

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

**Alcaloides isoquinolínicos e atividade citotóxica *in vitro* de  
*Hippeastrum canastrense* J. Dutilh & R. S. Oliveira  
(Amaryllidaceae)**

**Andressa Reis Vicente**

**Dissertação de Mestrado em Química**

**Vitória  
2016**

Andressa Reis Vicente

**Alcaloides isoquinolínicos e atividade citotóxica *in vitro* de  
*Hippeastrum canastrense* J. Dutilh & R. S. Oliveira  
(Amaryllidaceae)**

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

Orientador: Prof. Dr. Warley de Souza Borges

**Vitória  
2016**

**Alcaloides isoquinolínicos e atividade citotóxica *in vitro* de  
*Hippeastrum canastrense* J. Dutilh & R. S. Oliveira  
(Amaryllidaceae)**

Andressa Reis Vicente

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

---

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

---

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

---

**Prof. Dr. Márcio Fronza  
Universidade de Vila Velha**

---

**Prof. Dr. Murilo Marinho de Castro Lima  
Instituto Federal do Rio de Janeiro**

**Universidade Federal do Espírito Santo**

**Vitória, novembro de 2016.**

**Aos meus amados pais, obrigada por tudo.**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Ana Maria e Edson, meus maiores incentivadores, por acreditarem sempre em mim e por dedicarem suas vidas para me abençoar no crescimento intelectual e pessoal;

Aos meus irmãos, Elaine e Edinho, pelos momentos mais alegres da minha vida, estando sempre juntos, pela cumplicidade incondicional;

Às minhas sobrinhas Elizabeth e Alice, por me proporcionarem as risadas mais gostosas e os momentos mais divertidos;

Ao Gilson e à Luzia, por sempre me apoiarem e cuidarem de mim na distância dos meus pais;

Ao Professor Dr. Warley, pela oportunidade de trabalho, pela confiança, pelo apoio e atenção dedicada;

Aos meus amigos do laboratório, Marquinhos, Dudu, Karla, Raphael, Letícia, Amanda, Luisa, Carliani e especialmente à Vanessa, Carol e David, por tantas risadas, por tornarem o dia a dia mais alegre, os afazeres mais prazerosos, pelos conhecimentos repassados e por todo apoio emocional nos momentos mais difíceis;

Ao Jean, pela ajuda imprescindível nessa pesquisa, pelo socorro nos momentos de desespero, pelos conhecimentos compartilhados, pela amizade incondicional, pelos conselhos profissionais e pessoais, pela companhia sempre agradável, pelo apoio em todas as áreas que precisei durante esses dois anos;

Aos colegas do programa do mestrado, em especial Fernando Betim, Dedel, Eclair, Fernando Fogaça e Júlia pelos bons momentos de descontração, almoços e cafés animados;

À professora Edna Medeiros, pois seus ensinamentos na graduação foram essenciais e determinantes para que minha jornada nesses dois anos de trabalho fosse mais tranquila e confiante. Obrigada mais uma vez, pelos conselhos e pela amizade.

Ao Professor Dr. Jaume Bastida pelas análises de CG-EM e comparação com a biblioteca de alcaloides de Amaryllidaceae, pelas análises de RMN, pela paciência ao ensinar um pouco do que sabe sobre alcaloides de Amaryllidaceae;

Ao professor Dr. Márcio Fronza e a UVV pelas análises biológicas e pela disposição em ensinar a interpretação dos resultados;

À Fran, pelas análises biológicas realizadas, mas especialmente pela paciência e carinho ao me ensinar seus conhecimentos;

Aos Professores Dr. Álvaro Cunha Neto, Dr. Ricardo Küster e Dr. Márcio Fronza pelas sugestões para o aprimoramento do trabalho durante participação na banca de qualificação;

Ao laboratório de RMN do NCQP-UFES e ao Professor Dr. Álvaro Cunha Neto, Christiane Feijó, Júlia Leite e Mayara Modenesi pelas análises de RMN e claro, pela paciência com o grande volume de amostras todo mês;

Ao laboratório de Espectrometria de Massas da UFES de Goiabeiras, Alegre e São Mateus pelas análises de CG-EM;

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

À professora Dra. Luciana Dias Thomaz pelo depósito e registro da planta no Herbário VIES da UFES;

À Lilian e Heloá pelas análises de Massas de Alta Resolução e pela disposição em auxiliar na interpretação dos resultados;

À Faculdade Multivix e aos coordenadores Poline Fialho, Teresa Maté e Daniel Vivas pelo estímulo e compreensão nesses dois anos, e especialmente à Poliane Martins e Vânia Dias pela ajuda, apoio, amizade e disposição de sempre;

Aos amigos professores da Multivix, especialmente Luiz, Joãozito, Ronaldo, Valéria, Moacir, Ramiro, Thiago, Júlio, Silvana, Carol, Fabíola e Rachel por tornarem os meus dias de trabalho mais leves e divertidos, pelas gargalhadas, pelo apoio e incentivo de sempre;

Aos meus queridos alunos da Multivix, por me tornarem uma pessoa melhor, por me ensinarem tanto, pela compreensão quando precisei e pelos bons momentos em sala de aula;

Aos professores Ricardo Kuster, Márcio Fronza e Murilo Lima por aceitarem fazer parte da banca avaliadora deste trabalho;

À FAPES e CAPES pelo incentivo à pesquisa, especialmente à CAPES pelo incentivo financeiro;

Ao programa de pós-graduação em Química pela formação,

Obrigada!

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

~ - Aproximadamente

μ - Micro

μg - Microgramas

μM - Micromolar

<sup>13</sup>C - RMN de Carbono 13

1D - Uma dimensão

<sup>1</sup>H - RMN de hidrogênio

AcOEt - Acetato de Etila

ATCC – American Type Culture Collection

B - Extrato Bruto dos Bulbos

BA - Fração acetato de etila do extrato dos bulbos

BAM - Fração acetato de etila/metanol do extrato dos bulbos

BH - Fração hexânica do extrato dos bulbos

br - Largo

CCDC - Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CCDP - Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CD<sub>3</sub>OD - Metanol deuterado

CDCl<sub>3</sub> - Clorofórmio deuterado

CG-EM - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - Diclorometano

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**CLC** - Cromatografia líquida em Coluna

**CO<sub>2</sub>** – Gás carbônico

**COSY** - Homonuclear COrrrelation SpectroscopY

**d** - Dubleto

**dd** - Duplo dubleto

**ddd** - Duplo duplo dubleto

**dddd** - Duplo duplo duplo dubleto

**ddt** - Duplo duplo tripleto

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**dt** - Duplo tripleto

**Et<sub>2</sub>O** - Éter etílico

**g** - Gramas

**H** - Extrato Bruto das Hastes Florais

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** - Ácido sulfúrico

**HA** - Fração acetato de etila do extrato das hastes florais

**HAM** - Fração acetato de etila/metanol do extrato das hastes florais

**Hex** - Hexano

**HH** - Fração hexânica do extrato das hastes florais

**HMBC** - Heteronuclear Multiple Bond Correlation

**HRESIMS** – High-Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry

**HSQC** - Heteronuclear Single Quantum Correlation

**J** - Constante de acoplamento

**m** - Multipleteo

***m/z*** - Relação carga-massa

**Me** - Metil

**Me<sub>2</sub>CO** - Acetona

**MeOH** - Metanol

**mg** - Miligramas

**MHz** - MegaHertz

**mL** - Mililitros

**MTT** - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

**N<sub>2</sub>** – Nitrogênio

**Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** - Sulfato de sódio

**NADPH** - Hidrogênio fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

**NH<sub>3</sub>** - Amônia

**NH<sub>4</sub>OH** - Hidróxido de amônio

**NOESY** - Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

**o** - orto

**°C** – Graus Celsius

**φ** - Diâmetro

**p** - para

**pH** - Potencial Hidrogeniônico

**ppm** - Partes por milhão

**q** - Quadrupeto

**R<sub>f</sub>** - Fator de retenção

**RMN de <sup>13</sup>C**- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

## **RMN de $^1\text{H}$** - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1

**s** - Singleto

**t** - Tripleto

**UV** - Ultravioleta

**$\alpha$**  - Alfa

**$\beta$**  - Beta

**$\delta$**  - Deslocamento químico em partes por milhão

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1:</b> Preparação dos extratos brutos H e B.....	48
<b>Esquema 2:</b> Extração ácido-base de H e B: obtenção dos extratos HH, HA, HAM, BH, BA, BAM.....	49
<b>Esquema 3:</b> Fracionamento por CLC do extrato HA.....	51
<b>Esquema 4:</b> Fracionamento por CLC do extrato HH.....	52
<b>Esquema 5:</b> Fracionamento por CLC do extrato BH.....	54
<b>Esquema 6:</b> Fracionamento por CLC das frações BH1 e BH1.1.....	56
<b>Esquema 7:</b> Fracionamento por CLC das frações BH3, BH3.3 e BH3.4.....	58
<b>Esquema 8:</b> Fracionamento por CLC do extrato BA.....	60
<b>Esquema 9:</b> Fracionamento por CLC da fração BA2.....	62
<b>Esquema 10:</b> Fracionamento por CLC da subfração BA2.3.....	63
<b>Esquema 11:</b> Fracionamento por CLC da subfração BA2.4.....	64
<b>Esquema 12:</b> Fracionamento por CLC das subfrações BA2.5 e BA2.5.1.....	66
<b>Esquema 13:</b> Resumo do ensaio biológico realizado em extratos/compostos de <i>H. canastrense</i> .....	70

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura química da bixina, principal corante do urucum, um corante natural utilizado por tribos indígenas.....	27
<b>Figura 2:</b> Estrutura química da coniina, o principal constituinte do veneno de Hemlock.....	28
<b>Figura 3:</b> Estrutura química da morfina, salicina e ácido acetilsalicílico.....	29
<b>Figura 4:</b> Estrutura química dos aminoácidos L-fenilalanina e L-tirosina e o intermediário O-metilnorbeladina.....	32
<b>Figura 5:</b> Acoplamento fenol oxidativo em alcaloides de Amaryllidaceae.....	34
<b>Figura 6:</b> Esqueletos típicos dos alcaloides da subfamília Amaryllidoideae .....	35
<b>Figura 7:</b> <i>Hippeastrum canastrense</i> J. Dutilh & R. S. Oliveira.....	39
<b>Figura 8:</b> Estrutura dos alcaloides identificados por CG-EM nos extratos brutos de <i>H. canastrense</i> .....	73
<b>Figura 9:</b> Estrutura dos alcaloides identificados por CG-EM das hastes florais de <i>H. canastrense</i> .....	75
<b>Figura 10:</b> Estrutura dos alcaloides identificados por CG-EM dos bulbos de <i>H. canastrense</i> .....	78
<b>Figura 11:</b> Estrutura dos alcaloides isolados de <i>Hippeastrum canastrense</i> .....	79
<b>Figura 12:</b> Estrutura do alcaloide homolicorina.....	80
<b>Figura 13:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>2</b> e ampliações ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, 400 MHz).....	82
<b>Figura 14:</b> Estrutura química dos isômeros de posição 8 e 9-O-2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina, respectivamente.....	83
<b>Figura 15:</b> Estrutura química do alcaloide 8-O-2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina ( <b>2</b> ).....	84
<b>Figura 16:</b> Espectro de NOESY $^1\text{H}$ do composto <b>2</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, 400 MHz)	85
<b>Figura 17:</b> Espectro de COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ do composto <b>2</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, 400 MHz).	86
<b>Figura 18:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>3</b> e ampliações ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 25 °C, 400 MHz).....	88
<b>Figura 19:</b> Espectro de NOESY $^1\text{H}$ do composto <b>3</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 25 °C, 400 MHz)..	89
<b>Figura 20:</b> Espectro de COSY $^1\text{H}$ do composto <b>3</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 25 °C, 400 MHz)....	90

<b>Figura 21:</b> Estrutura química do alcaloide 7-metoximasonina ( <b>3</b> ).....	91
<b>Figura 22:</b> Mapa de contornos HSQC do composto <b>3</b> (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz).....	92
<b>Figura 23:</b> Mapa de contornos HMBC do composto <b>3</b> (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz).....	93
<b>Figura 24:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do composto <b>3</b> (CD <sub>3</sub> OD, 25 °C, 100 MHz)	94
<b>Figura 25:</b> Espectro de massas de alta resolução da 7-metoximasonina ( <b>3</b> ).....	96
<b>Figura 26:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto <b>4</b> e ampliações (CDCl <sub>3</sub> , 25 °C, 400 MHz).....	98
<b>Figura 27:</b> Estrutura química do alcaloide hipeastrina ( <b>4</b> ).....	99
<b>Figura 28:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto <b>5</b> e ampliações (CDCl <sub>3</sub> , 25 °C, 400 MHz).....	101
<b>Figura 29:</b> Estrutura química do alcaloide candimina ( <b>5</b> ).....	102
<b>Figura 30:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto <b>6</b> e ampliações (CD <sub>3</sub> OD, 25 °C, 400 MHz).....	104
<b>Figura 31:</b> Espectro de NOESY <sup>1</sup> H do composto <b>6</b> (CDCl <sub>3</sub> , 25 °C, 400 MHz)	106
<b>Figura 32:</b> Espectro de COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H do composto <b>6</b> (CDCl <sub>3</sub> , 25 °C, 400 MHz)	107
<b>Figura 33:</b> Estrutura química do alcaloide 2-O-metilcandimina ( <b>6</b> ).....	108
<b>Figura 34:</b> Mapa de contornos HSQC do composto <b>6</b> (CDCl <sub>3</sub> , 25 °C, 400 MHz)	109
<b>Figura 35:</b> Mapa de contornos HMBC do composto <b>6</b> (CDCl <sub>3</sub> , 25 °C, 400 MHz)	110
<b>Figura 36:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do composto <b>6</b> (CDCl <sub>3</sub> , 25 °C, 100 MHz)..	111
<b>Figura 37:</b> Espectro de massas de alta resolução da 2-O-metilcandimina ( <b>6</b> )....	113
<b>Figura 38:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto <b>7</b> e ampliações (CDCl <sub>3</sub> , 25 °C, 400 MHz).....	115
<b>Figura 39:</b> Estrutura química do alcaloide 7-metoxi-O-metillicorenina ( <b>7</b> ).....	116
<b>Figura 40:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto <b>8</b> e ampliações (CDCl <sub>3</sub> , 25 °C, 400 MHz).....	118
<b>Figura 41:</b> Estrutura química do alcaloide albomaculina ( <b>8</b> ).....	119
<b>Figura 42:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto <b>9</b> em mistura e ampliações (CDCl <sub>3</sub> , 25 °C, 400 MHz).....	121
<b>Figura 43:</b> Estrutura química do alcaloide isolado homolicorina ( <b>9</b> ).....	122

<b>Figura 44:</b> Cromatograma do isolamento do composto <b>9</b> por CLAE.....	122
<b>Figura 45:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>9</b> isolado por CLAE e ampliações ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, 400 MHz).....	124
<b>Figura 46:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>11</b> e ampliações ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, 400 MHz).....	126
<b>Figura 47:</b> Espectro de COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ do composto <b>11</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, 400 MHz)	127
<b>Figura 48:</b> Espectro de NOESY $^1\text{H}$ do composto <b>11</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, 400 MHz)	128
<b>Figura 49:</b> Estrutura química do alcaloide 7-metoxinormasonina ( <b>11</b> ).....	129
<b>Figura 50:</b> Mapa de contornos HSQC do composto <b>11</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	130
<b>Figura 51:</b> Mapa de contornos HMBC 1 do composto <b>11</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	131
<b>Figura 52:</b> Mapa de contornos HMBC 2 do composto <b>11</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	132
<b>Figura 53:</b> Espectro de massas de alta resolução da 7-metoxinormasonina ( <b>11</b> ).....	134
<b>Figura 54:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>12</b> e ampliações ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, 400 MHz).....	136
<b>Figura 55:</b> Estrutura química do alcaloide 2 $\alpha$ -metoxihomolicorina ( <b>12</b> ).....	137
<b>Figura 56:</b> Espectro de massas de alta resolução da 2 $\alpha$ -metoxihomolicorina ( <b>12</b> ).....	138
<b>Figura 57:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>13</b> e ampliações ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, 400 MHz).....	140
<b>Figura 58:</b> Estrutura química dos isômeros de posição 8 e 9-O-desmetilhomolicorina, respectivamente.....	139
<b>Figura 59:</b> Espectro de NOESY 1D do composto <b>13</b> e ampliação ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 25 °C, 400 MHz).....	142
<b>Figura 60:</b> Estrutura química do alcaloide 8-O-desmetilhomolicorina ( <b>13</b> ).....	141
<b>Figura 61:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>15</b> e ampliações ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, 400 MHz).....	144
<b>Figura 62:</b> Estrutura química do alcaloide 2 $\alpha$ ,7-dimetoxihomolicorina ( <b>15</b> ).....	145
<b>Figura 63:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ dos compostos <b>16</b> e <b>17</b> e ampliações ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, 400 MHz).....	147

<b>Figura 64:</b> Estrutura química do alcaloide 2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina ( <b>16</b> ).....	149
<b>Figura 65:</b> Estrutura química do alcaloide 2 $\alpha$ -hidroxialbomaculina ( <b>17</b> ).....	150
<b>Figura 66:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>18</b> e ampliações ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, 400 MHz).....	152
<b>Figura 67:</b> Mapa de contornos HSQC do composto <b>18</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	153
<b>Figura 68:</b> Estrutura química do alcaloide masonina ( <b>18</b> ).....	154
<b>Figura 69:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>19</b> e ampliações ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, 400 MHz).....	156
<b>Figura 70:</b> Estrutura química do alcaloide normasonina ( <b>19</b> ).....	157
<b>Figura 71:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>20</b> e ampliações ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, 400 MHz).....	159
<b>Figura 72:</b> Estrutura química do alcaloide nerinina ( <b>20</b> ).....	160
<b>Figura 73:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>10</b> e ampliações ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 25 °C, 400 MHz).....	162
<b>Figura 74:</b> Estrutura química do alcaloide licorina ( <b>10</b> ).....	163
<b>Figura 75:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>14</b> e ampliações ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 25 °C, 400 MHz).....	165
<b>Figura 76:</b> Estrutura química dos isômeros de posição 8 e 9- <i>O</i> -desmetilpluviina, respectivamente.....	166
<b>Figura 77:</b> Espectro de NOESY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ do composto <b>14</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 25 °C, 400 MHz).....	167
<b>Figura 78:</b> Estrutura química do alcaloide norpluviina ( <b>14</b> ).....	168
<b>Figura 79:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>1</b> e ampliações ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, 400 MHz).....	170
<b>Figura 80:</b> Estrutura química do alcaloide sanguinina ( <b>1</b> ).....	171
<b>Figura 81:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>21</b> e ampliações ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, 400 MHz).....	173
<b>Figura 82:</b> Estrutura química do alcaloide trisfaeridina ( <b>21</b> ).....	174
<b>Figura 83:</b> Esqueletos dos compostos identificados em <i>Hippeastrum canastrense</i> .....	177

<b>Figura 84:</b> Massa dos alcaloides isolados de <i>Hippeastrum canstrense</i> (mg).....	178
<b>Figura 85:</b> Valores de IC <sub>50</sub> de alcaloides de <i>Hippeastrum canastrense</i> ( $\mu\text{M}$ ).....	179
<b>Figura 86:</b> Valores de IC <sub>50</sub> dos extratos de <i>Hippeastrum canastrense</i> ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).....	180

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Compostos isolados por CCDP das frações de HA, identificados por RMN.....	51
<b>Tabela 2:</b> Compostos isolados por CCDP das frações de HH.....	53
<b>Tabela 3:</b> Compostos isolados por CCDP das frações e subfrações do extrato hexânico dos bulbos (BH), identificados por RMN.....	59
<b>Tabela 4:</b> Compostos isolados por CCDP das frações e subfrações do extrato acetato de etila dos bulbos (BA), identificados por RMN.....	67
<b>Tabela 5:</b> Dados de Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas dos extratos brutos das hastes florais e bulbos de <i>H. canastrense</i> .....	72
<b>Tabela 6:</b> Dados de Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas dos extratos das hastes florais de <i>Hippeastrum canastrense</i> .....	74
<b>Tabela 7:</b> Alcaloides identificados por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas de frações das hastes florais .....	74
<b>Tabela 8:</b> Alcaloides identificados por CG-EM nos extratos BA e BH de <i>H. canastrense</i> .....	76
<b>Tabela 9:</b> Dados de Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas das frações dos bulbos de <i>Hippeastrum canastrense</i> .....	77
<b>Tabela 10:</b> Comparação entre os $\delta$ do composto <b>2</b> e 9-O-desmetil-2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina (200 MHz).....	83
<b>Tabela 11:</b> Dados espectrais de RMN da 8-O-desmetil-2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina ( <b>2</b> ).....	84
<b>Tabela 12:</b> Comparação entre os $\delta$ do composto <b>3</b> e o alcaloide masonina (400 MHz).....	91
<b>Tabela 13:</b> Resumo dos dados espectrais de Ressonância Magnética Nuclear uni e bidimensionais do alcaloide 7-Metoximasonina ( <b>3</b> ).....	95
<b>Tabela 14:</b> Comparação entre os $\delta$ do composto <b>4</b> e o alcaloide hipeastrina (500 MHz).....	99

<b>Tabela 15:</b> Comparação entre os $\delta$ do composto <b>5</b> e o alcaloide candimina (500 MHz).....	102
<b>Tabela 16:</b> Comparação entre os $\delta$ do composto <b>6</b> e o alcaloide candimina (500 MHz).....	105
<b>Tabela 17:</b> Resumo dos dados espectrais de Ressonância Magnética Nuclear uni e bidimensionais do alcaloide 2-O-metilcandimina ( <b>6</b> ).....	112
<b>Tabela 18:</b> Comparação entre os $\delta$ do composto <b>7</b> e o alcaloide 7-metoxi-O-metillicorenina (500 MHz).....	116
<b>Tabela 19:</b> Comparação entre os $\delta$ do composto <b>8</b> e o alcaloide albomaculina (400 MHz).....	119
<b>Tabela 20:</b> Comparação entre os $\delta$ do composto <b>9</b> e o alcaloide homolicorina (200 MHz).....	120
<b>Tabela 21:</b> Comparação entre os $\delta$ do composto <b>11</b> e o alcaloide normasonina (400 MHz).....	129
<b>Tabela 22:</b> Resumo dos dados espectrais de Ressonância Magnética Nuclear uni e bidimensionais do alcaloide 7- metoxinormasonina ( <b>11</b> ).....	133
<b>Tabela 23:</b> Comparação entre os $\delta$ do composto <b>12</b> e o alcaloide homolicorina (200 MHz).....	137
<b>Tabela 24:</b> Comparação entre os $\delta$ do composto <b>13</b> e o alcaloide 8-O-desmetilhomolicorina (400 MHz).....	141
<b>Tabela 25:</b> Comparação entre os $\delta$ do composto de <b>15</b> e 2 $\alpha$ , 7-dimetoxihomolicorina (500 MHz).....	145
<b>Tabela 26:</b> Comparação entre os $\delta$ do composto de <b>16</b> e 2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina (250 MHz).....	148
<b>Tabela 27:</b> Comparação entre os $\delta$ do composto de <b>17</b> e 2 $\alpha$ -hidroxialbomaculina (400 MHz).....	149
<b>Tabela 28:</b> Comparação entre os $\delta$ do composto de <b>18</b> e o alcaloide masonina (400 MHz).....	151
<b>Tabela 29:</b> Comparação entre os $\delta$ de $^{13}\text{C}$ do composto <b>18</b> e o alcaloide masonina (100 MHz).....	154

<b>Tabela 30:</b> Comparação entre os $\delta$ do composto de <b>19</b> e normasonina (400 MHz).....	155
<b>Tabela 31:</b> Comparação entre os $\delta$ do composto de <b>20</b> e nerinina (400MHz)....	160
<b>Tabela 32:</b> Comparação entre os $\delta$ do composto de <b>10</b> e licorina (300 MHz).....	163
<b>Tabela 33:</b> Comparação entre os $\delta$ do composto de <b>14</b> e norpluviina (400 MHz)	168
<b>Tabela 34:</b> Comparação entre os $\delta$ do composto de <b>1</b> e sanguinina (250 MHz)	171
<b>Tabela 35:</b> Comparação entre os $\delta$ do composto de <b>21</b> e trisfaeridina (200 MHz).....	172
<b>Tabela 36:</b> Resultados de IC <sub>50</sub> dos ensaios biológicos realizados nos extratos e em compostos isolados de <i>Hippeastrum canastrense</i> .....	175

## RESUMO

A família de Amaryllidaceae encontra-se entre as 20 famílias de plantas mais aplicadas como agentes terapêuticos contra diversas doenças. Uma característica relevante desta família é a presença de um grupo exclusivo de alcaloides, que possuem uma gama de atividades biológicas relevantes como antitumoral, antibacteriano, antifúngica, antimalárica, antiviral, analgésica, antiparasitária e atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase.

Neste trabalho é relatado o estudo químico dos alcaloides presentes nas hastes florais e bulbos da espécie *Hippeastrum canastrense*, uma espécie endêmica do Brasil e que até o presente momento não apresenta estudos concernentes ao seu conteúdo alcaloídico, além da investigação da citotoxicidade dos extratos e alcaloides isolados em células tumorais. Neste sentido, foi realizada a extração ácido-base dos extratos metanólicos das partes de *H. canastrense*, seguida por técnicas cromatográficas de separação, com o objetivo de isolar os alcaloides presentes na espécie. Foram identificados 40 alcaloides por CG-EM, e isolados 16 alcaloides já conhecidos: sanguinina (1), hipeastrina (4), candimina (5), 7-Metoxi-O-metillicorenina (7), albomaculina (8), homolicorina (9), licorina (10), 8-O-desmetilhomolicorina (13), norpluviina (14), 2 $\alpha$ ,7-diMetoxihomolicorina (15), 2 $\alpha$ -Hidroxihomolicorina (16), 2 $\alpha$ -Hidroxialbomaculina (17), masonina (18), normasonina (19), nerinina (20), e trisfaeridina (21). Foram também isolados de cinco compostos pela primeira vez, 8-O-desmetil-2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina (2), 7-metoximasonina (3), 2-O-metilcandimina (6), 7-metoxinormasonina (11) e 2 $\alpha$ -metoxihomolicorina (12). Os extratos brutos e enriquecidos em alcaloides, assim como os alcaloides 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 19 e 20 foram ensaiados quanto à citotoxicidade em células de normais de fibroblastos e células tumorais de câncer de mama, fígado e pâncreas.

Os alcaloides hipeastrina, candimina e licorina apresentaram efeito citotóxico em todas as linhagens de células testadas. Os menores valores de IC<sub>50</sub> para a hipeastrina e candimina foram observados para a linhagem de carcinoma pancreático humano, enquanto o alcaloide licorina apresentou menor valor de IC<sub>50</sub> para as células de carcinoma hepatocelular. Os extratos brutos de *Hippeastrum*

*canastrense* apresentaram notável citotoxicidade em células tumorais, principalmente em células de carcinoma hepatocelular. Os extratos acetato de etila enriquecidos em alcaloides dos bulbos e hastes florais, assim como o extrato hexano dos bulbos expressaram um relevante potencial citotóxico em células tumorais, sendo os extratos dos bulbos mais seletivos.

**Palavras-chave:** Amaryllidaceae, *Hippeastrum*, alcaloides, esqueleto homolicorina, citotoxicidade, câncer.

## ABSTRACT

The Amaryllidaceae family lies between the 20 most applied plant families as therapeutic agents against various diseases. An important characteristic of this family is the presence of a unique group of alkaloids, exhibiting several biological activities such as antitumor, antibacterial, antifungal, antimalarial, antiviral, analgesic, and antiparasitic and acetylcholinesterase inhibition.

This work presents a chemical study of the alkaloids content found in the bulbs and flowerly stems of *Hippeastrum canastrense*, an endemic species from Brazil that notably has no studies concerning its chemical components so far. In addition, the investigation of the cytotoxicity effects of the extracts and alkaloids isolated were carried out with tumor cells assays. Therefore, a classical acid-base extraction of methanol extracts of both parts of *H. canastrense* was performed, followed by chromatographic separation techniques in order to isolate the alkaloids present in the species. The GC-MS analysis was able to identify 40 alkaloids, and 16 well-known alkaloids were isolated: sanguinine (1), hippeastrine (4), candimine (5), 7-methoxy-O-methyllycorine (7), albomaculine (8), homolycorine (9), lycorine (10), 8-O-demethylhomolycorine (13), norpluviine (14), 2 $\alpha$ ,7-dimethoxyhomolycorine (15), 2 $\alpha$ -hydroxihomolycorine (16), 2 $\alpha$ -hydroxialbomaculine (17), masonine (18), normasonine (19), nerinine (20), e trisphaeridine (21), and yet five novel alkaloids here reported as 8-O-demethyl-2 $\alpha$ -hydroxihomolycorine (2), 7-methoxymasonine (3), 2-O-methylcandimine (6), 7-methoxynormasonine (11) e 2 $\alpha$ -methoxyhomolycorine (12). The crude extracts and enriched extracts, as well as the compounds 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 19 e 20 were evaluated for their cytotoxicity in normal fibroblast-cells and also for breast, liver and panceas tumor-cells.

The alkaloids hippeastrine, candimine and lycorine showed significant cytotoxic effect in all assays. The lowest IC<sub>50</sub> values for hippeastrine and candimine were obtained for human pancreatic carcinoma cells, while for lycorine was in hepatocellular carcinoma cells assays. The crude extracts of *Hippeastrum canastrense* showed remarkable cytotoxicity in tumor cells especially in hepatocellular carcinoma cells. The ethyl acetate alkaloids-enriched extracts from the flowerly stems and bulbs, along with the hexane extract from bulbs expressed a

relevant cytotoxic potential in tumor cells. However, bulbs extracts appears to be most selective then the extracts of flowerly stems.

**Keywords:** Amaryllidaceae, *Hippeastrum*, alkaloids, homolycorine-type, cytotoxicity, cancer.

## SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO .....	27
1.1 – Produtos naturais .....	27
1.2 – Família Amaryllidaceae .....	31
1.2.1 – Alcaloides de Amaryllidoideae .....	32
1.3 – O gênero <i>Hippeastrum</i> Herb. ....	37
1.3.1 – <i>Hippeastrum canastrense</i> J. Dutilh & R. S. Oliveira .....	38
1.4 – Câncer .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b> 39
1.4.1 – Câncer no Brasil .....	40
1.4.2 – Produtos naturais x Câncer .....	41
2 – OBJETIVOS .....	44
2.1 – Objetivos gerais .....	44
2.2 – Objetivos específicos .....	44
3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	45
3.1 – Materiais, técnicas e e equipamentos em geral .....	45
3.2 – Coleta de <i>Hippeastrum canastrense</i> .....	47
3.3 – Preparação dos extratos brutos .....	47
3.4 – Extração ácido-base .....	48
3.4.1 – Hastes florais e bulbos.....	48
3.5 – Fracionamento cromatográfico e isolamento de alcaloides .....	50
3.5.1 – Hastes florais .....	50
3.5.1.1 – Fracionamento de HA.....	50
3.5.1.2 – Fracionamento de HH.....	52
3.5.2 – Bulbos.....	53
3.5.2.1 – Fracionamento de BH.....	53
3.5.2.2 – Fracionamento de BA.....	60
3.6 – Ensaio Biológicos de citotoxicidade .....	68

3.6.1 – Manutenção das linhagens de células .....	68
3.6.2 –Ensaio de citotoxicidade .....	68
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
4.1 – Compostos identificados por CG-EM.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b> 71
4.2 – Compostos isolados .....	78
4.2.1 – Compostos com esqueleto do tipo homolicorina .....	80
4.2.1.1 – Composto <b>2</b> .....	81
4.2.1.2 – Composto <b>3</b> .....	87
4.2.1.3 – Composto <b>4</b> .....	97
4.2.1.4 – Composto <b>5</b> .....	100
4.2.1.5 – Composto <b>6</b> .....	103
4.2.1.6 – Composto <b>7</b> .....	114
4.2.1.7 – Composto <b>8</b> .....	117
4.2.1.8 – Composto <b>9</b> .....	120
4.2.1.9 – Composto <b>11</b> .....	125
4.2.1.10 – Composto <b>12</b> .....	135
4.2.1.11 – Composto <b>13</b> .....	139
4.2.1.12 – Composto <b>15</b> .....	143
4.2.1.13 – Compostos <b>16 e 17</b> .....	146
4.2.1.14 – Composto <b>18</b> .....	150
4.2.1.15 – Composto <b>19</b> .....	155
4.2.1.16 – Composto <b>20</b> .....	157
4.2.2 – Compostos com esqueleto do tipo licorina .....	161
4.2.2.1 – Composto <b>10</b> .....	161
4.2.2.2 – Composto <b>14</b> .....	164
4.2.3 – Compostos com esqueleto do tipo galantamina .....	168
4.2.3.1 – Composto <b>1</b> .....	169

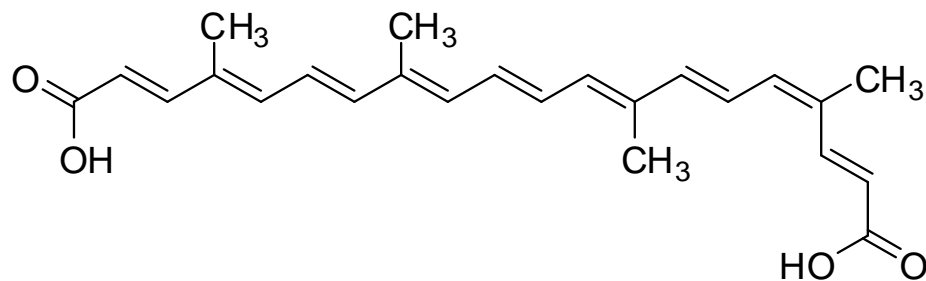
4.2.4 – Compostos com esqueleto do tipo narciclasina .....	172
4.2.4.1 – Composto <b>21</b> .....	172
4.3 – Avaliação da atividade citotóxica dos extratos e alcaloides isolados .....	174
4.4 – Resumo dos resultados .....	176
5 – CONCLUSÃO.....	181
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	182
ANEXO A: Eluentes utilizados nos fracionamentos por CLC .....	194
ANEXO B: Sistema de solventes em CCDP, fatores de retenção e rendimento em massa dos compostos isolados.....	183

# 1 – INTRODUÇÃO

## 1.1 – Produtos naturais

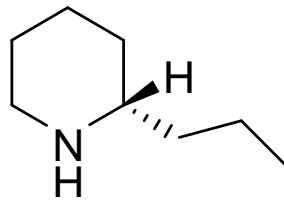
O uso de recursos naturais como fonte de sobrevivência à vida humana é relatado desde os tempos antigos no tratamento de doenças e enfermidades (DIAS, URBAN, ROESSNER, 2012). Há registros de civilizações bastante antigas que faziam uso de produtos naturais em múltiplas circunstâncias, tais como unguentos e óleos em rituais religiosos e festivos, chás na cura de doenças, venenos contra inimigos e presas, bálsamos, corantes, entre outras aplicações (BARREIRO, BOLZANI, 2009).

Corantes naturais tais como a bixina, popularmente conhecido como urucum (figura 1), eram usados para fins estéticos, religiosos e proteção por tribos indígenas americanas, a tintura era feita com as sementes do ouriço (*Bixa orellana*) (PINTO, 1995).



**Figura 1:** Estrutura química da bixina, o principal corante do urucum, um corante natural utilizado por tribos indígenas

Na Idade antiga, muitos venenos naturais foram descobertos e utilizados para fins de proteção, caça e até mesmo na execução de prisioneiros. O veneno de Hemlock, cujo principal constituinte é a coniina (figura 2) era obtido da cicuta (*Conium maculatum*), e foi utilizado para executar Sócrates, durante o império Grego. O veneno provocava paralisia muscular gradual seguida de convulsões e morte por paralisia respiratória (PINTO, 1995; VIEGAS JÚNIOR, BOLZANI, BARREIRO, 2006; DEWICK, 2002).



**Figura 2:** Estrutura química da coniina, o principal constituinte do veneno de Hemlock

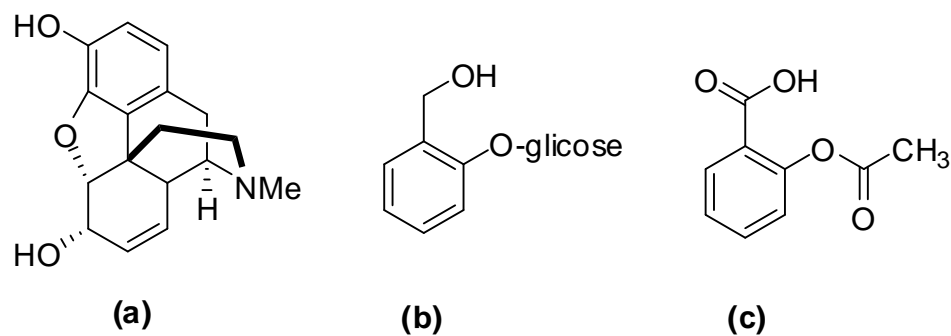
Dentre os vários tipos de recursos naturais essenciais à vida humana, os recursos biológicos, que englobam as matas e florestas, foram incessantemente explorados como forma de amenizar ou até mesmo sanar enfermidades dos povos, ainda que o conhecimento a respeito dos vegetais utilizados eram conhecimentos populares e não-científicos (NOGUEIRA *et al.*, 2009) e, talvez, uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais tenha sido ao ingerir ervas e folhas de plantas, devido ao alívio e cura de doenças encontrados (VIEGAS JÚNIOR, BOLZANI, BARREIRO, 2006).

Por milhares de anos a medicina tradicional esteve associada à produtos naturais provenientes principalmente de plantas como forma de medicamentos. Em muitos casos, os componentes bioativos ainda não eram identificados e a eficácia e aplicação dos medicamentos eram baseados em eventos experimentais com decorrer dos séculos (DIAS, URBAN, ROESSNER, 2012; BUTLER, 2004). Os numerosos relatos favoráveis ao uso de plantas no auxílio e combate às doenças, despertou um grande interesse em cientistas da época em buscar esclarecimentos sobre o porquê e como esses vegetais apresentavam tais efeitos medicamentosos. Portanto o convívio com diversos grupos étnicos e o aprendizado herdado da cultura dos mais diferentes povos, desempenhou um papel fundamental para o desenvolvimento da pesquisa em plantas, mais especificamente em produtos naturais (VIEGAS JUNIOR, BOLZANI, BARREIRO, 2006).

Diante de inúmeras indagações, pesquisadores do século XIX, desenvolveram técnicas que possibilitaram estudar as substâncias responsáveis pela ação medicinal das plantas conhecidas apenas empiricamente pelas civilizações da antiguidade, impulsionando a progressão tecnológica e o

desenvolvimento científico no ramo da obtenção de novos fármacos a partir de produtos naturais (VIEGAS JUNIOR *et al.*, 2006).

Os estudos químicos, farmacológicos e clínicos dos medicamentos tradicionais, levaram ao desenvolvimento dos primeiros fármacos, como por exemplo a Aspirina<sup>®</sup> e a morfina (DIAS, URBAN, ROESSNER, 2012; BUTLER, 2004). A morfina é um produto natural conhecido há séculos por suas propriedades anagésicas e soporíferas, sendo isolado pela primeira vez dos bulbos de *Papaver somniferum*, enquanto a Aspirina<sup>®</sup> (ácido acetilsalicílico), também utilizada como analgésico, é um medicamento inspirado em um produto natural, a salicina, extraída de *Salix alba* (figura 3) (VIEGAS JUNIOR, BOLZANI, BARREIRO, 2006; BRAGA e CASTILHO, 2011).



**Figura 3:** Estrutura química da morfina (a), salicina (b) e ácido acetilsalicílico (c)

No passado, a maioria dos fármacos utilizados foram descobertos originalmente de plantas ou inspirados em compostos extraídos destas (HARVEY *et al.* 2015), e ainda nos dias de hoje, somam-se quase 40% os medicamentos de moléculas pequenas que foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA), onde os esses fármacos são produtos naturais, inspirados ou derivados sinteticamente de produtos naturais, ou ainda, possuem como farmacóforo um produto natural, isto é, os produtos naturais continuam desempenhando um papel significativo no processo da descoberta, na inspiração e no desenvolvimento de fármacos (HARVEY *et al.* 2015; NEWMAN, CRAGG, 2012; NEWMAN, CRAGG, 2016).

Os produtos naturais são, em geral, metabólitos secundários com uma grande variedade estrutural, e são encontrados e produzidos por organismos específicos por estímulos do meio ou adaptação à ele, para sobrevivência da planta contra insetos, fungos, bactérias, clima e etc. (DIAS, URBAN, ROESSNER, 2012; STROHL, 2000). Alguns dos metabólitos apresentam-se como importantes matérias-primas para a produção de fármacos, pois são utilizados como farmacóforos uma vez que muitos deles são biologicamente ativos (HARVEY *et al.* 2015; STROHL, 2000; BARREIRO e BOLZANI, 2009).

A saúde é um dos principais fatores que impulsionam o desenvolvimento da ciência. Diante de tantas doenças que assolam a sociedade, o desafio de pesquisadores do mundo inteiro tem sido em encontrar a cura para tais patologias (CRAGG e NEWMAN, 2013).

A biodiversidade no planeta é imensurável, e apesar de existirem inúmeras espécies de plantas conhecidas e estudadas, relata-se que menos de 10% dessa biodiversidade foram avaliadas quanto ao potencial de atividade biológica advindo de seus metabólitos (DIAS, URBAN, ROESSNER, 2012; HARVEY, 2008). A natureza é o maior aliado dos cientistas nessa busca, devido à grande diversidade de plantas que têm conduzido a descoberta de compostos clinicamente benéficos, que desempenham um importante papel no tratamento de doenças. Portanto, o desafio de acessar essa diversidade química e, por consequência, descobrir possíveis produtos naturais úteis para a medicina contemporânea, tem feito do objetivo de muitos pesquisadores, encontrar habitats ainda não explorados (DIAS, URBAN, ROESSNER, 2012, COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010).

O Brasil é considerado o país com maior biodiversidade do mundo (KATO, 2001), possuindo entre 10 a 20% do número total de espécies de plantas conhecidas no planeta (ROMÃO *et al.*, 2015). Por possuir várias zonas climáticas distintas, apresenta muitas diferenças ecológicas, formando então, diferentes biomas tais como o Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Floresta Amazônica, Pantanal, Manguezal, entre outros (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010).

## 1.2 – Família Amaryllidaceae

Dentre as diversas espécies encontradas no Brasil, estão as plantas da família Amaryllidaceae. Esta família compreende três subfamílias Agapanthoideae, Allioideae e Amaryllidoideae, devido à união das antigas famílias Agapanthaceae, Alliaceae e Amaryllidaceae em uma única família (CHASE, REVEAL, FAY, 2009). Entretanto as espécies da subfamília Amaryllidoideae ainda são comumente denominadas como espécies de Amaryllidaceae.

A família Amaryllidaceae é uma família de plantas bulbosas, monocotiledôneas, distribuídas em regiões temperadas e quentes do mundo (JIN, 2011). A família compreende cerca de 70 gêneros e 1600 espécies com ampla distribuição mundial (CANDIDO *et al.*, 2013), das quais 75 são endêmicas do Brasil, estando presentes em todas as regiões do País (DUTILH *et al.*, 2013; de ANDRADE *et al.*, 2012). No Brasil são reconhecidos 18 gêneros e 135 espécies de Amaryllidaceae (DUTILH e OLIVEIRA, 2015).

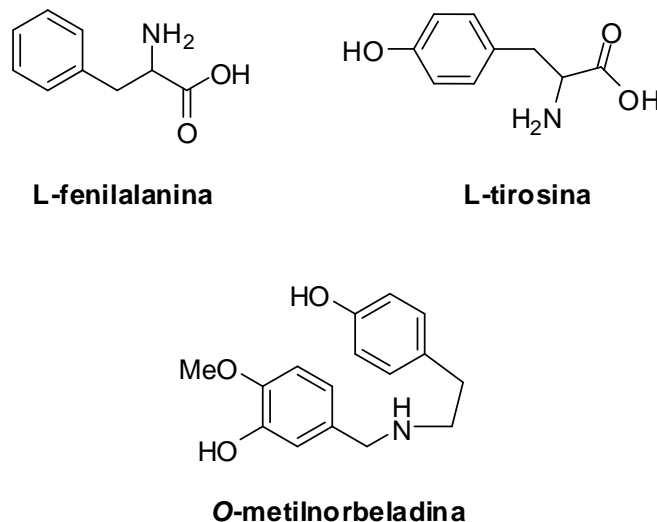
As plantas da família Amaryllidaceae se encontram entre as 20 famílias de plantas mais aplicadas como agentes terapêuticos contra várias doenças (JIN, 2013), sendo utilizadas por milhares de anos como remédios herbais na medicina tradicional (BASTIDA, *et al.*, 2011; LOUW, *et al.*, 2002) como no tratamento de doenças urinárias ou venéreas, problemas gastrointestinais e respiratórios, dores de cabeça, febre, inchaços, hematomas, fraturas entre muitos outros (LOUW, *et al.*, 2002; STAFFORD, *et al.*, 2008). Ainda, são muito utilizadas no comércio para ornamentação devido à beleza de suas flores.

Como grande parte dos vegetais, as espécies de Amaryllidoideae apresentam muitos produtos naturais tais como alcaloides, compostos fenólicos, flavonoides, glicosídeos, entre outros (JIN, 2011), e por cerca de 200 anos os alcaloides obtidos dos extratos das plantas desta família tem sido alvo de estudos químicos e biológicos (BASTIDA, *et al.*, 2011), uma vez que esta família apresenta como característica relevante a presença de um exclusivo grupo de alcaloides, conhecidos como alcaloides de Amaryllidaceae, que já foram isolados de plantas de todos os gêneros dessa família (BASTIDA, *et al.*, 2011).

O primeiro alcaloide a ser isolado foi a licorina. A literatura relata que esta substância foi obtida de *Lycoris radiata* em 1877, e desde então, a descoberta de novos alcaloides permanece em expansão (BASTIDA, *et al.*, 2011). Atualmente já foram isolados cerca de 500 alcaloides de Amaryllidaceae (JIN, 2013; BASTIDA, *et al.*, 2011), onde muitos, apresentam atividades biológicas relevantes (HE *et al.*, 2015), embora ainda sejam fontes de compostos relativamente inexplorados (JIN, 2013; BASTIDA, *et al.*, 2011).

### 1.2.1 – Alcaloides de Amaryllidoideae

Os alcaloides são compostos orgânicos que contém nitrogênio em suas estruturas, geralmente em um estado de oxidação negativo, e que provém direta ou indiretamente do metabolismo de aminoácidos (GURIB-FANKIM, 2006), em alcaloides de Amaryllidoideae os aminoácidos L-tirosina e L-fenilalanina dão origem ao intermediário chave O-metilnorbeladina (figura 4) (BASTIDA *et al.*, 2006). Os alcaloides são metabólitos secundários com distribuição restrita na natureza, e são considerados os principais componentes associados aos efeitos farmacológicos encontrados nessas plantas (JIN, 2009).



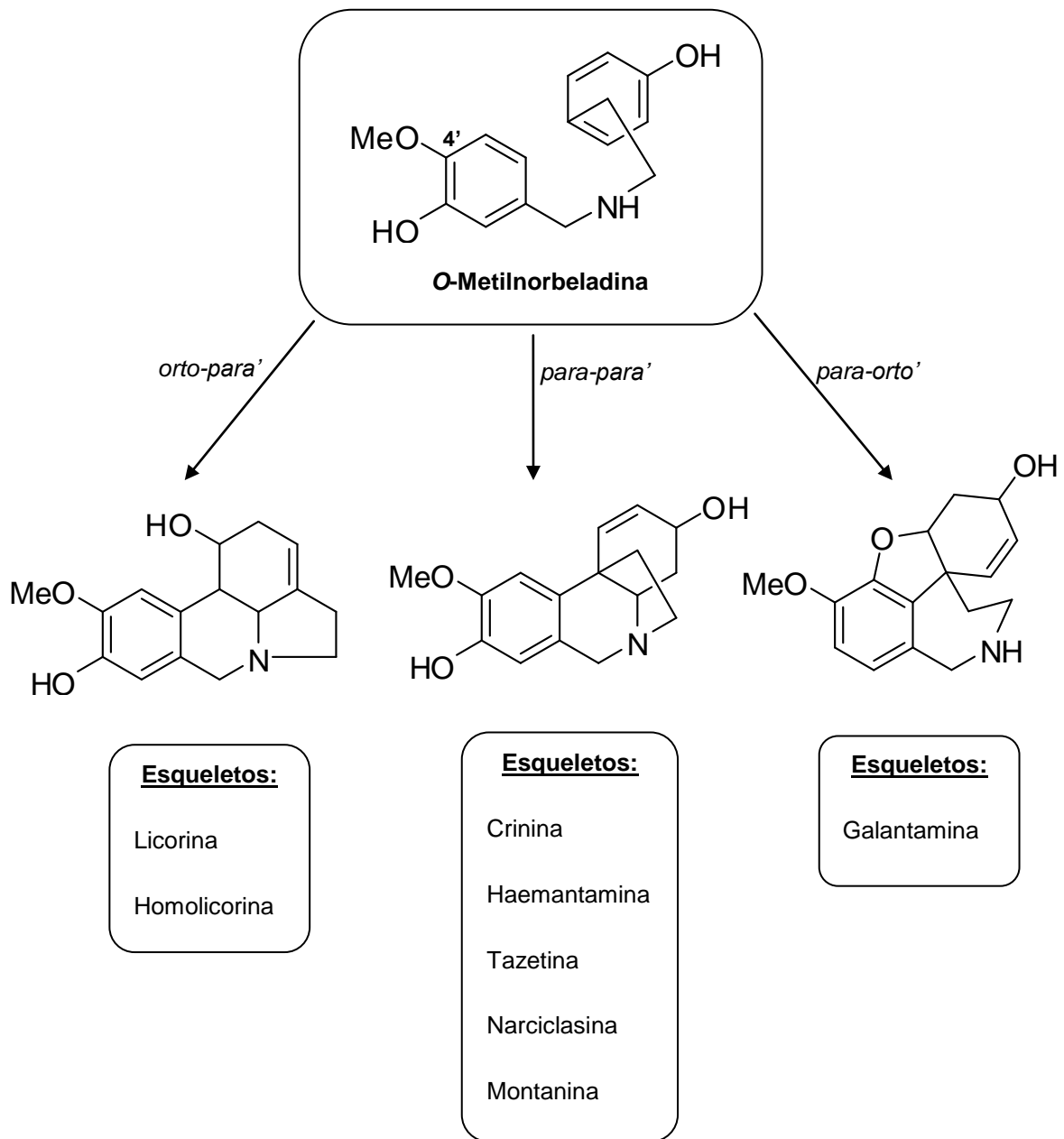
**Figura 4:** Estrutura química dos aminoácidos L-fenilalanina e L-tirosina e o intermediário O-metilnorbeladina

Alcaloides desta família são comumente denominados como alcaloides de Amaryllidaceae, um grupo de alcaloides isoquinolínicos que já foram isolados de todos os gêneros desta família, e ainda, a grande maioria deles não são encontrados em outras famílias de plantas, tornando-os exclusivos desta família (de ANDRADE *et al.*, 2012).

Dentre os vários alcaloides de Amaryllidaceae já isolados e caracterizados, muitos apresentam atividades biológicas relevantes para o desenvolvimento de novos fármacos (JIN, 2013), tais como atividades antitumoral, antibacteriana, antifúngica, antimalárica, antiviral, antiparasitária, analgésica, atividade contra reumatismo, poliomielite, atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase, entre muitas outras (JIN, 2009; PAGLIOSA *et al.*, 2010; SENER *et al.*, 2003; LUO *et al.*, 2012; OSORIO *et al.*, 2010; FENG *et al.*, 2011; BERKOV *et al.*, 2011; GIORDANI *et al.*, 2011).

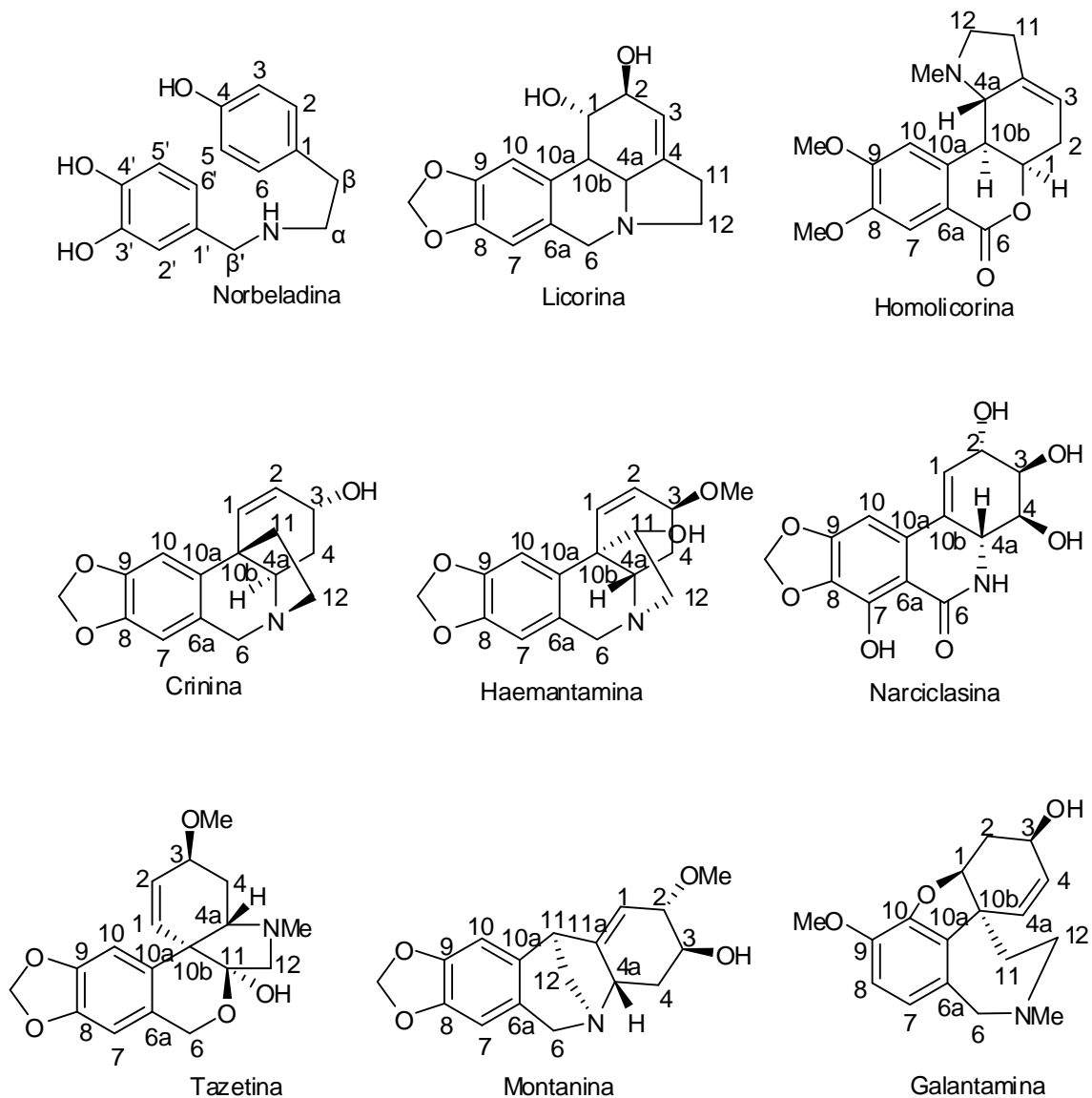
O alcaloide galantamina, isolado inicialmente de *Galanthus woronowii* (GIORDANI *et al.*, 2008), apresenta atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (JIN, 2011), e por este motivo têm sido largamente empregado no tratamento paliativo da doença de Alzheimer (JIN, 2013; WILLIAMS *et al.*, 2011), devido a muitas vantagens que dispõe em relação à outros medicamentos da mesma classe (HARVEY, 1995; HOWES *et al.*, 2003; HEINRICH *et al.*, 2004). A galantamina utilizada nas clínicas, são em sua maioria, provenientes de fontes naturais, principalmente de *Narcissus sp.* e *Leucojum aestivum* (GIORDANI *et al.*, 2008), evidenciando-se a importância de encontrar novas espécies da subfamília Amaryllidoideae para a produção sustentável desse fármaco (de ANDRADE *et al.*, 2011).

As estruturas desse grupo de alcaloides podem variar consideravelmente, ainda que consideradas biogeneticamente relacionadas. Embora ocorra esta variedade de estruturas, estes alcalóides são classificados em nove tipos de esqueletos derivados de diferentes tipos de acoplamentos fenol oxidativos do intermediário O-metilnorbeladina (figura 5).



**Figura 5:** Acoplamento fenol oxidativo em alcaloides de Amaryllidaceae

O acoplamento fenol oxidativo *orto-para* origina os esqueletos do tipo licorina e homolicorina, o *para-para* origina os esqueletos do tipo crinina, harmantamina, tazetina, narciclasina e montanina, enquanto o acoplamento *para-orto* origina o esqueleto do tipo galantamina (figura 6) (BASTIDA *et al.*, 2006). A numeração dos tipos de esqueletos é baseada no modelo de Ghosal (GHOSAL, 1985).



**Figura 6:** Esqueletos típicos dos alcaloides da subfamília Amaryllidoideae

Alcaloides com esqueleto do tipo homolicorina são muito estudados, e os compostos desta classe apresentam um grande número de atividades biológicas relevantes como: atividade citotóxica contra células fibroblásticas não-tumorais (WENIGER *et al.*, 1995), agente antiviral contra Herpes simplex tipo 1, atividade antifúngica contra *Candida albicans* (RENARD-NOZAKI *et al.*, 1989; EVIDENTE *et al.*, 2004), atividade citotóxica contra o parasita *Trichomonas vaginalis* (GIORDANI *et al.*, 2010), atividade antirretroviral (SZLÁVKI *et al.*, 2004), atividade neuroprotetora

contra estresse oxidativos em neuroblastomas (LI, *et al.*, 2013), efeito indutor de hipersensibilidade tardia em animais (GUDE *et al.*, 1988).

A licorina, o mais antigo dos alcalóides de Amaryllidaceae, é também o mais abundante, presente em praticamente todas as espécies da família. Existem inúmeros estudos a respeito das atividades biológicas que apresenta (MCNULTY *et al.*, 2009), entre elas: atividade antiviral contra vírus da gripe (HE, QI, TIAN *et al.*, 2012), antifúngica contra *Candida albicans* (EVIDENTE, ANDOLFI, ABOU-DONIA *et al.*, 2004), antimalárica (SENER, ORHAN e SATAYAVIVAD, 2003) e anticâncer (LUO *et al.*, 2012). Além dessas atividades, licorina também é usada em semissíntese como precursor de alcaloides com atividades contra *Trypanosoma brucei brucei* e *Plasmodium falciparum* (TORIIZUKA *et al.*, 2008; CÉDRON, *et al.*, 2010), e *Trichomonas vaginalis* (GIORDANI *et al.*, 2012).

Os alcaloides com esqueleto do tipo narciclasina parece ser um dos mais promissores como possíveis agentes antiproliferativos (BASTIDA *et al.*, 2006; 2011) e estudos mostram que alcaloides desta classe apresentaram atividade antirretroviral, porém com baixa seletividade (SZLÁVIK *et al.*, 2004) e atividade antitumoral frente a linhagem de células de linfoma (ZUPKÓ *et al.*, 2009).

O alcaloide montanina demonstra uma série de atividades psicofarmacológicas relevantes, tais como antidepressiva, ansiolítica e anticonvulsivante (da SILVA *et al.*, 2006), enquanto foi observado em alcaloides com esqueletos do tipo haemantamina uma pronunciada atividade inibitória do crescimento de diversas células tumorais, atividade antimalárica, além de efeitos citotóxicos contra células fibroblásticas não-tumorais (BASTIDA *et al.*, 2006).

O alcaloide pretazetina, precursor da tazetina, apresenta atividade antiviral e anticâncer. Este composto é um dos alcaloides de Amaryllidaceae mais ativos contra linfomas (BASTIDA *et al.*, 2006). Bastida e colaboradores (2006) ainda relatam que a conversão da estereoquímica da pretazetina em tazetina leva à redução significativa dos efeitos biológicos observados.

O alcaloide sanguinina diferencia-se da estrutura do alcaloide galantamina pela substituição do grupo metoxila aromático por um grupo hidroxila aromático.

Esta alteração torna este alcaloide ainda mais potente que a galantamina quanto à inibição da enzima acetilcolinesterase (HOUGHTON *et al.*, 2006), tornando-se assim, um dos alcaloides de Amaryllidaceae mais promissores da atualidade.

Em decorrência da ampla variedade de atividades biológicas relacionadas aos alcaloides da subfamília Amaryllidoideae, há um crescente interesse no estudo de plantas desta família, visando a caracterização completa de seus alcaloides e, conseqüentemente, avaliações dos mesmos para os mais variados alvos farmacêuticos (BASTIDA *et al.*, 2011).

### **1.3 – Gênero *Hippeastrum* Herb.**

O gênero *Hippeastrum* Herb. pertence à tribo Hippeastreae, família Amaryllidaceae e subfamília Amaryllidoideae. Encontra-se amplamente distribuído na América Latina, onde encontram-se muitas espécies ornamentais, com grande variação de cor de suas flores (DUTILH, 2005).

O gênero apresenta cerca de 70 espécies distribuídas na América Latina, enquanto no Brasil, existem cerca de 34 espécies distribuídas em diferentes biomas, tais como: Floresta Atlântica, cerrado, caatinga, campo rupestre e campos de altitude. Das espécies encontradas no território Nacional, 21 são endêmicas (DUTILH, OLIVEIRA, 2016; de OLIVEIRA *et al.*, 2013; de ANDRADE *et al.*, 2012).

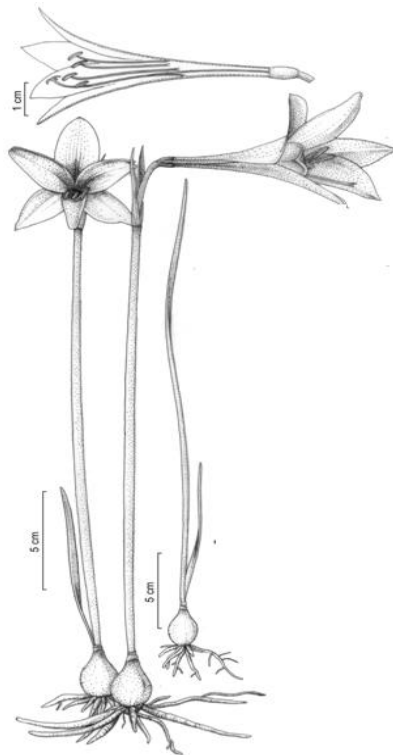
Os estudos fitoquímicos deste gênero iniciaram-se no ano de 1950, e até 1960 já haviam sido isolados alcaloides como: licorina, tazetina, montanina, galantamina, haemantamina, homolicorina, hipeastrina, entre outros. No entanto, como a maioria dos alcaloides de Amaryllidaceae, os compostos encontrados no gênero *Hippeastrum* ainda foram relativamente pouco avaliados quanto às atividades biológicas, se comparados aos de ocorrência européia e asiática (GIORDANI *et al.*, 2008), embora alguns compostos isolados de *Hippeastrum* encontrados no Brasil apresentaram propriedades interessantes e atividades biológicas importantes (de ANDRADE *et al.*, 2012).

A espécie *Hippeastrum morelianum* foi coletada em São Paulo, e levou ao isolamento do alcaloide candimina. Este composto, apresentou boa atividade citotóxica para o parasita *Trichomonas vaginalis* (GIORDANI *et al.*, 2011; GIORDANI *et al.*, 2010), enquanto montanina isolada da espécie *Hippeastrum vittatum*, coletada no Rio Grande do Sul, apresentou atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase e atividades psicofarmacológicas, como antidepressiva, anticonvulsivante e ansiolítica (GIORDANI *et al.*, 2010; da SILVA *et al.*, 2006).

Os resultados promissores obtidos referentes às atividades biológicas do gênero *Hippeastrum* continuam a impulsionar os estudos de espécies desse gênero, buscando novas fontes de compostos biologicamente ativos.

### **1.3.1 – *Hippeastrum canastrense* J. Dutilh & R. S. Oliveira**

Em 2013 um grupo de pesquisadores identificaram quatro novas espécies endêmicas do gênero *Hippeastrum* na Serra da Canastra, Minas Gerais em campo rupestre, são elas: *Hippeastrum canastrense*, *Hippeastrum diniz-cruzae*, *Hippeastrum roseoalbum* e *Hippeastrum sanfrasciscanum*. A espécie denominada *Hippeastrum canastrense* J. Dutilh & R. S. Oliveira (figura 7) foi nomeada em alusão ao local onde foi encontrada. Uma população extensa de *H. canastrense* foi encontrada em campo limpo em solo arenoso, entre gramas e outras ervas, próximo à cachoeira Casta d'Anta. Esta planta é similar a *Hippeastrum elegans*, diferindo-se desta apenas por apresentar uma menor estatura, folhas lineares, ligeiramente cilíndricas e estigma trifido. A maioria das plantas floresce entre outubro e novembro, possuindo flores com pétalas de coloração branca com centro levemente rosado (de OLIVEIRA, SEMIR, DUTILH, 2013) e, até o presente momento, esta espécie não possui registros na literatura sobre de estudos químicos ou biológicos.



(Fonte: Arquivo pessoal)

(Ilustração: Rogério Lupo em: de OLIVEIRA *et al.*, 2013)

**Figura 7:** *Hippeastrum canastrense* J. Dutilh & R. S. Oliveira

## 1.4 – Câncer

A palavra câncer é proveniente do grego *Karkínos* que significa caranguejo. Foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates, o pai da medicina. A doença foi detectada em múmias egípcias há mais de três mil anos antes de Cristo (Ministério da Saúde – INCA, 2011)

Segundo o Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), câncer é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças que possuem células em crescimento desordenado, invadindo tecidos e órgãos podendo, eventualmente, espalhar-se para regiões vizinhas ou distantes do corpo. O acúmulo de células cancerosas é denominado tumor, que é formado pela rápida e incontrolável divisão celular, por esta razão tende a ser extremamente agressivo. Quando o câncer tem

início em tecidos epiteliais ou mucosas ele é conhecido como carcinoma, se tem início em tecidos conjuntivos, músculos ou cartilagens é denominado sarcoma, portanto, os diferentes tipos de câncer estão relacionados aos diversos tipos de células no corpo.

A carcinogênese ou oncogênese é o processo de formação do câncer, tendo ocorrência lenta e classificada em três estágios: (a) iniciação, no qual os genes sofrem ação dos agentes cancerígenos; (b) promoção, no qual os agentes oncopromotores atuam na célula já alterada; (c) progressão, caracterizado pela descontrolada e irreversível divisão da célula (Ministério da Saúde – INCA, 2011).

#### **1.4.1 – Câncer no Brasil**

Dados de 2011 do ministério da saúde relatam que o número de novos casos de câncer no Brasil cresce a cada ano e os tipos de câncer mais incidentes na população brasileira é o câncer de boca, intestino, esôfago, mama, pele, próstata, colo do útero, pulmão e leucemias (Ministério da Saúde – INCA, 2011).

O câncer de pele não melanoma é o mais frequente no Brasil, correspondendo a cerca de 25% de todos os tumores malignos registrados no país, porém se detectado precocemente apresenta altos índices percentuais de cura (Ministério da Saúde – INCA, 2011).

Segundo a estimativa do INCA em 2016, o câncer de próstata é o mais incidente entre os homens em todas as regiões do país, enquanto nas mulheres o mais frequente é o câncer de mama, correspondendo a cerca de 20% dos tipos de câncer que acometem as mulheres (excluindo-se o câncer de pele) (GOMES e ALMEIDA, 2014), este é também o segundo tipo mais frequente no mundo (Ministério da Saúde – INCA, 2011).

O Instituto Nacional do Câncer estima ainda, que na região sudeste em 2016 serão 62 novos casos de câncer de próstata a cada 100 mil homens e 68 novos casos de câncer de mama a cada 100 mil mulheres. No Espírito Santo, são estimados 1.180 novos casos de câncer de próstata, sendo 120 na capital e, 1.010

novos casos de câncer de mama, sendo 140 novos casos na capital (Estimativa - INCA, 2016).

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são responsáveis pelas principais causas de óbitos no mundo. No Brasil, essas doenças crônicas, que incluem o câncer, constituem o problema de saúde de maior magnitude e cerca de 70% das mortes no país são atribuídas às DCNT (SCHMIDT *et al.*, 2011), pois gera perda da qualidade de vida, impactos econômicos para as famílias, aumentando a pobreza e ainda resultando em um elevado número de mortes prematuras, sendo 16,3% dos óbitos devido ao câncer (MALTA *et al.*, 2011).

As incidências do câncer de mama no Brasil são similares àsquelas dos países desenvolvidos, enquanto para o câncer de pulmão, próstata e colorretal, as taxas brasileiras estão em nível intermediário, as taxas para o câncer de esôfago são próximas dos níveis encontrados em países asiáticos (possuem as maiores ocorrências do mundo) e se tratando de câncer de colo do útero, as taxas são altas e próximas às de países com maior incidência tais como o Peru e países africanos (MALTA *et al.*, 2011).

#### **1.4.2 – Produtos naturais x câncer**

Grande parte dos fármacos derivados de plantas que são utilizados no tratamento do câncer foi desenvolvido pelas indústrias farmacêuticas a partir da observação e do estudo de seus usos na medicina tradicional (EFFERTH *et al.*, 2008). Hipócrates, o pai da medicina que viveu entre 460 e 377 a.C., utilizava óleo de *Narcissus poerticus* L. no tratamento de câncer (DASARI *et al.*, 2014), evidenciando o potencial dos constituintes de plantas da família Amaryllidaceae no tratamento de câncer (EVIDENTE *et al.*, 2009). Há relatos de que os extratos de plantas da família Amaryllidaceae como *Narcissus poerticus*, *Narcissus pseudonarcissus*, *Hymenocallis caribae* foram muito utilizados no tratamento de tumores na prática médica da China, norte da África, América central e Arábia durante a idade média (EVIDENTE *et al.*, 2009).

O progresso da pesquisa e da química no século XX acarretou uma diminuição do uso de ervas medicinais em países industrializados, porém observa-se que compostos biologicamente ativos extraídos de plantas estão cada vez mais em ascensão e estes são, em geral, produtos de metabólitos secundários. Os metabólitos secundários desenvolvem na planta o papel de agentes protetores contra herbívoros ou agentes patogênicos, como também atuam como reguladores de crescimento. Devido a essas funções fisiológicas, os metabólitos secundários podem apresentar-se como possíveis fármacos com atividades anticâncer (EFFERTH *et al.*, 2008).

Em 2016 Newmann e Cragg relatam que mais de 30% dos fármacos aprovados como drogas anticâncer são produtos naturais ou derivados de produtos naturais a partir da inspiração destes, ou ainda, possuem como farmacóforo um produto natural. Estes dados impulsionam os estudos de produtos naturais e a busca por novos compostos biologicamente ativos com atividade antitumoral para o uso no tratamento do câncer. McNulty e colaboradores (2007) enfatizam que existem muitos estudos revelando o grande potencial anticancer de alcaloides de Amaryllidaceae.

Evidente e colaboradores (2009) estudaram o potencial antiproliferativo, antiinvasivo e capacidade de indução de apoptose em células tumorais de vinte e nove alcaloides de Amaryllidaceae e derivados sintéticos deles com esqueletos do tipo licorina, homolicorina (licorenina), tazetina, crinina e narciclasina. Os resultados indicam que os compostos com esqueletos do tipo narciclasina e seus derivados apresentaram maior atividade antiproliferativa e maior potencial de indução de apoptose em células tumorais de câncer de mama e de próstata. A licorina, pseudolicorina e seus derivados, assim como a haemantamina, apresentaram resultados promissores em relação à atividade antiproliferativa e indução de apoptose nas células ensaiadas. Os alcaloides ungeramina, amarbelisina, e hipeastrina apresentaram-se como inibidores de crescimento. Enquanto derivados de licorina, hipeastrina, clivimina, compostos com esqueletos do tipo crinina e narciclasina mostraram bons resultados na supressão de invasão das células doentes.

A licorina foi avaliada *in vitro* e *in vivo* contra vários tipos de células cancerosas, mostrando atividade antiproliferativa, e grande potencial terapêutico contra leucemia, câncer de pulmão e ovário, além de induzir a inibição da proliferação e migração de células cancerosas resistentes à apoptose, como glioma e melanoma (DASARI *et al.*, 2014). McNulty e colaboradores (2009) constataram também, o grande potencial de utilizar a licorina como farmacóforo, pois revela a indução de apoptose em células tumorais de leucemia, suprimindo o crescimento das células.

Alcaloides da série crinano, como a crinamina também são relatados como antitumorais em diversos tipos de células cancerosas. A 6-hidroxicrinamina, por exemplo, mostrou atividade contra células de melanoma de camundongos, e a haemantamina apresenta atividade antiproliferativa (MCNULTY *et al.*, 2009). Estudos também demonstram que os alcaloides crinamina e haemantamina apresentam indução de apoptose seletiva em células de câncer de fígado em relação às células não cancerosas (MCNULTY *et al.*, 2007).

Em virtude da mortalidade provocada por uma grande diversidade de tipos de câncer que acometem a população de todo o mundo, e ainda, os efeitos colaterais experienciados no tratamento da doença devido à baixa seletividade dos medicamentos utilizados, torna evidente a necessidade de pesquisas para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, mais eficazes e menos agressivos ao enfermo. Os produtos naturais, como os alcaloides de Amaryllidaceae e também seus derivados sintéticos, surgem como importante fonte de estudo na busca por novos candidatos de fármacos para o tratamento e cura do câncer.

## 2 – OBJETIVOS

### 2.1 – Objetivos gerais

O objetivo desse trabalho foi estudar os alcaloides dos extratos dos bulbos e hastes florais de *Hippeastrum canastrense*, uma espécie da família Amaryllidaceae, seguido da avaliação da atividade citotóxica tanto dos extratos quanto dos alcaloides isolados em células tumorais de diferentes linhagens.

### 2.2 – Objetivos específicos

- Coletar o material vegetal;
- Identificar o material botânico no herbário;
- Fazer extração ácido-base do extrato metanólico das hastes florais e bulbos de *Hippeastrum canastrense*;
- Analisar os extratos brutos e frações enriquecidas em alcaloides por meio de CG-EM;
- Isolar o maior número de alcaloides;
- Elucidar as estruturas isoladas por técnicas de CG-EM, HRESIMS e RMN;
- Averiguar a atividade citotóxica dos extratos brutos, extratos particionados e alcaloides isolados em linhagens de células tumorais hepáticas, pancreáticas e de mama.

### 3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1 – Materiais, técnicas e equipamentos em geral

- A trituração do material foi feita em liquidificador Arno.
- Rotaevaporadores utilizados foram Buchi R-3 e Fisatom 801, acoplado à bomba de vácuo Vacuum Pump V-700 – Buchi, com controlador de pressão Vacuum Controller V-850 – Buchi.
- Os solventes utilizados para extração e partições foram hexano, acetato de etila, metanol, diclorometano, clorofórmio e acetona, de grau P.A. de diferentes marcas, ou purificados através de processos de destilação. Para análise de RMN foram utilizados solventes deuterados: Metanol ( $CD_3OD$ ) e Clorofórmio ( $CDCl_3$ ) (Sigma Aldrich).
- O reagente de Dragendorff (tetraiodobismutato de potássio) foi utilizado para revelar alcaloides.
- Células: Células normais de fibroblastos de camundongos da linhagem L929 (ATCC<sup>®</sup> BCRJ-0188), carcinoma hepatocelular Hep G2 (ATCC<sup>®</sup> HB-8065<sup>™</sup>), adenocarcinoma em glândulas mamárias MCF7 (ATCC<sup>®</sup> HTB-22<sup>™</sup>) e carcinoma pancreático humano MIA PaCa-2 (ATCC<sup>®</sup> CRL-1420<sup>™</sup>).
- Soluções para manutenção das linhagens: meio de cultura Dubelcco's Modified Eagle's Medium - DMEM<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich), soro fetal bovino - FBS (Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen), penicilina e estreptomicina (Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen), tripsina, EDTA (0,25%) e vermelho fenol (Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen), azul de tripano, Dimetilsulfóxido P.A. - DMSO (Dinâmica), Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio - MTT (Sigma-Aldrich) e Etoposídeo (Sigma-Aldrich).
- Equipamentos para ensaio biológicos: incubadora de  $CO_2$  (MCO -19AiC (UV), Sanyo), câmara de Neubauer, bancada de fluxo laminar (Quimis), Leitor de microplacas (Mults-Mode Microplate Reader, Filter Max F5, Molecular Devices Spectra), placa para cultivo de células 96 poços fundo chato (K12-096, Kasvi) e frasco para cultivo de células 600 mL – tampa plug (sem filtro) (K11-1600, Kasvi).

- Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC): placas de alumínio encobertas por sílica gel 60 G/UV254 Macherey-Nagel (0,20 mm, 20 x 20 cm), analisadas por exposição à radiação ultravioleta (UV) em câmara de UV da Camag, nos comprimentos de 254 e 366 nm, e posteriormente borrifadas com o reagente de Dragendorff seguido de aquecimento.
- Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP): placas de vidro, 20 x 20 cm, encobertas por sílica gel 60 F<sub>254</sub>, Macherey-Nagel (0, 25 mm) analisadas através de UV nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm e reveladas com 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 3,5 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 (Life Sciences Bulk GHP Acrodisc, 13 mm) 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 removido em evaporador rotatório e os compostos isolados armazenados a vácuo em dessecador por 2- 5 dias.
- Cromatografia líquida em coluna (CLC): fase estacionária Sílica-gel 60 (70-230 mesh, Merck), altura, diâmetro ( $\phi$ ), e fase móvel variáveis de acordo com as características da amostra, tais como solubilidade, quantidade e polaridade na CCDC.
- Espectrometria de massas de alta resolução: foi realizada em equipamento 9,4 T FT-ICRMS Solarix por injeção direta da amostra solubilizada em metanol.
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN): equipamento Varian 400 MHz, com sonda 5 mm ATB BroaBand <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F/X e TMS como padrão de referência.
- A análise e separação dos alcaloides por CLAE preparativo foram realizados em equipamento Agilent de bomba binária modelo G1361A-1260 prep pump, coluna

Agilent Eclipse XDB-C18, 5 $\mu$ m, 9,4 x 250 mm (semi-preparativa), acoplado a um detector 1260 MWD VL, G1365D e coletor de frações 1260 FC-PS, modelo G1364B.

- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM): cromatógrafo CG-17A Shimadzu, modelo GC-EM QP 5000, operando no modo EI a 70 eV usando coluna apolar DB-1 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m). Programação da temperatura: 100–180 °C a 15 °C min<sup>-1</sup>, 1 min em 180 °C, 180–300 °C a 5 °C min<sup>-1</sup> e 40 min a 300 °C. Temperatura no injetor: 280°C. Fluxo de gás: 0,8 mL.min<sup>-1</sup> com gás hélio.

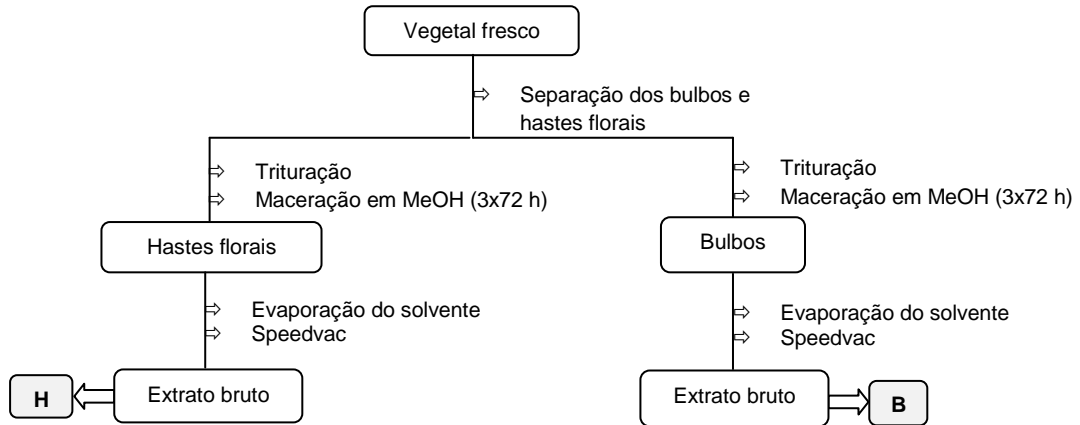
### 3.2 – Coleta de *Hippeastrum canastrense*

Aproximadamente 720 g de hastes florais e 900 g de bulbos de *Hippeastrum canastrense* foram coletados no Parque Nacional da Serra da Canastra, São Roque de Minas, no Estado de Minas Gerais (sob as coordenadas 20°16'36.1"S e 46°31'36.9"W) em novembro de 2013. A identificação da espécie foi realizada pela botânica Doutora Renata Souza de Oliveira da Universidade de São Paulo, como *Hippeastrum canastrense* J. Dutilh & R. S. Oliveira. Uma exsicata foi depositada no Herbário VIES da Universidade Federal do Espírito Santo sob a supervisão da Professora Doutora Luciana Dias Thomaz, com o registro de número 35305.

### 3.3 – Preparação dos extratos brutos

As hastes florais e bulbos frescos coletados foram triturados, separadamente, em liquidificador e em seguida macerados com metanol (MeOH) três vezes, admitindo-se um intervalo de 72 horas entre os procedimentos e sendo filtrados em papel de filtro. Os filtrados foram reunidos e o solvente removido em evaporador rotatório. Em seguida, os extratos brutos concentrados foram transferidos para um frasco, e secos em speedvac, obtendo-se os dois extratos brutos, um deles das partes aéreas (**H**) e o outro, dos bulbos (**B**) da planta *Hippeastrum canastrense*

(Esquema 1). Uma alíquota de cada extrato foi submetida à análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrômetro de Massas (CG-EM).



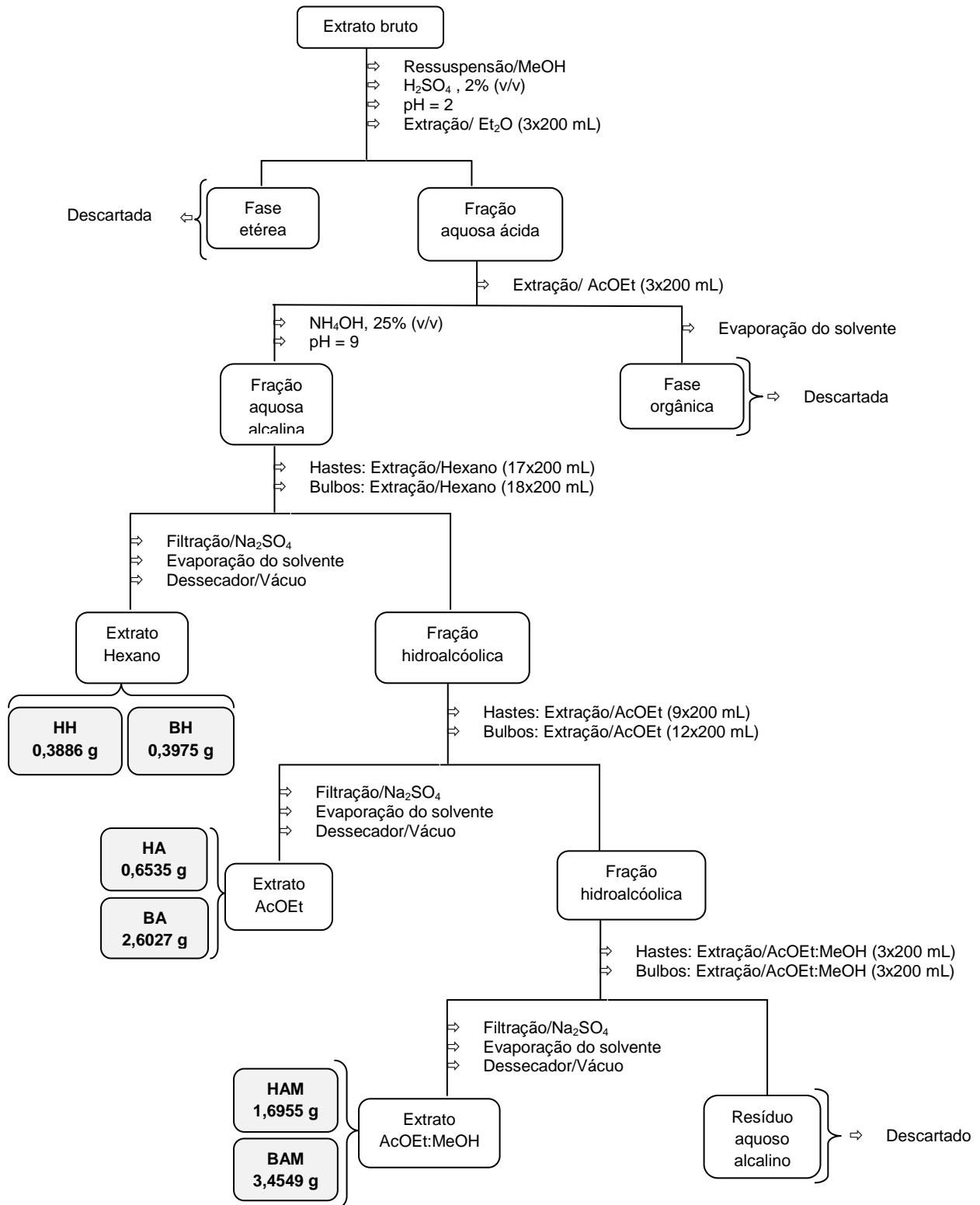
**Esquema 1:** Preparação dos extratos brutos H e B

### 3.4 – Extração ácido-base

#### 3.4.1 – Hastes florais e Bulbos

O extrato bruto dos bulbos e hastes florais foi ressuspenso separadamente em MeOH, acidificado com solução aquosa a 2 % (v/v) de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  até aproximadamente pH 2, e então extraído com éter etílico ( $\text{Et}_2\text{O}$ ) (3x200 mL), para retirada de substâncias resinosas, lipofílicas e neutras e posteriormente extraído também com acetato de etila (AcOEt) (3x200 mL). A fração aquosa resultante foi alcalinizada com solução aquosa a 25 % (v/v) de  $\text{NH}_4\text{OH}$  até aproximadamente pH 9 e em seguida extraída com hexano, acetato de etila (até teste negativo para alcaloides, utilizando o reagente de Dragendorff em cromatografia em camada delgada comparativa - CCDC) e finalmente, com uma mistura de MeOH:AcOEt na proporção de 3:1. As frações resultantes da partição líquido-líquido foram secas com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtradas em papel de filtro e o solvente foi removido em evaporador rotatório. Os extratos obtidos foram armazenados a vácuo em um dessecador por 48 horas, obtendo-se os extratos das partes aéreas: Hastes-Hexano (**HH**), Hastes-Acetato de etila (**HA**), Hastes-Acetato:Metanol (**HAM**); E os extratos dos bulbos:

Bulbos-Hexano (**BH**), Bulbos-Acetato de etila (**BA**) e Bulbos-Acetato:Metanol (**BAM**) (Esquema 2).



**Esquema 2:** Extração ácido-base de H e B: obtenção dos extratos HH, HA, HAM, BH, BA e BAM.

### **3.5 – Fracionamento cromatográfico e isolamento de alcaloides**

As frações hexano, acetato de etila e acetato de etila:metanol (3:1) das hastes florais e bulbos foram analisadas por CG-EM afim de traçar o perfil alcaloídico de cada extrato. Os resultados foram comparados com a biblioteca de espectros de alcaloides desenvolvida pelo grupo de produtos naturais da Universidade de Barcelona (UB), a qual é regularmente atualizada com informações de alcaloides isolados e inequivocamente identificados através de meios físicos e espectroscópicos. A análise por CG-EM indicou a presença de diversos alcaloides nas frações hexano e acetato de etila de ambas as partes estudadas, porém as frações acetato:metanol (HAM e BAM) não apresentaram indícios de presença de alcaloides e desta forma, não foram mais estudadas.

O fracionamento dos extratos das hastes florais e bulbos foi realizado utilizando como eluentes os solventes hexano, diclorometano, acetona, acetato de etila e metanol em diferentes proporções, de acordo com a análise prévia por CCDC e, observadas sob luz UV (254 nm e 365 nm), reveladas com reagente de Dragendorff, seguido de aquecimento.

#### **3.5.1 – Hastes florais**

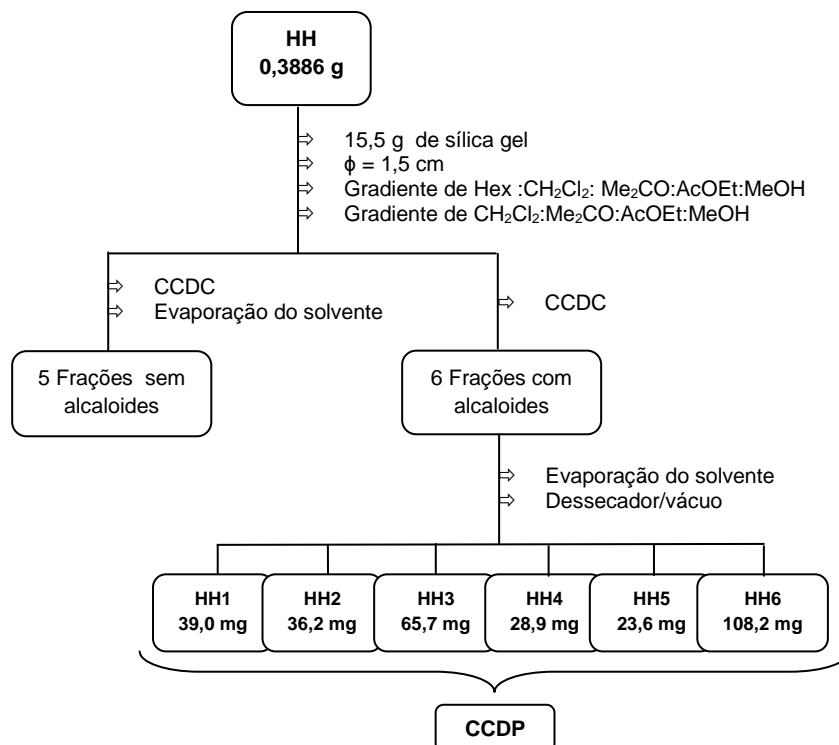
##### **3.5.1.1 – Fracionamento de HA**

O extrato foi solubilizado em aproximadamente 1 mL de metanol e fracionado por meio de Cromatografia Líquida em Coluna (CLC) com sílica gel e fase móvel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}:\text{MeOH}$  em eluição gradiente (Anexo A: tabela A<sub>1</sub>). O fracionamento originou 763 alíquotas de aproximadamente 2,5 mL cada, que foram reunidas por comparação e semelhança após análise por CCDC, resultando em 18 frações dentre as quais, apenas 11 revelaram teste positivo para alcaloides com reagente de Dragendorff (Esquema 3). O solvente foi removido em evaporador rotatório, as frações foram armazenadas a vácuo em um dessecador por um período de 48 horas e em seguida pesadas. Uma alíquota de cada fração foi analisada por CG-EM e, finalmente, as amostras foram submetidas à técnica de Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) para o isolamento dos compostos, os quais foram



### 3.5.1.2 – Fracionamento de HH

O extrato foi solubilizado em aproximadamente 1 mL de Hex:AcOEt:MeOH (1:1:1) e fracionado por meio de CLC com sílica gel e fase móvel Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Me<sub>2</sub>CO:AcOEt:MeOH em eluição gradiente (Anexo A: tabela A<sub>2</sub>). O fracionamento originou 520 alíquotas de aproximadamente 2,5 mL cada, que foram reunidas por comparação e semelhança após análise em CCDC, resultando em 11 frações dentre as quais, apenas seis revelaram teste positivo para alcaloides com reagente de Dragendorff (Esquema 4). Após a remoção do solvente em evaporador rotatório, as frações foram armazenadas a vácuo em um dessecador por 48 horas e em seguida pesadas. Uma alíquota de cada fração foi analisada por CG-EM e, finalmente, as amostras foram submetidas à técnica CCDP para o isolamento dos compostos, os quais foram enviados para análise de RMN para identificação (tabela 2). O sistema de solventes utilizado na eluição das frações, bem como o fator de retenção ( $R_f$ ) dos compostos isolados e seus respectivos rendimentos estão dispostos na tabela B<sub>2</sub> do anexo B.



**Esquema 4:** Fracionamento por CLC do extrato HH

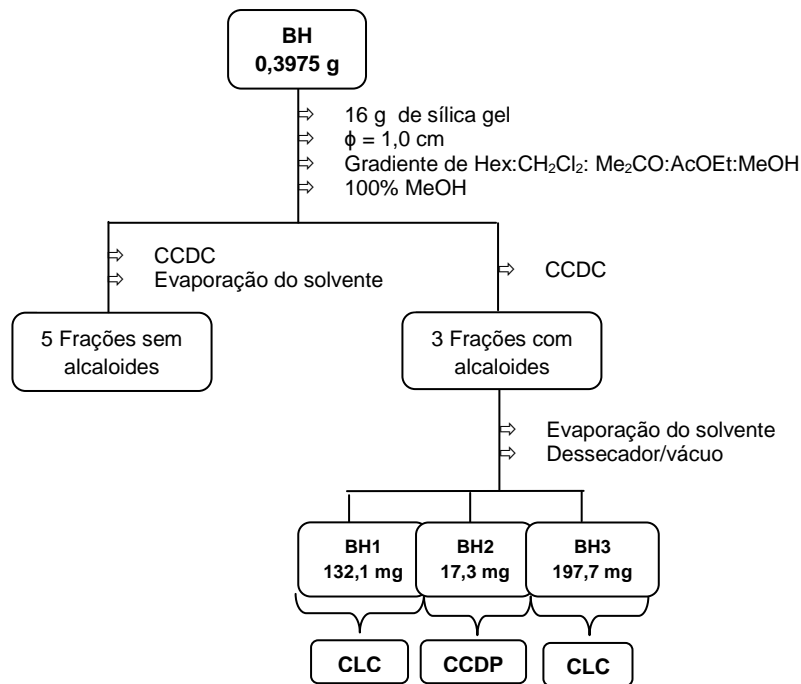
**Tabela 2:** Compostos isolados por CCDP das frações de HH

Fração/ Composto	HH1	HH2	HH3	HH4	HH5	HH6
3		3,8 mg	8,1 mg			
6				1,3 mg		
7		1,7				
8 e 9			24,0 mg	1,2 mg		3,9 mg
11				1,2 mg	1,1 mg	
18		1,4 mg				
19				1,7 mg		

### 3.5.2 – Bulbos

#### 3.5.2.1 – Fracionamento de BH

O extrato hexânico dos bulbos foi solubilizado em aproximadamente 1,0 mL de Hex:AcOEt:MeOH (2:1:1) e fracionado por meio de CLC com sílica gel e fase móvel de Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Me<sub>2</sub>CO:AcOEt:MeOH em eluição gradiente (Anexo A: tabela A<sub>3</sub>). O fracionamento originou 214 alíquotas de aproximadamente 6 mL cada que foram reunidas por comparação e semelhança após análise em CCDC, resultando em oito frações dentre as quais, apenas três revelaram teste positivo para alcaloides com reagente de Dragendorff (Esquema 5). Após a remoção do solvente em evaporador rotatório, as frações foram armazenadas a vácuo em um dessecador por 48 horas e em seguida pesadas. Uma alíquota das frações enriquecidas em alcaloides foi enviada para análise por CG-EM. As frações BH1 e BH3 foram fracionadas por meio de CLC, enquanto BH2 foi submetida à técnica de CCDP para o isolamento de seus constituintes químicos.



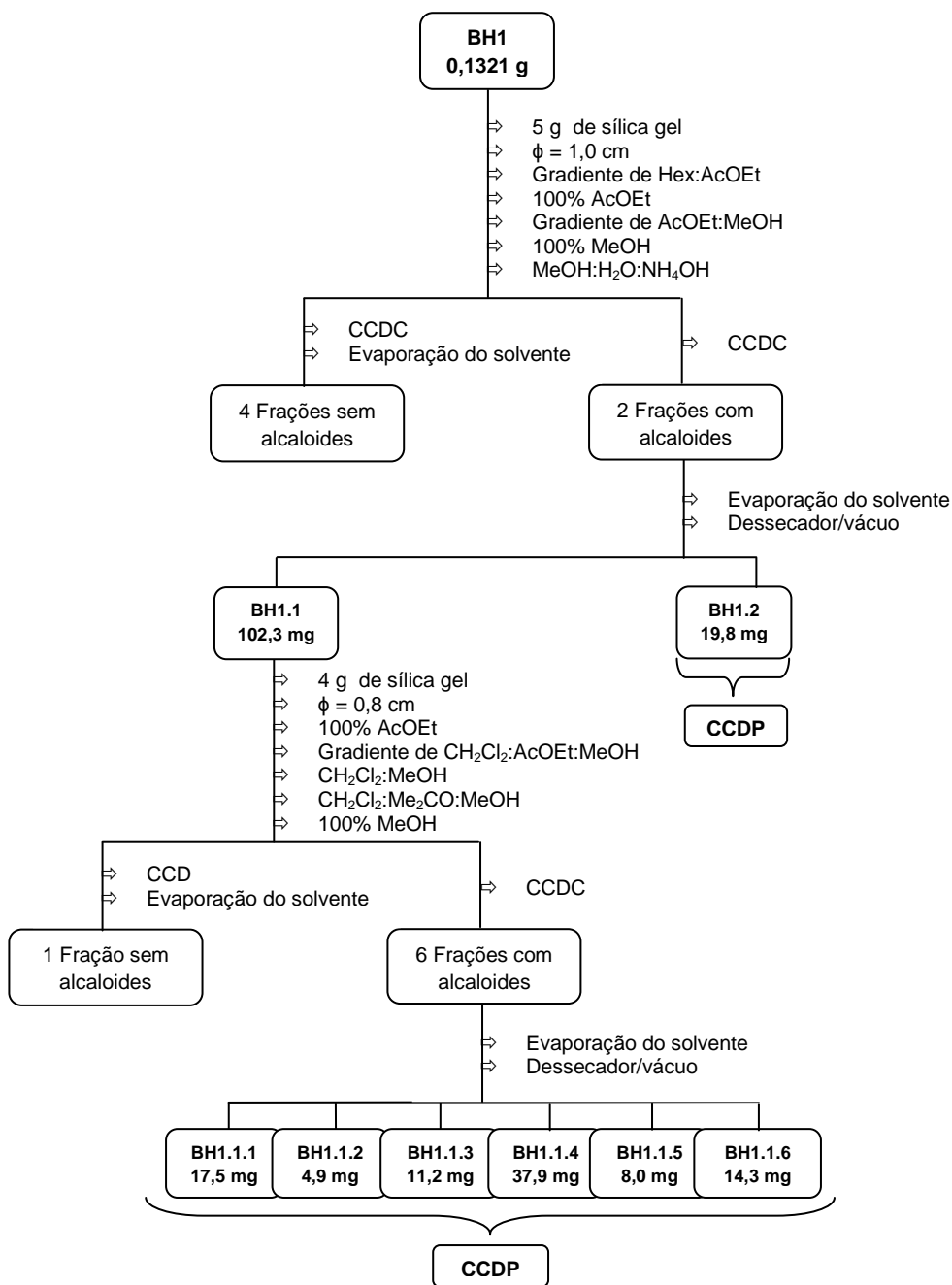
**Esquema 5:** Fracionamento por CLC do extrato BH

- **BH1:** foi solubilizada em aproximadamente 1 mL de Hex:AcOEt:MeOH (1:1:1) e fracionado por meio de CLC com sílica gel e fase móvel de Hex:AcOEt e AcOEt:MeOH com o aumento gradual da polaridade do eluente (Anexo A: tabela A<sub>4</sub>). O fracionamento originou 131 alíquotas de aproximadamente 2 mL cada, que foram reunidas por comparação e semelhança após análise em CCDC, resultando em seis frações dentre as quais, apenas duas revelaram teste positivo para alcaloides com reagente de Dragendorff (BH1.1 e BH1.2), conforme resumido no esquema 6.
- **BH1.1:** foi solubilizada em aproximadamente 0,5 mL de MeOH e fracionado por meio de CLC com sílica gel e fase móvel de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:AcOEt:MeOH em eluição gradiente (Anexo A: tabela A<sub>5</sub>). O fracionamento originou 131 alíquotas de aproximadamente 2 mL cada, que foram reunidas por comparação e semelhança após análise em CCDC, resultando em sete frações dentre as quais, seis revelaram a presença de alcaloides pelo teste com reagente de Dragendorff. Após a remoção do solvente em evaporador rotatório, as frações foram armazenadas a vácuo em um dessecador por 48 horas, pesadas e,

finalmente, foram submetidas à técnica de CCDP para o isolamento dos compostos, os quais foram enviados para análise de RMN para identificação.

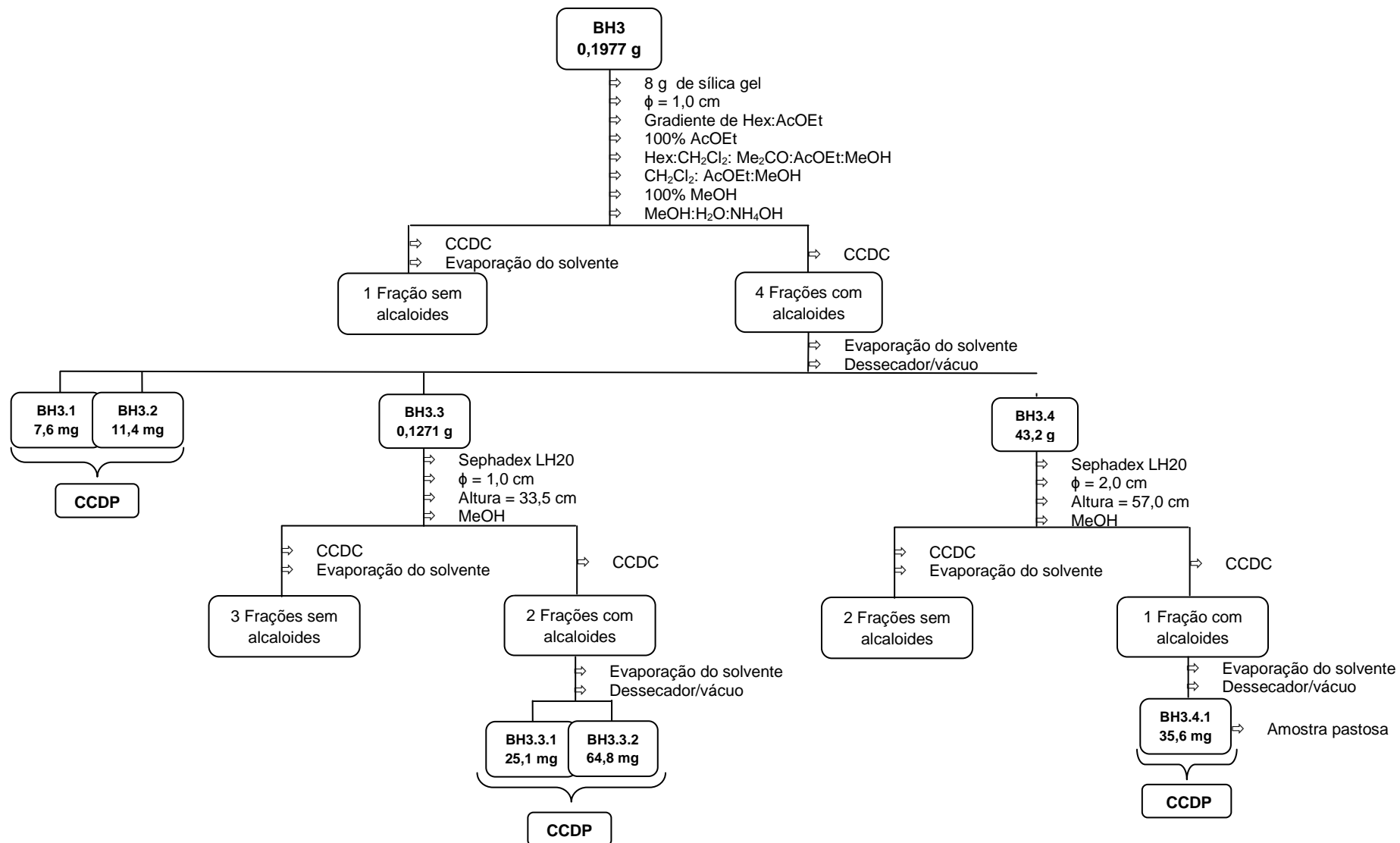
- **BH1.2:** após a remoção do solvente em evaporador rotatório, a fração foi armazenada a vácuo em um dessecador por 48 horas, pesada e, submetida à técnica de CCDP para o isolamento dos compostos, os quais foram enviados para análise de RMN para identificação.

- **BH3:** foi solubilizada em aproximadamente 1 mL de Hex:AcOEt:MeOH (1:1:1) e fracionado por meio de CLC com sílica gel e fase móvel de Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Me<sub>2</sub>CO:AcOEt:MeOH em eluição gradiente (Anexo A: tabela A<sub>6</sub>). O fracionamento originou 150 alíquotas de aproximadamente 8 mL cada, que foram reunidas por comparação e semelhança após análise em CCDC, resultando em cinco frações, dentre as quais, quatro revelaram a presença de alcaloides através do teste com reagente de Dragendorff (BH3.1 a BH3.4), os procedimentos estão resumidos no esquema 7. As subfrações BH3.1 e BH3.2 foram fracionadas através da técnica de CCDP, enquanto BH3.3 e BH3.4 foram purificadas através de fracionamento por CLC.



**Esquema 6:** Fracionamento por CLC das frações BH1 e BH1.1

- **BH3.3:** foi solubilizada em aproximadamente 0,5 mL de MeOH e fracionada isocraticamente por CLC utilizando Sephadex LH20 como fase estacionária e MeOH como fase móvel. O fracionamento forneceu 50 alíquotas de aproximadamente 4 mL cada, que foram reunidas por comparação e semelhança após análise em CCDC, resultando em cinco frações dentre as quais, apenas duas revelaram a presença de alcaloides pelo teste com reagente de Dragendorff (BH3.3.1 e BH3.3.2). Após a remoção do solvente em evaporador rotatório, as frações foram armazenadas a vácuo em um dessecador por 48 horas, pesadas e, finalmente, foram submetidas à técnica de CCDP para o isolamento dos compostos, os quais foram enviados para análise de RMN para identificação.
  
- **BH3.4:** foi solubilizada em aproximadamente 0,5 mL de MeOH e fracionada isocraticamente por CLC utilizando Sephadex LH20 como fase estacionária e MeOH como fase móvel. O fracionamento forneceu 25 alíquotas de aproximadamente 8 mL cada, que foram reunidas por comparação e semelhança após análise em CCDC, resultando em três subfrações dentre as quais, apenas uma revelou a presença de alcaloides pelo teste com reagente de Dragendorff. Após a remoção do solvente em evaporador rotatório, a fração BH3.4.1 foi armazenada a vácuo em um dessecador por 48 horas, pesada e, finalmente, submetida à técnica de CCDP para o isolamento dos compostos, os quais foram enviados para análise de ressonância magnética nuclear de hidrogênio para identificação.



Esquema 7: Fracionamento por CLC das frações BH3, BH3.3 e BH3.4

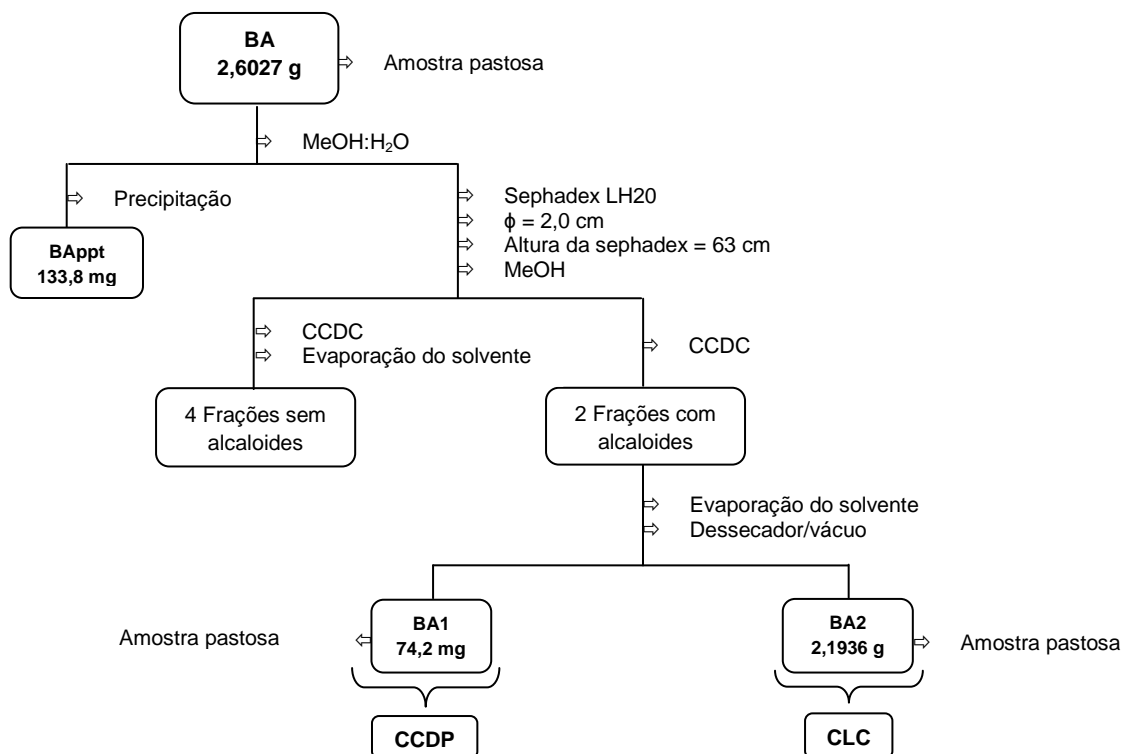
A tabela 3 resume os compostos que foram isolados do fracionamento de BH, identificados pela técnica de RMN. O sistema de solventes utilizado na eluição das frações e subfrações, bem como o fator de retenção ( $R_f$ ) dos constituintes químicos isolados e seus respectivos rendimentos estão dispostos na tabela B<sub>3</sub> do anexo B.

**Tabela 3:** Compostos isolados por CCDP das frações e subfrações do extrato hexânico dos bulbos (BH), identificados por RMN

Fração/ Composto	BH1						BH2	BH3				
	BH1.1.1	BH1.1.2	BH1.1.3	BH1.1.4	BH1.1.5	BH1.1.6		BH3.1	BH3.2	BH3.3.1	BH3.3.2	BH3.4.1
3			0,8 mg					1,5 mg	1,0 mg			
6												
7			4,0 mg	4,0 mg			2,8 mg	4,5 mg	2,2 mg			
8				3,8 mg					1,1 mg	1,0 mg		0,9 mg
12											7,0 mg	
15										1,7 mg		
20							1,0 mg					
3 e 18		4,9 mg										
3 e 8							5,3 mg					
8 e 9											4,9 mg	
6 e 11				1,1 mg			0,5 mg				7,4 mg	
8 e 20				3,2 mg			2,5 mg					

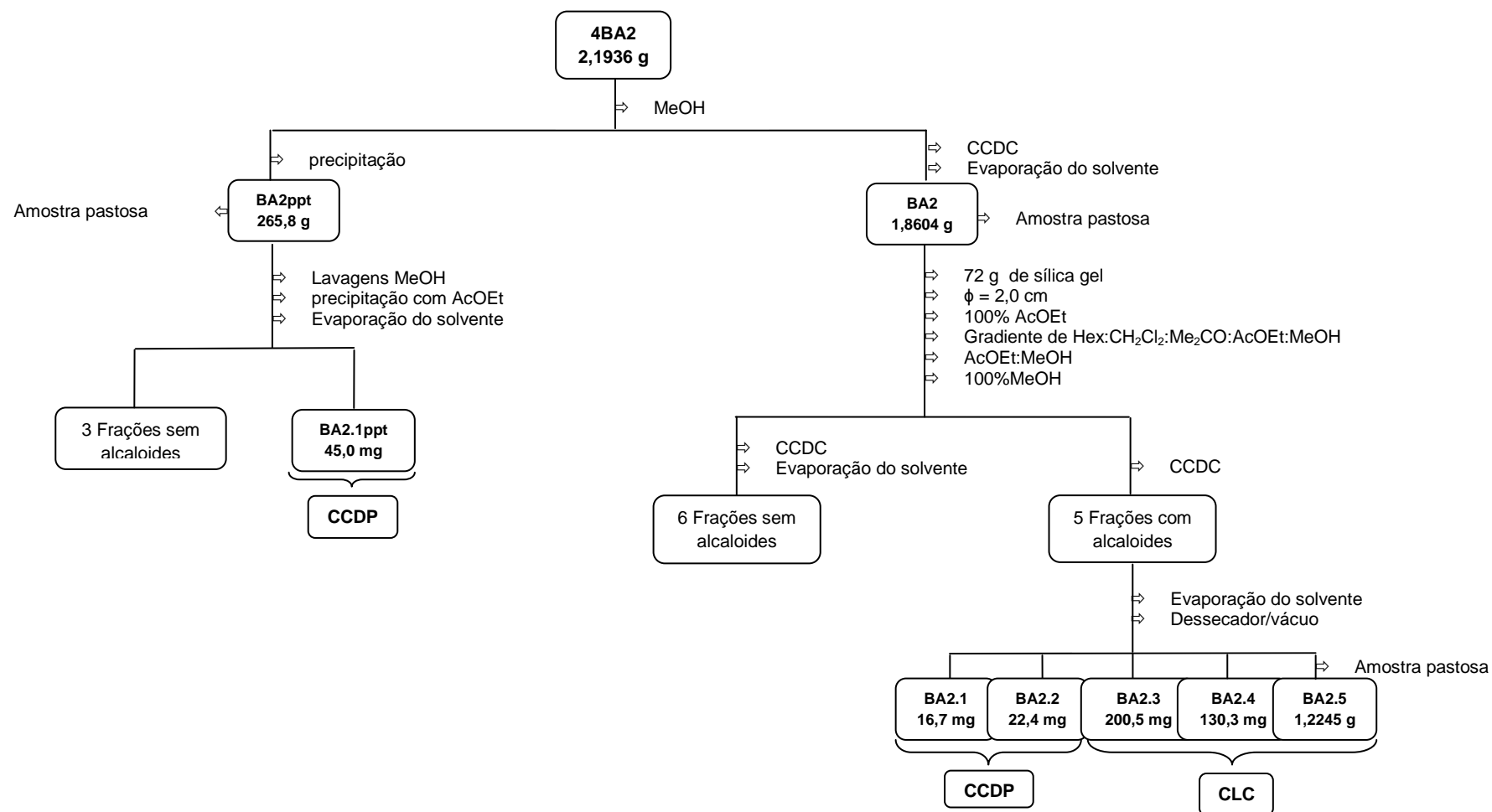
### 3.5.2.2 – Fracionamento de BA

Ao solubilizar o extrato acetato de etila dos bulbos em aproximadamente 1 mL de metanol:água (4:1), houve a precipitação espontânea de um sólido branco (BAppt), cuja análise por RMN indicou tratar-se do **composto 10**. O sobrenadante de BA foi fracionado por meio de CLC utilizando sephadex LH20 como fase estacionária e eluição isocrática com MeOH. O fracionamento originou 250 alíquotas de aproximadamente 2,5 mL cada, que foram reunidas por comparação e semelhança após análise em CCDC resultando em seis frações dentre as quais, apenas duas revelaram teste positivo para alcaloides com reagente de Dragendorff (BA1 e BA2). Após a remoção do solvente em evaporador rotatório, as frações foram armazenadas a vácuo em um dessecador por 48 horas e em seguida pesadas. Uma alíquota de cada fração foi enviada para análise por CG-EM, e finalmente, a fração BA1 foi submetida à técnica de CCDP para o isolamento de seus compostos, enquanto BA2 foi fracionada por CLC (Esquema 8).



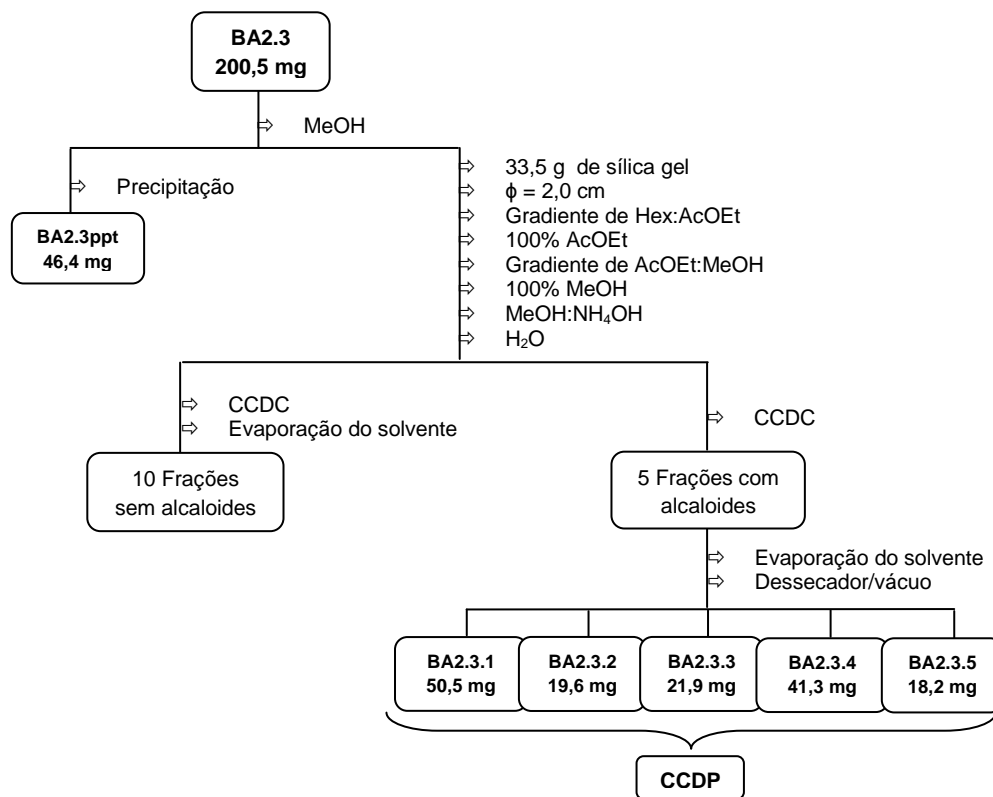
**Esquema 8:** Fracionamento por CLC do extrato BA

- **BA2:** foi solubilizada em aproximadamente 1 mL de MeOH, havendo a formação de um precipitado (BA2ppt), que foi purificado através de lavagem com MeOH e precipitação com AcOEt, originando quatro frações onde apenas uma indicou a presença de alcaloides (BA2.1ppt). O sobrenadante de BA2 foi fracionado por CLC com sílica gel em eluição gradiente com Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Me<sub>2</sub>CO:AcOEt:MeOH (Anexo A: tabela A<sub>7</sub>), originando 463 alíquotas de aproximadamente 4,5 mL cada, que foram reunidas por comparação e semelhança após análise em CCDC, resultando em onze frações, dentre as quais, cinco revelaram a presença de alcaloides através do teste com reagente de Dragendorff (BA2.1 a BA2.5). As subfrações BA2.1ppt, BA2.1 e BA2.2 foram fracionadas através da técnica de CCDP, enquanto as demais frações foram purificadas através de fracionamento por CLC. Os procedimentos de fracionamento de BA2 estão resumidos no esquema 9.



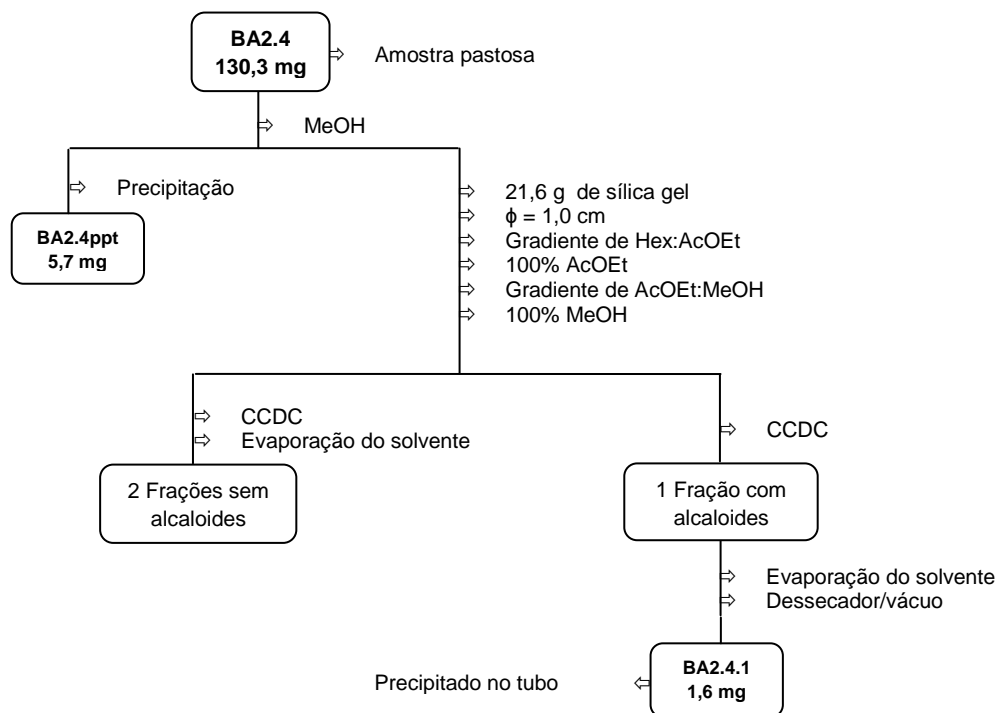
**Esquema 9:** Fracionamento por CLC da fração BA2

- **BA2.3:** foi solubilizada em aproximadamente 1 mL de MeOH, havendo a precipitação espontânea de um sólido branco (BA2.3ppt), cuja análise por RMN indicou tratar-se do **composto 10**. O sobrenadante BA2.3 foi fracionado por meio de CLC com sílica gel e fase móvel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}:\text{MeOH}$  em eluição gradiente (Anexo A: tabela A<sub>8</sub>). O fracionamento forneceu 449 alíquotas de aproximadamente 4 mL cada, que foram reunidas por comparação e semelhança após análise em CCDC, resultando em quinze frações dentre as quais, apenas cinco revelaram a presença de alcaloides pelo teste com reagente de Dragendorff (BA2.3.1 a BA2.3.5). Após a remoção do solvente em evaporador rotatório, as frações foram armazenadas a vácuo em um dessecador por 48 horas, pesadas e, finalmente, foram submetidas à técnica de CCDP para o isolamento dos compostos, os quais foram enviados para análise de RMN para identificação (Esquema 10).



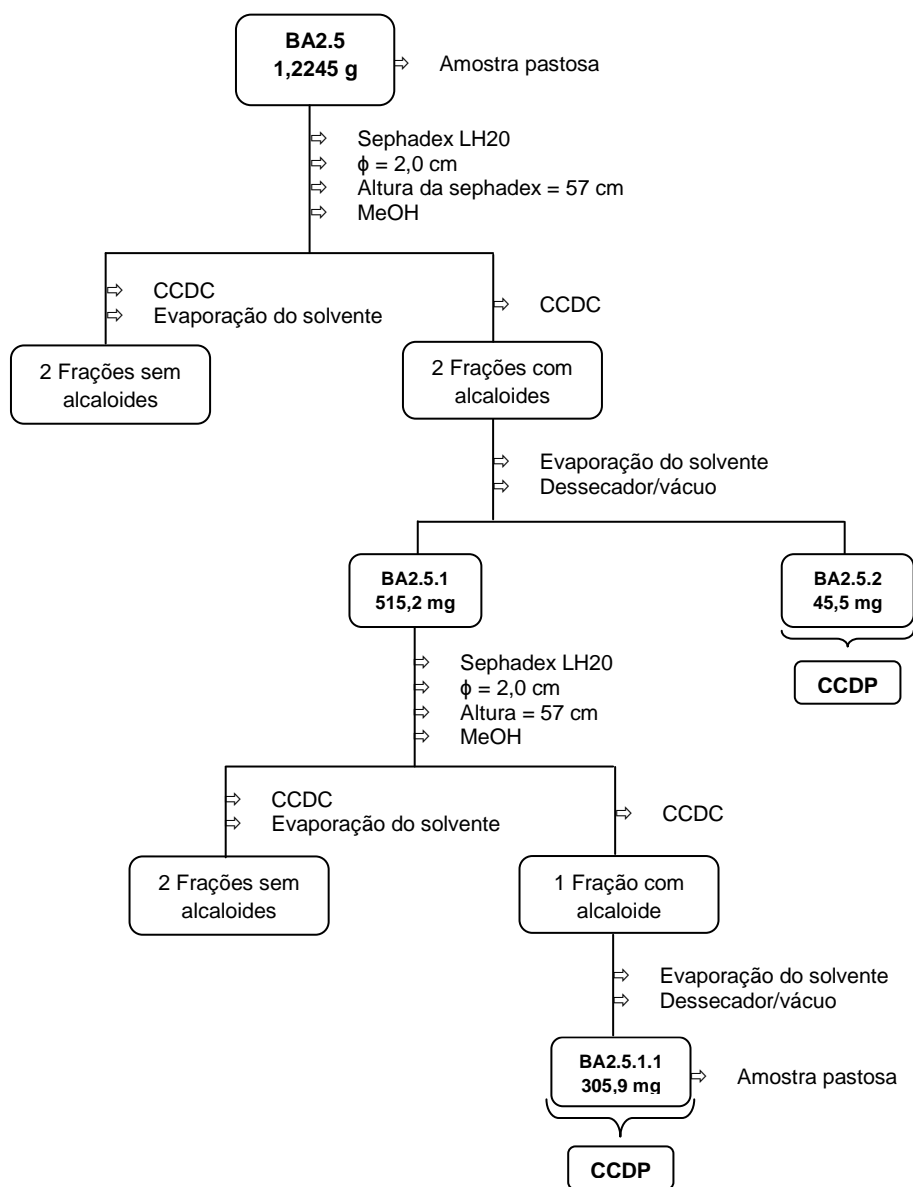
**Esquema 10:** Fracionamento por CLC da subfração BA2.3

- **BA2.4**: foi solubilizada em aproximadamente 1 mL de MeOH, havendo a precipitação espontânea de um sólido branco (BA2.4ppt), cuja análise por RMN indicou tratar-se do **composto 10**. O sobrenadante BA2.4 foi fracionado por meio de CLC com sílica gel e fase móvel Hex:AcOEt e AcOEt:MeOH em eluição gradiente (Anexo A: tabela A<sub>9</sub>). O fracionamento forneceu 180 alíquotas de aproximadamente 10 mL cada, que foram reunidas por comparação e semelhança após análise em CCDC, resultando em três frações dentre as quais, apenas uma revelou a presença de alcaloides pelo teste com reagente de Dragendorff, e após a remoção do solvente em evaporador rotatório, a fração foi armazenada a vácuo em um dessecador por 48 horas, pesada e, finalmente, enviada para análise de RMN para identificação (Esquema 11).



**Esquema 11:** Fracionamento por CLC da subfração BA2.4

- **BA2.5:** foi solubilizada em aproximadamente 1 mL de MeOH e fracionada isocraticamente por CLC utilizando-se como fase estacionária Sephadex LH20 e MeOH como fase móvel. O fracionamento forneceu 97 alíquotas de aproximadamente 5 mL cada, que foram reunidas por comparação e semelhança após análise em CCDC, resultando em quatro frações dentre as quais, apenas duas revelaram a presença de alcaloides pelo teste com reagente de Dragendorff (BA2.5.1 e BA2.5.2). Após a remoção do solvente em evaporador rotatório, as frações foram armazenadas a vácuo em um dessecador por 48 horas, pesadas. A subfração BA2.5.2 foi submetida a técnica de CCDP para isolamento de seus compostos, os quais foram enviados para identificação através da técnica de RMN, enquanto a subfração BA2.5.1 foi fracionada por CLC (Esquema 12).
  - A subfração BA2.5.1 foi fracionada por CLC, sendo solubilizada em aproximadamente 0,5 mL de MeOH e fracionada isocraticamente por CLC utilizando Sephadex LH20 como fase estacionária e MeOH como fase móvel. O fracionamento forneceu 50 alíquotas de aproximadamente 4 mL cada, que foram reunidas por comparação e semelhança após análise em CCDC, resultando em três frações dentre as quais, apenas uma revelou a presença de alcaloides pelo teste com reagente de Dragendorff (BA2.5.1.1). Após a remoção do solvente em evaporador rotatório, a subfração foi armazenada a vácuo em um dessecador por 48 horas, pesada e, finalmente, submetida a técnica de CCDP para isolamento de seus constituintes químicos, os quais foram enviados para análise de RMN para identificação.



**Esquema 12:** Fracionamento por CLC das subfrações BA2.5 e BA2.5.1

A tabela 4 resume os compostos que foram isolados do fracionamento de BA, identificados pela técnica de RMN. O sistema de solventes utilizado na eluição das frações e subfrações, bem como o fator de retenção ( $R_f$ ) dos constituintes químicos isolados e seus respectivos rendimentos estão dispostos na tabela B<sub>4</sub> do anexo B.



### **3.6 – Ensaios Biológicos de citotoxicidade**

Os ensaios biológicos em amostras de *H. canastrense* foram realizadas pelo Núcleo de Pesquisa em Ciências Farmacêuticas (NuPECFARMA) da Universidade de Vila Velha (UVV), sob a supervisão do professor Dr. Márcio Fronza. Foram realizados testes em células normais de fibroblastos L929, e a citotoxicidade foi testada para as linhagens de carcinoma hepatocelular Hep G-2, adenocarcinoma em glândulas mamárias MCF-7 e carcinoma pancreático humano MIAPaCa-2.

#### **3.6.1 – Manutenção das linhagens de células**

As células são armazenadas em nitrogênio líquido a  $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e foram cultivadas em garrafas próprias para cultivo celular em meio de cultura DMEM<sup>®</sup>, acrescido dos antibióticos penicilina  $100\text{ }\mu\text{L/mL}$  e estreptomicina  $0,1\text{ }\mu\text{g/mL}$  e bicarbonato de sódio mantidos em pH 7,2. As células foram então mantidas a  $37^{\circ}\text{ C}$  em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  até que a monocamada celular estivesse confluenta, e prontamente lavadas com 5 mL de solução tampão fosfato pH 7,4 estéril e desagregadas das garrafas com 1,5 mL de tripsina 0,25%. Após o desprendimento do tapete celular, homogeneizaram-se as células com 8,5 mL de meio de cultura acrescido de 10 % de soro fetal bovino para inativação da ação da tripsina e dissolução de possíveis grumos celulares. A suspensão celular obtida foi então contada usando azul de tripano para verificar a viabilidade celular. Após contagem na câmara de Neubauer e avaliação da viabilidade, a suspensão foi transferida para placas de 96 poços para realização dos testes.

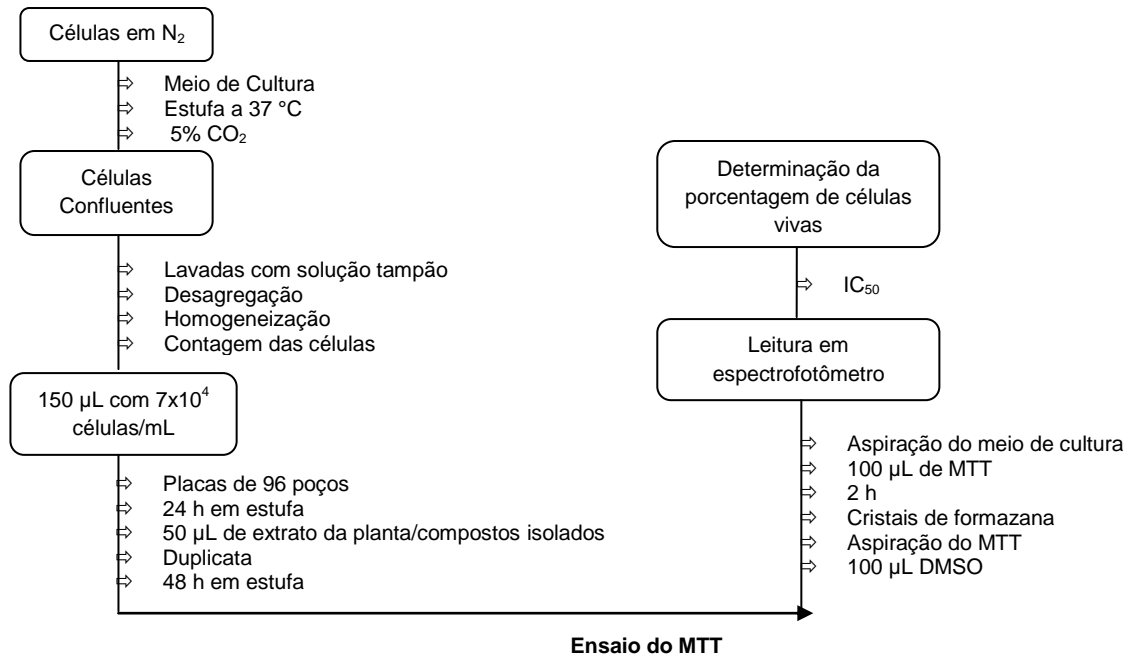
#### **3.6.2 – Ensaio de citotoxicidade**

O ensaio de citotoxicidade foi realizado pelo método colorimétrico do MTT segundo Mosmann (1983). Este método baseia-se na redução metabólica do MTT no interior da mitocôndria celular pela enzima NADPH, formando um composto de coloração violácea denominado de formazana, onde a quantidade produzida desses cristais é proporcional a quantidade de células vivas.

Para os experimentos do MTT foi utilizada uma suspensão de  $7 \times 10^4$  células/mL, e as células foram cultivadas em placas de 96 poços. Após 24 horas de cultivo, foram expostas a diferentes concentrações das amostras diluídas no próprio meio de cultura. A seguir, as placas foram incubadas por exatamente 48 horas a 37° C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após incubação, o conteúdo de cada poço foi removido, e 100 µL de MTT ( $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) foram adicionados, seguido de incubação por 2 horas para metabolização mitocondrial pelas células vivas do MTT. O excesso de MTT foi removido e os cristais de formazana dissolvidos com 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO).

A leitura da absorbância (595 nm) das placas foi feita em leitor de microplacas, e a viabilidade celular foi determinada por comparação dos valores de absorbância obtidos para as células tratadas, com células não tratadas. O resultado foi expresso em porcentagem de morte e como IC<sub>50</sub> (concentração necessária para causar a morte de 50% das células) com o auxílio de regressão linear. Cada ensaio foi realizado em duplicata. O etoposídeo foi utilizado como controle positivo, enquanto o controle negativo foi realizado com células incubadas, porém sem a adição dos extratos ou compostos isolados, e o branco utilizado na leitura da absorbância foram utilizados poços com células incubadas, porém sem adição do MTT.

O esquema a seguir resume os procedimentos de manutenção e cultivo das células, além de sintetizar o ensaio de citotoxicidade desempenhado nos extratos H, HA, HH, B, BA e BH e nos compostos **1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 19** e **20** isolados de *Hippeastrum canastrense*.



**Esquema 13:** Resumo do ensaio biológico realizado em extratos/compostos de *H. canastrense*

## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espécie *Hippeastrum canastrense* é endêmica do Brasil, entretanto até o presente momento não existem estudos sobre seu perfil alcaloídico. Neste trabalho, foram estudados tanto as hastes florais, quanto os bulbos desta espécie.

A extração ácido-base dos extratos brutos (H e B), seguida das extrações com solventes de diferentes polaridades das partes aéreas e bulbos de *H. canastrense*, forneceu os extratos enriquecidos em alcaloides: Hastes-Hexano (**HH**), Hastes-Acetato de etila (**HA**), Hastes-Acetato-metanol (**HAM**), Bulbos-Hexano (**BH**), Bulbos-Acetato de etila (**BA**) e Bulbos-Acetato-metanol (**BAM**). Os extratos brutos, assim como os extratos enriquecidos, foram analisados por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) na Universidade de Barcelona, e comparados com a biblioteca de alcaloides do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Jaume Bastida

### 4.1 - Compostos identificados por CG-EM

A comparação dos resultados das análises cromatográficas com os dados da biblioteca proporcionou a identificação de 33 alcaloides de Amaryllidaceae com variados tipos de esqueletos, tais como: homolicorina, licorina, galantamina, haemantamina, tazetina e narciclasina.

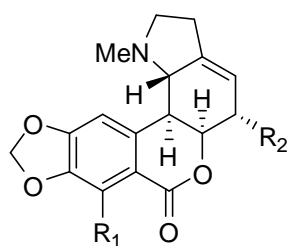
Dos extratos brutos de *Hippeastrum canastrense* foram identificados 22 alcaloides (tabela 5, figura 8). Foram também identificados 17 alcaloides nos extratos e frações das hastes florais, (tabelas 6 e 7, figura 9), e ainda 20 alcaloides nos extratos e frações dos bulbos (tabela 8 e 9, figura 10).

As frações obtidas na extração com a mistura acetato de etila e metanol (HAM e BAM) também foram analisadas por CG-EM e por não apresentarem indícios de alcaloides não foram mais estudadas.

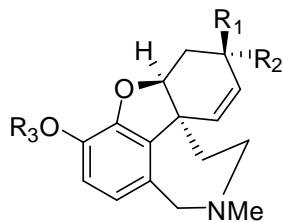
**Tabela 5:** Dados de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas dos extratos brutos das hastes florais e bulbos de *H. canastrense*

Alcaloide	Hastes florais (%)	Bulbos (%)	M <sup>+</sup>	EM
Sanguinina (1)	0,102	0,278	273(100)	272(90), 256(25), 202(45), 160(80)
Hipeastrina (4)	0,068	-	315(<1)	190(1), 162(2), 134(1), 125(100), 96(35)
Candimina (5)	0,330	-	345(<1)	190(1), 162(2), 134(1), 125(100), 96(35)
Homolicorina (9)	1,180	3,790	315(<1)	206(<1), 178(2), 109(100), 150(1), 108(22), 94(3), 82(3)
Licorina (10)	0,109	0,743	287(31)	286(19), 268(24), 250(15), 227(79), 226(100), 211(7), 147(15)
2 $\alpha$ -metoxihomolicorina (12)	1,110	1,450	345(<1)	206(<1), 178(2), 150(1), 139(100), 124(64), 96(5), 94(5), 81(3)
8-O-desmetilhomolicorina (13)	2,660	0,969	301(<1)	192(<1), 164(2), 109(100), 108(23), 94(3), 82(3)
Norpluviina (14)	0,412	-	273(68)	272(41), 255(10), 254(45), 228(100), 214(13), 186(10), 147(8), 77(12)
2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina (16)	0,520	-	287(18)	272(13), 243(12), 227(22), 211(13), 181(22), 149(30), 125(24), 111(34), 97(56)
2 $\alpha$ -7-dimetoxihomolicorina (15)	0,712	-	374(<1)	221(1), 193(1), 139(100), 124(75), 96(5)
Trisfaeridina (21)	tr <sup>a</sup>	tr <sup>a</sup>	223(100)	222(38), 167(8), 165(9), 164(14), 138(20), 137(9), 111(13)
2 $\alpha$ -metoxi-8-O-desmetilhomolicorina (22)	2,090	2,180	331(<1)	140(11), 139(100), 124(65)
8-O-desmetilmaritidina (23)	tr <sup>a</sup>	0,034	273(100)	256(22), 230(20), 201(83), 189(42), 174(22), 128(23), 115(24)
Tazetina (24)	0,760	0,454	331(31)	316(15), 298(23), 247(100), 230(12), 201(15), 181(11), 152(7)
Epi-macronina (25)	-	tr <sup>a</sup>	329(27)	314(23), 245(100), 225(14), 201(83), 139(16), 70(18)
Ismina (26)	-	tr <sup>a</sup>	257(35)	238(100), 211(6), 196(8), 168(6), 154(3), 106(4), 77(3)
Galantamina (27)	tr <sup>a</sup>	0,084	287(83)	286(100), 270(13), 244(24), 230(12), 216(33), 174(27), 115(12)
3-O-dcetilgalantamina (28)	0,075	0,259	357(50)	356(53), 315(24), 314(37), 297(43), 296(53), 254(100), 43(55)
3-O-dcetilanguinina (29)	-	0,031	315(47)	314(17), 256(100), 254(34), 212(21), 202(20), 197(16), 165(19), 96(33)
Acetilcaranina (30)	tr <sup>a</sup>	0,030	313(55)	252(91), 226(100), 210(1), 194(9), 180(4), 167(8), 154(7), 115(6), 89(8)
Caranina (31)	0,065	-	271(55)	252(45), 226(100), 210(1), 194(5), 180(3), 167(6), 154(7), 115(6), 89(8)
Desacetilcantabricina (32)	0,404	0,101	275(100)	258(27), 204(89), 188(43), 161(24), 131(19), 115(27), 91(18), 77(14)

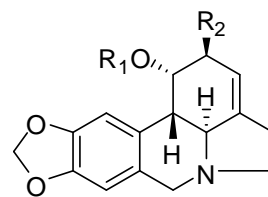
<sup>a</sup> Traços <0,01 de TIC



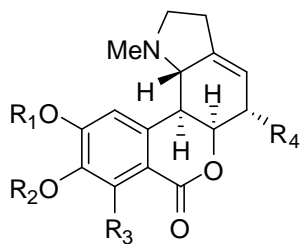
4 R<sub>1</sub>= H; R<sub>2</sub>= OH  
5 R<sub>1</sub>= OMe; R<sub>2</sub>= OH



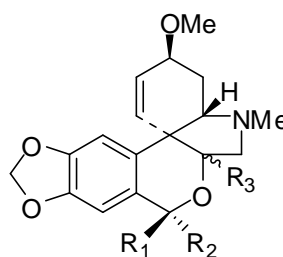
1 R<sub>1</sub>= OH; R<sub>2</sub>= H; R<sub>3</sub>= H  
27 R<sub>1</sub>= OH; R<sub>2</sub>= H; R<sub>3</sub>= Me  
28 R<sub>1</sub>= OAc; R<sub>2</sub>= H; R<sub>3</sub>= Me  
29 R<sub>1</sub>= OAc; R<sub>2</sub>= H; R<sub>3</sub>= H



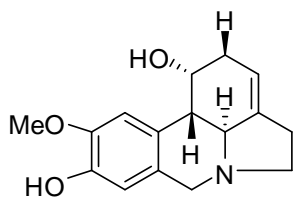
10 R<sub>1</sub>= H; R<sub>2</sub>= OH  
30 R<sub>1</sub>= Ac; R<sub>2</sub>= H  
31 R<sub>1</sub>= H; R<sub>2</sub>= H



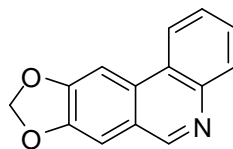
9 R<sub>1</sub>= Me; R<sub>2</sub>= Me; R<sub>3</sub>= H; R<sub>4</sub>= H  
12 R<sub>1</sub>= Me; R<sub>2</sub>= Me; R<sub>3</sub>= H; R<sub>4</sub>= OMe  
13 R<sub>1</sub>= Me; R<sub>2</sub>= H; R<sub>3</sub>= H; R<sub>4</sub>= H  
15 R<sub>1</sub>= Me; R<sub>2</sub>= Me; R<sub>3</sub>= OMe; R<sub>4</sub>= OMe  
16 R<sub>1</sub>= Me; R<sub>2</sub>= Me; R<sub>3</sub>= H; R<sub>4</sub>= OH  
22 R<sub>1</sub>= Me; R<sub>2</sub>= H; R<sub>3</sub>= H; R<sub>4</sub>= OMe



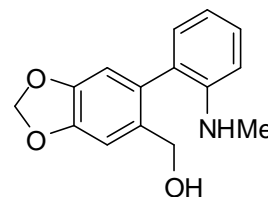
24 R<sub>1</sub>= H; R<sub>2</sub>= H; R<sub>3</sub>= OH (α)  
25 R<sub>1</sub>+ R<sub>2</sub>= O; R<sub>3</sub>= H (β)



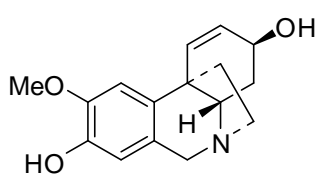
14



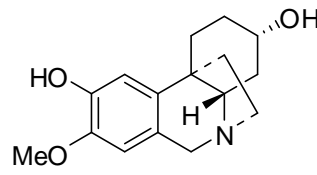
21



26



23



32

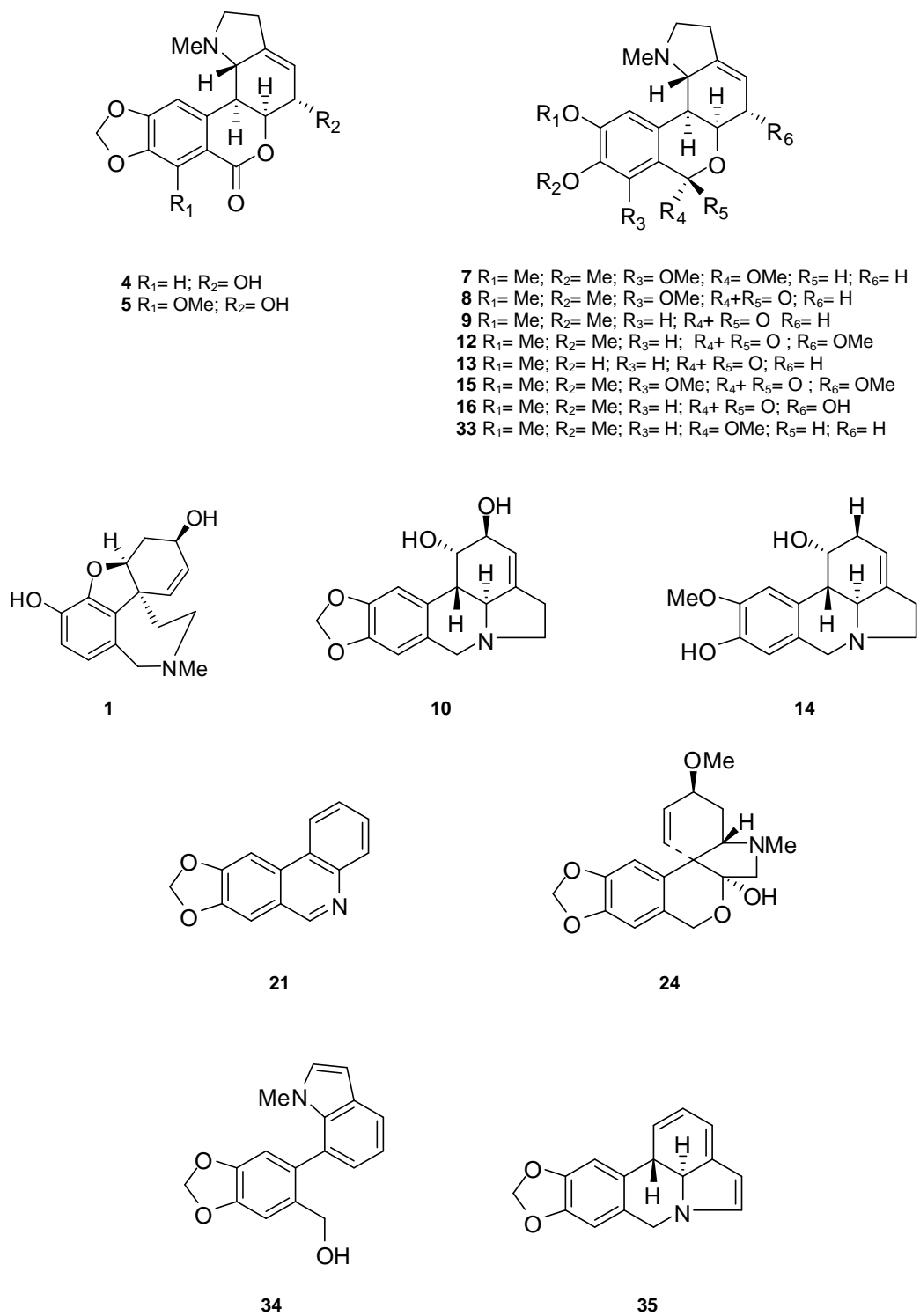
**Figura 8:** Estruturas dos alcaloides identificados por CG-EM nos extratos brutos de *H. canastrense*

**Tabela 6:** Dados de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas dos extratos das hastes florais de *Hippeastrum canastrense*

Alcaloide	HA (%)	HH (%)	M <sup>+</sup>	EM
Sanguinina (1)	0,08	-	273(100)	272(90), 256(25), 202(45), 160(80)
Candimina (5)	2,06	-	345(<1)	190(1), 162(2), 134(1), 125(100), 96(35)
Albomaculina (8)	18,98	49,64	345(<1)	221(1), 193(1), 165(1), 110(10), 109(100), 108(25), 94(2), 82(3)
Homolicorina (9)	4,99	24,44	315(<1)	206(<1), 178(2), 109(100), 150(1), 108(22), 94(3), 82(3)
Licorina (10)	0,07	-	287(31)	286(19), 268(24), 250(15), 227(79), 226(100), 211(7), 147(15)
8-O-desmetilhomolicorina (13)	0,33	19,98	301(<1)	192(<1), 164(2), 109(100), 108(23), 94(3), 82(3)
2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina (16)	0,51	-	287(18)	272(13), 243(12), 227(22), 211(13), 181(22), 149(30), 125(24), 111(34), 97(56)
2 $\alpha$ -7-dimetoxihomolicorina (15)	23,21	-	374(<1)	221(1), 193(1), 139(100), 124(75), 96(5)
Trisfaeridina (21)	0,02	-	223(100)	222(38), 167(8), 165(9), 164(14), 138(20), 137(9), 111(13)
Tazetina (24)	0,61	-	331(31)	316(15), 298(23), 247(100), 230(12), 201(15), 181(11), 152(7)
Galantidol (34)	0,42	-	281(100)	280(7), 264(13), 263(17), 262(20), 252(15), 204(7), 1(14), 132(8)
11,12-deshidroanidrollicorina (35)	0,14	-	249(60)	248(100), 191(10), 190(24), 189(7), 163(7), 95(17)

**Tabela 7:** Alcaloides identificados por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas de frações das hastes florais

Alcaloide	HA (Fração) (%)	HH (Fração) (%)	M <sup>+</sup>	EM
Hipeastrina (4)	1,40 (HA2)	-	315(<1)	190(1), 162(2), 134(1), 125(100), 96(35)
7-metoxi-O-metillicorenina (7)	-	14,33 (HH2)	361(<1)	330(8), 221(10), 191(2), 110(8), 109(100), 108(15), 94(2), 83(2)
2 $\alpha$ -metoxihomolicorina (12)	36,57 (HA8)	-	345(<1)	206(<1), 178(2), 150(1), 139(100), 124(64), 96(5), 94(5), 81(3)
Norpluviina (14)	2,87 (HA7)	-	273(68)	272(41), 255(10), 254(45), 228(100), 214(13), 186(10), 147(8), 77(12)
O-metillicorenina (33)	-	0,16 (HH3)	331(-)	300(3), 191(8), 110(9), 109(100), 108(15), 94(3), 82(2), 42(2)



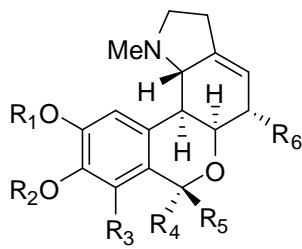
**Figura 9:** Estruturas dos alcaloides identificados por CG-EM das hastes florais de *H. canastrense*

**Tabela 8:** Alcaloides identificados por CG-EM nos extratos BA e BH dos bulbos de *H. canastrense*

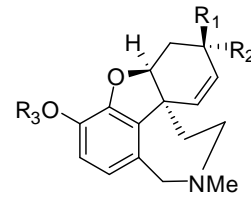
<b>Alcaloide</b>	<b>BA (%)</b>	<b>BH (%)</b>	<b>M<sup>+</sup></b>	<b>EM</b>
Sanguinina (1)	5,81	-	273(100)	272(90), 256(25), 202(45), 160(80)
Albomaculina (8)	8,44	76,91	345(<1)	221(1), 193(1), 165(1), 110(10), 109(100), 108(25), 94(2), 82(3)
8-O-desmetilhomolicorina (13)	-	14,14	301(<1)	192(<1), 164(2), 109(100), 108(23), 94(3), 82(3)
Licorina (10)	2,88	-	287(31)	286(19), 268(24), 250(15), 227(79), 226(100), 211(7), 147(15)
Anidrolícorina (36)	0,27	-	251(43)	250(100), 192(13), 191(11), 165(4), 164(3), 139(2), 124(7)
11,12-deshidroanidrolícorina (35)	1,82	-	249(60)	248(100), 191(10), 190(24), 189(7), 163(7), 95(17)

**Tabela 9:** Dados de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas das frações dos bulbos de *Hippeastrum canastrense*

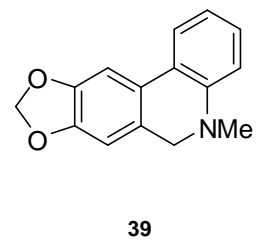
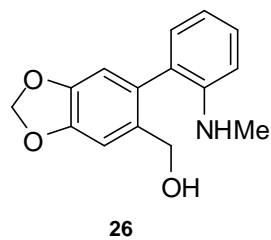
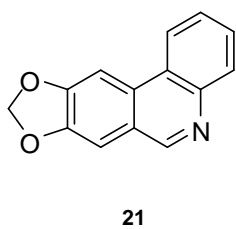
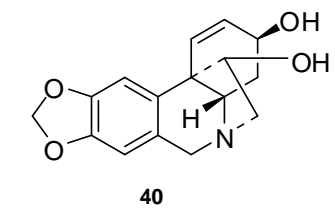
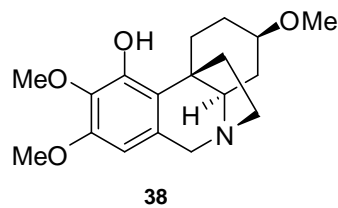
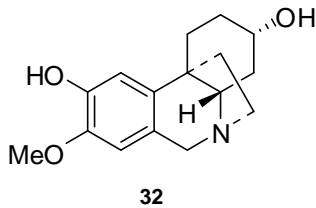
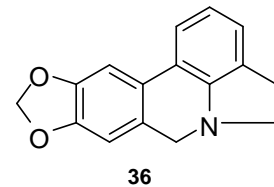
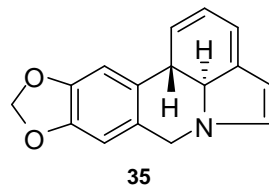
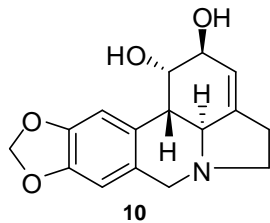
Alcaloide	BA (Fração) (%)	BH (Fração) (%)	M <sup>+</sup>	EM
Ismina (26)	0,41 (BA1)	-	257(35)	238(100), 211(6), 196(8), 168(6), 154(3), 106(4), 77(3)
	1,22 (BA2)			
Trisfaeridina (21)	0,29 (BA1)	-	223(100)	222(38), 167(8), 165(9), 164(14), 138(20), 137(9), 111(13)
	0,73 (BA2)			
Licoramina (37)	0,92 (BA1)	-	301(95)	300(100), 270(75), 216(65), 165(25)
	3,31 (BA1)			
Nerinina (20)	1,12 (BA2)	-	347(<1)	222(1), 207(2), 179(1), 164(1), 110(8), 109(100), 108(18), 94(2)
	2,35 (BA2ppt)			
Aulicina (38)	0,58 (BA1)	-	319(100)	304(19), 288(37), 246(18), 233(73), 218(19), 206(26), 163(7)
5,6-dihidrobicolorina (39)	0,45 (BA2)	-	239(37)	238(99), 180(29), 167(7), 152(15), 140(6), 139(15), 77(6), 63(7)
11-hidroxitatina (40)	3,45 (BA2)	-	287(5)	258(100), 211(15), 186(20), 181(23), 153(13), 128(24), 115(23)
Desacetilcantabricina (32)	2,84 (BA2ppt)	-	277(2)	275(100), 274(22), 258(27), 204(89), 188(43), 161(24), 131(19), 91(18), 77(14)
Galantamina (27)	1,11 (BA1)	0,41 (BH2)	287(83)	286(100), 270(13), 244(24), 230(12), 216(33), 174(27), 115(12)
	0,68 (BA2)	2,58 (BH3)		
O-metillicorenina (33)	2,73 (BA1)	0,18 (BH2)	331(-)	300(3), 191(8), 110(9), 109(100), 108(15), 94(3), 82(2), 42(2)
7-metoxi-O-metillicorenina (7)	39,98 (BA1)	27,08 (BH2)	361(<1)	330(8), 221(10), 191(2), 110(8), 109(100), 108(15), 94(2), 83(2)
		15,33 (BH3)		
Homolicorina (9)	-	3,05 (BH2)	315(<1)	206(<1), 178(2), 109(100), 150(1), 108(22), 94(3), 82(3)
		1,26 (BH3)		
2 $\alpha$ -metoxihomolicorina (12)		2,99 (BH3)	345(<1)	206(<1), 178(2), 150(1), 139(100), 124(64), 96(5), 94(5), 81(3)
2 $\alpha$ -7-dimetoxihomolicorina (15)	8,29 (BA1)	3,42 (BH3)	374(<1)	221(1), 193(1), 139(100), 124(75), 96(5)
	11,36 (BA2)			



- 7 R<sub>1</sub>= Me; R<sub>2</sub>= Me; R<sub>3</sub>= OMe; R<sub>4</sub>= OMe; R<sub>5</sub>= H; R<sub>6</sub>= H  
 8 R<sub>1</sub>= Me; R<sub>2</sub>= Me; R<sub>3</sub>= OMe; R<sub>4</sub>+R<sub>5</sub>= O; R<sub>6</sub>= H  
 9 R<sub>1</sub>= Me; R<sub>2</sub>= Me; R<sub>3</sub>= H; R<sub>4</sub>+ R<sub>5</sub>= O R<sub>6</sub>= H  
 12 R<sub>1</sub>= Me; R<sub>2</sub>= Me; R<sub>3</sub>= H; R<sub>4</sub>+ R<sub>5</sub>= O ; R<sub>6</sub>= OMe  
 13 R<sub>1</sub>= Me; R<sub>2</sub>= H; R<sub>3</sub>= H; R<sub>4</sub>+ R<sub>5</sub>= O; R<sub>6</sub>= H  
 15 R<sub>1</sub>= Me; R<sub>2</sub>= Me; R<sub>3</sub>= OMe; R<sub>4</sub>+ R<sub>5</sub>= O ; R<sub>6</sub>= OMe  
 20 R<sub>1</sub>= Me; R<sub>2</sub>= Me; R<sub>3</sub>= OMe; R<sub>4</sub>= OH; R<sub>5</sub>= H; R<sub>6</sub>= H  
 33 R<sub>1</sub>= Me; R<sub>2</sub>= Me; R<sub>3</sub>= H; R<sub>4</sub>= OMe; R<sub>5</sub>= H; R<sub>6</sub>= H



- 1 R<sub>1</sub>= OH; R<sub>2</sub>= H; R<sub>3</sub>= H  
 27 R<sub>1</sub>= OH; R<sub>2</sub>= H; R<sub>3</sub>= Me  
 37 R<sub>1</sub>= OH; R<sub>2</sub>= H; R<sub>3</sub>= Me

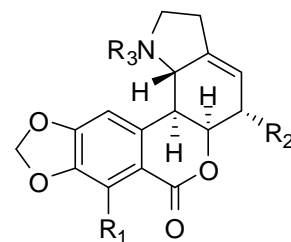
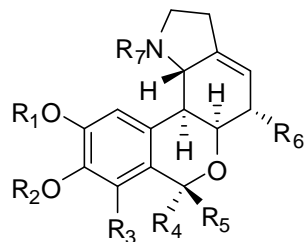


**Figura 10:** Estruturas dos alcaloides identificados por CG-EM dos bulbos de *H. canastrense*

## 4.2 - Compostos isolados

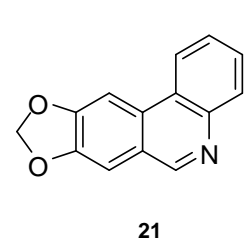
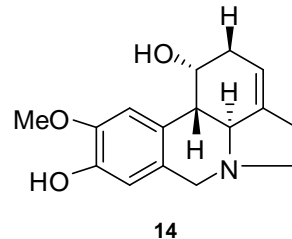
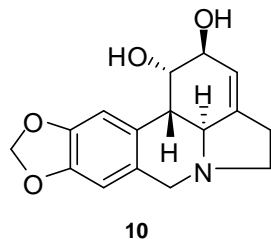
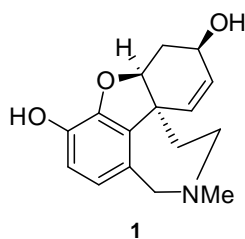
Neste trabalho, foram identificados e/ou isolados 21 compostos pertencentes a classe dos alcaloides isoquinolínicos com esqueletos dos tipos homolycorina, lycorina, galantamina e narciclasina (figura 11).

Dentre os compostos isolados, 16 foram identificados por análise de RMN e comparação dos dados com a literatura como: sanguinina (**1**), hipeastrina (**4**), candimina (**5**), 7-metoxi-*O*-metillicorenina (**7**), albomaculina (**8**), homolicorina (**9**), licorina (**10**), 8-*O*-desmetilhomolicorina (**13**), norpluviina (**14**), 2 $\alpha$ ,7-dimetoxihomolicorina (**15**), 2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina (**16**), 2 $\alpha$ -hidroxialbomaculina (**17**), masonina (**18**), normasonina (**19**), nerinina (**20**), e trisfaeridina (**21**). Além de cinco compostos isolados pela primeira vez, no qual a análise por RMN levou à determinação das estruturas dos alcaloides: 8-*O*-desmetil-2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina (**2**), 7-metoximasonina (**3**), 2-*O*-metilcandimina (**6**), 7-metoxinormasonina (**11**) e 2 $\alpha$ -metoxihomolicorina (**12**), onde o último foi, até o presente momento, identificado apenas pela técnica de CG-EM (de Andrade *et al.*, 2014), não possuindo portanto, informações de RMN na literatura.



- 2** R<sub>1</sub>= Me; R<sub>2</sub>= H; R<sub>3</sub>= H; R<sub>4</sub>+ R<sub>5</sub>= O; R<sub>6</sub>= MeO; R<sub>7</sub>=Me  
**7** R<sub>1</sub>= Me; R<sub>2</sub>= Me; R<sub>3</sub>= OMe; R<sub>4</sub>= OMe; R<sub>5</sub>= H; R<sub>6</sub>= H; R<sub>7</sub>=Me  
**8** R<sub>1</sub>= Me; R<sub>2</sub>= Me; R<sub>3</sub>= OMe; R<sub>4</sub>+R<sub>5</sub>= O; R<sub>6</sub>= H; R<sub>7</sub>=Me  
**9** R<sub>1</sub>= Me; R<sub>2</sub>= Me; R<sub>3</sub>= H; R<sub>4</sub>+ R<sub>5</sub>= O; R<sub>6</sub>= H; R<sub>7</sub>=Me  
**12** R<sub>1</sub>= Me; R<sub>2</sub>= Me; R<sub>3</sub>= H; R<sub>4</sub>+ R<sub>5</sub>= O; R<sub>6</sub>= OMe; R<sub>7</sub>=Me  
**13** R<sub>1</sub>= Me; R<sub>2</sub>= H; R<sub>3</sub>= H; R<sub>4</sub>+ R<sub>5</sub>= O; R<sub>6</sub>= H; R<sub>7</sub>=Me  
**15** R<sub>1</sub>= Me; R<sub>2</sub>= Me; R<sub>3</sub>= OMe; R<sub>4</sub>+ R<sub>5</sub>= O; R<sub>6</sub>= OMe; R<sub>7</sub>=Me  
**16** R<sub>1</sub>= Me; R<sub>2</sub>= Me; R<sub>3</sub>= H; R<sub>4</sub>+ R<sub>5</sub>= O; R<sub>6</sub>= OH; R<sub>7</sub>=Me  
**17** R<sub>1</sub>= Me; R<sub>2</sub>= Me; R<sub>3</sub>= MeO; R<sub>4</sub>+ R<sub>5</sub>= O; R<sub>6</sub>= OH; R<sub>7</sub>=Me  
**20** R<sub>1</sub>= Me; R<sub>2</sub>= Me; R<sub>3</sub>= OMe; R<sub>4</sub>= OH; R<sub>5</sub>= H; R<sub>6</sub>= H; R<sub>7</sub>=Me

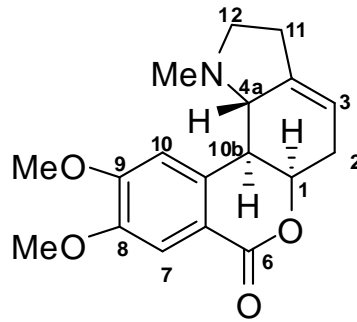
- 3** R<sub>1</sub>= OMe; R<sub>2</sub>= H; R<sub>3</sub>=Me  
**4** R<sub>1</sub>= H; R<sub>2</sub>= OH; R<sub>3</sub>=Me  
**5** R<sub>1</sub>= OMe; R<sub>2</sub>= OH; R<sub>3</sub>=Me  
**11** R<sub>1</sub>= OMe; R<sub>2</sub>= H; R<sub>3</sub>=H  
**18** R<sub>1</sub>= H; R<sub>2</sub>= H; R<sub>3</sub>=Me  
**19** R<sub>1</sub>= H; R<sub>2</sub>= H; R<sub>3</sub>=H



**Figura 11:** Estruturas dos alcaloides isolados de *Hippeastrum canastrense*

#### 4.2.1 – Compostos com esqueleto do tipo homolicorina

O fracionamento dos extratos das hastas florais e bulbos da espécie *Hippeastrum canastrense* levou ao isolamento e identificação por RMN de 16 alcaloides derivados do núcleo homolicorina (figura 12).



**Figura 12:** Estrutura química do alcaloide homolicorina

As principais características do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C) do alcaloide homolicorina podem ser resumidas em: (a) dois hidrogênios singletos (s) *p*-orientados em 7,57 e 6,99 ppm, referente aos hidrogênios das posições 7 e 10 respectivamente; (b) um hidrogênio olefínico em 5,50 ppm, referente ao hidrogênio da posição 3; (c) um duplo duplo dubleto (ddd) em 4,81 ppm atribuído ao hidrogênio da posição 1; (d) dois singletos, integrando para 3 hidrogênios cada, referente aos grupos  $\text{OCH}_3$  das posições 8 e 9 em 3,96 e 3,95 ppm; (e) um ddd em 3,14 ppm atribuído ao hidrogênio da posição 12 $\alpha$ ; (f) um duplo dubleto (dd) em 2,72 ppm, referente ao hidrogênio da posição 4a; (g) um dd em 2,64 ppm, atribuído ao hidrogênio da posição 10b; (h) um quadrupletto (q) em aproximadamente 2,24 ppm, referente ao hidrogênio da posição 12 $\beta$ ; (i) um singleto referente ao grupo  $\text{NCH}_3$  em aproximadamente 2,00 ppm, igualmente apresentando integração para 3 hidrogênios.

O esqueleto do alcaloide homolicorina pertence à série das lactonas, devido a ausência de hidrogênios na posição 6, e ainda à atribuição por RMN  $^{13}\text{C}$  do carbono 6 como uma carboxila (JEFFS *et al.*, 1985).

Ainda, o alcaloide homolicorina apresenta, tipicamente, os hidrogênios das posições 4a e 10b em disposição *trans* di-axial, sendo caracterizado no espectro de

RMN  $^1\text{H}$  pela constante de acoplamento  $J_{10b,4a}$  de aproximadamente 9,5 Hertz (Hz). Esta estereoquímica mantém-se preservada, pois provém da fusão *cis* entre os anéis B e C do esqueleto que o origina. Além disso, pode-se destacar também que o hidrogênio  $\alpha$  orientado da posição 12 apresenta-se mais desblindado que o hidrogênio  $\beta$  da posição 12, devido à relação *cis* com o par de elétrons livre do átomo de Nitrogênio do grupo  $\text{NCH}_3$ , conforme descrito por Bastida *et al.* (2006).

#### 4.2.1.1 – Composto 2

O fracionamento do extrato acetato de etila das hastes florais de *Hippeastrum canastrense* levou ao isolamento de 1,2 mg do composto **2**, que se apresentou como um sólido branco. O composto foi solubilizado em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) para análise de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 13).

As características dos sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$  incluem: (a) dois hidrogênios singletos em 7,62 e 6,93 ppm, correspondentes aos hidrogênios aromáticos *p*-orientados H-7 e H-10; (b) um hidrogênio olefínico em 5,61 ppm, referente ao hidrogênio da posição 3; (c) um dubleto largo em 4,70 ppm, atribuído ao hidrogênio da posição 1; (d) um multiplete em 4,52 ppm, atribuído ao hidrogênio da posição 2 (d) um singleto, integrando para 3 hidrogênios, referente a um grupo  $\text{O-CH}_3$  no anel aromático em 3,97 ppm; (e) um multiplete em 3,15 ppm atribuído ao hidrogênio da posição  $12\alpha$ ; (f) um duplo dubleto em 2,88 ppm, atribuído ao hidrogênio da posição 10b; (g) um dubleto largo em 2,74 ppm, referente ao hidrogênio da posição 4a; (h) um multiplete em aproximadamente 2,28 ppm, referente ao hidrogênio da posição  $12\beta$ ; (i) um singleto referente ao grupo  $\text{NCH}_3$  em 2,05 ppm, apresentando integração para 3 hidrogênios.

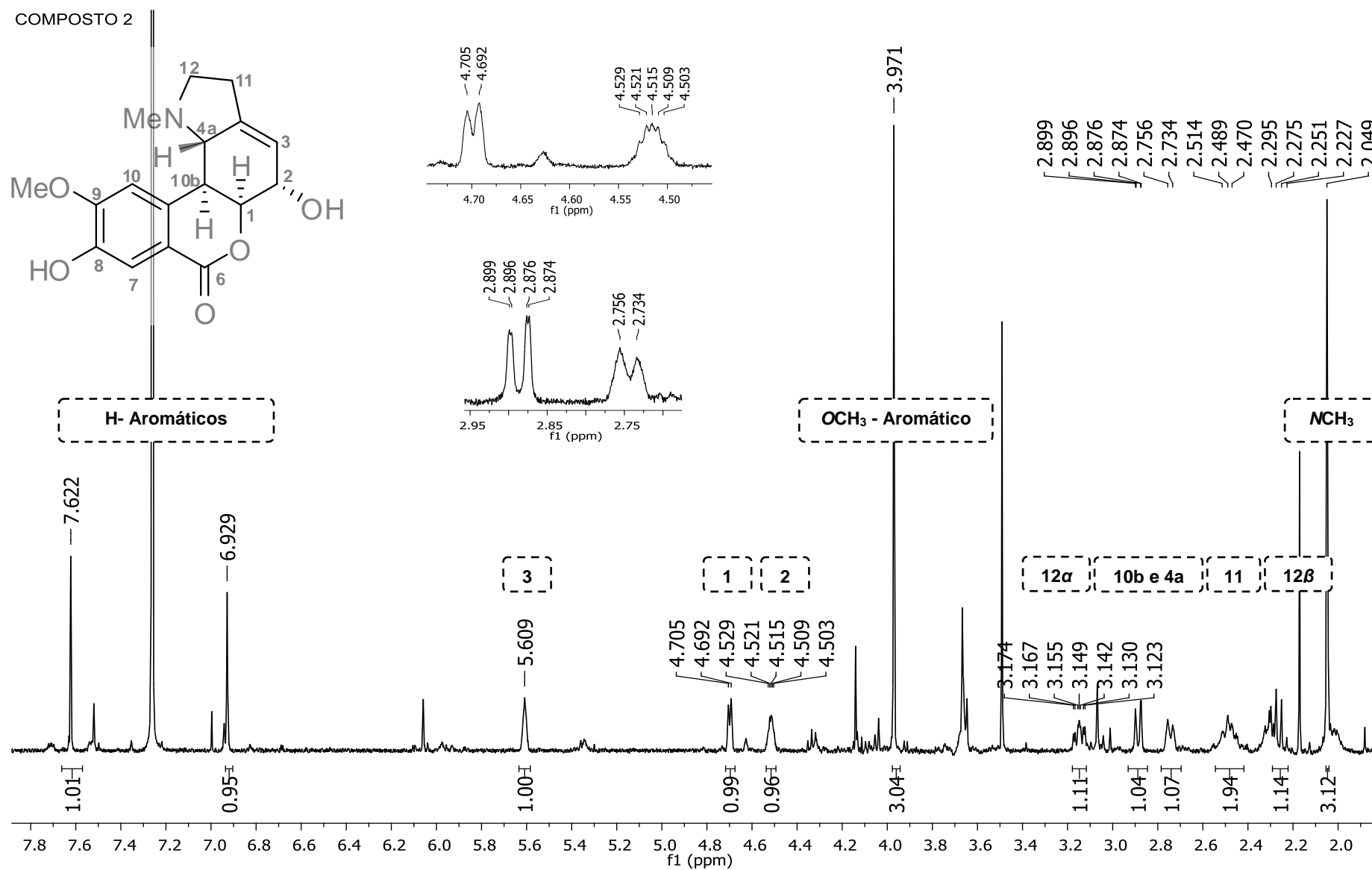
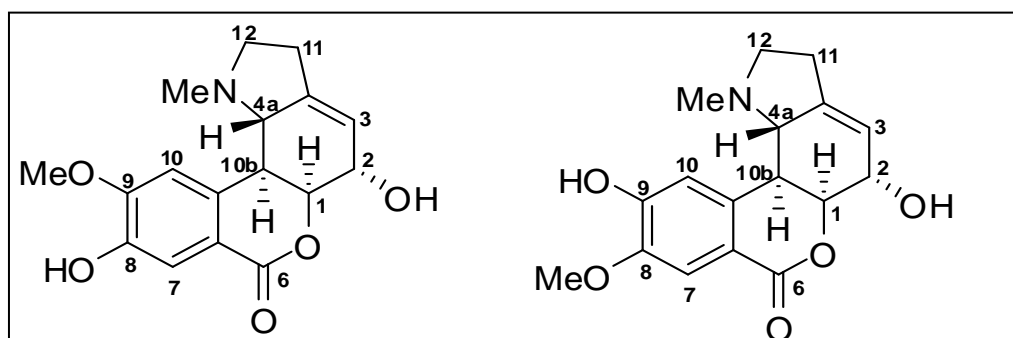


Figura 13: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 2 e ampliações (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, 400 MHz)

Os dados obtidos no RMN  $^1\text{H}$  do composto **2**, indicam que a estrutura desse composto possui esqueleto do tipo homolicorina da série das lactonas, devido a ausência de hidrogênios na posição 6. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  evidencia a presença de apenas uma metoxila aromática, levando à possibilidade de dois isômeros de posição (figura 14), e ainda, uma substituição na posição 2, uma vez que o hidrogênio desta posição está consideravelmente desblindado se comparado aos hidrogênios do alcaloide homolicorina. A ausência de metoxilas alifáticas, sugere que o substituinte em 2 seja um grupamento hidroxila. A posição trans di-axial entre os hidrogênios das posições 4a e 10b é confirmada através do cálculo da constante de acoplamento ( $J_{10b,4a} = 9,0$  Hz). Os dados de RMN  $^1\text{H}$  foram comparados com os dados do alcaloide 9-O-desmetil-2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina descrito na literatura (BASTIDA *et al.*, 1990), (tabela 10).

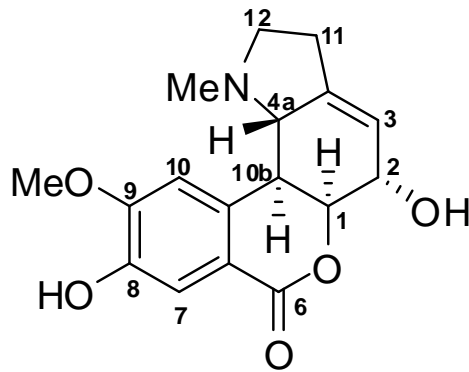


**Figura 14:** Estrutura química dos isômeros de posição 8- e 9-O-desmetil-2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina, respectivamente

**Tabela 10:** Comparação entre os  $\delta$  do composto **2** e 9-O-desmetil-2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina (200 MHz)

Posição	Composto 2 ( $\delta$ em ppm, J em Hz)	9-O-desmetil-2 $\alpha$ -hidroxi-homolicorina (BASTIDA <i>et al.</i> , 1990)
1	4,70 br d (4,8)	4,59 br d
2 $\beta$	4,52 m	4,28 br t
3	5,61 br s	5,68 br s
4a	2,74 br d (9,0)	2,66 br d
7	7,62 s	7,47 s
10	6,93 s	6,95 s
10b	2,88 dd (9,0, 1,2)	2,83 dd
11 (2H)	2,42-2,60 m	2,50-2,60 m
12 $\alpha$	3,15 m	3,17 ddd
12 $\beta$	2,28 m	2,31 dd
8-OMe	3,97 s	3,95 s
9-OMe	-	-
NMe	2,05 s	2,08 s
Solvente	CDCl <sub>3</sub>	CDCl <sub>3</sub> /CD <sub>3</sub> OD

Para confirmar a posição da metoxila aromática, foi realizada a análise de RMN NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , na qual se observa a existência da correlação de NOESY do hidrogênio da posição 10 com o substituinte em questão, assim como a correlação com o grupamento  $\text{NCH}_3$ , e ainda, verificou-se que o hidrogênio da posição 7 não apresenta correlação de NOESY com o grupamento metoxila, portando foi proposto que o composto **2** trata-se do isômero 8-O-desmetil-2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina, um alcaloide ainda não descrito na literatura (figura 15). A tabela 11 resume a atribuição dos sinais com base nos dados de RMN mono e bidimensionais realizados (figura 16 e 17). As demais análises para completa caracterização do composto estão em andamento.



**Figura 15:** Estrutura química do alcaloide 8-O-desmetil-2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina (**2**)

**Tabela 11:** Dados espectrais de RMN da 8-O-desmetil-2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina (**2**)

Posição	H $\delta$ ( $\delta$ em ppm, J em Hz)	COSY	NOESY
<b>1</b>	4,70 br d (4,8)	H-2, H-10b	H-2,H-10b
<b>2<math>\beta</math></b>	4,52 m	H-1, H-3	H-1
<b>3</b>	5,61 br s	H-2, H-4a, H-11	H-2, H-11
<b>4a</b>	2,74 br d (9,0)	H-3, H-10b	$\text{NCH}_3$
<b>7</b>	7,62 s		
<b>10</b>	6,93 s		H-10b, $\text{NCH}_3$ , $\text{OCH}_3$
<b>10b</b>	2,88 dd (9,0, 1,2)	H-1, H-4a	H-1,H-10
<b>11 (2H)</b>	2,42-2,60 m	H-3, H-12 $\alpha$ , H-12 $\beta$	H-12 $\beta$
<b>12<math>\alpha</math></b>	3,15 m	H-11, H-12 $\beta$	H-12 $\beta$ , H-11
<b>12<math>\beta</math></b>	2,28 m	H-11, H-12 $\alpha$	H-11, H-12 $\alpha$ , $\text{NCH}_3$
<b>9-OMe</b>	3,97 s		H-10
<b>NMe</b>	2,05 s	H-12 $\beta$	H-11, H-12 $\alpha$ , H-12 $\beta$

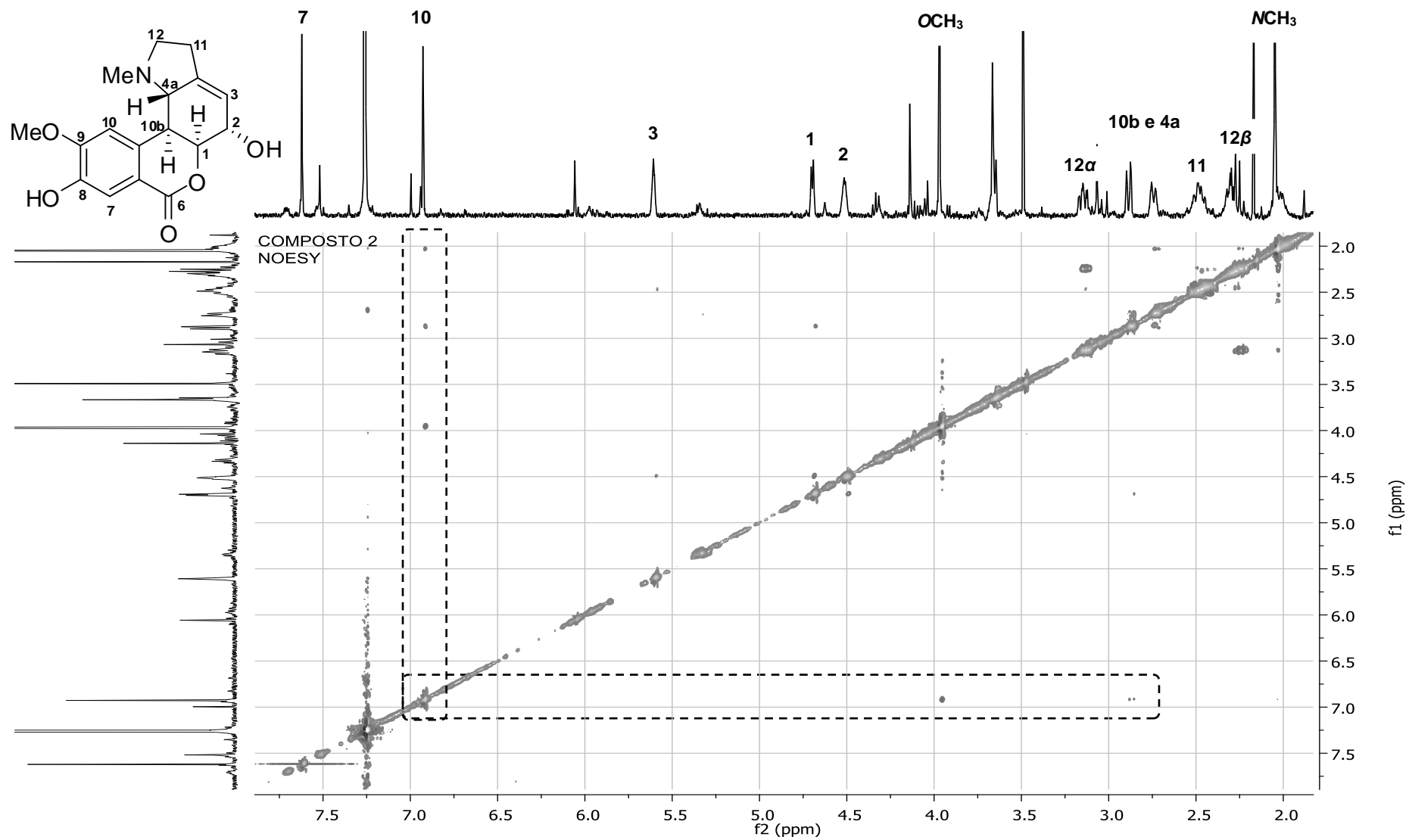


Figura 16: Espectro de NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  do composto **2** ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, 400 MHz)

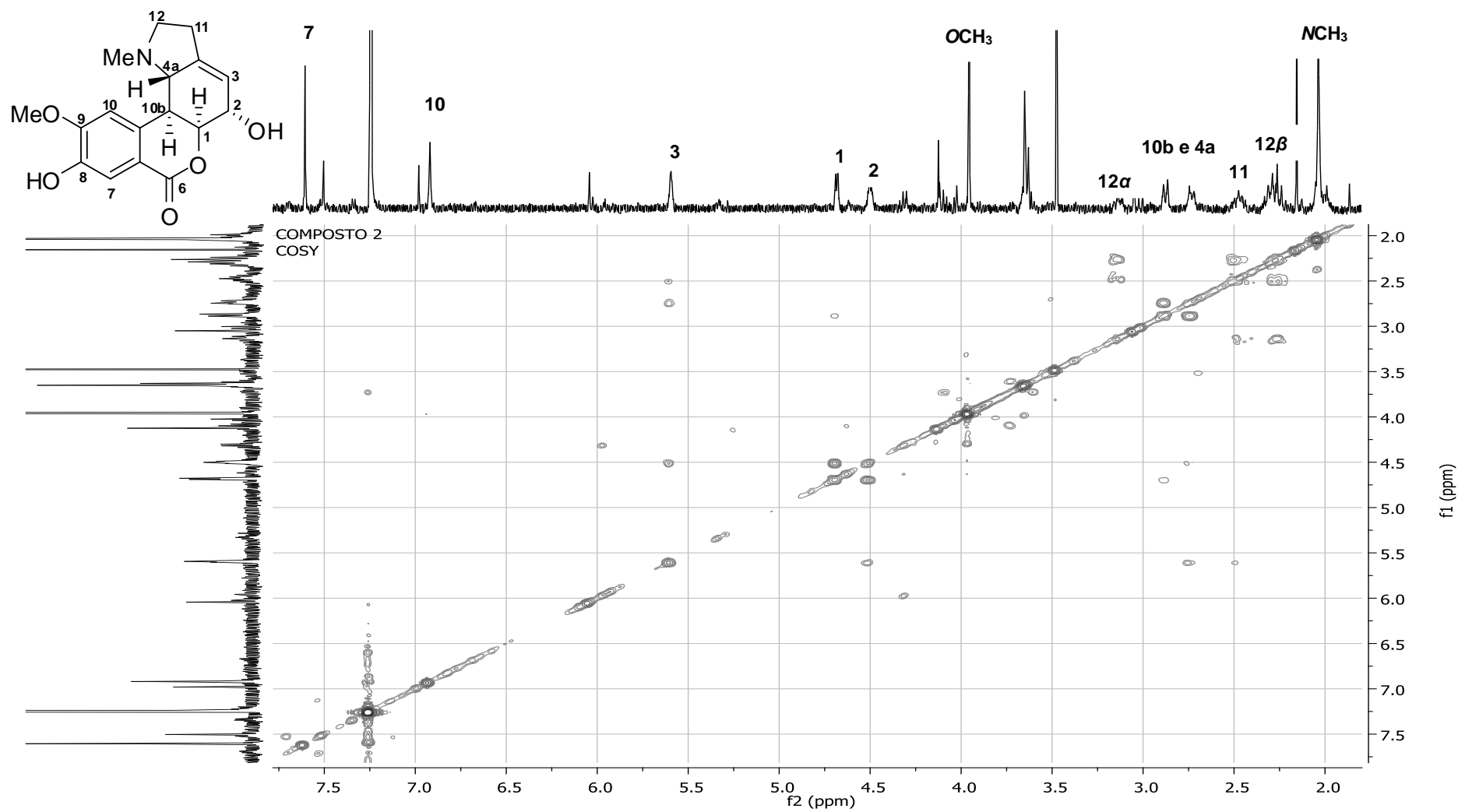


Figura 17: Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  do composto 2 ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, 400 MHz)

#### 4.2.1.2 – Composto 3

O fracionamento dos extratos hexano e acetato de etila das hastes florais e bulbos de *Hippeastrum canastrense* levou ao isolamento de um total de 30,1 mg do composto **3**, que se apresentou como um sólido branco. O composto foi solubilizado em metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD) para análise de RMN <sup>1</sup>H (Figura 18).

As características dos sinais no espectro de RMN <sup>1</sup>H incluem: (a) um hidrogênio singleto em 6,74 ppm, correspondente ao hidrogênio H-10; (b) dois dubletos em 6,08 ppm, integrando para dois hidrogênios, atribuídos ao grupo OCH<sub>2</sub>O no anel aromático; (c) um hidrogênio olefínico em 5,55 ppm, referente ao hidrogênio da posição 3; (d) um dubleto largo em 4,71 ppm, atribuído ao hidrogênio da posição 1; (e) um singleto, integrando para 3 hidrogênios, referente a um grupo OCH<sub>3</sub> no anel aromático em 4,07 ppm; (f) um ddd em 3,15 ppm atribuído ao hidrogênio da posição 12 $\alpha$ ; (g) um multiplete em 2,72 ppm, integrando para dois hidrogênios, atribuído aos hidrogênios da posição 4a e 10b; (h) um quadruplete em 2,29 ppm, referente ao hidrogênio da posição 12 $\beta$ ; (i) um singleto referente ao grupo NCH<sub>3</sub> em 2,11 ppm, apresentando integração para 3 hidrogênios.

Os dados obtidos no RMN <sup>1</sup>H do composto **3**, indicam que a estrutura desse alcaloide é do tipo homolicorina da série das lactonas, devido a ausência de hidrogênios na posição 6. O espectro de RMN <sup>1</sup>H evidencia a presença de apenas um hidrogênio aromático, sugerindo uma substituição no anel aromático por uma metoxila na posição 7 ou 10 do composto, nesse sentido, a análise de RMN bidimensionais NOESY e COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (figuras 19 e 20) foram de extrema importância para confirmar a posição do substituinte em questão.

O espectro de NOESY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H exibe a correlação do hidrogênio aromático tanto com o grupo NCH<sub>3</sub> em 2,11 ppm, quanto com o hidrogênio da posição 10b em aproximadamente 2,72 ppm, o que leva à indicação de que a posição não substituída no anel aromático é a posição 10, e ainda, o espectro COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H corrobora a constatação através do acoplamento explícito entre os hidrogênios 10 e 10b.

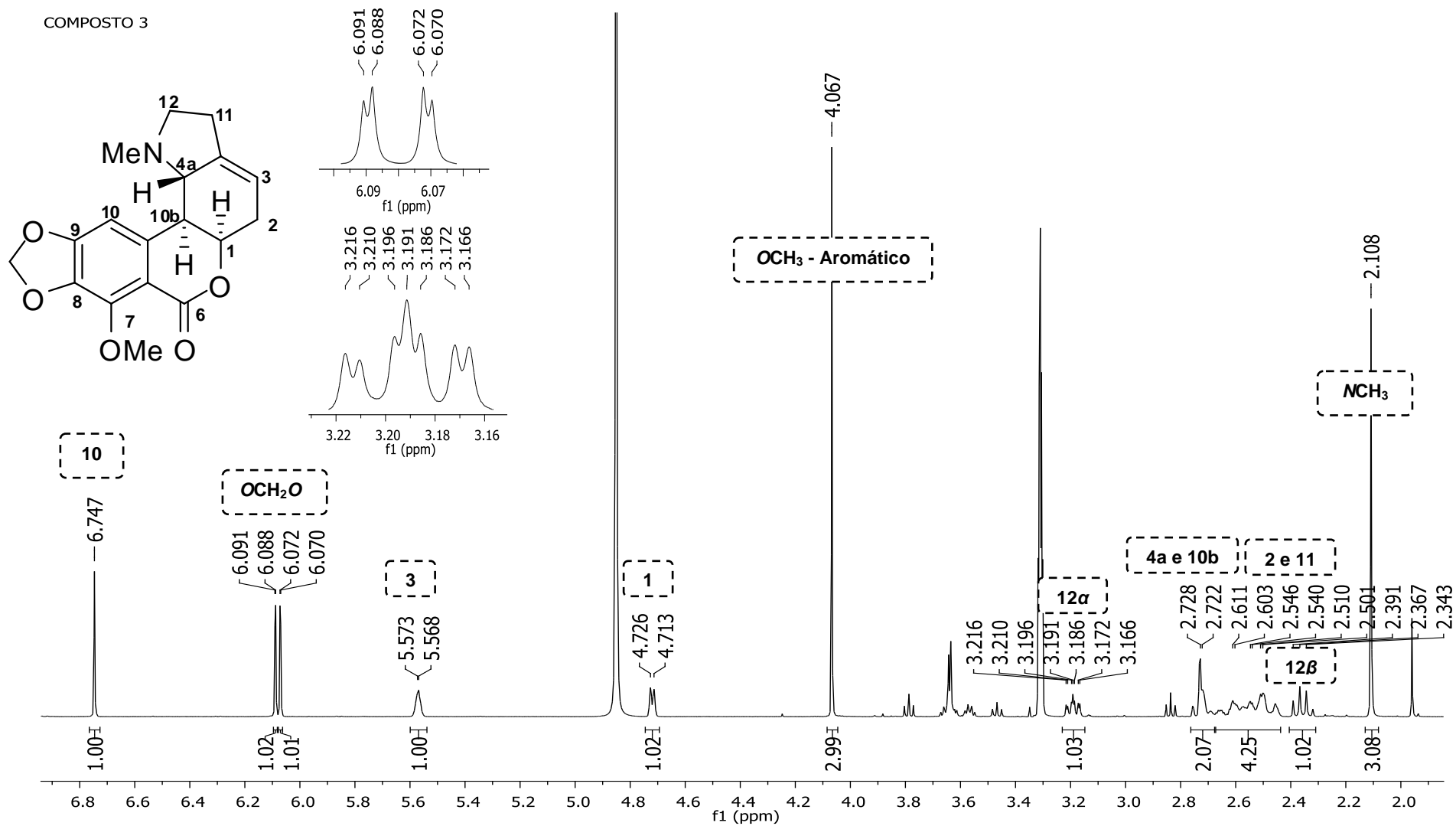


Figura 18: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 3 e ampliações ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 25 °C, 400 MHz)

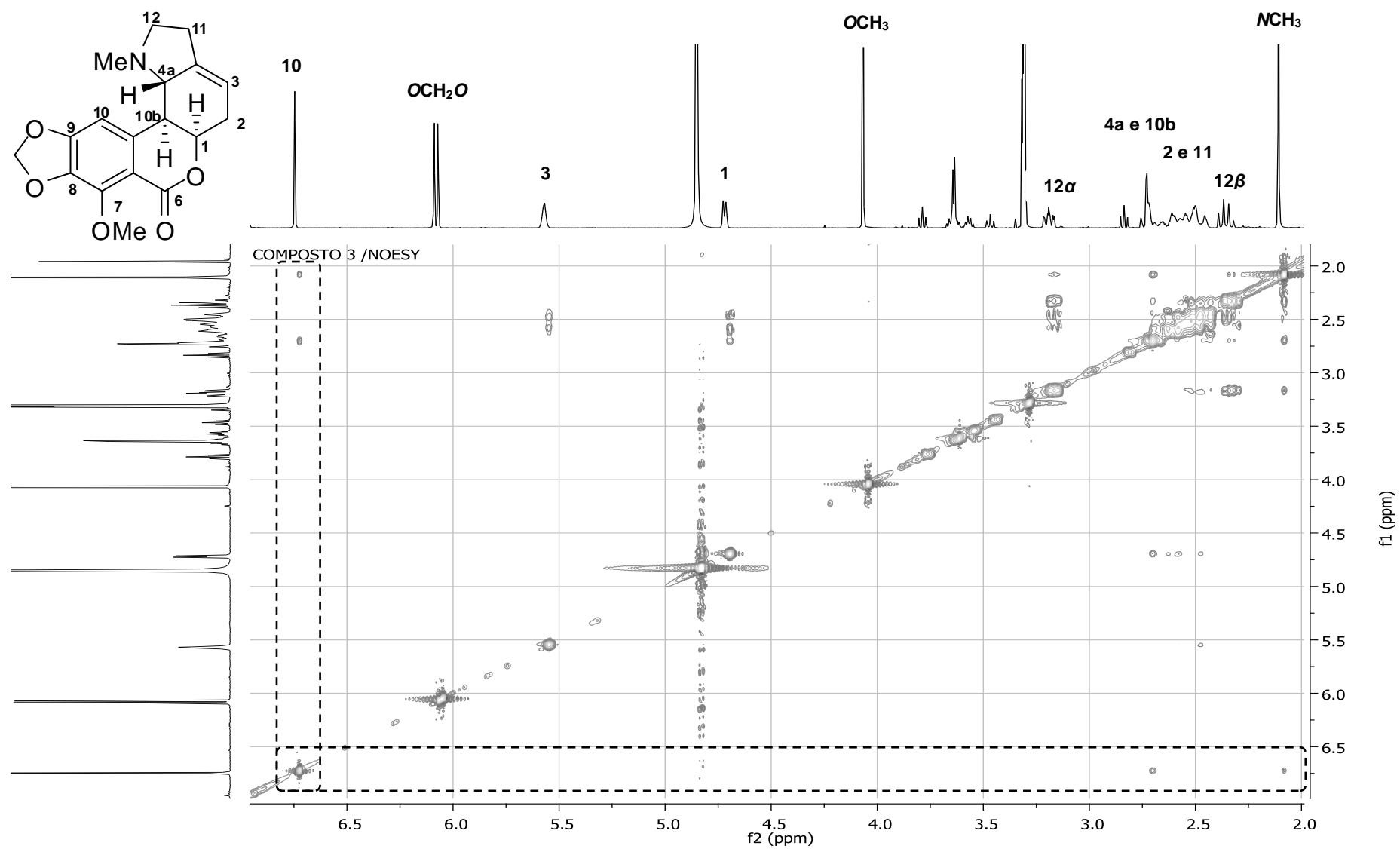


Figura 19: Espectro de NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  do composto **3** (CD<sub>3</sub>OD, 25 °C, 400 MHz)

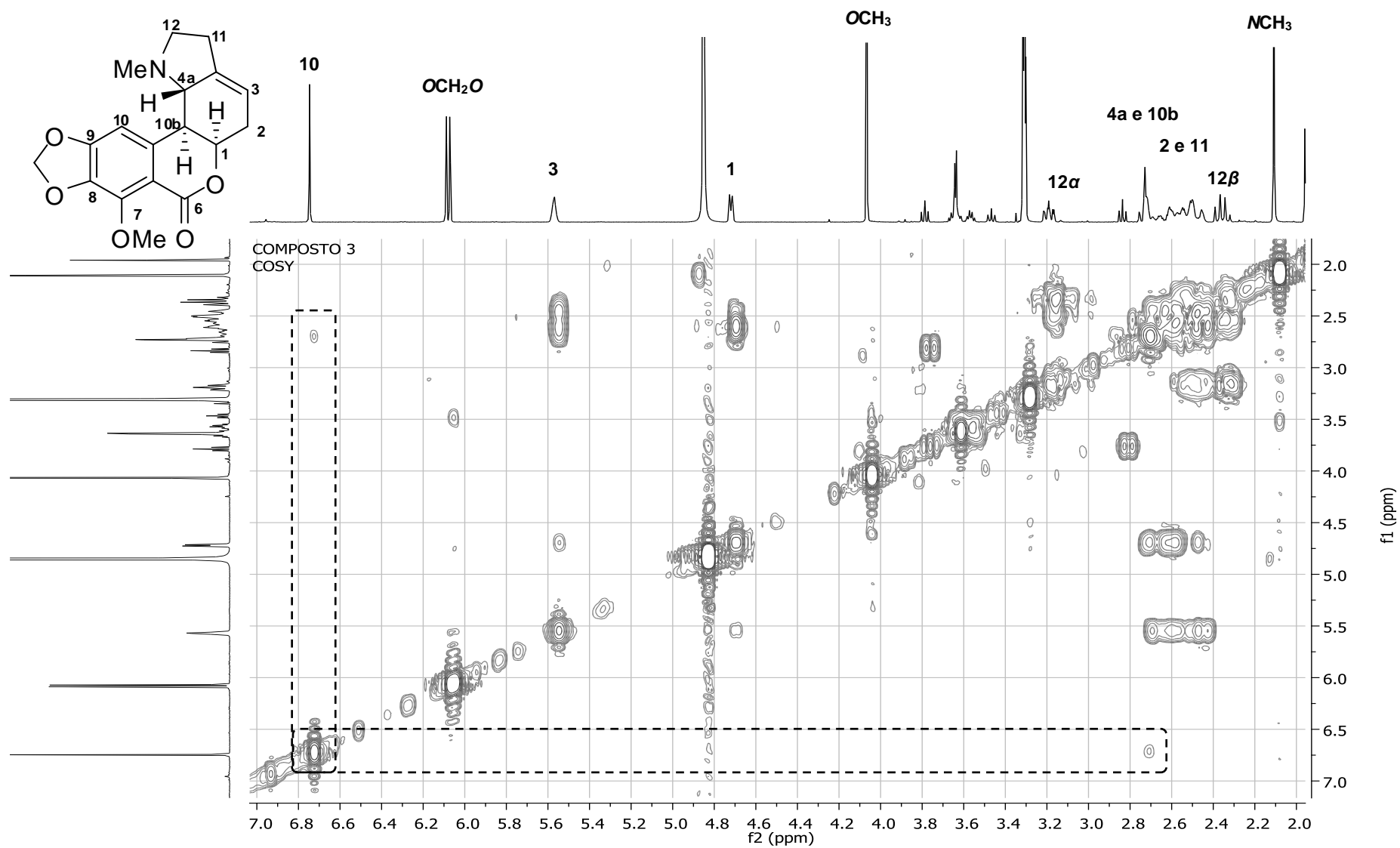


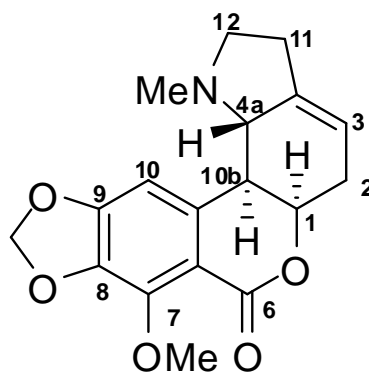
Figura 20: Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  do composto 3 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 25 °C, 400 MHz)

Constatou-se uma apreciável similaridade do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **3** com os deslocamentos teóricos do alcaloide masonina descrito na literatura por Kreh e colaboradores (1995), onde o espectro de **3** diferencia-se apenas pela substituição que ocorre no anel aromático (tabela 12). Este diferencial revela um composto inédito, denominado 7-metoximasonina (figura 21) e para a completa elucidação da estrutura proposta, foram realizadas as demais análises de RMN bidimensionais HSQC, HMBC e RMN  $^{13}\text{C}$  (figuras 22, 23 e 24).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  apresentou dezoito sinais, condizentes com a estrutura sugerida, e ainda, o sinal em 164,7 ppm é característico de um carbono carboxílico, evidenciando a presença do grupo lactona no arcabouço. A tabela 13 resume a atribuição dos sinais com base nos dados de RMN mono e bidimensionais realizados.

**Tabela 12:** Comparação entre os  $\delta$  do composto **3** e o alcaloide masonina (400 MHz)

Posição	Composto 3 ( $\delta$ em ppm, J em Hz)	Masonina (KREH e MATUSCH, 1995)
1	4,63 m	4,75 m
2(2H)	2,55 m	2,60 m
3	5,46 m	5,50 br d (2,2)
4a	2,68 br d (9,9)	2,74 m
7	-	7,49 s
10	6,66 s	6,96 s
10b	2,61 br d (9,9)	2,74 m
11 (2H)	2,46 m	2,50 m
12 $\alpha$	3,15 m	3,18 ddd (7,4; 6,3; 4,2)
12 $\beta$	2,22 q (9,4)	2,27 dd (18,7; 9,2)
7-OMe	4,12 s	-
OCH <sub>2</sub> O	6,02 br s	6,07 2d
MMe	2,07 s	2,06 s
Solvente	CDCl <sub>3</sub>	CDCl <sub>3</sub>



**Figura 21:** Estrutura química do alcaloide 7-metoxi-masonina (**3**)

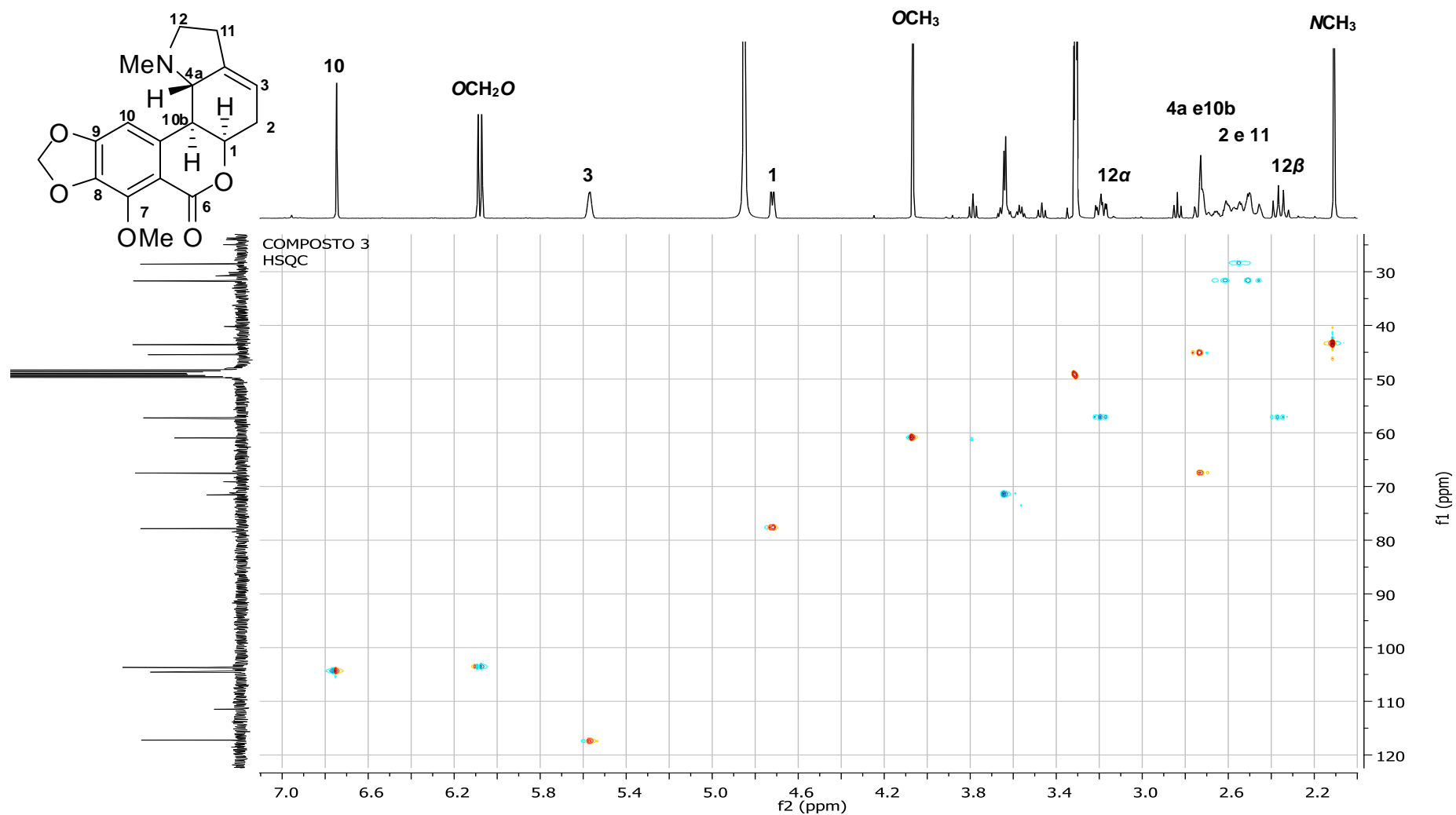


Figura 22: Mapa de contornos HSQC do composto 3 (CD<sub>3</sub>OD, 25 °C, 400 MHz)

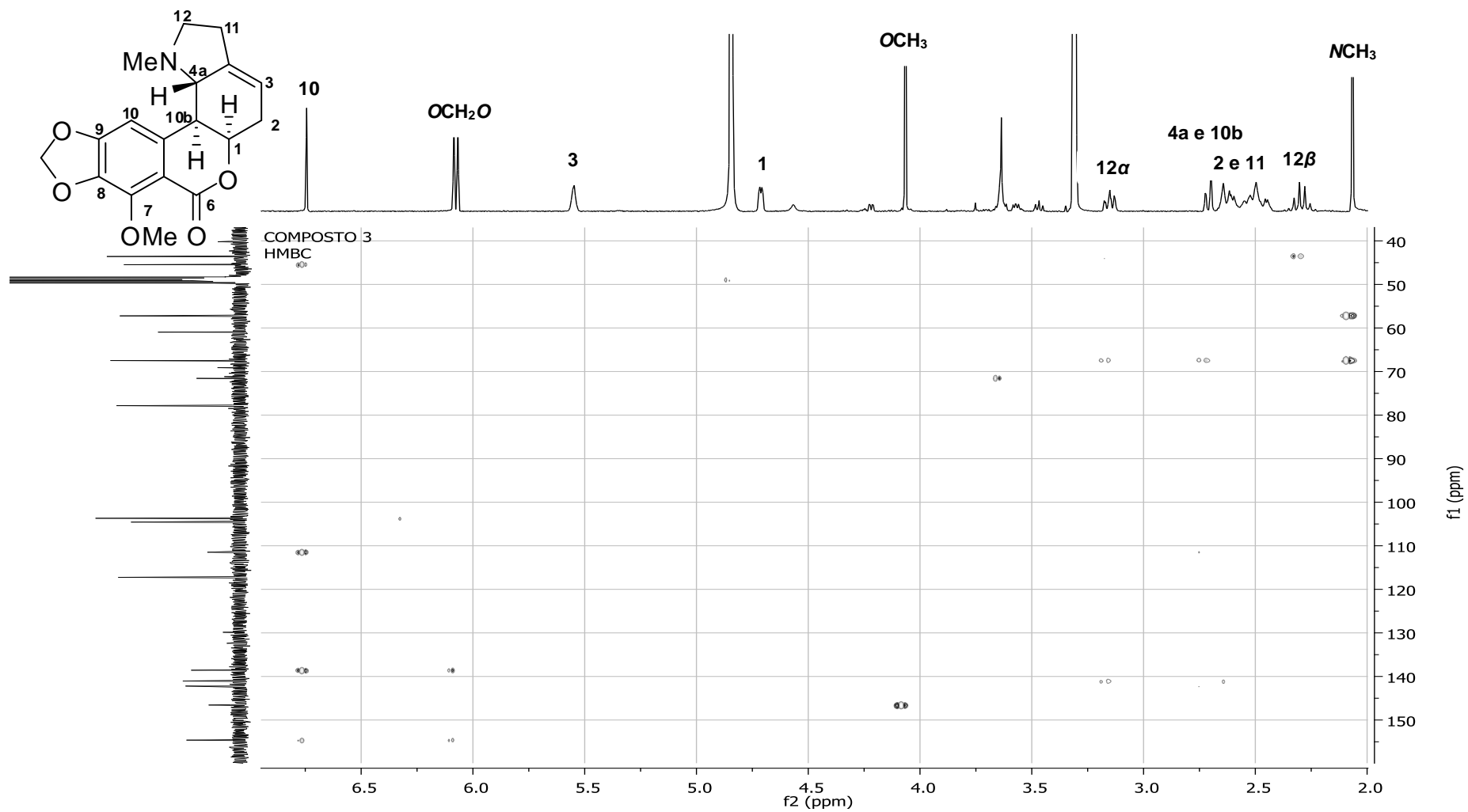


Figura 23: Mapa de contornos HMBC do composto 3 (CD<sub>3</sub>OD, 25 °C, 400 MHz)

COMPOSTO 3

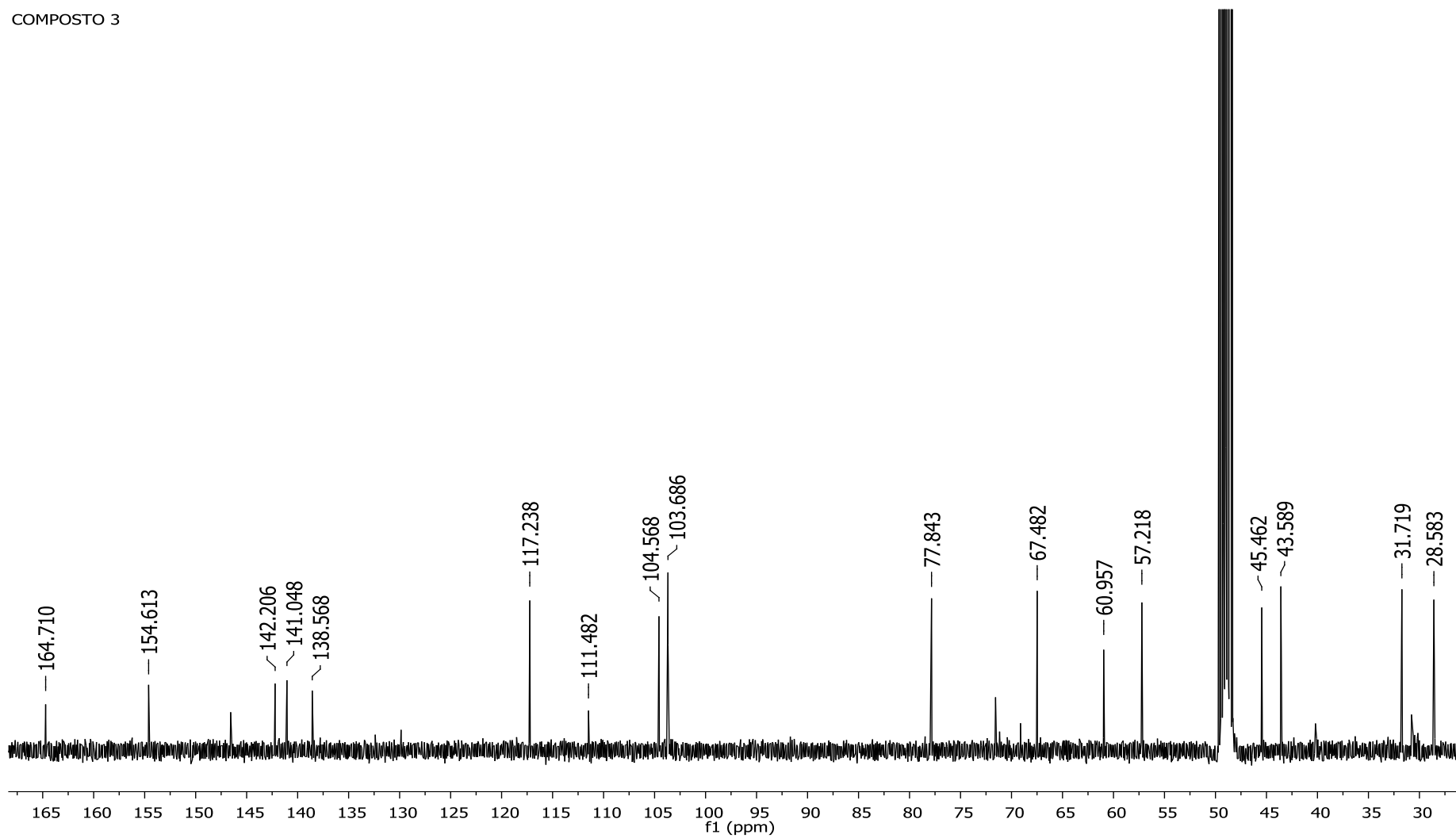
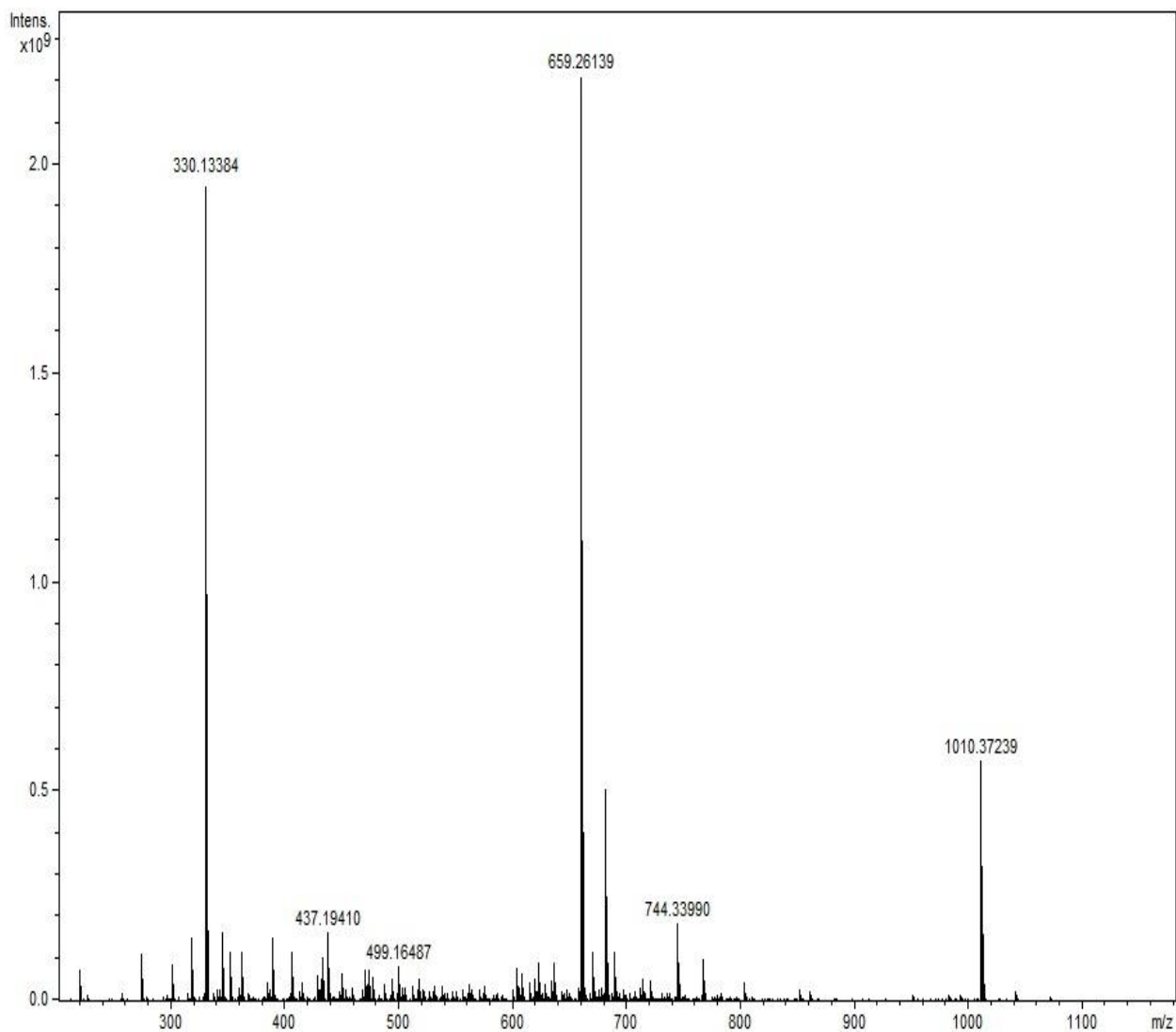


Figura 24: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto 3 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 25  $^\circ\text{C}$ , 400 MHz)

**Tabela 13:** Resumo dos dados espectrais de Ressonância Magnética Nuclear uni e bidimensionais do alcaloide 7-Metoximasonina (**3**)

Posição	H $\delta$ ( $\delta$ em ppm, J em Hz)	COSY	NOESY	HSQC	HMBC
<b>1</b>	4,71 d (4,0)	H-2, H-3, H-10b	H-2, H-10b	77,8 CH	
<b>2 (2H)</b>	2,64-2,44 m	H-1, H-2, H-3	H-1, H-3, H-11	31,7 CH <sub>2</sub>	C-4
<b>3</b>	5,55 br s	H-1, H-2, H-4a, H11	H-2, H-11	117,2 CH	
<b>4</b>				141,0 C	
<b>4a</b>	2,73 m	H-2, H-3, H-10b	H-2, NCH <sub>3</sub>	67,4 CH	
<b>6</b>				164,7 C	
<b>6a</b>				111,4 C	
<b>7</b>				146,5 C	
<b>8</b>				138,5 C	
<b>9</b>				154,6 C	
<b>10</b>	6,74 s	H-10b	H-10b, NCH <sub>3</sub>	104,5 CH	C-10b, C-6a, C-8, C-9
<b>10a</b>				142,2 C	
<b>10b</b>	2,71 dd (9,6; 1,5)	H-1, H-4a	H-1, H-10	45,4 CH	C-4a, C-6a
<b>11 (2H)</b>	2,51-2,60 m	H-2, H-3, H-12 $\alpha$ , H-12 $\beta$	H-2, H-3, H-12 $\alpha$ , H-12 $\beta$	28,5 CH <sub>2</sub>	
<b>12<math>\alpha</math></b>	3,15 ddd (9,5; 7,7; 2,0)	H-11, H-12 $\beta$	H-11, H-12 $\beta$ , NCH <sub>3</sub>	57,2 CH <sub>2</sub>	C-4, C-4a
<b>12<math>\beta</math></b>	2,29 q (9,5)	H-11, H-12 $\alpha$	H-4a, H-11, H-12 $\alpha$ , NCH <sub>3</sub>	57,2 CH <sub>2</sub>	NCH <sub>3</sub>
<b>7-OMe</b>	4,07 s		OCH <sub>2</sub> O	60,9 CH <sub>3</sub>	C-7
<b>OCH<sub>2</sub>O</b>	6,08 2d (1,2)			103,6 CH <sub>2</sub>	C-8, C-9
<b>NMe</b>	2,06 s	H-12 $\beta$	H-4a, H-10, H-12 $\alpha$ , H-12 $\beta$	43,5 CH <sub>3</sub>	C-4a, C-12

A estrutura do alcaloide 7-metoximasonina (**3**) foi confirmada pela análise de espectrometria de massas de alta resolução. Os íons observados foram os íons com  $m/z$   $[M+H]^+$  330,13384 (calculado  $C_{18}H_{20}NO_5$  330,13360),  $[2M+H]^+$  659,26139 (calculado  $C_{36}H_{39}N_2O_{10}$  659,25992) e  $[3M+Na]^+$  1010,37239 (calculado  $C_{54}H_{57}N_3O_{15}$  1010,36819) como representado na figura 25.



**Figura 25:** Espectro de massas de alta resolução da 7-metoximasonina (**3**)

#### 4.2.1.3 – Composto 4

O fracionamento do extrato acetato de etila das hastes florais de *Hippeastrum canastrense* levou ao isolamento de 1,4 mg do composto **4**, que se apresentou como um sólido branco. O composto foi solubilizado em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) para análise de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 26).

As principais características dos sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$  incluem: (a) dois hidrogênios singletos em 7,48 e 6,95 ppm, correspondente à hidrogênios aromáticos; (b) dois dubletos em 6,07 ppm, integrando para dois hidrogênios atribuídos ao grupo  $\text{OCH}_2\text{O}$  no anel aromático; (c) um sinal em 4,40 ppm, integrando para um hidrogênio, referente ao hidrogênio da posição 2 substituída; (d) um singlete referente ao grupo  $\text{NCH}_3$  em 2,06 ppm, apresentando integração para 3 hidrogênios.

Os dados obtidos no RMN  $^1\text{H}$  do composto **4**, indicam que este possui esqueleto típico de homolicorinas da série das lactonas, devido a ausência de hidrogênios na posição 6. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  evidencia também, uma substituição na posição 2, uma vez que o hidrogênio desta posição está consideravelmente desblindado se comparado aos hidrogênios do alcaloide homolicorina, e a ausência de metoxilas alifáticas sugere que o substituinte em 2 seja um grupamento hidroxila.

A posição trans di-axial entre os hidrogênios das posições 4a e 10b foi confirmada através do cálculo da constante de acoplamento ( $J_{4a,10b} \sim 9,5 \text{ Hz}$ ).

COMPOSTO 4

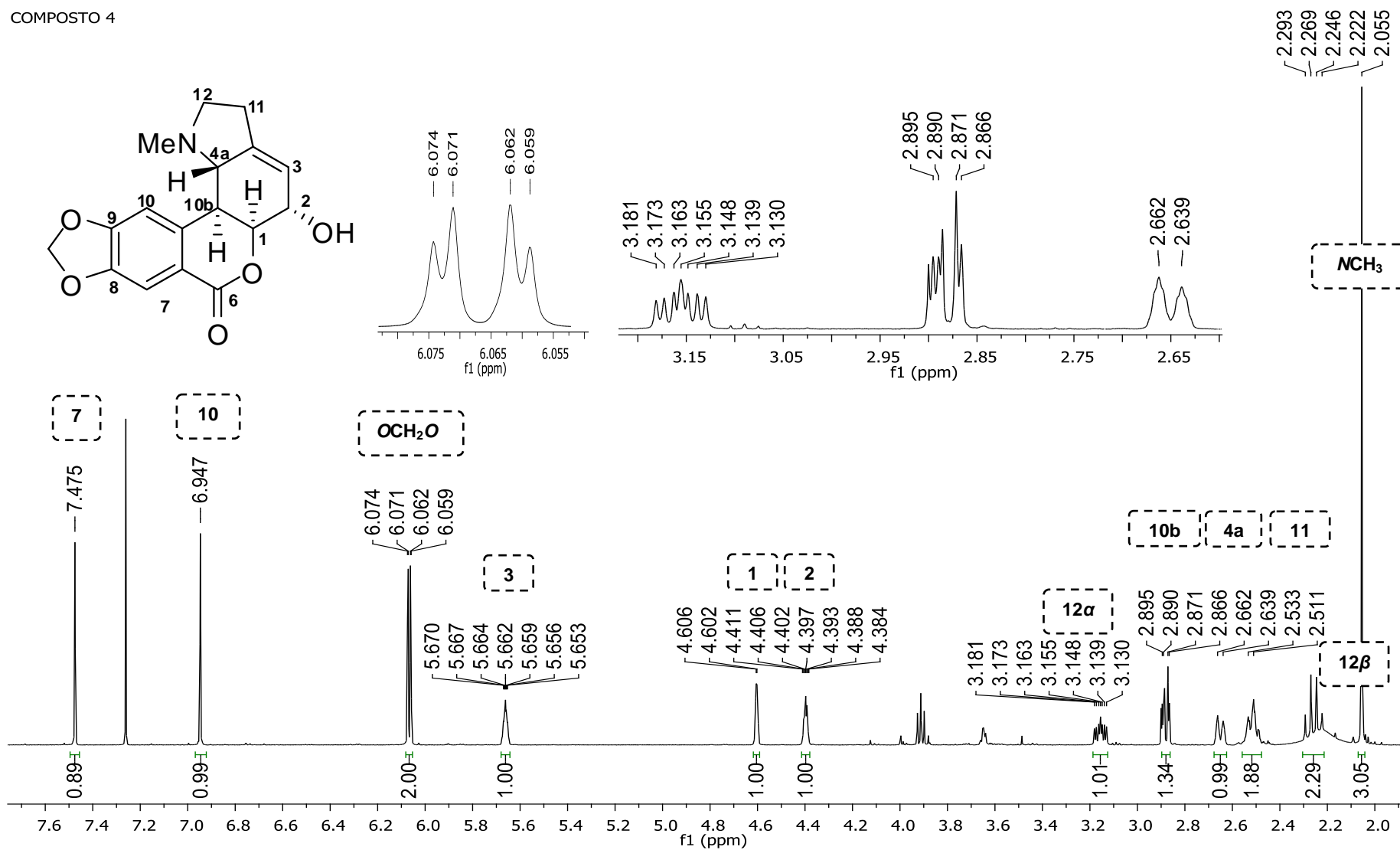
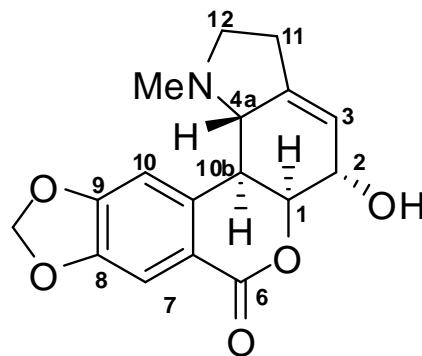


Figura 26: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 4 e ampliações (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, 400 MHz)

Os dados de RMN  $^1\text{H}$  foram comparados com os deslocamentos da hipeastrina descrito por Almanza *et al.* em 1996 (tabela 14), e baseado nessa conferência, classificou-se o composto **4** como o alcaloide hipeastrina (figura 27).

**Tabela 14:** Comparação entre os  $\delta$  do composto **4** e o alcaloide hipeastrina (500 MHz)

Posição	Composto 4 ( $\delta$ em ppm, J em Hz)	Hipeastrina (ALMANZA <i>et al.</i> , 1996)
<b>1</b>	4,60 br s	4,62 br s
<b>2<math>\beta</math></b>	4,40 m	4,38 br s
<b>3</b>	5,66 m	5,63 br s
<b>4a</b>	2,64 d (9,5)	2,62 d (9,5)
<b>7</b>	7,48 s	7,45 s
<b>10</b>	6,95 s	6,92 s
<b>10b</b>	2,88 dd (9,5; 2,2)	2,85 dd (9,5; 2,5)
<b>11 (2H)</b>	2,52 m	2,48 m
<b>12<math>\alpha</math></b>	3,16 ddd (10,0; 7,2; 3,2)	3,13 ddd (10,0; 8,0; 3,0)
<b>12<math>\beta</math></b>	2,26 q (9,6)	2,23 ddd (10,0; 9,0; 9,0)
<b>OCH<sub>2</sub>O</b>	6,07 2d (1,2)	6,04 2d (1,5)
<b>NMe</b>	2,06 s	2,03 s
<b>Solvente</b>	CDCl <sub>3</sub>	CDCl <sub>3</sub>



**Figura 27:** Estrutura química do alcaloide Hipeastrina

A literatura relata que a hipeastrina apresenta atividade citotóxica contra células fibroblásticas não-tumorais (WENIGER *et al.*, 1995), atua como agente antiviral contra *Herpes simplex* tipo 1, e também desempenha boa atividade antifúngica contra *Candida albicans* (RENARD-NOZAKI *et al.*, 1989; EVIDENTE *et al.*, 2004).

#### 4.2.1.4 – Composto 5

O fracionamento dos extratos acetato de etila das hastes florais e bulbos de *Hippeastrum canastrense* levou ao isolamento de 12,8 mg do composto **5**, que se apresentou como um sólido branco. O composto foi solubilizado em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) para análise de RMN  $^1\text{H}$  (figura 28).

As principais características dos sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$  incluem: (a) um hidrogênio singleto em 6,68 ppm, correspondente a um hidrogênio aromático; (b) um singleto largo em 6,03 ppm, integrando para dois hidrogênios atribuídos ao grupo  $\text{OCH}_2\text{O}$  no anel aromático; (c) um duplo tripleto em 4,37 ppm, integrando para um hidrogênio, referente ao hidrogênio da posição 2 substituída; (d) um singleto em 4,13 ppm, integrando para 3 hidrogênios, atribuído a um grupo  $\text{OCH}_3$  no anel aromático; (e) um singleto referente ao grupo  $\text{NCH}_3$  em 2,09 ppm, apresentando igualmente integração para 3 hidrogênios.

Os dados obtidos no RMN  $^1\text{H}$  do composto **5**, indicam que este possui esqueleto típico de homolicorina da série das lactonas, devido a ausência de hidrogênios na posição 6. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  evidencia também, uma substituição na posição 2, uma vez que o hidrogênio desta posição está consideravelmente desblindado se comparado aos hidrogênios do alcaloide homolicorina, desta forma, a ausência de metoxilas alifáticas sugere que o substituinte em 2 seja um grupamento hidroxila.

A posição trans di-axial entre os hidrogênios das posições 4a e 10b foi confirmada através do cálculo da constante de acoplamento ( $J_{4a,10b} = 9,4 \text{ Hz}$ ).

COMPOSTO 5

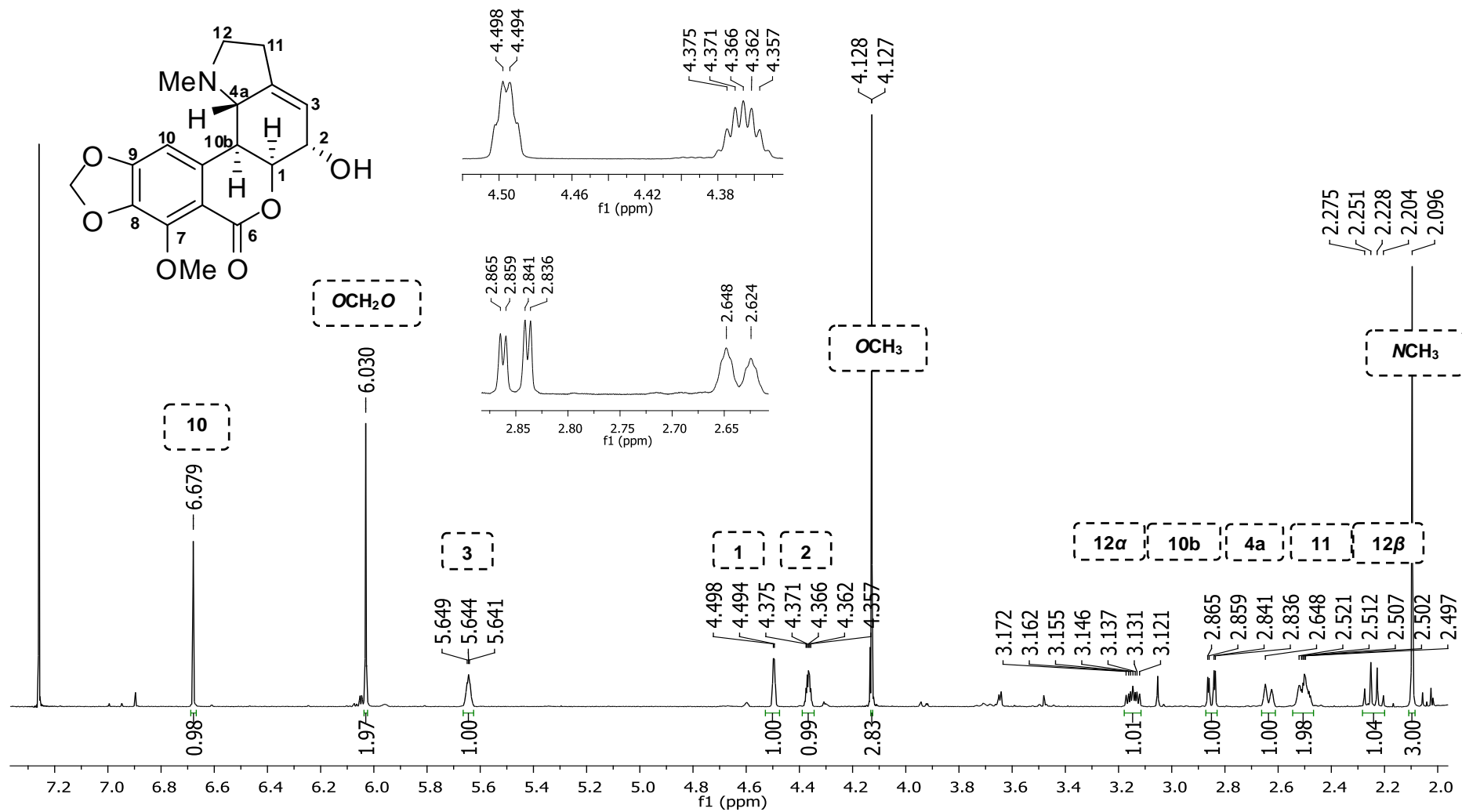
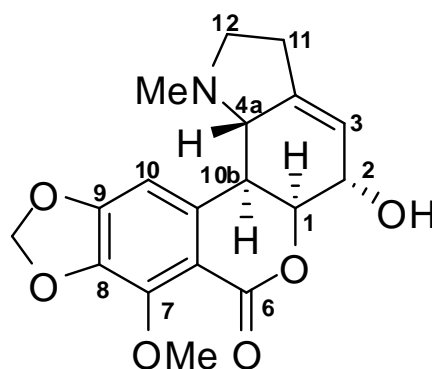


Figura 28: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 5 e ampliações ( $\text{CDCl}_3$ , 25  $^\circ\text{C}$ , 400 MHz)

Os dados de RMN  $^1\text{H}$  foram comparados com os deslocamentos teóricos da candimina descrito por Giordani *et al.* em 2011 (tabela 15), e embasado nessa comparação, classificou-se o composto **5** como o alcaloide candimina (figura 29).

**Tabela 15:** Comparação entre os  $\delta$  do composto **5** e o alcaloide candimina (500 MHz)

Posição	Composto 5 ( $\delta$ em ppm, J em Hz)	Candimina (GIORDANI <i>et al.</i> , 2011)
<b>1</b>	4,50 br d (1,5)	4,50 br d (1,5)
<b>2<math>\beta</math></b>	4,37 dt (3,6; 1,8)	4,37 dt (4,0; 1,5)
<b>3</b>	5,64 m	5,63 m
<b>4a</b>	2,64 d (9,4)	2,63 d (9,5)
<b>10</b>	6,68 s	6,68 s
<b>10b</b>	2,85 dd (9,4; 2,1)	2,85 dd (9,5; 2,0)
<b>11 (2H)</b>	2,47-2,52 m	2,42- 2-55 m
<b>12<math>\alpha</math></b>	3,15 m	3,15 ddd (9,5; 8,0; 3,0)
<b>12<math>\beta</math></b>	2,24 q (9,4)	2,24 ddd (9,5; 9,0)
<b>7-OCH<sub>3</sub></b>	4,13 s	4,13 s
<b>OCH<sub>2</sub>O</b>	6,03 br s	6,03 s
<b>NMe</b>	2,09 s	2,09 s
<b>Solvente</b>	CDCl <sub>3</sub>	CDCl <sub>3</sub>



**Figura 29:** Estrutura química do alcaloide Candimina

A literatura relata que a candimina apresenta atividade citotóxica contra o parasita *Trichomonas vaginalis* (GIORDANI *et al.*, 2010).

#### 4.2.1.5 – Composto 6

O fracionamento dos extratos acetato de etila e hexano das hastes florais e acetato de etila dos bulbos de *Hippeastrum canastrense* levou ao isolamento de 30,8 mg do composto **6**, que se apresentou como um sólido branco. O composto foi solubilizado em metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD) para análise de RMN <sup>1</sup>H (figura 30).

As características dos sinais no espectro de RMN <sup>1</sup>H incluem: (a) um hidrogênio singlete em 6,72 ppm, correspondente a um hidrogênio aromático; (b) dois dubletos em 6,08 ppm, integrando para dois hidrogênios, atribuídos a um grupo OCH<sub>2</sub>O no anel aromático; (c) um hidrogênio olefínico em 5,61 ppm, referente ao hidrogênio da posição 3; (d) um sinal em 4,82 ppm, atribuído ao hidrogênio da posição 1; (e) um sinal em 4,25 ppm, atribuído a um hidrogênio da posição 2 substituída; (f) um singlete, integrando para 3 hidrogênios, referente a um grupo OCH<sub>3</sub> no anel aromático em 4,07 ppm; (g) um singlete, integrando para 3 hidrogênios, referente a um grupo OCH<sub>3</sub> alifático em 3,46 ppm; (h) um ddd em 3,16 ppm atribuído ao hidrogênio da posição 12 $\alpha$ ; (i) um duplo dubleto em 2,94 ppm, integrando para um hidrogênio, atribuído ao hidrogênio da posição 10b; (j) um dubleto largo em 2,71 ppm, integrando para um hidrogênio, atribuído ao hidrogênio da posição 4a; (l) um quadrupletto em 2,32 ppm, referente ao hidrogênio da posição 12 $\beta$ ; (m) um singlete referente ao grupo NCH<sub>3</sub> em 2,10 ppm, apresentando integração para 3 hidrogênios.

Os dados obtidos no RMN <sup>1</sup>H do composto **6**, indicam que a estrutura desse composto possui esqueleto do tipo homolicorina da série das lactonas, devido a ausência de hidrogênios na posição 6. A posição trans di-axial entre os hidrogênios das posições 4a e 10b é confirmada através do cálculo da constante de acoplamento entre eles ( $J_{4a, 10b} \sim 9,4$  Hz).

COMPOSTO 6

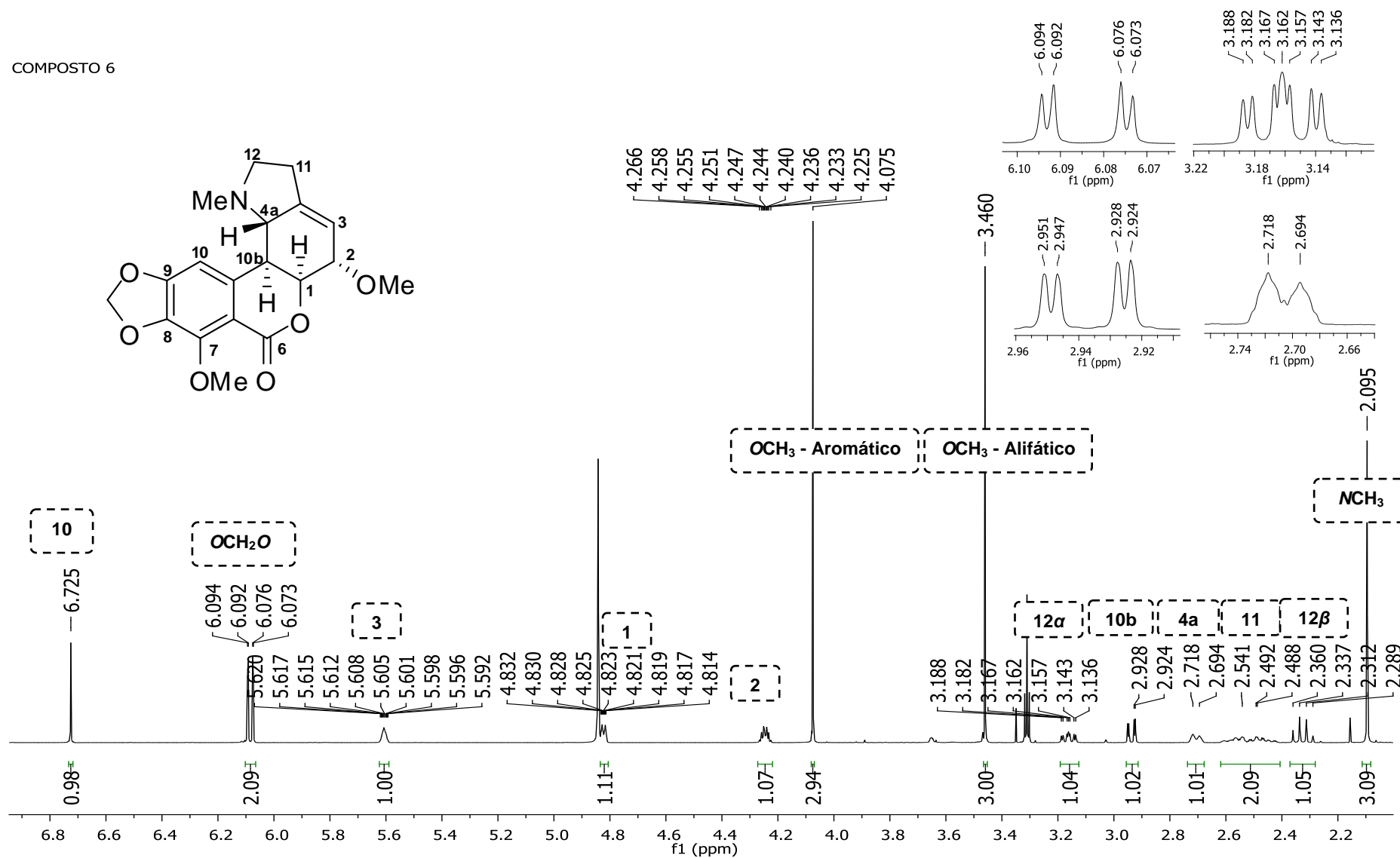


Figura 30: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 6 e ampliações (CD<sub>3</sub>OD, 25 °C, 400 MHz)

Constatou-se uma apreciável similaridade do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **6** com os deslocamentos teóricos do alcaloide candimina (**5**) descrito anteriormente, onde o espectro de **6** diferencia-se apenas pelo fato de que o substituinte na posição dois é um grupo  $\text{OCH}_3$  e não  $\text{OH}$  como em observado em **5** (tabela 16). De fato, o hidrogênio da posição 2 do composto **6** encontra-se mais blindado que o H-2 do alcaloide candimina (**5**), devido à mudança do substituinte em 2. Para efeito de comparação, o composto **6** foi analisado por RMN  $^1\text{H}$  em clorofórmio deuterado.

**Tabela 16:** Comparação entre os  $\delta$  do composto **6** e o alcaloide candimina (500 MHz)

Posição	Composto 6 ( $\delta$ em ppm, J em Hz)	Candimina (GIORDANI <i>et al.</i> , 2011)
<b>1</b>	4,69 dt (4,5; 1,2)	4,50 br d (1,5)
<b>2<math>\beta</math></b>	4,15 m	4,37 dt (4,0; 1,5)
<b>3</b>	5,59 m	5,63 m
<b>4a</b>	2,78 m	2,63 d (9,5)
<b>10</b>	6,59 s	6,68 s
<b>10b</b>	2,78 m	2,85 dd (9,5; 2,0)
<b>11 (2H)</b>	2,40-2,55 m	2,42- 2-55 m
<b>12<math>\alpha</math></b>	3,12 ddd (9,7; 8,1; 2,8)	3,15 ddd (9,5; 8,0; 3,0)
<b>12<math>\beta</math></b>	2,25 q (9,3)	2,24 ddd (9,5; 9,0)
<b>2-OCH<sub>3</sub></b>	3,47 s	-
<b>7-OCH<sub>3</sub></b>	4,11 s	4,13 s
<b>OCH<sub>2</sub>O</b>	6,02 br s	6,03 s
<b>NMe</b>	2,09 s	2,09 s
<b>Solvente</b>	$\text{CDCl}_3$	$\text{CDCl}_3$

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  evidencia a presença de apenas um hidrogênio aromático, sugerindo uma substituição no anel aromático por uma metoxila na posição 7 ou 10 do composto, nesse sentido, a análise de RMN bidimensionais NOESY e COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (figuras 31 e 32) foram de extrema importância para confirmar a posição do substituinte em questão.

O espectro de NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  exhibe a correlação do hidrogênio aromático tanto com o grupo  $\text{NCH}_3$  em 2,09 ppm, quanto com o hidrogênio da posição 10b em aproximadamente 2,78 ppm, o que leva à indicação de que a posição não substituída no anel aromático é a posição 10, e ainda, o espectro COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  corrobora a constatação através do acoplamento explícito entre os hidrogênios 10 e 10b.

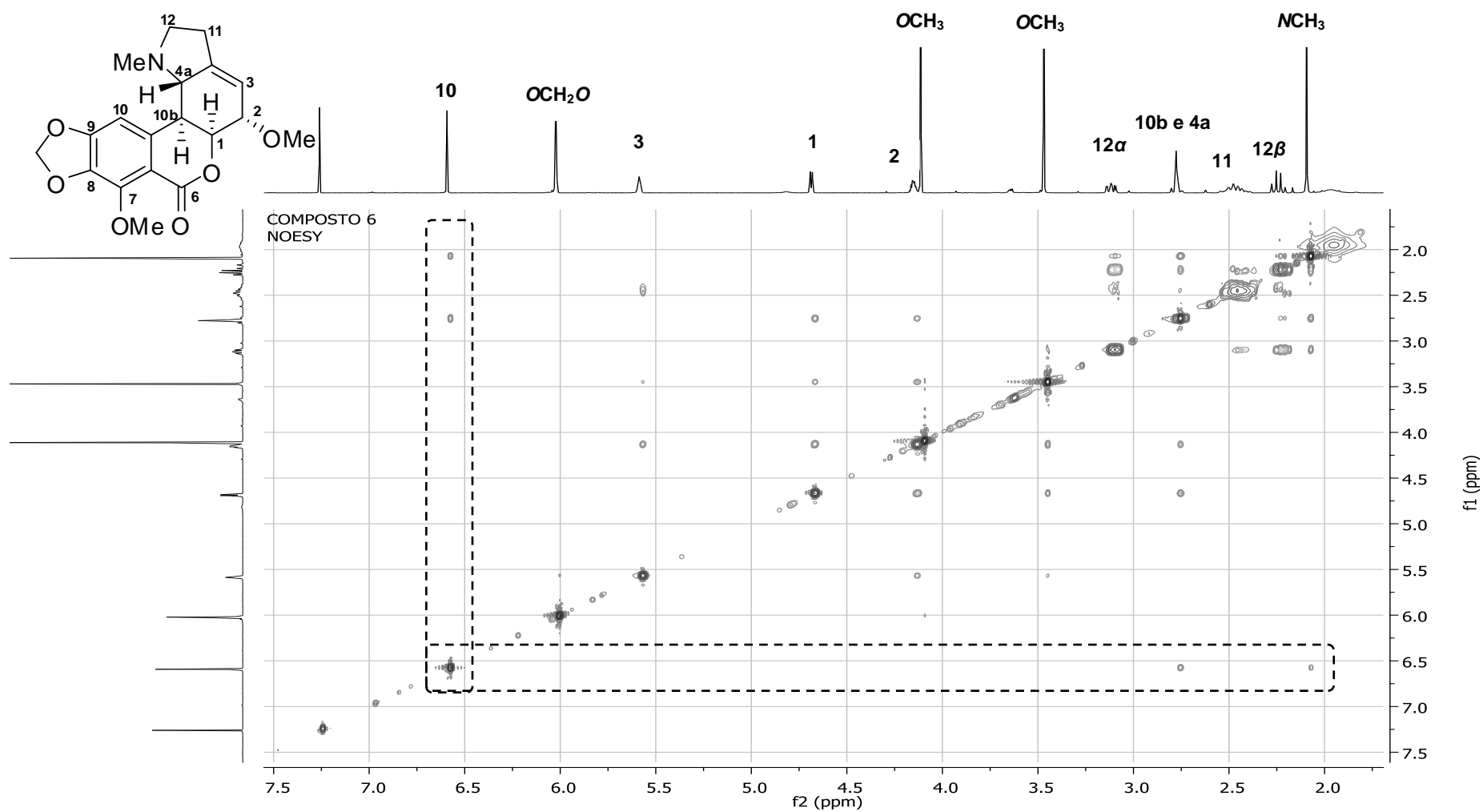
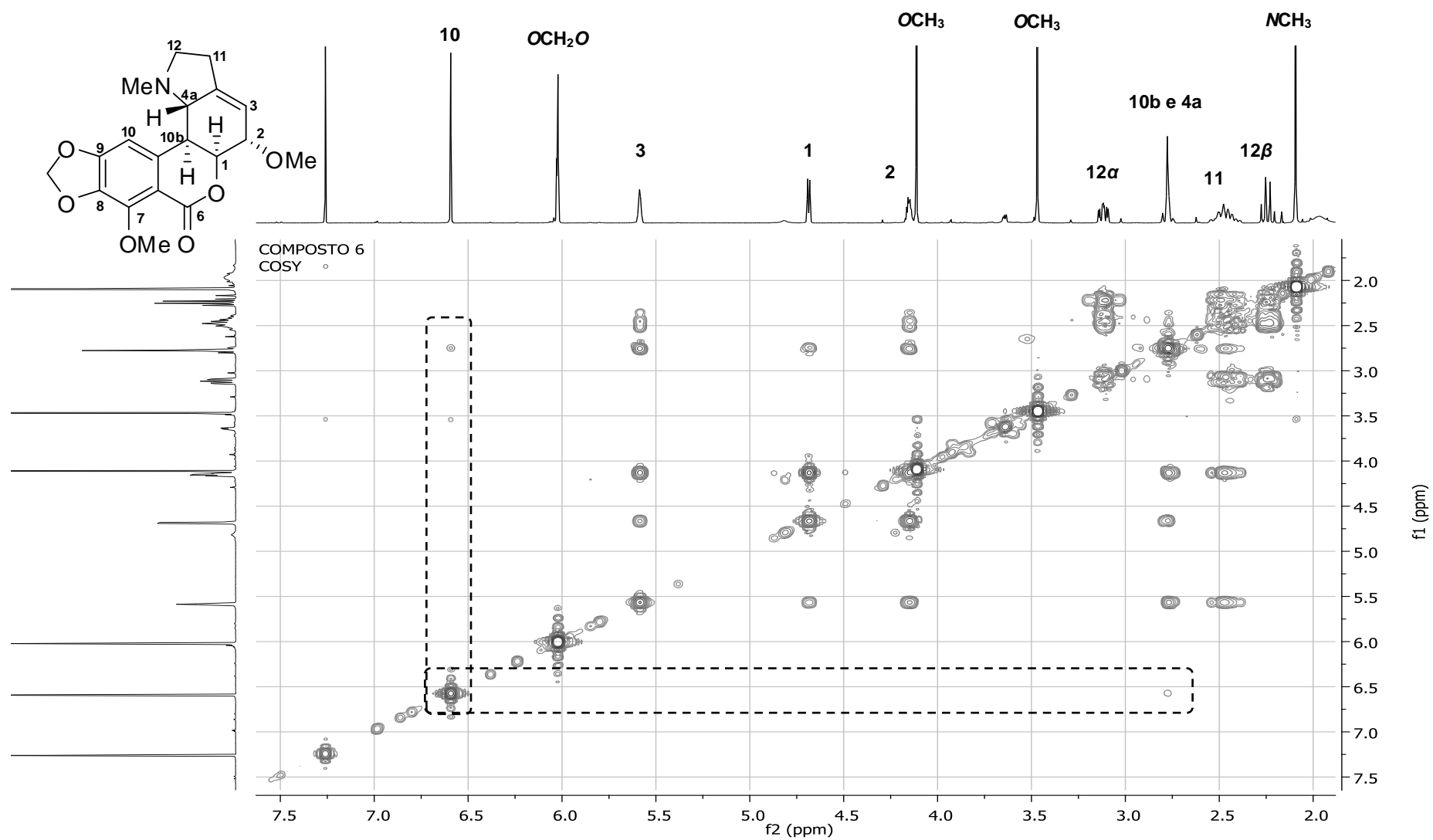


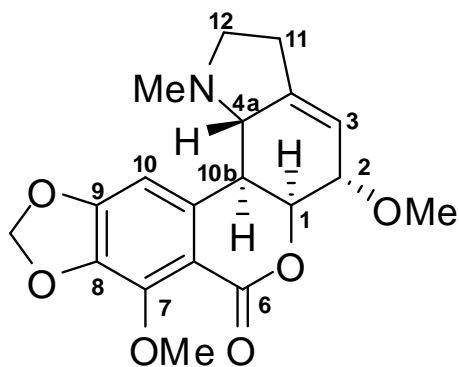
Figura 31: Espectro de RMN NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  do composto 6 ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, 400 MHz)



**Figura 32:** Espectro de RMN COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  do composto 6 ( $\text{CDCl}_3$ , 25  $^\circ\text{C}$ , 400 MHz)

Diante das informações extraídas dos espectros de RMN uni e bidimensionais do composto **6**, foi proposto que o mesmo trata-se do alcaloide denominado 2-O-metilcandimina (figura 33). Esta estrutura não possui, até o presente momento, dados publicados na literatura, logo foram realizadas as demais análises de RMN bidimensionais HSQC, HMBC e RMN  $^{13}\text{C}$  para a completa elucidação do composto proposto (figuras 34, 35 e 36).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  apresentou dezenove sinais, condizentes com a estrutura sugerida, e ainda, o sinal em 161,4 ppm é característico de um carbono carbonílico, evidenciando a presença do grupo lactona no arcabouço preconizado. A tabela 17 resume a atribuição dos sinais com base nos dados de RMN realizados.



**Figura 33:** Estrutura química do alcaloide 2-O-metilcandimina (**6**)

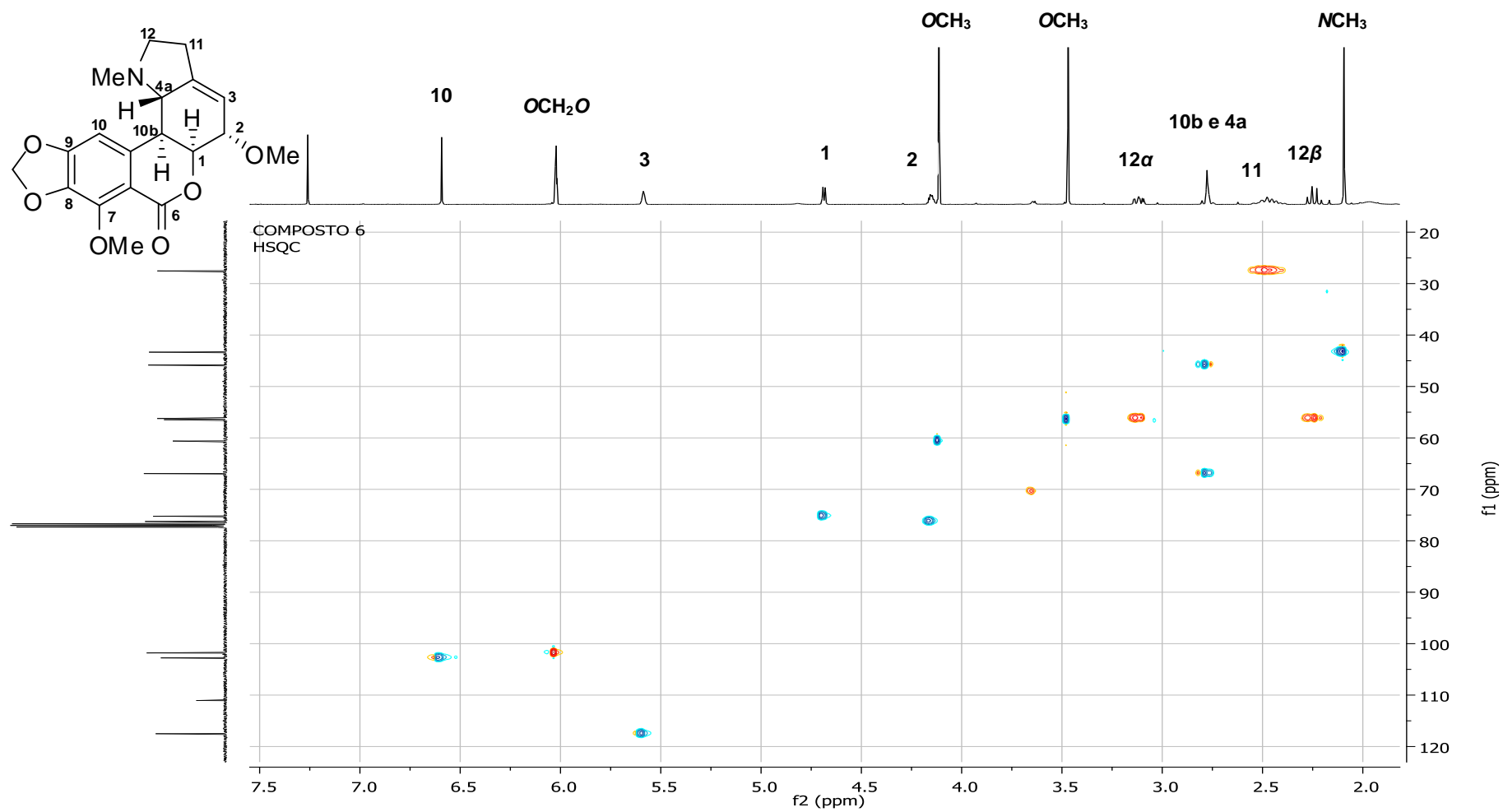


Figura 34: Mapa de contornos HSQC do composto **6** (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, 400 MHz)

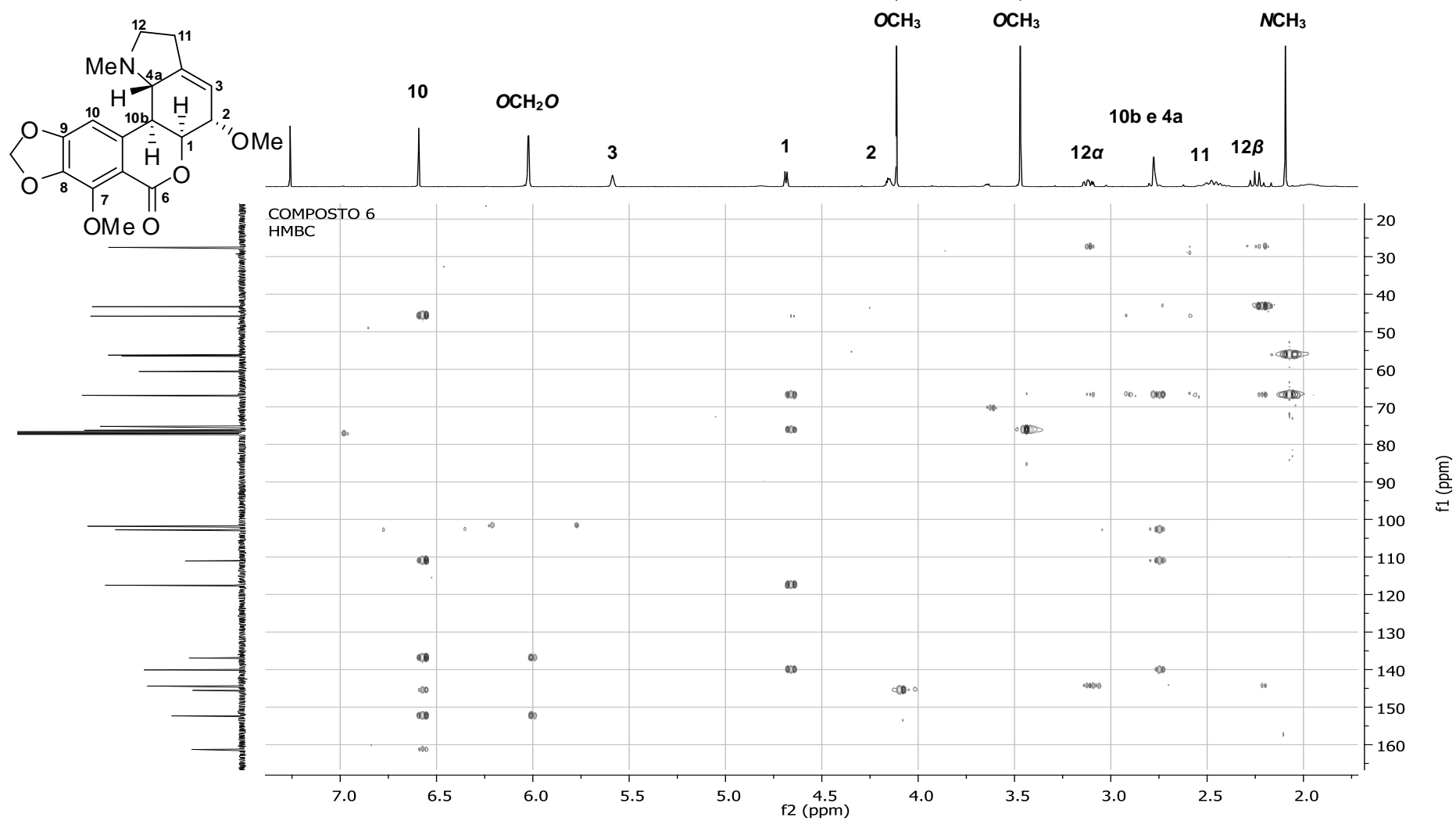


Figura 35: Mapa de contornos HMBC do composto **6** (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, 400 MHz)

COMPOSTO 6

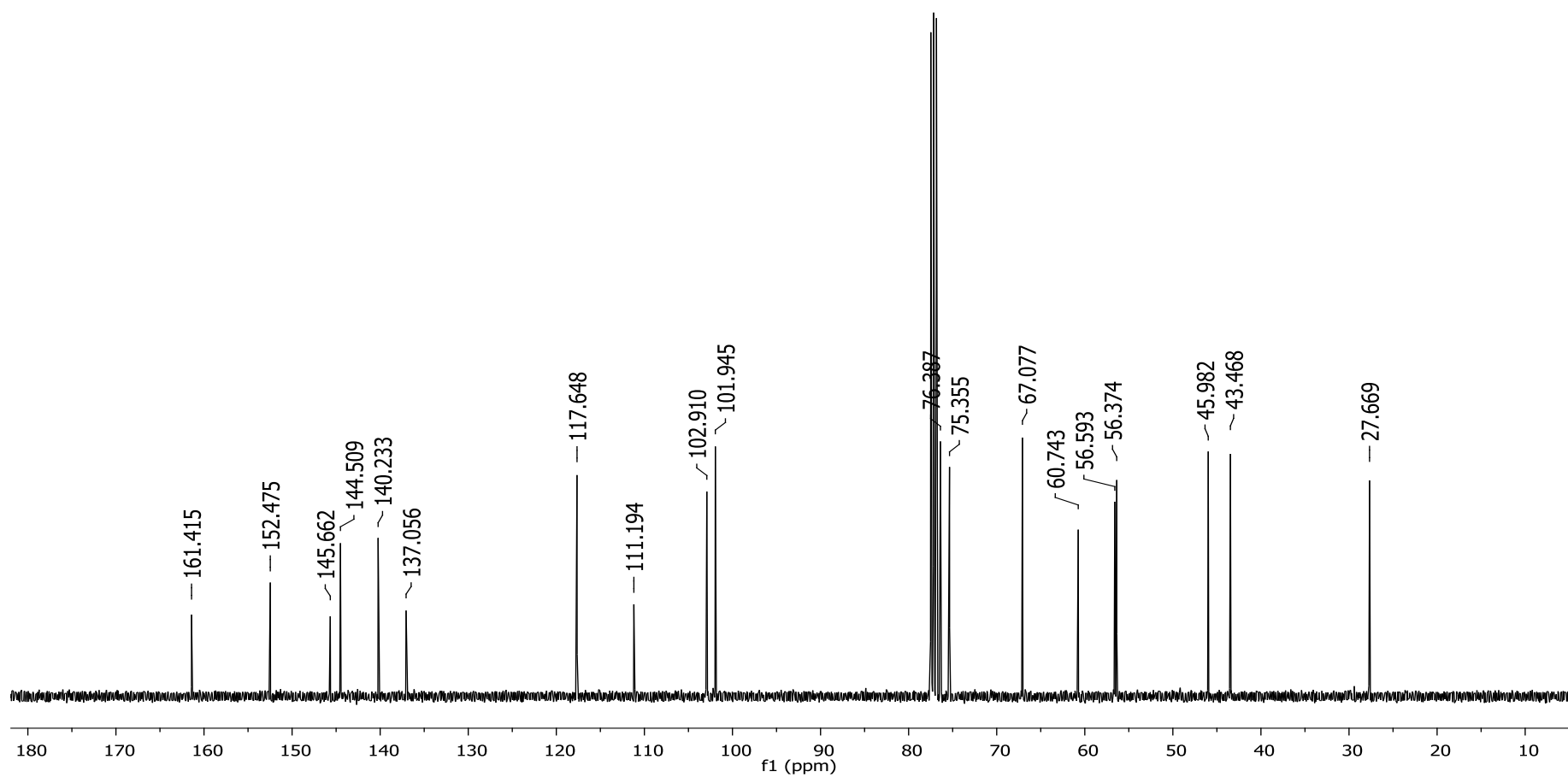
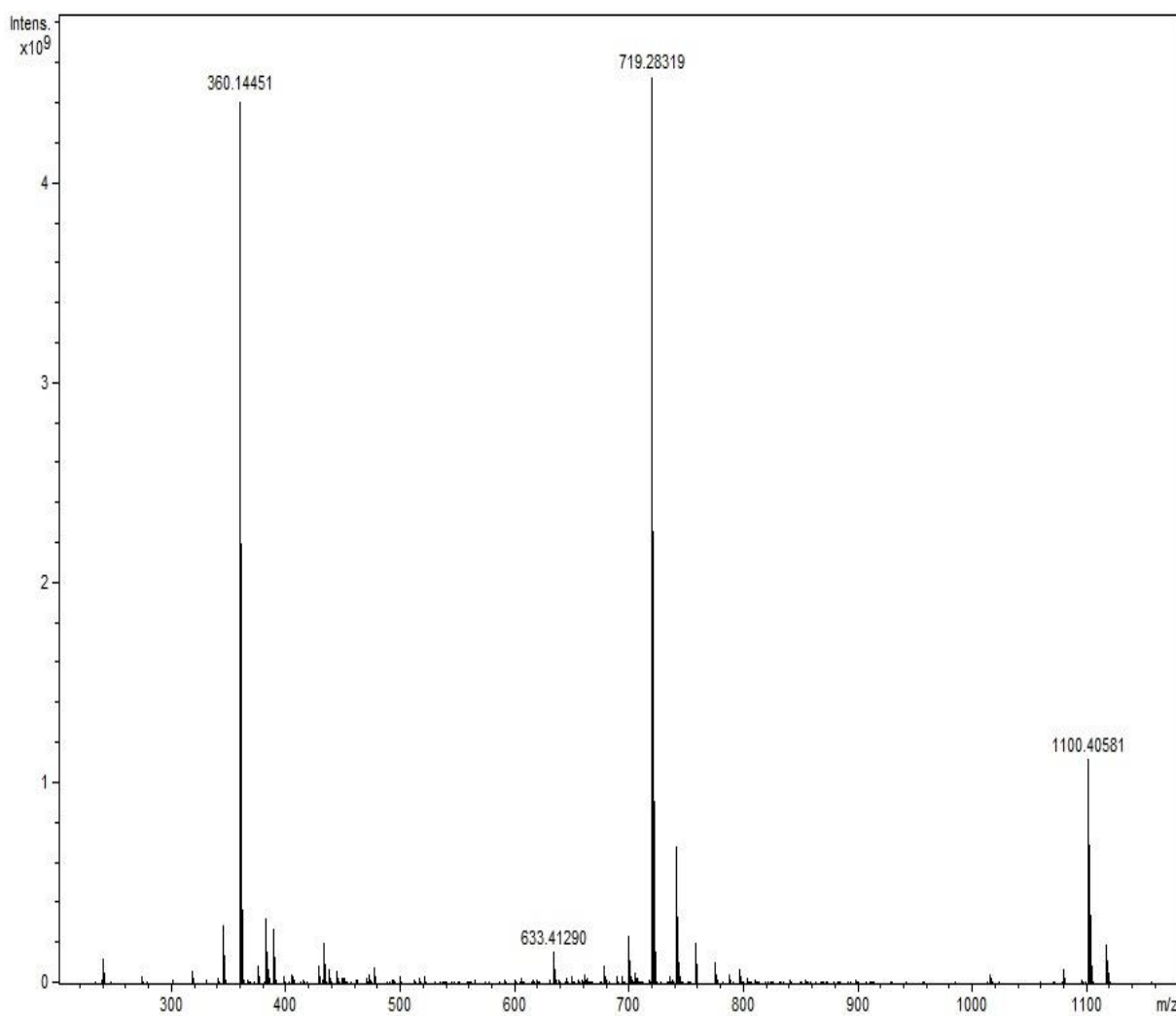


Figura 36: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto 6 ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, 400 MHz)

**Tabela 17:** Resumo dos dados espectrais de Ressonância Magnética Nuclear uni e bidimensionais do alcaloide 2-O-metilcandimina (6)

Posição	H $\delta$ ( $\delta$ em ppm, J em Hz)	COSY	NOESY	HSQC	HMBC
1	4,69 dt (4,5; 1,2)	H-2, H-3, H-10b	H-2, H-10b, 2-OMe	75,3 CH	C-2, C-3, C-4a, C-10a
2	4,15 m	H-1, H-3, H-4a, H-11	H-1, H-3, H-4a 2-OMe	76,3 CH	C-4
3	5,59 m	H-1, H-2, H-3, H-4a, H-11	H-2, H-11	117,3 CH	C-1, C-4a, C-11
4				144,5 C	
4a	2,78 m	H-2, H-3	H-2, H-3, H-11, H-12 $\beta$ , NCH <sub>3</sub>	67,0 CH	C-10a, NCH <sub>3</sub>
6				161,4 C	
6a				111,1 C	
7				145,6 C	
8				137,0 C	
9				152,4 C	
10	6,59 s	H-10b	H-10b, NCH <sub>3</sub>	102,9 CH	C-6, C-6a, C-7, C-8, C-9, C10b
10a				140,2 C	
10b	2,78 m	H-1, H-10	H-1, H-10	45,9 CH	C-4, C-4a, C-6a, C-10
11 (2H)	2,40-2,55 m	H-2, H-3, H-4a, H-12 $\alpha$ , H-12 $\beta$	H-3, H-12 $\alpha$ , H-12 $\beta$	27,6 CH <sub>2</sub>	C-3, C-4, C-12
12 $\alpha$	3,12 ddd (9,7; 8,1; 2,8)	H-11, H-12 $\beta$	H-11, H-12 $\beta$ , NCH <sub>3</sub>	56,3 CH <sub>2</sub>	C-4, C-4a, C-11
12 $\beta$	2,25 q (9,3)	H-11, H-12 $\alpha$	H-11, H-12 $\alpha$ , NCH <sub>3</sub>	56,3 CH <sub>2</sub>	C-4, C-11, NCH <sub>3</sub>
2-OMe	3,47s		H-1, H-2, H-3	56,5 C	C-2
7-OMe	4,11 s		OCH <sub>2</sub> O	60,7 CH <sub>3</sub>	
OCH <sub>2</sub> O	6,02 br s		7-OMe	101,9 CH <sub>2</sub>	C-8, C-9
NMe	2,09 s		H-4a, H-10, H-12 $\alpha$ , H-12 $\beta$	43,4 CH <sub>3</sub>	C-4a, C-12

A estrutura do alcaloide 2-O-metilcandimina (**6**) foi confirmada pela análise de espectrometria de massas de alta resolução. Os íons observados foram os íons com  $m/z$   $[M+H]^+$  360,14451 (calculado  $C_{19}H_{22}NO_6$  360,380531),  $[2M+H]^+$  719,28319 (calculado  $C_{38}H_{43}N_2O_{12}$  719,75367) e  $[3M+Na]^+$  1100,40581 (calculado  $C_{57}H_{64}N_3O_{18}$  1101,10864) como representado na figura 37.



**Figura 37:** Espectro de massas de alta resolução da 2-O-metilcandimina (**6**)

#### 4.2.1.6 – Composto 7

O fracionamento dos extratos acetato de etila e hexano das hastes florais e bulbos de *Hippeastrum canastrense* levou ao isolamento de 30,7 mg do composto **7**, que se apresentou como um sólido amarelado. O composto foi solubilizado em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) para análise de RMN  $^1\text{H}$  (figura 38).

As principais características dos sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$  incluem: (a) um hidrogênio singlete em 6,79 ppm, correspondente a um hidrogênio aromático; (b) um singlete em 5,59 ppm, integrando para um hidrogênio; (c) um singlete largo em 5,50 ppm, integrando para um hidrogênio, referente ao hidrogênio olefínico; (d) três singletos em 3,92, 3,87 e 3,85 ppm, integrando para 3 hidrogênios cada, atribuído a três grupos  $\text{OCH}_3$  no anel aromático; (e) um singlete em 3,54 ppm referente a um grupo  $\text{OCH}_3$  alifático, apresentando igualmente integração para 3 hidrogênios; (f) um sinal em 2,65 ppm, integrando para um hidrogênio; (g) um singlete em 2,08 ppm referente ao grupo  $\text{NCH}_3$ , apresentando integração para 3 hidrogênios.

Os dados obtidos no RMN  $^1\text{H}$  do composto **7**, mostram que este possui um esqueleto típico de homolicorinas da classe hemiacetal, devido a presença de um singlete em 5,59 ppm, típico em estruturas do tipo homolicorina pertencentes a esta classe. Logo, o grupo metoxila alifático deve estar na posição 6 da estrutura.

Similarmente, observa-se a substituição no anel aromático por três grupos  $\text{OCH}_3$ , sendo duas delas localizadas nas posições 8 e 9, que é característico dos alcaloides pertencentes ao tipo homolicorina e a terceira metoxila aromática foi atribuída à posição 7 da estrutura, através da comparação com a literatura. Tipicamente, observa-se que alcaloides do tipo homolicorina que possuem três substituintes no anel aromático apresentam a posição 10 não substituída.

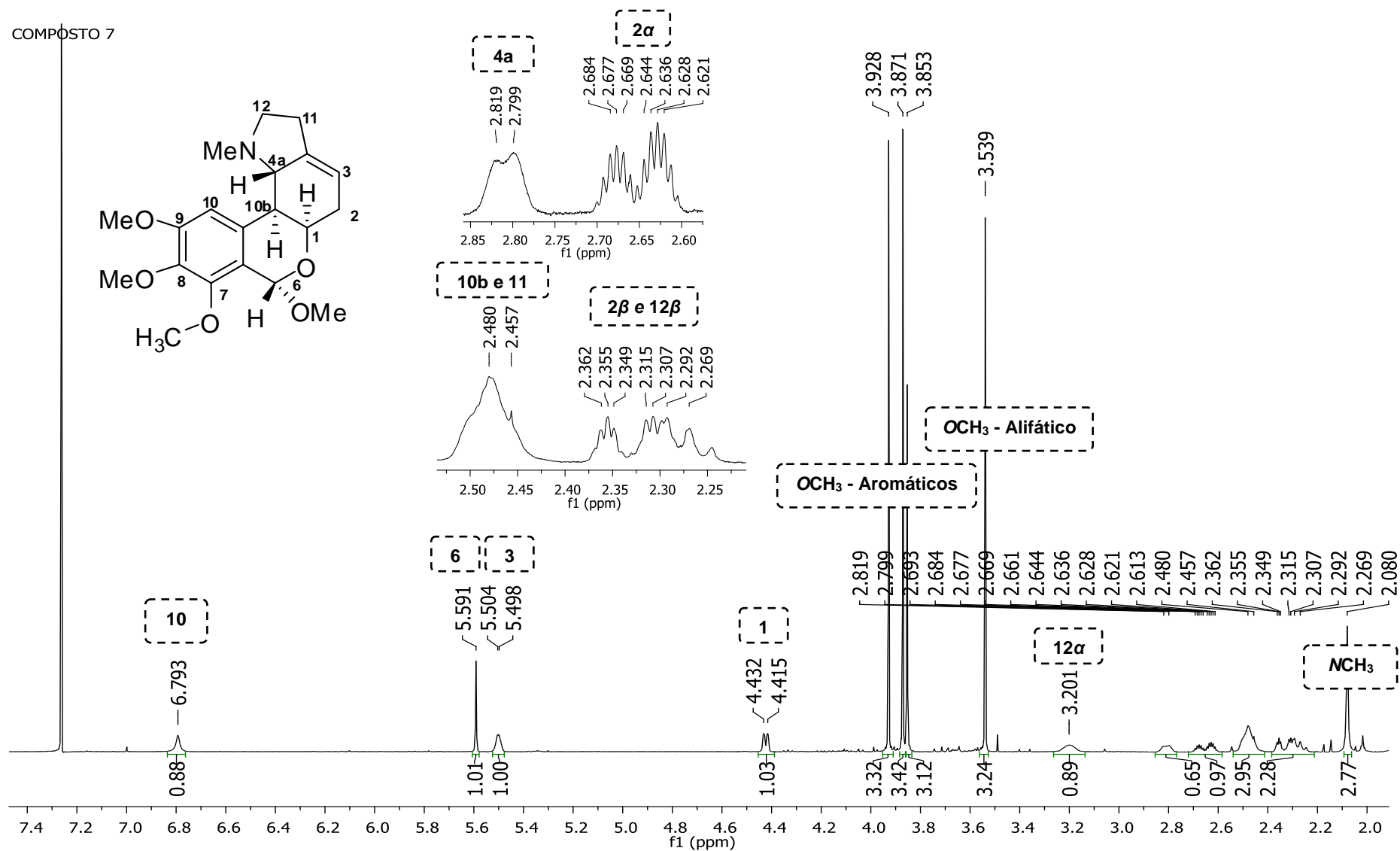
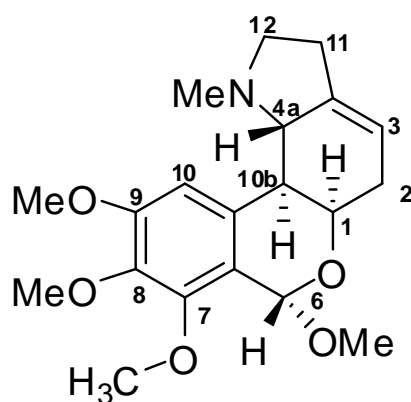


Figura 38: Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 7 e ampliações (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, 400 MHz)

Verificou-se uma semelhança considerável entre o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **7** com os deslocamentos teóricos do alcaloide 7-metoxi-O-metillicorenina descrito por DE ANDRADE *et al.* em 2014. Alguns deslocamentos químicos encontraram-se distintos devido ao uso de solventes de diferentes polaridades. Desta forma, o composto **7** foi analisado por RMN  $^1\text{H}$  em metanol deuterado para efeito de comparação (tabela 18) e conseqüentemente pode-se estabelecer que o composto em questão trata-se do alcaloide 7-metoxi-O-metillicorenina (figura 39).

**Tabela 18:** Comparação entre os  $\delta$  do composto **7** e o 7-metoxi-O-metillicorenina (500 MHz)

Posição	Composto <b>7</b> ( $\delta$ em ppm, J em Hz)	7-metoxi-O-metillicorenina (DE ANDRADE <i>et al.</i> , 2014)
<b>1</b>	4,39 dt (4,5; 1,2)	4,40 br d (6,5)
<b>2<math>\alpha</math></b>	2,66 ddt (19,6; 7,0; 3,2)	2,67 ddt (19,0; 6,5; 3,0)
<b>2<math>\beta</math></b>	2,31 m	2,29 dt (19,5; 3,0)
<b>3</b>	5,52 br s	5,55 br s
<b>4a</b>	2,85 br d (9,5)	2,92br d (10,0)
<b>6<math>\beta</math></b>	5,59 s	5,52 s
<b>10</b>	6,85 s	6,85 s
<b>10b</b>	2,45 dd (9,5; 2,0)	2,47 dd (10,0; 2,0)
<b>11 (2H)</b>	2,48- 2-55 m	2,49- 2-58 m
<b>12<math>\alpha</math></b>	3,19 ddd (10,2; 7,4; 3,0)	3,22 ddd (10,5; 7,5; 3,0)
<b>12<math>\beta</math></b>	2,38 m	2,42 m
<b>6-OCH<sub>3</sub></b>	3,51 s	3,51 s
<b>7-OCH<sub>3</sub></b>	3,88 s	3,89 s
<b>8-OCH<sub>3</sub></b>	3,81 s	3,82 s
<b>9-OCH<sub>3</sub></b>	3,87 s	3,87 s
<b>NMe</b>	2,07s	2,11 s
<b>Solvente</b>	CD <sub>3</sub> OD	CD <sub>3</sub> OD



**Figura 39:** Estrutura química do alcaloide 7-metoxi-O-metillicorenina (**7**)

O alcaloide 7-metoxi-O-metillicorenina foi avaliado por Lou e colaboradores em 2012 quanto a citotoxicidade frente à linhagens de células tumorais, não apresentando atividade citotóxica satisfatória contra as cinco linhagens de células ensaiadas.

#### 4.2.1.7 – Composto 8

O composto **8** foi isolado dos extratos acetato de etila das hastes florais e bulbos e do extrato hexano dos bulbos, totalizando em 29,8 mg de um sólido branco. O composto foi solubilizado em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) para análise de RMN  $^1\text{H}$  (figura 40).

As principais características dos sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$  incluem: (a) um hidrogênio singleto em 6,80 ppm, correspondente a um hidrogênio aromático; (b) três singletos em 3,99, 3,91 e 3,89 ppm, integrando para 3 hidrogênios cada, atribuído a três grupos  $\text{OCH}_3$  no anel aromático; (c) um hidrogênio singleto em 2,05 ppm referente ao grupo  $\text{NCH}_3$ , apresentando integração para 3 hidrogênios.

Os dados obtidos no RMN  $^1\text{H}$  do composto **8**, indicam que este composto possui esqueleto do tipo homolicorina da série das lactonas, devido a ausência de hidrogênios na posição 6. Ainda, observa-se a substituição no anel aromático por três grupos  $\text{OCH}_3$ , sendo duas delas localizadas nas posições 8 e 9, que é característico dos alcaloides pertencentes ao tipo homolicorina. A terceira metoxila aromática foi atribuída à posição 7 da estrutura, através da comparação com a literatura. Tipicamente, observa-se que alcaloides do tipo homolicorina que possuem três substituintes no anel aromático apresentam a posição 10 não substituída .

A posição trans di-axial entre os hidrogênios das posições 4a e 10b é confirmada através do cálculo da constante de acoplamento entre eles ( $J_{4a, 10b} \sim 9,0$  Hz).

COMPOSTO 8

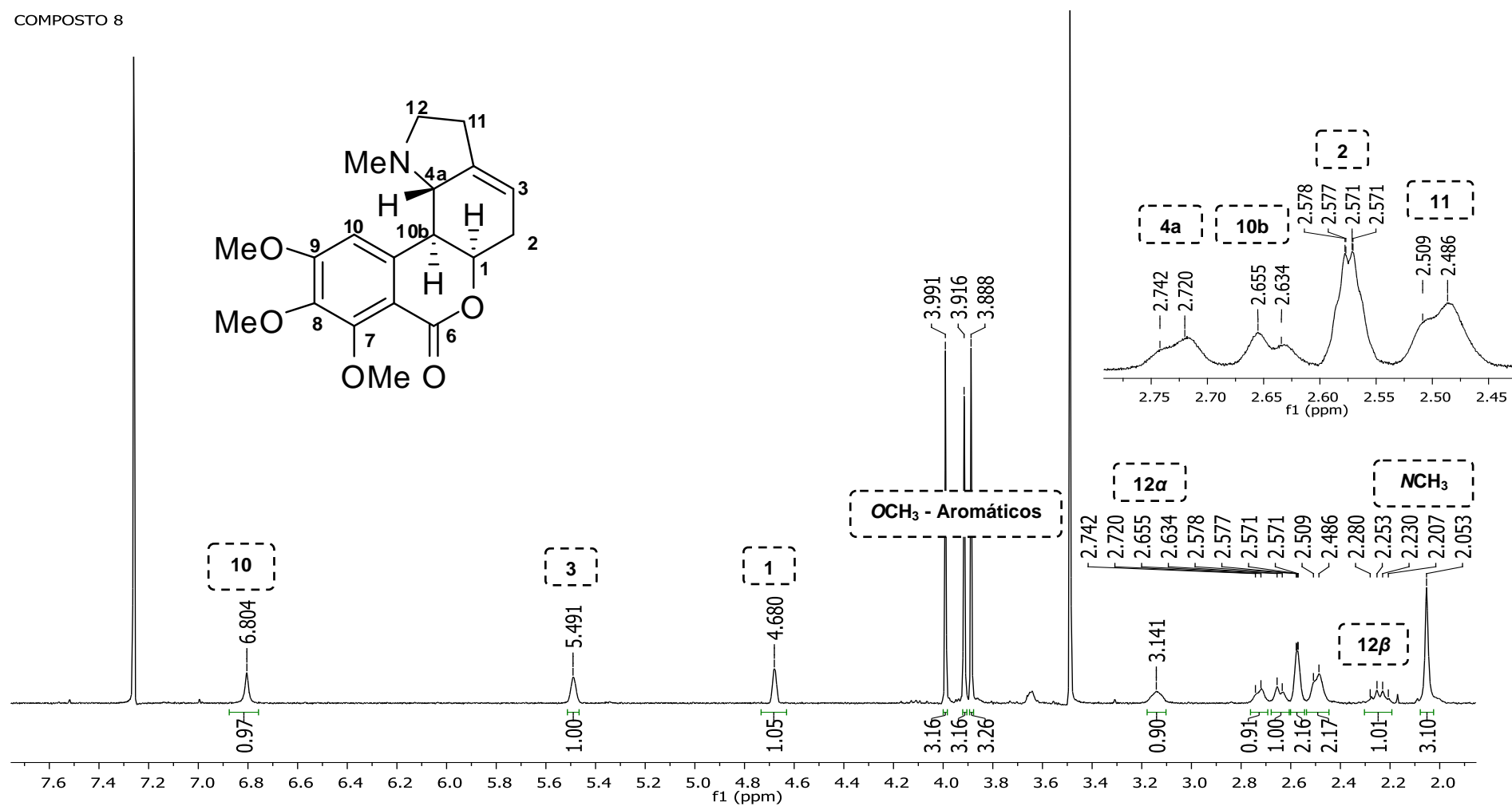
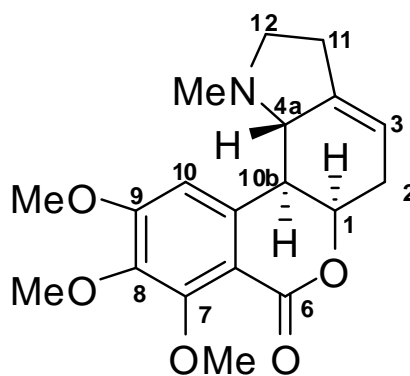


Figura 40: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 8 e ampliações ( $\text{CDCl}_3$ , 25  $^\circ\text{C}$ , 400 MHz)

A comparação entre os deslocamentos químicos do espectro de hidrogênio do composto **8** e o alcaloide descrito na literatura por De Andrade e colaboradores em 2014 como albomaculina, permitiu confirmar a estrutura do composto isolado em questão (tabela 19). A figura 41 ilustra a estrutura química do composto **8**.

**Tabela 19:** Comparação entre os  $\delta$  do composto **8** e albomaculina (400 MHz)

Posição	Composto <b>8</b> ( $\delta$ em ppm, J em Hz)	Albomaculina (DE ANDRADE <i>et al.</i> , 2014)
<b>1</b>	4,68 br s	4,68 m
<b>2 (2H)</b>	2,57 m	2,55-2,60 m
<b>3</b>	5,49 br s	5,48 m
<b>4a</b>	2,73 br d (9,0)	2,72 d (10,0)
<b>10</b>	6,80 s	6,78 s
<b>10b</b>	2,64 br d (9,0)	2,63 d (10,0)
<b>11 (2H)</b>	2,48- 2-50 m	2,45- 2-53 m
<b>12<math>\alpha</math></b>	3,14 m	3,13 ddd (9,6; 7,2; 3,6)
<b>12<math>\beta</math></b>	2,24 m	2,23 q (9,6)
<b>7-OCH<sub>3</sub></b>	3,99 s	3,99 s
<b>8-OCH<sub>3</sub></b>	3,89 s	3,89 s
<b>9-OCH<sub>3</sub></b>	3,91 s	3,91 s
<b>NMe</b>	2,05 s	2,05 s
<b>Solvente</b>	CDCl <sub>3</sub>	CDCl <sub>3</sub>



**Figura 41:** Estrutura química do alcaloide albomaculina (**8**)

A albomaculina (**8**) foi isolada pela primeira vez em 1956, a partir da planta *Haemanthus albomaculatus* (BRIGGS *et al.*, 1956) e poucos resultados de testes biológicos envolvendo esse alcaloide encontram-se descritos na literatura (WANG, *et al.*, 2007).

#### 4.2.1.8 – Composto 9

O composto **9** foi identificado em mistura com o alcaloide albomaculina (**8**) nos extratos acetato de etila e hexano das hastes florais e no extrato hexano dos bulbos de *Hippeastrum canastrense*, totalizando em 36,7 mg. A mistura contendo o composto **9** foi solubilizada em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) para análise de RMN  $^1\text{H}$ .

Conhecendo-se os deslocamentos químicos dos hidrogênios da albomaculina (**8**), é possível distinguir e identificar quais sinais pertencem aos hidrogênios do composto **9**, e nesse sentido, o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **9** apresentou como características principais: (a) dois hidrogênios singletos relativos a hidrogênios aromáticos *para* orientados em 7,56 e 7,01 ppm; (b) dois singletos em 3,95 e 3,94 ppm, integrando para 3 hidrogênios cada, atribuído a dois grupos  $\text{OCH}_3$  no anel aromático; (c) um singlete em 2,01 ppm referente ao grupo  $\text{NCH}_3$ , apresentando igualmente integração para 3 hidrogênios (figura 42).

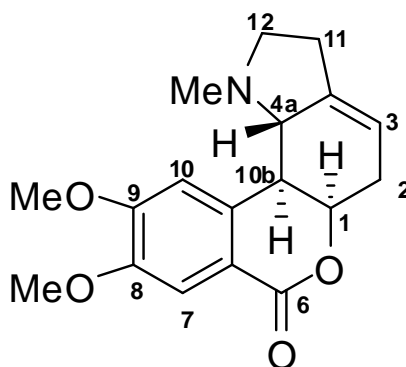
Diante das informações extraídas do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **9**, sugere-se que o mesmo possui esqueleto do tipo homolicorina da classe das lactonas, devido a ausência de hidrogênios na posição 6. A comparação entre os deslocamentos químicos do espectro de hidrogênio do composto **9** e o alcaloide homolicorina descrito anteriormente no item 4.1.1, permitiu designar o composto **9** como o alcaloide homolicorina (tabela 20).

**Tabela 20:** Comparação entre os  $\delta$  do composto **9** e homolicorina (200 MHz)

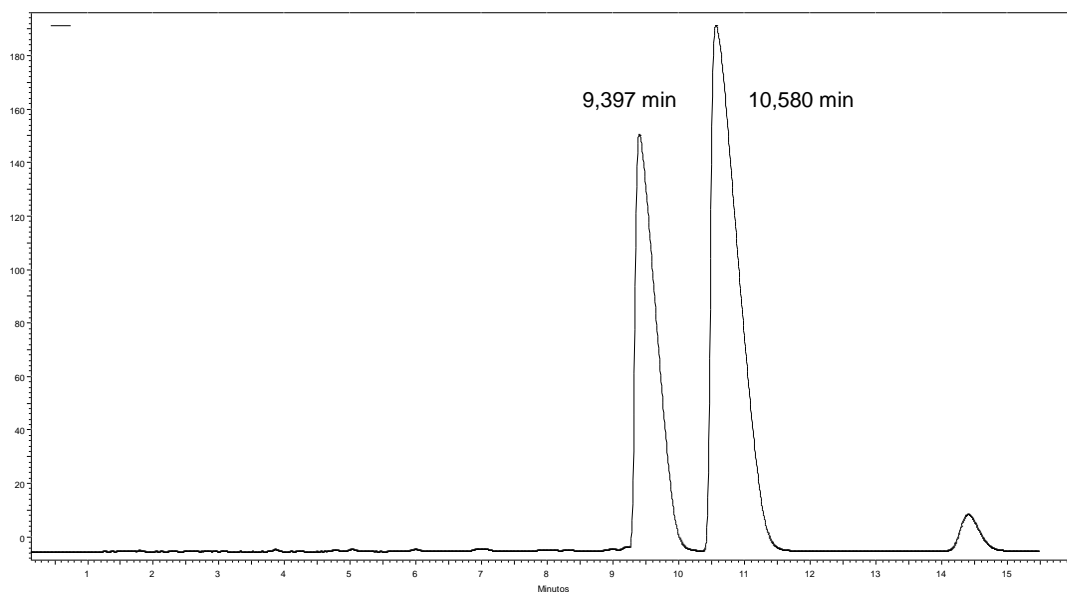
Posição	Composto 8 ( $\delta$ em ppm, J em Hz)	Homolicorina (BASTIDA <i>et al.</i> , 1987)
1	4,80 dd (4,4; 2,2)	4,81 ddd
2 (2H)	2,50 m	2,49 m
3	5,50 m	5,50 m
4a	2,76 br d (10,0)	2,72 dd (10,0)
7	7,56 s	7,57 s
10	7,01 s	6,99 s
10b	2,68 br d (10,0)	2,64 dd (10,0)
11 (2H)	2,55- 2-63 m	2,60- 2-70 m
12 $\alpha$	3,16 ddd (9,5; 6,7; 3,6)	3,14 ddd (9,6; 7,2; 3,6)
12 $\beta$	2,25 q (9,5)	2,24 ddd (9,6)
8-OCH <sub>3</sub>	3,95 s	3,96 s
9-OCH <sub>3</sub>	3,94 s	3,95 s
NMe	2,01 s	2,00 s
Solvente	$\text{CDCl}_3$	$\text{CDCl}_3$



Para o isolamento do alcaloide homolicorina (**9**) (figura 43) foi utilizado a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando como eluente a fase móvel ácida água:metanol:acetonitrila (80:10:10+1%TFA), eluída isocraticamente, e como fase estacionária coluna semi-preparativa C-18 (Agilent Eclipse). Foi utilizado um fluxo de 7 mL.min<sup>-1</sup> e a leitura foi realizada no comprimento de onda de 270 e 290 nm. Observou-se dois sinais no cromatograma com os tempos de retenção em 10,580 e 9,397 minutos. Após isolar os produtos, ambos foram analisados por RMN <sup>1</sup>H, confirmando os compostos presentes na mistura previamente discutida. Ainda, constatou-se que o alcaloide homolicorina (**9**) é o composto com o tempo de retenção de 9,397 minutos (figura 44).



**Figura 43:** Estrutura química do alcaloide isolado homolicorina (**9**)



**Figura 44:** Cromatograma do isolamento do composto **9** por CLAE.

O isolamento de **9** por CLAE, forneceu 11,3 mg de um sólido branco, e o espectro RMN  $^1\text{H}$  está disposto na figura 45. Todos os deslocamentos químicos do espectro estão congruentes com a descrição do alcaloide na literatura.

Estudos realizados por Szlávik e colaboradores (2004) indicam que o alcaloide homolicorina apresenta alta atividade antirretroviral, e também atividade citotóxica contra células fibroblásticas não-tumorais (WENIGER *et al.*, 1995).

## COMPOSTO 9

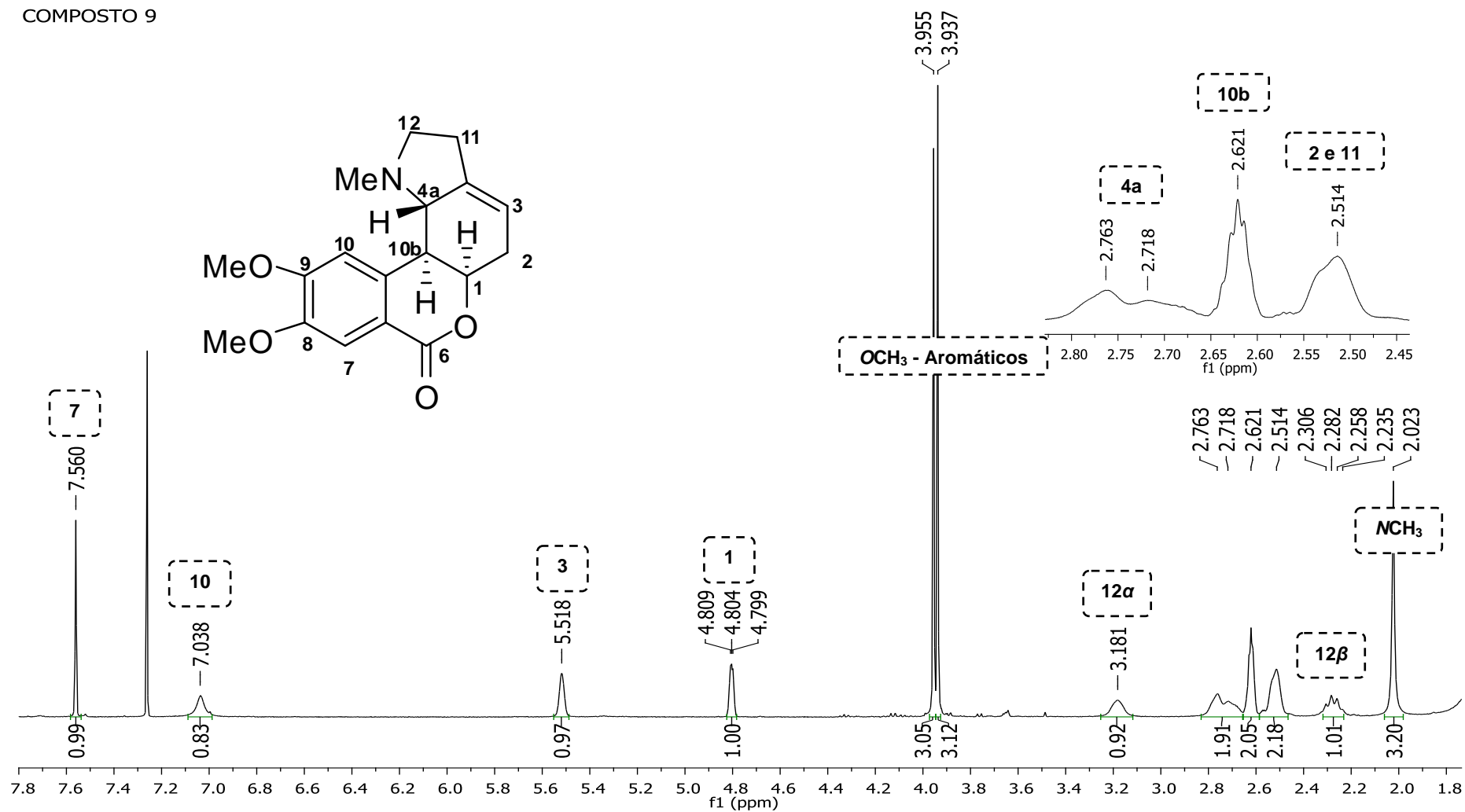


Figura 45: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 9 isolado por CLAE e ampliações ( $\text{CDCl}_3$ , 25  $^\circ\text{C}$ , 400 MHz)

#### 4.2.1.9 – Composto 11

O composto **11** foi isolado dos extratos acetato de etila e hexano das hastes florais e do extrato acetato de etila dos bulbos, totalizando em 7,7 mg de um sólido branco. O composto foi solubilizado em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) para análise de RMN  $^1\text{H}$  (figura 46).

As principais características do espectro de RMN  $^1\text{H}$  incluem: (a) um hidrogênio singleto em 6,58 ppm, correspondente a um hidrogênio aromático; (b) dois singletos largos em 6,04 e 5,99 ppm, integrando para um hidrogênio cada, atribuídos ao grupo  $\text{OCH}_2\text{O}$  no anel aromático; (c) um singleto, integrando para 3 hidrogênios, referente a um grupo  $\text{OCH}_3$  no anel aromático em 4,11 ppm; (d) um dubleto largo em 3,32 ppm integrando para um hidrogênio; (e) um quadrupletto em 2,87 ppm, integrando para um hidrogênio.

Os dados obtidos no RMN  $^1\text{H}$  do composto **11**, indicam que a estrutura desse alcaloide é do tipo homolicorina da série das lactonas, devido a ausência de hidrogênios na posição 6. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  evidencia a presença de apenas um hidrogênio aromático, sugerindo uma substituição no anel aromático por uma metoxila. Nesse sentido foram realizadas as análises de RMN NOESY e COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  para confirmar a posição do substituinte, onde espectro de NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  evidenciou a correlação do hidrogênio aromático com o hidrogênio da posição 10b em aproximadamente 2,51 ppm, levando à indicação de que a posição não substituída no anel aromático é a posição 10, e ainda, o espectro COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  corrobora a constatação através do acoplamento explícito entre os hidrogênios 10 e 10b.

O espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (figura 47) também mostrou um acoplamento grande entre os hidrogênios com deslocamentos químicos em 3,32 e 2,51 ppm ( $J \sim 9,5$  Hz), enquanto no espectro de NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (figura 48), estes não apresentaram correlação. Assim, atribuiu-se os hidrogênios 4a e 10b em 3,32 e 2,51 ppm, respectivamente, confirmando a estereoquímica e a posição trans di-axial entre eles.

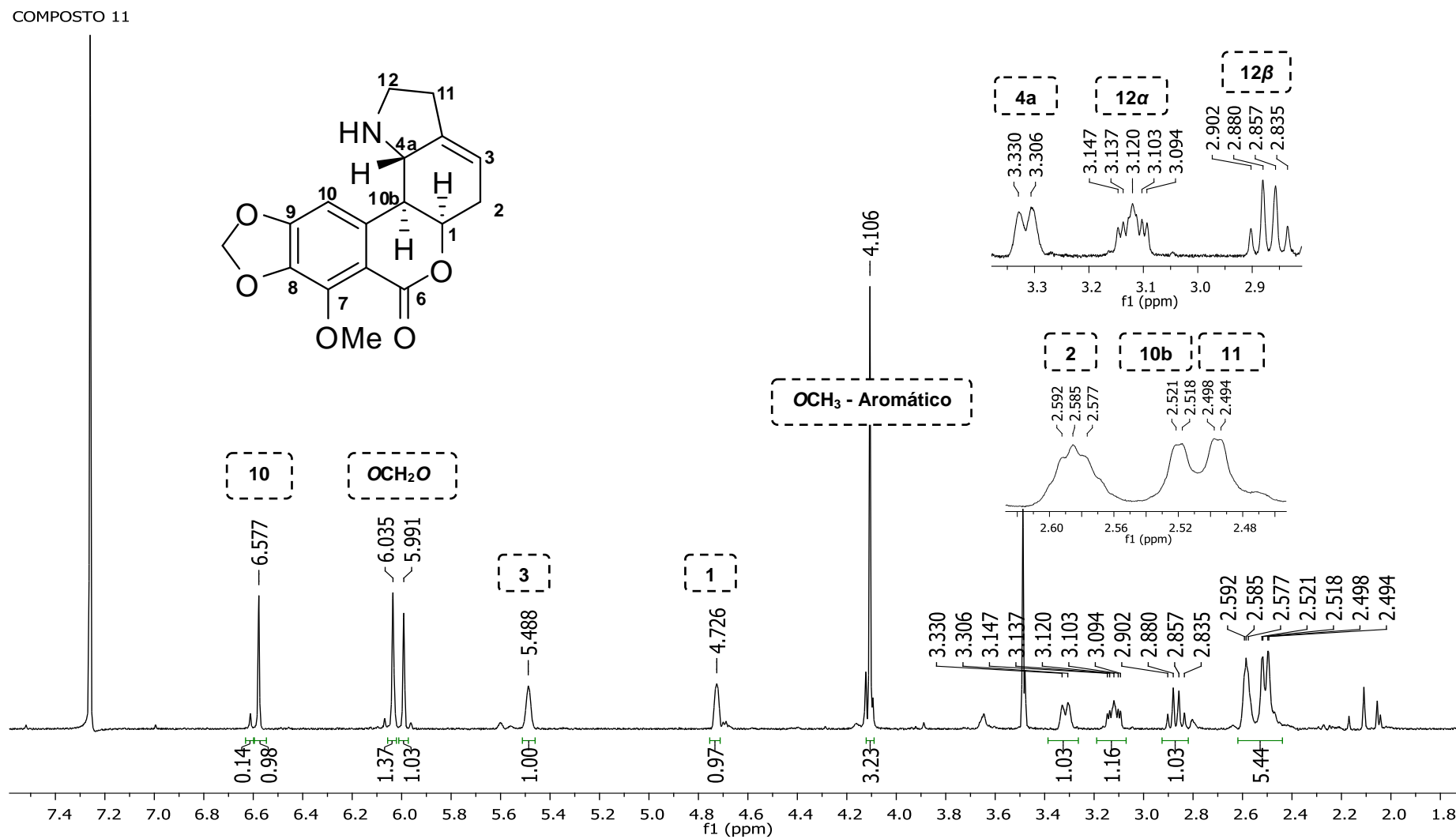


Figura 46: Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 11 e ampliações (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, 400 MHz)

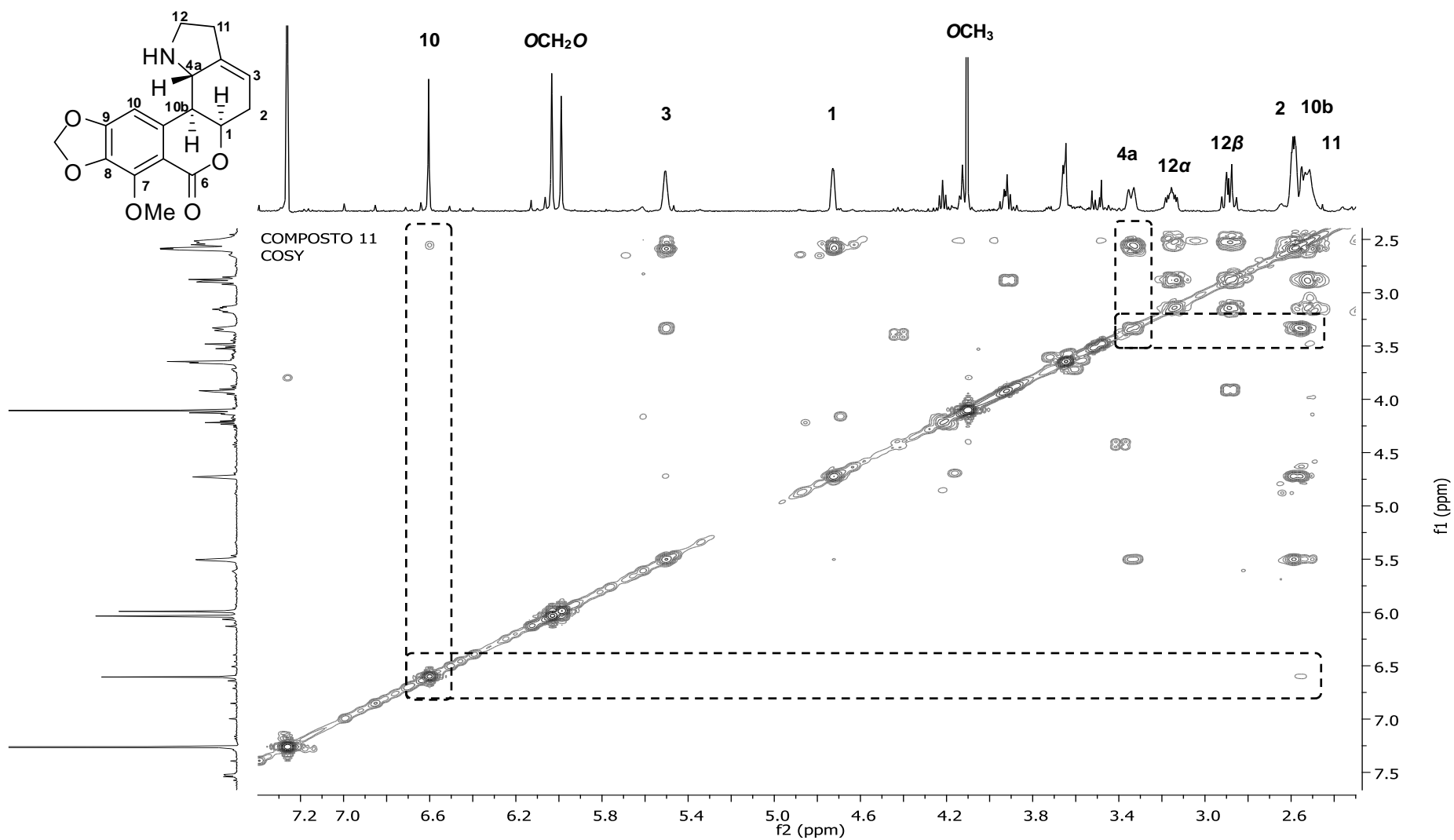


Figura 47: Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  do composto 11 ( $\text{CDCl}_3$ , 25  $^\circ\text{C}$ , 400 MHz)

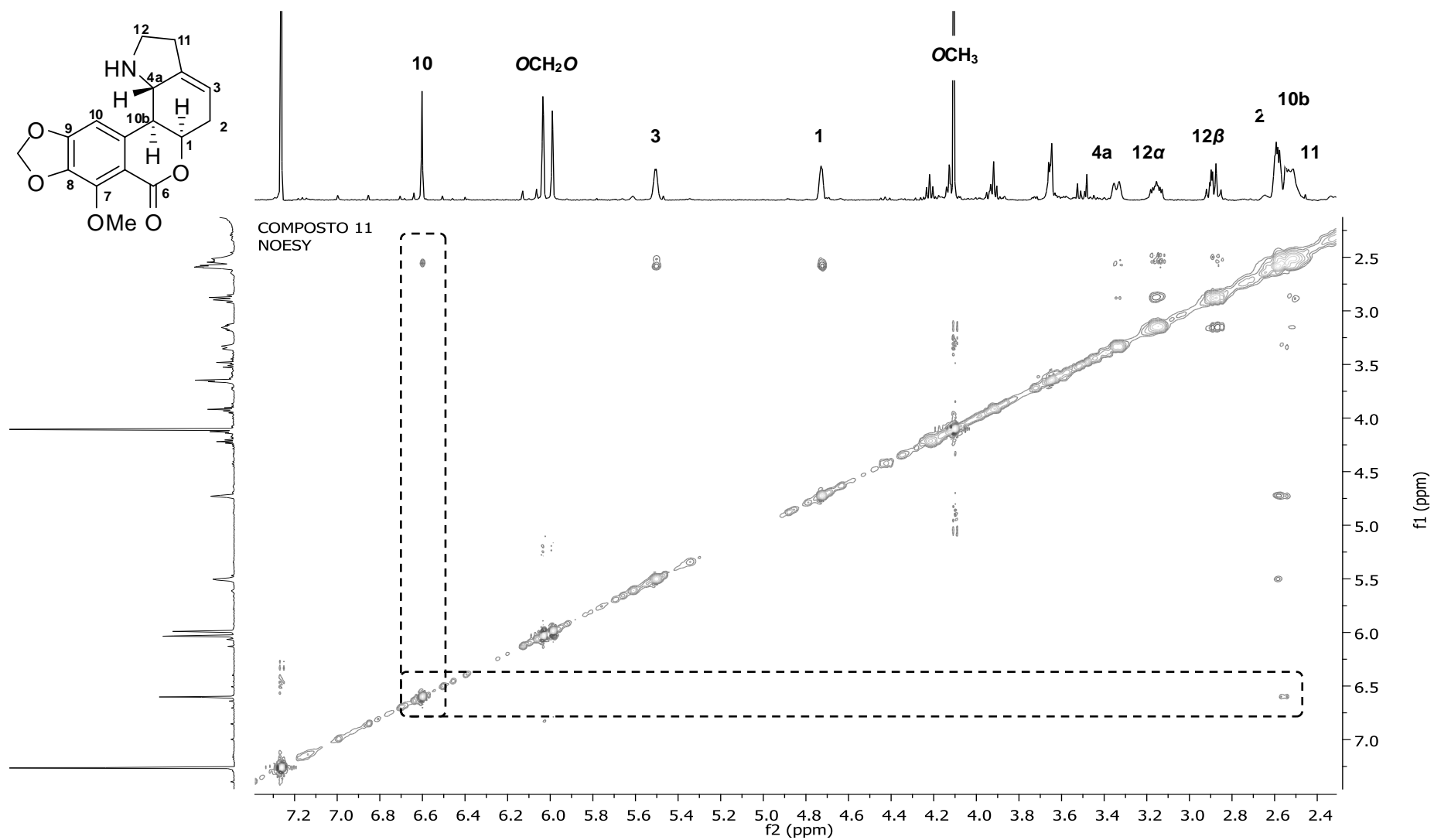


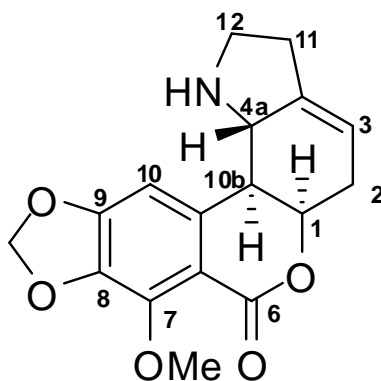
Figura 48: Espectro de NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  do composto 11 ( $\text{CDCl}_3$ , 25  $^\circ\text{C}$ , 400 MHz)

A ausência do sinal do grupo  $NCH_3$  no espectro de hidrogênio do composto **11**, comum em compostos com esqueleto homolicorina, e também o deslocamento químico atípico dos hidrogênios  $4a$  e  $12\beta$ , norteou uma investigação de alcaloides com características semelhantes. De fato, os deslocamentos dos hidrogênios no espectro de RMN do composto **11** mostraram-se consideravelmente similares aos deslocamentos dos hidrogênios do alcaloide normasonina, descrito pela primeira vez por Kreh e Matusch em 1995. O espectro de **11** diferencia-se principalmente pela substituição da posição 7 da estrutura por um grupamento metoxila (tabela 21).

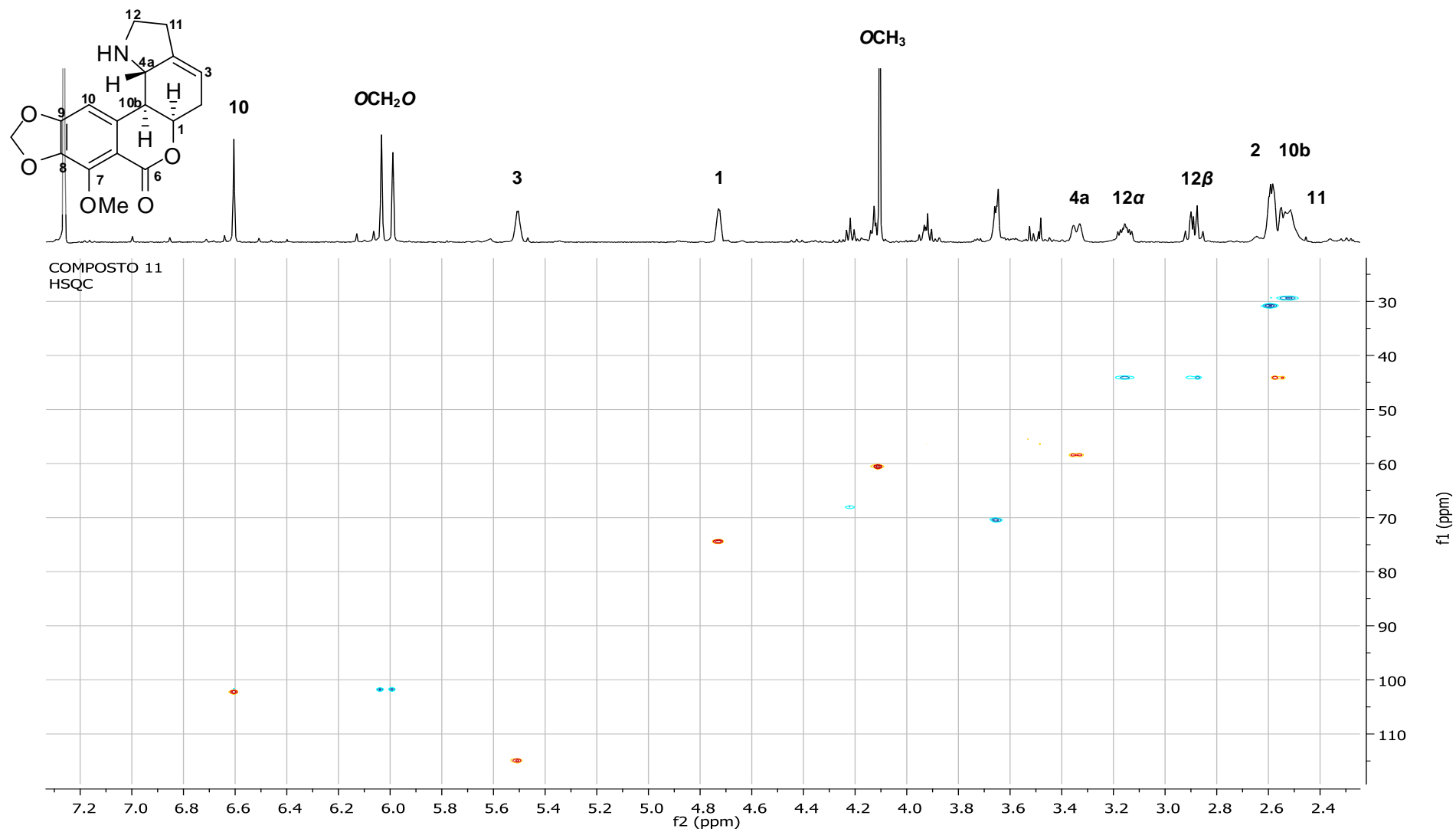
**Tabela 21:** Comparação entre os  $\delta$  do composto **11** e o alcaloide normasonina (400 MHz)

Posição	Composto 11 ( $\delta$ em ppm, J em Hz)	Normasonina (KREH e MATUSCH, 1995)
1	4,73 br s	4,85 m
2 (2H)	2,58 m	2,62 m
3	5,49 br s	5,64 m
4a	3,32 br d (9,5)	5,50 br d (9,3)
7	-	7,52 s
10	6,58 s	7,11 s
10b	2,51 dd (9,5; 1,6)	2,66 d (9,7)
11 (2H)	2,47-2,52 m	2,52 m
12 $\alpha$	3,12 ddd (10,8; 7,2, 4,0)	3,15 ddd (10,8; 6,8; 4,3)
12 $\beta$	2,87 q (9,0)	2,89 dd (18,6; 8,6)
7-OCH <sub>3</sub>	4,11 s	-
OCH <sub>2</sub> O	6,01 br s	6,05 d (5,01)
Solvente	CDCl <sub>3</sub>	CDCl <sub>3</sub>

Diante das informações extraídas dos espectros de RMN uni e bidimensionais do composto **11**, foi proposto que o mesmo se trata do alcaloide denominado 7-metoxinormasonina (figura 49). Esta estrutura não possui, até o presente momento, dados publicados na literatura, logo foram realizadas as demais análises de RMN bidimensionais para a elucidação adequada do composto preconizado (tabela 22, figuras 50, 51 e 52).



**Figura 49:** Estrutura química do alcaloide 7-metoxinormasonina (**11**)



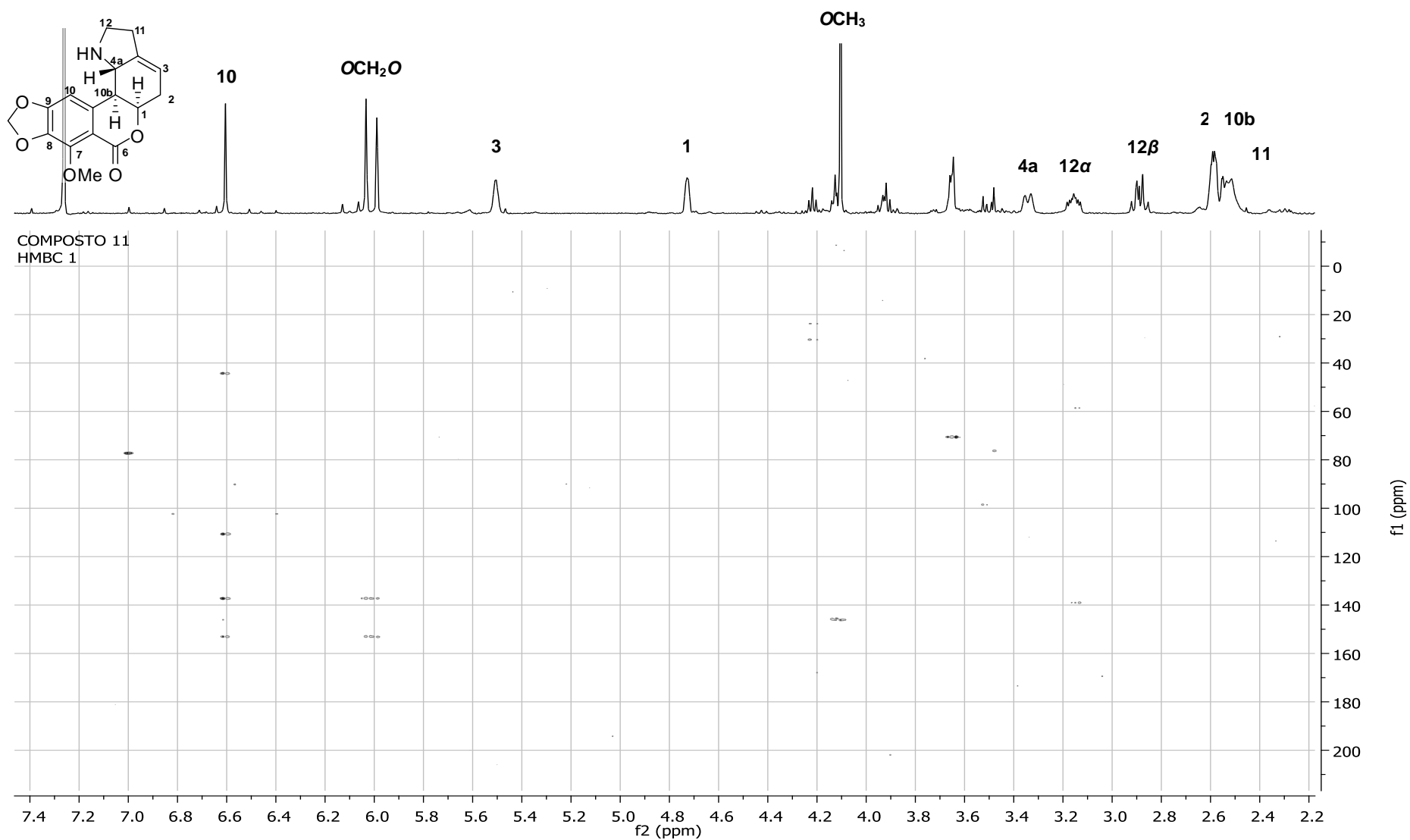


Figura 51: Mapa de contornos HMBC 1 do composto 11 ( $\text{CDCl}_3$ , 25  $^\circ\text{C}$ , 400 MHz)

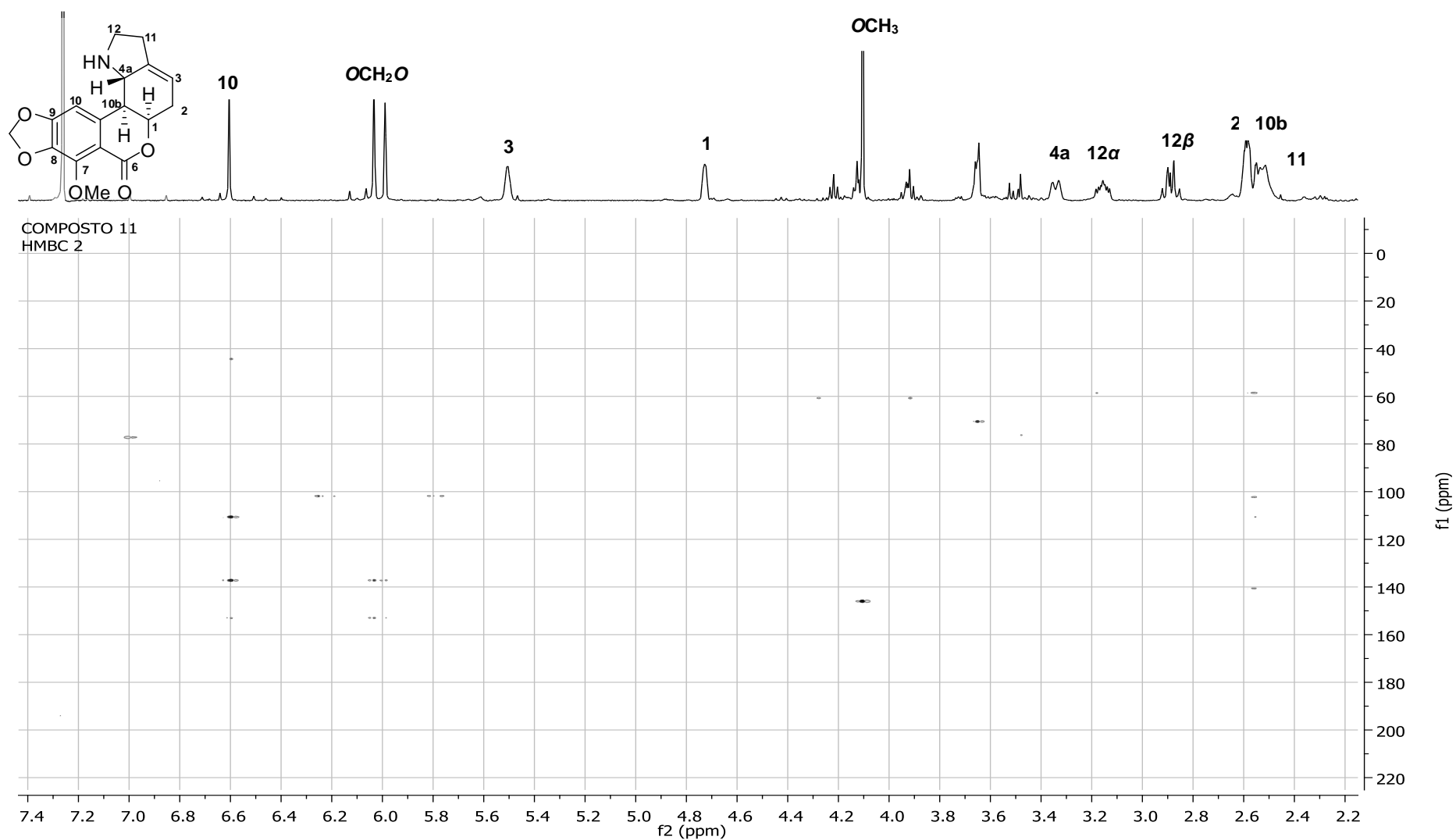
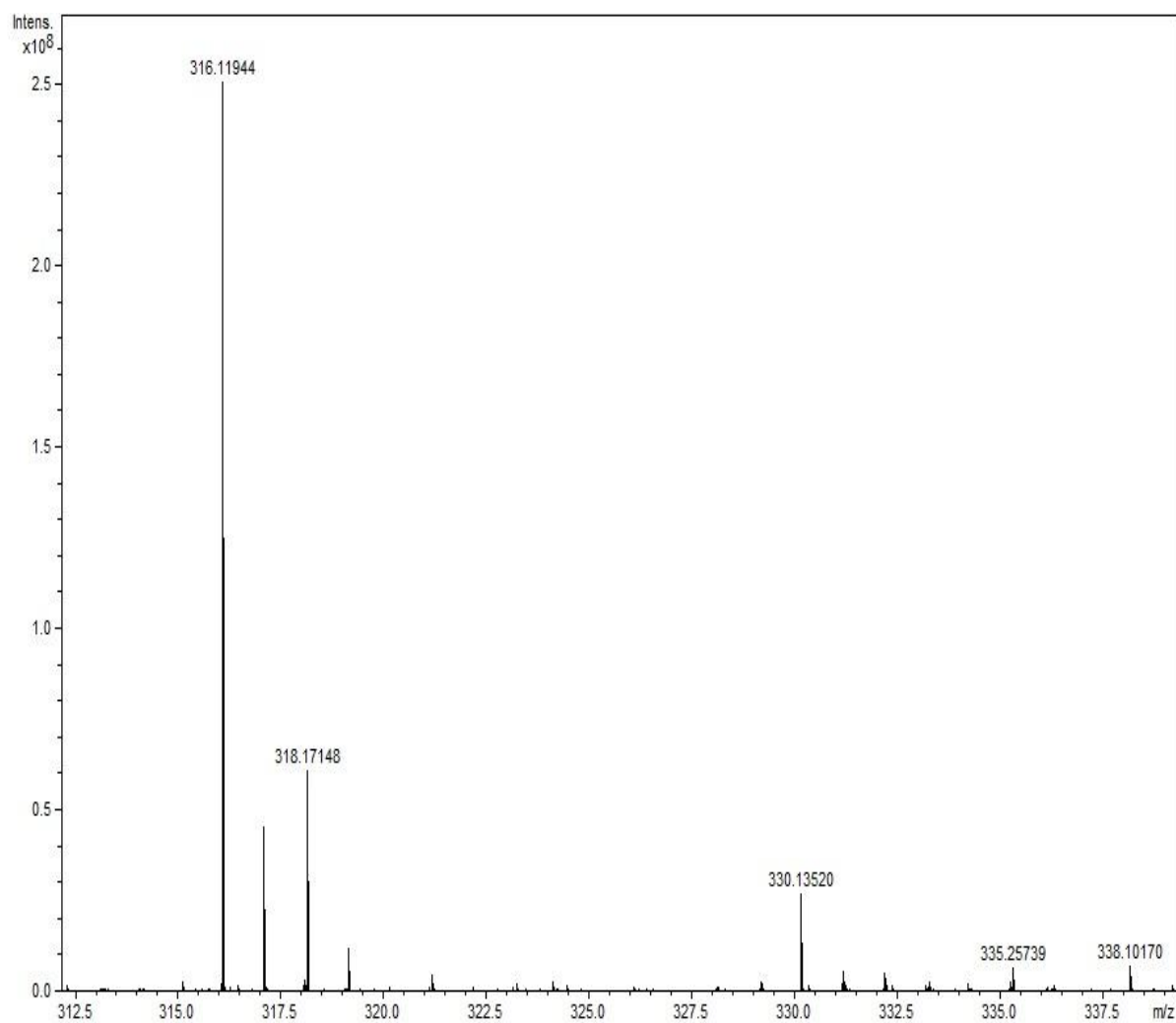


Figura 52: Mapa de contornos HMBC 2 do composto 11 (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, 400 MHz)

**Tabela 22:** Resumo dos dados espectrais de Ressonância Magnética Nuclear uni e bidimensionais do alcaloide 7-metoxinormasonina (**11**)

Posição	H $\delta$ (J em Hz)	COSY	NOESY	HSQC	HMBC
<b>1</b>	4,73 br s	H-2, H-3, H-4a, H-10b	H-2, H-10b	74,6 CH	
<b>2 (2H)</b>	2,47-2,52 m	H-1, H-3	H-1, H-3	31,1 CH <sub>2</sub>	C-4
<b>3</b>	5,49 br s	H-1, H-2, H-4a, H-11	H-2, H-11	115,1 CH	
<b>4</b>				139,0 C	
<b>4a</b>	3,32 br d (9,5)	H-1, H-3, H-10b	H-11, H-12 $\beta$	58,6 CH	
<b>6</b>				110,6 C	
<b>6a</b>				146,7 C	
<b>7</b>				137,8 C	
<b>8</b>				153,1 C	
<b>9</b>				102,5 CH	C-6a, C-8, C-9, C-10b
<b>10</b>	6,58 s	H-10b	H-10b		
<b>10a</b>					
<b>10b</b>	2,51 dd (9,5; 1,6)	H-1, H-4a, H-10	H-1, H-10b	44,4 CH	C-4a, C-6a, C-10
<b>11 (2H)</b>	2,58 m	H-3, H-12 $\alpha$ , H-12 $\beta$	H-4a, H-12 $\alpha$ , H-12 $\beta$	29,6 CH <sub>2</sub>	
<b>12<math>\alpha</math></b>	3,12 ddd (10,8; 7,2, 4,0)	H-11, H-12 $\beta$	H-11, H-12 $\beta$	43,4 CH <sub>2</sub>	C-4, C-4a
<b>12<math>\beta</math></b>	2,87 q (9,0)	H-11, H-12 $\alpha$	H-4a, H-11, H-12 $\alpha$	43,4 CH <sub>2</sub>	
<b>7-O-Me</b>	4,11 s			60,8 CH <sub>3</sub>	C-7
<b>OCH<sub>2</sub>O</b>	6,01 br s			102,0 CH <sub>2</sub>	C-8, C-9

A estrutura do alcaloide 7-metoxinormasonina (**11**) foi confirmada pela análise de espectrometria de massas de alta resolução. O íon observado com  $m/z$   $[M+H]^+$  316,11944 (calculado  $C_{17}H_{18}NO_5$  316,32797) conforme ilustrado na figura 53.



**Figura 53:** Espectro de massas de alta resolução da 7- metoxinormasonina (**11**)

#### 4.2.1.10 – Composto 12

O fracionamento dos extratos acetato de etila das hastes florais e dos extratos acetato de etila e hexano dos bulbos de *Hippeastrum canastrense* levou ao isolamento de 14,3 mg do composto **12**, que se apresentou como um sólido branco. O composto foi solubilizado em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) para análise de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 54).

As principais características dos sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$  incluem: (a) dois singletos referente a dois hidrogênios aromáticos em 7,57 e 6,92 ppm; (b) um sinal em 4,21 ppm, referente a um hidrogênio da posição 2 substituída; (c) um singlete largo em 3,94 ppm, integrando para 6 hidrogênios, atribuído a dois grupos  $\text{OCH}_3$  no anel aromático; (d) um singlete integrando para 3 hidrogênios em 3,50 ppm referente a um grupo  $\text{OCH}_3$  alifático; (e) um singlete em 2,03 ppm referente ao grupo  $\text{NCH}_3$ , apresentando igualmente integração para 3 hidrogênios.

Os dados obtidos no RMN  $^1\text{H}$  do composto **12**, indicam que este composto possui esqueleto do tipo homolicorina da série das lactonas, devido a ausência de hidrogênios na posição 6. Ainda, verifica-se a substituição no anel aromático por dois grupos  $\text{OCH}_3$ , sendo localizadas nas posições 8 e 9, que é característico dos alcaloides pertencentes ao tipo homolicorina. A terceira metoxila identificada no espectro de hidrogênio de **12** foi atribuída à posição 2 da estrutura, uma vez que está na região de metoxilas alifáticas e ainda, o hidrogênio desta posição está consideravelmente desblindado se comparado aos hidrogênios do alcaloide homolicorina.

## COMPOSTO 12

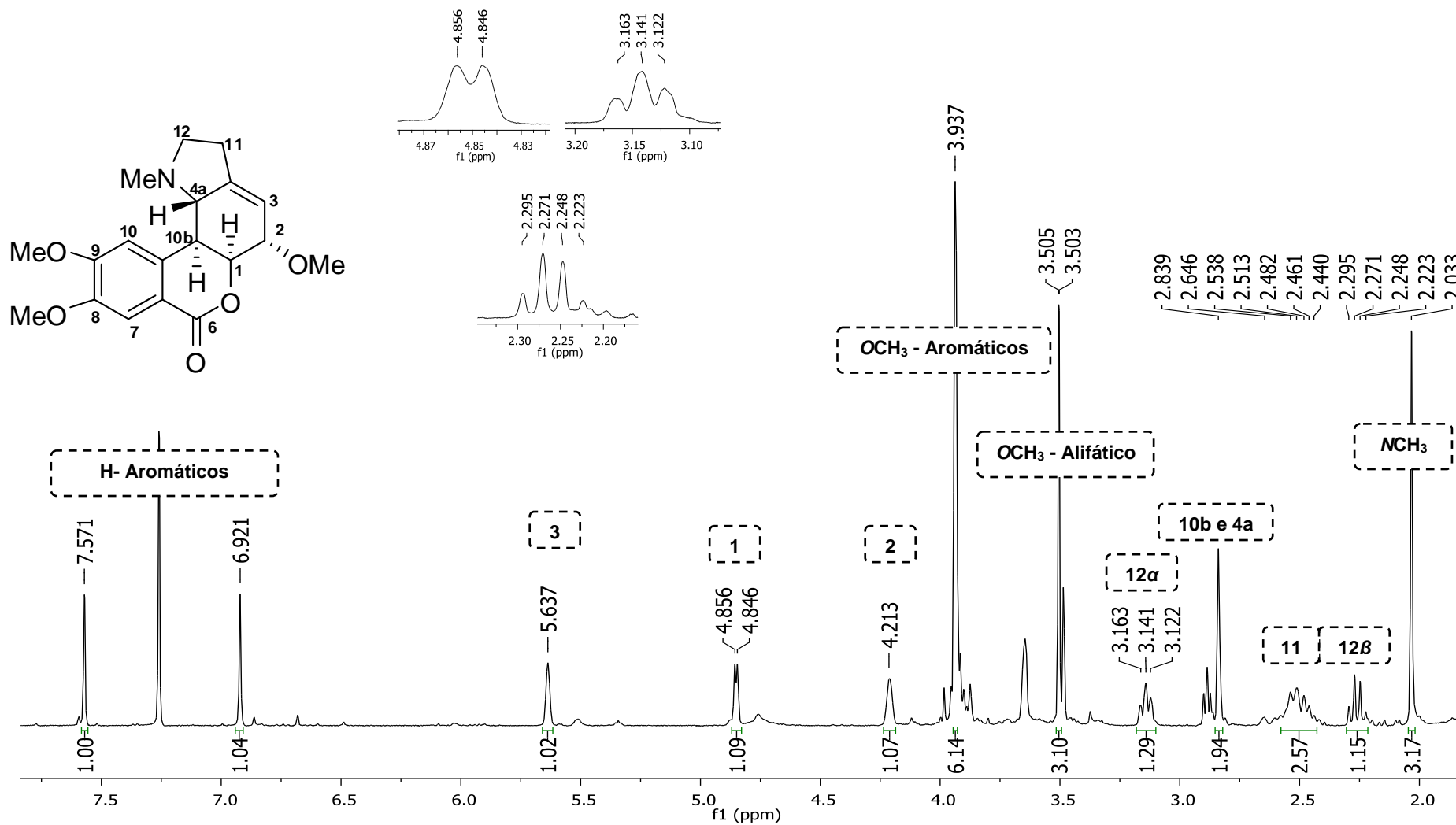
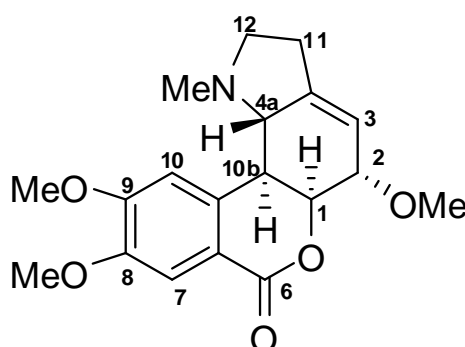


Figura 54: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 12 e ampliações (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, 400 MHz)

Verificou-se uma apreciável semelhança das características do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **12** com os deslocamentos teóricos do alcaloide homolicorina, onde o espectro de **12** diferencia-se apenas pela substituição que ocorre na posição 2 da estrutura (tabela 23). Este diferencial revela um composto conhecido e denominado  $2\alpha$ -metoxihomolicorina. No entanto, este alcaloide foi identificado somente pelo estudo de massas e do padrão de fragmentação por CG-EM em 2014 por De Andrade e colaboradores. Assim sendo, o alcaloide  $2\alpha$ -metoxihomolicorina (**12**) foi isolado pela primeira vez no presente trabalho (figura 55).

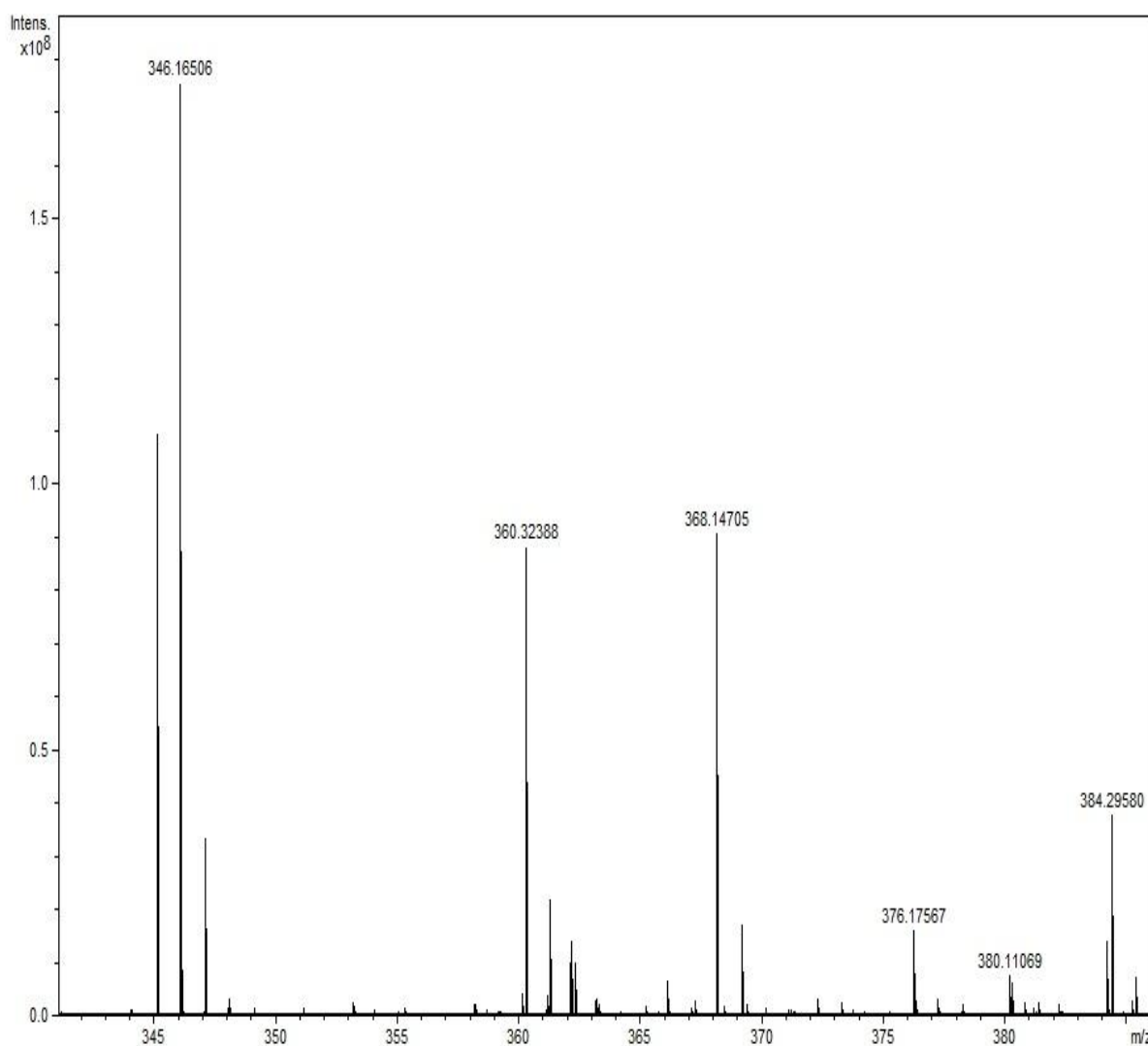
**Tabela 23:** Comparação entre os  $\delta$  do composto **12** e homolicorina (200 MHz)

Posição	Composto 12 ( $\delta$ em ppm, J em Hz)	Homolicorina (BASTIDA <i>et al.</i> , 1987)
1	4,85 (4,1)	4,81 ddd 4,2; 1,8, 1,7)
2	4,21 br s ( $\beta$ )	2,49 m (2H)
3	5,64 br s	5,50 m
4a	2,84 br s	2,72 dd (9,6; 2,0)
7	7,56 s	7,57 s
10	7,01 s	6,99 s
10b	2,84 br s	2,64 dd (9,6; 1,8)
11 (2H)	2,44- 2-58 m	2,60- 2-70 m
12 $\alpha$	3,14 m	3,14 ddd (9,2; 5,3; 4,1)
12 $\beta$	2,26 q (9,7)	2,24 dd (18,0; 9,2)
2-OCH <sub>3</sub>	3,50 s	-
8-OCH <sub>3</sub>	3,94 s	3,96 s
9-OCH <sub>3</sub>	3,94 s	3,95 s
NMe	2,03 s	2,00 s
Solvente	CDCl <sub>3</sub>	CDCl <sub>3</sub>



**Figura 55:** Estrutura química do alcaloide  $2\alpha$ -metoxihomolicorina (**12**)

A estrutura do alcaloide 2 $\alpha$ -metoxihomolicorina (**12**) foi confirmada pela análise de espectrometria de massas de alta resolução. O íon observado com  $m/z$   $[M+H]^+$  346,16506 (calculado  $C_{19}H_{24}NO_5$  346,39701) conforme ilustrado na figura 56. As demais análises para a completa caracterização do composto estão em andamento.



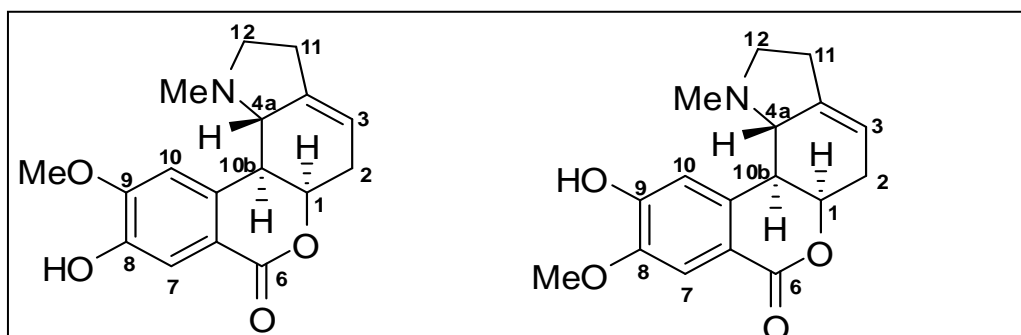
**Figura 56:** Espectro de massas de alta resolução da 2 $\alpha$ -metoxihomolicorina (**12**)

#### 4.2.1.11 – Composto 13

O fracionamento do extrato acetato de etila das hastes florais e de *Hippeastrum canastrense* levou ao isolamento de 2,3 mg do composto **13**, que se apresentou como um sólido branco. O composto foi solubilizado em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) para análise de RMN  $^1\text{H}$  (figura 57).

As principais características dos sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$  incluem: (a) dois singletos referente a dois hidrogênios aromáticos em 7,60 e 7,06 ppm; (b) um singlete em 3,97 ppm, integrando para 3 hidrogênios, atribuído a um grupo  $\text{OCH}_3$  no anel aromático; (c) um singlete em 2,04 ppm referente ao grupo  $\text{NCH}_3$ , apresentando igualmente integração para 3 hidrogênios.

As informações obtidas no espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **13**, indicam que este composto possui esqueleto do tipo homolicorina da série das lactonas, devido a ausência de hidrogênios na posição 6. Nota-se que o composto apresenta as características típicas do alcaloide homolicorina, porém destaca-se que o anel aromático encontra-se deficiente de um grupo metoxila. Esta constatação leva à possibilidade de dois isômeros de posição (figura 58).



**Figura 58:** Estrutura química dos isômeros de posição 8- e 9-O-desmetilhomolicorina, respectivamente

COMPOSTO 13

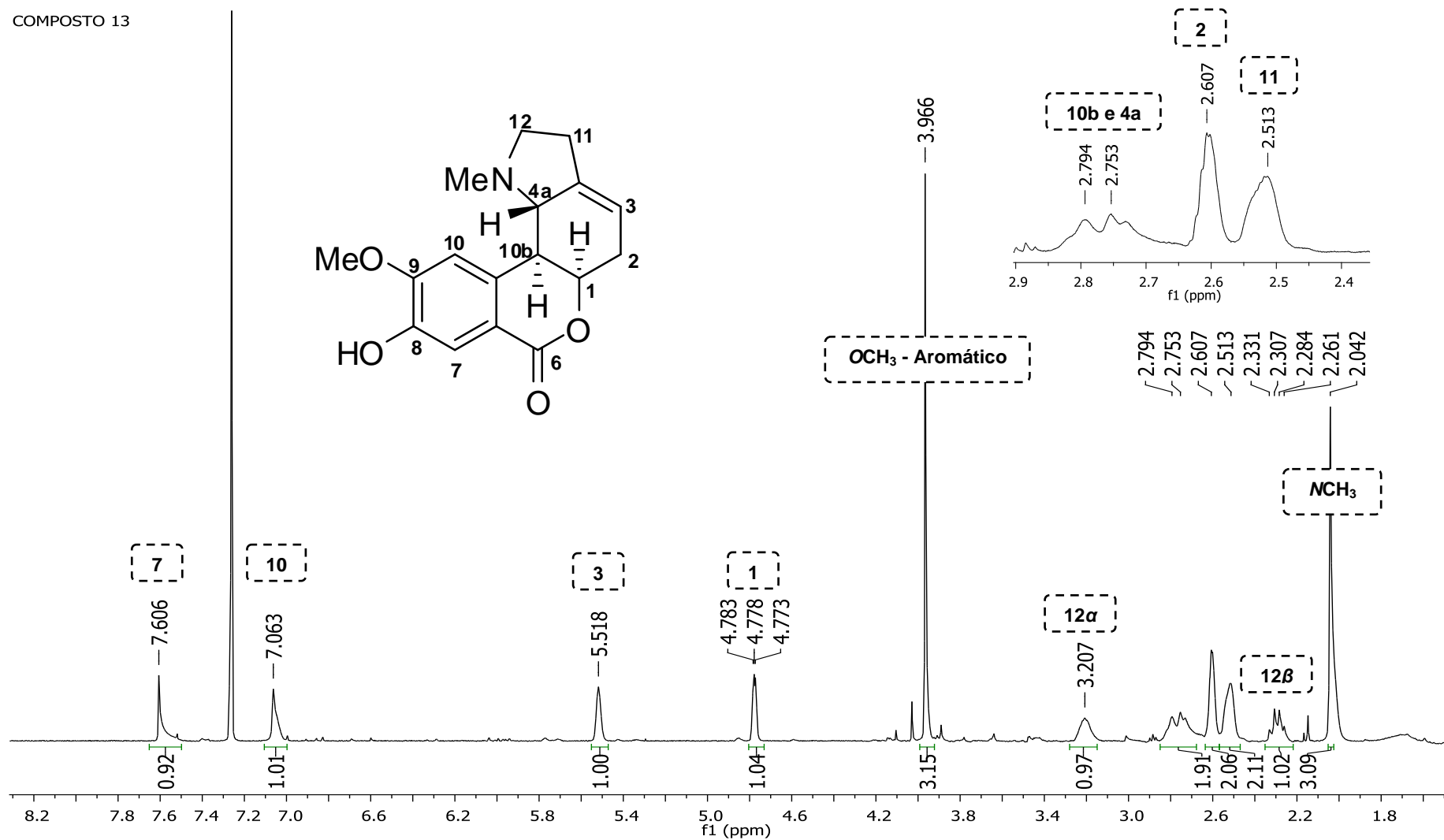
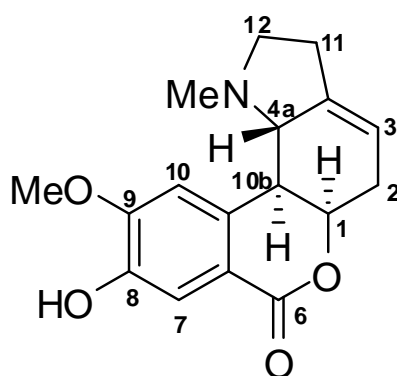


Figura 57: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **13** e ampliações ( $\text{CDCl}_3$ , 25  $^\circ\text{C}$ , 400 MHz)

Para determinar a posição do grupo  $\text{OCH}_3$ , efetuou-se a análise de RMN NOESY unidimensional, onde observou-se a correlação entre o hidrogênio da posição 10 com a metoxila aromática, comprovando a proximidade entre eles (figura 59). Logo, a ausência de outros substituintes no anel aromático sugere que a posição 8 possui uma hidroxila. Os dados de RMN  $^1\text{H}$  do composto **13** foram então comparados com a literatura (Tabela 24) e concluiu-se que o composto **13** trata-se do alcaloide 8-O-desmetilhomolicorina (figura 60).

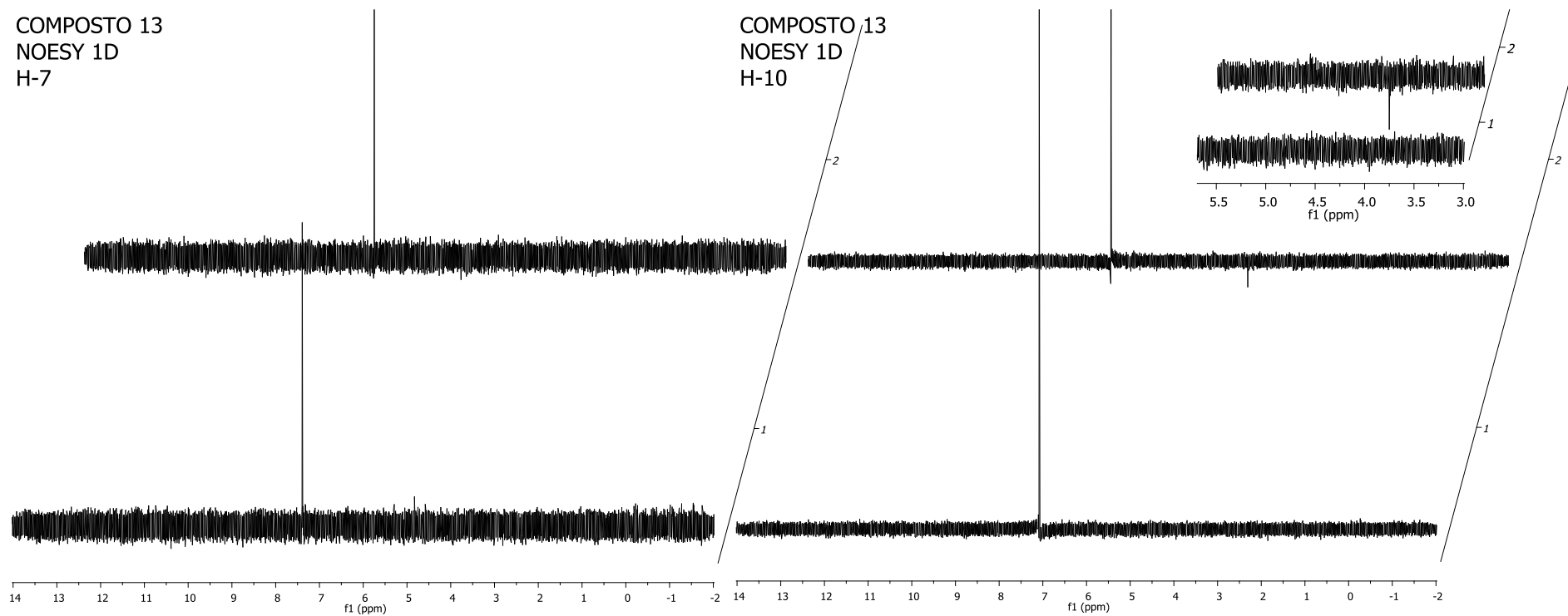
**Tabela 24:** Comparação entre os  $\delta$  do composto **13** e 8-O-desmetilhomolicorina (400 MHz)

Posição	Composto 13 ( $\delta$ em ppm, J em Hz)	8-O-desmetilhomolicorina (JEFFS <i>et al.</i> , 1985, LATVALA <i>et al.</i> , 1995)
1	4,78 m	4,77 br s
2 (2H)	2,61 br s	2,59 m
3	5,52 br s	5,53 br s
4a	2,81 br d (10,0)	2,73 dd
7	7,61 s	7,59 s
10	7,06 s	7,08 s
10b	2,74 br d (10,0)	2,63 dd
11 (2H)	2,61 m	2,50 m
12 $\alpha$	3,21 m	3,26 m
12 $\beta$	2,30 dd (18,7;9,5)	2,25 dd
9-OCH <sub>3</sub>	3,97 s	3,97 s
NMe	2,04 s	2,06 s
Solvente	CDCl <sub>3</sub>	CDCl <sub>3</sub>



**Figura 60:** Estrutura química de 8-O-desmetilhomolicorina (**13**)

Estudos recentes indicam que o alcaloide 8-O-desmetilhomolicorina apresentou atividade neuroprotetora contra estresse oxidativos em uma linhagem de neuroblastoma humano testada (LI, *et al.*, 2013), enquanto apresenta-se inativo quanto ao efeito de inibição da enzima acetilcolinesterase em ensaios *in vitro* (LEE, *et al.*, 2014).



**Figura 59:** Espectro de NOESY 1D do composto **13** e ampliação ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 25 °C, 400 MHz)

#### 4.2.1.12 – Composto 15

O composto **15** foi isolado dos extratos acetato de etila das hastes florais, assim como dos extratos acetato de etila e hexano dos bulbos de *Hippeastrum canastrense*, totalizando 7,4 mg do composto. O sólido amarelado foi solubilizado em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) para análise de RMN  $^1\text{H}$ , onde as principais características observadas incluem (figura 61): (a) Um singleto em 7,78 ppm, na região de hidrogênios aromáticos; (b) um sinal em 4,18 ppm, referente a um hidrogênio da posição 2 substituída; (c) três singletos em 4,00, 3,91 e 3,88 ppm, integrando para 3 hidrogênios cada, atribuídos a três grupos  $\text{OCH}_3$  no anel aromático; (d) um singleto integrando para 3 hidrogênios em 3,48 ppm referente a um grupo  $\text{OCH}_3$  alifático; (e) um singleto em 2,09 ppm referente ao grupo  $\text{NCH}_3$ , apresentando igualmente integração para 3 hidrogênios.

Os dados obtidos no RMN  $^1\text{H}$  do composto **15**, indicam que a estrutura desse composto possui esqueleto do tipo homolicorina da série das lactonas, devido a ausência de hidrogênios na posição 6. Tipicamente, compostos do tipo homolicorina que possuem três grupos  $\text{OCH}_3$  aromáticos, apresentam as substituições nas posições 7, 8 e 9 do anel. A quarta metoxila identificada no espectro de hidrogênio de **15** foi atribuída à posição 2 da estrutura, uma vez que o sinal encontra-se na região de metoxilas alifáticas e ainda, o hidrogênio desta posição está consideravelmente desblindado se comparado aos hidrogênios do alcaloide homolicorina.

COMPOSTO 15

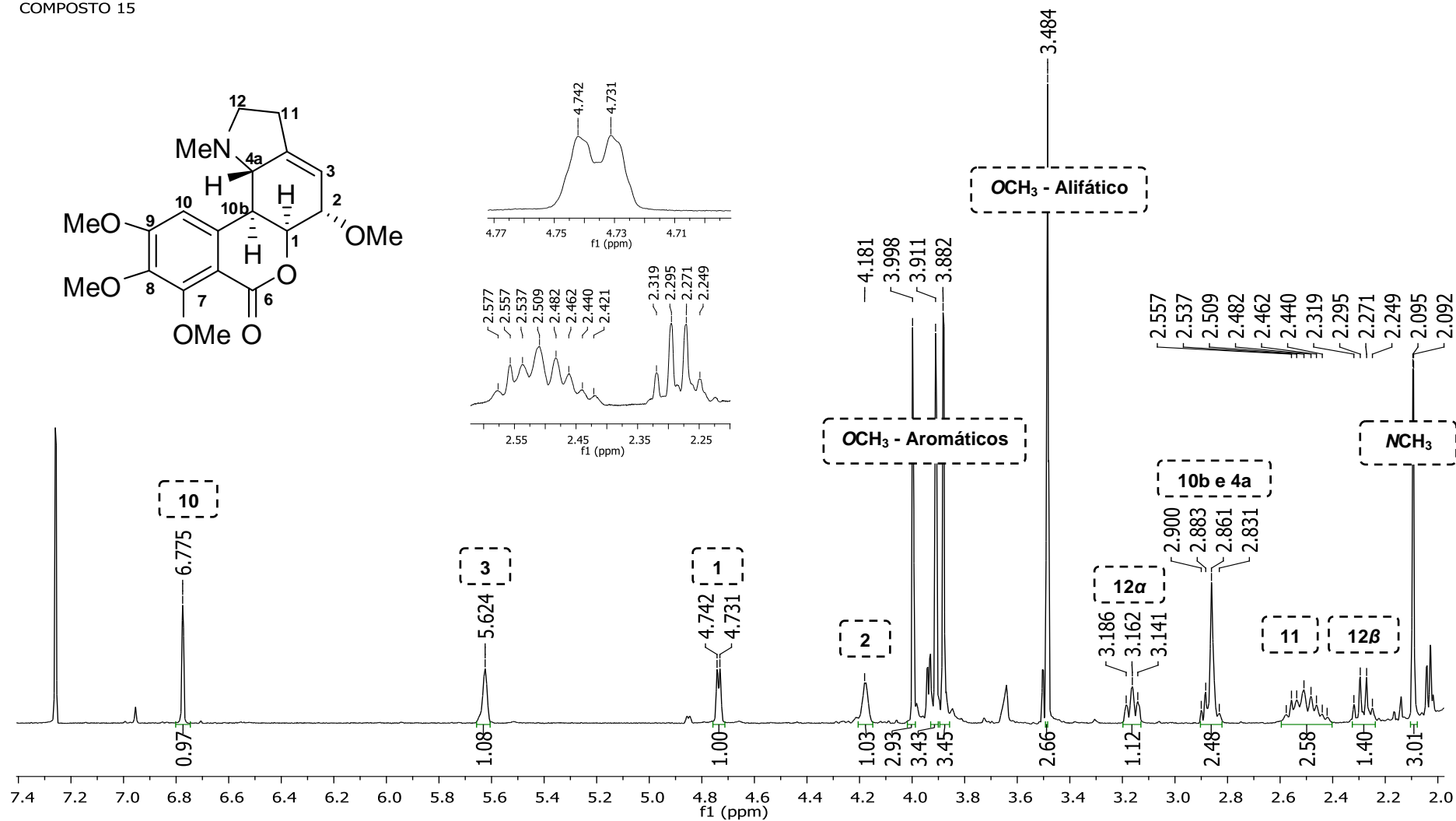


Figura 61: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 15 e ampliações ( $\text{CDCl}_3$ , 25  $^\circ\text{C}$ , 400 MHz)



#### 4.2.1.13 – Compostos 16 e 17

Os compostos **16** e **17** foram identificados somente em mistura, obtida do extrato acetato de etila das hastes florais com um peso de 4,9 mg. A mistura foi solubilizada em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) para análise de RMN  $^1\text{H}$  (figura 63).

Diante de um espectro de RMN  $^1\text{H}$  de uma mistura de compostos, é necessário que um sinal associado a apenas um hidrogênio de uma das estruturas seja escolhido como referência, a fim de normalizar qual a área abaixo da curva corresponde à integração de 1H. Nesse sentido, foi escolhido o singlete em 7,56 ppm como padrão. Este, e os demais sinais relacionados a essa estrutura, foram estabelecidos como sinais de hidrogênios do composto **16**. Conseqüentemente, os demais sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura pertencem ao composto **17**.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostra que os sinais correspondentes ao composto **17** apresentaram cerca de 80% da integração do sinal escolhido como parâmetro de 1H. Desta forma, distingui-se entre as estruturas dos compostos presentes na mistura.

As principais características verificadas relacionadas ao composto **16** incluem: (a) dois hidrogênios singletos *para* orientados em 7,56 e 6,97 ppm; (b) dois singletos em 3,95 e 3,94 ppm, integrando para 3 hidrogênios cada, atribuído a dois grupos  $\text{OCH}_3$  no anel aromático; (c) um singlete em 2,10 ppm referente ao grupo  $\text{NCH}_3$ , apresentando igualmente integração para 3 hidrogênios. Enquanto as principais características dos sinais pertencentes ao composto **17** incluem: (a) um singlete em 6,79 ppm na região de hidrogênios aromáticos; (b) três singletos em 4,00 e 3,92 e 3,89 ppm, integrando para 3 hidrogênios cada, atribuído a três grupos  $\text{OCH}_3$  no anel aromático; (c) um singlete em 2,06 ppm referente ao grupo  $\text{NCH}_3$ , apresentando integração para 3 hidrogênios.

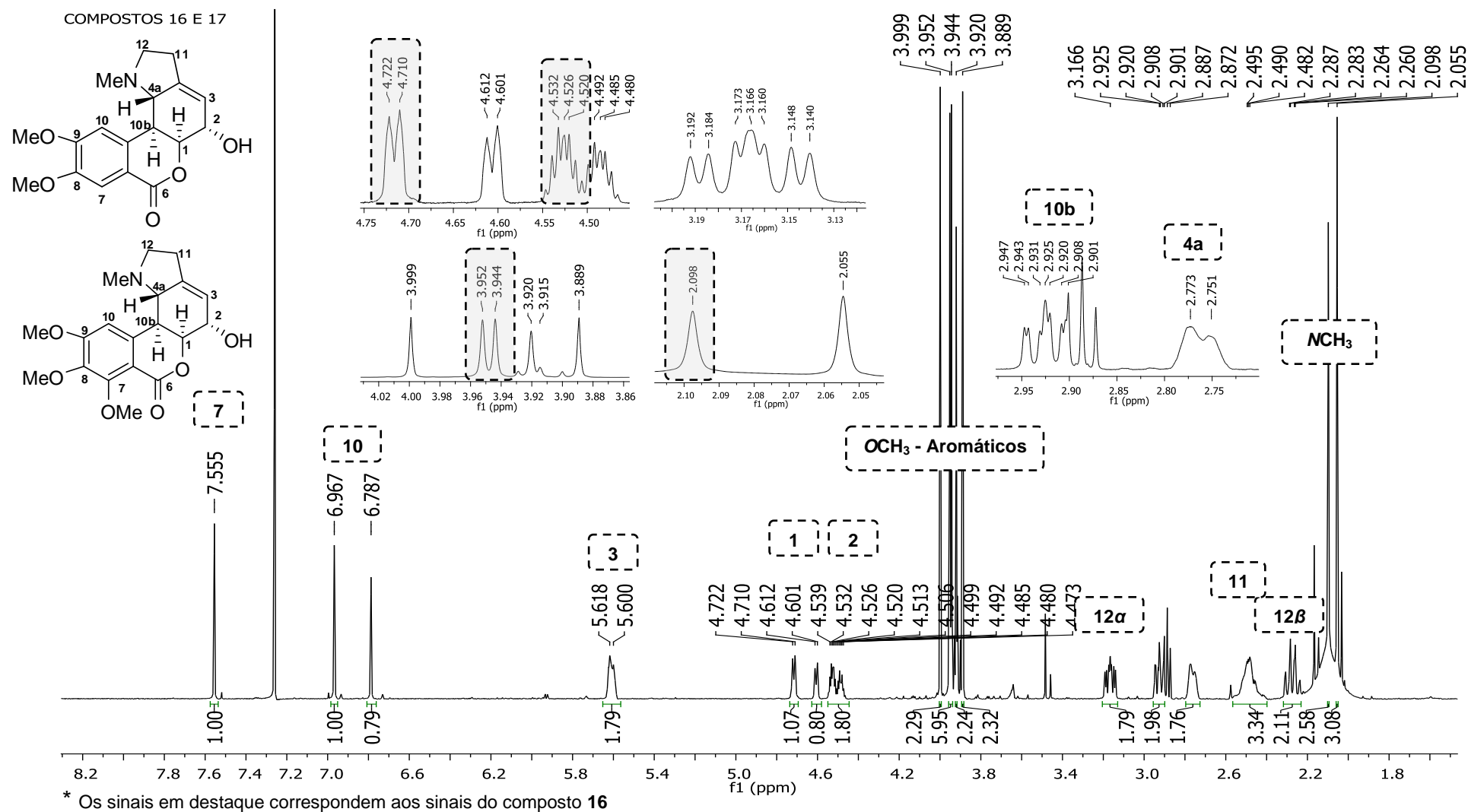


Figura 63: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos 16 e 17 e ampliações ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, 400 MHz)

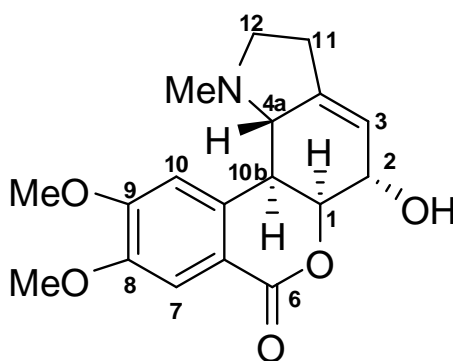
As informações extraídas do espectro dos compostos **16** e **17**, indicam que ambas as estruturas possuem esqueleto do tipo homolicorina da série das lactonas, devido a ausência de hidrogênios nas posições 6 de cada composto. Nota-se também, que os dois compostos possuem uma substituição na posição 2, uma vez que os hidrogênios desta posição estão consideravelmente desblindados se comparados aos hidrogênios, da mesma posição, do alcaloide homolicorina. Ademais, a ausência de metoxilas alifáticas no espectro sugere que o substituinte em ambas as estruturas seja um grupamento hidroxila.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  revela ainda, que o composto **16** possui duas substituições no anel aromático, localizadas tipicamente nas posições 8 e 9 em compostos do tipo homolicorina. Enquanto o composto **17** apresenta três grupos  $\text{OCH}_3$  aromáticos, posicionados habitualmente em 7, 8 e 9 no anel.

A comparação entre os deslocamentos químicos do espectro de hidrogênio do composto **16** e o alcaloide descrito por Jeffs e colaboradores em 1985 (tabela 26), permitiu propor que o composto **16** trata-se do alcaloide  $2\alpha$ -hidroxihomolicorina (figura 64).

**Tabela 26:** Comparação entre os  $\delta$  do composto **16** e  $2\alpha$ -hidroxihomolicorina (250 MHz)

Posição	Composto 16 ( $\delta$ em ppm, J em Hz)	$2\alpha$ -hidroxihomolicorina (JEFFS <i>et al.</i> , 1985)
<b>1</b>	4,72 br d (4,7)	4,63 br s
<b>2<math>\beta</math></b>	4,53m	4,40 br s
<b>3</b>	5,61 m	5,72 br s
<b>4a</b>	2,76 br d (9,0)	3,02 m
<b>7</b>	7,56 s	7,50 s
<b>10</b>	6,98 s	7,07 s
<b>10b</b>	2,93 m	3,32 m
<b>11 (2H)</b>	2,45- 2-53 m	2,50- 2-60 m
<b>12<math>\alpha</math></b>	3,17 ddd (10,5; 7,8; 3,2)	3,20 m
<b>12<math>\beta</math></b>	2,27 q (10,5)	2,30 m
<b>8-OCH<sub>3</sub></b>	3,95 s	3,96 s
<b>9-OCH<sub>3</sub></b>	3,94 s	3,92 s
<b>NMe</b>	2,10 s	2,09 s
<b>Solvente</b>	$\text{CDCl}_3$	$\text{CDCl}_3$

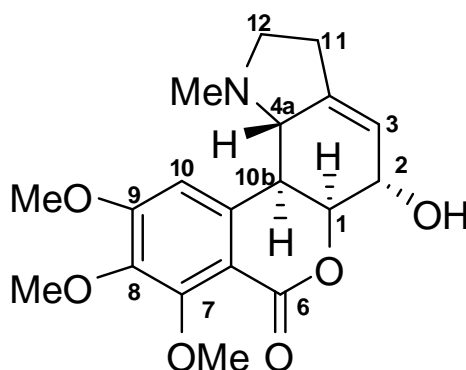


**Figura 64:** Estrutura química do alcaloide 2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina (**16**)

A comparação entre os deslocamentos químicos do espectro de hidrogênio do composto **17** e o alcaloide descrito por Shitara e colaboradores em 2014 (tabela 27), permitiu determinar o composto **17** como o alcaloide 2 $\alpha$ -hidroxialbomaculina (figura 65). Alguns sinais demonstraram uma pequena diferença no deslocamento químico, o que pode ter sido causado pela diferença de solventes utilizados na análise.

**Tabela 27:** Comparação entre os  $\delta$  do composto **17** e 2 $\alpha$ -hidroxialbomaculina (400 MHz)

Posição	Composto 17 ( $\delta$ em ppm, J em Hz)	2 $\alpha$ -hidroxialbomaculina (SHITARA <i>et al.</i> , 2014)
<b>1</b>	4,61 br d (4,7)	4,73 br s
<b>2<math>\beta</math></b>	4,49 m	4,60 m
<b>3</b>	5,61 m	5,85 br s
<b>4a</b>	2,76 br d (9,0)	3,93 m
<b>10</b>	6,79 s	7,12 s
<b>10b</b>	2,93 m	3,58 d
<b>11 (2H)</b>	2,45- 2-53 m	2,75 m
<b>12<math>\alpha</math></b>	3,17 ddd (10,5; 7,8; 3,2)	3,29 m
<b>12<math>\beta</math></b>	2,27 q (10,5)	3,88 m
<b>7-OCH<sub>3</sub></b>	3,92 s	3,93 s
<b>8-OCH<sub>3</sub></b>	3,89 s	3,84 s
<b>9-OCH<sub>3</sub></b>	4,00 s	3,98 s
<b>NMe</b>	2,06 s	2,72 s
<b>Solvente</b>	CDCl <sub>3</sub>	CD <sub>3</sub> OD



**Figura 65:** Estrutura química do alcaloide 2 $\alpha$ -hidroxialbomaculina (17)

Apesar de conhecido há décadas, existem poucos estudos biológicos concernentes ao alcaloide 2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina. Estudos recentes em busca de novos fármacos contra a malária, uma doença muito presente em países mais pobres, apontam que o alcaloide 2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina não possui efeito antimalárico significativo (CEDRÓN, *et al.*,2013).

O alcaloide 2 $\alpha$ -hidroxialbomaculina foi isolado pela primeira vez por Shitara e colaboradores em 2014, portanto, até o presente momento não existem dados de ensaios biológicos e aplicações para o composto.

#### 4.2.1.14 – Composto 18

O composto **18** foi identificado em apenas uma fração do extrato hexano das hastes florais de *H. canastrense* com um peso de 1,4 mg de um sólido branco. O composto foi solubilizado em clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) para análise de RMN <sup>1</sup>H (figura 66).

As principais características do espectro de RMN <sup>1</sup>H incluem: (a) dois hidrogênios singletos em 7,50 e 6,92 ppm, correspondente a um hidrogênio aromático; (b) dois dubletos integrando para dois hidrogênios em 6,07 ppm, atribuídos a um grupo OCH<sub>2</sub>O no anel aromático; (c) um singlete, integrando para 3 hidrogênios, referente a um grupo NCH<sub>3</sub> no anel aromático em 2,03 ppm;

Devido à ausência de sinais de hidrogênio na posição 6 do composto, admite-se que o mesmo pertence ao grupo de alcaloides com esqueleto do tipo homolicorina da série das lactonas. Ainda, uma rápida investigação de alcaloides com características semelhantes foi realizada, permitindo a suposição de que o composto **18** encaixa-se ao perfil do alcaloide masonina descrito por Kreh e colaboradores em 1995 (tabela 28).

A posição trans di-axial entre os hidrogênios das posições 4a e 10b foi confirmada através do cálculo da constante de acoplamento ( $J_{4a,10b} \sim 10$  Hz).

**Tabela 28:** Comparação entre os  $\delta$  do composto **18** e o alcaloide masonina (400 MHz)

Posição	Composto 18 ( $\delta$ em ppm, J em Hz)	Masonina (KREH e MATUSCH, 1995)
<b>1</b>	4,75 m	4,75 m
<b>2 (2H)</b>	2,59 m	2,60 m
<b>3</b>	5,49 br d (2,4)	5,50 br d (2,2)
<b>4a</b>	2,70 br d (10,0)	2,74 m
<b>7</b>	7,50 s	7,49 s
<b>10</b>	6,92 s	6,96 s
<b>10b</b>	2,62 br dd (10,0; 1,7)	2,74 m
<b>11 (2H)</b>	2,49 m	2,50 m
<b>12<math>\alpha</math></b>	3,13 ddd (9,6; 6,6; 3,7)	3,18 ddd (7,4; 6,3; 4,2)
<b>12<math>\beta</math></b>	2,23 q (9,6)	2,27 dd (18,7; 9,2)
<b>OCH<sub>2</sub>O</b>	6,07 2d (1,3)	6,07 2d
<b>NCH<sub>3</sub></b>	2,03 s	2,06 s
<b>Solvente</b>	CDCl <sub>3</sub>	CDCl <sub>3</sub>

De fato, os deslocamentos dos hidrogênios no espectro de RMN do composto **18** mostraram-se consideravelmente similares aos deslocamentos dos hidrogênios do alcaloide masonina, porém diante da baixa qualidade do espectro de hidrogênio, optou-se por realizar a análise de RMN bidimensional HSQC para confirmação da estrutura do composto (figura 67).

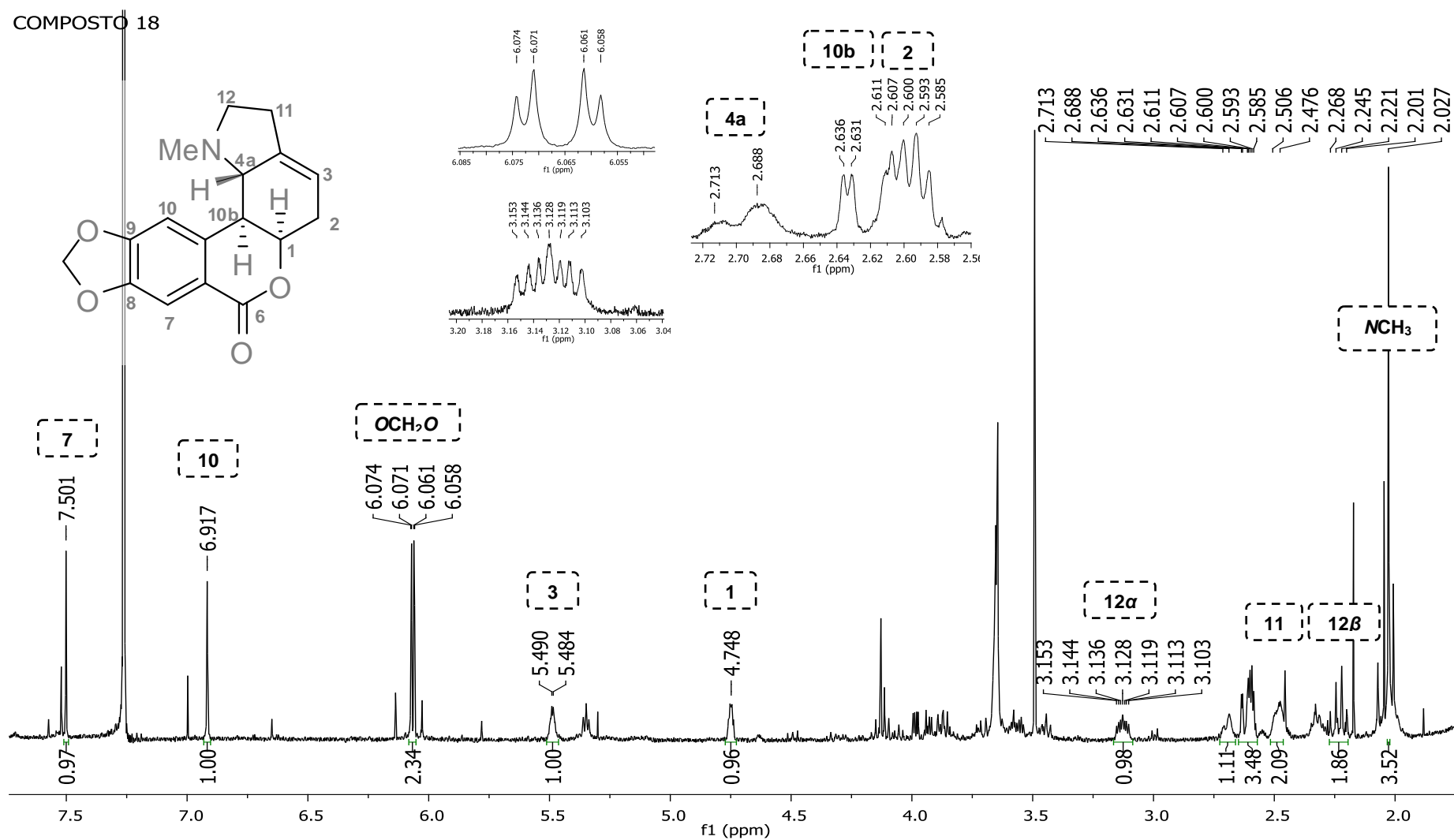
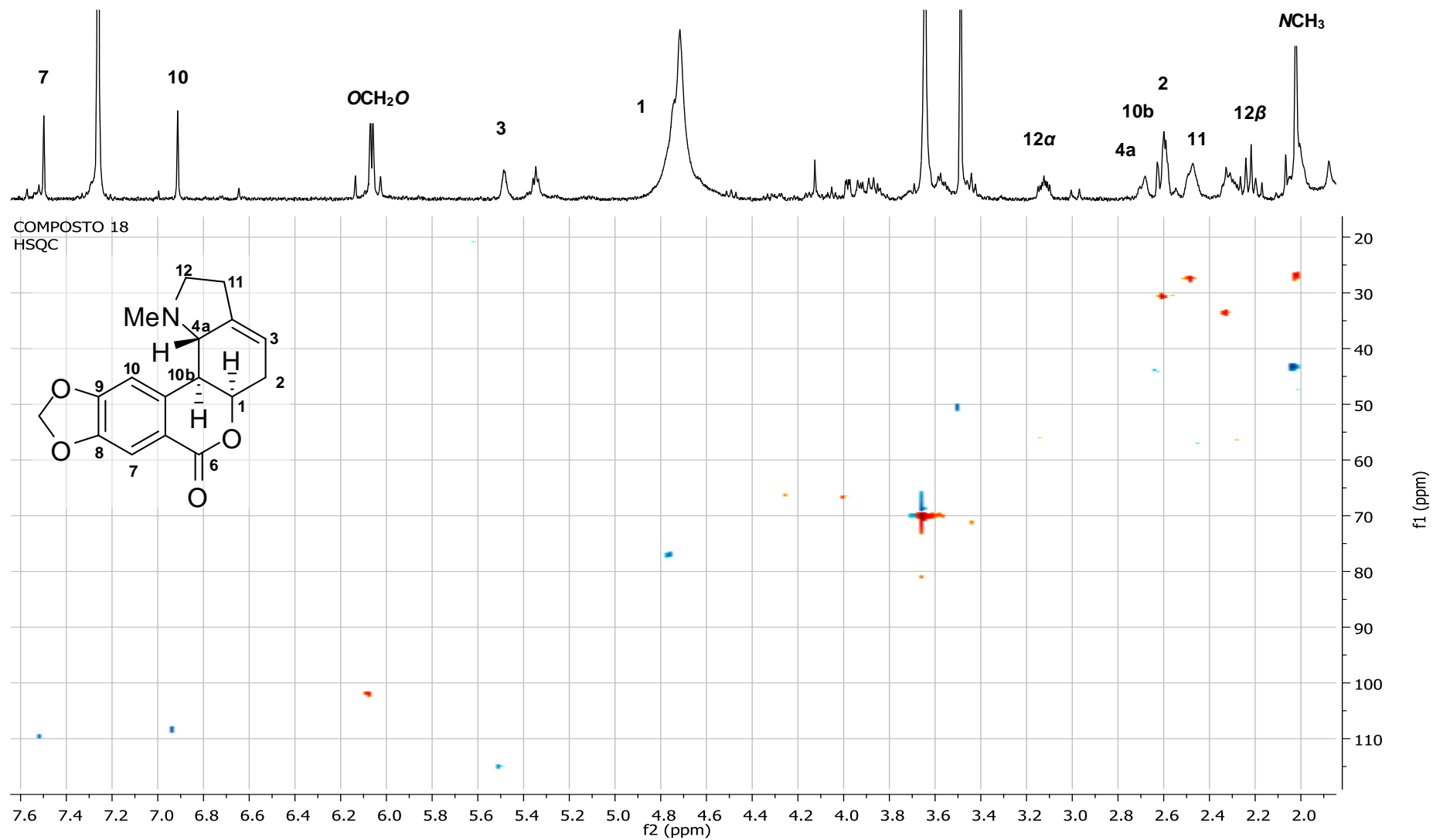


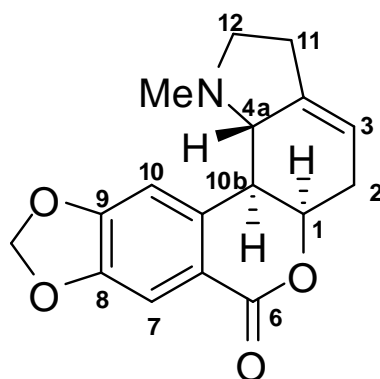
Figura 66: Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 18 e ampliações (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, 400 MHz)



As informações extraídas do mapa de contornos HSQC do composto 18, em comparação com os dados de  $^{13}\text{C}$  do alcaloide masonina (tabela 29), confirma a estrutura do composto (figura 68).

**Tabela 29:** Comparação entre os  $\delta$  de  $^{13}\text{C}$  do composto 18 e o alcaloide masonina (100 MHz)

Posição	Composto 18 ( $\delta$ em ppm)	Masonina (KREH e MATUSCH, 1995)
1	77,1	77,3
2	30,8	31,1
3	115,1	115,6
4a	66,3	66,8
7	109,7	109,7
10	108,4	108,6
10b	44,2	43,8
11	27,5	27,9
12	56,3	56,3
OCH <sub>2</sub> O	102,0	102,0
NCH <sub>3</sub>	43,4	43,5
Solvente	CDCl <sub>3</sub>	CDCl <sub>3</sub>



**Figura 68:** Estrutura química do alcaloide masonina (18)

A masonina foi isolada pela primeira vez em 1958 por Boit e Werner, entretanto, não existem muitos estudos biológicos associados ao composto. Gude e colaboradores (1988) relatam que a masonina atua como indutora de hipersensibilidade tardia em animais sendo, portanto, um dos compostos responsáveis pela irritação que ocorre na pele decorrentes do manuseio da planta *Narcissus pseudonarcissus*.

#### 4.2.1.15 – Composto 19

O fracionamento do extrato hexano das hastes florais de *Hippeastrum canastrense* levou a identificação do composto **19** em uma subfração com massa de 1,7 mg. O sólido branco foi solubilizado em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) para análise de RMN  $^1\text{H}$ , onde as principais características observadas incluem (figura 69): (a) dois singletos em 7,54 e 6,84 ppm, correspondente a dois hidrogênios aromáticos; (b) dois dubletos em 6,05 ppm, integrando para dois hidrogênios, atribuídos ao grupo  $\text{OCH}_2\text{O}$  no anel aromático; (c) um dubleto largo em 3,32 ppm integrando para um hidrogênio; (e) um quadrupeto em 2,88 ppm, integrando para um hidrogênio.

Devido à ausência de sinais de hidrogênio na posição 6 do composto, admite-se que o mesmo pertence ao grupo de alcaloides com esqueleto do tipo homolicorina da série das lactonas. A ausência do sinal do grupo  $\text{NCH}_3$  no espectro de hidrogênio do composto **19**, comum em compostos com esqueleto homolicorina, e também o deslocamento químico atípico dos hidrogênios 4a e 12 $\beta$ , norteou uma investigação de alcaloides com características semelhantes. Desta forma, a comparação entre os deslocamentos químicos dos hidrogênios do alcaloide normasonina, isolado pela primeira vez por Kreh e Matusch (1995) possibilitou confirmar que o composto **19** encaixa-se ao perfil deste alcaloide (tabela 30). Ainda, a posição trans di-axial entre os hidrogênios das posições 4a e 10b foi confirmada através do cálculo da constante de acoplamento ( $J_{4a,10b} \sim 10 \text{ Hz}$ ).

**Tabela 30:** Comparação entre os  $\delta$  do composto **19** e o alcaloide normasonina (400 MHz)

Posição	Composto 19 ( $\delta$ em ppm, J em Hz)	Normasonina (KREH e MATUSCH, 1995)
1	4,84 m	4,85 m
2 (2H)	2,63 m	2,62 m
3	5,52 m	5,64 m
4a	3,32 br d (10,0)	5,50 br d (9,3)
7	7,54 s	7,52 s
10	6,84 s	7,11 s
10b	2,55 dd (10,0; 2,5)	2,66 d (9,7)
11 (2H)	2,52 m	2,52 m
12 $\alpha$	3,13 ddd (11,2; 7,6; 3,8)	3,15 ddd (10,8; 6,8; 4,3)
12 $\beta$	2,88 q (8,5)	2,89 dd (18,6; 8,6)
$\text{OCH}_2\text{O}$	6,05 2d (1,0)	6,05 d (5,01)
Solvente	$\text{CDCl}_3$	$\text{CDCl}_3$

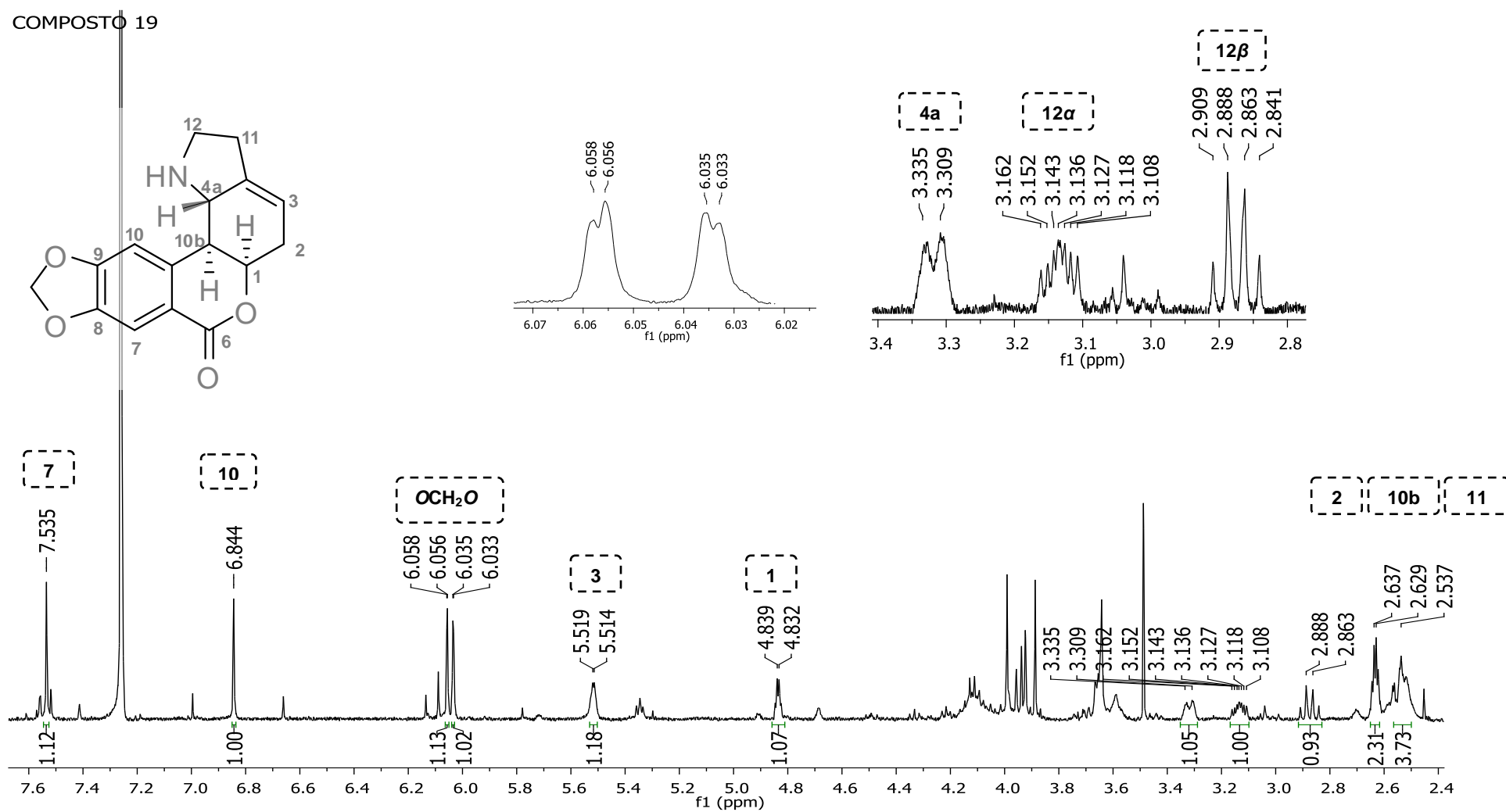
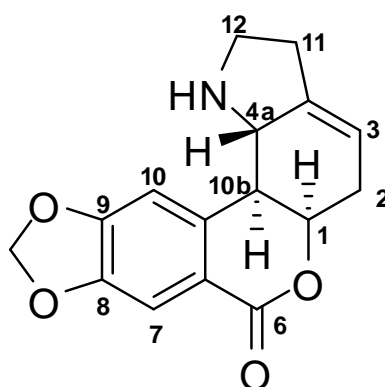


Figura 69: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 19 e ampliações ( $\text{CDCl}_3$ , 25  $^\circ\text{C}$ , 400 MHz)

Kreh e colaboradores relatam que a ocorrência de alcaloides derivados da homolicorina sem o grupo  $NCH_3$  são raros de serem encontrados, uma vez que a biossíntese destes, utilizam como precursores compostos *N*-metilados. Os autores acreditam que derivados *N*-desmetilados podem estar presentes em muitas espécies da família Amaryllidaceae, porém em quantidades ínfimas. De fato, uma pesquisa rápida na literatura revelou que, até o presente momento, o composto foi isolado somente por Kreh e Mastusch, onde 12 Kg de material vegetal fresco originou apenas 27 mg do composto. Portanto, não existem estudos de possíveis atividades biológicas concernentes a este produto isolado, e a figura 70 ilustra a estrutura química do alcaloide.



**Figura 70:** Estrutura química do alcaloide normasonina (19)

#### 4.2.1.16 – Composto 20

O composto **20** foi identificado em diferentes frações hexano dos bulbos de *Hippeastrum canastrense*, porém foi isolado somente de uma subfração com massa de 1,0 mg. O composto foi solubilizado em clorofórmio deuterado ( $CDCl_3$ ) para análise de RMN  $^1H$  (figura 71), onde as principais características dos sinais no espectro de RMN  $^1H$  incluem: (a) um hidrogênio singlete em 6,77 ppm, correspondente a um hidrogênio aromático; (b) um singlete em 6,14 ppm, integrando para um hidrogênio; (c) dois singletos em 3,99 integrando para 3 hidrogênios, e outros dois em 3,87 e 3,86 ppm, integrando para 6 hidrogênios, atribuído a três grupos  $OCH_3$  no anel aromático; (d) um singlete em 2,05 ppm referente ao grupo  $NCH_3$ , apresentando integração para 3 hidrogênios.

O singlete em 6,14 ppm identificado no espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **20**, é tipicamente detectado em estruturas do tipo homolicorina pertencentes à classe hemiacetal, sendo atribuído ao hidrogênio da posição 6 (JEFFS e HAWKSWORTH *et al.*, 1963). A ausência de metoxilas alifáticas sugere que o substituinte na posição 6 seja um grupo hidroxila. O espectro de hidrogênios do composto também revela três grupos  $\text{OCH}_3$  no anel aromático. Tipicamente, compostos do tipo homolicorina que possuem três grupos metoxilas aromáticas, apresentam essas substituições nas posições 7, 8 e 9 do anel.

Verificou-se uma semelhança considerável entre o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **20** com os deslocamentos teóricos do alcaloide nerinina descrito de forma completa por DE ANDRADE *et al.* em 2014 (tabela 31), e portanto, estabeleceu-se que o composto em questão trata-se do alcaloide nerinina (figura 72).

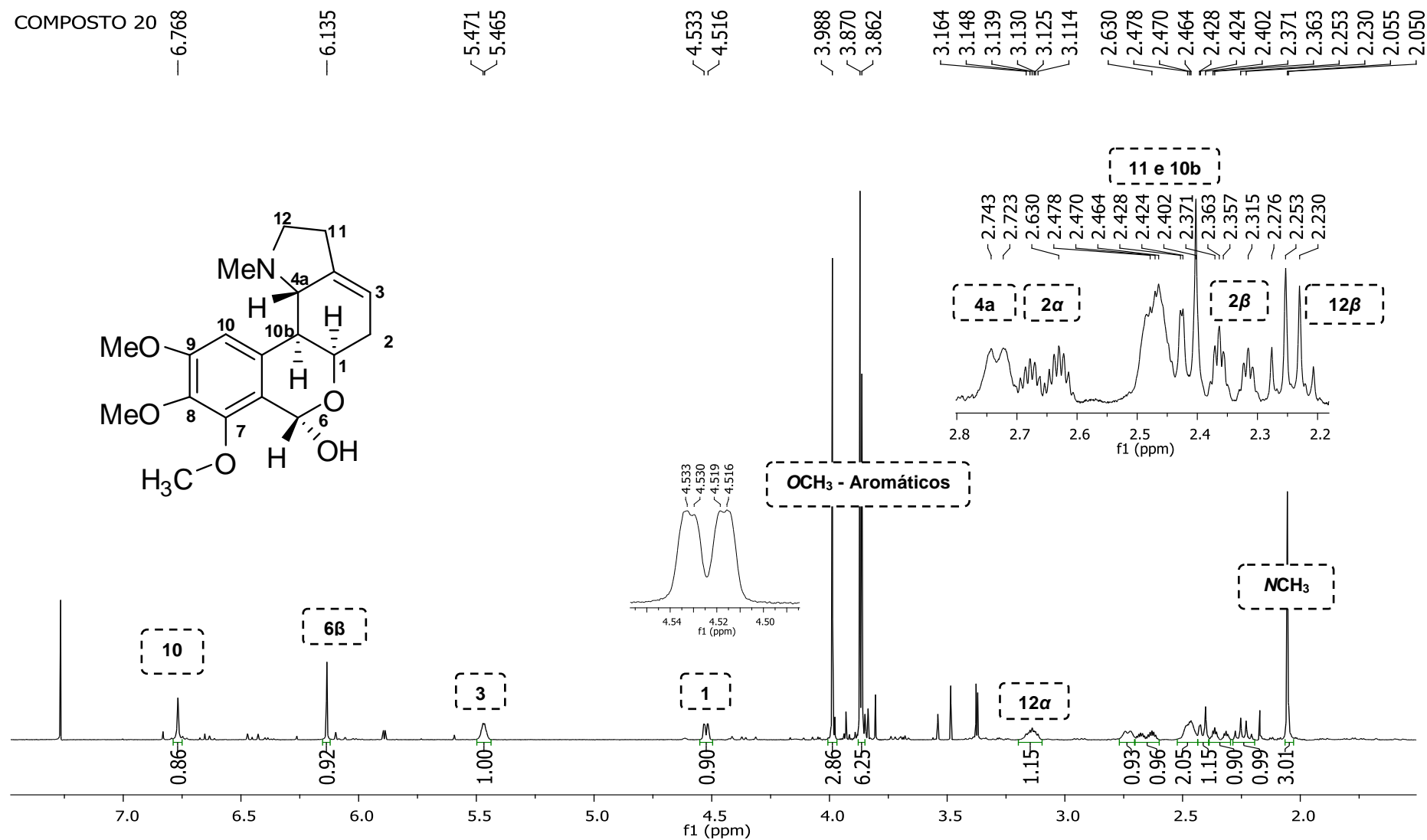
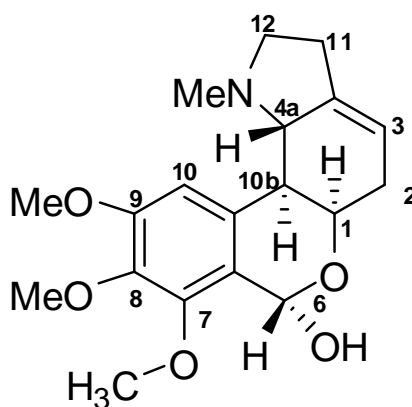


Figura 71: Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 20 e ampliações (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, 400 MHz)

**Tabela 31:** Comparação entre os  $\delta$  do composto **20** e nerinina (400 MHz)

Posição	Composto 20 ( $\delta$ em ppm, J em Hz)	Nerinina (DE ANDRADE <i>et al.</i> , 2014)
<b>1</b>	4,52br dd (5,6;1,2)	4,52 ddd (5,6;2,0;1,0)
<b>2<math>\alpha</math></b>	2,65 ddt (19,1; 6,6; 3,3)	2,65 ddt (19,2; 6,0; 2,8)
<b>2<math>\beta</math></b>	2,34 m	2,34 dt (19,2; 2,5)
<b>3</b>	5,47 m	5,47 m
<b>4a</b>	2,74 br d (10,0)	2,73 d (9,6)
<b>6<math>\beta</math></b>	6,14 s	6,14 s
<b>10</b>	6,77 s	6,77 s
<b>10b</b>	2,42 br d (10,3)	2,41 dd (9,6; 1,5)
<b>11 (2H)</b>	2,43- 2,48 m	2,44- 2-51 m
<b>12<math>\alpha</math></b>	3,14 m	3,14 m
<b>12<math>\beta</math></b>	2,24 q (9,2)	2,24 q (9,2)
<b>7-OCH<sub>3</sub></b>	3,99 s	3,99 s
<b>8-OCH<sub>3</sub></b>	3,87 s	3,87 s
<b>9-OCH<sub>3</sub></b>	3,86 s	3,86 s
<b>NMe</b>	2,05 s	2,06 s
<b>Solvente</b>	CDCl <sub>3</sub>	CDCl <sub>3</sub>

**Figura 72:** Estrutura química do alcaloide nerinina (**20**)

Não foram encontradas informações concernentes à possíveis atividades biológicas do alcaloide nerinina.

## 4.2.2 – Compostos com esqueleto do tipo licorina

### 4.2.2.1 – Composto 10

O composto **10** foi obtido do fracionamento dos extratos acetato de etila das hastes florais e bulbos da espécie *Hippeastrum canastrense*. Foram isolados cerca de 190 mg do composto, que se apresentou como um sólido branco amorfo. Para análise de RMN  $^1\text{H}$ , foram solubilizados 5 mg do composto em metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), onde o espectro de RMN  $^1\text{H}$  apresentou como principais características (figura 73): (a) dois singletos relativos a hidrogênios aromáticos *p*-orientados em 6,88 e 6,64 ppm; (b) um sinal em 5,91 ppm integrando para dois hidrogênios, referente a um grupo  $\text{OCH}_2\text{O}$  no anel aromático; (c) um sinal na região de hidrogênios olefínicos em 5,54 ppm; (d) dois dubletos em sistema *a,b* em 4,11 e 3,54 ppm, integrando para um hidrogênio cada, atribuídos aos hidrogênios da posição 6.

A apresentação do espectro de hidrogênio do composto **10** sugere que este, possui esqueleto do tipo licorina, uma vez que os compostos desse tipo englobam características muito peculiares tais como: ausência de grupo  $\text{NCH}_3$ , sinais dubletos em sistema *a,b* com constante de acoplamento de grande magnitude ( $J = 14,0$  Hz), presença de apenas um hidrogênio olefínico e ainda hidrogênios aromáticos *p*-orientados. Ainda, os hidrogênios H-1 e H-2 encontram-se desblindados, evidenciando que os carbonos das posições 1 e 2 possuem ligação com átomos eletronegativos, e na ausência de metoxilas, atribuí-se grupos hidroxilas a estas posições.

Os hidrogênios  $\beta$  orientados das posições 6 e 12, encontram-se mais desblindados que os seus homólogos  $\alpha$ , e segundo Bastida e colaboradores (2006), isto ocorre devido à relação *cis* com o par de elétrons livre do átomo de nitrogênio na estrutura. Ainda, a grande constante de acoplamento observada entre os hidrogênios 4a e 10b ( $J = 10,8$  Hz), é indicativa de acoplamento *trans*-diaxial, confirmando a junção *trans* dos anéis B e C dos esqueletos desse tipo.

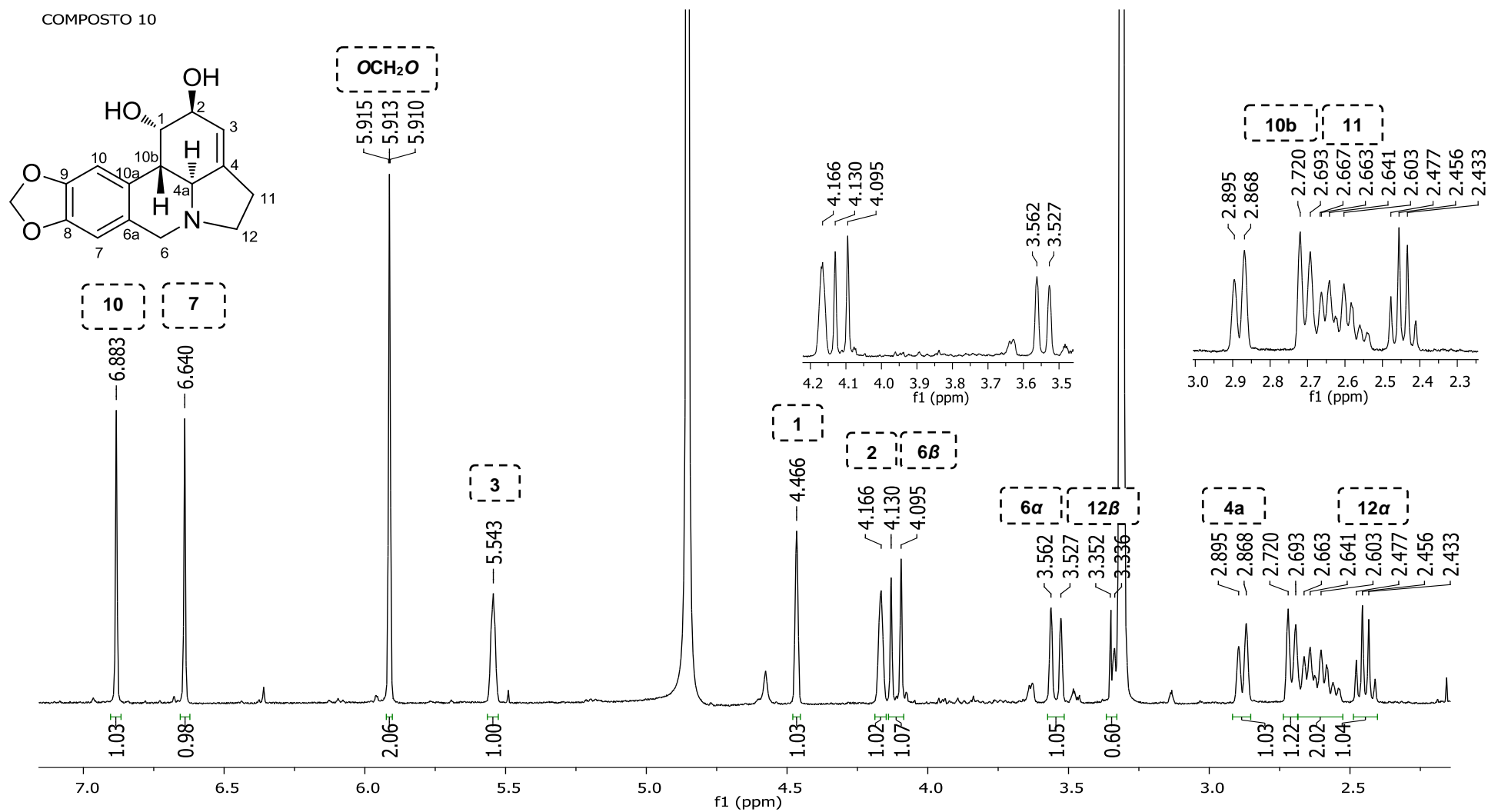
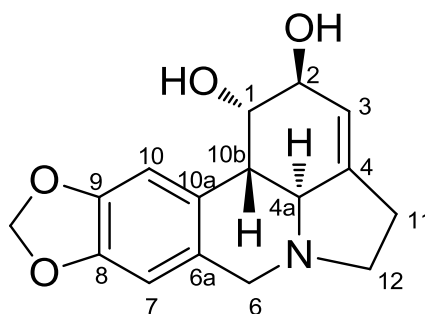


Figura 73: Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 10 e ampliações (CD<sub>3</sub>OD, 25 °C, 400 MHz)

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios do composto **10** foram comparados com dados da literatura (tabela 32), de tal maneira que foi proposto que o composto isolado trata-se do alcaloide licorina (figura 74).

**Tabela 32:** Comparação entre os  $\delta$  do composto **10** e licorina (300 MHz)

Posição	Composto 10 ( $\delta$ em ppm, J em Hz)	Licorina (LIKHITWITAYAWUID <i>et al.</i> , 1993)
1	4,46 br s	4,27 br s
2 (2H)	4,17 br s	3,97 br s
3	5,54 br s	5,37 br s
4a	2,88 d (10,8)	2,60 d (10,6)
6 $\alpha$	3,54 d (14,0)	3,32 d (14,4)
6 $\beta$	4,11 (14,1)	4,02 d (14,4)
7	6,64 s	6,68 s
10	6,88 s	6,81 s
10b	2,71 d (10,8)	2,50 m
11 (2H)	2,53-2,67 m	2,44 m
12 $\alpha$	2,44 q (8,9)	2,19 ddd (14,4; 8,6; 1,5)
12 $\beta$	3,34 m	3,19 dd (14,4; 7,5)
OCH <sub>2</sub> O	5,91 br s	5,95 s
Solvente	CD <sub>3</sub> OD	DMSO-d <sub>6</sub>



**Figura 74:** Estrutura química do alcaloide licorina (**10**)

A licorina (**10**) foi o primeiro alcaloide de Amaryllidaceae isolado e é o mais abundante, presente em praticamente todas as espécies da família. Existem inúmeros estudos a respeito das atividades biológicas que este apresenta (MCNULTY *et al.*, 2009), entre elas: atividade antiviral contra vírus da gripe (HE, QI, TIAN *et al.*, 2012), antifúngica contra *Candida albicans* (EVIDENTE, ANDOLFI, ABOU-DONIA *et al.*, 2004), antimalárica (SENER, ORHAN e SATAYAVIVAD, 2003)

e anticâncer (LUO *et al.*, 2012). Além dessas atividades, licorina também é usada em semissíntese como precursor de alcaloides com atividades contra *Trypanosoma brucei brucei* e *Plasmodium falciparum* (TORIIZUKA *et al.*, 2008; CÉDRON, *et al.*, 2010), e *Trichomonas vaginalis* (GIORDANI *et al.*, 2012).

#### 4.2.2.2 – Composto 14

O composto **14** foi obtido do fracionamento do extrato acetato de etila das hastes florais *Hippeastrum canastrense*. Foram isolados 1,5 mg do composto, que se apresentou como um sólido branco, que foi solubilizado em metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD) para análise de RMN <sup>1</sup>H (figura 75).

As principais características do espectro de RMN <sup>1</sup>H incluem: (a) dois singletos relativos a hidrogênios aromáticos *para* orientados em 6,95 e 6,59 ppm; (b) um sinal na região de hidrogênios olefínicos em 5,43 ppm; (c) dois dubletos em sistema *a,b* em 4,07 e 3,52 ppm, integrando para um hidrogênio cada, atribuídos aos hidrogênios da posição 6; (d) um singleto em 3,87 ppm, integrando para 3 hidrogênios e atribuído ao grupo OCH<sub>3</sub> no anel aromático.

O espectro de hidrogênio do composto **14** sugere que possui esqueleto do tipo licorina, uma vez que englobam características típicas de esqueletos desse tipo, tais como: ausência de grupo NCH<sub>3</sub>, sinais dubletos em sistema *a,b* com constante de acoplamento de grande magnitude ( $J = 14,0$  Hz), presença de apenas um hidrogênio olefínico e ainda hidrogênios aromáticos *para* orientados.

Diferentemente do alcaloide licorina, o espectro de **14** não apresenta o grupo OCH<sub>2</sub>O no anel aromático, e a presença de apenas uma metoxila aromática na estrutura, leva à possibilidade de dois isômeros de posição (figura 76). Pode-se destacar também que há apenas um substituinte no anel C do composto, uma vez que somente um hidrogênio da região encontra-se mais desblindado, enquanto outros dois hidrogênios aparecem na região mais blindada do espectro.

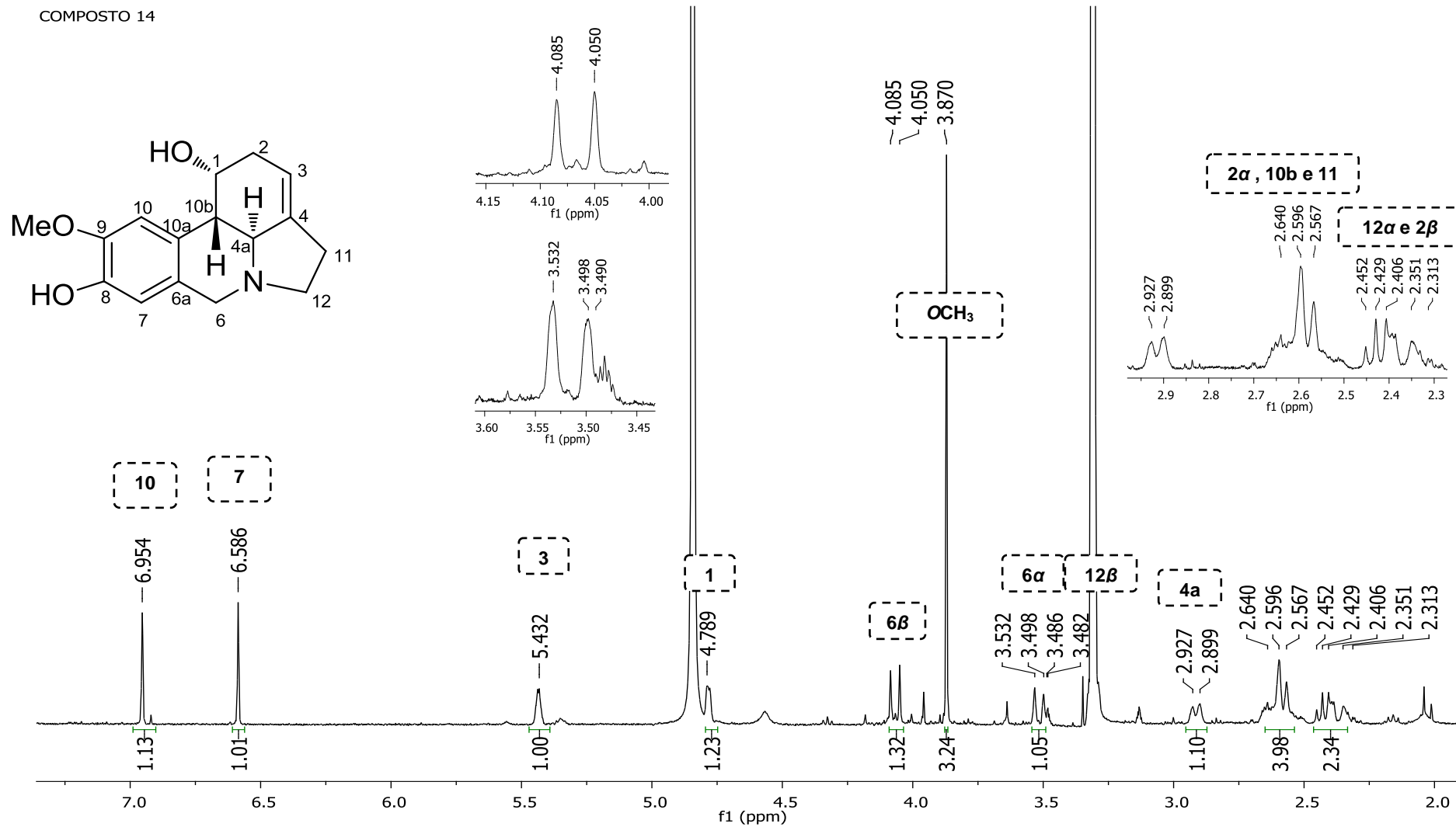
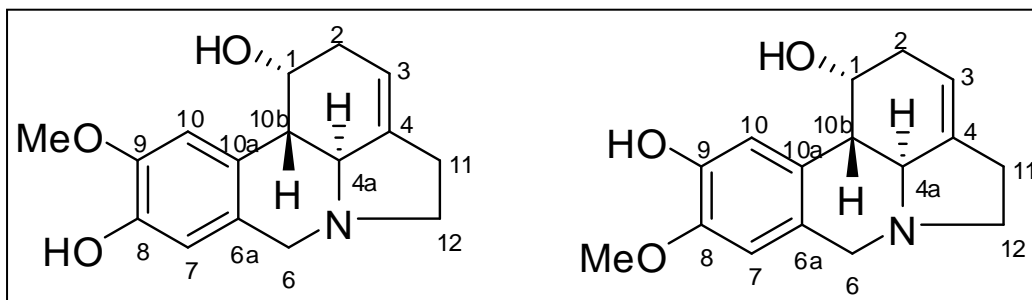


Figura 75: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 14 e ampliações (CD<sub>3</sub>OD, 25 °C, 400 MHz)



**Figura 76:** Estrutura química dos isômeros de posição 8- e 9-O-desmetilpluviina, respectivamente

Tipicamente, os hidrogênios  $\beta$  orientados das posições 6 e 12, encontram-se mais desblindados que os seus homólogos  $\alpha$ , e segundo Bastida e colaboradores (2006), isto ocorre devido à relação *cis* com o par de elétrons livre do átomo de nitrogênio na estrutura. Ainda, a constante de acoplamento calculada entre os hidrogênios 4a e 10b ( $J \sim 11$  Hz) confirma a relação *trans*-diaxial entre eles.

No intuito de confirmar a posição da metoxila aromática, foi realizada análise de RMN NOESY (figura 77), no qual o espectro demonstrou correlação entre o hidrogênio da posição 10 e os hidrogênios da metoxila aromática, indicando que na a metoxila encontra-se na posição nove. Ao comparar os deslocamentos químicos exibidos no espectro de **14** com o alcaloide 8-O-desmetilpluviina (tabela 33), constatou-se que o composto se trata do alcaloide norpluviina (8-O-desmetilpluviina) e a figura 78 ilustra sua estrutura química.

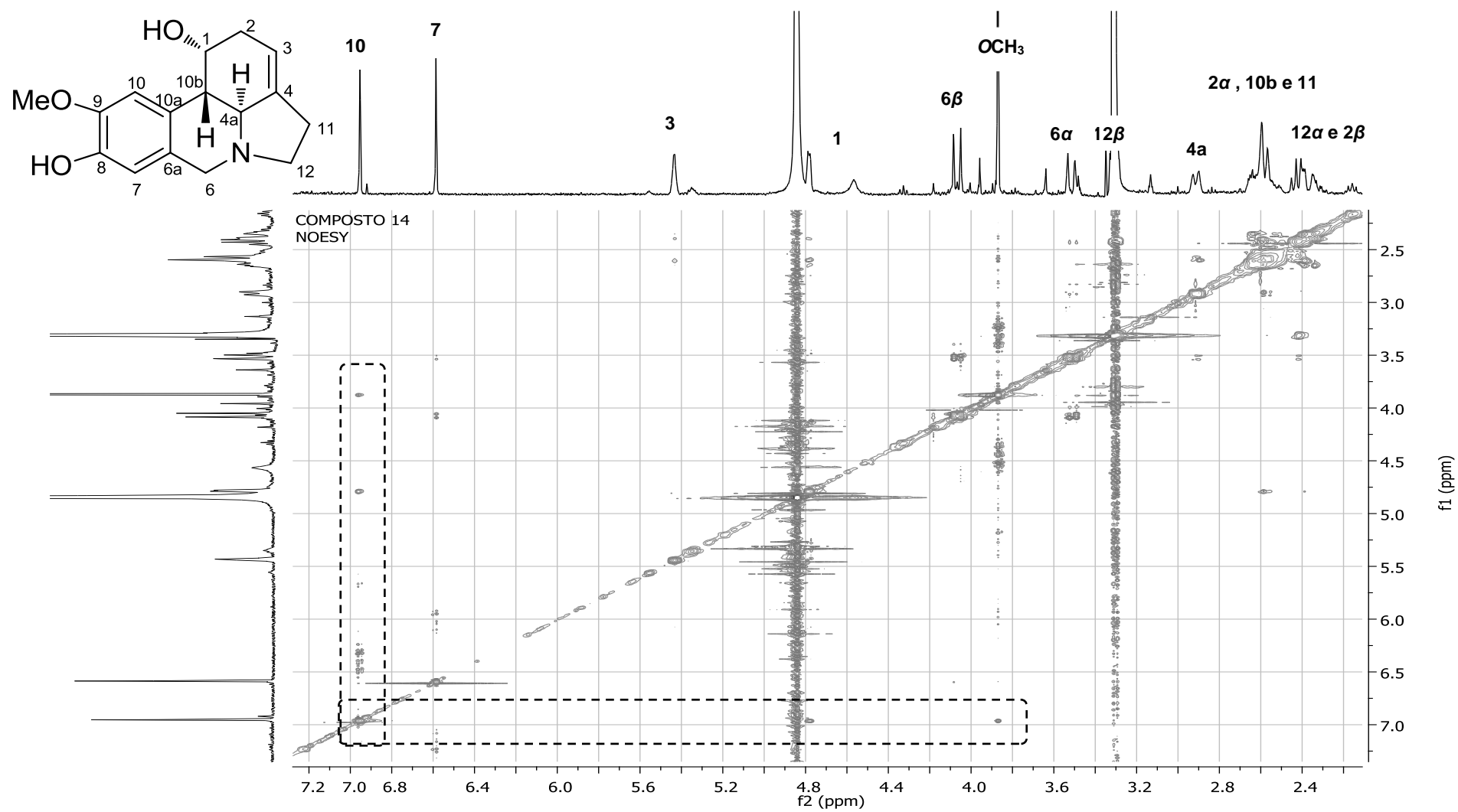
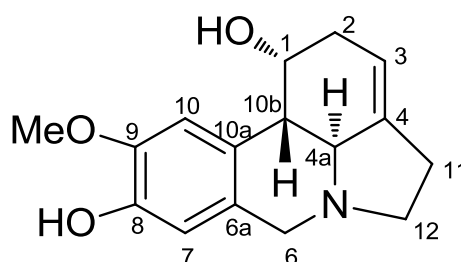


Figura 77: Espectro de NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  do composto 14 (CD<sub>3</sub>OD, 25 °C, 400 MHz)

**Tabela 33:** Comparação entre os  $\delta$  do composto **14** e norpluviina (400 MHz)

Posição	Composto 14 ( $\delta$ em ppm, J em Hz)	Norpluviina (LAMORAL-THEYS <i>et al.</i> , 2009)
<b>1</b>	4,78 m	4,26 dd (5,9; 1,0)
<b>2<math>\alpha</math></b>	2,51-2,66 m	2,62 m
<b>2<math>\beta</math></b>	2,31-2,45 m	2,33 m
<b>3</b>	5,43 br d (2,4)	5,39 d (2,2)
<b>4a</b>	2,91 d (11,1)	2,76 d (9,9)
<b>6<math>\alpha</math></b>	3,52 d (14,0)	3,50 d (14,5)
<b>6<math>\beta</math></b>	4,07 (14,0)	4,13 d (14,5)
<b>7</b>	6,59 s	6,64 s
<b>10</b>	6,95 s	6,74 s
<b>10b</b>	2,58 d (11,6)	2,66 d (9,9)
<b>11 (2H)</b>	2,51-2,66 m	2,59 m
<b>12<math>\alpha</math></b>	2,31-2,45 m	2,37 m
<b>12<math>\beta</math></b>	3,34 m	3,34 m
<b>Solvente</b>	CD <sub>3</sub> OD	CDCl <sub>3</sub>

**Figura 78:** Estrutura química do alcaloide norpluviina (**14**)

### 4.2.3 – Compostos com esqueleto do tipo galantamina

#### 4.2.3.1 – Composto 1

O composto **1** foi obtido do fracionamento dos extratos acetato de etila das hastes florais e bulbos da espécie *Hippeastrum canastrense*. Foram isolados 2,6 mg do composto, que se apresentou como um sólido branco amorfo, que foi solubilizado em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) para análise de RMN  $^1\text{H}$  (figura 79).

As principais características do espectro de RMN  $^1\text{H}$  incluem: (a) dois dubletos relativos a hidrogênios aromáticos *o*-orientados ( $J = 8,0$  Hz) em 6,66 e 6,56 ppm; (b) na reação de hidrogênios olefínicos foram observados um dubleto em 6,07 ppm, e um duplo dubleto em 6,01 ppm, ambos integrando para um hidrogênio; (c) dois dubletos em 4,09 e 3,68 ppm ( $J \sim 14,5$  Hz) referentes aos hidrogênios da posição 6; (d) um sinal em 2,40 ppm integrando para 3 hidrogênios, atribuídos a um grupo  $\text{NCH}_3$ .

A apresentação do espectro de hidrogênio do composto **1** sugere que este, possui esqueleto do tipo galantamina, uma vez que os compostos desse tipo englobam características muito peculiares tais como: duas olefinas, hidrogênios aromáticos *orto* orientados, e a presença de grupo  $\text{NCH}_3$ .

Destacam-se dois sinais de hidrogênios bastante desblindados em 4,62 e 4,17 ppm, indicando que os carbonos dessas posições estão ligados à átomos eletronegativos, atribuindo portando, os hidrogênios das posições 1 e 3, e ainda, a ausência de metoxilas aromáticas na estrutura indicam que as substituições alifáticas e aromáticas sejam grupos hidroxilas.

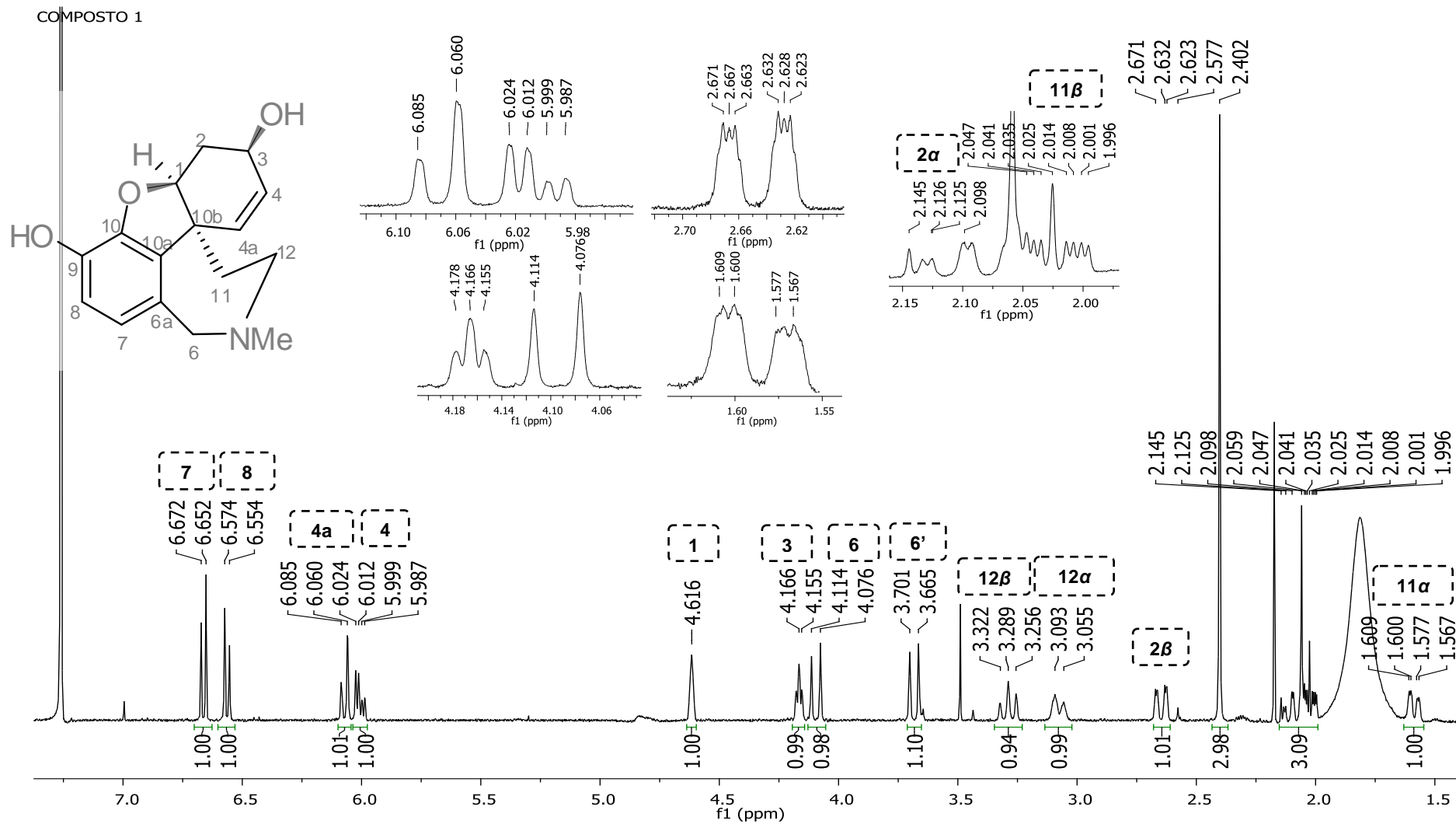


Figura 79: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 1 e ampliações (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, 400 MHz)



## 4.2.4 – Compostos com esqueleto do tipo narciclasina

### 4.2.4.1 – Composto 21

O fracionamento do extrato acetato de etila dos bulbos de *Hippeastrum canastrense* levou ao isolamento de 1,0 mg do composto **21**, que foi solubilizado em  $\text{CDCl}_3$  para análise de RMN  $^1\text{H}$  (figura 81). As principais características encontradas no espectro incluem: (a) um singlete em 9,10 ppm atribuído ao hidrogênio da posição 6 devido a proximidade com o átomo de nitrogênio; (b) dois singletos em 7,35 e 7,93 ppm integrando para um hidrogênio cada, atribuídos a dois hidrogênios aromáticos *para* orientados; (c) um singlete integrando para dois hidrogênios em 6,18 ppm referente ao grupo  $\text{OCH}_2\text{O}$  no anel aromático;

O espectro do composto **21** apresentou-se muito distinto, uma vez que todos os seus sinais aparecem com deslocamentos na região mais desblindada do espectro. Diante deste fato, foi realizada uma investigação de alcaloides com características semelhantes, constatando que o composto exibe uma grande similaridade com um alcaloide descrito por Suau e colaboradores em 1990. Após comparar os deslocamentos químicos do espectro de **21** com a literatura (tabela 35), verificou-se que o composto em questão se trata do alcaloide trisfaeridina (figura 82).

**Tabela 35:** Comparação entre os  $\delta$  do composto **21** e trisfaeridina (200 MHz)

Posição	Composto 21 ( $\delta$ em ppm, J em Hz)	Trisfaeridina (SUAU <i>et al.</i> , 1990)
1	8,39 dd (8,1; 1,5)	8,36 dddd (8,0; 1,8; 1,0; 1,0)
2	7,63 ddd (8,4; 7,0; 1,5)	7,61 ddd (8,0; 7,0; 1,7)
3	7,69 ddd (8,2; 7,0; 1,5)	7,67 ddd (7,0; 7,0; 1,8)
4	8,15 dd (8,0; 1,5)	8,11 ddd (7,0; 1,7; 1,0)
6	9,10 s	9,06 s
7	7,35 s	7,32 s
10	7,93 s	7,89 s
$\text{OCH}_2\text{O}$	6,18 s	6,15 s
Solvente	$\text{CDCl}_3$	$\text{CDCl}_3$

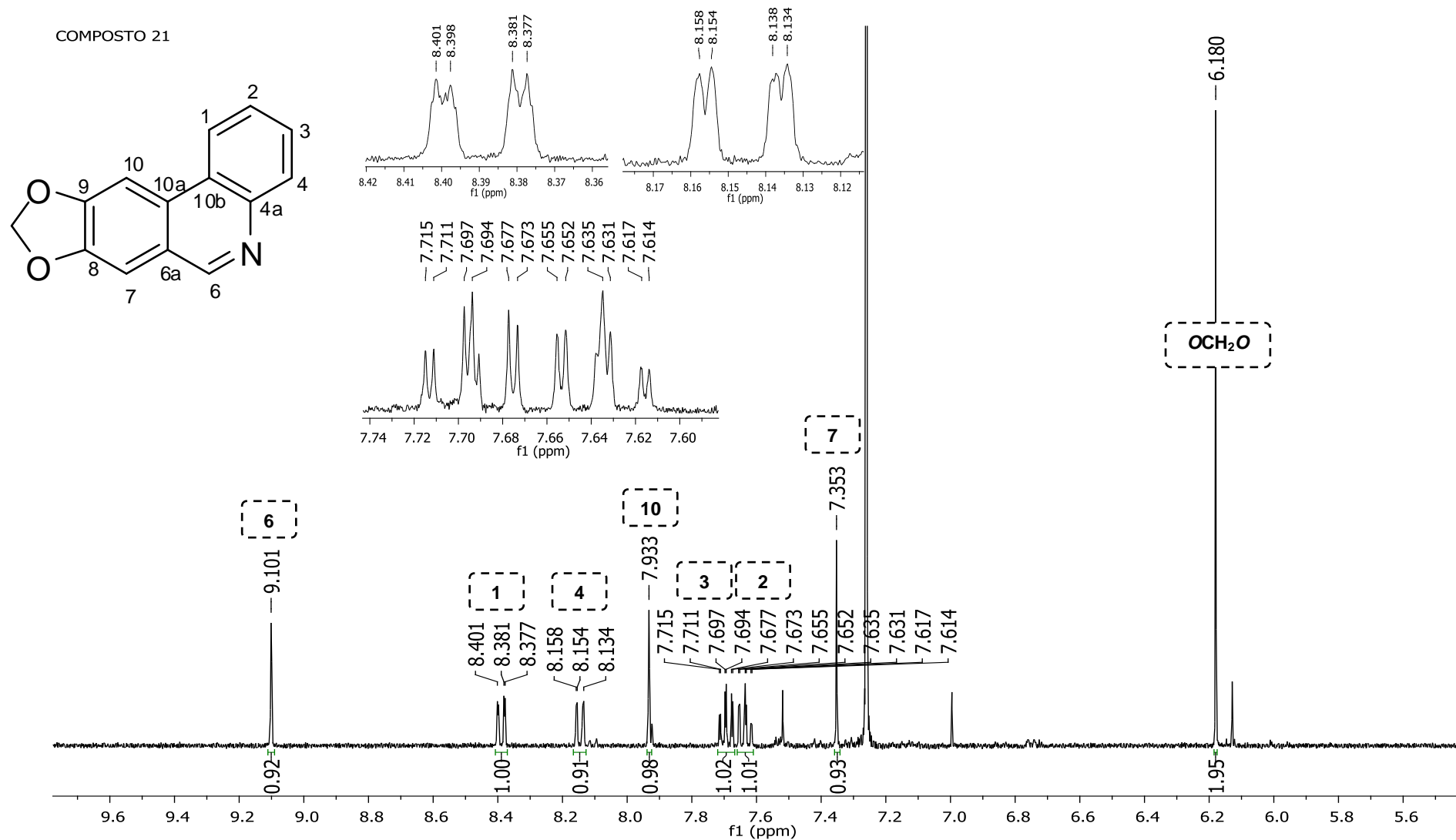
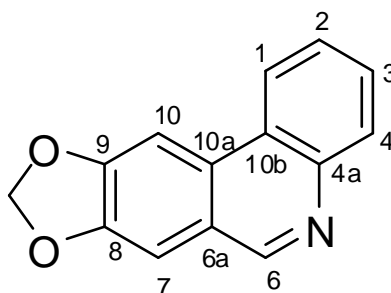


Figura 81: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 21 e ampliações ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, 400 MHz)



**Figura 82:** Estrutura química do alcaloide trisfaeridina (**21**)

Estudos evidenciam que a trisfaeridina (**21**) apresenta atividade antirretroviral, porém com baixa seletividade e baixo índice terapêutico (SZLÁVIK *et al.*, 2004). Em estudo realizado por Zupkó e colaboradores (2009) o alcaloide demonstrou moderada atividade antitumoral frente a linhagem de células de linfoma. O alcaloide já foi sintetizado com bons rendimentos (cerca de 70%) (BANWELL *et al.*, 2004; PORTELA-CUBILLO *et al.*, 2008), apresentando, uma boa alternativa para a obtenção do composto.

#### 4.3 – Avaliação da atividade citotóxica dos extratos e alcaloides isolados

Os extratos brutos das hastes florais (H) e bulbos (B), bem como os extratos enriquecidos em alcaloides acetato de etila e hexano de ambas as partes de *Hippeastrum canastrense* (HA, HH, BA e BH) e ainda, os alcaloides sanguinina (**1**), 7-metoximasonina (**3**), hipeastrina (**4**), candimina (**5**), 2-O-metilcandimina (**6**), 7-metoxi-O-metillicorina (**7**), albomaculina (**8**), licorina (**10**), 7-metoxinormasonina (**11**), 2 $\alpha$ -metoxihomolicorina (**12**), 8-O-desmetilhomolicorina (**13**), 2 $\alpha$ ,7-diMetoxihomolicorina (**15**), masonina (**18**), normasonina (**19**) e nerinina (**20**) isolados neste trabalho foram submetidos a ensaios biológicos para analisar a citotoxicidade em células normais de fibroblastos da linhagem L929 e células tumorais das linhagens de carcinoma hepatocelular Hep G-2, adenocarcinoma em glândulas mamárias MCF-7 e carcinoma pancreático humano MIAPaCa-2 e os valores de IC<sub>50</sub> calculados estão apresentados na tabela 36.

**Tabela 36:** Resultados de IC<sub>50</sub> dos ensaios biológicos realizados nos extratos e em compostos isolados de *Hippeastrum canastrense*

Extrato/Alcaloide	Fibroblastos	Carcinoma	Adenocarcinoma	Carcinoma
	L929	Hepatocelular	em glândulas mamárias	pancreático humano
	(IC <sub>50</sub> )	Hep G-2 (IC <sub>50</sub> )	MCF-7 (IC <sub>50</sub> )	MIAPaCa-2 (IC <sub>50</sub> )
Extrato bruto hastes (H)	120,80 µg.mL <sup>-1</sup>	20,55 µg.mL <sup>-1</sup>	51,28 µg.mL <sup>-1</sup>	22,50 µg.mL <sup>-1</sup>
Extrato acetato de etila das hastes (HA)	18,00 µg.mL <sup>-1</sup>	6,05 µg.mL <sup>-1</sup>	17,24 µg.mL <sup>-1</sup>	9,10 µg.mL <sup>-1</sup>
Extrato hexano das hastes (HH)	286,80 µg.mL <sup>-1</sup>	74,33 µg.mL <sup>-1</sup>	117,20 µg.mL <sup>-1</sup>	90,70 µg.mL <sup>-1</sup>
Extrato bruto dos bulbos (B)	122,50 µg.mL <sup>-1</sup>	16,94 µg.mL <sup>-1</sup>	25,96 µg.mL <sup>-1</sup>	23,40 µg.mL <sup>-1</sup>
Extrato acetato de etila dos bulbos (BA)	139,90 µg.mL <sup>-1</sup>	11,90 µg.mL <sup>-1</sup>	3,20 µg.mL <sup>-1</sup>	8,00 µg.mL <sup>-1</sup>
Extrato hexano dos bulbos (BH)	123,70 µg.mL <sup>-1</sup>	11,61 µg.mL <sup>-1</sup>	24,99 µg.mL <sup>-1</sup>	24,10 µg.mL <sup>-1</sup>
Sanguinina (1)	>200 µM	>100 µM	>100 µM	>100 µM
7-metoximasonina (3)	>200 µM	>100 µM	>100 µM	>100 µM
Hipeastrina (4)	54,40 µM	48,05 µM	84,45 µM	46,50 µM
Candimina (5)	35,50 µM	17,20 µM	26,21 µM	16,90 µM
2-O-metilcandimina (6)	>200 µM	>100 µM	>100 µM	>100 µM
7-metoxi-O-metillicorenina (7)	>200 µM	>100 µM	>100 µM	>100 µM
Albomaculina (8)	>200 µM	>100 µM	>100 µM	>100 µM
Licorina (10)	109,00 µM	44,39 µM	67,91 µM	52,30 µM
7-metoxinormasonina (11)	>200 µM	>100 µM	>100 µM	>100 µM
2-O-metilhomolicorina (12)	>200 µM	>100 µM	>100 µM	>100 µM
8-O-desmetilhomolicorina (13)	>200 µM	>100 µM	>100 µM	>100 µM
2α-7-dimetoxihomolicorina (15)	>200 µM	>100 µM	>100 µM	>100 µM
Masonina (18)	>200 µM	>100 µM	>100 µM	>100 µM
Normasonina (19)	>200 µM	>100 µM	>100 µM	>100 µM
Nerinina (20)	>200 µM	>100 µM	>100 µM	>100 µM
Etoposídeo (Controle positivo)	179,70 µM	5,30 µM	62,64 µM	16,90 µM
	105,77 µg.mL <sup>-1</sup>	1,90 µg.mL <sup>-1</sup>	29,43 µg.mL <sup>-1</sup>	6,90 µg.mL <sup>-1</sup>

Os extratos brutos das hastes florais (**H**) e bulbos (**B**) de *Hippeastrum canastrense*, apresentaram efeito de citotoxicidade próximos ao do controle positivo em células normais de fibroblastos, entretanto, expressaram maior IC<sub>50</sub> em células tumorais, exceto para células de adenocarcinoma em glândulas mamárias, no qual o extrato **B** foi mais citotóxico que o controle positivo. Ambos os extratos foram mais citotóxicos em células de carcinoma hepatocelular (20,6 µg.mL<sup>-1</sup> e 16,9 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente).

O extrato acetato de etila das hastes florais (**HA**) expressou uma toxicidade importante para todas as linhagens de células ensaiadas, porém pequena seletividade entre as células normais e tumorais. Os extratos enriquecidos em alcaloides dos bulbos (**BH** e **BA**), evidenciaram uma seletividade superior aos extratos das hastes florais, inclusive maiores que a do controle positivo, especialmente em células de câncer de mama. O extrato **BA** apresentou menor valor de IC<sub>50</sub> em células de adenocarcinoma em glândulas mamárias, enquanto **BH** em células de carcinoma hepatocelular.

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade evidenciam que os alcaloides sanguinina (**1**), 7-metoximasonina (**3**), 2-O-metilcandimina (**6**), 7-metoxi-O-metillicorenina (**7**), albomaculina (**8**), 7-metoxinormasonina (**11**), 2α-metoxihomolicorina (**12**), 8-O-desmetilhomolicorina (**13**), 2α,7-diMetoxihomolicorina (**15**), masonina (**18**), normasonina (**19**) e nerinina (**20**) não apresentaram efeito citotóxico nas linhagens de células ensaiadas, sendo maiores que 100 µM para células cancerosas e maiores que 200 µM para células normais de fibroblastos.

Os alcaloides hipeastrina (**4**), candimina (**5**) e licorina (**10**), apresentaram efeito citotóxico em todas as linhagens de células testadas. Estes compostos expressaram maior citotoxicidade em células normais de fibroblastos do que o controle positivo. Os menores valores de IC<sub>50</sub> para a hipeastrina (**4**) e candimina (**5**) foram observados para a linhagem de carcinoma pancreático humano (46,50 µM e 16,90 µM, respectivamente), enquanto o alcaloide licorina (**10**) apresentou menor valor de IC<sub>50</sub> para as células de carcinoma hepatocelular. Observou-se ainda, a seletividade do efeito citotóxico em células de câncer em relação às células normais de fibroblastos, exceto para a hipeastrina (**4**) em células de adenocarcinoma em glândulas mamárias. A licorina (**10**) apresentou efeitos de citotoxicidade similares

aos do controle positivo nos ensaios com células normais de fibroblastos e de adenocarcinoma em glândulas mamárias.

#### 4.4 – Resumo dos resultados

Nesse trabalho, foram identificados 40 alcaloides das frações hexano e acetato de etila dos bulbos e hastes florais da espécie *H. canastrense*, possuindo diferentes tipos de esqueletos: 19 compostos do tipo homolicorina, 7 compostos do tipo licorina, 5 compostos do tipo galantamina, 4 compostos do tipo haemantamina, 3 compostos do tipo narciclasina, e ainda 2 compostos do tipo tazetina. A figura 83 representa em porcentagem os tipos de esqueletos dos compostos identificados na espécie em questão.

#### Esqueleto dos compostos identificados em *Hippeastrum canastrense*

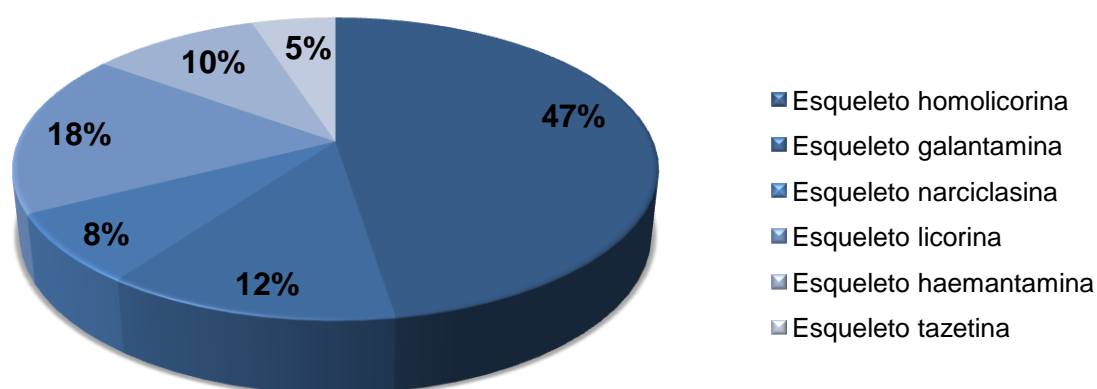
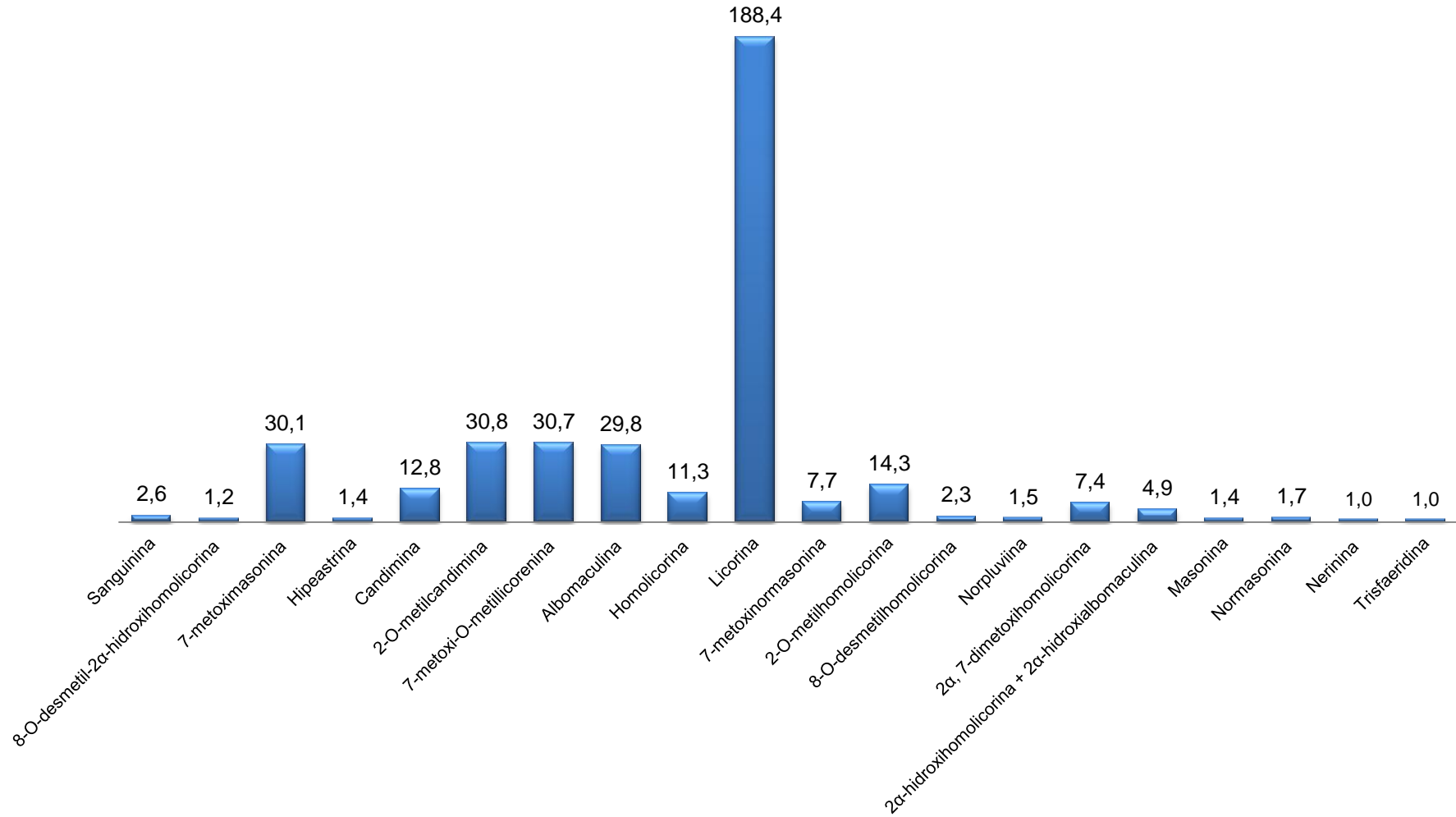


Figura 83: Esqueletos dos compostos identificados em *Hippeastrum canastrense*

O desenvolvimento da pesquisa levou ao isolamento de 21 alcaloides: sanguinina, hipeastrina, candimina, 7-Metoxi-O-metillicorenina, albomaculina, homolicorina, licorina, 8-O-desmetilhomolicorina, norpluviina, 2 $\alpha$ ,7-diMetoxihomolicorina, 2 $\alpha$ -Hidroxihomolicorina, 2 $\alpha$ -Hidroxialbomaculina, masonina, normasonina, nerinina, trisfaeridina, 8-O-desmetil-2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina, 7-metoximasonina, 2-O-metilcandimina, 7-metoxinormasonina e 2 $\alpha$ -metoxihomolicorina, onde os cinco últimos foram isolados pela primeira vez.

A licorina é o composto majoritário da espécie *Hippeastrum canastrense* J. Dutilh & R. S. Oliveira, pois foram isolados cerca de 190 mg do composto, enquanto os alcaloides trisfaeridina e nerinina foram os alcaloides isolados em menor quantidade (1,0 mg). A figura 84 ilustra as massas dos alcaloides isolados da espécie em questão.

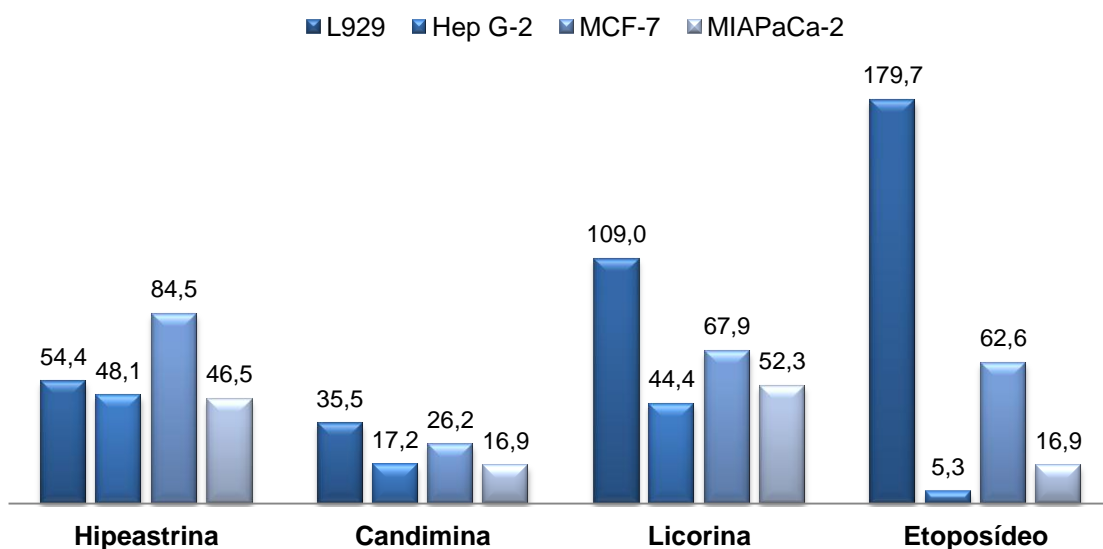
## Massa dos alcaloides isolados de *Hippeastrum canastrense* (mg)



**Figura 84:** Massa dos alcaloides isolados de *Hippeastrum canastrense* (mg)

Os extratos brutos das hastes florais e bulbos, assim como os extratos enriquecidos em alcaloides acetato de etila e hexano de ambas as partes, e ainda 15 alcaloides isolados de *Hippeastrum canastrense* foram avaliados quanto à citotoxicidade em células normais de fibroblastos da linhagem L929 e células tumorais das linhagens de carcinoma hepatocelular Hep G-2, adenocarcinoma em glândulas mamárias MCF-7 e carcinoma pancreático humano MIAPaCa-2. Apenas os alcaloides hipeastrina, candimina e licorina apresentaram efeito citotóxico importantes nas linhagens de células ensaiadas (figura 85), enquanto os extratos brutos de *Hippeastrum canastrense* apresentaram notável citotoxicidade em células tumorais, principalmente em células de carcinoma hepatocelular. Os extratos enriquecidos em alcaloides HA, BA e BH expressaram um relevante potencial citotóxico em células tumorais, sendo os extratos dos bulbos mais seletivos (figura 86).

### Valores de IC<sub>50</sub> de alcaloides de *Hippeastrum canastrense* (µM)



**Figura 85:** Valores de IC<sub>50</sub> de alcaloides de *Hippeastrum canastrense* (µM)

### Valores de IC<sub>50</sub> dos extratos de *Hippeastrum canastrense* (µg.mL<sup>-1</sup>)

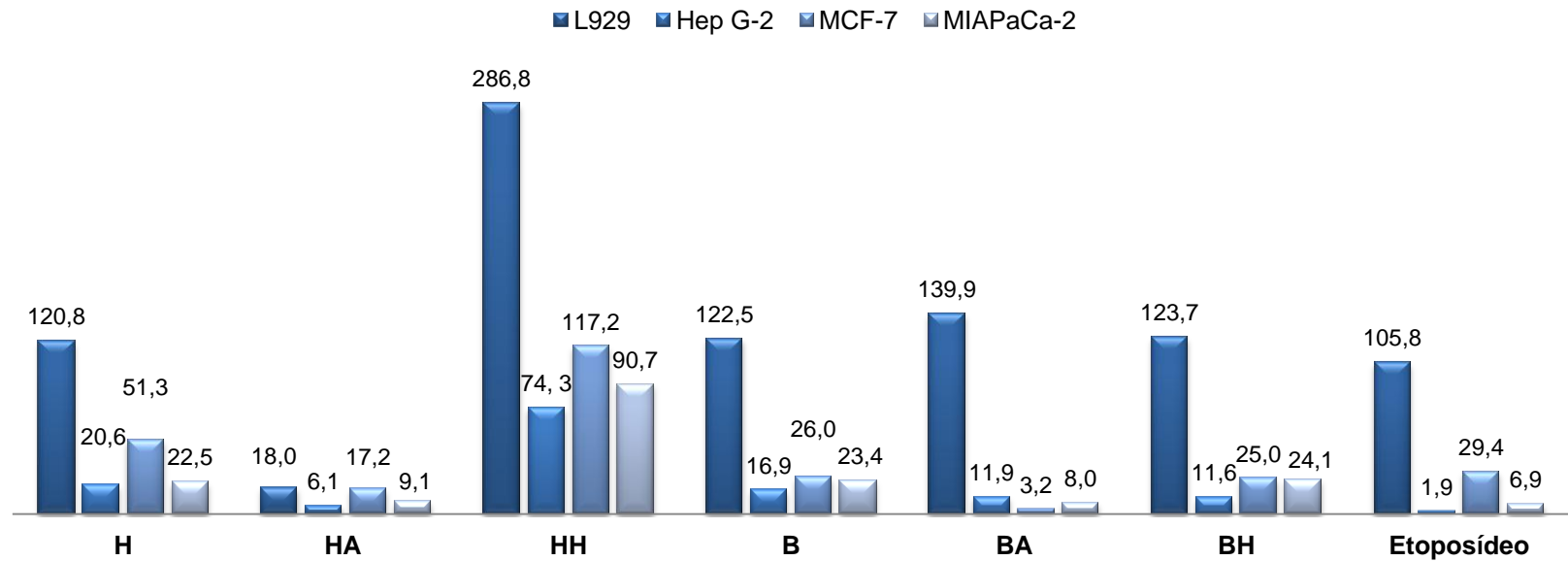


Figura 86: Valores de IC<sub>50</sub> dos extratos de *Hippeastrum canastrense* (µg.mL<sup>-1</sup>)

## 5 – CONCLUSÃO

As espécies da família Amaryllidaceae possuem um grupo específico de alcaloides que demonstram uma ampla variedade de atividades biológicas. O estudo dessas espécies é de grande relevância na busca de novos compostos a serem empregados como agentes terapêuticos.

A investigação do conteúdo alcaloídico dos bulbos e hastes florais da espécie *Hippeastrum canastrense*, uma espécie da família Amaryllidaceae endêmica do Brasil e, até o presente momento não estudada, revelou um perfil alcaloídico extenso e diversificado. A espécie apresentou-se como uma fonte de alcaloides, especialmente de compostos com esqueletos do tipo homolicorina.

Os resultados obtidos nesse trabalho encorajam a avaliação dos compostos isolados para os mais variados alvos farmacêuticos.

## 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, S. V., Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos, *Química Nova*, **32(3)**, 679-688, 2009.

BASTIDA, J. *et.al.* Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. In: D. MUNOZ-TORRERO (Ed.), *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences Kerala*, India: Transworld Research Network, 65-100, 2011.

BASTIDA, J.; LAVILLA, R.; VILADOMAT, F. Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids In: The Alkaloids; CORDELL, G. A. (Ed), *Chemistry and Physiology*. San Diego: Academic Press INC., **63(3)**, 87-179, 2006.

BASTIDA, J.; LLABRÉS, J. M.; VILADOMAT, F.; CODINA, C., *Narcissus* alkaloids, III. 9-O-demetilhomolycorine from *Narcissus confusus*, *Journal of Natural Products*, **50**, 199-202, 1987.

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

BOIT, H. G.; DOPKE, W., Masonine, a new amaryllidaceous alkaloid, *Naturwissenschaften Journal*, **45**, 85, 1958.

BRAGA, F.C.; CASTILHO, R.O., Potencialidades do cerrado como fonte de substâncias bioativas e de espécies medicinais para o desenvolvimento de fitoterápicos. In: de SOUZA, G. H. B.; de MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P

*Farmacognosia: coletânea científica*, 1 ed. Ouro Preto, Editora UFOP, 295-318, 2011.

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

BUTLER, M. S. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery, *Journal of Natural Products*, **67**, 2141-2153, 2004.

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

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

CEDRÓN, J. C.; GUTIÉRREZ, D.; FLORES, N.; RAVELO, A. G.; ESTÉVEZ-BRAUN, A., Preparations and antimalarial of semisynthetic lycorenine derivatives, *Journal of Medicinal Chemistry*, **63**, 722-730, 2013.

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

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer, *Revista Virtual de Química*, **2(1)**, 47-58, 2010.

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

Da SILVA, A. F. S.; de ANDRADE, J. P.; BEVILAQUA, L. R. M.; de SOUZA, M. M.; IZQUIERDO, I.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J. A. S., Anxiolytic-, antidepressant-

and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **85(1)**, 148-154, 2006.

DASARI, R.; BANULS, L. M. Y.; MASI, M.; PELLY, S. C.; MATHIEU, V.; GREEN, I. R.; van OTTERLO, W. A. L.; EVIDENTE, A.; KISS, R.; KORNIENKO, A., C1,C2-ether derivatives of the Amaryllidaceae alkaloid lycorine: retention of activity of highly lipophilic analogues against cancer cells, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **24**, 923-927, 2014.

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

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

De ANDRADE, J. P.; PIGNI, N. B.; TORRAS-CLAVERIA, L.; STRAHIL, B.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J., Bioactive alkaloid extracts from *Narcissus broussonetii*: mass spectral studies, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **70**, 13-25, 2012.

De ANDRADE, J. P.; PIGNI, N. B.; TORRAS-CLAVERIA, L.; GUO, Y.; BERKOV, S.; REYES-CHILPAC, R.; AMRANI, A. E.; ZUANAZZI, J. A.; CODINA, C.; VILADOMATA, F.; BASTIDA, J. Alkaloids from the *Hippeastrum* genus: chemistry and biological activity, *Rev. Latinoamer. Quím.*, **40(2)**, 83-98 2012.

De OLIVEIRA, S. O.; SEMIR, J.; DUTILH, J. H. A. Four new endemic species of *Hippeastrum* (Amaryllidaceae) from Serra da Canastra, Minas Gerais State, Brazil, *Phytotaxa*, **145(1)**, 38-46, 2013.

DEWICK, P. M., Medicinal natural products: a biosynthetic approach, 2<sup>a</sup> edição. England: Josh Wiley & Sons LTD, 507, 2002.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery, *Metabolites*, **2**, 303-336, 2012.

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

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

DUTILH, J.H.A.; OLIVEIRA, R.S. Amaryllidaceae in: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB129639>>. Acesso em: 10 de agosto de 2016.

DUTILH, J.H.A.; OLIVEIRA, R.S. *Amaryllidaceae* in: Lista de Espécies da Flora do Brasil, *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4354>>. Acesso em: 09 de agosto de 2016

EFFERTH, T.; KAHL, S.; PAULUS, K.; ADAMNS, M.; RAUH, R.; BOECHZELT, H.; HAO, X.; KAINA, B.; BAUER, R., Phytochemistry and pharmacogenomics os natural products derived from tradicional Chinese medicine and Chinese material medica with activity against tumor cells, *Molecular Cancer Therapeutics*, **7**, 152-161, 2008.

Estimativa|2016: Incidência de câncer no Brasil, Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes Silva (INCA). Disponível em: [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br). Acesso em: 23 de Agosto de 2016.

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

EVIDENTE, A.; KIREEV, A. S.; JENKINS, A. R.; ROMERO, A. E.; STEELANT, W. F. A.; SLAMBROUCK, S. V.; KORNIENKO, A., Biological evaluation os structurally

diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives: discovery of novel leads for anticancer drug design, *Planta Med*, **75**, 501-507, 2009.

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

FORGO, P.; HOHMANN, J., Leucoverine and acetylleucoverine, alkaloids from *Leucojum vernum*, *Journal of Natural Products*, **68**, 1588-1591, 2006.

GHOSAL, S.; SAINI, K. S.; RAZDAN, S. Crinum alkaloids: their chemistry and biology, *Phytochemistry*, **24(10)**, 2141-2156, 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*, **49**, 668–672, 2011.

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

GIORDANI, R. B.; PAGLIOSA, L. B.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J. A. S.; DUTILH, J. H. A., Investigação do potencial antioxidante e anticolinester sico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae), *Química Nova*, **31(8)**, 2042-2046, 2008.

GIORDANI, R. B.; WEIZENMANN, M.; ROSENBERG, D. B.; De CARLI, G. A.; BOGO, M. R.; ZUANAZZI, J. A. S.; TASCA, T., *Trichomonas vaginalis* nucleoside triphosphate diphosphatase and 5'-nucleotidase activities are inhibited by lycorine and candimine, *Parasitology Internacional*, **59**, 226-237, 2010.

GOMES, J. R.; ALMEIDA, T. L., Prevenção do câncer de mama, *Prática Hospitalar*, **91**, 9-12, 2014.

GUDE, M.; HAUSEN, B. M.; HEITSCH, H.; KONG, W. A., An investigation of the irritant and allergenic properties of daffodils (*Narcissus pseudonarcissus* L., Amaryllidaceae). A review of daffodil dermatitis, *Contact Dermatitis*, **19**, 1-10, 1988.

GURIB-FAKIM, A., Traditions of yesterday and drugs of tomorrow, *Molecular Aspects of Medicine*, **27**, 1-93, 2006.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery, *Drug Discovery Today*, **13 (19/20)**, 894-901, 2008.

HARVEY, A. L., The pharmacology of galanthamine and its analogues, *Pharmacology and Therapeutics*, **68(1)**, 113-128, 1995.

HARVEY, A. L.; EBEL-EDRADA, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era, *Nature*, **14**, 111-129, 2015.

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

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

HEINRICH, M.; TEOH, H. L., Galanthamine from snowdrop – the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge, *Journal of Ethnopharmacology*, **92**, 147-162, 2004.

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

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

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

IANELLO, C.; PIGNI, N. B.; ANTOGNONI, F.; POLI, F.; MAXIA, A.; DE ANDRADE, J. P.; BASTIDA, J., A potente acetylcholinesterase inhibitor from *pancratium illyricum* L., *Fitoterapia*, 1-5, 2013.

JEFFS, P. W.; ABOU-DONIA, A.; CAMPAU, D. Structures of 9 - O - Demethylhomolycorine and 5a-Hydroxyhomolycorine. Alkaloids of *Crinum defixum*, *C. scabrum*, and *C. latifolium* . Assignment of Aromatic Substitution Patterns from <sup>1</sup>H-Coupled <sup>13</sup>C Spectra, *Journal of Organic Chemistry*, **50**, 1732-1737, 1985.

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

JEGOROV, A; BUCHTA, M; SEDMERA, P; KUZMA, M; HAVLICEK, V, Accurate product ion mass spectra of galanthamine derivatives, *Journal of Mass Spectrometry*, **41**, 544-548, 2006.

JIN, Z. Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids, *Natural Products Reports*, **30**, 849–868, 2013.

JIN, Z. Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids, *Natural Products Reports*, **26**, 363–381, 2009.

JIN, Z., Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids, *Natural Products Reports*, **28**, 1126-1142, 2011.

KATO, M. J. Global phytochemistry: the Brazilian approach, *Phytochemistry*, **57**, 621-623, 2001.

KIHARA, M.; KONISHI, K.; XU, L.; KOBAYASHI, S., Alkaloidal constituents of the flowers of *Lycoris radiate* HERB. (Amaryllidaceae), *Chem. pharm. Bull.*, **39(7)**, 1849-1853, 1991.

KOBAYASHI, S.; TAKEDA, S.; ISHIKAWA, H.; MATSUMOTO, H.; KIHARA, M.; SHINGU, T.; NUMATA, A.; UYEO, S., Alkaloids of the Amaryllidaceae. A new alkaloid, sanguinine from *Licorys sanguine* Maxim. Var. *Kiushiana* Makino, and pretazzetine from *Lycoris radiate* Herb., *Chem. pharm. Bull.*, **24(7)**, 1537-1576, 1976.

KREH, M., MASTUSCH, R., O-methyloduline and N-demethylmasonine, alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus*, *Phytochemistry*, **38(6)**, 1533-1535, 1995.

KREH, M., MASTUSCH, R.; WITTE, L., Capillary gas chromatography-mass spectrometry of Amaryllidaceae alkaloids, *Phytochemistry*, **38(3)**, 773-776, 1995.

LAMORAL-THEYS, D. *et al.* Lycorine, the Main Phenanthridine Amaryllidaceae Alkaloid, Exhibits Significant Antitumor Activity in Cancer Cells That Display Resistance to Proapoptotic Stimuli: An Investigation of Structure-Activity Relationship and Mechanistic Insight, *Journal of Medicinal Chemistry*, **52**, 6244-6256, 2009.

LATVALA, A.; ONUR, M. A.; GOZLER, T.; LINDEN, A.; KIVÇAK, B.; HESSE, M., Nitrogen inversion in 9-O-demethylhomolycorine, *Tetrahedron*, **6**, 361-364, 1995.

LEE, J. Y.; CHAN, M.; LEE, J. E.; KIM, J.; CHO, H.; PARK, W. K.; CHOI, S. U.; RYU, S. Y., A new Amaryllidaceae alkaloid from the bulbs of *Lycoris radiata*, *Bull. Korean Chemistry Society*, **35(12)**, 3665, 2014.

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*, **56**, 1331-1338, 1993.

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*, **82**, 147-154, 2002.

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

MALTA, D. C.; de MORAIS NETO, O. L.; SILVA JUNIOR, J. B., Apresentação do plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis no Brasil, 2011 a 2022, *Epidemiol. Serv. Saúde*, **20(4)**, 425-438, 2011.

MARY, A; RENKO, D.Z.; GUILLOU, C.; THAL, C., Potente acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis, and structure-activity relationship of bis-interacting

ligands in the galanthamine series, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **6**, 1835-1850, 1998

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

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

MIKAMI, M.; KITAHARA, M.; KITANO, M.; ARIKI, Y.; MIMAKI, Y.; SASHIDA, Y.; YAMAZAKI, M.; YUI, S., Supressive activity of Lycoricidinol (Narciclasina) against cytotoxicity of neutrophil-derived calprotectin, and it's suppressive effets on rat adjuvant arthritis model, *Biol. pharm. Bull.*, **22(7)**, 674-678, 1999.

Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Cancer (INCA), ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer, *Rio de Janeiro: INCA*, 128, 2011.

MOSMANN, T., Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal os Immunological Methods*, **65**, 55-63, 1983.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010, *Journal of Natural Products*, **75**, 311-335, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs from 1981 to 2014, *Journal of Natural Products*, **79(3)**, 629-661, 2016.

NOGUEIRA, L. J.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L., Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch, *Revista Virtual de Química*, **1(3)**, 227-240, 2009.

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

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

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

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

RENARD-NOZAKI, J.; KIM, T.; IMAKURA, Y.; KIHARA, M.; KOBAYASHI, S., Effect of alkaloids isolated from Amaryllidaceae on *Herpes simplex* virus, *Research in Virology*, **140**, 115-128, 1989.

ROMÃO, R.; MARTINELLI, G.; CREPALDI, I.; MARTINEZ-LABORDE, J. B. Brazilian biodiversity for ornamental use and conservation, *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, **15**, 100 - 105, 2015.

SCHMIDT, M. I.; DUNCAN, B. B.; SILVA, G. A.; MENEZES, A. M.; MONTEIRO, C. A.; BARRETO, S. M.; CHOR, D.; MENEZES, P.R., Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: carga e desafios atuais, Saúde no Brasil 4, *The Lancet*, 61-74, 2011)

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

SHITARA, N.; HIRASAWA, Y.; HASUMI, S.; SASAKI, T.; MATSUMOTO, M.; WONG, C. P.; KANEDA, T.; ASAKAWA, Y.; MORITA, H. Four new Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes candida*, *Journal of Natural Medicines*, **68**, 610-614, 2014.

STAFFORD, G. I.; PEDERSEN, M. E.; STADEN, J. V.; JAGER, A. K. Review on plants with CNS-effects used in traditional South African medicine against mental diseases, *Journal of Ethnopharmacology*, **119**, 513–537, 2008.

STRAHIL, B.; BASTIDA, J.; NIKOLOVA, M.; VILADOMAT, F.; CODINA, C., Rapid TLC/GC-MS identification of acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extracts, *Phytochemical Analysis*, **19**, 411-419, 2008.

STRAHIL, B.; BASTIDA, J.; SIDJIMOVA, B.; VILADOMAT, F.; CODINA, C.; Alkaloid diversity in *Galanthus elwesii* and *Galanthus nivalis*, *Chemistry & Biodiversity*, **8**, 115-130, 2011.

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

STRAHIL, B.; VIDADOMAT, F.; CODINA, C. SUÁREZ, S.; RAVELO, A.; BASTIDA, J., GC-MS of amaryllidaceous galanthamine-type alkaloids, *Journal of Mass Spectrometry*, **47**, 1065-1073, 2012.

STROHL, W. R. The role of natural products in a modern drug discovery program, *Drug Discovery Today*, **5(2)**, 39-41, 2000.

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

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

TORIIZUKA, Y., KINOSHITA, E.; KOGURE, N.; KITAJIMA, M.; ISHIYAMA, A.; OTOGURO, K.; YAMADA, H.; OMURA, S.; TAKAYAMA, H., New lycorine-type alkaloid from *Lycoris traubii* and evaluation of antitrypanosomal and antimalarial

activities of lycorine derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **16**, 10182-10189, 2008.

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

WANG, Y.; ZHANG, Z.; YANG, F.; SUN, Q.; HE, H.; DI, Y.; MU, S.; LU, Y.; CHANG, Y.; ZHENG, Q.; DING, M.; DONG, J.; HAO, X., Benzylphenethylamine alkaloids from *Hosta plantaginea* with inhibitory activity against Tobacco Mosaic Virus and acetylcholinesterase, *Journal of Natural Products*, **70**, 1458-1461, 2007.

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

WILLIAMS, P; SORRIBAS, A.; HOWES, MJ. R., Natural products as a source of Alzheimer's drug leads, *Natural Products Reports*, **28**, 48-77, 2011.

XUE, L.; YU, H.; WANG, Z.; PI, H.; ZHANG, P.; HAN-LI, R., Neuroprotective compounds from the bulbs of *Lycoris radiata*, *Fitoterapia*, **88**, 82-90, 2013.

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

## **ANEXO A**

Eluentes utilizados nos fracionamentos por CLC

**Tabela A<sub>1</sub>**: Sistema de eluição no fracionamento de HA por CC

Fase móvel	Volume (mL)
100% AcOEt	250
95% AcOEt + 5% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	100
90% AcOEt + 10% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	100
80% AcOEt + 20% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	100
70% AcOEt + 30% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	100
60% AcOEt + 40% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	500
50% AcOEt + 50% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	100
30% AcOEt + 70% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	200
20% AcOEt + 80% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	100
10% AcOEt + 90% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	100
100% AcOEt	100
100% MeOH	200

**Tabela A<sub>2</sub>**: Sistema de eluição no fracionamento de HH por cromatografia líquida em coluna

Fase móvel	Volume (mL)
Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (10:6:6:8:3) + 4 Gotas de NH <sub>4</sub> OH	850
Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (2:3:3:4:5) + 4 Gotas de NH <sub>4</sub> OH	170
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (3:3:4:6) + 4 Gotas de NH <sub>4</sub> OH	160
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (1:1:1:4) + 4 Gotas de NH <sub>4</sub> OH	210

**Tabela A<sub>3</sub>**: Sistema de eluição no fracionamento de BH por cromatografia líquida em coluna

Fase móvel	Volume (mL)
Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (12:6:6:12:1) + 6 Gotas de NH <sub>4</sub> OH	925
Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (1:1:3:6:6) + 6 Gotas de NH <sub>4</sub> OH	85
100% MeOH	300

**Tabela A<sub>4</sub>**: Sistema de eluição no fracionamento de BH1 por cromatografia líquida em coluna

Fase móvel	Volume (mL)
Hex:AcOEt (4:1)	10
Hex:AcOEt (3:2)	10
Hex:AcOEt (2:3)	20
Hex:AcOEt (3:7)	10
Hex:AcOEt (1:4)	10
Hex:AcOEt (1:9)	10
100% AcOEt	20
AcOEt:MeOH (9:1)	10
AcOEt:MeOH (4:1)	10
AcOEt:MeOH (7:3)	10
AcOEt:MeOH (3:2)	10
AcOEt:MeOH (1:1)	20
AcOEt:MeOH (2:3)	10
AcOEt:MeOH (3:7)	10
AcOEt:MeOH (1:4)	10
AcOEt:MeOH (1:9)	10
100% MeOH	30
MeOH:H <sub>2</sub> O:NH <sub>4</sub> OH (8:1:1)	40

**Tabela A<sub>5</sub>:** Sistema de eluição no fracionamento de BH1.1 por CC

Fase móvel	Volume (mL)
100% AcOEt	50
90% AcOEt + 10% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	50
80% AcOEt + 10% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	20
70% AcOEt + 10% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	20
60% AcOEt + 10% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	30
50% AcOEt + 10% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	100
40% AcOEt + 10% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	50
30% AcOEt + 10% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	50
20% AcOEt + 10% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	30
10% AcOEt + 90% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	20
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	40
50% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :Me <sub>2</sub> CO (1:1) + 50% MeOH	100
100% MeOH	100

**Tabela A<sub>6</sub>:** Sistema de eluição no fracionamento de BH3 por cromatografia líquida em coluna

Fase móvel	Volume (mL)
100% AcOEt	50
Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (12:6:6:12:1) + 6 Gotas de NH <sub>4</sub> OH	860
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt:MeOH (1:1:3)	100
100% MeOH	100
MeOH:H <sub>2</sub> O:NH <sub>4</sub> OH (2:1:1)	100

**Tabela A<sub>7</sub>:** Sistema de eluição no fracionamento de BA2 por cromatografia líquida em coluna

Fase móvel	Volume (mL)
Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:MeOH (6:3:3:10 gotas) + 6 Gotas de NH <sub>4</sub> OH	595
Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:MeOH (6:3:3:20 gotas) + 6 Gotas de NH <sub>4</sub> OH	680
Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:MeOH (6:3:3:24 gotas) + 6 Gotas de NH <sub>4</sub> OH	138
Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (1:1:1:1:1) + 6 Gotas de NH <sub>4</sub> OH	206
AcOEt:MeOH (1:1)	200
100% MeOH	200

**Tabela A<sub>8</sub>:** Sistema de eluição no fracionamento de BA2.3 por CC

Fase móvel	Volume (mL)
100% AcOEt	70
95% AcOEt + 5% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	70
90% AcOEt + 10% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	70
80% AcOEt + 10% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	100
70% AcOEt + 10% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	100
60% AcOEt + 10% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	100
50% AcOEt + 10% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	100
40% AcOEt + 10% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	200
30% AcOEt + 10% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	100
20% AcOEt + 10% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	100
10% AcOEt + 90% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	100
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	100
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (3:2)	100
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (7:3)	100
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (4:1)	100
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (9:1)	100
100% MeOH	100

**Tabela A<sub>9</sub>**: Sistema de eluição no fracionamento de BA2.4 por CC

<b>Fase móvel</b>	<b>Volume (mL)</b>
100% Hex	20
90% Hex + 10% AcOEt	20
80% Hex + 20% AcOEt	20
70% Hex + 30% AcOEt	20
60% Hex + 0% AcOEt	10
50% Hex +50% AcOEt	15
40% Hex + 60% AcOEt	15
30% Hex + 70% AcOEt	15
20% Hex + 80% AcOEt	15
10% Hex + 90% AcOEt	15
100% AcOEt	15
97,5% AcOEt + 2,5% MeOH	20
95% AcOEt + 5% MeOH	20
92,5% AcOEt + 7,5% MeOH	20
90% AcOEt + 10% MeOH	20
87,5% AcOEt + 12,5% MeOH	20
85% AcOEt + 15% MeOH	20
82,5% AcOEt + 17,5% MeOH	20
80% AcOEt + 20% MeOH	20
77,5% AcOEt + 22,5% MeOH	20
75% AcOEt + 25% MeOH	20
72,5% AcOEt + 27,5% MeOH	20
70% AcOEt + 30% MeOH	20
67,5% AcOEt + 32,5% MeOH	20
65% AcOEt + 35% MeOH	20
62,5% AcOEt + 37,5% MeOH	20
60% AcOEt + 40% MeOH	20
57,5% AcOEt + 42,5% MeOH	20
55% AcOEt +45% MeOH	20
52,5% AcOEt + 47,5% MeOH	20
50% AcOEt + 50% MeOH	20
47,5% AcOEt + 52,5% MeOH	10
45% AcOEt + 55% MeOH	10
42,5% AcOEt + 57,5% MeOH	10
30% AcOEt + 60% MeOH	10
37,5% AcOEt + 62,5% MeOH	10
35% AcOEt + 65% MeOH	10
32,5% AcOEt + 67,5% MeOH	10
30% AcOEt + 70% MeOH	70
27,5% AcOEt + 72,5% MeOH	70
25% AcOEt + 75% MeOH	70
22,5% AcOEt + 77,5% MeOH	70
20% AcOEt + 80% MeOH	100
17,5% AcOEt + 82,5% MeOH	100
15% AcOEt + 85% MeOH	100
12,5% AcOEt + 87,5% MeOH	100
10% AcOEt + 90% MeOH	100
7,5% AcOEt + 92,5% MeOH	100
5% AcOEt + 95% MeOH	100
2,5% AcOEt + 97,5% MeOH	100
100% MeOH	100

## **ANEXO B**

Sistemas de solventes em CCDP, fatores de retenção e rendimento em massa dos compostos isolados.

**Tabela B<sub>1</sub>:** Sistemas de eluição de solventes, fatores de retenção e rendimentos em massa dos compostos isolados das frações de HA

Fração	Massa (mg)	Técnica Cromatográfica	Fase móvel	Compostos Isolados/Siglas	R <sub>f</sub>	Reativo para Dragendorff	Massa (mg)	Compostos isolados
HA1	21,6	CCDP	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO AcOEt:MeOH (12:6:6:8:3) + 5 gotas de NH <sub>4</sub> OH	HA1A	0,29	+	1,1	<b>Composto 1</b>
				HA1B	0,25	+	1,0	-
				HA1C	0,15	+	1,2	<b>Composto 2</b>
				HA1D	0,10	+	1,0	-
				HA1E	0,70	+	1,0	-
				HA1F	0,03	+	5,5	-
HA2	47,2	CCDP	Hex: Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (3:4:6:2)	HA2A	0,95	+	4,7	<b>Composto 3</b>
				HA2B	0,90	-	1,4	<b>Composto 4</b>
				HA2C	0,88	-	1,4	<b>Composto 5</b>
				HA2D	0,82	-	1,0	-
HA3	28,8	CCDP	Hex: Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MEOH (7:4:6:2)	HA3A	0,51	+	1,9	<b>Composto 3</b>
				HA3B	0,14	+	2,9	<b>Composto 5</b>
				HA3C	0,17	-	0,5	-
HA4	24,7	CCDP	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (6:4:3:4:2) + 3 gotas de NH <sub>4</sub> OH	HA4A	0,49	+	2,4	<b>Composto 3</b>
				HA4B	0,41	-	0,8	-
				HA4C	0,33	+	0,9	<b>Composto 6</b>
				HA4D	0,06	+	0,5	<b>Composto 5</b>
HA5	73,3	CCDP	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (6:4:3:4:2) + 6 gotas de NH <sub>4</sub> OH	HA5A	0,76	+	1,4	<b>Composto 7</b>
				HA5B	0,65	+	2,7	<b>Compostos 8 e 9</b>
				HA5C	0,55	+	11,9	<b>Composto 6</b>
				HA5D	0,39	+	2,3	<b>Composto 5</b>
				HA5E	0,29	+	2,5	<b>Composto 10</b>
				HA5F	0,25	-	0,6	-
				HA5G	0,13	-	0,5	-
				HA5H	0,05	-	2,5	-
HA6	64,4	CCDP	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (12:6:6:8:3) + 4 gotas de NH <sub>4</sub> OH	HA6A	0,61	+	0,5	<b>Composto 7</b>
				HA6B	0,50	+	4,0	<b>Composto 8</b>
				HA6C	0,46	+	7,0	-
				HA6D	0,40	+	2,4	<b>Composto 6</b>
				HA6E	0,32	-	0,1	-
				HA6F	0,28	+	2,0	-

Continuação da tabela B<sub>1</sub>

<b>HA7</b>	41,1	CCDP	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (12:6:6:8:3) + 5 gotas de NH <sub>4</sub> OH	HA7A	0,83	+	1,5	-
				HA7B	0,77	+	1,9	-
				HA7C	0,73	+	2,3	<b>Composto 8</b>
				HA7D	0,62	+	0,7	<b>Composto 11</b>
				HA7E	0,58	+	1,4	<b>Composto 12</b>
				HA7F	0,43	-	4,9	-
				HA7G	0,15	+	1,2	-
<b>HA8</b>	82,7	CCDP (Corrida 2x)	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (12:6:6:4:3) + 4 gotas de NH <sub>4</sub> OH	HA8A	0,93	-	3,5	-
				HA8B	0,83	-	2,0	-
				HA8C	0,73	+	15,9	-
				HA8D	0,34	+	1,5	-
				HA8E	0,31	+	2,3	<b>Composto 13</b>
				HA8F	0,24	-	1,5	<b>Composto 14</b>
<b>HA9</b>	88,5	CCDP	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (6:4:3:4:2) + 3 gotas de NH <sub>4</sub> OH	HA9A	0,84	-	3,5	-
				HA9B	0,78	+	1,0	<b>Composto 15</b>
				HA9C	0,69	-	2,7	-
				HA10A	0,46	+	1,7	<b>Composto 11</b>
<b>HA10</b>	64,3	CCDP (Corrida 2x)	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (6:4:3:4:2) + 4 gotas de NH <sub>4</sub> OH	HA10B	0,37	+	1,6	<b>Composto 15</b>
				HA10C	0,30	+	4,9	<b>Compostos 16 e 17</b>
				HA10D	0,26	+	2,8	-
				HA10E	0,13	+	1,0	-
				HA11A	0,72	+	1,7	-
<b>HA11</b>	15,9	CCDP (Corrida 2x)	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (12:6:6:8:3) + 5 gotas de NH <sub>4</sub> OH	HA11B	0,66	+	1,6	-
				HA11C	0,41	+	4,9	-
				HA11D	0,32	+	2,8	-
				HA11E	0,20	+	1,0	-

**Tabela B<sub>2</sub>:** Sistemas de eluição de solventes, fatores de retenção e rendimentos em massa dos compostos isolados das frações de HH

Fração	Peso (mg)	Técnica Cromatográfica	Fase móvel	Compostos Isolados/Siglas	R <sub>f</sub>	Reativo para Dragendorff	Peso (mg)	Compostos isolados
HH1	39,0	CCDP	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (10:6:10:8:3) + 4 gotas de NH <sub>4</sub> OH	HH1A	0,78	-	14,3	-
				HH1B	0,74	-	2,1	-
				HH1C	0,70	-	1,7	-
				HH1D	0,52	-	2,1	-
				HH1E	0,09	+	3,5	-
				HH1F	0,02	-	3,5	-
HH2	36,2	CCDP	Hex : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (6:3:3:4:1) + 4 gotas de NH <sub>4</sub> OH	HH2A	0,82	-	1,0	-
				HH2B	0,70	+	1,7	<b>Composto 7</b>
				HH2C	0,66	+	1,4	<b>Composto 18</b>
				HH2D	0,52	+	3,8	<b>Composto 3</b>
				HH2E	0,08	+	1,1	-
				HH2F	0,00	-	1,0	-
HH3	65,7	CCDP	Hex : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (12:8:6:14:1) + 4 gotas de NH <sub>4</sub> OH	HH3A	0,74	+	8,1	<b>Composto 3</b>
				HH3B	0,60	+	24,0	<b>Compostos 8 e 9</b>
				HH3C	0,01	+	7,1	-
				HH3D	0,82	-	3,9	-
HH4	28,9	CCDP	Hex : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (12:6:6:8:1) + 4 gotas de NH <sub>4</sub> OH	HH4A	0,65	-	1,0	-
				HH4B	0,42	+	1,2	<b>Compostos 8 e 9</b>
				HH4C	0,32	+	1,2	<b>Composto 11</b>
				HH4D	0,28	+	1,3	<b>Composto 6</b>
				HH4E	0,24	-	1,5	-
				HH4F	0,01	+	3,5	-
HH5	23,6	CCDP	Hex : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (6:3:3:4:1) + 4 gotas de NH <sub>4</sub> OH	HH4G	0,53	-	1,7	<b>Composto 19</b>
				HH5A	0,84	-	1,0	-
				HH5B	0,79	-	1,5	-
				HH5C	0,77	+	1,1	<b>Composto 11</b>
				HH5D	0,35	+	1,5	-
				HH5E	0,19	+	1,4	-
				HH5F	0,14	-	2,1	-
				HH5G	0,09	+	1,6	-
HH6	108,2	CCDP	Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (1:1:4) + 4 gotas de NH <sub>4</sub> OH	HH5H	0,04	-	1,3	-
				HH6A	0,55	+	3,9	<b>Compostos 8 e 9</b>
				HH6B	0,81	+	15,7	-

**Tabela B<sub>3</sub>:** Sistemas de eluição de solventes, fatores de retenção e rendimentos em massa dos compostos isolados das frações de BH

Fração	Peso (mg)	Técnica Cromatográfica	Fase móvel	Compostos Isolados/Siglas	R <sub>f</sub>	Reativo para Dragendorff	Peso (mg)	Compostos isolados
BH1.1.1	17,5	CCDP	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (14:1:1:4:20 gotas) + 2 gotas de NH <sub>4</sub> OH	BH1.1.1A	0,62	-	1,0	-
				BH1.1.1B	0,12	-	1,0	-
				BH1.1.1C	0,02	+	1,5	-
BH1.1.2	4,9	-	Precipitado da CC	BH1.1.2	-	+	4,9	Compostos 3 e 18
BH1.1.3	11,2	CCDP	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (12:8:6:14:1) + 4 gotas de NH <sub>4</sub> OH	BH1.1.3A	0,42	+	4,0	Composto 7
				BH1.1.3B	0,30	+	0,8	Composto 3
				BH1.1.3C	0,22	+	1,0	-
				BH1.1.3D	0,08	+	1,0	-
				BH1.1.3E	0,00	+	3,4	-
BH1.1.4	37,9	CCDP (Corrida 2x)	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (12:8:6:6:1) + 4 gotas de NH <sub>4</sub> OH	BH1.1.4A	0,75	+	4,0	Composto 7
				BH1.1.4B <sub>1</sub>	0,58	+	3,8	Composto 8
				BH1.1.4B <sub>2</sub>	0,53	-	3,2	Compostos 8 e 20
				BH1.1.4C	0,45	-	1,1	Compostos 6 e 11
				BH1.1.4D	0,02	+	1,1	-
BH1.1.5	8,0	CCDP	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (12:8:6:14:1) + 4 gotas de NH <sub>4</sub> OH	BH1.1.5A	0,64	+	0,7	-
				BH1.1.5B	0,37	+	1,2	-
BH1.1.6	14,3	CCDP	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (12:8:6:14:1) + 4 gotas de NH <sub>4</sub> OH	BH1.1.6A	0,75	-	6,2	-
				BH1.1.6B	0,61	+	3,3	-
				BH1.1.6C	0,51	+	2,2	-
BH1.2	19,8	CCDP	Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (1:1:4) + 4 gotas de NH <sub>4</sub> OH	BH1.2A	0,77	-	6,6	-
				BH1.2B	0,60	+	6,5	-
				BH1.2C	0,50	+	2,2	-
BH2	17,3	CCDP (Corrida 2x)	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (4:6:6:8:1) + 4 gotas de NH <sub>4</sub> OH	BH2A	0,80	+	2,8	Composto 7
				BH2B	0,71	+	5,3	Compostos 3 e 8
				BH2C	0,63	+	2,5	Composto 8 e 20
				BH2D	0,57	+	1,0	Composto 20
				BH2E	0,50	+	0,5	Compostos 6 e 11
				BH2F	0,43	+	0,7	-
				BH2G	0,30	+	0,6	-
				BH2H	0,19	+	3,1	-
				BH2I	0,06	+	1,3	-
				BH2J	0,00	-	1,0	-

Continuação da **tabela B<sub>3</sub>**

<b>BH3.1</b>	7,6	CCDP	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (3:1,5:1,5:3:0,25) + 6 Gotas de NH <sub>4</sub> OH	BH3.1A	0,56	+	4,5	<b>Composto 7</b>
				BH3.1B	0,47	+	1,5	<b>Composto 3</b>
<b>BH3.2</b>	11,4	CCDP	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (3:1,5:1,5:3:0,25) + 6 Gotas de NH <sub>4</sub> OH	BH3.2A	0,70	+	2,2	<b>Composto 7</b>
				BH3.2B	0,68	-	1,0	-
				BH3.2C	0,54	-	1,0	<b>Composto 3</b>
				BH3.2D	0,45	+	1,1	<b>Composto 8</b>
				BH3.2E	0,36	-	2,0	-
<b>BH3.3.1</b>	25,1	CCDP	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt (3:1,5:1,5:3) + 6 gotas de NH <sub>4</sub> OH	BH3.3.1A	0,76	-	2,4	-
				BH3.3.1B	0,69	-	3,2	-
				BH3.3.1C	0,46	+	0,7	-
				BH3.3.1D	0,33	+	1,0	<b>Composto 8</b>
				BH3.3.1E	0,19	+	1,7	<b>Composto 15</b>
				BH3.3.1F	0,10	+	1,4	-
<b>BH3.3.2</b>	64,8	CCDP (Corrida 2x)	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt (3:1,5:1,5:3) + 6 gotas de NH <sub>4</sub> OH	BH3.3.2A	0,56	+	4,9	<b>Compostos 8 e 9</b>
				BH3.3.2B	0,49	+	7,4	<b>Compostos 6 e 11</b>
				BH3.3.2C	0,44	+	7,0	<b>Composto 12</b>
				BH3.3.2D	0,38	+	6,3	-
<b>BH3.4.1</b>	35,6	CCDP (Corrida 2x)	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt (3:2:2:2)	BH3.4.1A	0,75	-	2,1	-
				BH3.4.1B	0,67	-	4,3	-
				BH3.4.1C	0,60	-	2,7	-
				BH3.4.1D	0,50	+	0,9	<b>Composto 8</b>
				BH3.4.1E	0,40	-	1,9	-
				BH3.4.1F	0,28	+	0,7	-
				BH3.4.1G	0,03	+	1,1	-

**Tabela B<sub>4</sub>:** Sistemas de eluição de solventes, fatores de retenção e rendimentos em massa dos compostos isolados das frações e subfrações de BA

Fração	Peso (mg)	Técnica Cromatográfica	Fase móvel	Compostos Isolados/Siglas	R <sub>f</sub>	Reativo para Dragendorff	Peso (mg)	Compostos isolados
<b>BAppt</b>	133,8	-	Precipitado	BAppt	-	+	133,8	<b>Composto 10</b>
<b>BA1</b>	74,2	CCDP	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (4:3:3:6:1) + 6 gotas de NH <sub>4</sub> OH	BA1A	0,66	+	3,1	<b>Composto 15</b>
				BA1B	0,31	-	2,3	-
				BA1C	0,16	+	1,5	<b>Composto 1</b>
				BA1D	0,09	+	1,2	-
				BA1E	0,06	-	1,0	-
				BA1F	0,00	+	3,1	-
<b>BA2.1ppt</b>	45,0	CCDP	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt:MeOH (1:1:4:1) + 6 gotas de NH <sub>4</sub> OH	BA2.1pptA	0,58	+	1,2	-
				BA2.1pptB	0,53	+	1,0	-
				BA2.1pptC	0,47	+	2,3	<b>Compostos 6 e 11</b>
				BA2.1pptD	0,14	+	1,4	<b>Compostos 12 e 15</b>
<b>BA2.1</b>	16,7	CCDP	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt (6:3:3:3) + 6 gotas de NH <sub>4</sub> OH	BA2.1A	0,55	+	1,0	-
				BA2.1B	0,38	+	0,7	-
				BA2.2A	0,82	+	1,8	-
				BA2.2B	0,72	+	1,9	<b>Composto 7</b>
<b>BA2.2</b>	22,4	CCDP	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt (6:3:3:4) + 6 gotas de NH <sub>4</sub> OH	BA2.2C	0,62	+	0,5	-
				BA2.2D	0,57	+	2,5	<b>Composto 3</b>
				BA2.2E	0,49	+	0,6	-
				BA2.2F	0,40	-	2,2	-
				BA2.2G	0,13	-	1,0	-
				BA2.2H	0,00	-	8,8	-
<b>BA2.3ppt</b>	46,4	-	Precipitado	BA2.3ppt	-	+	46,4	<b>Composto 10</b>
<b>BA2.3.1</b>	50,5	CCDP (Corrida 2x)	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (6:5:3:7:8 gotas) + 4 gotas de NH <sub>4</sub> OH	BA2.3.1A	0,77	+	6,7	<b>Composto 7</b>
				BA2.3.1B	0,70	+	3,4	<b>Composto 3</b>
				BA2.3.1C	0,64	+	2,4	<b>Compostos 6 e 11</b>
				BA2.3.1D	0,56	+	14,3	<b>Composto 6</b>
				BA2.3.1E	0,30	+	5,7	<b>Composto 5</b>
				BA2.3.1F	0,20	+	2,8	-
				BA2.3.1G	0,01	+	10,4	-

Continuação da **tabela B<sub>4</sub>**

<b>BA2.3.2</b>	19,6	CCDP (Corrida 2x)	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (6:5:3:7:8 gotas) + 4 gotas de NH <sub>4</sub> OH	BA2.3.2A	0,84	+	1,0	<b>Composto 7</b>
				BA2.3.2B	0,66	+	6,5	<b>Composto 8</b>
				BA2.3.2C <sub>1</sub>	0,53	+	3,0	<b>Composto 11</b>
				BA2.3.2C <sub>2</sub>	0,40	+	6,0	-
				BA2.3.2D	0,21	+	1,4	-
				BA2.3.2E	0,18	+	1,9	-
				BA2.3.2F	0,02	+	2,2	-
<b>BA2.3.3</b>	21,9	CCDP (Corrida 2x)	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (6:5:3:7:8 gotas) + 4 gotas de NH <sub>4</sub> OH	BA2.3.3A	0,86	+	10,2	<b>Composto 8</b>
				BA2.3.3B	0,71	+	5,9	<b>Composto 12</b>
				BA2.3.3C	0,55	+	1,1	<b>Compostos 7 e 12</b>
				BA2.3.3D	0,43	+	0,9	-
				BA2.3.3E	0,05	+	5,0	-
<b>BA2.3.4</b>	41,3	CCDP (Corrida 3x)	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt:MeOH (6:5:3:7:8 gotas) + 4 gotas de NH <sub>4</sub> OH	BA2.3.4A	0,60	+	10,0	<b>Compostos 7 e 12</b>
				BA2.3.4B	0,46	-	2,8	-
				BA2.3.4C	0,35	+	0,5	-
				BA2.3.4D	0,03	-	0,5	-
				BA2.3.4E	0,02	+	2,3	-
<b>BA2.3.5</b>	18,2	CCDP (Corrida 2x)	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt (18:1:1)	BA2.3.5A	0,58	-	1,0	-
				BA2.3.5B	0,45	-	1,1	-
				BA2.3.5C	0,06	-	1,0	-
				BA2.3.5D	0,02	+	2,1	-
<b>BA2.4ppt</b>	5,7	-	Precipitado	BA2.4ppt	-	+	5,7	<b>Composto 10</b>
<b>BA2.4.1</b>	1,6	-	Precipitado da CC	BA2.4.1	-	+	1,6	<b>Composto 21</b>
<b>BA2.5.1.1</b>	305,9	CCDP (Corrida 3x)	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO:AcOEt (3:2:1:1)	BA2.5.1.1A	0,26	+	2,0	-
				BA2.5.1.1B	0,03	+	3,5	-
				BA2.5.1.1C	0,00	+	12,3	-
<b>BA2.5.2</b>	45,5	CCDP (Corrida 2x)	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt:MeOH (1:1:4:1)	BA2.5.2A	0,80	-	3,0	-
				BA2.5.2B	0,74	+	1,0	<b>Composto 22</b>
				BA2.5.2C	0,64	-	2,3	-
				BA2.5.2D	0,52	-	1,2	-
				BA2.5.2E	0,15	-	1,1	-
				BA2.5.2F	0,11	-	0,9	-
				BA2.5.2G	0,05	+	1,0	-