



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Estudo fitoquímico das partes aéreas de *Worsleya procera* (Lem.) Traub (Amaryllidaceae)

CAROLINA TORRES MORAES

Dissertação de Mestrado em Química

Vitória

2016

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

Estudo fitoquímico das partes aéreas de *Worsleya procera* (Lem.) Traub (Amaryllidaceae)

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Mestranda: Carolina Torres Moraes

Orientador: Prof. Dr. Warley de Souza Borges

Vitória
2016

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Marli Pinheiro Torres e Hélio Correa Moraes, e minha irmã Marcela Torres Moraes, pelo carinho e apoio, principalmente durante as fases de dificuldades. Por serem a minha principal fonte de inspiração e os principais responsáveis por todos os meus objetivos até hoje alcançados.

Ao Prof. Dr. Warley de Souza Borges pela orientação e oportunidade de aprendizado no seu laboratório.

Ao Dr. Jean de Andrade pela confiança e compreensão. Por ter comigo partilhado seus conhecimentos e experiências fundamentais na minha formação. Pela grande amizade e bons momentos.

Às minhas amigas e companheiras de laboratório, Vanessa Dias dos Santos e Andressa Reis, pelos momentos bons e ruins, preocupações, alegrias, dúvidas, confidências, apoio, enfim, obrigado pela amizade e companheirismo. Fica desde já uma saudade grande dos momentos que passamos e enfrentamos juntas.

Ao meu irmão gringo do laboratório, David Raigh Florez, pela amizade e risadas infinitas. Com você esses anos do mestrado foram mais divertidos. Vou sentir saudade.

À todos os amigos do laboratório de Produtos Naturais, Eduardo Cole, Marcos Vinícios Lacerda, Letícia Carlesso Sobrani, Carliane Dal Piero, Haloísio Vargas e Karla Gonring, pela companhia, momentos de descontração e pela ajuda nos experimentos.

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

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

Ao laboratório de RMN do NCQP-UFES e todos os envolvidos nas análises de RMN, muito obrigada.

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

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins pelos testes de atividade biológica.

Ao Prof. Dr. Javier Ellena pelas análises de cristalografia de Raio-X dos alcaloides.

Á UFES e ao programa de pós-graduação em Química pela oportunidade na construção do meu conhecimento.

Á CAPES e a FAPES pelo incentivo financeiro.

Enfim, a todos que de alguma maneira participaram direta ou indiretamente da realização desse estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	7
LISTA DE TABELAS.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS	17
RESUMO	19
ABSTRACT.....	21
1. Introdução.....	23
1.1 Produtos Naturais	23
1.2 Família Amaryllidaceae.....	27
1.2.1 Alcaloides presentes em Amaryllidaceae	29
1.3 Espécie <i>Worsleya procera</i> (Lem.) Traub	34
2. Objetivos.....	36
2.1 Objetivo Geral	36
2.2 Objetivos Específicos.....	36
3. Parte Experimental	37
3.1 Solventes utilizados	37
3.2 Cromatografia em Camada Delgada	37
3.3 Cromatografia Líquida em Coluna e Cromatografia Líquida à Vácuo...	38
3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	38

3.5 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas	39
3.6 Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio	39
3.7 Dicroísmo Circular	40
3.8 Coleta e identificação da planta	40
3.9 Obtenção dos extratos brutos	41
3.10 Extração ácido-base dos extratos.....	41
3.11 Obtenção dos alcaloides.....	43
3.11.1 Caule	44
3.11.1.1 Extrato hexânico do Caule.....	44
3.11.1.2 Extrato acetato de etila do caule da planta	49
3.11.2 Folhas.....	56
3.11.2.1 Extrato hexânico das folhas da planta	56
3.11.2.2 Extrato acetato de etila das folhas da planta	59
3.12 Avaliação de atividade antimicrobiana	68
4. Resultados e Discussão	70
4.1 Rendimentos dos extratos	70
4.2 CG – EM	71
4.3 Compostos isolados.....	74
4.3.1 Composto 3	75
4.3.2 Composto 4	81
4.3.3 Composto 5	85
4.3.4 Composto 1	90

4.3.5 Composto 15	95
4.3.6 Composto 16	99
4.3.7 Composto 9	102
4.3.8 Composto 2	106
4.3.9 Composto 6	111
4.3.10 Composto 7	114
4.3.11 Composto 8	118
4.3.12 Composto 10	121
4.3.13 Composto 13	127
4.3.14 Composto 20	131
4.3.15 Composto 12	136
4.3.16 Composto 17	143
4.3.17 Composto 18 e 19	148
4.3.18 Composto 11	153
4.3.19 Composto 14	157
4.2.20 Composto 21	161
4.4 Avaliação de atividade antimicrobiana	165
4.5 Resumo dos resultados	166
5. Conclusões	169
6. Referências Bibliográficas	170

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química dos alcaloides morfina e quinina, isolados a partir de plantas.....	24
Figura 2 - Compostos isolados de plantas utilizados no desenvolvimento de medicamentos.....	26
Figura 3 - Possíveis acoplamentos fenol oxidativos do precursor O-metilnorbeladina que origina todos os tipos de esqueletos químicos de alcaloides de Amaryllidaceae.	31
Figura 4 - Tipos de esqueletos de alcaloides de Amaryllidaceae.....	32
Figura 5 - Espécie <i>Worsleya procera</i>	35
Figura 6 - Esquema da extração ácido-base realizada com cada extrato bruto obtido das partes aéreas da planta <i>W. procera</i>	42
Figura 7 - Esquema da CLV realizada com o extrato n-Hex do caule de <i>W. procera</i>	44
Figura 8 - Esquema da CCDP submetida na fração H2.4 - C.	46
Figura 9 - Esquema da CCDP realizada com a amostra H2.5 - C.....	46
Figura 10 - Esquema cromatográfico realizado com a fração H2.6 - C.	47
Figura 11 - Esquema da CCDP executada com a amostra H2.7 - C.....	48
Figura 12 - Esquema do sistema cromatográfico realizado com a fração H2.8 - C..	49
Figura 13 - Esquema da CLV realizada com o extrato AcOEt do caule de <i>W. procera</i>	50
Figura 14 - Esquema ilustrando a CLC realizada com a amostra A2 - C.	51
Figura 15 - Esquema da CCDP efetuada na fração A2.2 - C.	51
Figura 16 - Esquema ilustrando a CCDP feita com a amostra A2.5 - C.	52
Figura 17 - Esquema da CCDP realizada com a fração A2.6 - C.....	52

Figura 18 - Esquema da CLC empregada na fração A3 - C.....	53
Figura 19 - Esquema exemplificando a CCDP realizada com a amostra A3.1 - C...	53
Figura 20 - Esquema da CCDP feita com a fração A3.3 - C.	54
Figura 21 - Esquema demonstrando a CCDP realizada com a fração A3.5 - C.....	54
Figura 22 - Esquema ilustrando a CCDP empregada com a amostra A3.6 - C.....	55
Figura 23 - Esquema detalhando a CCDP realizada com a fração A6 - C.....	55
Figura 24 - Esquema cromatográfico realizado para o isolamento dos alcaloides do extrato n-Hex das folhas de <i>W. procera</i>	56
Figura 25 - Esquema da CCDP feita com a fração H2 - F.....	57
Figura 26 - Esquema ilustrando o processo cromatográfico empregado com a amostra H4 - F para o isolamento dos alcaloides desta fração.....	58
Figura 27 - Esquema ilustrando a CCDP feita com a fração H6 - F.	59
Figura 28 - Esquema da CCDP executada com a amostra H7 - F, a fim de isolar seus constituintes.....	59
Figura 29 - Esquema mostrando a CLC realizada com o extrato AcOEt das folhas de <i>W. procera</i>	60
Figura 30 - Esquema do procedimento cromatográfico escolhido para o isolamento dos alcaloides presentes na fração A1 - F.	61
Figura 31 - Esquema ilustrando a CCDP realizada com a amostra A2 - F.....	61
Figura 32 - Esquema da CCDP realizada com a amostra A3 - F.	62
Figura 33 - Esquema ilustrando a CLC realizada com a fração A4 – F.....	63
Figura 34 - Esquema demonstrando a CCDP feita com a amostra A4.4 - F.	63
Figura 35 - Esquema da CCDP empregada para o isolamento dos alcaloides da fração A4.5 - F.....	64
Figura 36 - Esquema da CCDP realizada com a fração H4.6 - F.....	64
Figura 37 - Esquema mostrando a CCDP feita com a amostra H4.7 - F.....	64

Figura 38 - Esquema do procedimento cromatográfico empregado na fração A5 - F, onde foi realizado uma CLC gerando seis frações.....	65
Figura 39 - Esquema da CCDP realizada com a fração A5.2 - F.	66
Figura 40 - Esquema ilustrando a CCDP realizada com a fração A5.3 - F.....	66
Figura 41 - Esquema da CCDP feita com a fração A5.4 - F.....	67
Figura 42 - Esquema exemplificando a CCDP realizada com a amostra A5.5 – F...	67
Figura 43 - Esquema ilustrando a CCDP feita com a fração A5.6 - F.	67
Figura 44 - Estrutura dos alcaloides isolado a partir da espécie <i>W. procera</i>	75
Figura 45 - Espectro de RMN de ^1H do composto 3 e sua estrutura (CD_3OD , 400 MHz).	76
Figura 46 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto 3 (CD_3OD , 400 MHz).....	77
Figura 47 – Precipitação do alcaloide licorina obtido por fracionamento em coluna.	78
Figura 48 – Parte da biossíntese de alcaloides com esqueleto do tipo licorina.....	80
Figura 49 - Espectro de RMN de ^1H do composto 4 e sua estrutura (CDCl_3 , 400 MHz).....	82
Figura 50 - Parte da biossíntese do alcaloide galantina.	84
Figura 51 - Análise por cristalografia do alcaloide galantina.	84
Figura 52 - Espectro de RMN de ^1H do composto 5 e sua estrutura (CDCl_3 , 400 MHz).....	86
Figura 53 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto 5 (CDCl_3 , 400 MHz).....	87
Figura 54 - Cristais de tazetina obtidos da coluna cromatográfica, realizada com a amostra A5-F.....	88
Figura 55 – Parte da rota biossintética dos alcaloides com esqueleto do tipo tazetina.....	90

Figura 56 - Espectro de RMN de ^1H do composto 1 e sua estrutura (CDCl_3 , 400 MHz).....	92
Figura 57 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto 1 (CDCl_3 , 400 MHz).....	93
Figura 58 - Espectro de RMN de ^1H do composto 15 e sua estrutura (CDCl_3 , 400 MHz).....	96
Figura 59 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto 15 (CDCl_3 , 400 MHz).....	97
Figura 60 - Espectro de RMN de ^1H do composto 16 e sua estrutura (CDCl_3 , 400 MHz).....	100
Figura 61 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto 16 (CDCl_3 , 400 MHz).....	101
Figura 62 - Espectro de RMN de ^1H do composto 9 e sua estrutura (CDCl_3 , 400 MHz).....	103
Figura 63 - Parte da biossíntese de alcaloides com esqueleto do tipo homolicorina.	106
Figura 64 - Espectro de RMN de ^1H do composto 2 e sua estrutura (CDCl_3 , 400 MHz).....	107
Figura 65 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto 2 (CDCl_3 , 400 MHz).....	108
Figura 66 - Cristais do alcaloide albomaculina, obtidos por coluna cromatográfica.	110
Figura 67 - Análise por cristalografia do alcaloide albomaculina.....	110
Figura 68 - Espectro de RMN de ^1H do composto 6 e sua estrutura (CDCl_3 , 400 MHz).....	112
Figura 69 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto 6 (CDCl_3 , 400 MHz).....	113

Figura 70 - Espectro de RMN de ^1H do composto 7 e sua estrutura (CDCl_3 , 400 MHz).....	115
Figura 71 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto 7 (CDCl_3 , 400 MHz).....	116
Figura 72 - Espectro de RMN de ^1H do composto 8 e sua estrutura (CDCl_3 , 400 MHz).....	119
Figura 73 - Espectro de RMN de ^1H do composto 10 e sua estrutura (CDCl_3 , 400 MHz).....	123
Figura 74 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto 10 (CDCl_3 , 400 MHz).....	124
Figura 75 - Espectro de NOESY do composto 10 , onde as seta indicam a correlação NOESY do H-10 com o grupo OMe, com o H-10b e com o grupo NMe (CDCl_3 , 400 MHz).....	125
Figura 76 - Espectro de RMN de ^1H do composto 13 e sua estrutura (CDCl_3 , 400 MHz).....	128
Figura 77 - Espectro de NOESY do composto 13 , onde as setas indicam a correlação NOESY do H-10 com o grupo OMe, com o H-10b e com o grupo NMe (CDCl_3 , 400 MHz).....	129
Figura 78 - Espectro de RMN de ^1H do composto 20 e sua estrutura (CDCl_3 , 400 MHz).....	132
Figura 79 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto 20 (CDCl_3 , 400 MHz).....	133
Figura 80 - Espectro de NOESY do composto 20 , onde a seta indica a correlação NOESY do H-10 com o grupo OMe aromático (CDCl_3 , 400 MHz).	134
Figura 81 - Estrutura do alcaloide 8-O-desmetil-2 α -hidroxihomolicorina (I) e do alcaloide 9-O-desmetil-2 α -hidroxihomolicorina (II).	135
Figura 82 - Espectro de RMN de ^1H do composto 12 e sua estrutura (CDCl_3 , 400 MHz).....	138

Figura 83 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto 12 (CDCl_3 , 400 MHz).....	139
Figura 84 - Análise por dicroísmo circular do composto 12	141
Figura 85 - Biossíntese dos alcaloides da série crinano.....	142
Figura 86 - Espectro de RMN de ^1H do composto 17 e sua estrutura (CDCl_3 , 400 MHz).....	144
Figura 87 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto 17 (CDCl_3 , 400 MHz).....	145
Figura 88 - Análise por dicroísmo circular do composto 17	146
Figura 89 - Estrutura química do alcaloide vittatina.....	146
Figura 90 - Espectro de RMN de ^1H dos compostos 18 e 19 e suas estruturas (CDCl_3 , 400 MHz).....	149
Figura 91 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H dos compostos 18 e 19 (CDCl_3 , 400 MHz).....	150
Figura 92 - Análise por dicroísmo circular, dos compostos 18 e 19	151
Figura 93 - Espectro de RMN de ^1H do composto 11 e sua estrutura (CDCl_3 , 400 MHz).....	154
Figura 94 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto 11 (CDCl_3 , 400 MHz).....	155
Figura 95 - Espectro de RMN de ^1H do composto 14 e sua estrutura (CDCl_3 , 400 MHz).....	158
Figura 96 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto 14 (CDCl_3 , 400 MHz).....	159
Figura 97 - Biossíntese resumina do alcaloide ismina.....	161
Figura 98 - Espectro de RMN de ^1H do composto 21 e sua estrutura (CDCl_3 , 400 MHz).....	162

Figura 99 – Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto **21** (CDCl_3 , 400 MHz)..... 163

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Massa de cada parte da planta <i>Worsleya procera</i> (Lem.) Traub coletada na cidade de Petrópolis - Rio de Janeiro.....	40
Tabela 2 - Massa dos extratos brutos de cada parte da planta e os respectivos rendimentos.....	70
Tabela 3 - Massa dos extratos de cada parte da planta e os respectivos rendimentos com base no extrato bruto.....	71
Tabela 4 - Resultado da análise de CG - EM do extrato acetato e extrato hexânico das folhas da planta <i>Worsleya procera</i> (Lem.) Traub.....	72
Tabela 5 - Resultado da análise de CG - EM do extrato acetato e extrato hexânico do caule da planta <i>Worsleya procera</i> (Lem.)Traub.	73
Tabela 6 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto 3 , e do alcaloide licorina.....	79
Tabela 7 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto 4 , e do alcaloide galantina.....	83
Tabela 8 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto 5 , e do alcaloide tazetina.....	89
Tabela 9 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto 1 , e do alcaloide 3-epimacronina.	94
Tabela 10 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto 15 , e o alcaloide 6-O-metilpretazetina.....	98
Tabela 11 – Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto 16 , e do alcaloide pretazetina.	102
Tabela 12 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto 9 , e do alcaloide homolicorina.....	105

Tabela 13 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto 2 , e do alcaloide albomaculina.	109
Tabela 14 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto 6 , e do alcaloide hippeastrina.....	114
Tabela 15 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto 7 , e o alcaloide O-metillicorenina.	118
Tabela 16 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto 8 , e o alcaloide 7-metóxi-O-metillicorenina.	121
Tabela 17 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto 10 , e o alcaloide 8-O-desmetilhomolicorina.	126
Tabela 18 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto 13 , e o alcaloide 8-O-desmetil-O-metillicorenina.....	130
Tabela 19 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto 20 , e o alcaloide 9-O-desmetil-2 α -hidroxihomolicorina.	136
Tabela 20 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto 12 , e o alcaloide haemantamina.	140
Tabela 21 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto 17 , e o alcaloide vittatina.....	147
Tabela 22 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto 18 e 19 , e os alcaloides haemantidina e 6-epihaemantidina.....	152
Tabela 23 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto 11 , e o alcaloide trisfaeridina.....	156
Tabela 24 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto 14 , e o alcaloide ismina.....	160
Tabela 25 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto 21 , e do alcaloide N-formilismina, onde os deslocamentos da esquerda se referem ao isômero em maior proporção.....	164

Tabela 26 – Resultado da atividade antimicrobiana dos alcaloides testados: 3-epimacronina (1), albomaculina (2), licorina (3), galatina (4), tazetina (5), hippeastrina (6), O-metillicorenina (7), 7-metoxi-O-metillicorenina (8) e 8-O-desmetilhomolicorina (10). 166

Tabela 27 - Massas totais dos alcaloides obtidos a partir das partes aéreas da planta *W. procera*..... 168

LISTA DE ABREVIATURAS

AChe	Enzima acetilcolinesterase
AcOEt	Acetato de Etila
ATCC	American Type Culture Collection
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CD₃OD	Metanol deuterado
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CG - EM	Cromatografia Gasosa Acoplada á Espectrometria de Massas
CH₂Cl₂	Diclorometano
CHCl₃	Clorofórmio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLC	Cromatografia Líquida em Coluna
CLV	Cromatografia Líquida á Vácuo
d	Dubleto
DC	Dicroísmo circular
dd	Duplo dubleto
ddd	Duplo dubleto de dubleto
dl	Dubleto largo
DMSO	Dimetilsulfóxido
dt	Duplo tripleto
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
J	Constante de acoplamento
m	Multiplete
MeOH	Metanol

Me₂CO	Acetona
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standard
NH₄OH	Hidróxido de amônio
n-Hex	n-Hexano
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
OH	Grupo hidroxila
OMe	Grupo metoxila
PAL	Fenilalanina amônio liase
q	Quadrupletto
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Singleto
sl	Singleto largo
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
UV	Ultravioleta

RESUMO

Muitos compostos naturais têm apresentado interessantes atividades biológicas e farmacológicas, sendo considerados alvos importantes e uma das maiores fontes de novos fármacos, usados diretamente ou indiretamente, como ponto de partida para o desenvolvimento de novos medicamentos. Dos compostos vegetais com potencial biológico, os alcaloides presentes na família Amaryllidaceae são especialmente efetivos, como por exemplo, o alcaloide galantamina, um inibidor seletivo, reversível e competitivo da enzima acetilcolinesterase, sendo comercializado para o tratamento da doença de Alzheimer. Nenhum estudo de caracterização química e biológica da planta *Worsleya procera* (Lem.) Traub (Amaryllidaceae) foi encontrado na literatura e desta forma, com o objetivo de caracterização fitoquímica desta planta, diversas técnicas cromatográficas foram empregadas em seus extratos para o isolamento e identificação dos alcaloides. Como resultado, foram isolados 19 alcaloides e uma mistura de dois alcaloides epímeros (**18** e **19**) a partir das partes aéreas de *W. procera*: 3-epimacronina (**1**), albomaculina (**2**), licorina (**3**), galantina (**4**), tazetina (**5**), hippeastrina (**6**), O-metillicorenina (**7**), 7-metoxi-O-metillicorenina (**8**), homolicorina (**9**), 8-O-desmetilhomolicorina (**10**), trisfaeridina (**11**), haemantamina (**12**), 8-O-desmetil-O-metillicorenina (**13**), ismina (**14**), 6-O-metilpretazetina (**15**), pretazetina (**16**), alcaloide com esqueleto do tipo haemantamina (**17**), haemantidina (**18**), 6-epihaemantidina (**19**), 8-O-desmetil-2 α -hidroxihomolicorina (**20**) e N-fomilismina (**21**), onde suas estruturas foram elucidadas através da técnica de RMN de ^1H uno e bidimensional e em comparação com dados da literatura. O alcaloide 8-O-desmetil-2 α -hidroxihomolicorina (**20**) é relatado pela primeira vez a partir de fonte natural. Nove alcaloides isolados (Tazetina, 3-epimacronina, albomaculina, licorina, galantina, hippeastrina, O-metillicorenina, 7-metoxi-O-metillicorenina e 8-O-desmetilhomolicorina) foram avaliados quanto a atividade antimicrobiana, apresentando todos atividade fraca, quando comparado ao controle positivo. A técnica de CG-EM mostrou ser uma técnica rápida e eficiente de identificação de alcaloides, uma vez que, os resultados das análises dos extratos da planta

W.procera verificaram que os alcaloides majoritários eram os alcaloides com esqueleto do tipo homolicorina, esqueleto com tipo licorina e esqueleto do tipo tazetina, o que foi confirmado pelas massas totais dos alcaloides obtidos.

PALAVRAS-CHAVES: Amaryllidaceae, Alcaloides, *Worsleya procera*, Fitoquímica, RMN de ^1H , CG-EM.

ABSTRACT

Many natural compounds have shown interesting biological and pharmacological activities and are considered important targets and one of the largest sources of new drugs, used directly or indirectly as a starting point for developing new drugs. Of plant compounds with biological potency, the alkaloids present in the Amaryllidaceae family are especially effective, for example, the alkaloid galanthamine, a selective, reversible and competitive inhibitor of the enzyme acetylcholinesterase and is marketed for the treatment of Alzheimer's disease. No study of chemical and biological characterization of the plant *Worsleya procera* (Lem.) Traub (Amaryllidaceae) was found in the literature and thus, for the purpose of phytochemical characterization of this plant, various chromatographic techniques were used in their extracts for the isolation and identification of alkaloids. As a result, 19 alkaloids and a mixture of two epimers alkaloids (**18** and **19**) were isolated from the aerial parts of *W. procera*: 3-epimacronine (**1**), albomaculine (**2**), lycorine (**3**), galanthine (**4**), tazettine (**5**), hippeastrine (**6**), O-methyllycorenine (**7**), 7-methoxy-O-methyllycorenina (**8**), homolycorine (**9**), 8-O-demethylhomolycorine (**10**), trisphaeridine (**11**), haemanthamine (**12**), 8-O-demethyl-O-methyllycorenine (**13**), ismine (**14**), 6-O-methylpretazettine (**15**), pretazettine (**16**), alkaloid with skeleton type haemanthamine (**17**), haemanthidine (**18**), 6-epihaemanthidine (**19**), 8-O-demethyl-2 α -hydroxyhomolycorine (**20**) e N-fomylistmine (**21**), where their structures could be elucidated by the ^1H NMR technique one- and two-dimensional, in compared with literature data. The alkaloid 8-O-demethyl-2 α -hydroxyhomolycorine is reported for the first time from natural source. Nine isolated alkaloids (Tazettine, 3-epimacronine, albomaculine, lycorine, galanthine, hippeastrine, O-methyllycorenine, 7-methoxy-O-methyllycorenina and 8-O-demethylhomolycorine) were evaluated for antimicrobial activity, with all weak activity when compared to positive control. The GC-MS technique proved to be a rapid and efficient technical alkaloids identification, since the analysis results of *W. procera* plant extracts found that the majority were alkaloids

with skeleton homolicorina type, skeleton lycorine type and skeleton tazetina type, which was confirmed by the total mass of alkaloid obtained.

KEYWORDS: Amaryllidaceae, Alkaloids, *Worsleya procera*, Phytochemistry, ¹H NMR, GC-MS.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Produtos Naturais

O emprego pelo homem de produtos naturais vem desde seus primórdios, principalmente na busca pelo alívio de algumas enfermidades através da ingestão de ervas e folhas (VIEGAS *et al*, 2006). Relatos do uso de plantas são encontrados em todas as culturas, como no caso da utilização da espécie *Papaver somniferum* pela Civilização Suméria há aproximadamente 4000 a.C., por suas propriedades soníferas e analgésicas (PINTO *et al*, 2002; THEIS e LERDAU, 2003).

Evidências arqueológicas mostram que Nozes de bétel (*Areca catechu* L.), uma planta que contém substâncias psicoativas, eram mascaradas no Timor há aproximadamente treze mil anos, e artefatos no Equador datam o uso de folhas de coca há cerca de cinco mil anos atrás (PINTO *et al*, 2002).

Na Grécia antiga, o filósofo e médico grego Hipócrates, utilizava espécies vegetais, como as cascas e folhas do salgueiro (*Salix alba*) para o tratamento de febre, e para aliviar as dores do parto. E extratos de plantas eram empregados em execuções, como no caso de Sócrates, que morreu após a ingestão de uma bebida à base de cicuta, que continha a coniina (*Conium maculatum*) (VIEGAS *et al*, 2006; MACIEL *et al*, 2007; AWAN *et al*, 2016).

Na cultura indígena, as cascas secas da espécie *Cinchona succiruna* eram utilizadas para o tratamento de alguns tipos de febre, e várias espécies de *Strychnos* e *Chondodendron* americanas e africanas, eram utilizadas para produzir o curare, cuja função era produzir flechas envenenadas para caça e pesca. Os índios sul-americanos utilizavam largamente rapés e bebidas alucinógenas, principalmente em suas práticas religiosas, como as sementes de *Piptedemia peregrina* (Leguminosae) que eram torradas e moídas para a produção do rapé, cujo princípio ativo é a bufotenina (PINTO A. C., 1995; MACIEL *et al*, 2007).

Em meados do século XVI, o médico suíço Paracelso, considerado pai da físico-química, foi o primeiro a propor a extração de produtos naturais bioativos a partir de fontes vegetais. Somente a partir do século XIX, com o desenvolvimento da química farmacêutica, o uso de plantas como medicamentos passou a envolver o isolamento de compostos ativos, principalmente ácidos orgânicos e alcaloides (PINTO et al, 2002; HOSTETTMANN et al, 2003; VIEGAS et al, 2006; MACIEL et al, 2007).

O primeiro composto isolado foi o alcaloide morfina (Figura 1), da espécie *Papaver somniferum*, realizado pelo pesquisador Friedrich Wilhelm Sertürner em 1806. Este foi um acontecimento marcante, sendo a primeira demonstração científica que a atividade biológica de uma planta poderia ser atribuída a uma substância isolada a partir dela, o princípio ativo (VIEGAS et al, 2006; HOSTETTMANN et al, 2003; PATRIDGE et al, 2016).

Desde então, diversos outros compostos com potencial farmacológico foram isolados, como a aconitina, com propriedade amebicida, emetina um agente antiemético, atropina que detém ação anticolinérgica e digitoxina, com propriedade cardiotônica (MACIEL et al, 2007). Sendo um marco histórico importante o isolamento da quinina das cascas de *Cinchona succiruna* em 1820, por Pierre J. Pelletier e Joseph B. Caventou, que durante quase trezentos anos foi à única substância eficaz contra a malária (Figura 1) (PINTO et al, 2002, VIEGAS et al, 2006; BARREIRO e FRAGA, 1999).

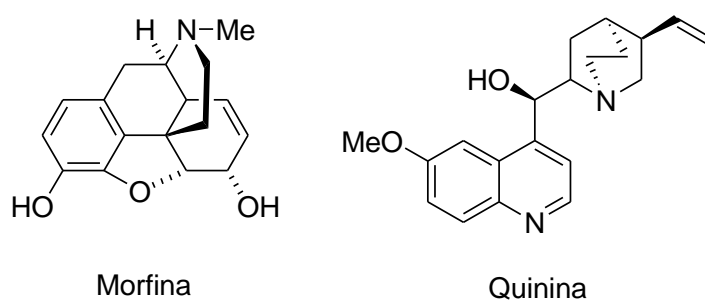


Figura 1 - Estrutura química dos alcaloides morfina e quinina, isolados a partir de plantas.

Normalmente, as substâncias às quais são atribuídas as funções terapêuticas, são metabólitos secundários produzidos pelas plantas e compreendem uma diversificada gama de estruturas químicas complexas, cujo número total em plantas foi estimado acima de 500 mil (LUCKNER, M., 1990; MARIENHAGEN e BOTT, 2013).

Os metabólitos secundários não estão diretamente ligados ao crescimento, desenvolvimento e reprodução das plantas, e sim, são biossintetizados em detrimento de alguns aspectos ecológicos e evolutivos, como para proteção da planta contra radiação ultravioleta e agentes de defesa contra herbívoros, insetos, bactérias e fungos (DEMAIN e FANG, 2000; MANACH *et al*, 2004; MARIENHAGEN e BOTT, 2013). Podem ser classificados de acordo com suas vias biossintéticas e incluem, resumidamente, os compostos fenólicos, terpenos e alcaloides (LUCKNER, M., 1990).

Como muitos destes compostos naturais têm apresentado interessantes atividades biológicas e farmacológicas, eles são vistos como alvo importante e uma das maiores fontes de novos fármacos. Dentre os quais, os alcaloides têm se mostrado especialmente efetivos, como exemplo, podem-se citar os alcaloides da vinca, vimblastina e vincristina, extraídos da *Catharanthus roseus* e a camptotecina, extraída de *Camptotheca acuminata*, utilizados no tratamento do câncer (GUERRA e NODARI, 2003; VIEGAS *et al*, 2006; NEWMAN e CRAGG, 2016; YUAN *et al*, 2016).

Em uma revisão recente, Newman e Gragg, demonstraram a importância dos produtos naturais para o desenvolvimento de novos fármacos. Verificam que nas últimas décadas, aproximadamente 50% dos medicamentos utilizados na clínica, provinham direta ou indiretamente de estudos de produtos naturais, incluindo nesta porcentagem vacinas e produtos biológicos. Considerando-se apenas a terapia dos processos tumorais e infecciosos, estas porcentagens são ainda maiores (NEWMAN e CRAGG, 2016).

Dentre os medicamentos comercializados atualmente, que provém de forma direta ou indireta de produtos naturais, pode-se citar o medicamento Artemether (Artemotil[®]), que é um potente antimalárico derivado da artemisinina (Figura 2),

isolada pela primeira vez de *Artemisia annua* L. (Asteraceae) em 1972. Esta espécie de planta é utilizada na medicina tradicional chinesa há 1700 anos, onde desde o isolamento da artemisinina, extensos estudos, principalmente na área de química farmacêutica e química orgânica levaram ao desenvolvimento deste medicamento. Inclusive em 2015, a pesquisadora Youyou Tu, ganhou o Prêmio Nobel em Medicina pela sua devoção em descobrir a artemisinina (YUAN *et al*, 2016; AWAN *et al*, 2016).

O ácido salicílico, ilustrado na figura 2, comercializado sob a forma de ácido acetilsalicílico (Aspirina[®]), isolado das cascas do Salgueiro-branco (*Salix alba*), espécie de planta usada no século XIX no tratamento da malária, é um dos medicamentos mais conhecidos e vendidos por todo o mundo, por suas propriedades analgésica, antitérmica e anti-inflamatória (BALUNAS e KINGHORN, 2005; MACIEL *et al*, 2007).

Pode-se citar ainda, a galantamina (Figura 2) (Reminyl[®]) isolada na Rússia na década de 1950, de *Galanthus worowii* Lorisnk (Amaryllidaceae), aprovado para o tratamento da doença de Alzheimer, por inibir a enzima acetilcolinesterase. E o medicamento Tiotropium (Spiriva[®]), utilizado no tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica, onde atua como broncodilatador e é baseado no ipratropium (Figura 2), um derivado da atropina que foi isolada de *Atropa belladonna* L. (Solanaceae) (MACIEL *et al*, 2007).

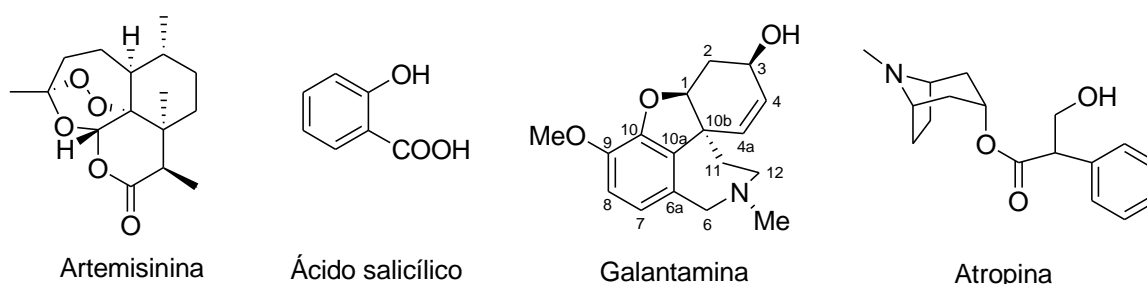


Figura 2 - Compostos isolados de plantas utilizados no desenvolvimento de medicamentos.

A fitoquímica representa a área dentro da química responsável pela obtenção e descrição dos constituintes produzidos pelas plantas. Os estudos fitoquímicos

compreendem as etapas de extração, isolamento, elucidação estrutural e identificação dos constituintes químicos da planta, permitindo identificar a espécie vegetal, bem como analisar e caracterizar frações de substâncias ativas, o que permite um grande avanço nas pesquisas de novos fármacos (OLIVEIRA *et al*, 2006).

Esta área é a mais antiga dentro da química brasileira, e o isolamento de componentes presentes nas plantas, a descoberta de suas atividades biológicas, bem como seus mecanismos de ação continuam sendo um dos maiores desafios dos profissionais de fitoquímica, química farmacêutica, bioquímica e farmacologia.

1.2 Família Amaryllidaceae

As Amaryllidaceae representam uma família de plantas monocotiledônicas, da ordem das Asparagales, que ocorrem no continente Africano e em alguns países da América do Sul, como no Brasil. Alguns gêneros ainda são encontrados na Austrália, Malásia, continente Europeu e no continente Asiático (DAHEGREN *et al*, 1985; BASTIDA *et al*, 2011; MARTINELLI e MORAES, 2013).

Segundo a classificação atual da APG (Angiosperm Phylogeny Group), esta família de planta é composta por três subfamílias: Agapanthoideae, Allioideae e Amaryllidoideae, antes consideradas separadamente como família: Agapanthaceae, Alliaceae e Amaryllidaceae, respectivamente. Assim, é comum o uso do nome Amaryllidaceae para representar somente a subfamília Amaryllidoideae, que é conhecida pelo grande potencial biológico de seus constituintes (CHASE *et al*, 2009).

Inicialmente identificada por James St. Hilaire, em 1805, hoje compreende 74 gêneros e cerca de 1100 espécies, sendo no Brasil encontrado em todas as regiões com 134 espécies representantes (BASTIDA *et al*, 2011; MARTINELLI e MORAES, 2013; BOZKURT-SARIKAYA *et al*, 2013; DUTILH e OLIVEIRA, 2014).

A família Amaryllidaceae é conhecida pela beleza de suas flores, sendo muito utilizadas na ornamentação e pelo seu alto valor medicinal. Algumas espécies são empregadas pelo homem desde a antiguidade. Relatos apontam o uso dessas plantas por Hipócrates no quarto século a.C. no tratamento do câncer, empregando o óleo extraído da espécie *Narcissus poeticus* L. (PETTIT *et al*, 1986; BASTIDA *et al*, 2011).

As tribos Zulu, sul-africanas, utilizavam várias espécies de Amaryllidaceae para diversas doenças, como afecções da pele, dor de cabeça, doenças venéreas e urinárias, inchaços, artrites e contusões em geral (HUTCHINGS *et al*, 1996).

Muitas espécies são empregadas na medicina popular, como por exemplo, a espécie *Crinum glaucum* usada como antiespasmódico, espécies do gênero *Cyrtanthus* usadas para dor de cabeça, tosse crônica e cistite; e as espécies do gênero *Gethyllis* para flatulências e indigestão (ELGORASHI e STADEN, 2004; KOORBANALLY *et al*, 2000; OKPO e ADEYEME, 1998).

A espécie *Lycoris radiata* é amplamente conhecida na medicina tradicional chinesa para o tratamento da poliomielite. Na América Central, flores de *Crinum amabile*, são utilizadas como expectorantes e seus bulbos utilizados para tratar contusões, devido ao seu efeito anti-inflamatório (MORTON, J.F., 1981; JIN, Z, 2013).

No Brasil, espécies do gênero *Hippeastrum* são popularmente utilizadas sob a forma de suco obtido de seus bulbos, como purgativo, emético e para doenças respiratórias. E algumas ainda, como a espécie *H. psittacinum* são indicadas para tosse e como estimulante sexual (CORRÊA, M. P., 1984; LORENZI e MATOS, 2002; ALBUQUERQUE *et al*, 2007; SILVA *et al*, 2012).

No continente africano, o uso de plantas na medicina tradicional é maior, principalmente espécies de Amaryllidaceae, que são amplamente distribuídas neste continente, devido à falta de medicina convencional e ao problema sócio econômico que atinge grande parte da população, o que faz com que os indivíduos procurem a medicina tradicional ao invés de um médico profissional (NAIR e VAN STADEN, 2013).

Assim, na África, espécies do gênero *Crinum*, como *C. macowanii* e *C. bulbispermum* são utilizadas para o tratamento de problemas reumáticos, artrite e doenças sexualmente transmissíveis. Espécies do gênero *Clivia* são utilizadas durante o parto, para problemas de fertilidade, infecções urinárias e picadas de cobras. A espécie *Amaryllis beladonna* é indicada como antiespasmódico e antitumoral (NAIR e VAN STADEN, 2013).

Como a maioria dessas plantas não são estudadas quanto ao efeito tóxico, algumas espécies, como a espécie *Boophane distichia* causou a morte por intoxicação entre algumas etnias africanas (NAIR e VAN STADEN, 2013).

Assim, a partir do uso histórico e popular dessas plantas, diversos estudos fitoquímicos e biológicos mostraram que compostos isolados a partir de Amaryllidaceae apresentam propriedades intrínsecas com grande potencial farmacológico, como atividade antiparasitária (OSORIO *et al*, 2010; KAYA *et al*, 2011; GIORDANI *et al*, 2012), antitumoral (MCNULTY *et al*, 2007; MCNULTY *et al*, 2009), anticolinesterásica (BOZKURT-SARIKAYA *et al*, 2013; IANNELLO *et al*, 2014), hipotensiva (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al*, 2000), dentre outras.

Este valor medicinal das espécies de Amaryllidaceae (subfamília Amaryllidoideae) é atribuído principalmente à presença de alcaloides isoquinolínicos peculiares na sua constituição, sendo esses alcaloides objeto de intensas investigações nos últimos 200 anos (PIGNI *et al*, 2010; BASTIDA *et al*, 2011; BOZKURT-SARIKAYA, 2013).

1.2.1 Alcaloides presentes em Amaryllidaceae

Uma característica particular da família Amaryllidaceae (subfamília amaryllidoideae) é a presença de alcaloides isoquinolínicos de estrutura peculiar, encontrados quase que exclusivamente nessa subfamília, sendo raros em outras espécies vegetais (BASTIDA *et al*, 2011).

Desde o isolamento do alcaloide licorina em 1877, da espécie *Lycoris radiata*, esta família tem sido estudada quanto ao seu conteúdo alcaloídico, sendo considerada uma das 20 famílias de planta mais importantes quando se trata de seu conteúdo de alcaloides (BASTIDA *et al*, 2006; JIN, Z, 2013).

Assim, como resultado de extensos estudos fitoquímicos até o momento, cerca de 500 alcaloides com diversas estruturas e ampla gama de atividades biológicas têm sido isolados da família Amaryllidaceae, sendo que das espécies existentes ainda restam muitas por serem investigadas (JIN, Z, 2013).

Extensos estudos biossintéticos na década de 1950, utilizando precursores marcados, demonstraram que os alcaloides de Amaryllidaceae eram derivados do metabolismo dos aminoácidos L-fenilalanina e L-tirosina, os quais formavam o intermediário norbeladina, representando a transição do metabolismo primário e secundário (BARTON e COHEN, 1957; BASTIDA *et al*, 2006; BASTIDA *et al*, 2011).

Como ilustrado na figura 3, o aminoácido L-fenilalanina é incorporado como aldeído protocatecuico, o que implica na perda pelo aminoácido de dois átomos de carbono e a introdução de substituintes oxigenados no anel aromático, via ácido cinâmico, sendo a eliminação da amônia realizada pela enzima PAL. E o aminoácido L-tirosina é incorporado como tirosina, depois de sofrer descarboxilação mediada pela enzima Tyr-descarboxilase, onde a condensação do aldeído com a tirosina leva a formação da norbeladina (BARTON e COHEN, 1957; BASTIDA *et al*, 2006 e BASTIDA *et al*, 2011).

Uma vez formado o intermediário chave, este é adequadamente metilado na posição 4', formando a O-metilnorbeladina, para orientar os possíveis acoplamentos fenol oxidativos intramoleculares que formam intermediários adequados para a conversão nos vários tipos de alcaloides de Amaryllidaceae (BARTON e COHEN, 1957; BASTIDA *et al*, 2006; BASTIDA *et al*, 2011).

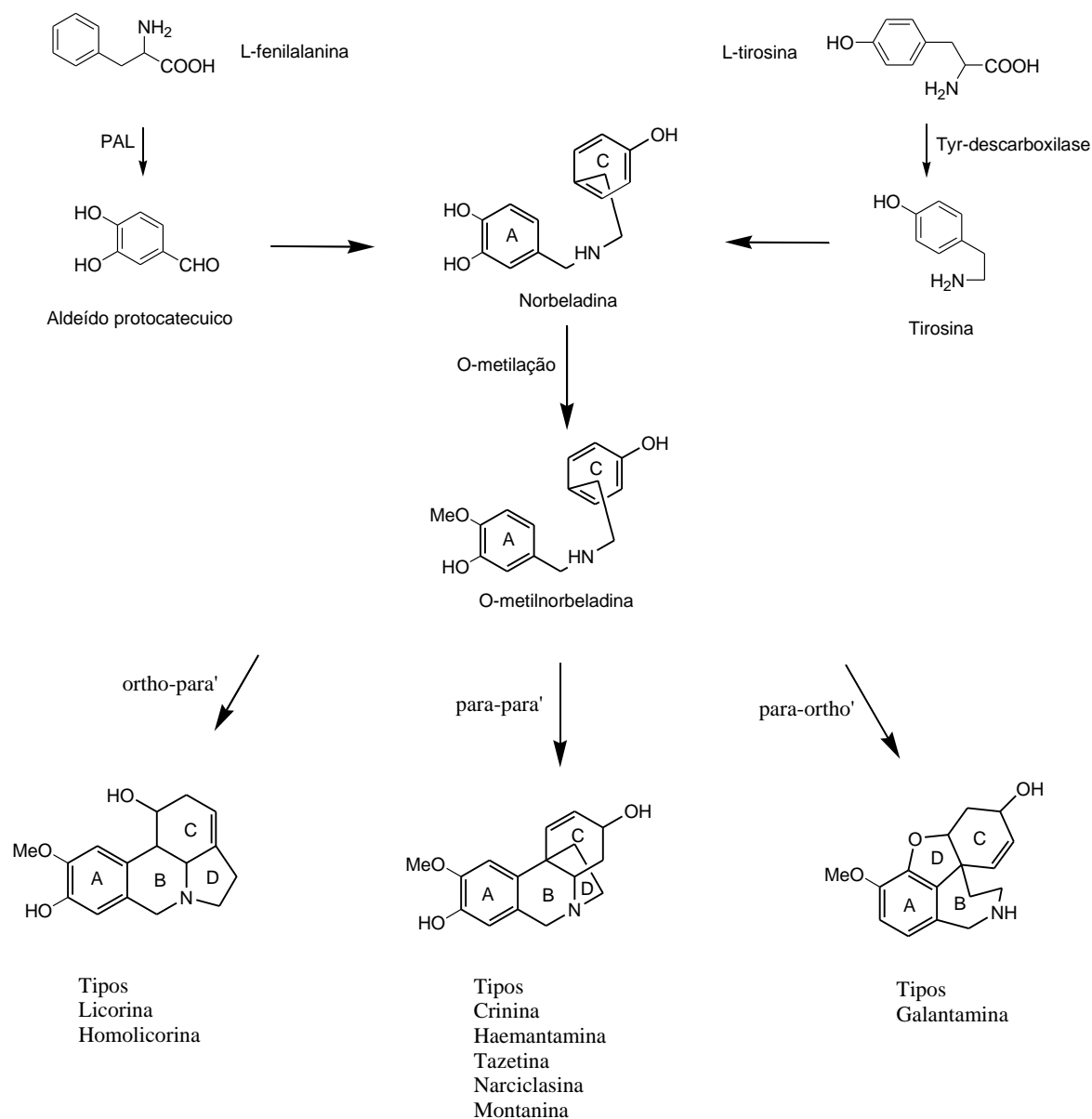


Figura 3 - Possíveis acoplamentos fenol oxidativos do precursor O-metilnorbeladina que origina todos os tipos de esqueletos químicos de alcaloides de Amaryllidaceae.

Desta forma, de acordo com a origem biossintética desses alcaloides, a partir de um precursor comum, obtêm-se diferentes esqueletos, que podem ser classificados em nove grandes grupos, como demonstrado na figura 4, onde a numeração está de acordo com o modelo de Ghosal e o tipo de acoplamento que origina cada tipo de esqueleto (GHOSAL *et al*, 1985; BASTIDA *et al*, 2011).

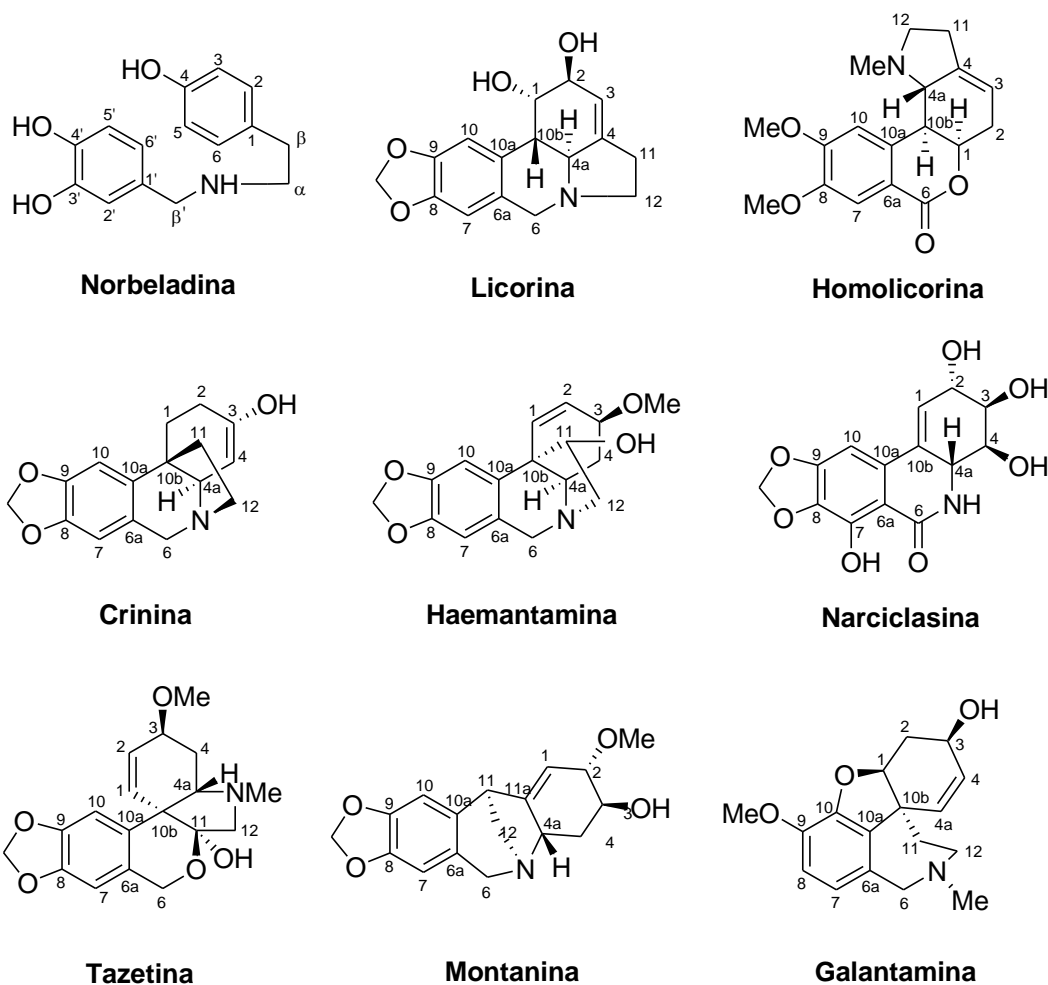


Figura 4 - Tipos de esqueletos de alcaloides de Amaryllidaceae.

Visto que a biossíntese desses alcaloides é específica, eles são quase que exclusivos desta família. Porém há exceções, tanto de alcaloides típicos de outras famílias encontrados em espécies de Amaryllidaceae, como de alcaloides típicos da família Amaryllidaceae encontrados em outras famílias de plantas (BASTIDA *et al*, 2011).

Como no caso do isolamento de alcaloides do tipo mesembrano, geralmente presentes em espécies gênero *Sceletium*, pertencente à família Aizoaceae. Onde estudos fitoquímicos isolaram o alcaloide mesembrenol da espécie *Crinum oligatum*, e o alcaloide mesembrenone, da espécie *Narcissus pallidulus* (DÖPKE *et al*, 1981; BASTIDA *et al*, 1989).

Um acontecimento marcante, verificado em 2004, foi o isolamento por KAYA e colaboradores (2004) dos compostos (-)capnoidine e (+)bulbocapnine a partir de *Galanthus nivalis*, dado que foi a primeira vez que ocorreu alcaloides isoquinolínicos clássicos em membros de Amaryllidaceae.

Um exemplo de alcaloides típicos de Amaryllidaceae encontrados em outras famílias, podemos citar o isolamento do alcaloide crinamina, um alcaloide do tipo crinina que foi isolado da espécie *Dioscorea dregeana*, da família Dioscoreaceae. Bem como, alcaloides com esqueleto do tipo homolicorina e narciclasina isolados da espécie *Hosta plantaginea* (Asparagales) (MULHOLLAND *et al*, 2002; WANG *et al*, 2007). Porém estes acontecimentos são raros, assim esses metabólitos secundários típicos desta família de plantas pode ser uma ferramenta de grande interesse em estudos quimiotaxonômicos.

Os alcaloides com esqueleto do tipo licorina e homolicorina são os grupos mais comuns em Amaryllidaceae, sendo a licorina, o alcaloide mais abundante nesta família de planta. Este alcaloide é reportado por apresentar diversas atividades biológicas, dentre as quais se destacam a atividade antitumoral, principalmente por inibir o crescimento celular e induzir a apoptose de células tumorais. Além disso, exerce efeitos antivirais, analgésicos e hipotensivos, e detem atividade antiparasitária, emética, anti-inflamatória, dentre outras (BASTIDA *et al*, 2006; LAMORAL-THEYS *et al*, 2010; BASTIDA *et al*, 2011; GIORDANI *et al*, 2012).

Com a descoberta do alcaloide galantamina, o interesse nesses alcaloides cresceu exponencialmente, tanto no aspecto fitoquímico, quando na avaliação de suas atividades biológicas. Isso se dá, devido ao fato de que este alcaloide é um potente inibidor seletivo da enzima acetilcolinesterase (AChE), sendo o primeiro alcaloide típico de Amaryllidaceae a ser utilizado comercialmente como medicamento, com o nome de Razadyne[®] e Reminyl[®], utilizados para o tratamento da doença de Alzheimer (WILLIAMS *et al*, 2011; BASTIDA *et al*, 2011; JIN, Z, 2013; ANDRADE *et al*, 2014).

Em uma revisão recente, NAIR e colaboradores (2016) mostraram o grande potencial dos alcaloides de Amaryllidaceae no tratamento do câncer, por induzir a

apoptose celular, principalmente os alcaloides pancratistatina, narciclasina, crinina e licorina.

A identificação do conteúdo alcaloídico de uma planta, bem como a identificação de novos núcleos químicos, os quais são frequentemente associados a propriedades farmacológicas específicas podem levar ao entendimento de uma relação estrutura – atividade. Esta ferramenta poderá ser útil para o desenvolvimento de análogos sintéticos com o objetivo de ampliar o número de moléculas disponíveis para avaliação farmacológica (IEVEN *et al*, 1982; BRUNETON *et al*, 2001; HOHMANN e FORGO, 2005).

1.3 Espécie *Worsleya procera* (Lem.) Traub

O gênero *Worsleya*, representado somente pela espécie *Worsleya procera* (Lem.) Traub (Figura 5), é endêmica do Brasil, sendo encontrada apenas na Serra de Araras, na cidade de Petrópolis, no Rio de Janeiro, e desde 1983 está incluída da lista oficial brasileira de espécies da flora ameaçadas de extinção (MARTINELLI e MORAES, 2007; MARTINELLI e MORAES, 2013; DUTILH e OLIVEIRA, 2014).

Conhecida popularmente como “Imperatriz do Brasil” ou “Rabo-de-galo” foi inicialmente descrita por Duchartre em 1863, e devido a suas características peculiares, sugerem-se uma linhagem evolutiva independente dentro da família Amaryllidaceae, o que faz com que seja diferente dos outros gêneros, sendo, portanto, um gênero monotípico (MARTINELLI e MORAES, 2007; MARTINELLI e MORAES, 2013).

Nenhum estudo fitoquímico ou biológico foi encontrado na literatura sobre esta espécie e como o potencial farmacológico da família Amaryllidaceae é elevado, um estudo químico e biológico desta planta torna-se necessário.



Figura 5 - Espécie *Worsleya procera*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar no aspecto fitoquímico a planta *Worsleya procera* (Lem.) Traub, através do isolamento e da identificação dos alcaloides presentes no seu extrato bruto, seguido de avaliação de atividade antimicrobiana de alguns alcaloides isolados.

2.2 Objetivos Específicos

- Coletar a planta *Worsleya procera* (Lem.) Traub;
- Obter os extratos brutos das partes aéreas da planta *Worsleya procera* (Lem.) Traub (folhas e caule), através de maceração em metanol;
- Realizar a extração dos alcaloides presentes nos extratos brutos, utilizando solventes orgânicos;
- Isolar e purificar os alcaloides dos extratos orgânicos, a partir de diferentes métodos cromatográficos, como cromatografia líquida em coluna, cromatografia líquida à vácuo, cromatografia em camada delgada preparativa e cromatografia líquida de alta eficiência;
- Comparar, identificar e elucidar as estruturas dos alcaloides através das técnicas: cromatografia em camada delgada comparativa, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear, dicroísmo circular e cristalografia de Raios-X;
- Avaliar a atividade antimicrobiana de alguns alcaloides isolados frente às bactérias bucais.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Solventes utilizados

Os solventes utilizados foram: Metanol (MeOH), metanol deuterado (CD₃OD), acetato de etila (AcOEt), acetona (Me₂CO), diclorometano (CH₂Cl₂), clorofórmio deuterado (CDCl₃) n-hexano (n-Hex), éter dietílico, água destilada, solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2% (v/v), hidróxido de amônio (NH₄OH), dimetilsulfóxido (DMSO).

3.2 Cromatografia em Camada Delgada

Neste trabalho, foram utilizadas as técnicas de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), para análises apenas qualitativas de misturas complexas, e a cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP), com a finalidade de isolamento e purificação das amostras.

Em ambos os casos, cromatofolhas ou placas de vidro contendo sílica gel 60 G/UV₂₅₄(20 x 20) eram colocadas dentro de cubas de eluição, saturadas com NH₄OH, contendo as fases móveis, escolhidas de acordo com cada amostra. Posteriormente, estas placas eram analisadas sob radiação UV nos comprimentos de onda de 254 nm e 366 nm e reveladas pelo reagente de Dragendorff, para avaliar a presença de alcaloides.

No caso da CCDP, a substância desejada era removida da sílica através da imersão da mesma em 100% de AcOEt, seguida de dez minutos do ultrassom. Onde o sobrenadante era filtrado com a utilização de um filtro para seringa, de porosidade de 0,45µ, e secado com a ajuda de um compressor de ar. Sendo este procedimento repetido com as soluções de AcOEt:MeOH nas concentrações de 20%, 40% e 60% de MeOH respectivamente.

3.3 Cromatografia Líquida em Coluna e Cromatografia Líquida à Vácuo

Para isolar e purificar os alcaloides presentes nos extratos orgânicos foram utilizadas as técnicas de Cromatografia Líquida em Coluna (CLC) e Cromatografia Líquida à Vácuo (CLV). Para tanto, foram empregadas colunas de vidro de diversos comprimentos e diâmetros, preenchidas por uma fase estacionária, composta de sílica 60 ACC (70-90 mesh, Silice) ou Sephadex LH – 20, onde as fases móveis foram escolhidas de acordo com análises de CCDC da amostra.

A CLV é uma variante da CLC, em que a coluna de vidro é acoplada a um Kitassato conectado a uma bomba de vácuo, onde o vácuo gerado na coluna propicia a eluição da fase móvel e conseqüentemente dos constituintes.

3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Neste trabalho, foi utilizada a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a separação de misturas de alcaloides. Para tanto, foi utilizado como fase móvel uma mistura isocrática de água:metanol:acetonitrila (8:1:1+1% TFA), com fluxo de 7 mL min⁻¹, e como fase estacionária uma coluna semi-preparativa (Agilent Eclipse XDB-C18 - 9,4 x 250 mm), com tamanho de partícula de 5µm e leitura nos comprimentos de onda de 270 e 290 nm.

Especificação do equipamento: equipamento Agilent de bomba binária modelo G1361A-1260 prep pump, coluna Agilent Eclipse XDB-C18, 5µm, 9,4 x 250 mm (semi-prep), acoplado a um detector 1260 MWD VL, G1365D e coletor de frações 1260 FC-PS, modelo G1364B.

3.5 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

Após o processo de extração dos alcaloides da planta *W. procera*, os extratos obtidos foram analisados por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG – EM), permitindo desta forma a identificação inicial dos alcaloides presentes nestes extratos.

Desta forma, uma alíquota de cada extrato foi enviada para a Faculdade de Farmácia da Universidade de Barcelona, sob supervisão do Prof. Dr. Jaume Bastida, que apresenta uma biblioteca digital com mais de 200 alcaloides de Amaryllidaceae caracterizados, o que facilita as análises comparativas dos resultados obtidos.

Especificação do equipamento: cromatógrafo CG – 17 A Shimadzu, modelo GC – EM QP 5000, operando no modo EI a 70 eV usando coluna apolar DB – 1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Programação da temperatura: 100 – 180 °C a 15 °C min⁻¹, 1 minuto em 180 °C, 180 – 300 °C a 5 °C min⁻¹, 40 minutos a 300 °C. Temperatura no injetor: 280 °C. Fluxo de gás: 0,8 mL/min com gás hélio.

3.6 Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

Os alcaloides isolados a partir dos extratos enriquecidos em alcaloides foram analisados pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ¹H), a fim de elucidar suas estruturas químicas, permitindo desta forma a sua identificação.

Inicialmente, as amostras foram solubilizadas em metanol deuterado (CD₃OD) ou clorofórmio deuterado (CDCl₃), e posteriormente enviadas para o equipamento de RMN de ¹H.

Especificação do equipamento: Varian 400 MHz, com sonda de 5 mm ATB BroaBand ¹H/¹⁹F/X.

3.7 Dicroísmo Circular

Alguns alcaloides isolados foram enviados para a Espanha, sob supervisão do Prof. Dr. Jaume Bastida para análise de dicroísmo circular (DC).

Especificação do equipamento: espectrofotômetro Jasco-J-810 (Easton, MD, USA). Análise realizada em MEOH.

3.8 Coleta e identificação da planta

A coleta da planta foi feita no dia 20 de Julho de 2014, no Estado do Rio de Janeiro, na cidade de Petrópolis, pelo Prof. Dr. Warley de Souza Borges (UFES), sendo esta autorizada pelo SISBIO (n. 41717), pois ocorreu dentro da Área de Preservação Ambiental de Petrópolis.

As partes aéreas de seis indivíduos da planta *Worsleya procera* (Lem.) Traub (folha e caule) foram coletadas e levadas para o Estado do Espírito Santo, no município de Vitória. Na tabela 1 podem-se observar as massas de cada parte da planta fresca que foi coletada.

A identificação da planta foi feita pela Profa. Dra. Luciana Dias Thomaz, e uma excicata foi depositada no Herbário da UFES sob a sua supervisão. Número de excicata: 35307.

Tabela 1 – Massa de cada parte da planta *Worsleya procera* (Lem.) Traub coletada na cidade de Petrópolis - Rio de Janeiro.

Partes da Planta	Peso (Kg)
Caule	3,817
Folhas	1,558

3.9 Obtenção dos extratos brutos

Inicialmente, as partes da planta *Worsleya procera* (Lem.) Traub frescas (caule e folhas) foram trituradas separadamente em liquidificador, utilizando o solvente MeOH. Em seguida, foram filtradas em papel filtro e as soluções resultantes secas em um evaporador rotatório, com pressão reduzida e banho de aquecimento funcional a uma temperatura de 40 °C.

As tortas resultantes deste processo foram submetidas à maceração com MeOH por um período de 48 horas. Após este período, foram filtradas em papel filtro e as soluções resultantes, foram secas como mencionado anteriormente, sendo este processo repetido por mais duas vezes.

Os extratos brutos resultantes (extrato bruto do caule e extrato bruto das folhas) foram devidamente pesados, para que a porcentagem de rendimento fosse calculada.

3.10 Extração ácido-base dos extratos

Os extratos brutos obtidos (extrato bruto do caule e extrato bruto da folha) foram separadamente submetidos à extração ácido-base para a obtenção dos extratos orgânicos enriquecidos em alcaloides, de acordo com a figura 6.

Desta forma, cada extrato bruto foi inicialmente acidificado com a adição de uma solução de H₂SO₄ 2% (v/v), até que o pH atingisse 2 – 3. As soluções ácidas resultantes, foram quatro vezes particionadas com 300 mL do solvente éter dietílico e AcOEt respectivamente, por um procedimento denominado partição líquido-líquido, onde a fase aquosa foi separada da fase orgânica através da utilização de um funil de separação.

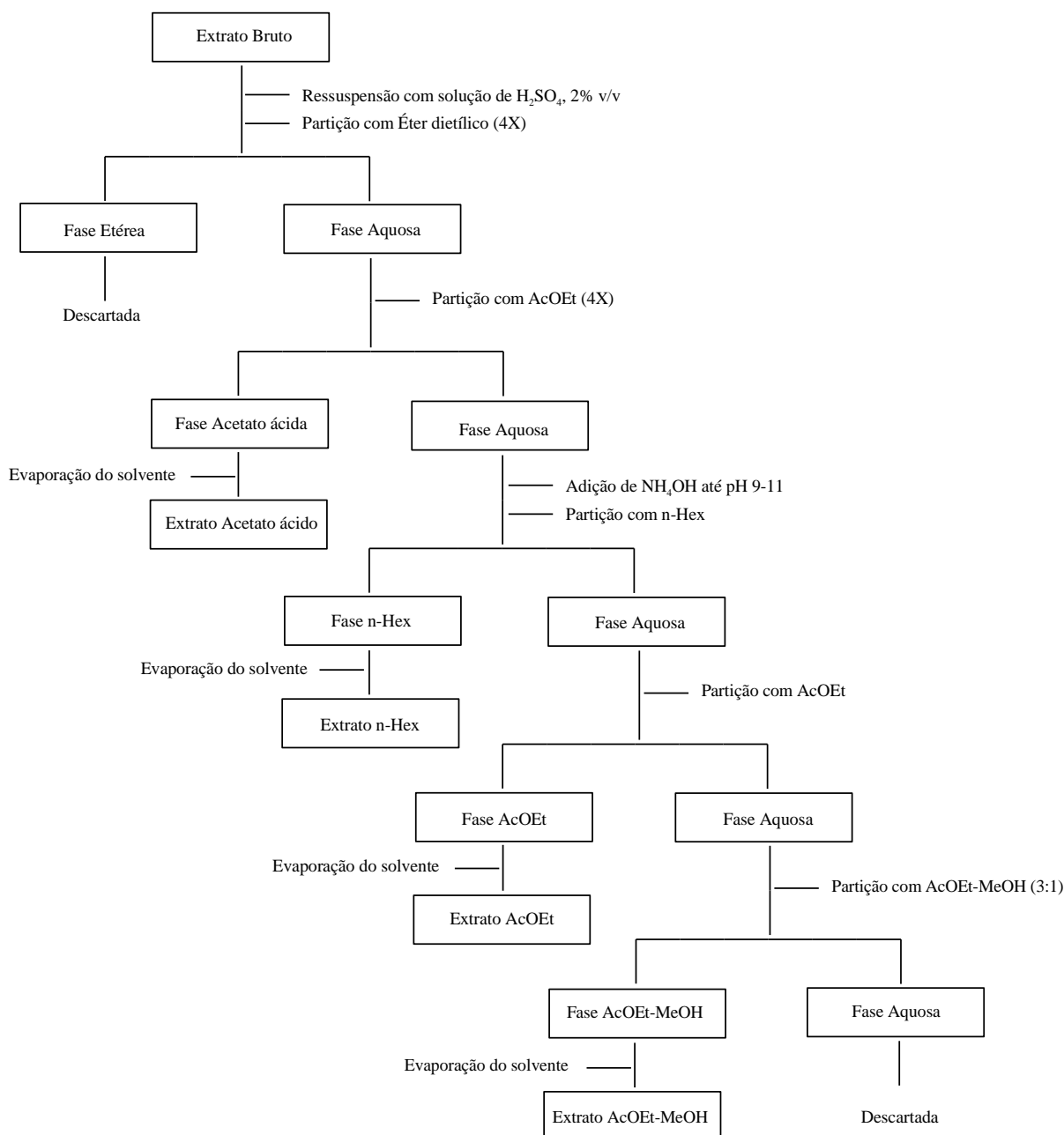


Figura 6 - Esquema da extração ácido-base realizada com cada extrato bruto obtido das partes aéreas da planta *W. procera*.

Às fases aquosas remanescentes, foram adicionadas NH₄OH, até que o pH atingisse 9 - 10. Em seguida, essas fases foram transferidas para um funil de separação e particionadas várias vezes com 300 mL do solvente n-Hex, até reação negativa de alcaloides frente ao reagente de Dragendorff.

As frações hexânicas resultantes foram filtradas em papel filtro com a adição de sulfato de sódio anidro e secas com a ajuda de um evaporador rotatório sobre pressão reduzida e banho a 40 °C. Assim, os extratos hexânicos obtidos foram transferidos para frascos e devidamente pesados e os rendimentos foram calculados com base no peso de seus respectivos extratos brutos.

Nas fases aquosas remanescentes, foi realizado o mesmo procedimento de partição descrito para a fração hexânica, porém com os solvente AcOEt e uma solução de AcOEt:MeOH (3:1), respectivamente.

Assim, a partir deste procedimento, foram obtidos quatro extratos orgânicos do caule (extrato acetato de etila ácido, extrato hexânico, extrato acetato de etila e extrato acetato:metanol) e quatro extratos orgânicos da folha (extrato acetato de etila ácido, extrato hexânico, extrato acetato de etila e extrato acetato:metanol).

3.11 Obtenção dos alcaloides

Após a realização da extração ácido-base, os extratos obtidos do caule e da folha foram analisados pela técnica de CCDC e CG-EM, e a partir dos resultados obtidos, optou-se por trabalhar somente com o extrato hexânico e extrato acetato de cada parte da planta. Uma vez que, os extratos ácidos e os extratos AcOEt-MeOH apresentaram baixa concentração de alcaloides.

Assim, os extratos hexânicos e os extratos acetato do caule e das folhas foram submetidos a diferentes processos cromatográficos, a fim de isolar seus constituintes.

3.11.1 Caule

3.11.1.1 Extrato hexânico do Caule

O extrato hexânico da amostra de caule foi inicialmente submetido a uma CLV (diâmetro da coluna: 4 cm e altura de sílica: 5,5 cm), no qual foi empregado um gradiente de solventes como fase móvel. Assim, utilizou-se quatro litros dos solventes n-Hex e AcOEt (100% de n-Hex até 100% de AcOEt), seguido de três litros dos solventes AcOEt e MeOH (100% de AcOEt até 60% de MeOH).

Como ilustrado na figura 7, desta coluna resultaram quatro frações, que foram unidas de acordo com análises comparativas dos tubos obtidos, através da técnica de CCDP, denominadas como H1 - C, H2 - C, H3 - C e H4 - C, sendo as duas últimas descartadas, já que apresentaram teste negativo frente ao reagente de Dragendorff.

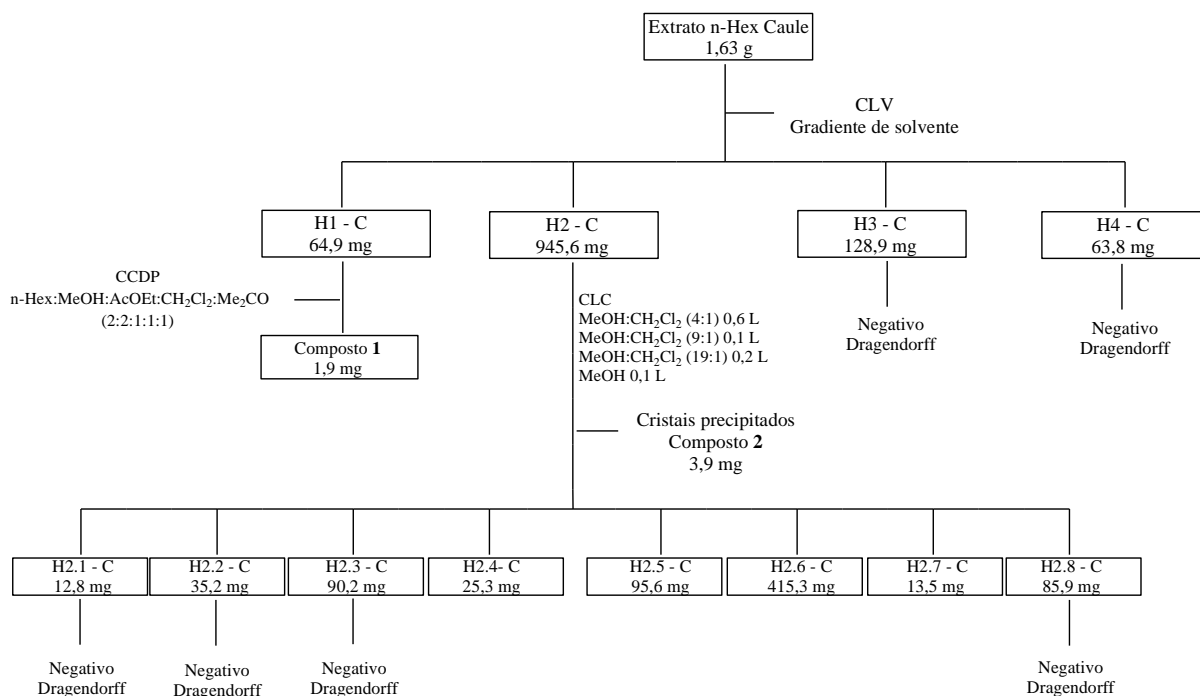


Figura 7 - Esquema da CLV realizada com o extrato n-Hex do caule de *W. procera*.

- **Fração H1 - C**

Para a separação dos alcaloides desta fração, esta foi submetida a uma CCDP (Figura 7), onde a fase móvel utilizada foi escolhida após análises de CCDC da referente amostra. Este procedimento resultou no isolamento do composto **1**, analisado pela técnica de RMN de ^1H .

- **Fração H2 - C**

Para o isolamento dos alcaloides presentes na fração H2-C, inicialmente, foi feita uma CLC (diâmetro da coluna: 2 cm e altura de sílica: 25 cm), onde as proporções de solventes se basearam em análises de CCDC desta amostra. Após a realização da coluna, foi observada a formação de cristais em alguns tubos de recolhimento de amostra, estes foram analisados por RMN de ^1H , mostrando ser o composto **2**. Como demonstrado na figura 7, este procedimento resultou em oito frações, unidas de acordo com similaridade das análises de CCDC dos tubos obtidos, denominadas de H2.1-C à H2.8-C.

Todas as frações obtidas foram analisadas por CCDC, sendo as frações H2.1 - C, H2.2 - C, H2.3 - C e H2.8 - C descartadas, já que apresentaram teste negativo frente ao reagente de Dragendorff.

➤ **Fração H2.4 - C:** Como ilustrado na figura 8, esta fração foi submetida à uma CCDP, onde foi observado o isolamento de três compostos (compostos **3**, **4** e **5**). Sendo estes analisados por RMN de ^1H .

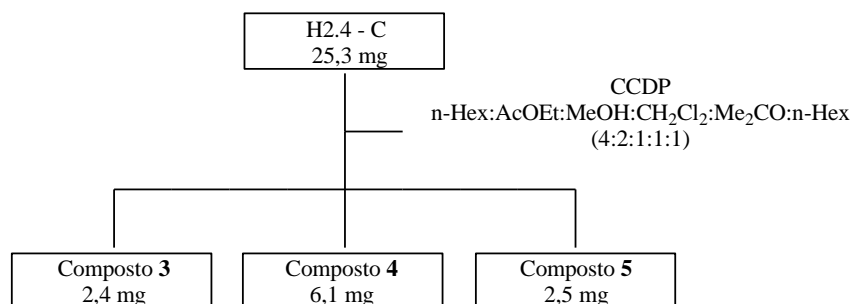


Figura 8 - Esquema da CCDP submetida na fração H2.4 - C.

➤ **Fração H2.5 - C:** A partir desta fração, foram isolados cinco compostos (compostos 2, 3, 6, 7 e 8), como ilustrado na figura 9, sendo todos analisados pela técnica de RMN de ^1H .

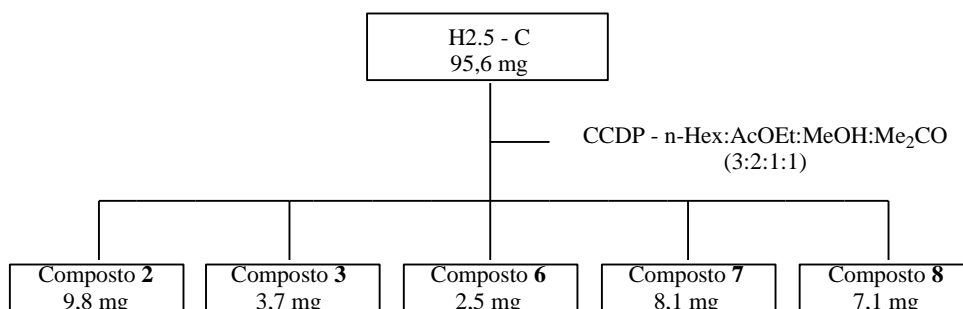


Figura 9 - Esquema da CCDP realizada com a amostra H2.5 - C.

➤ **Fração H2.6 - C:** Para o isolamento dos alcaloides desta fração, esta foi submetida inicialmente à uma CLC, (diâmetro da coluna: 1,5 cm e altura de sílica: 31,5 cm), resultando em quatro frações, como ilustrado na figura 10. Após a realização da coluna, foi observado à formação de cristais em alguns tubos de recolhimento de amostra, estes foram analisados pela técnica de RMN de ^1H , comprovando ser o composto 2.

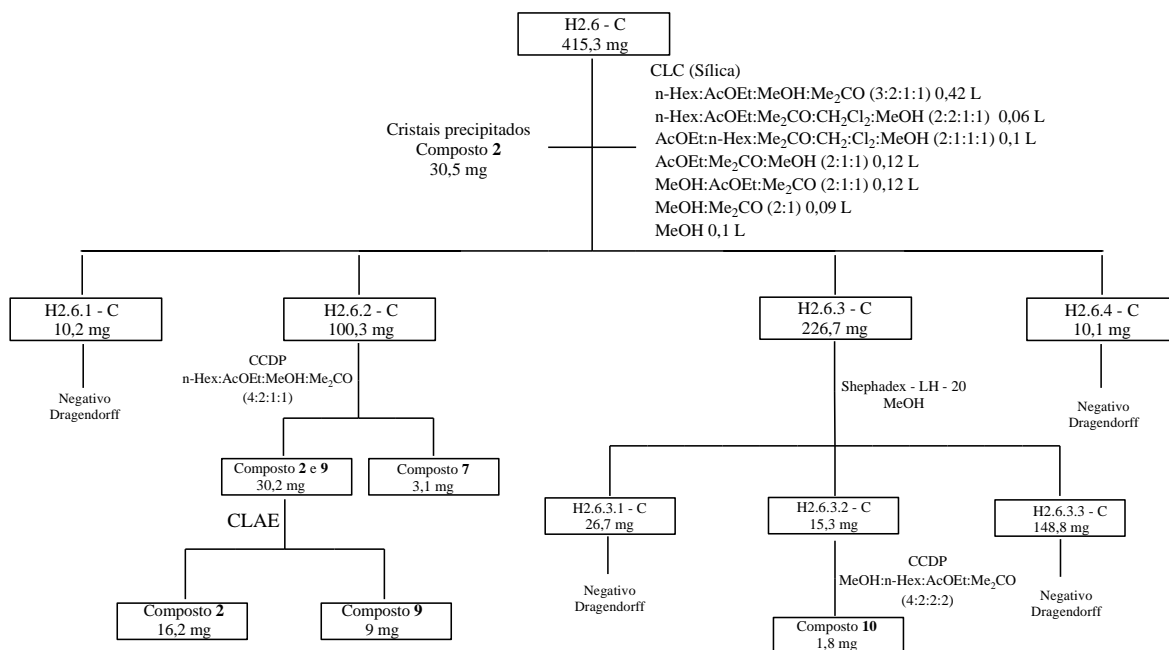


Figura 10 - Esquema cromatográfico realizado com a fração H2.6 - C.

✓ **Fração H2.6.2 - C:** Esta fração foi submetida à uma CCDP, sendo isolado o composto **7** e uma mistura do composto **2** e **9** (Figura 10). A mistura de alcaloides foi então separada, utilizando a metodologia CLAE. Para tanto, foi utilizado como fase móvel uma mistura isocrática de água:metanol:acetonitrila (8:1:1+1% TFA), com fluxo de 7 mL min^{-1} , e como fase estacionária uma coluna semi-preparativa (Agilent Eclipse XDB-C18 - $9,4 \times 250 \text{ mm}$), com tamanho de partícula de $5 \mu\text{m}$ e leitura nos comprimentos de onda de 270 e 290 nm.

✓ **Fração H2.6.3 - C:** Como ilustrado na figura 10, esta fração foi inicialmente submetida à uma CLC, utilizando sephadex LH-20 como fase estacionária (diâmetro da coluna: 2,3 cm e altura de sephadex LH-20: 56 cm), e fase móvel o solvente MeOH, onde obteve-se três frações, denominadas H2.6.3.1 - C, H2.6.3.2 - C e H2.6.3.3 - C. Sendo que a primeira e a última foram descartadas, já que apresentaram teste negativo frente ao Reagente de Dragendorff.

▪ **Fração H2.6.3.2 - C:** Esta fração foi submetida a uma CCDP, sendo isolado o composto **10** (Figura 10), analisado por RMN de ^1H uno e bidimensional (NOESY).

➤ **Fração H2.7 - C:** Foi empregada a técnica de CCDP, para o isolamento dos constituintes desta fração. Sendo isolado o composto **2**, analisado por RMN de ^1H , como demonstrado na figura 11.

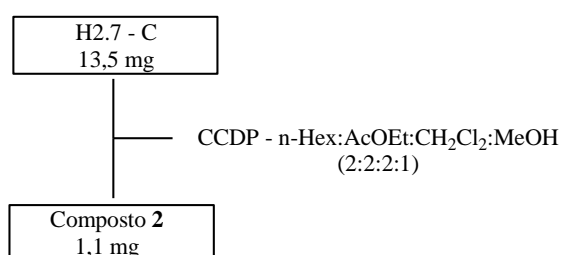


Figura 11 - Esquema da CCDP executada com a amostra H2.7 - C.

➤ **Fração H2.8 - C:** Ao analisar a amostra H2.8 - C pela técnica de CCDC, foi observado que esta, apresentava alcaloides, porém continha muita impureza, assim, optou-se por submetê-la a uma CLC, utilizando como fase estacionária a sephadex LH-20 (diâmetro da coluna - 2 cm e altura de shephadex - 32 cm), e como fase móvel utilizou-se somente o solvente MeOH. Após análises de CCDC dos tubos obtidos da coluna, obteve-se duas frações denominadas H2.8.1 - C e H2.8.2 - C. Ambas, foram submetidas separadamente a uma nova sephadex LH - 20 (diâmetro da coluna: 2 cm e altura de shephadex: 32 cm), originando respectivamente quatro e três frações, que estão em processo de análise por CG - EM (Figura 12).

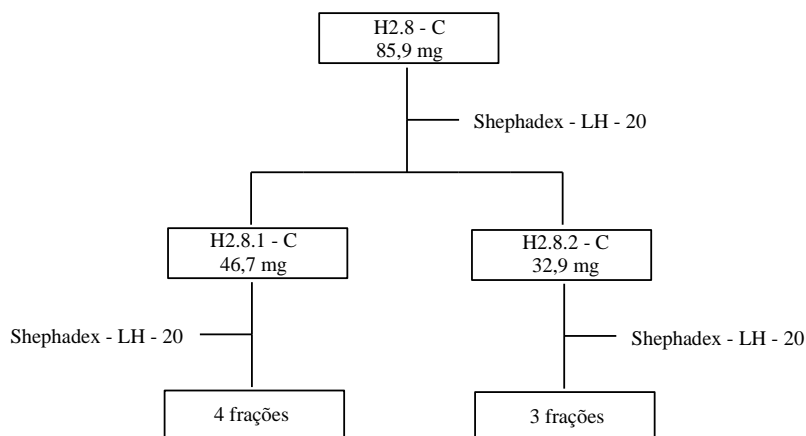


Figura 12 - Esquema do sistema cromatográfico realizado com a fração H2.8 - C.

3.11.1.2 Extrato acetato de etila do caule da planta

Ao adicionar o solvente MeOH ao extrato acetato da parte caule, houve a formação de um precipitado branco, este foi separado do sobrenadante e enviado para análise de RMN de ^1H , mostrando ser o composto **3**.

O sobrenadante remanescente foi submetido a uma CLV (Figura 13), utilizando como fase estacionária a sílica (diâmetro da coluna: 4 cm e altura de sílica: 5,5 cm), e como fase móvel um sistema gradiente de solventes, de uma fase móvel menos polar para uma fase móvel mais polar.

Assim, inicialmente, utilizou-se 800 mL dos solventes n-Hex e AcOEt (100% de n-Hex até 50% de AcOEt), em seguida, foram empregados 2,8 L dos solventes n-Hex, AcOEt e CH_2Cl_2 , onde se manteve constante a concentração de AcOEt (50% da solução), sendo alterado as proporções de n-Hex e CH_2Cl_2 (100% de n-Hex até 100% de CH_2Cl_2), o que resultou em uma solução final composta de AcOEt: CH_2Cl_2 (1:1), em seguida foi acrescentado a esta solução o solvente MeOH até que a fase móvel fosse composta de 100% deste solvente, onde foram gastos 6L de solvente.

Desta coluna, resultaram seis frações A1 - C – A6 - C, unidas de acordo com similaridade das análises de CCDC dos tubos de recolhimento de amostra. Onde as frações A1 - C, A4 - C e A5 - C foram descartadas, pois apresentaram teste negativo frente ao Reagente de Dragendorff.

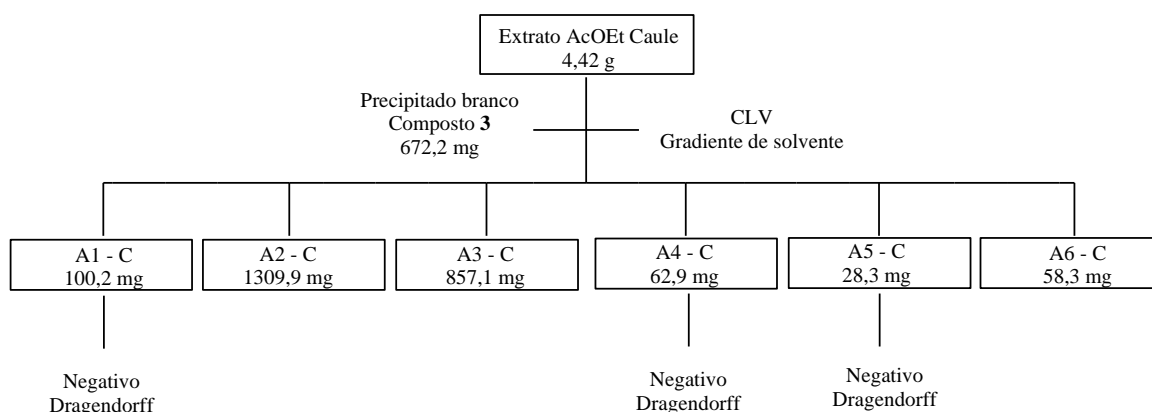


Figura 13 - Esquema da CLV realizada com o extrato AcOEt do caule de *W. procera*.

- **Fração A2 - C**

Como ilustrado na figura 14, esta fração foi inicialmente submetida a uma CLC, utilizando com fase estacionária a sílica (diâmetro da coluna: 2 cm e altura de sílica: 31 cm).

Após o procedimento, foi observado que alguns tubos de recolhimento apresentavam um precipitado branco. Estes foram analisados pela técnica de RMN de ^1H demonstrando ser o composto **3**.

Desta coluna, resultaram oito frações (A2.1 - C – A2.8 - C), sendo todas analisadas pela técnica de CCDC. As frações A2.2 - C, A2.5 - C e A2.6 - C apresentaram teste positivo para alcaloides ao serem reveladas com Reagente de Dragendorff.

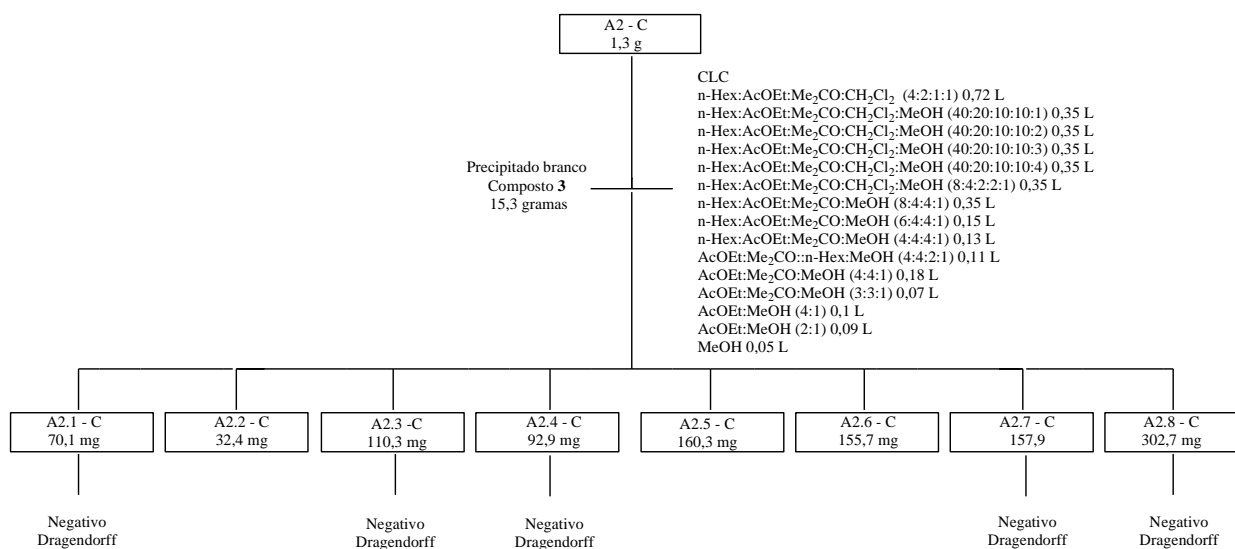


Figura 14 - Esquema ilustrando a CLC realizada com a amostra A2 - C.

➤ **Fração A2.2 - C:** Esta fração foi submetida à uma CCDP, onde resultou no isolamento do composto **11**, analisado por RMN de ¹H, como ilustrado na figura 15.

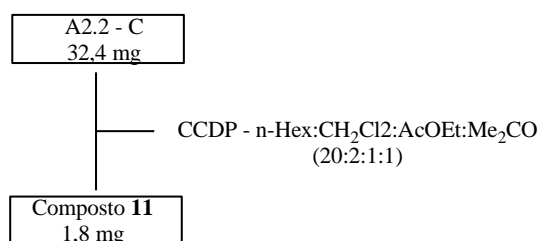


Figura 15 - Esquema da CCDP efetuada na fração A2.2 - C.

➤ **Fração A2.5 - C:** A técnica de CCDP foi empregada nesta fração (Figura 16), a fim de isolar os seus constituintes, onde pôde-se observar o isolamento de quatro compostos (composto **4**, **6**, **7** e **8**) e uma mistura dos compostos **2** e **9**.

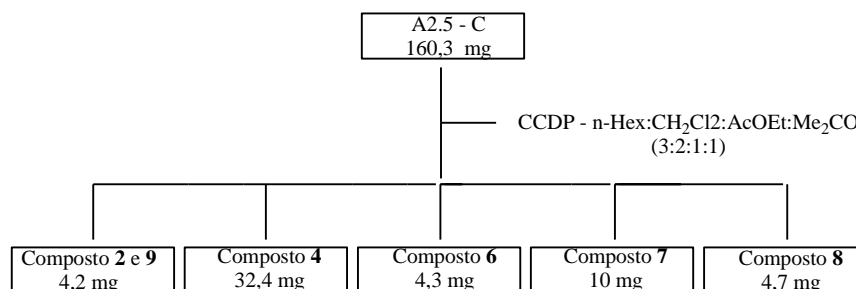


Figura 16 - Esquema ilustrando a CCDP feita com a amostra A2.5 - C.

➤ **Fração A2.6 - C:** Esta fração foi submetida à uma CCDP (Figura 17), sendo isolado seis compostos (compostos **2**, **6**, **7**, **10**, **12** e **13**), analisados pela técnica de RMN de ^1H .

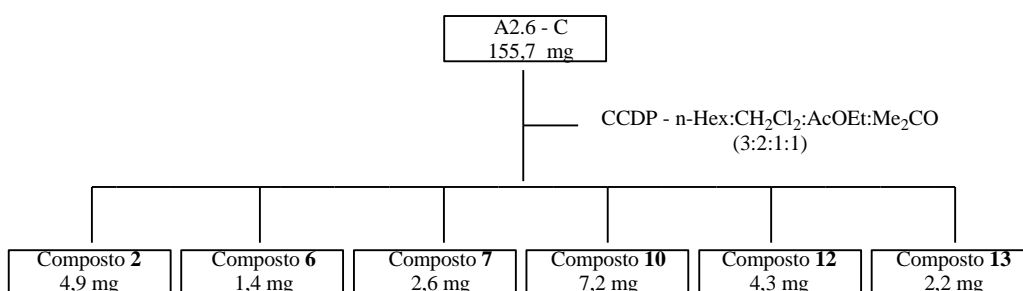


Figura 17 - Esquema da CCDP realizada com a fração A2.6 - C.

- **Fração A3 - C**

Como ilustrado na figura 18, a fração A3 - C foi inicialmente submetida a uma CLC (diâmetro da coluna: 2 cm e altura de sílica: 28 cm), onde foi empregado um gradiente de solventes como fase móvel, de uma fase móvel menos polar para uma fase móvel mais polar. Para tanto, foram utilizados os solventes n-Hex, CH_2Cl_2 , AcOEt, Me_2CO e MeOH.

Desta coluna, resultaram oito frações, unidas de acordo com as análises de CCDC dos tubos de recolhimento de amostra.

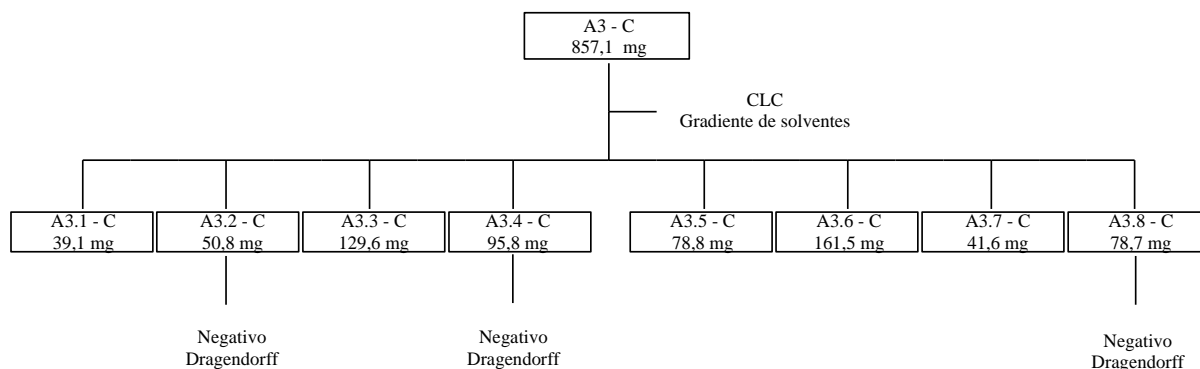


Figura 18 - Esquema da CLC empregada na fração A3 - C.

➤ **A3.1 - C:** Após análise de CCDC desta fração, optou-se por fazer uma CCDP (Figura 19), onde foi observado o isolamento de quatro compostos (compostos **1**, **11**, **14** e **15**).

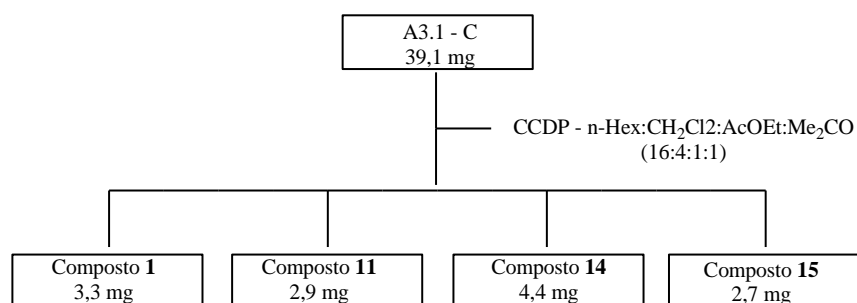


Figura 19 - Esquema exemplificando a CCDP realizada com a amostra A3.1 - C.

➤ **A3.3 - C:** Como ilustrado na figura 20, esta fração foi submetida à uma CCDP, no qual foi observado o isolamento de quatro composto (Composto **2**, **4**, **6** e **10**). Todos analisados pela técnica de RMN de ^1H .

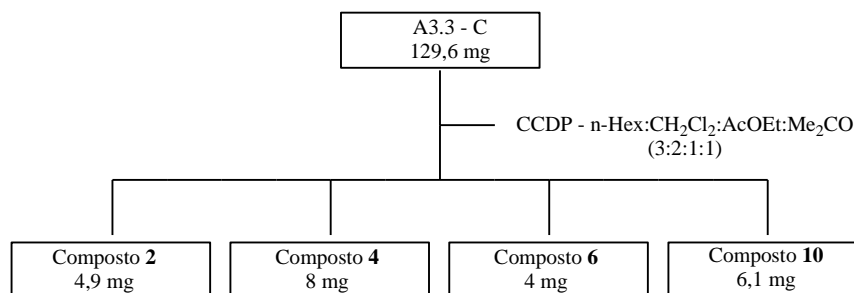


Figura 20 - Esquema da CCDP feita com a fração A3.3 - C.

➤ **A3.5 - C:** Para o isolamento dos alcaloides presentes nesta fração, foi escolhida a técnica de CCDP, como ilustrado na figura 21. O que resultou, no isolamento de três compostos (compostos **7**, **16** e **17**), analisados por RMN de ^1H .

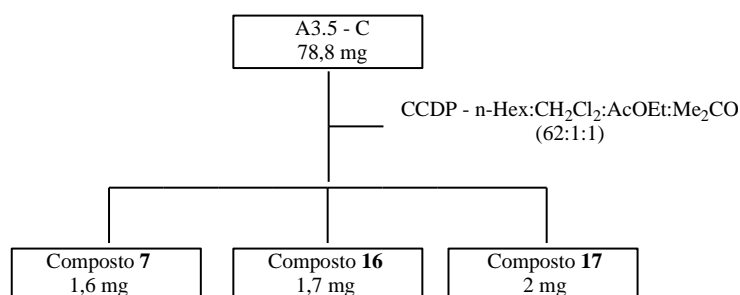


Figura 21 - Esquema demonstrando a CCDP realizada com a fração A3.5 - C.

➤ **A3.6 - C:** Esta fração foi submetida à uma CCDP (Figura 22), onde pôde-se observar o isolamento de quatro compostos (compostos **1**, **5**, **14** e **16**), sendo todos analisados pelas técnica de RMN de ^1H .

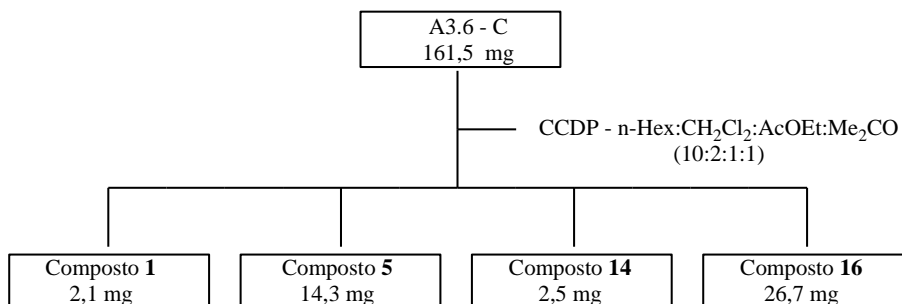


Figura 22 - Esquema ilustrando a CCDP empregada com a amostra A3.6 - C.

➤ **A3.7 - C:** Esta fração foi submetida à uma CCDP, cuja fase móvel foi composta por n-Hex:CH₂Cl₂:AcOEt:Me₂CO:MeOH (8:8:1:1:0,5), onde resultou em duas frações puras que estão em processo de análise por RMN de ¹H uno e bidimensional.

- **Fração A6 - C**

Após análise de CCDC desta fração, optou-se pela técnica de CCDP para o isolamento de seus constituintes, resultando no isolamento do composto **16**, como demonstrado na figura 23.

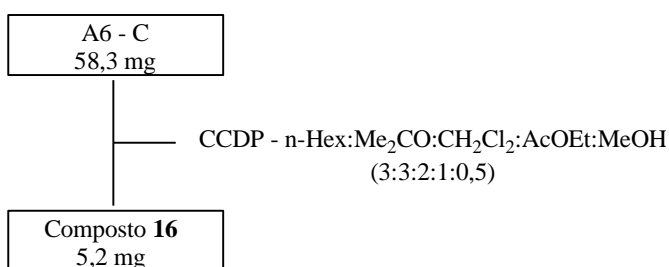


Figura 23 - Esquema detalhando a CCDP realizada com a fração A6 - C.

3.11.2 Folhas

3.11.2.1 Extrato hexânico das folhas da planta

O extrato hexânico das folhas foi inicialmente submetido à uma CLC (diâmetro de coluna: 1,5 cm e altura da sílica: 30 cm), resultando em oito frações, unidas de acordo com similaridade das análises de CCDC dos tubos de recolhimento de amostra (Figura 24).

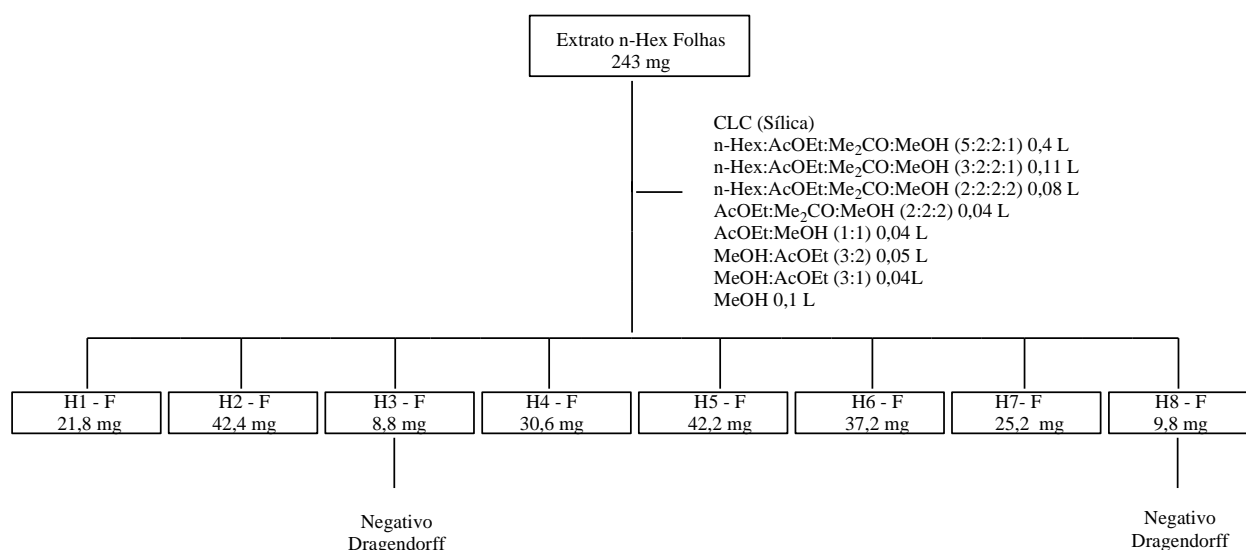


Figura 24 - Esquema cromatográfico realizado para o isolamento dos alcaloides do extrato n-Hex das folhas de *W. procera*.

- **Fração H1 - F**

Após análises de CCDC desta fração, optou-se por realizar uma CCDP, cuja fase móvel foi composta pelos solventes n-Hex:AcOEt:CH₂Cl₂:Me₂CO:MeOH (24:4:4:3:1). Este processo resultou em duas frações puras, que estão em processo de análise por RMN de ¹H uno e bidimensional.

- **Fração H2 - F**

Foi adicionado o solvente MeOH à fração H2 – F, e após um período de 48 horas foi observado a formação de cristais, estes foram separados do sobrenadante e analisados pela técnica de RMN de ^1H , mostrando ser o composto **1**.

O sobrenadante foi submetido a uma CCDP, como ilustrado na figura 25, resultando novamente no isolamento do composto **1**.

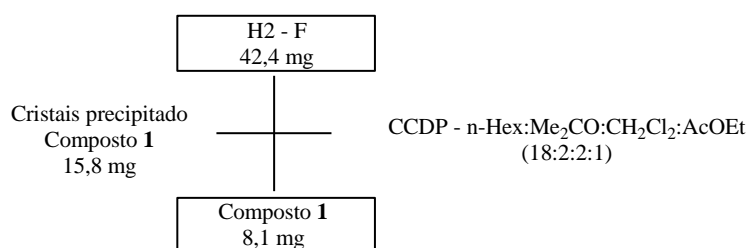


Figura 25 - Esquema da CCDP feita com a fração H2 - F.

- **H4 - F**

A técnica empregada para o isolamento dos alcaloides da fração H4 - F foi a CCDP, em que foi isolado uma mistura dos compostos **2** e **9** e o composto **8** (Figura 26). Os alcaloides da mistura foram separados pela técnica de CLAE, como mencionado anteriormente para a fração H2.6.2 - C.

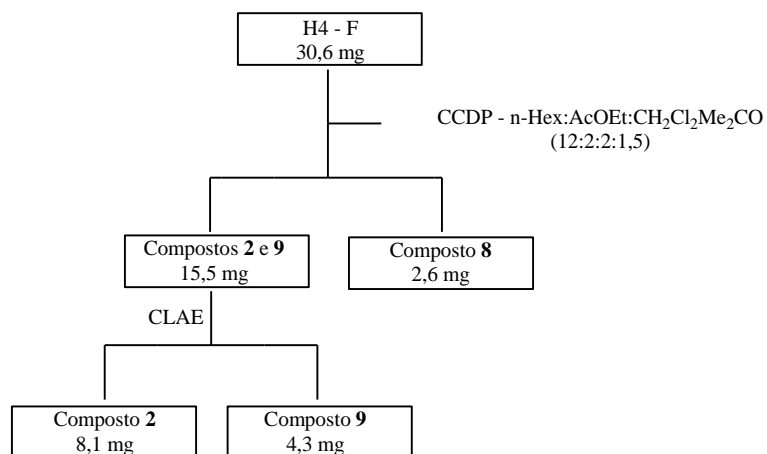


Figura 26 - Esquema ilustrando o processo cromatográfico empregado com a amostra H4 - F para o isolamento dos alcaloides desta fração.

- **H5 - F**

Ao analisar a fração H5 - F quanto à presença de alcaloides, utilizando a técnica de CCDC, pôde-se observar a presença de somente um alcaloide.

Desta forma, com a utilização do solvente MeOH conseguiu-se cristalizar 30,9 mg deste composto, que ao ser analisada por RMN de ^1H , mostrou ser o composto **2**. Estes cristais foram enviado para análise por cristalografia de Raio-X.

- **H6 - F**

A fração H6 - F foi submetida a uma CCDP, para o isolamento de seus constituintes, como ilustrado na figura 27, sendo isolado os compostos **2** e **10**.

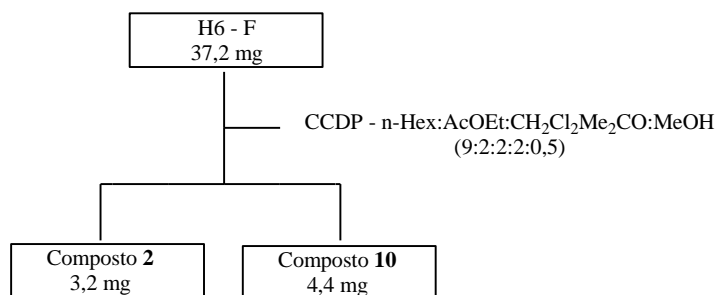


Figura 27 - Esquema ilustrando a CCDP feita com a fração H6 - F.

- **H7 - F**

Para o isolamento do alcaloide presente nesta fração, foi empregada a técnica de CCDP (Figura 28), isolando-se o composto **5**.

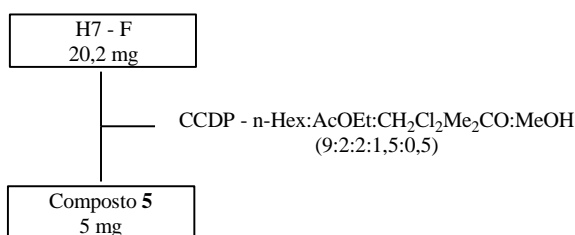


Figura 28 - Esquema da CCDP executada com a amostra H7 - F, a fim de isolar seus constituintes.

3.11.2.2 Extrato acetato de etila das folhas da planta

O extrato acetato de etila da parte folha da planta, foi submetido a uma CLC, utilizando a sílica como fase estacionária (diâmetro da coluna: 2 cm e altura de sílica: 36 cm), no qual as fases móveis empregadas estão ilustradas na figura 29. Esta coluna resultou em cinco frações, unidas de acordo com análises de CCDC dos tubos de recolhimento de amostra obtidos.

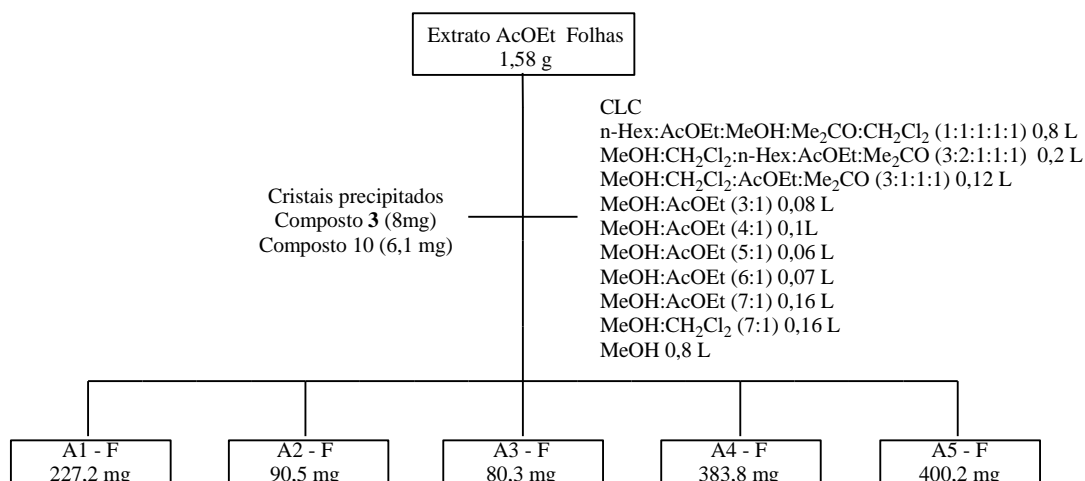


Figura 29 - Esquema mostrando a CLC realizada com o extrato AcOEt das folhas de *W. procera*.

- **Fração A1 - F**

Para o isolamento dos constituintes desta fração, o primeiro procedimento cromatográfico escolhido foi a CLC (diâmetro da coluna: 1,5 cm e altura de sílica: 23 cm), como demonstrado na figura 30. Deste processo resultaram três frações (A1.1 - C, A1.2 - C e A1.3 - C), porém somente a fração A1.1 - C apresentou teste positivo frente ao Reagente de Dragendorff.

➤ **Fração A1.1 - C:** Esta fração foi submetida à uma CCDP, cuja fase móvel escolhida está detalhada na figura 30, sendo isolados os alcaloides **11** e **14**.

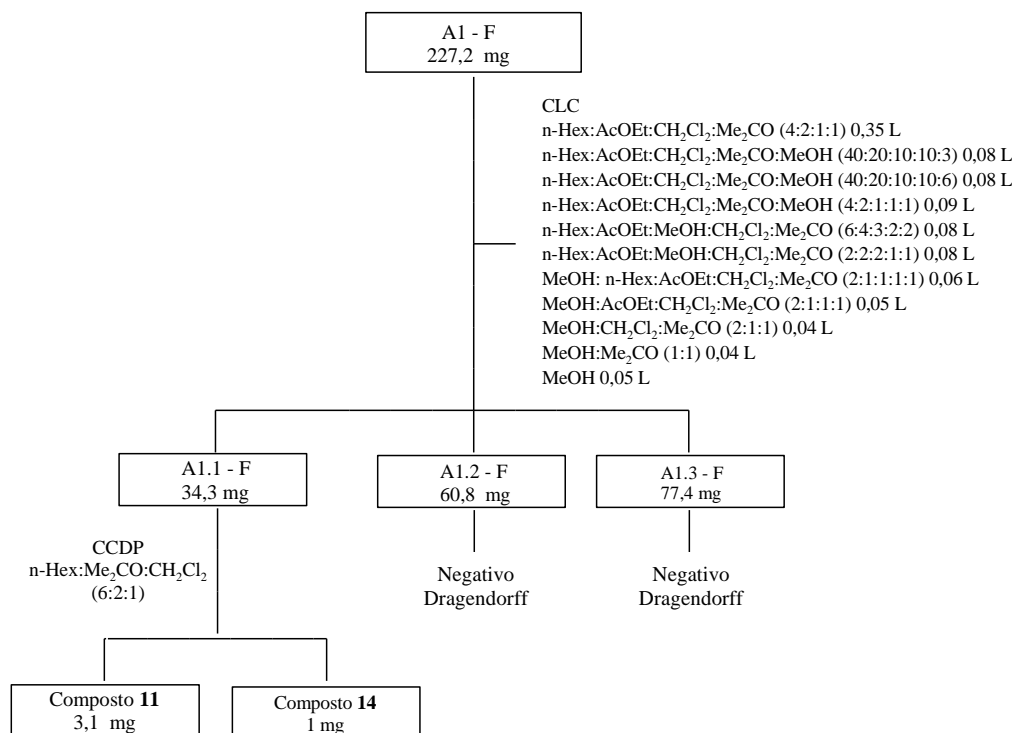


Figura 30 - Esquema do procedimento cromatográfico escolhido para o isolamento dos alcaloides presentes na fração A1 - F.

- **Fração A2 - F**

A fração A2 - F foi submetida a uma CCDP, para o isolamento dos alcaloides presentes nesta amostra. Assim, como ilustrado na figura 31, foram isolados o composto **4** e uma mistura do composto **18** e **19**.

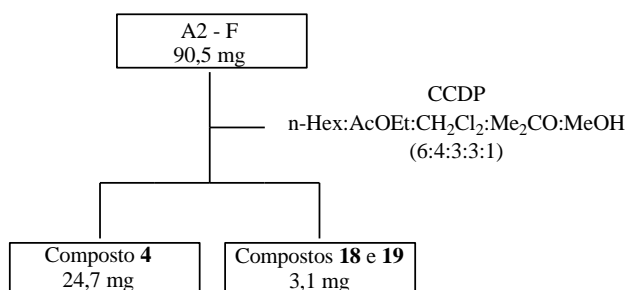


Figura 31 - Esquema ilustrando a CCDP realizada com a amostra A2 - F.

- **Fração A3 - F**

Foi adicionado o solvente MeOH a esta fração, e após o período de 72 horas, houve a formação de cristais, estes foram separados do sobrenadante e analisados pela técnica de RMN de ^1H , mostrando ser o composto **3**.

O sobrenadante foi analisado por CCDC, e a técnica escolhida para a separação dos seus constituintes foi a CCDP, ilustrada na figura 32.

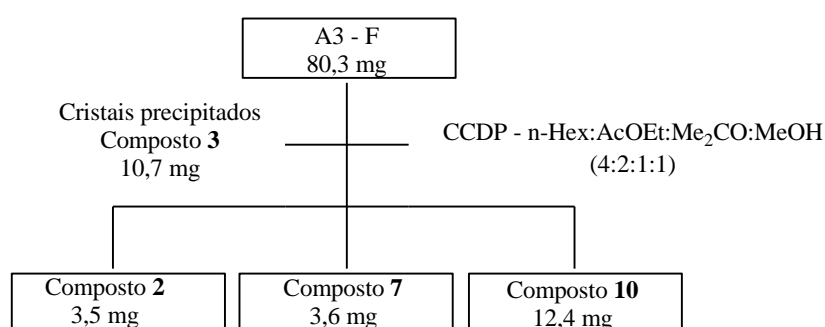


Figura 32 - Esquema da CCDP realizada com a amostra A3 - F.

- **Fração A4 - F**

O procedimento cromatográfico escolhido para a separação dos constituintes desta fração foi a CLC (Figura 33), utilizando a sílica como fase estacionária (diâmetro da coluna: 1,5 cm e altura de sílica: 32 cm). Após o procedimento cromatográfico, houve a formação de cristais em um dos tubos de recolhimento de amostra, estes foram analisados por RMN de ^1H , mostrando ser o composto **3**.

A partir desta coluna, foi originada oito frações, unidas de acordo com similaridade dos tubos de recolhimento de amostra, denominadas de A4.1 - F à A4.8 - F. As frações A4.1 - F, A4.3 - F e A4.8 - F foram descartadas, já que apresentaram teste negativo frente ao Reagente de Dragendorff. A fração A4.2 - F foi enviada diretamente para análise de RMN de ^1H , já que pela análise de CCDC desta fração, pôde-se observar que esta apresentava somente uma substância, sendo constatado ser o composto **11**.

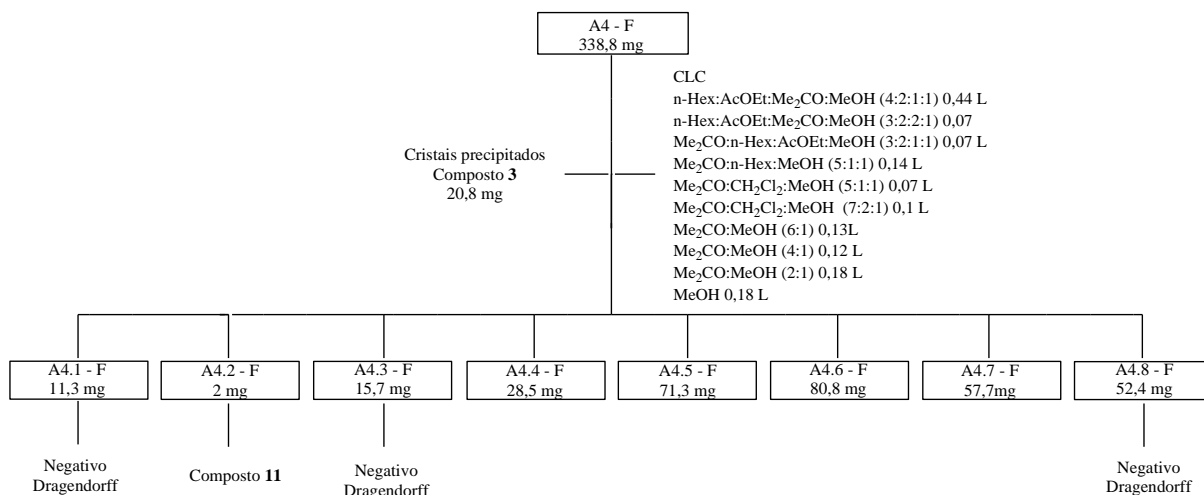


Figura 33 - Esquema ilustrando a CLC realizada com a fração A4 – F.

➤ **Fração A4.4 - F:** Esta fração foi submetida à uma CCDP (Figura 34), acarretando no isolamento de quatro compostos (composto 4, 6, 7 e 8), sendo todos analisados pela técnica de RMN de ^1H .

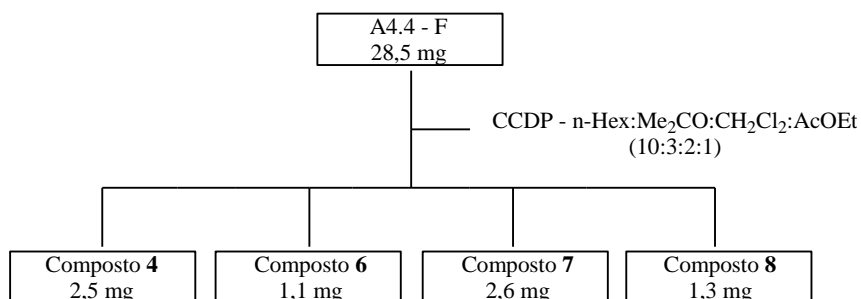


Figura 34 - Esquema demonstrando a CCDP feita com a amostra A4.4 - F.

➤ **Fração A4.5 - F:** Após análise de CCDP desta fração, foi decidido a utilização da técnica de CCDP, para o isolamento de seus constituintes. Este processo, resultou no isolamento de uma mistura dos compostos 2 e 9 e os compostos isolados 7, 10 e 13 (Figura 35).

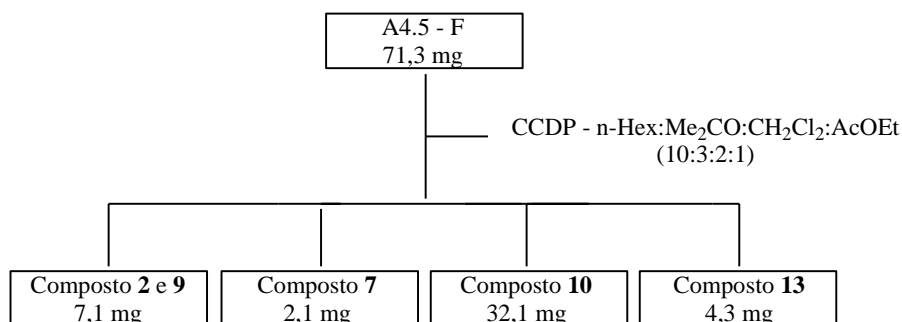


Figura 35 - Esquema da CCDP empregada para o isolamento dos alcaloides da fração A4.5 - F.

➤ **Fração H4.6 - F:** Para o isolamento do alcaloide presente nesta fração, foi empregada a técnica de CCDP, isolando-se o composto **10**, como ilustrado da figura 36.

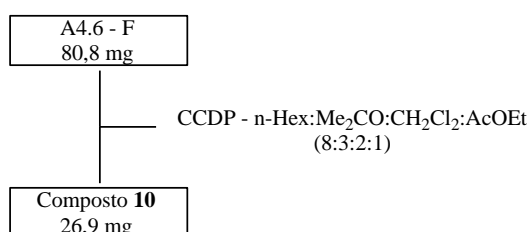


Figura 36 - Esquema da CCDP realizada com a fração H4.6 - F.

➤ **Fração H4.7 - F:** Foi empregada a técnica de CCDP para o isolamento dos constituintes desta fração, como demonstrado na figura 37, resultando no isolamento dos compostos **10** e **20**, analisados por RMN de ^1H .

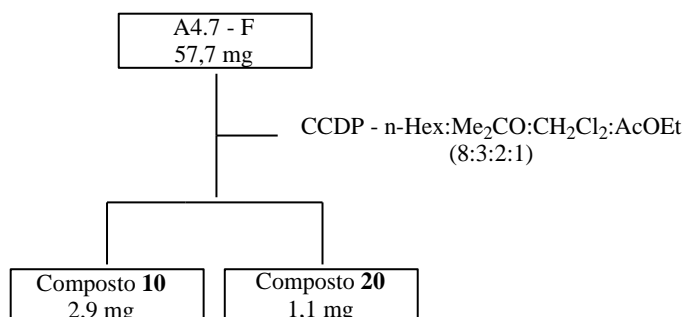


Figura 37 - Esquema mostrando a CCDP feita com a amostra H4.7 - F.

- **Fração A5 - F**

O procedimento escolhido para a separação dos constituintes desta fração foi a CLC, utilizando a sílica como fase estacionária (diâmetro de coluna: 1,5 cm e altura de sílica: 33,5 cm), ilustrada na figura 38. Após a realização da coluna, foi observada a formação de cristais em alguns tubos de recolhimento de amostra, estes foram analisados por RMN de ^1H , mostrando ser o composto **5**.

Deste processo cromatográfico, resultaram seis frações, unidas após análises comparativas dos tubos de recolhimento de amostra, utilizando a técnica de CCDC. As frações foram denominadas de A5.1 - F a A5.6 - F, sendo a fração A5.1 - F descartada pela ausência de alcaloides, uma vez que apresentou teste negativo frente ao Reagente de Dragendorff.

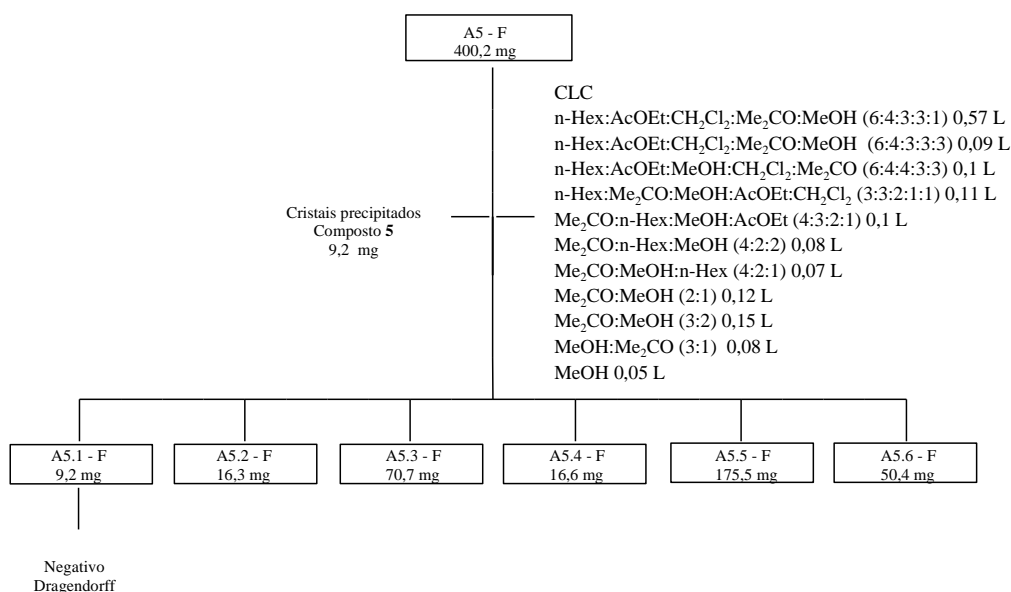


Figura 38 - Esquema do procedimento cromatográfico empregado na fração A5 - F, onde foi realizado uma CLC gerando seis frações.

➤ **Fração A5.2 - F:** Para o isolamento dos alcaloides presentes nesta fração, foi empregada a técnica de CCDC, ilustrada na figura 39. O que resultou, no isolamento do composto **21** e de uma mistura dos compostos **1** e **14**.

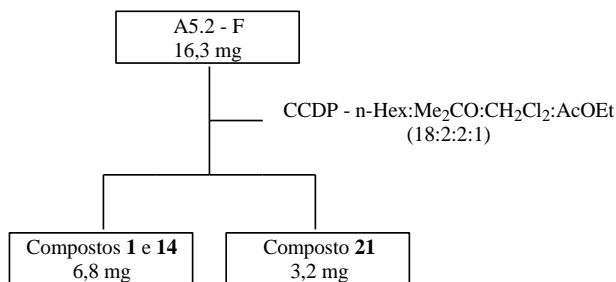


Figura 39 - Esquema da CCDP realizada com a fração A5.2 - F.

➤ **Fração A5.3 - F:** Ao adicionar o solvente MeOH a esta fração, e deixá-la em repouso por um período de 48 horas, ocorreu a formação de cristais. Estes foram separados do sobrenadante, e enviados para análise de RMN de ^1H , indicando ser o composto **5**. O sobrenadante remanescente foi analisado por CCDC, e desta forma foi escolhida a técnica de CCDP para o isolamento de seus constituintes, como ilustrado na figura 40, sendo isolados os compostos **5**, **11**, **14** e mais um que está em processo de análise por RMN de ^1H uno e bidimensional.

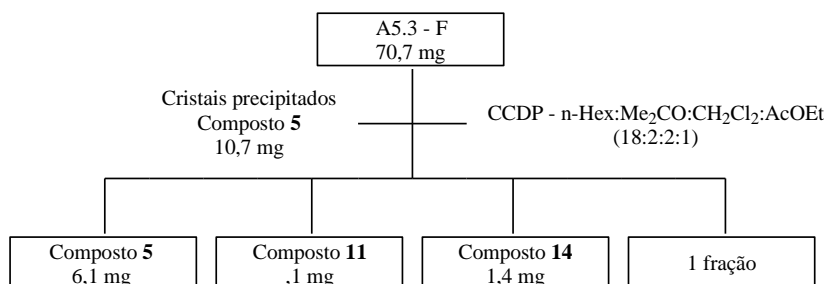


Figura 40 - Esquema ilustrando a CCDP realizada com a fração A5.3 - F.

➤ **Fração A5.4 - F:** O procedimento cromatográfico empregado para a separação dos constituintes desta fração, foi a técnica de CCDP (Figura 41), que resultou no isolamento do composto **14**.

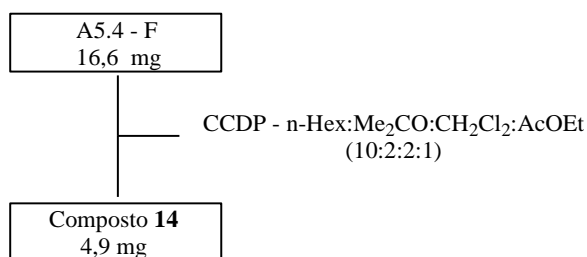


Figura 41 - Esquema da CCDP feita com a fração A5.4 - F.

➤ **Fração A5.5 – F:** Esta fração foi submetida a uma CCDP, que culminou no isolamento de quatro compostos (compostos **1**, **5**, **14** e **16**) (Figura 42), sendo todos analisados pela técnica de RMN de ^1H .

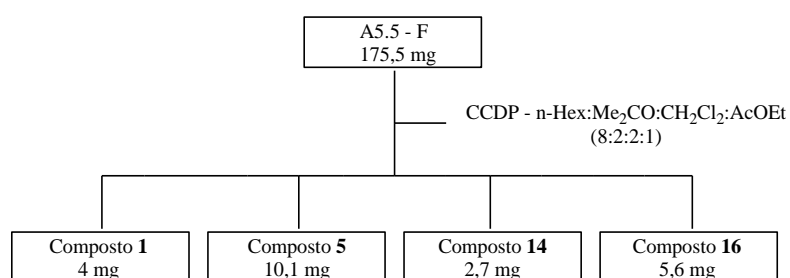


Figura 42 - Esquema exemplificando a CCDP realizada com a amostra A5.5 – F.

➤ **Fração A5.6 – F:** A partir desta fração, isolou-se dois compostos, utilizando a técnica de CCDP, ilustrada na figura 43. Assim foi isolado o composto **16** e mais um que está em processo de análise pela técnica de RMN de ^1H uno e bidimensional.

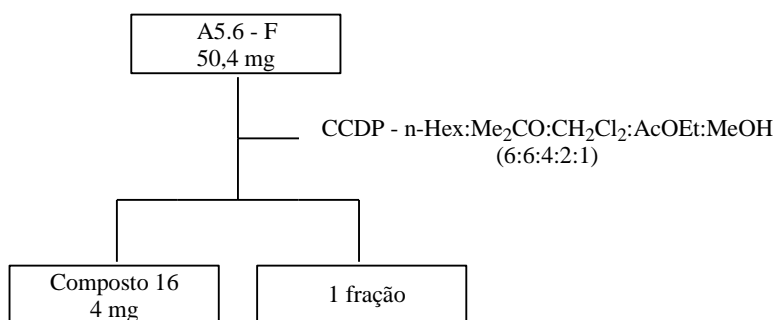


Figura 43 - Esquema ilustrando a CCDP feita com a fração A5.6 - F.

3.12 Avaliação de atividade antimicrobiana

Nove alcaloides isolados a partir de *W. procera* (Tazetina, 3-epimacronina, 8-O-desmetilhomolicorina, galantina, licorina, albomaculina, O-metillicorenina, 7-metoxi-O-metillicorenina e hippeastrina) foram avaliados quanto a atividade antimicrobiana frente a algumas bactérias bucais.

Todos os ensaios foram realizados utilizando-se cepas provenientes da American Type Culture Collection (ATCC): *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Streptococcus salivarius* (ATCC 25975), *Enterococcus faecalis* (ATCC 4082), *Lactobacillus casei* (ATCC 11578), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43717).

Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos alcaloides isolados de *W. procera* foram determinados em triplicata pelo método de microdiluição, em microplacas com 96 poços (TPP, EUA) (RIOS e RECIO, 2005). As amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO), seguido da diluição em caldo de soja tríptica (Difco) para bactérias aeróbias e Schaedler Caldo (Difco), suplementado com hemina (5,0 µg/mL) e vitamina K (10,0 µg/mL) para as bactérias anaeróbias, com a finalidade de atingir concentrações variando de 400 a 0,195 µg/ mL.

A concentração de DMSO final foi de 4% (v/v), e esta solução foi usada como controle negativo. O inóculo foi ajustado para cada organismo a fim se obter uma concentração de células de 5×10^5 unidades formadoras de colônias por mL, de acordo com o National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) (NCCLS, 2003). O dicloridrato de clorexidina foi utilizado como controle positivo, e as concentrações variaram de 0,115 µg/mL a 59,0 µg/ mL. Foram realizados os controles de esterilidade dos caldos, do dicloridrato de clorexidina, da amostra, do controle da cultura (inóculo) e do controle do DMSO.

As microplacas (96 poços) com os micro-organismos aeróbios foram fechados com um vedante de placa estéril e incubados aerobicamente a 37 °C durante 24 horas. Os micro-organismos anaeróbios foram fechados com um vedante de placa

estéril e incubados de 48 a 72 horas numa câmara anaeróbia (Don Whitley Scientific), com 5% a 10% de H₂, 10% de CO₂, 80% a 85% de N₂, a 37 °C. Logo depois, resazurina (30 µL) em solução aquosa (0,01%) foi adicionada para indicar viabilidade de micro-organismos. Os valores de CIM foram determinados a partir da concentração mais baixa dos alcaloides, capaz de inibir o crescimento de micro-organismos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimentos dos extratos

A metodologia empregada para a extração dos alcaloides da espécie *W. procera*, está de acordo com outros autores e mostra ser uma técnica eficiente. Uma vez que, consegue-se eliminar muitas impurezas, através do extrato ácido, obtendo desta forma, extratos básicos enriquecidos em alcaloides (DE ANDRADE *et al*, 2011; DE ANDRADE *et al*, 2012; GUERRIERI *et al*, 2015).

Assim como, demonstrado na metodologia, foram obtidos dois extratos brutos a partir das partes aéreas da planta *W. procera* (Lem.) Traub (Extrato bruto das folhas e extrato bruto do caule). A tabela 2 detalha o rendimento desses extratos, em comparação com a massa das partes frescas da planta e a massa dos respectivos extratos.

Tabela 2 - Massa dos extratos brutos de cada parte da planta e os respectivos rendimentos.

Parte da Planta	Massa da planta fresca (Kg)	Massa extrato bruto (g)	Rendimento (%)
Caule	3,817	148,826	3,8990
Folhas	1,558	48,274	3,0984

A partir de cada extrato bruto, foram obtidos quatro extratos (extrato acetato ácido, extrato hexânico, extrato acetato e extrato acetato:metanol). Estes foram devidamente pesados, e o seu rendimento foi calculado com base na massa do extrato bruto que os originou, sendo o resultado representado na tabela 3.

Tabela 3 - Massa dos extratos de cada parte da planta e os respectivos rendimentos com base no extrato bruto.

Parte da Planta	Massa extrato bruto (g)	Extratos orgânicos	Massa dos extratos orgânicos(g)	Rendimento (%)
Caule	148,826	Extrato acetato ácido	4,3301	2,9095
		Extrato hexânico	1,6394	1,1015
		Extrato acetato	4,4285	2,9756
		Extrato AcOEt:MeOH	4,9694	3,3390
Folhas	48,274	Extrato acetato ácido	1,5251	3,1592
		Extrato hexânico	0,2433	0,504
		Extrato acetato extração	1,582	3,2771
		Extrato AcOEt:MeOH	5,7073	11,8227

4.2 CG – EM

Atualmente, a técnica de CG - EM é empregada por diversos pesquisadores para análise inicial dos extratos de plantas da família Amaryllidaceae e provou ser uma técnica útil na identificação e quantificação relativa de alcaloides desta família (IANNELLO *et al*, 2014; GUERRIERI *et al*, 2015; SEBBEN *et al*, 2015; DE ANDRADE *et al*, 2015; SHAWKY *et al*, 2015; CORTES *et al*, 2015; RAZIK *et al*, 2016; GUO *et al*, 2016).

Como demonstrado pela pesquisadora Torras-Claveria e colaboradores, estes autores estudaram 106 espécies do gênero *Narcissus* (Amaryllidaceae) usadas na ornamentação e identificaram pela técnica de CG – EM, 62 diferentes alcaloides (TORRAS-CLAVERIA *et al*, 2014).

Desta forma, os extratos da planta *W. procera* foram inicialmente analisados pela técnica de CG – EM e os espectros obtidos foram comparados com uma base

de dados, que apresenta mais de 200 alcaloides de Amaryllidaceae caracterizados, sendo possível assim, a identificação da maioria dos alcaloides quanto ao tipo de esqueleto, e alguns ainda, sua identificação foi completa, como mostrado nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Resultado da análise de CG - EM do extrato acetato e extrato hexânico das folhas da planta *Worsleya procera* (Lem.) Traub.

FOLHA			
Extrato acetato		Extrato hexânico	
Alcaloides	Porcentagem (%)	Alcaloides	Porcentagem (%)
Tipo homolicorina	0,77	Tipo homolicorina	0,3
Tipo homolicorina	0,22	Tipo homolicorina	0,6
Galantindol	0,12	Dehydroungwedine	0,1
Tipo homolicorina	0,20	Tazetina	18,1
Dehidroungwedina	0,21	ND	0,5
Tazetina	38,31	Galantina	1,8
ND	15,92	Licorina	0,4
Galantina	10,78	Tipo homolicorina	0,5
Licorina	11,07	3-Epimacronina	31,5
Tipo homolicorina	0,49	8-O-desmemetilhomolicorina	7,9
Tipo homolicorina	19,96	Albomaculina	33,4
Tipo homolicorina	1,87	2-O-Acetillicorina	0,3
Tipo homolicorina	0,09	NC	1,9
-	-	Tipo homolicorina	0,1
-	-	ND	2,8
TOTAL	100,00	TOTAL	100,00

* ND: alcaloide não definido na base de dados utilizada.

Tabela 5 - Resultado da análise de CG - EM do extrato acetato e extrato hexânico do caule da planta *Worsleya procera* (Lem.)Traub.

CAULE			
Extrato acetato		Extrato hexânico	
Alcaloides	Porcentagem (%)	Alcaloides	Porcentagem (%)
Ismine	2,8	Tipo homolicorina	2,1
Trisferidina	0,1	Tipo homolicorina	5,4
ND	0,2	Tipo homolicorina	1,0
ND	4,4	Tazetina	5,4
Tipo homolicorina	0,3	Galantina	5,1
Galantindol	4,7	Licorina	0,8
Tipo homolicorina	0,3	Tipo homolicorina	17,8
ND	0,1	3-Epimacronina	3,0
Assoanine	0,0	Albomaculina	58,8
ND	2,3	Tipo homolicorina	0,2
Tazetina	31,4	ND	0,1
Galantina	40,1	ND	0,2
Licorine	5,1	ND	0,1
Tipo homolicorina	0,6	-	-
Tipo homolicorina	4,4	-	-
Tipo homolicorina	2,7	-	-
Tipo homolicorina	0,4	-	-
ND	0,1	-	-
Tipo homolicorina	0,0	-	-
TOTAL	100,0	TOTAL	100,0

* ND: alcaloide não definido na base de dados utilizada.

Pode-se observar, que os alcaloides majoritários presentes nas partes aéreas da planta *W. procera* são os alcaloides galantina, 3-epimacronina, albomaculina, tazetina. Vale ressaltar, que a análise de CG-EM do extrato acetato caule foi feita após a precipitação inicial de 672,2 mg do alcaloide licorina.

Estes alcaloides são típicos da família Amaryllidaceae, encontrados em muitos artigos de fitoquímica, que trabalham com esta família (BASTIDA *et al*, 2006; BERKOV *et al*, 2009; GIORDANI *et al*, 2011; BASTIDA *et al*, 2011; SARIKAYA *et al*, 2013; DE ANDRADE *et al*, 2014).

4.3 Compostos isolados

Neste trabalho foram empregados diversos processos cromatográficos, a fim de isolar os alcaloides presentes nos extratos da planta *W. procera*. Desta forma, foram isolados 19 alcaloides e uma mistura de dois alcaloides epímeros (**18** e **19**), todos analisados pela técnica de RMN de ^1H . Além de seis frações puras que estão em processo de análise por RMN de ^1H uno e bidimensional.

A partir dos espectros obtidos, em comparação com os dados da literatura, foram identificados como (Figura 44): 3-epimacronina (**1**), albomaculina (**2**), licorina (**3**), galantina (**4**), tazetina (**5**), hippeastrina (**6**), O-metillicorenina (**7**), 7-metóxi-O-metillicorenina (**8**), homolicorina (**9**), 8-O-desmetilhomolicorina (**10**), trisfaeridina (**11**), haemantamina (**12**), 8-O-desmetil-O-metillicorenina (**13**), ismina (**14**), 6-O-metilpretazetina (**15**), pretazetina (**16**), haemantatidina (**18**), 6-epihaemantidina (**19**), 8-O-desmetil-2 α -hidroxihomolicorina (**20**) e N-formilismina (**21**). O composto **17** foi identificado com o esqueleto tipo haemantamina, contudo, sua configuração exata não foi completamente elucidada.

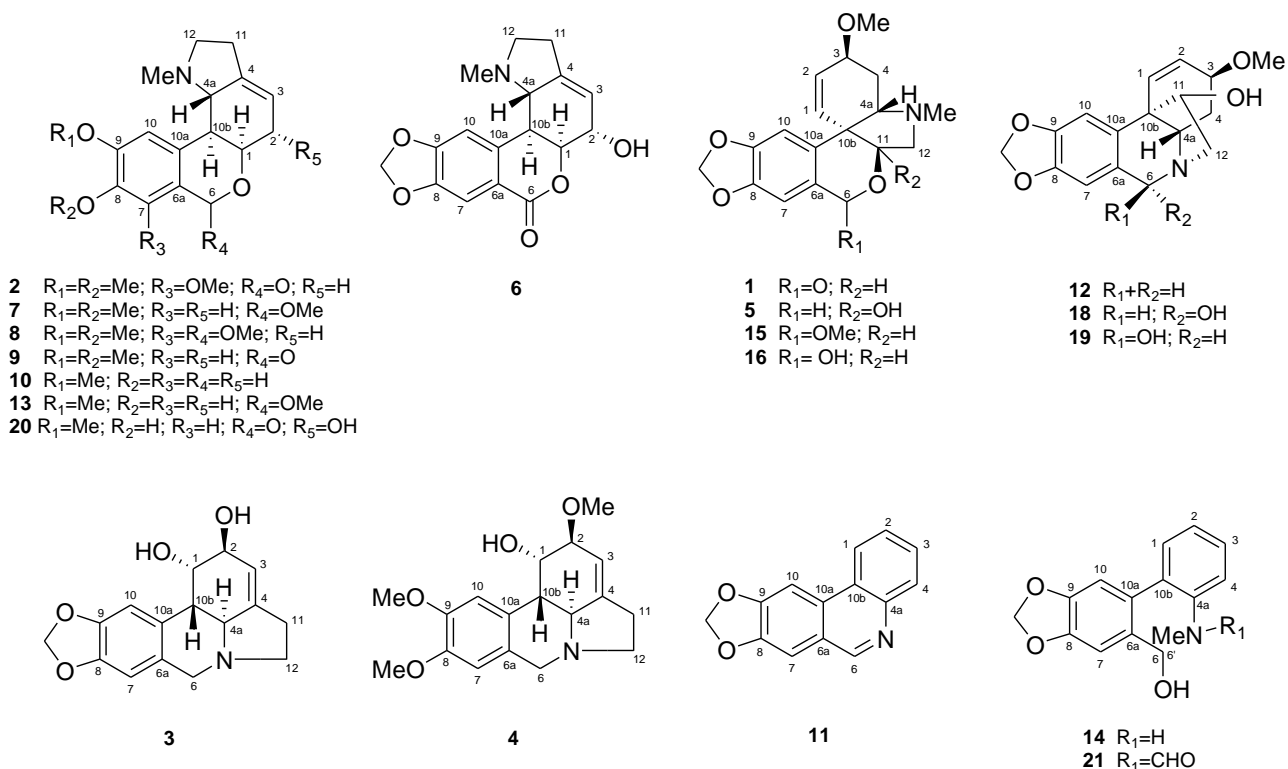


Figura 44 - Estrutura dos alcaloides isolado a partir da espécie *W. procera*.

4.3.1 Composto 3

O composto **3** foi o alcaloide isolado em maior proporção neste trabalho, totalizando em 733,1 mg de sólido branco amorfo. Este composto foi analisado pela técnica de RMN de ¹H. A partir do espectro obtido, e em comparação com os dados da literatura, conclui-se que se tratava do alcaloide licorina (C₁₇H₁₉NO₄) (LIKHITWITAYAWUID *et al*, 1993), conforme ilustrado nas figuras 45 e 46.

O espectro de RMN de ¹H obtido para este composto apresentou algumas características importantes, que incluem: dois hidrogênios singletos *p*-orientados, em 6,64 ppm e 6,88 ppm, atribuídos aos hidrogênios H-7 e H-10; a presença de um hidrogênio oléfínico, em 5,54 ppm, correspondendo ao hidrogênio da posição H-3 e um sinal do grupamento metilenodioxifenila, em 5,91 ppm (dubleto) – 5,90 ppm (dubleto), apresentando uma constante de 1,1 Hz, característico deste grupo.

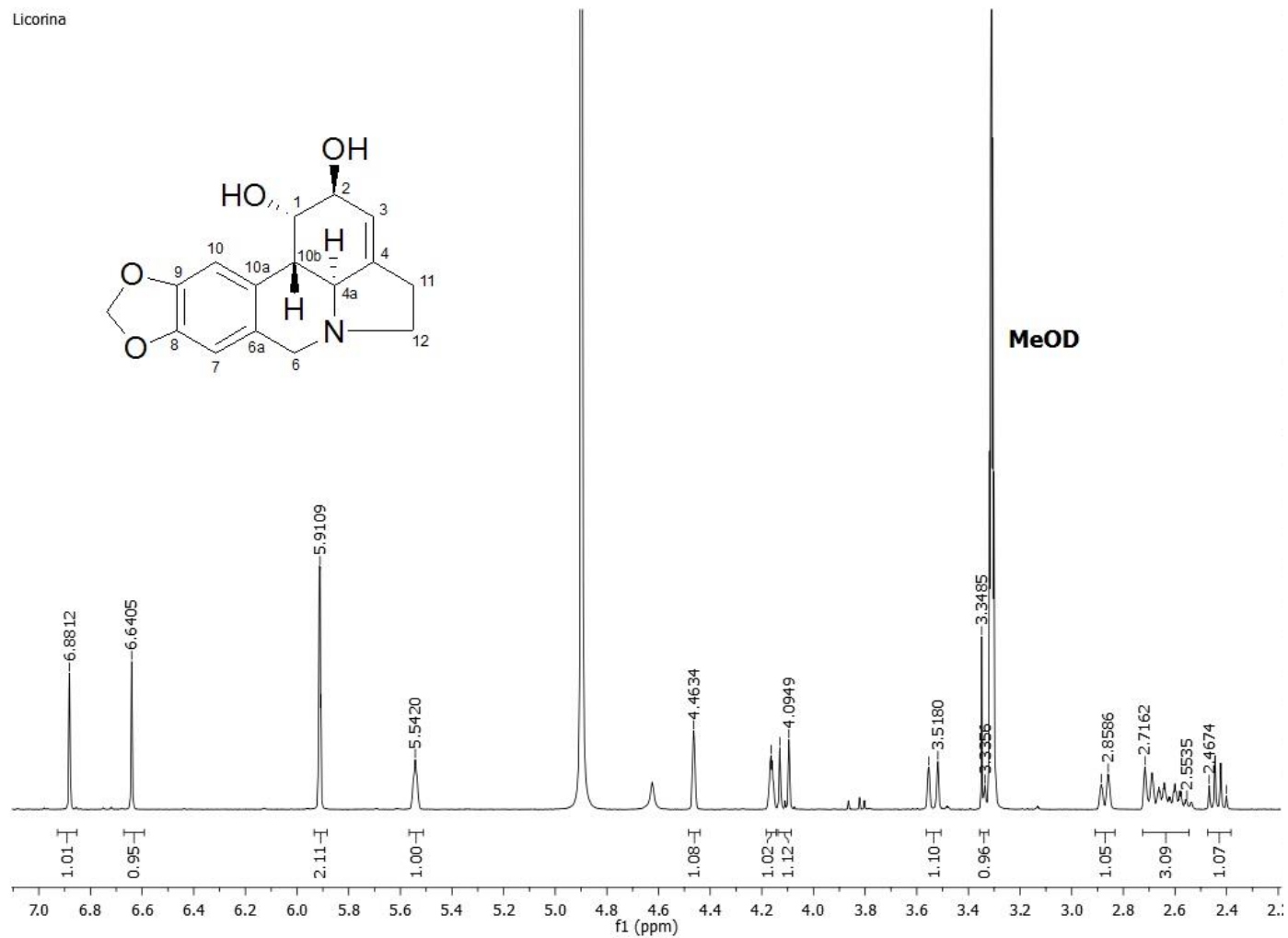


Figura 45 - Espectro de RMN de ^1H do composto **3** e sua estrutura (CD_3OD , 400 MHz).

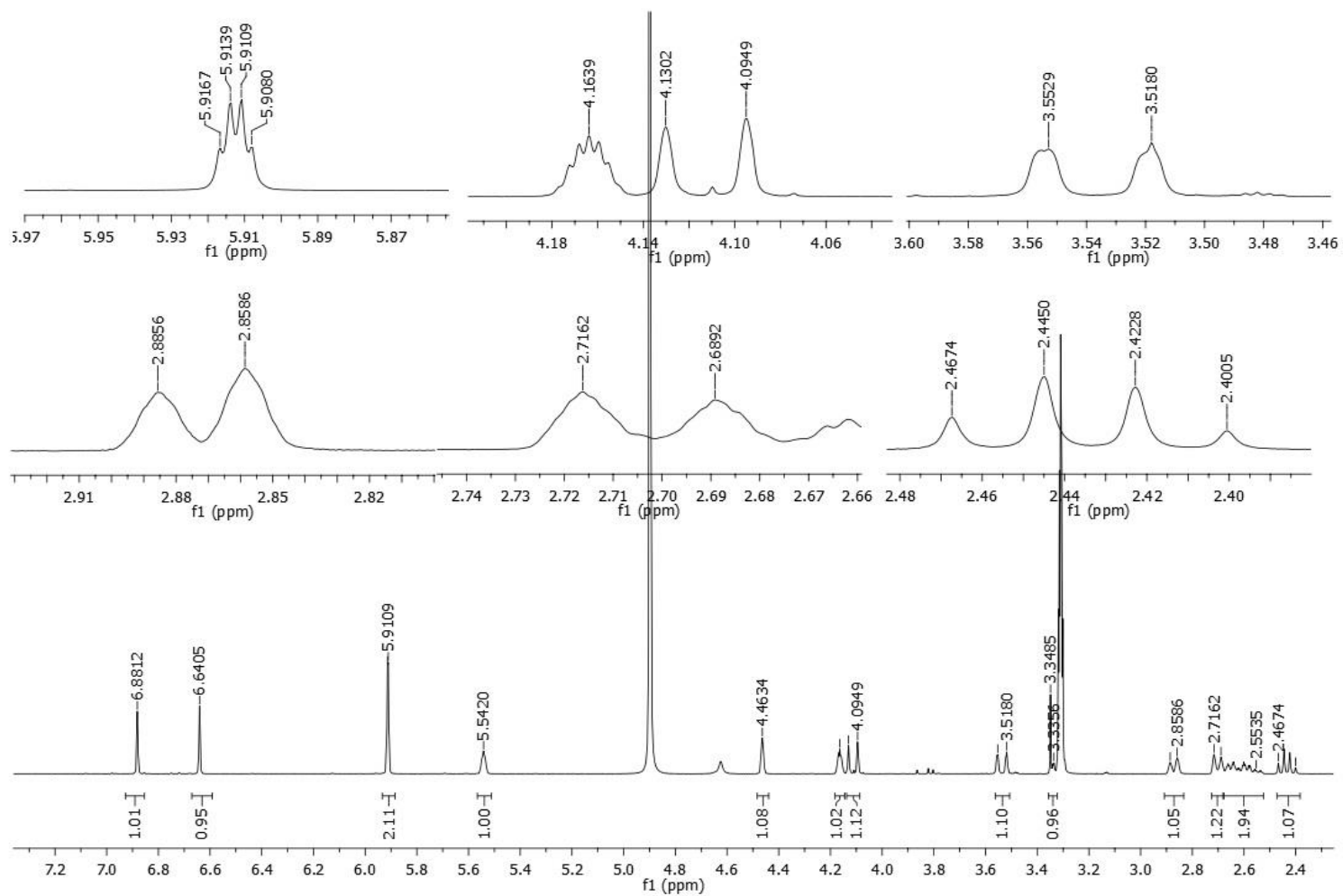


Figura 46 - Ampliações do espectro de RMN de ¹H do composto 3 (CD₃OD, 400 MHz).

Ainda, pode-se observar os sinais dos hidrogênios benzílicos da posição 6 (H-6 α e H-6 β), como dubletos, em 3,53 e 4,11 ppm, que acoplam entre si por uma constante de acoplamento de aproximadamente 14 Hz. Vale ressaltar, que ocorre um maior desblindamento dos hidrogênios β das posições 6 e 12 em relação aos seus homólogos α , devido ao efeito do par de elétrons no átomo de nitrogênio (BASTILA *et al*, 2011).

Constatou-se também, uma constante de acoplamento (J) de magnitude de 10,8 Hz, entre os H-4a e o H-10b, coerente com o acoplamento trans-diaxial destes hidrogênios, que confirma a junção *trans* dos anéis B/C de alcaloides com esqueleto do tipo licorina (BASTIDA *et al*, 2011).

A figura 47 ilustra a precipitação do alcaloide licorina, decorrente da coluna cromatográfica, realizada com a amostra A2-C.



Figura 47 – Precipitação do alcaloide licorina obtido por fracionamento em coluna.

A tabela 6 compara os deslocamentos e as multiplicidades dos hidrogênios do composto **3**, com os deslocamentos previamente publicado do alcaloide licorina (LIKHITWITAYAWUID *et al*, 1993), confirmando a estrutura proposta.

Tabela 6 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto **3**, e do alcaloide licorina.

Posição dos hidrogênios	δ experimental do alcaloide isolado (ppm) CD ₃ OD, 400 MHz	δ previamente publicado da LICORINA (ppm) DMSO -d ₆ , 300 MHz
H - 1	4,46 sl	4,27 sl
H - 2	4,16 m	3,97 sl
H - 3	5,54 m	5,37 sl
H - 4a	2,87 d (10,8)	2,60 d (10,6)
H - 6 α	3,53 dl (13,9)	3,32 d (14,4)
H - 6 β	4,11 d (14,1)	4,02 d (14,4)
H - 7	6,64 s	6,68 s
H - 10	6,88 s	6,81 s
H - 10b	2,70 dl (10,8)	2,50 m
H - 11 α/β	2,52 – 2,67 m	2,44 m
H - 12 α	2,43 q (8,9)	2,19 ddd (14,4; 8,6; 1,5)
H - 12 β	3,33 m	3,19 dd (14,4; 7,5)
OCH ₂ O	5,91 d – 5,90 d (1,1)	5,94 s – 5,96 s

Alcaloides com esqueleto do tipo licorina, são considerados derivados do acoplamento fenol oxidativo intramolecular *orto-para'*, do precursor O-metilnorbaledina (Figura 48). Estudos de síntese de licorina e derivados, utilizando L-Tyr marcada (Trítio) na posição 2 β , concluíram que, este alcaloide é formado a partir do alcaloide norpluvina, com inversão de configuração, passando por um intermediário epóxido, já que a licorina apresenta um grupamento hidroxila, também na posição 2 β (BASTIDA *et al*, 2006; BASTIDA *et al*, 2011).

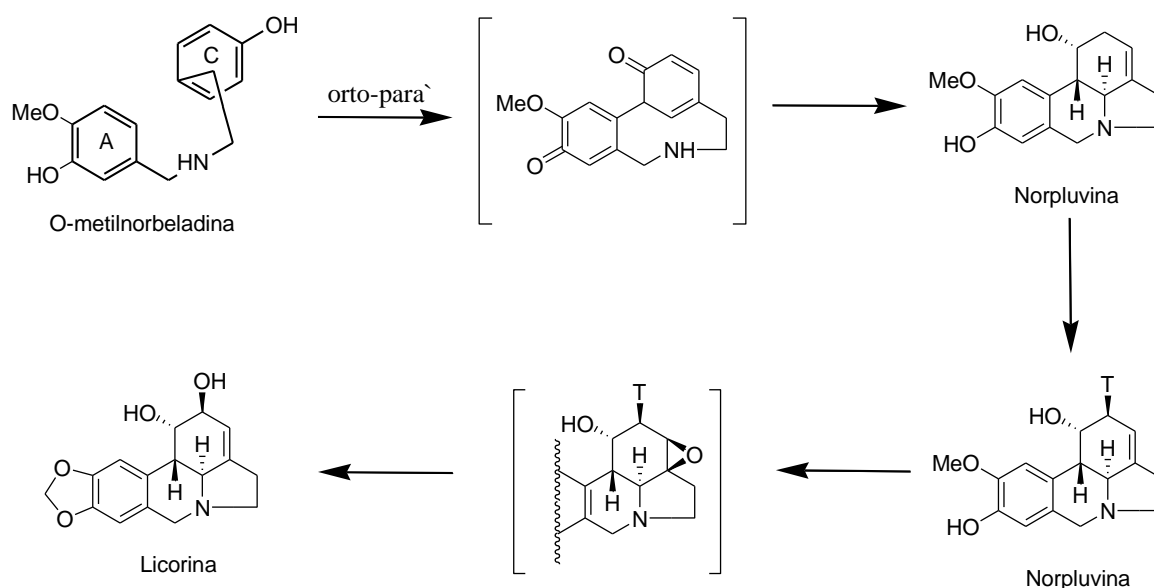


Figura 48 – Parte da biossíntese de alcaloides com esqueleto do tipo licorina.

A licorina é o alcaloide mais abundante da família Amaryllidaceae, descrito em muitas espécies de planta pertencentes a esta família (BASTIDA *et al*, 1992; HOHMANN *et al*, 2002; CABEZAS *et al*, 2003; PIGNI *et al*, 2010; BASTIDA *et al*, 2011; DE andrade *et al*, 2012; SARIKAYA *et al*, 2013; LEE *et al*, 2014^a; SEBBEN *et al*, 2015; ORTIZ *et al*, 2016).

Diversos estudos de atividade biológica foram realizados com este composto, demonstrando que a licorina apresenta muitos efeitos biológicos, principalmente, quando se trata de efeitos antitumorais (CAMPBELL *et al*, 1998; HOHMANN *et al*, 2002; KAIA *et al*, 2004; MCNULTY *et al*, 2009; LAMORAL-THEYS *et al*, 2010; BERKOV *et al*, 2011; JIN, Z., 2013; HE *et al*, 2015).

Este alcaloide também exibe atividade antirretroviral e antiviral (SZLÁVIK *et al*, 2004; HE *et al*, 2013), atividade antiparasitária contra *Trichomonas vaginalis* (VIEIRA *et al*, 2011; GIORDANI *et al*, 2012) e contra *Plasmodium falciparum* (CAMPBELL *et al*, 1998; CAMPBELL *et al*, 2000; NAIR *et al*, 2000), atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (LEE *et al*, 2014^b), além de exercer efeitos neuroprotetores (LI *et al*, 2013).

4.3.2 Composto 4

Foram isolados 79,8 mg do composto **4**, a partir do fracionamento cromatográfico dos extratos do caule e das folhas de *W. procera*, sendo analisado pela técnica de RMN de ^1H , como ilustrado na figura 49.

O espectro de RMN de ^1H obtido para este composto, apresentou características de alcaloides com esqueleto do tipo licorina, como a presença de dois hidrogênios aromáticos em 6,85 e 6,62 ppm, um hidrogênio olefínico, em 5,60 ppm e dois hidrogênios dubletos, em 3,50 e 4,15 ppm, acoplando entre si por uma constante de acoplamento de aproximadamente 14 Hz.

Ao comparar o espectro deste composto, com o espectro do alcaloide licorina, verificou-se algumas diferenças, como a presença de três grupamentos metoxilas, dois aromáticos, em 3,88 e 3,84 ppm, e um alifático, em 3,51 ppm, inexistentes no alcaloide licorina. Além, da ausência do grupamento metilenodióxifenila.

Desta forma, a partir dos deslocamentos dos hidrogênios obtidos deste composto, em comparação com dados da literatura, concluiu-se que se tratava do alcaloide galantina ($\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NO}_4$) (BASTIDA *et al*, 1990).

A tabela 7 detalha os deslocamentos e as multiplicidades dos hidrogênios do composto **4**, com os deslocamentos do alcaloide galantina, previamente publicado (BASTIDA *et al*, 1990). Pode-se observar que ocorre um maior desblindamento dos hidrogênios 6β e 12β em comparação com seus homólogos α , característico de alcaloides, com este tipo de esqueleto (BASTIDA *et al*, 2011).

Galantina

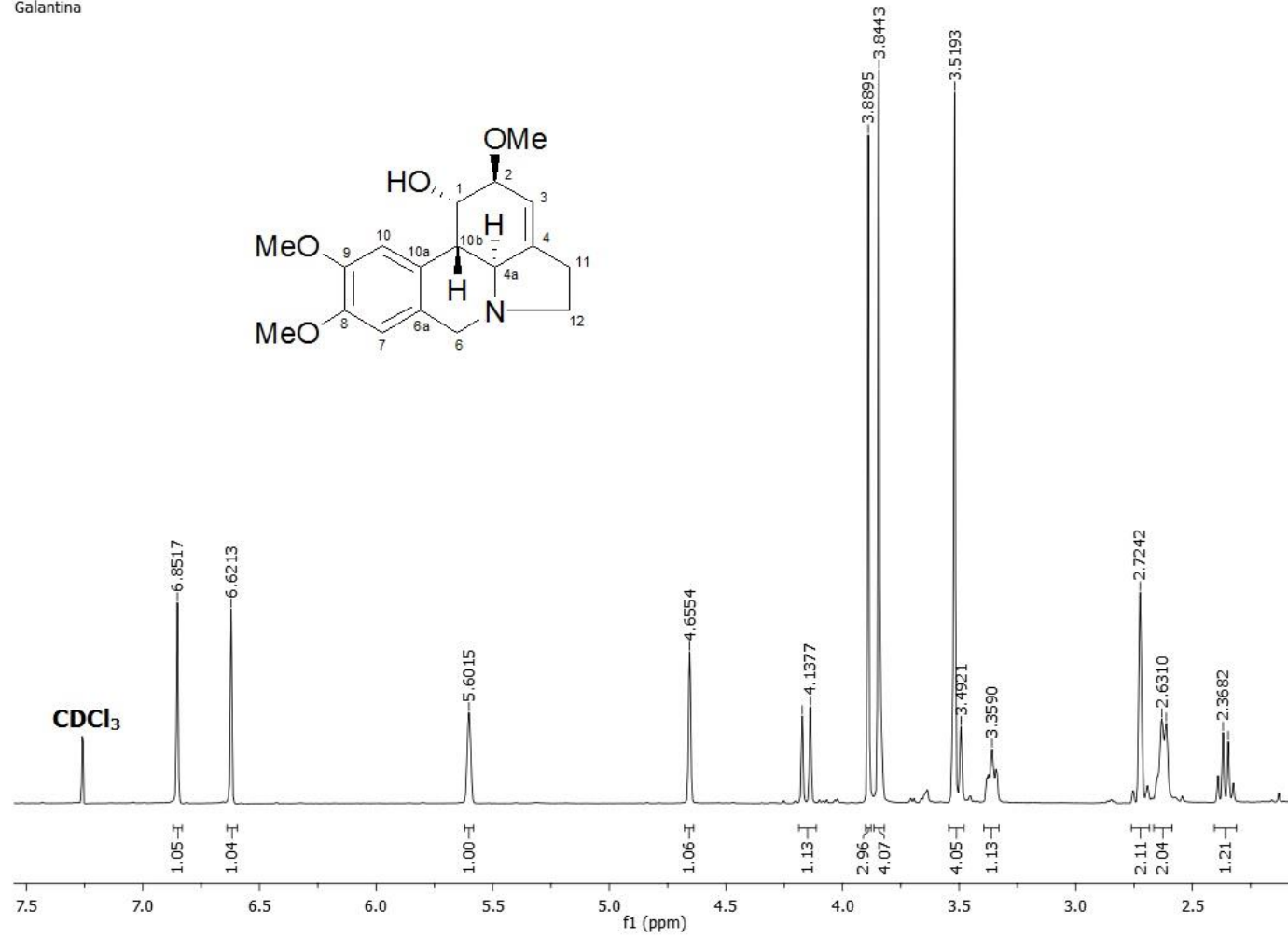


Figura 49 - Espectro de RMN de ¹H do composto 4 e sua estrutura (CDCl₃, 400 MHz).

Tabela 7 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto **4**, e do alcaloide galantina.

Posição dos hidrogênios	δ experimental do alcaloide isolado (ppm) CDCl_3 , 400 MHz	δ previamente publicado da GALANTINA (ppm) CDCl_3 200 MHz
H - 1	4,46 s	4,55 s
H - 2	3,84 overlap	3,72 m
H - 3	5,60 sl	5,55 sl
H - 4a	2,72 s	2,65 s
H - 6 α	3,50 d (14)	3,40 dl (14)
H - 6 β	4,15 d (13,9)	4,05 d (14)
H - 7	6,62 s	6,52 s
H - 10	6,85 s	6,78 s
H - 10b	2,72 s	2,65 s
H - 11 α/β	2,59 – 2,66 m	2,45 – 2,60 m
H - 12 α	2,31 q (8,7)	2,25 dd (8,2; 16,4)
H - 12 β	3,35 m	3,35 ddd (6; 10; 16,4)
OMe	3,88 s	3,78 s
OMe	3,84 s	3,74 s
OMe	3,51 s	3,40 s

Na biossíntese do alcaloide galantina, o intermediário norpluvina, passa por uma metilação, levando ao alcaloide pluvina, esta, por sua vez, é hidroxilada na posição 2 β por um mecanismo de inversão de configuração, similar ao observado na biossíntese do alcaloide licorina, onde uma posterior metilação da posição dois, leva a formação do alcaloide galantina (BASTIDA *et al*, 2011) (Figura 50).

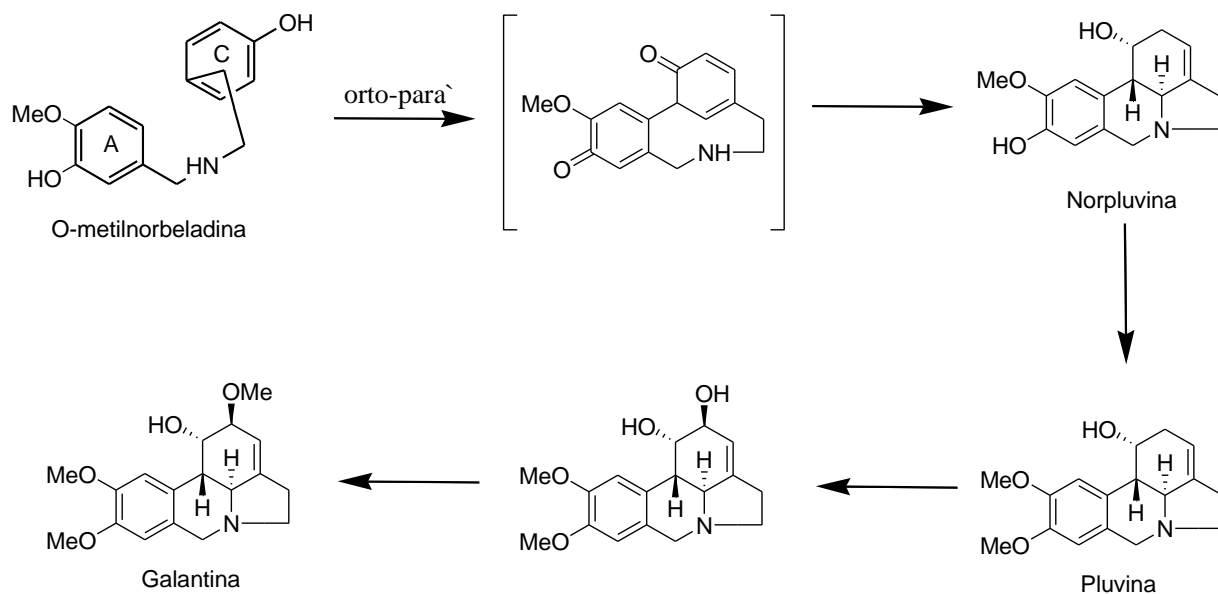


Figura 50 - Parte da biossíntese do alcaloide galantina.

Como obteve-se cristais da galantina, estes foram enviados para análise de cristalografia de Raios-X, confirmando a configuração absoluta deste alcaloide, como ilustrado na figura 51. Sendo a primeira vez, descrito estudos de cristalografia de Raios-X para este composto.

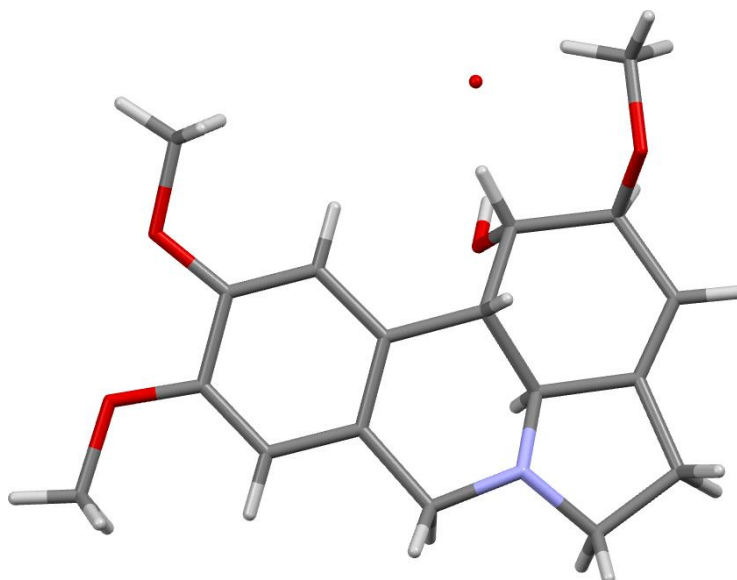


Figura 51 - Análise por cristalografia do alcaloide galantina.

A galantina foi isolada a partir de muitas espécies da família Amaryllidaceae (HERRERA *et al*, 2001; SARIKAYA *et al*, 2013; EMIR *et al*, 2016) e estudos de atividade biológica realizados para este alcaloide, mostram que a galantina apresenta atividade hipotensiva (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al*, 2000), atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase (AChE) (SARIKAYA *et al*, 2013), atividade antiparasitária contra *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma brucei rhodesiense* (HERRERA *et al*, 2001) e atividade citotóxica moderada (BERKOV *et al*, 2011).

4.3.3 Composto 5

O composto **5** foi isolado a partir do caule e das folhas de *W. procera*, totalizando 57,9 mg, apresentando-se como um sólido branco, e como cristais. Sendo analisado pela técnica de RMN de ^1H , como observado nas figuras 52 e 53.

Após a análise do espectro deste composto, em comparação com dados da literatura, foi-se indentificado o alcaloide tazetina ($\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_5$) (GHOSAL *et al*, 1984).

Alcaloides, com esqueleto do tipo tazetina, apresentam algumas características principais em seus espectros de RMN de ^1H , como a presença do grupamento NMe entre 2,4 – 2,5 ppm, e do grupo metilendióxifenila entre as posições C-8 e C-9 (BASTIDA *et al*, 2011).

No espectro do composto **5** pode-se observar a presença das características mencionadas, e a presença de alguns sinais importantes, como dois hidrogênios singletos, em 6,85 e 6,49 ppm, atribuídos aos hidrogênios H-10 e H-7, respectivamente. Um sinal, integrando para três hidrogênios em 3,46 ppm, característico do grupamento OMe alifático e a presença de dois hidrogênios olefínicos, em 5,61 ppm, como um duplo duplo dubleto, correspondente ao H-1, e em 6,14 ppm, como um duplo tripleto, correspondendo ao H-2 (Figuras 52 e 53).

Tazetina

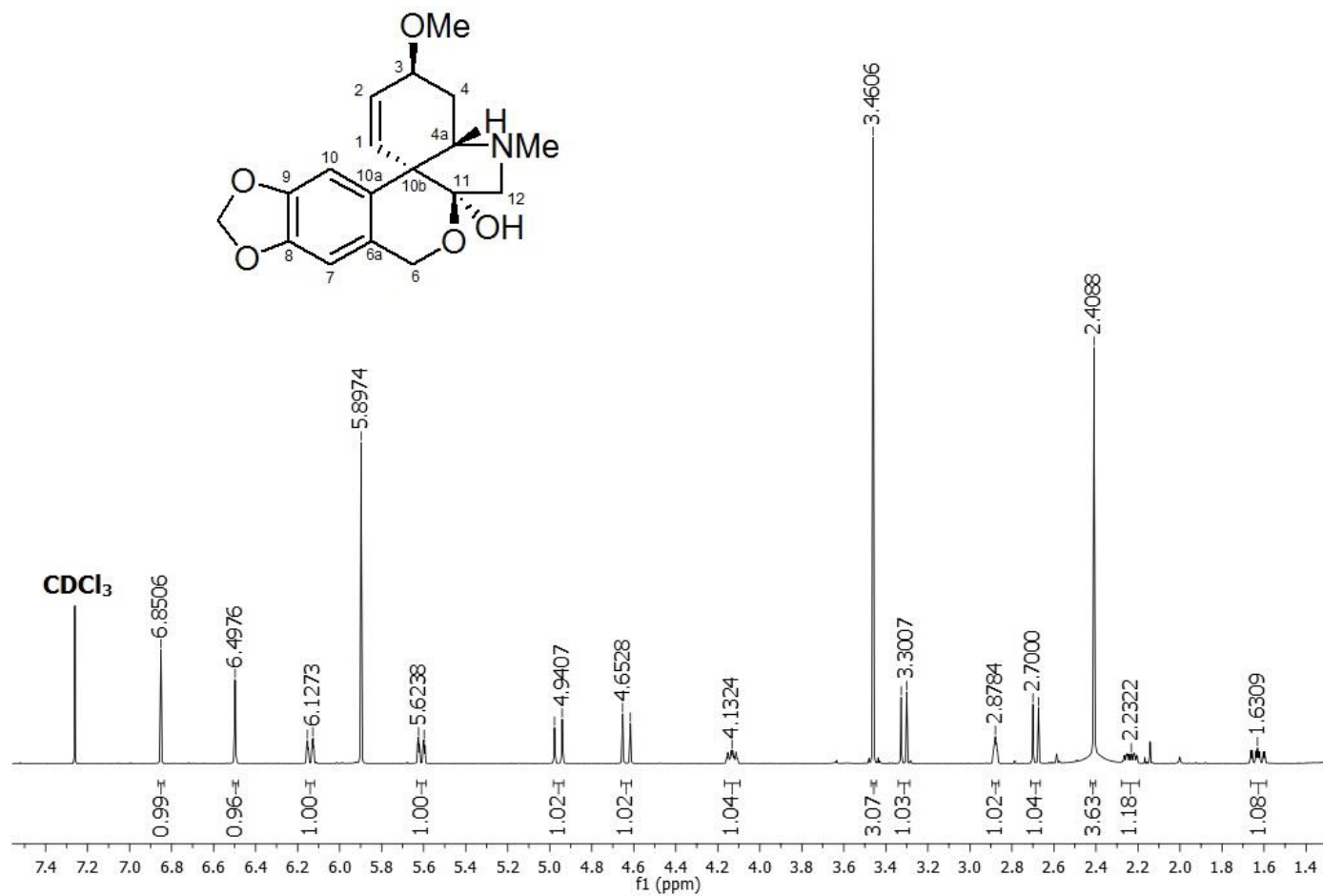


Figura 52 - Espectro de RMN de ¹H do composto 5 e sua estrutura (CDCl₃, 400 MHz).

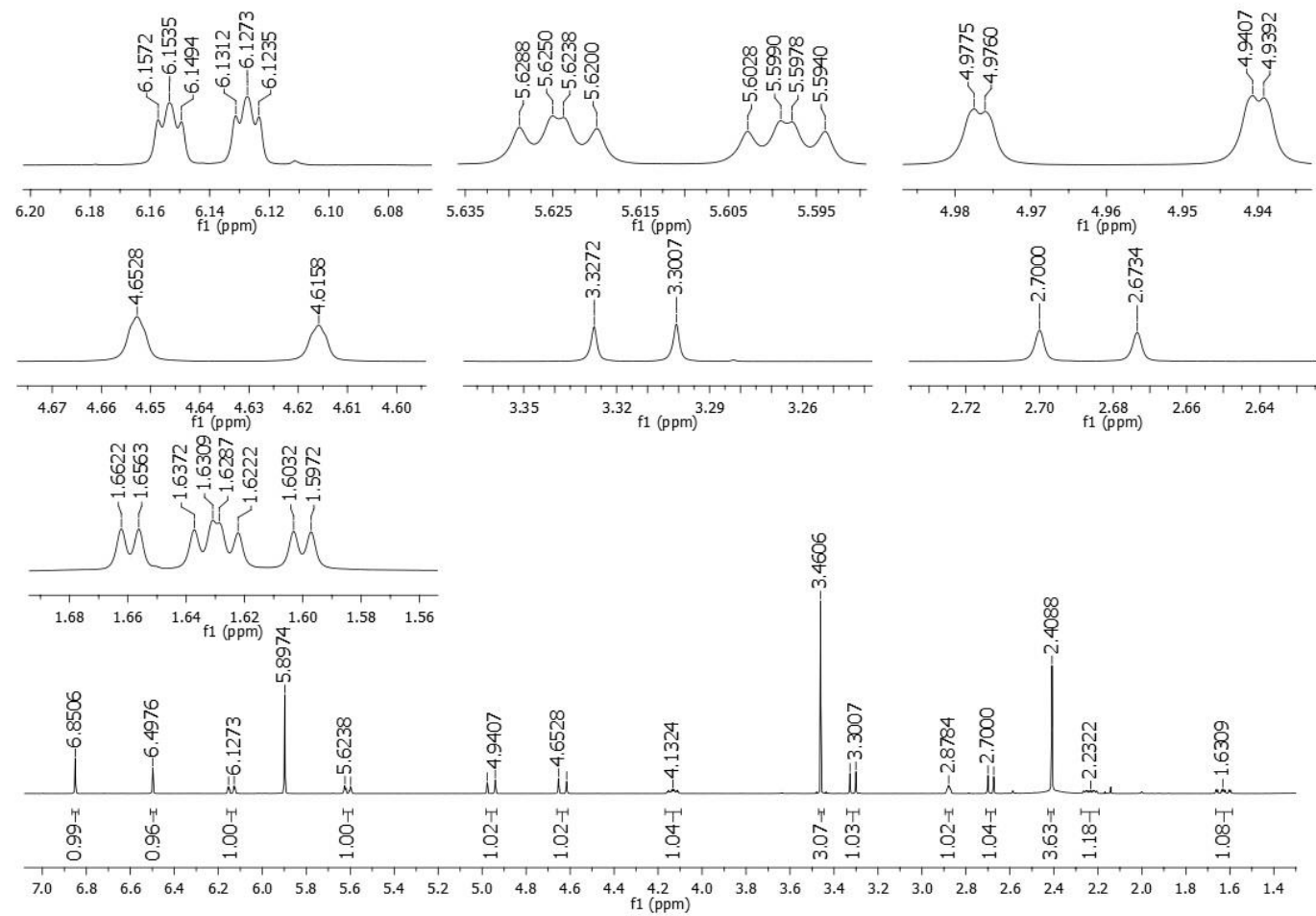


Figura 53 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto 5 (CDCl_3 , 400 MHz).

Ainda, pode-se verificar os sinais dos hidrogênios da posição 12, como dubletos, em 2,68 ppm, atribuído ao H-12 α , e em 3,31 ppm, correspondente ao H-12 β , que acoplam entre si por uma constante de acoplamento de 10,6 Hz, e os sinais dos hidrogênios benzílicos da posição 6, em 4,63 e 4,95 ppm, atribuídos aos H-6 α e H-6 β , respectivamente (Figura 52 e 53).

A figura 54 ilustra cristais de tazetina, decorrentes da coluna cromatográfica da amostra A5-F.



Figura 54 - Cristais de tazetina obtidos da coluna cromatográfica, realizada com a amostra A5-F.

A tabela 8 detalha os deslocamentos e as multiplicidades dos hidrogênios do composto **5**, com os deslocamentos do alcaloide tazetina, previamente publicado, confirmando assim, a estrutura proposta (GHOSAL *et al*, 1984).

Tabela 8 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto **5**, e do alcaloide tazetina.

Posição dos hidrogênios	δ experimental do alcaloide isolado (ppm) CDCl_3 , 400MHz	δ previamente publicado da TAZETINA (ppm) CDCl_3 , 90 MHz
H - 1	5,61 ddd (10,4; 1,9; 1,5)	5,60 ddd (10,5; 2; 1,5)
H - 2	6,14 dt (10,4; 1,5)	6,15 ddd (10,5; 2; 1,2)
H - 3	4,13 m	4,13 m
H - 4a	2,87 m	2,83 m
H - 4 α	2,23 m	2,20 m
H - 4 β	1,62 ddd (13,6; 10,1; 2,4)	1,60 m
H - 6 α	4,63 d (14,8)	4,65 d (14,7)
H - 6 β	4,95 dd (14,7; 0,6)	4,95 dd (14,7; 0,5)
H - 7	6,49 s	6,50 sl
H - 10	6,85 s	6,85 s
H - 12 α	2,68 d (10,6)	2,65 d (10,5)
H - 12 β	3,31 d (10,6)	3,30 d (10,5)
NMe	2,40 s	2,40 s
OCH ₂ O	5,89 s	5,90 s
OMe	3,46 s	3,45 s

Alcaloides, com esqueleto do tipo tazetina, são considerados derivados do acoplamento fenol oxidativo para-para' do precursor O-metilnorbeladina (BASTIDA *et al*, 2011). Estudos de biossíntese de *Sprekelia formosissima* demonstraram que ocorre uma conversão dos esqueletos do tipo haemantamina para os esqueletos do tipo tazetina, passando pela rota biossintética haemantamina \rightarrow 6-epihaemantidina – haemantidina \rightarrow pretazetina, como ilustrado na figura 55 (WILDMAN e BAILEY, 1968; BASTIDA *et al*, 2011).

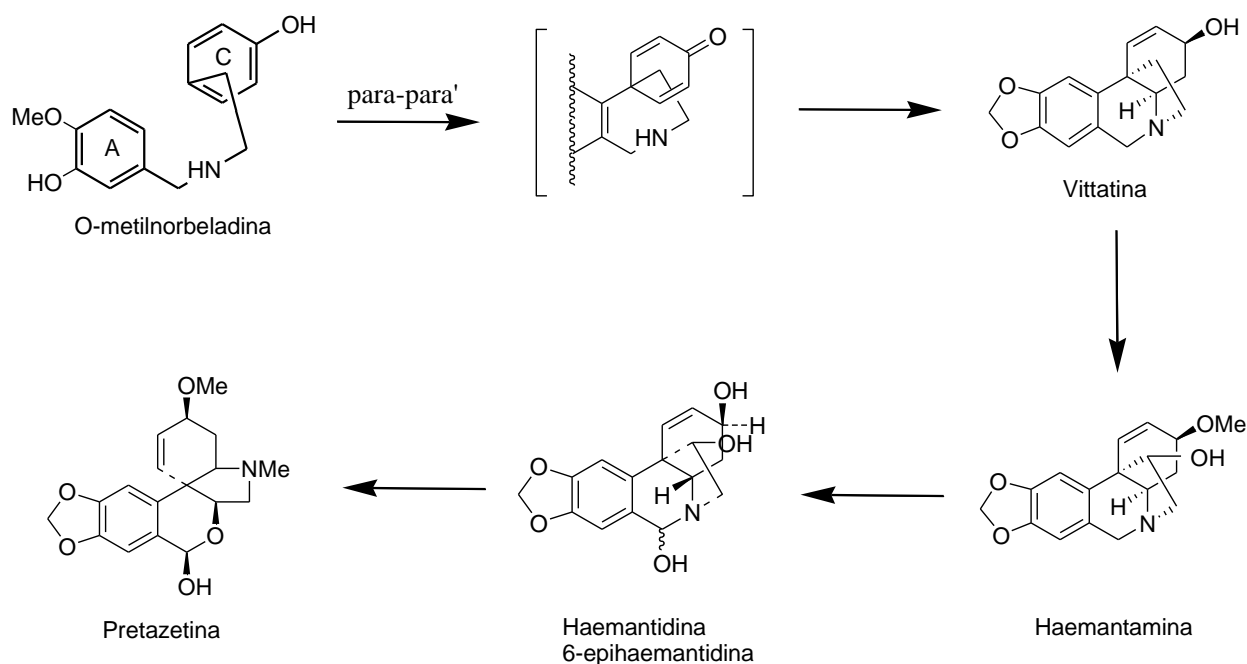


Figura 55 – Parte da rota biossintética dos alcaloides com esqueleto do tipo tazetina.

A tazetina representa um alcaloide amplamente isolado a partir de espécies da família Amaryllidaceae (BASTIDA *et al*, 1995; BRINE *et al*, 2002; HOHMANN *et al*, 2002; CABEZAS *et al*, 2003; BERKOV *et al*, 2007; GIORDANI *et al*, 2011; DE ANDRADE *et al*, 2012; LEE *et al*, 2014). Porém, foi verificado que é um artefato da extração da pretazetina (BASTIDA *et al*, 2011; DE ANDRADE *et al*, 2012).

Estudos de atividade biológica realizado com este alcaloide, verificaram que o mesmo, apresenta atividade antiproliferativa frente a células neoplásicas (HOHMANN *et al*, 2002), atividade antiparasitária contra *Trichomonas vaginalis* (VIEIRA *et al*, 2011) e efeitos hipotensivos (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al*, 2000).

4.3.4 Composto 1

Foram isolados 34,7 mg do composto **1**, a partir do fracionamento cromatográfico dos extratos do caule e das folhas de *W. procera*, sendo analisado pela técnica de RMN de ^1H , como ilustrado na figura 56 e 57.

As características principais do espectro de RMN de ^1H obtido para este composto incluem: dois hidrogênios singletos *p*-orientados, em 7,51 e 6,74 ppm; um sinal em 6,04 ppm (dubleto) – 6,02 ppm (dubleto), integrando para dois hidrogênios ($J = 1,2$ Hz), característico do grupamento metilenodioxifenila; a presença de dois sinais de olefinas, em 5,95 ppm, como um dubleto ($J = 10,4$ Hz), e em 5,47 ppm, como um duplo tripleto ($J = 10,4; 1,8$). Além de dois sinais, em 2,52 e 3,42 ppm, como singletos, integrando para três hidrogênios, representando os grupamentos NMe e OMe, respectivamente.

A partir destas observações, conclui-se que o composto **1** é um alcaloide com esqueleto do tipo tazetina, porém não foi detectado os sinais correspondente aos hidrogênios da posição 6, o que levou a suposição que este alcaloide apresentava uma carbonila nesta posição.

Assim, ao comparar os deslocamentos e as multiplicidades do composto **1**, com dados da literatura, pôde-se constatar que era o alcaloide 3-epimacronina ($\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_5$) (KIHARA *et al*, 1987).

Nas ampliações da figura 57, observar-se as multiplicidades dos hidrogênios das posições H-11, H-12 α e H-12 β , todos como um duplo dubleto. Onde o H-11, corresponde ao sinal em 4,45 ppm ($J_{11,12\beta} = 11,0$ Hz e $J_{11,12\alpha} = 7,7$ Hz), o H-12 β , representado pelo sinal em 3,18 ppm ($J_{12\beta,11} = 10,8$ Hz e $J_{12\beta,12\alpha} = 10,2$ Hz) e o H-12 α , atribuído ao sinal em 2,79 ppm ($J_{12\alpha,12\beta} = 9,9$ e $J_{12\alpha,11} = 7,8$).

A tabela 9 compara os deslocamentos e as multiplicidades do composto **1**, com os deslocamentos previamente publicados do alcaloide 3-epimacronina (KIHARA *et al*, 1987), onde pode-se observar que se trata do mesmo composto.

3 - epimacronina

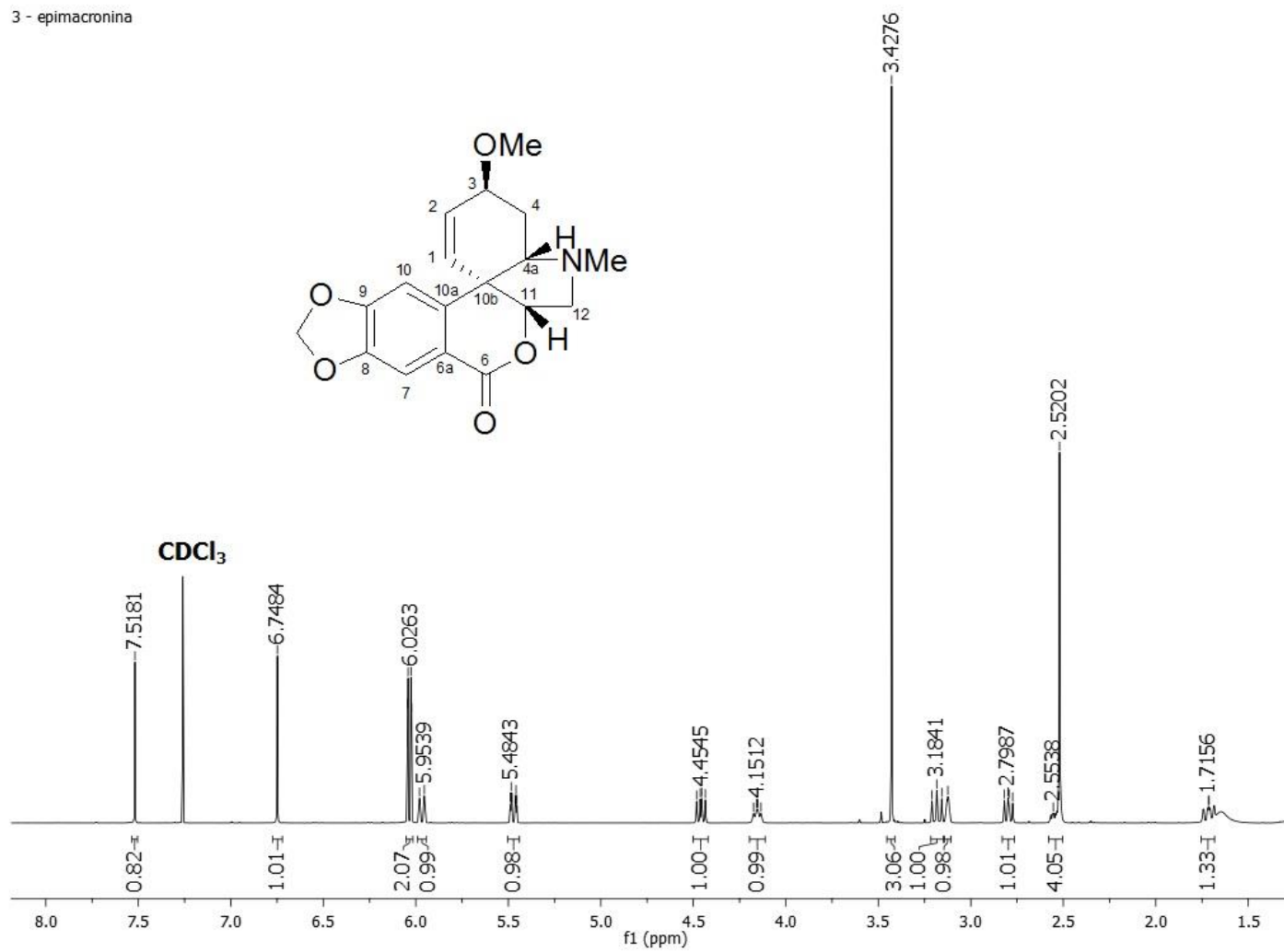


Figura 56 - Espectro de RMN de ¹H do composto 1 e sua estrutura (CDCl₃, 400 MHz).

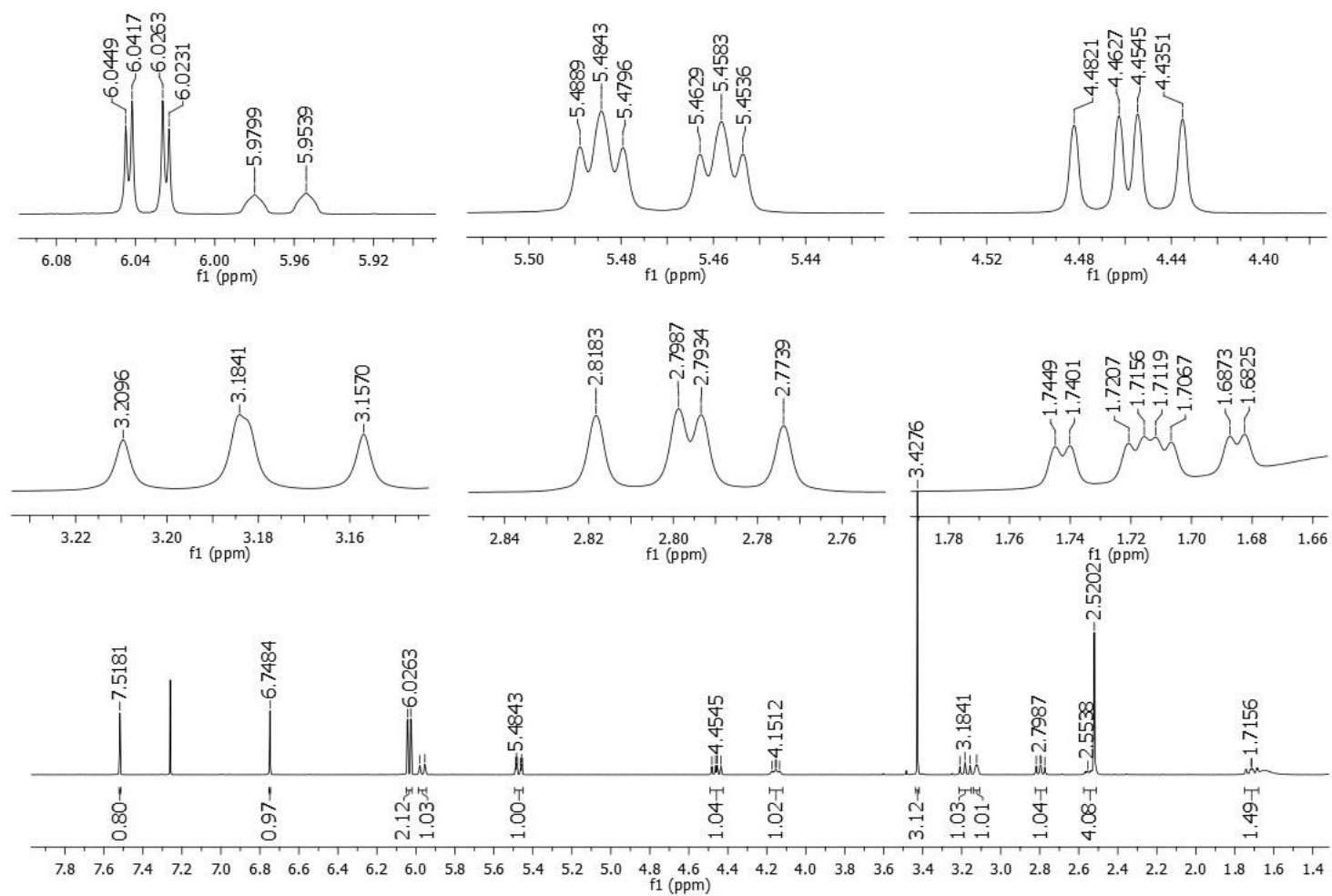


Figura 57 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto 1 (CDCl_3 , 400 MHz).

Tabela 9 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto **1**, e do alcaloide 3-epimacronina.

Posição dos hidrogênios	δ experimental do alcaloide isolado (ppm) CD_3OD , 400 MHz	δ previamente publicado da 3-EPIMACRONINA (ppm) CDCl_3 , 100 MHz
H - 1	5,47 dt (10,4; 1,8)	5,44 ddd (10; 2; 2)
H - 2	5,96 d (10,4)	5,97 d (10)
H - 3	4,15 m	4,12 m
H - 4a	3,12 m	3,10 m
H - 4 α	1,71 ddd (13,3; 9,7; 1,9)	1,70 m
H - 4 β	2,55 m	2,55 m
H - 7	7,51 s	7,52 s
H - 10	6,74 s	6,73 s
H - 11	4,45 dd (11,0; 7,7)	4,43 dd (11; 8)
H - 12 α	2,79 dd (9,9; 7,8)	2,76 dd(10; 8)
H - 12 β	3,18 dd (10,8; 10,2)	3,16 dd (11; 10)
NMe	2,52 s	2,50 s
OCH ₂ O	6,04 d – 6,02 d (1,2)	6,01 s
OMe	3,42 s	3,40 s

A 3-epimacronina é um alcaloide descrito em muitas espécies de plantas da família Amariyllidaceae (VILADOMAT *et al*, 1990; BRINE *et al*, 2002; HOHMANN *et al*, 2002; BERKOV *et al*, 2009; GIORDANI *et al*, 2011; DE ANDRADE *et al*, 2012; LEE *et al*, 2014).

Estudos de citotoxicidade frente a linhagens de células tumorais, verificaram que a 3-epimacronina apresenta atividade citotóxica moderada, contra células tumorais Molt 4 (células neoplásicas humanas de linfoide) (WENIGER *et al*, 1995). E estudos de atividade inibidora da enzima AChE (acetilcolinesterase), constataram que este alcaloide exibe fraca atividade inibidora desta enzima (KULHÁNKOVÁ *et al*, 2013).

4.3.5 Composto 15

O composto **15** foi isolado a partir do fracionamento cromatográfico do extrato acetato do caule de *W. procera*, totalizando 2,7 mg. Sendo analisado pela técnica de RMN de ^1H , como ilustrado nas figuras 58 e 59.

A partir do espectro obtido, e em comparação com os dados da literatura, conclui-se que se tratava do alcaloide 6-O-metilpretazetina ($\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_5$), isolado pela primeira vez, por CABEZAS e colaboradores, no ano de 2003 (CABEZAS *et al*, 2003).

A 6-O-metilpretazetina é um alcaloide com esqueleto do tipo tazetina, e no espectro de RMN de ^1H é observa-se características que definem este esqueleto, como a presença de dois hidrogênios singletos, em 6,77 ppm e 6,75 ppm, correspondente aos hidrogênios aromáticos das posições H-7 e H-10, respectivamente; dois hidrogênios olefínicos, em 5,53 ppm, como um duplo tripleto, atribuído ao H-1 e, um em 5,87 ppm, como um dubleto, correspondendo ao H-2.

Além da presença de dois sinais característicos do grupamento OMe alifático, em 3,55 e 3,42 ppm, e a presença de um sinal em 2,48 ppm, integrando para três hidrogênios, que corresponde ao grupamento NMe, pode-se observar o sinal referente ao hidrogênio da posição H-6, em 5,58 ppm, como um singlete, uma vez que não acopla com nenhum hidrogênio.

A tabela 10 detalha os deslocamentos e as multiplicidades observadas para este composto, em comparação com os deslocamentos do alcaloide 6-O-metilpretazetina, previamente publicado (CABEZAS *et al*, 2003), confirmando a estrutura proposta.

O alcaloide 6-O-metilpretazetina é incomum na família Amaryllidaceae. Foi isolado por poucos pesquisadores da área de fitoquímica (CABEZAS *et al*, 2003; LEE *et al*, 2014).

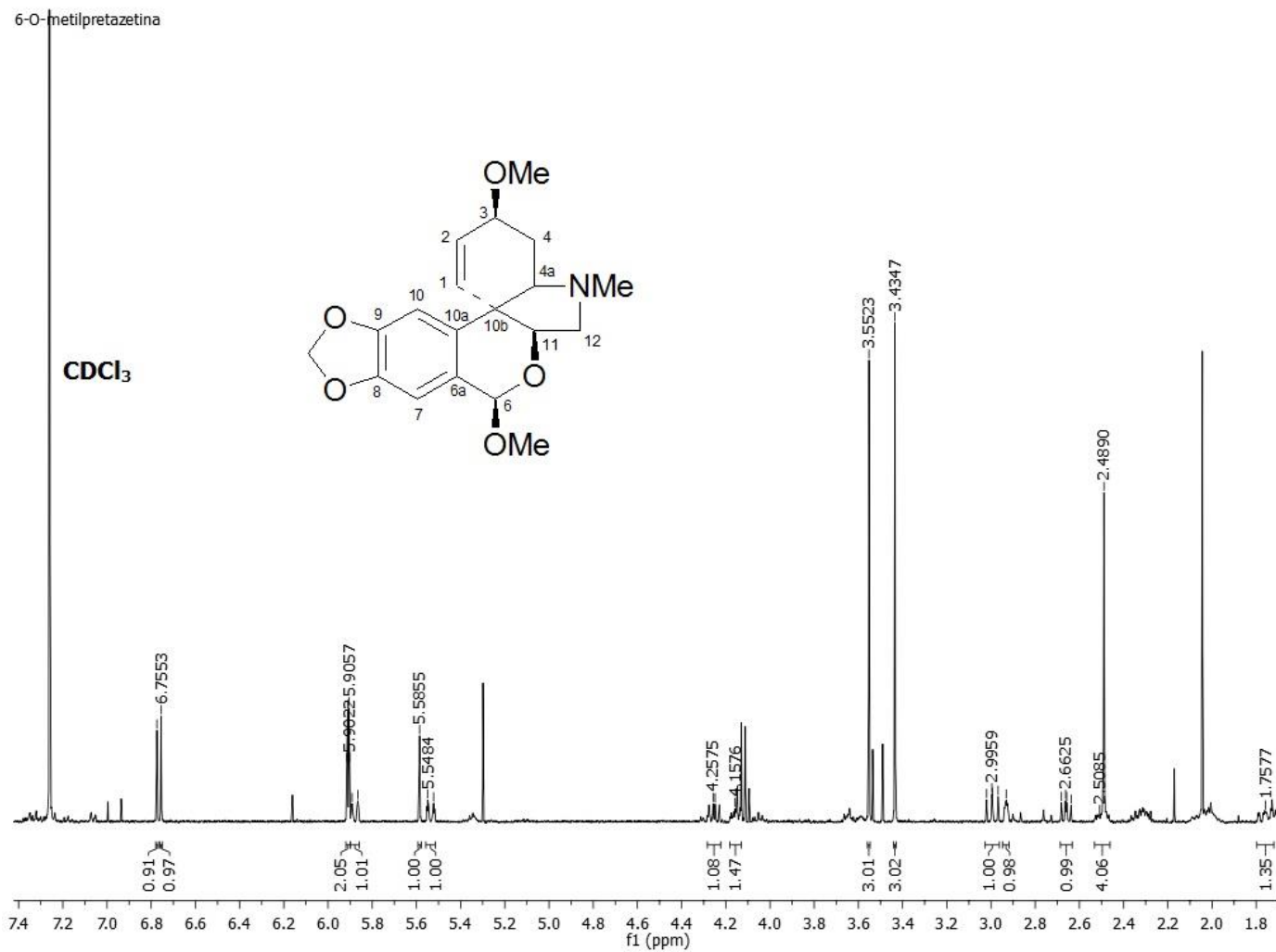


Figura 58 - Espectro de RMN de ¹H do composto **15** e sua estrutura (CDCl₃, 400 MHz).

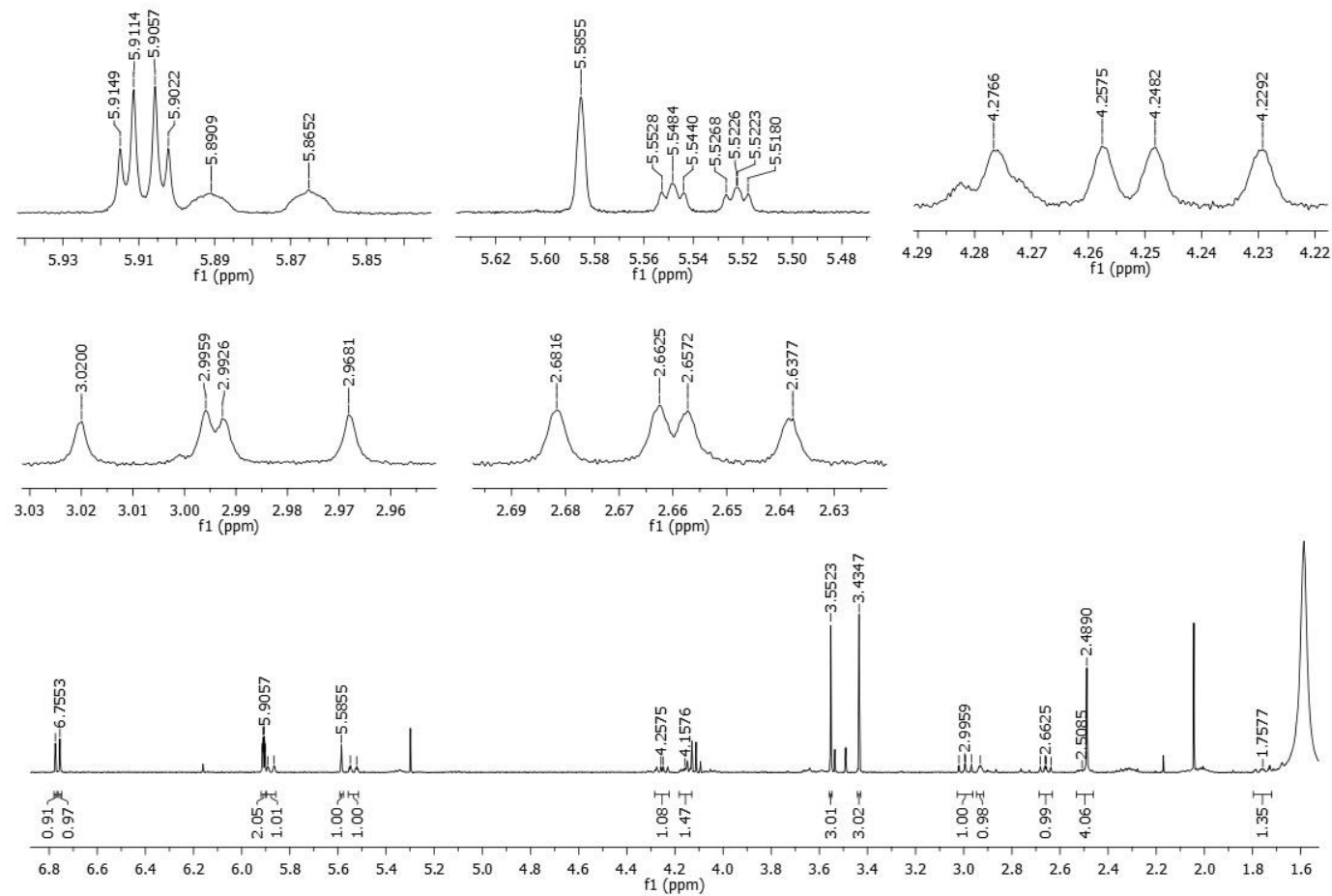


Figura 59 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto **15** (CDCl_3 , 400 MHz).

Tabela 10 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto **15**, e o alcaloide 6-O-metilpretazetina.

Posição dos hidrogênios	δ experimental do alcaloide isolado (ppm) CD_3OD , 400MHz	δ previamente publicado da 6-O-METILPRETAZETINA (ppm) CDCl_3 , 500 MHz
H - 1	5,53 dt (10,4; 1,7)	5,51 dt (10; 2)
H - 2	5,87 dl (10,2)	5,86 dl (10,5)
H - 3	4,15 m	4,14 m
H - 4a	2,93 m	2,91 sl
H - 4 α	2,50 m	2,49 m
H - 4 β	1,75 m	1,74 ddd (13,5; 9,5; 2)
H - 6	5,58 s	5,56 s
H - 7	6,77 s	6,75 s
H - 10	6,75 s	6,73 s
H - 11	4,25 dd (11,2; 7,5)	4,23 dd (11; 7,5)
H - 12 α	2,99 dd (11; 9,7)	2,98 t (10,5)
H - 12 β	2,65 dd (9,8; 7,7)	2,64 dd (10; 7,5)
NMe	2,48 s	2,47 s
OCH ₂ O	5,91 d - 5,90 d (1,4)	5,89 d - 5,88 d (1,5)
OMe	3,43 s	3,41 s
OMe	3,55 s	3,53 s

Nenhum estudo de atividade biológica foi descrito, na literatura, para este alcaloide. Porém, em 2015, MASI e colaboradores (2015), isolaram da espécie *Narcissus jonquilla quail*, o alcaloide jonquiline, epímero do alcaloide 6-O-metilpretazetina, diferenciando somente da disposição do grupamento OMe da posição C-6, e verificaram que o mesmo, apresenta atividade contra algumas linhagens de células tumorais resistentes.

4.3.6 Composto 16

Foram isolados 43,2 mg do composto **16**, a partir do fracionamento cromatográfico dos extratos do caule e das folhas de *W. procera*, sendo analisado pela técnica de RMN de ^1H , como ilustrado na figura 60 e 61.

No espectro de RMN de ^1H obtido para este composto, podem-se observar alguns sinais importantes, que incluem: dois hidrogênios singletos, em 6,74 e 6,83 ppm, característico de hidrogênios aromáticos; dois sinais de hidrogênios olefínicos, em 5,50 ppm, como um duplo tripleto ($J - 10,4$ e $1,7$ Hz), e em 5,85 ppm, como um dubleto ($J - 10,5$ Hz); assim como, dois sinais singletos, integrando para três hidrogênios, em 3,41 e 2,47 ppm, característicos dos grupamentos OMe e NMe, respectivamente.

Ao comparar o espectro deste composto, com o espectro do alcaloide 6-O-metilpretazetina, pode-se observar grande semelhança, diferenciando somente pela ausência de um grupamento OMe alifático. Desta forma, concluiu-se que se tratava, novamente, de um alcaloide com esqueleto do tipo tazetina.

Na tabela 11, verificam-se os deslocamentos dos hidrogênios do espectro de RMN de ^1H , obtido para este composto, em comparação com dados da literatura, onde é possível assim, caracterizá-lo como sendo o alcaloide pretazetina ($\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_5$) (ZHANG *et al*, 2006).

Este alcaloide é descrito em muitas espécies de plantas da família Amaryllidaceae (BASTIDA *et al*, 1987; HOHMANN *et al*, 2002; PAGLIOSA *et al*, 2010; GIORDANI *et al*, 2011; DE ANDRADE *et al*, 2012). Estudos de atividade biológica, demonstram que a pretazetina apresenta atividade antiparasitária contra *Trichomonas vaginalis* (VIEIRA *et al*, 2011) e atividade antiviral contra o vírus *Herpes simplex* tipo I (RENARD-NOZAKI *et al*, 1989). Além de exercer atividade citotóxica frente diferentes linhagens de células tumorais (WENIGER *et al*, 1995; ZUPKÓ *et al*, 2009; BERKOV *et al*, 2011).

Pretazetina

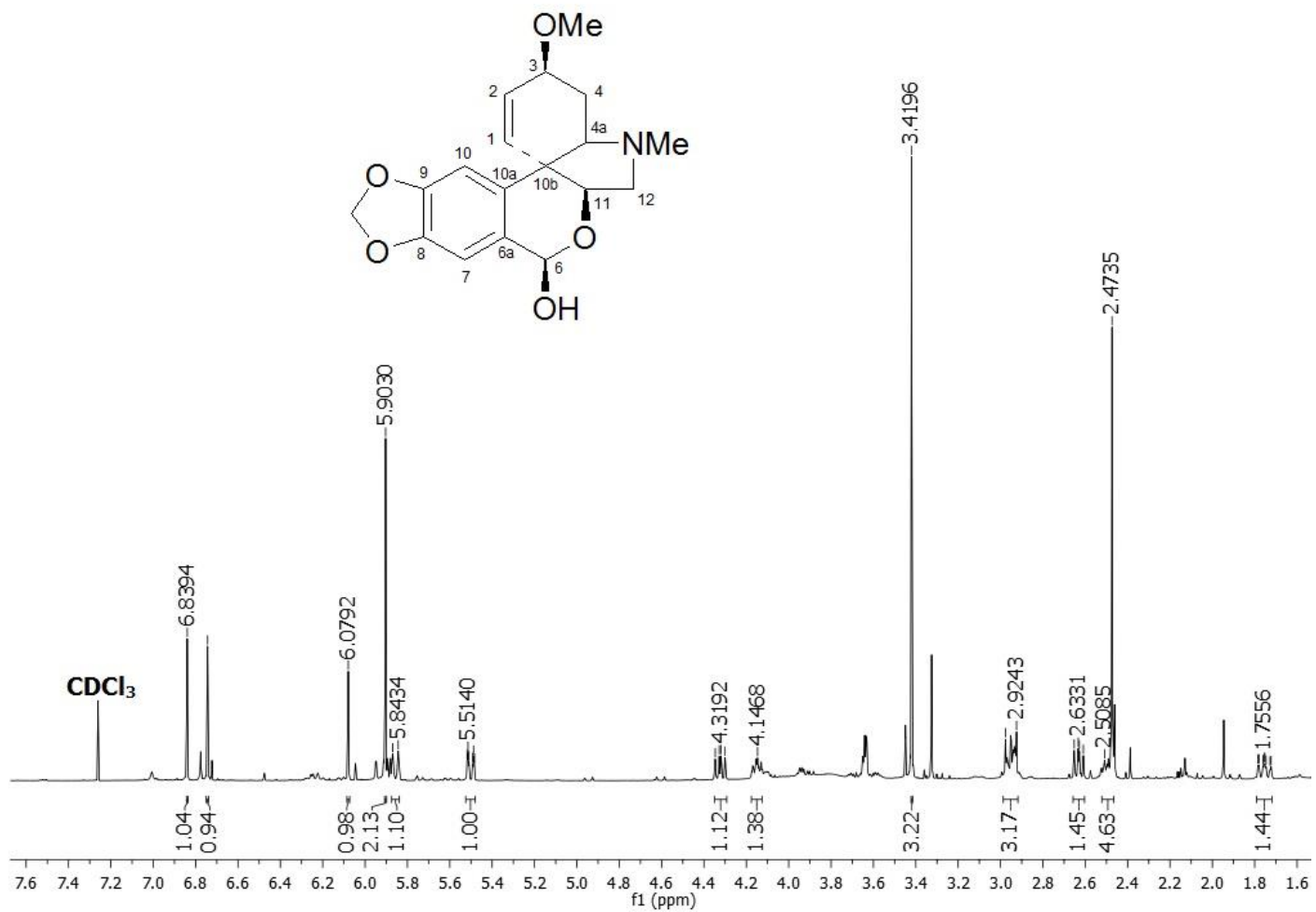


Figura 60 - Espectro de RMN de ^1H do composto 16 e sua estrutura (CDCl_3 , 400 MHz).

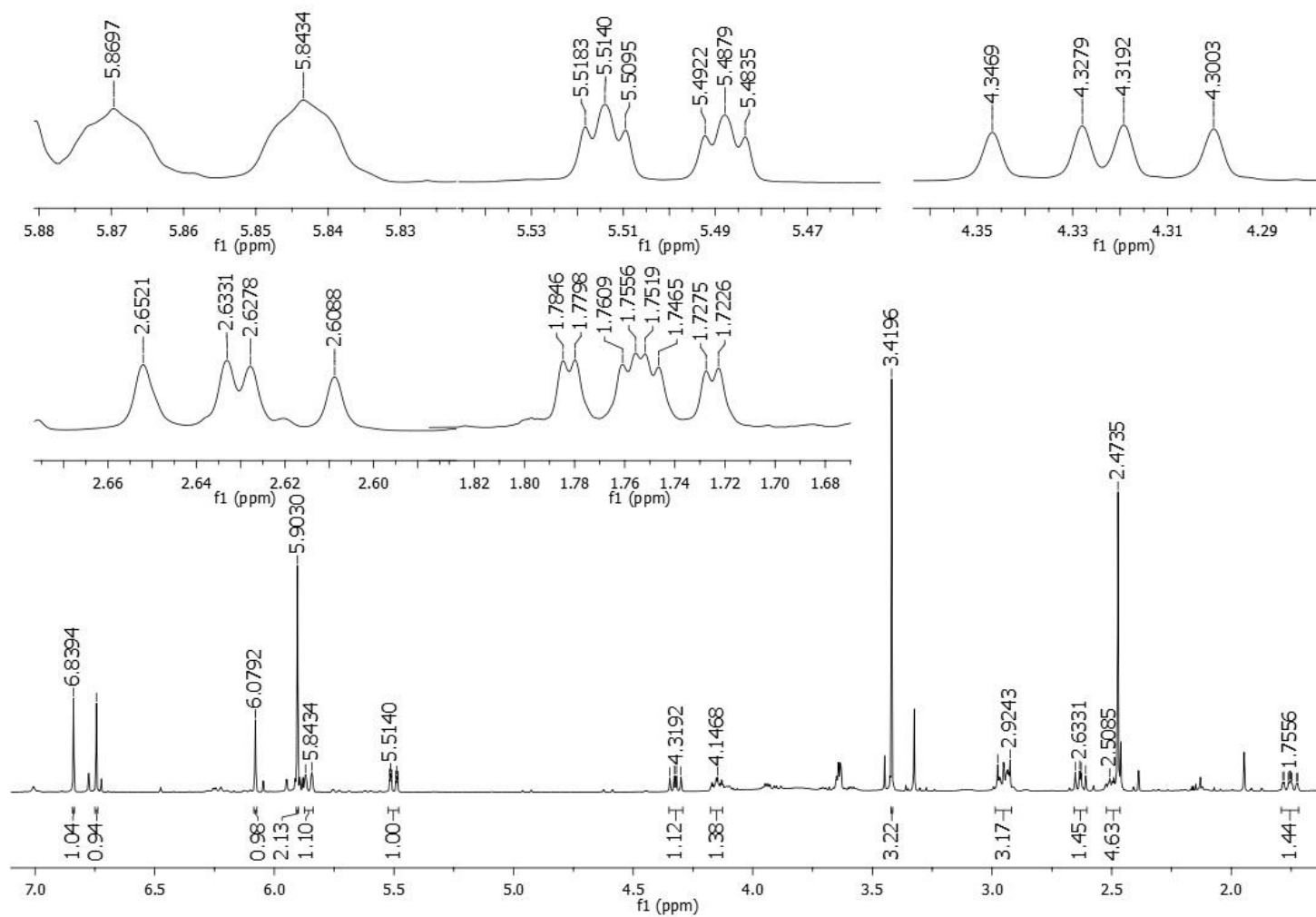


Figura 61 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto **16** (CDCl_3 , 400 MHz).

Tabela 11 – Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto **16**, e do alcaloide pretazetina.

Posição dos hidrogênios	δ experimental do alcaloide isolado (ppm) CD_3OD , 400MHz	δ previamente publicado da PRETAZETINA (ppm) CDCl_3 , 400 MHz
H - 1	5,50 dt (10,4; 1,7)	5,52 d (10,4)
H - 2	5,85 d (10,5)	5,89 d (10,8)
H - 3	4,12 – 4,18 m	4,14 – 4,18 m
H - 4a	2,91 – 2,99 m	3,01 – 2,96 m
H - 4 α	2,48 – 2,53 m	2,48 – 2,55 m
H - 4 β	1,75 ddd (13,2; 9,6; 2)	1,77 dd (11,2; 10)
H - 6	6,07 s	6,13 s
H - 7	6,74 s	6,77 s
H - 10	6,83 s	6,87 s
H - 11	4,32 dd (11; 7,5)	4,43 dd (11,2; 7,2)
H - 12 α	2,91 – 2,99 m	2,96 - 3.01 m
H - 12 β	2,63 dd (9,7; 7,6)	2,67 dd (9,6; 8)
NMe	2,47 s	2,50 s
OCH ₂ O	5,90 s	5,93 s
OMe	3,41 s	3,44 s

4.3.7 Composto 9

O composto **9** foi isolado a partir do caule e das folhas de *W. procera*, totalizando 9,0 mg, e apresentou-se como um sólido branco amorfo. Sendo analisado pela técnica de RMN de ¹H, como observado na figura 62.

Homolicorina

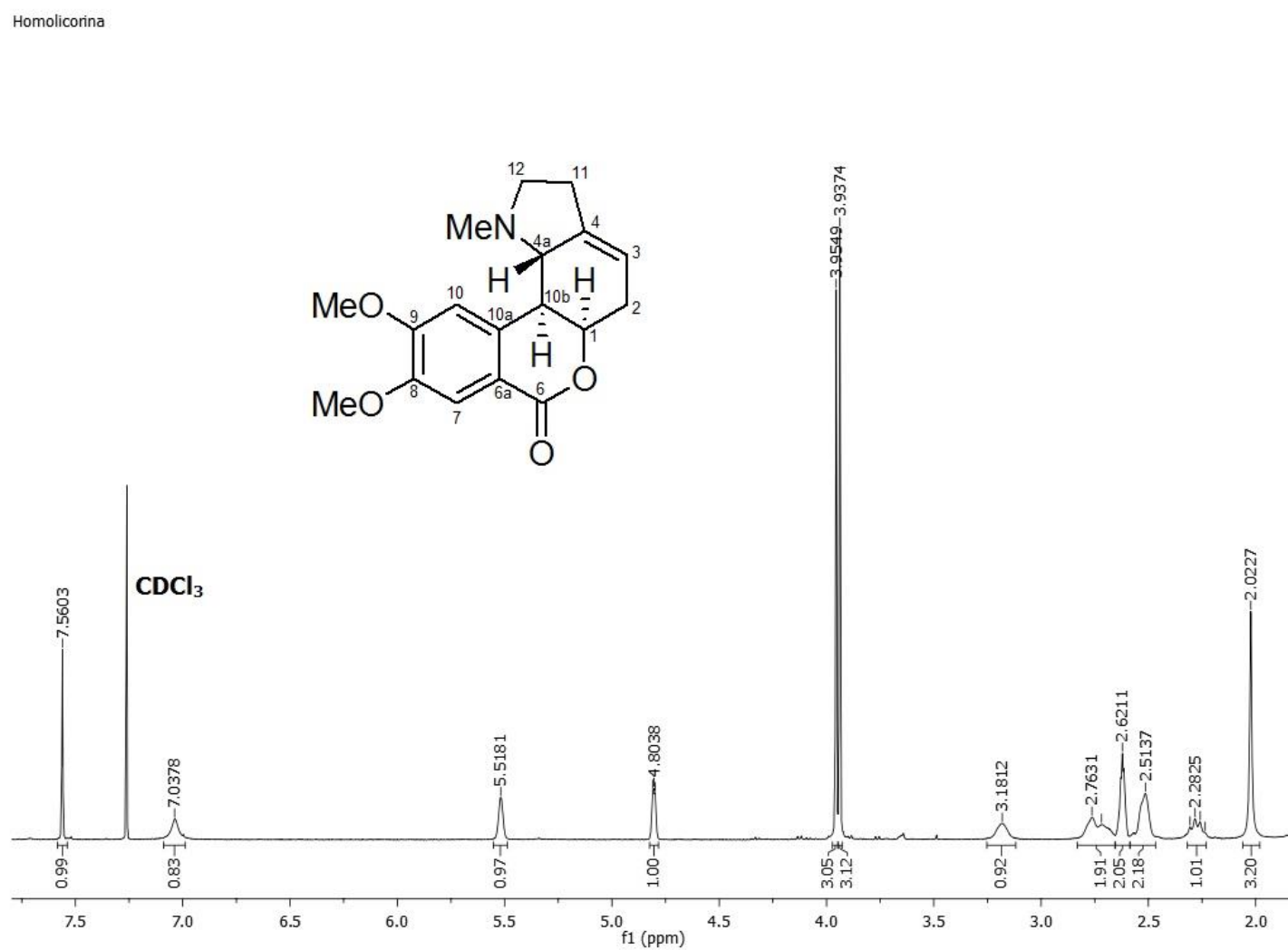


Figura 62 - Espectro de RMN de ^1H do composto **9** e sua estrutura (CDCl_3 , 400 MHz).

Após a análise do espectro deste composto, em comparação com dados da literatura, foi identificado como sendo o alcaloide homolicorina ($C_{18}H_{21}NO_4$) (BASTIDA *et al*, 1987).

Alcaloides com esqueleto do tipo homolicorina, apresentam características nos espectros de RMN de 1H que os definem, como: dois hidrogênios singletos *para*-orientados, a presença de um singlete entre 2,0 - 2,2 ppm, integrando para três hidrogênios, característico do grupamento NMe. Ao contrário, dos esqueletos do tipo licorina, ocorre um maior desblindamento do hidrogênio 12 α , em relação ao hidrogênio 12 β , como consequência do par de elétrons cis no átomo de nitrogênio 6 (BASTIDA *et al*, 2011).

Normalmente, alcaloides desta série, apresentam junção cis dos anéis B/C, o que é congruente com a pequena constante de acoplamento observada entre os hidrogênios (H-1 e H-10b), e apresentam uma constante grande, entre os H-4a e H-10b ($J \approx 10$ Hz), consistente com a relação trans-diaxial destes hidrogênios (BASTIDA *et al*, 2011).

No espectro da homolicorina (Figura 62), pode-se observar ainda, dois singletos integrando para três hidrogênios, em 3,95 e 3,93 ppm, característico do grupamento OMe aromático, e um hidrogênio olefínico, em 5,51 ppm, como um multiplete. Vale ressaltar que os alcaloides com grupo lactona, como a homolicorina, ocorre um maior desblindamento do H-7, em relação ao H-10, devido a influencia da carbonila na posição 6 (BASTIDA *et al*, 2011).

A homolicorina é um alcaloide muito comum em Amaryllidaceae, encontrado em diversas espécies de planta desta família (BASTIDA *et al*, 1990; CODINA *et al*, 1993; LABRAÑA *et al*, 1999; DE ANDRADE *et al*, 2012; LEE *et al*, 2014). Este alcaloide foi descrito por possuir atividade antirretroviral (SZLÁVIK *et al*, 2004) e atividade antitumoral (NAIR *et al*, 2012; HE *et al*, 2015). Além de exercer efeitos hipotensivos (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al*, 2000).

Na tabela 12, pode-se observar os deslocamentos e as multiplicidades do alcaloide homolicorina, previamente publicado, em comparação com o composto **9** (BASTIDA *et al*, 1987), confirmando a estrutura composta.

Tabela 12 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto **9**, e do alcaloide homolicorina.

Posição dos hidrogênios	δ experimental do alcaloide isolado (ppm) CDCl_3 , 400MHz	δ previamente publicado da HOMOLICORINA (ppm) CDCl_3 , 200 MHz
H - 1	4,80 m	4,81 ddd (4,2; 1,8; 1,7)
H - 2	2,48 – 2,55 m	2,49 m
H - 3	5,51 m	5,5 m
H - 4a	2,66 – 2,82 m	2,72 dd (9,6; 1,8)
H - 7	7,56 s	7,57 s
H - 10	7,03 s	6,99 s
H – 10b	2,66 – 2,82 m	2,64 dd (9,6; 1,8)
H - 11 α/β	2,59 – 2,64 m	2,61 – 2,67 m
H - 12 α	3,18 sl	3,14 ddd (9,2; 5,3; 14,1)
H - 12 β	2,27 q (9,3)	2,24 dd (18; 9,2)
NMe	2,02 s	2,00 s
OMe	3,95 s	3,96 s
OMe	3,93 s	3,95 s

Alcaloides com esqueleto do tipo homolicorina, são considerados derivados do acoplamento fenol oxidativo intramolecular *orto-para'*, do precursor O-metilnorbeladina, resultando na formação do alcaloide norpluviina, como ilustrado na figura 63 (BASTIDA *et al*, 2006; BASTIDA *et al*, 2011).

Posteriormente, a norpluviina é oxidada na posição C-6, e sofre uma ruptura da ligação C-6 com o átomo de nitrogênio, seguida de uma rotação de 180°. A formação da licorenina, um alcaloide com grupo hemiacetal, seguida da oxidação da posição C-6, leva a formação do alcaloide homolicorina, pertencente ao grupo das lactonas (Figura 63) (BASTIDA *et al*, 2011).

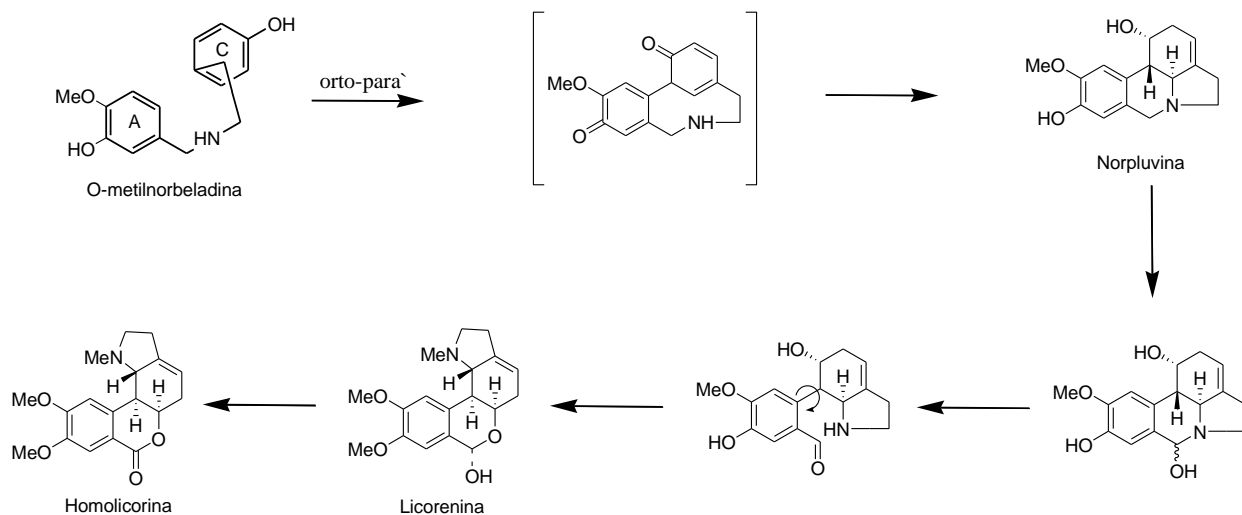


Figura 63 - Parte da biossíntese de alcaloides com esqueleto do tipo homolicorina.

4.3.8 Composto 2

Foram isolados 117,0 mg do composto **2**, a partir do fracionamento cromatográfico dos extratos do caule e das folhas de *W. procera*, e apresentou-se como cristais. Sendo analisado pela técnica de RMN de ^1H , como ilustrado na figura 64 e 65.

As características principais encontradas no espectro deste composto incluem: um hidrogênio aromático, em 6,77 ppm, como um singleto; um hidrogênio olefínico, em 5,47 ppm, como um multipletto; a presença de um sinal, como um singleto, em 2,03 ppm, integrando para três hidrogênios, característico do grupo NMe e de três sinais, em 3,90, 3,97 e 3,87 ppm, integrando para três hidrogênios, caracterizando os grupamentos OMe aromáticos.

Quando comparado ao espectro de RMN de ^1H do alcaloide homolicorina, observou-se que diferenciavam apenas pela presença de um grupo OMe aromático. Desta forma concluiu-se que se tratava de um alcaloide com esqueleto do tipo homolicorina.

Albomaculina

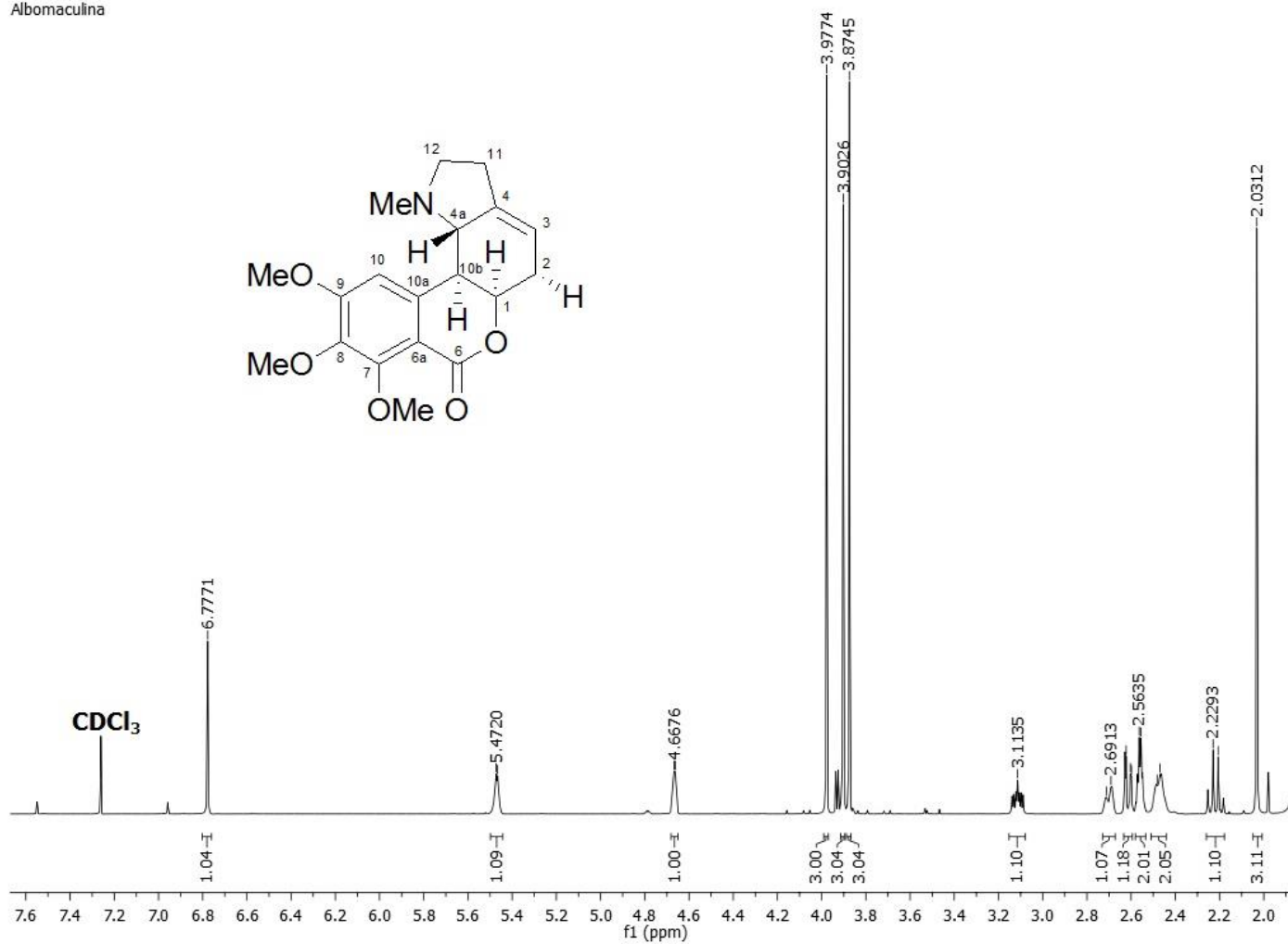


Figura 64 - Espectro de RMN de ¹H do composto **2** e sua estrutura (CDCl₃, 400 MHz).

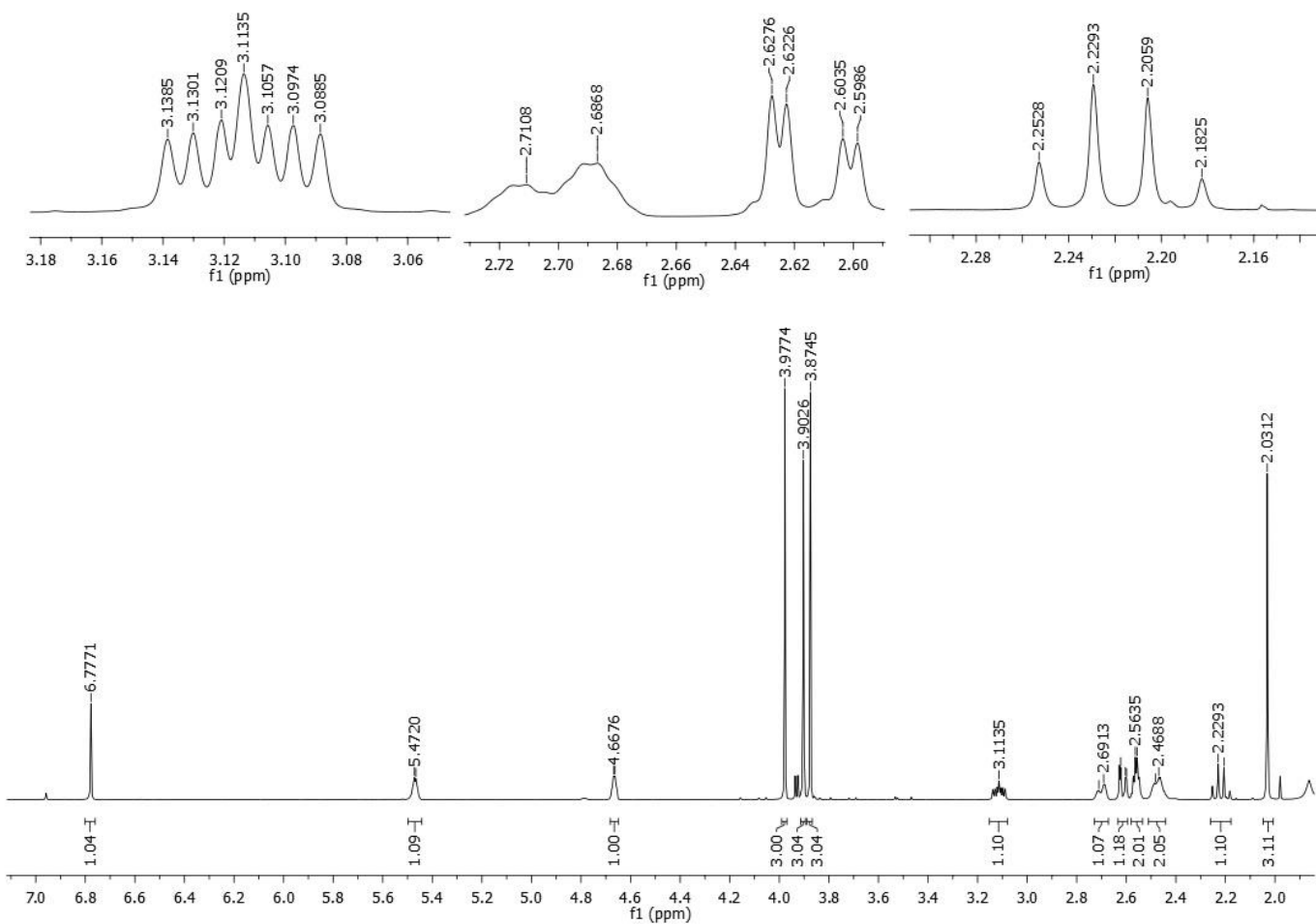


Figura 65 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto **2** (CDCl_3 , 400 MHz).

Ao comparar os deslocamentos dos hidrogênios do composto **2**, com dados da literatura, constatou-se que se tratava do alcaloide albomaculina ($C_{19}H_{23}NO_5$) (DE ANDRADE *et al*, 2014), como demonstrado na tabela 13.

Tabela 13 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto **2**, e do alcaloide albomaculina.

Posição dos hidrogênios	δ experimental do alcaloide isolado (ppm) $CDCl_3$, 400 MHz	δ previamente publicado da ALBOMACULINA (ppm) $CDCl_3$, 400 MHz
H - 1	4,66 m	4,68 m
H - 2 α/β	2,53 – 2,58 m	2,55 – 2,6 m
H - 3	5,47 m	5,48 m
H - 4a	2,70 d (9,6)	2,72 d (10)
H - 10	6,77 s	6,78 s
H - 10b	2,61 dd (9,6; 1,9)	2,63 d (10)
H - 11 α/β	2,44 – 2,51 m	2,45 – 2,53 m
H - 12 α	3,11 ddd (9,6; 6,7; 3,2)	3,13 ddd (9,6; 7,2; 3,6)
H - 12 β	2,21 q (9,3)	2,23 q (9,6)
NMe	2,03 s	2,05 s
7 - OMe	3,97 s	3,99 s
9 - OMe	3,90 s	3,91 s
8 - OMe	3,87 s	3,89 s

Como obteve-se cristais da albomaculina (Figura 66), este composto foi enviado para análise de cristalografia de Raios-X, confirmando a configuração absoluta deste alcaloide, como ilustrado na figura 67. Sendo a primeira vez, descrito estudos de cristalografia de Raios-X para este composto.



Figura 66 - Cristais do alcaloide albomaculina, obtidos por coluna cromatográfica.

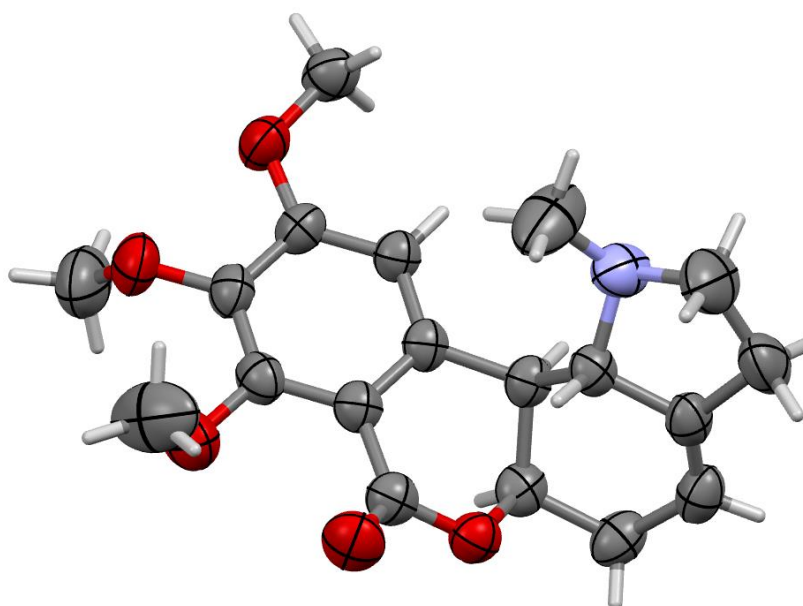


Figura 67 - Análise por cristalografia do alcaloide albomaculina.

A albomaculina foi descrita em poucas espécies de Amaryllidaceae, e nenhum estudo biológico foi encontrado na literatura para este composto (DE ANDRADE *et al*, 2014).

Este alcaloide foi isolado em 2007, pelo pesquisador WANG e colaboradores, a partir da espécie *Hosta plantaginea* (Lam.) Aschers, da família Liliaceae, sendo este, um acontecimento raro, o isolamento de alcaloides típicos da família Amaryllidaceae encontrados em outras famílias de plantas (WANG *et al*, 2007; BASTIDA *et al*, 2011).

4.3.9 Composto 6

O composto **6** foi isolado tanto do caule, quanto das folhas de *W. procera*, totalizando 13,3 mg, sendo analisado pela técnica de RMN de ^1H .

Ao analisar o espectro obtido deste composto (Figuras 68 e 69), concluiu-se que se tratava de um alcaloide com esqueleto do tipo homolicorina. O espectro de RMN de ^1H apresentou dois hidrogênios singletos *p*-orientados, em 7,48 e 6,94 ppm; a presença um sinal característico de olefina, em 5,67 ppm, e um sinal, como um singlete, integrando para três hidrogênios, em 2,06 ppm, caracterizando o grupamento NMe.

Não foi detectado sinal do grupamento OMe aromático, como nos alcaloides homolicorina e albomaculina, e sim, a presença de um sinal, em 6,07 ppm (dubleto) – 6,06 ppm (dubleto) (J - 1,2 Hz), característico do grupo metilendioxifenila, entre as posições C-8 e C-9 (BASTIDA *et al*, 2011).

Ao comparar os deslocamentos dos hidrogênios deste composto, com dados da literatura, concluiu-se que se tratava do alcaloide hippeastrina ($\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_5$), como demonstrado na tabela 14 (ALMANZA *et al*, 1996).

Nos esqueletos do tipo homolicorina, quando ocorre substituição da posição C-2 pelos grupos OH, OMe ou AcO, esta substituição geralmente apresenta disposição α . Desta forma, no espectro do alcaloide hippeastrina, que apresenta um substituinte hidroxila (OH) na posição C-2, pode-se observar um sinal, em 4,39 ppm, referente ao hidrogênio H-2 β (BASTIDA *et al*, 2011).

A hippeastrina é um alcaloide típico da família Amaryllidaceae, descrito em variadas espécies desta família (ALMANZA *et al*, 1996; BERKOV *et al*, 2007; PAGLIOSA *et al*, 2010; LEE *et al*, 2014). Estudos de atividade biológica deste composto levavam ao conhecimento, que a hippeastrina possui atividade antiviral e antiparasitária (VIEIRA *et al*, 2011; He *et al*, 2013; e HE *et al*, 2015). Além de exercer efeitos neuroprotetores (LI *et al*, 2013) e atividade citotóxica fraca (BERKOV *et al*, 2011).

Hippeastrina

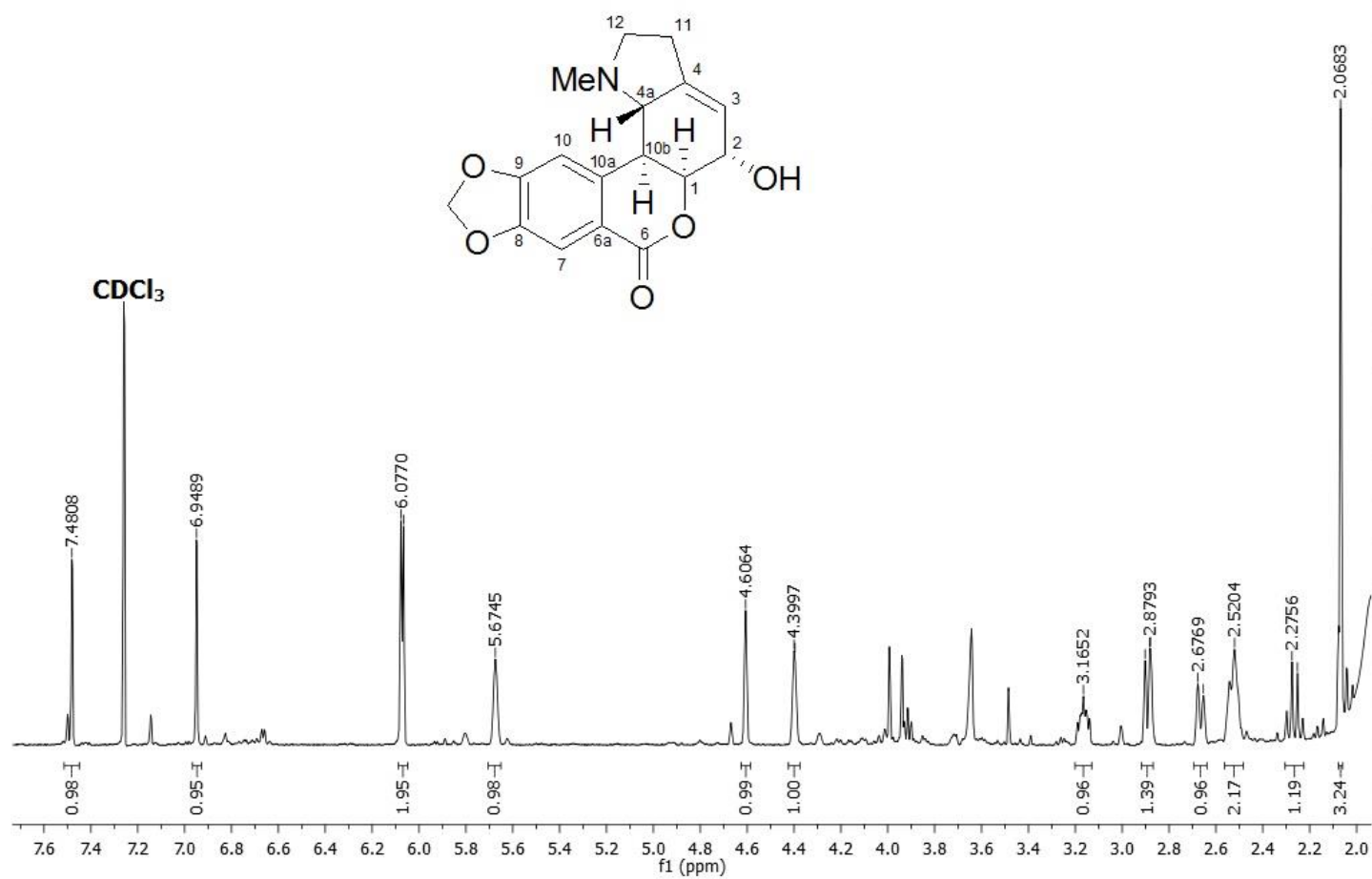


Figura 68 - Espectro de RMN de ^1H do composto **6** e sua estrutura (CDCl_3 , 400 MHz).

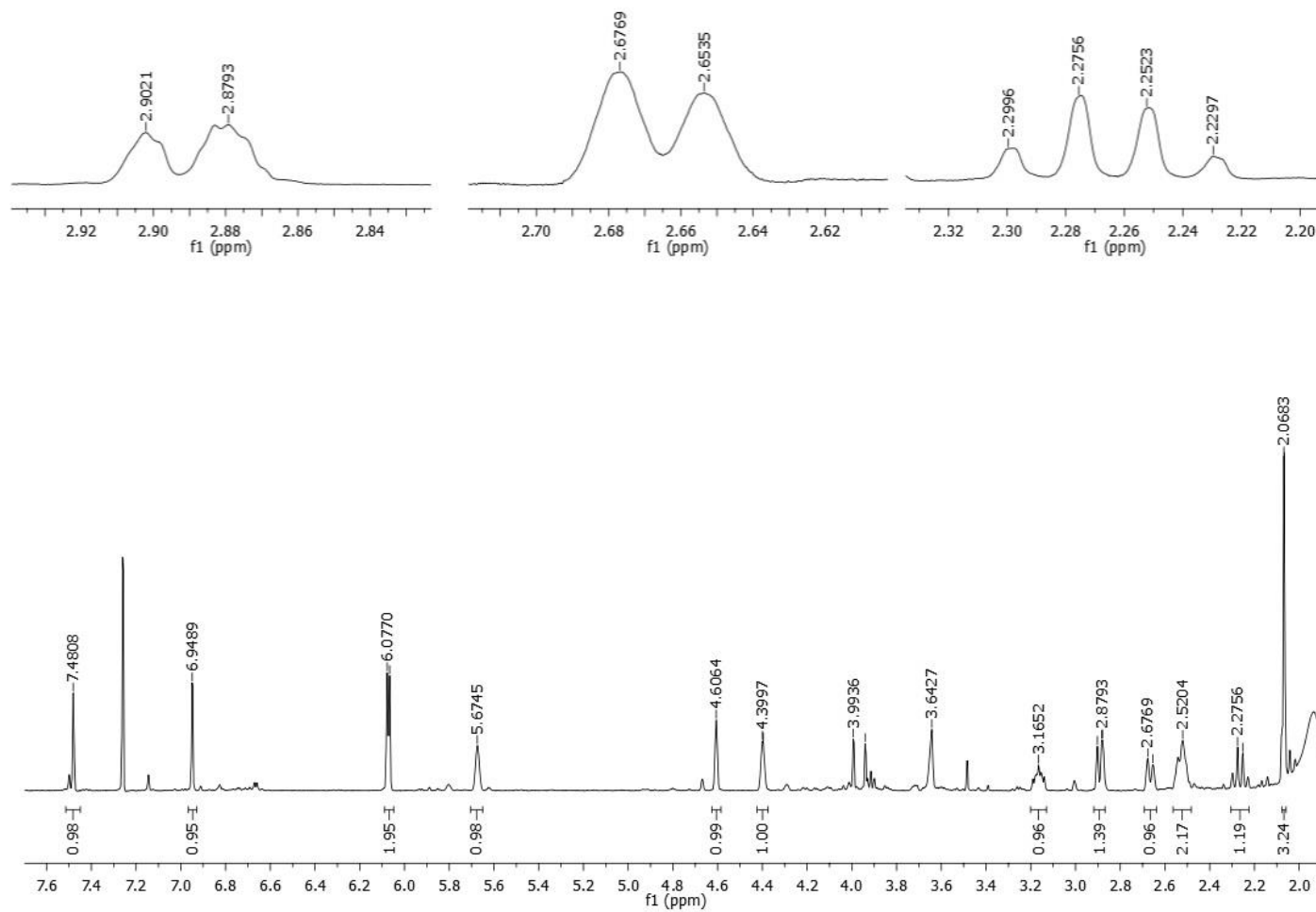


Figura 69 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto **6** (CDCl_3 , 400 MHz).

Tabela 14 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto **6**, e do alcaloide hippeastrina.

Posição dos hidrogênios	δ experimental do alcaloide isolado (ppm) CDCl_3 400MHz	δ previamente publicado da HIPPEASTRINA (ppm) CDCl_3 500 MHz
H - 1	4,60 sl	4,58 sl
H - 2 β	4,39 m	4,38 sl
H - 3	5,67 sl	5,63 sl
H - 4a	2,66 d (9,3)	2,62 d (9,5)
H - 7	7,48 s	7,45 s
H - 10	6,94 s	6,92 s
H - 10b	2,89 dl (9,1)	2,85 dd (9,5; 2,5)
H - 11 α/β	2,48 - 2,56 m	2,48 m
H - 12 α	3,16 m	3,13 ddd (10; 8; 3)
H - 12 β	2,26 q (9,3)	2,23 ddd (10; 9; 9)
NMe	2,06 s	2,03 s
OCH ₂ O	6,07 d - 6,06 d (1,2)	6,04 d - 6,02 d (1,5)

4.3.10 Composto 7

Foram isolados 33,7 mg do composto **7**, a partir do fracionamento cromatográfico dos extratos do caule e das folhas de *W. procera*, e apresentou-se como um sólido branco. Sendo analisado pela técnica de RMN de ¹H, como ilustrado na figura 70 e 71.

O-metillicorena

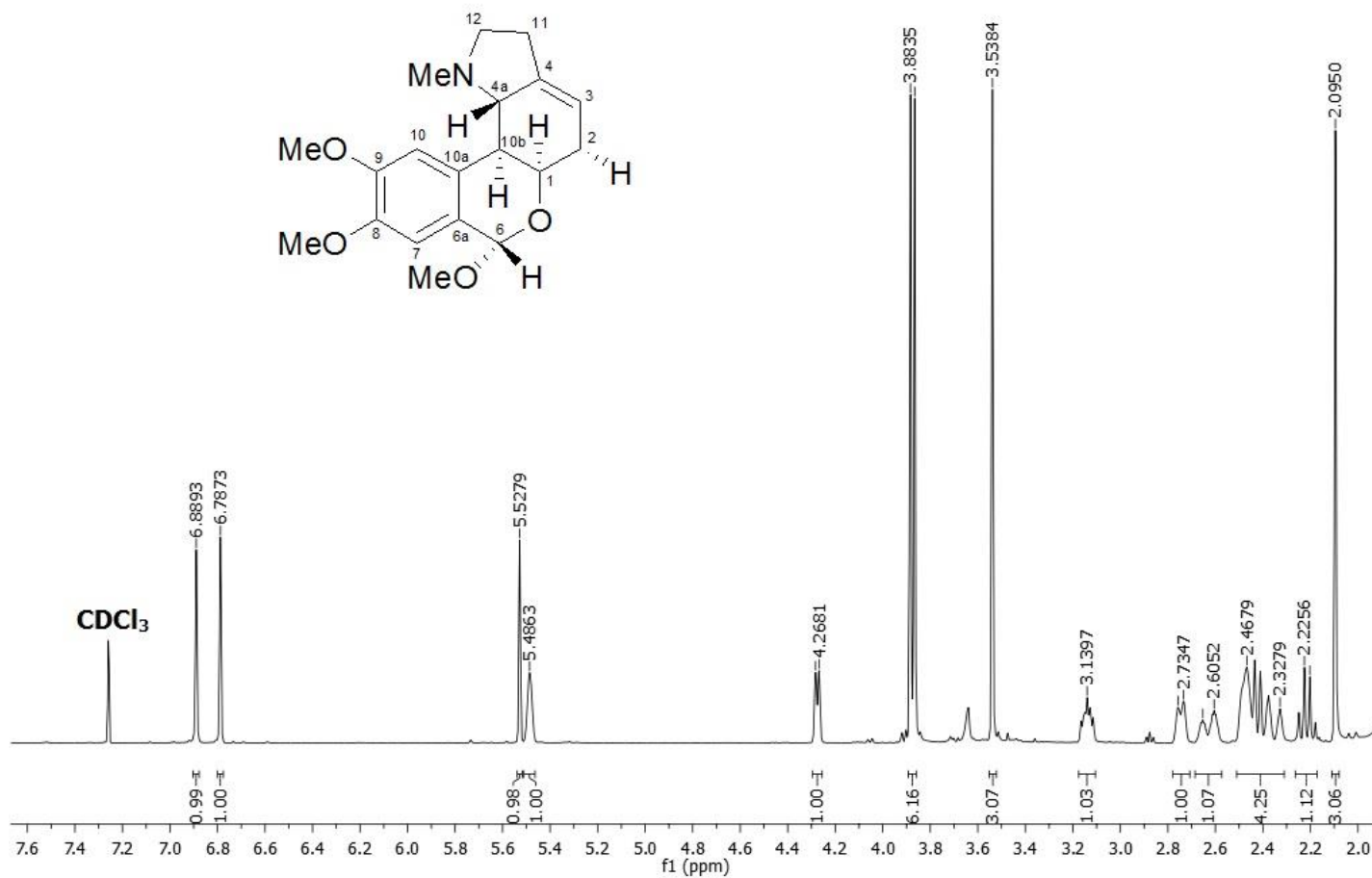


Figura 70 - Espectro de RMN de ¹H do composto 7 e sua estrutura (CDCl₃, 400 MHz).

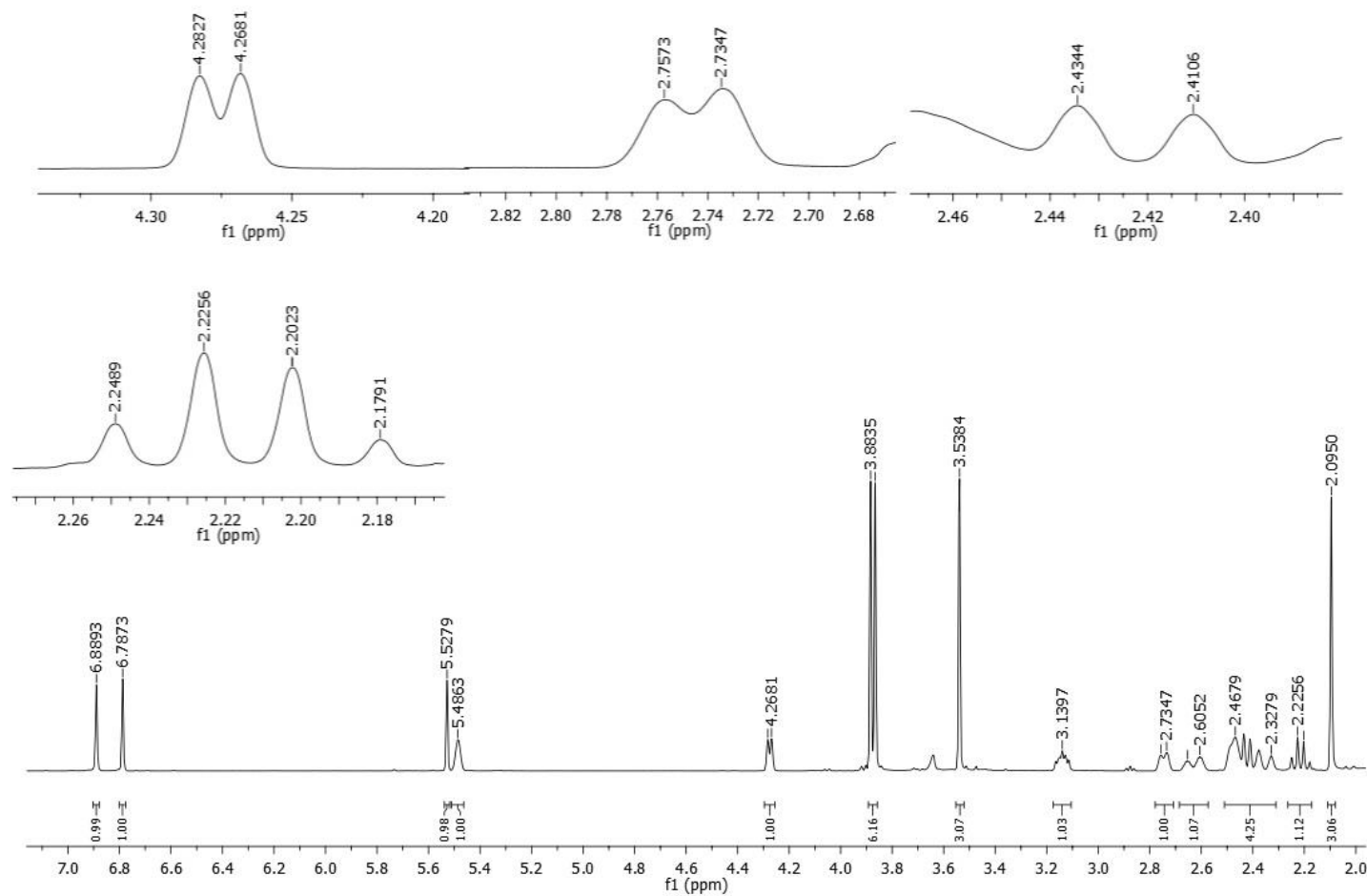


Figura 71 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto 7 (CDCl_3 , 400 MHz).

No espectro de RMN de ^1H , podem-se observar algumas características importantes, que incluem: dois sinais, como singletos, em 6,88 e 6,78 ppm, correspondendo aos hidrogênios aromáticos *p*-orientados; um sinal característico de olefina, em 5,48 ppm; a presença de três sinais referentes ao grupo OMe, dois aromáticos, em 3,88 e 3,86 ppm, e um alifático, em 3,53 ppm; e um sinal, integrando para três hidrogênios, em 2,09 ppm, atribuído ao grupamento NMe.

A partir destes dados, caracterizou-se o composto **6**, como sendo pertencente aos alcaloides com esqueleto do tipo homolicorina. Porém, foi observado um sinal de hidrogênio singlete, em 5,52 ppm, característico de hidrogênio da posição C-6, quando a mesma está substituída por um grupo oxigenado (BASTIDA *et al*, 2011).

Desta forma, ao comparar os dados do espectro de RMN de ^1H obtido, com os dados da literatura, concluiu-se que se tratava do alcaloide *O*-metillicorenina ($\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NO}_4$), que pertence ao grupo dos alcaloides hemiacetais, apresentando um substituinte OMe na posição C-6, em disposição α , uma vez que, alcaloides pertencentes à este grupo, apresentam geralmente esta característica (CODINA *et al*, 1993; BASTIDA *et al*, 2011).

O alcaloide *O*-metillicorenina foi isolado de muitas famílias de Amaryllidaceae (CODINA *et al*, 1993; LABRAÑA *et al*, 1999; DE ANDRADE *et al*, 2012; LEE *et al*, 2014). Na literatura está descrito que este alcaloide exibe atividade antibacteriana, contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (LEE *et al*, 2014^b), além de exercer efeitos neuroprotetores (LI *et al*, 2013).

A tabela 15 compara os deslocamentos e as multiplicidades do composto **7**, com os deslocamentos previamente publicados do alcaloide *O*-metillicorenina (CODINA *et al*, 1993), onde pode-se observar que se trata do mesmo composto.

Pode-se observar que ocorre um maior desblindamento do hidrogênio H-10, em comparação com o H-7, diferentemente do que ocorre com o alcaloide homolicorina da série lactona, que apresentam uma carbonila na posição C-6. (BASTIDA *et al*, 2011).

Tabela 15 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto **7**, e o alcaloide *O*-metillicorenina.

Posição dos hidrogênios	δ experimental do alcaloide isolado (ppm) CDCl_3 , 400MHz	δ previamente publicado da <i>O</i> -METILLICORENINA (ppm) CDCl_3 , 50 MHz
H - 1	4,27 d (5,8)	4,29 dl (5,8)
H - 2 α	2,35 m	2,35 m
H - 2 β	2,62 m	2,65 m
H - 3	5,48 sl	5,50 dl (2,2)
H - 4a	2,74 d (9)	2,77 dd (9,3; 2,6)
H - 6 β	5,52 s	5,54 s
H - 7	6,78 s	6,80 s
H - 10	6,88 s	6,93 s
H - 10b	2,42 d (9,5)	2,44 dd (9,3; 1,8)
H - 11 α/β	2,44 – 2,50 m	2,38 – 2,55 m
H - 12 α	3,13 m	3,15 ddd (9,2; 5,3; 4,1)
H - 12 β	2,21 q (9,3)	2,23 dd (18; 9,2)
NMe	2,09 s	2,10 s
OMe	3,88 s	3,89 s
Ome	3,86 s	3,88 s
OMe	3,53 s	3,55 s

4.3.11 Composto 8

O composto **8** foi isolado a partir do caule e das folhas de *W. procera*, totalizando 15,7 mg, sendo analisado pela técnica de RMN de ^1H , como ilustrado na figura 72.

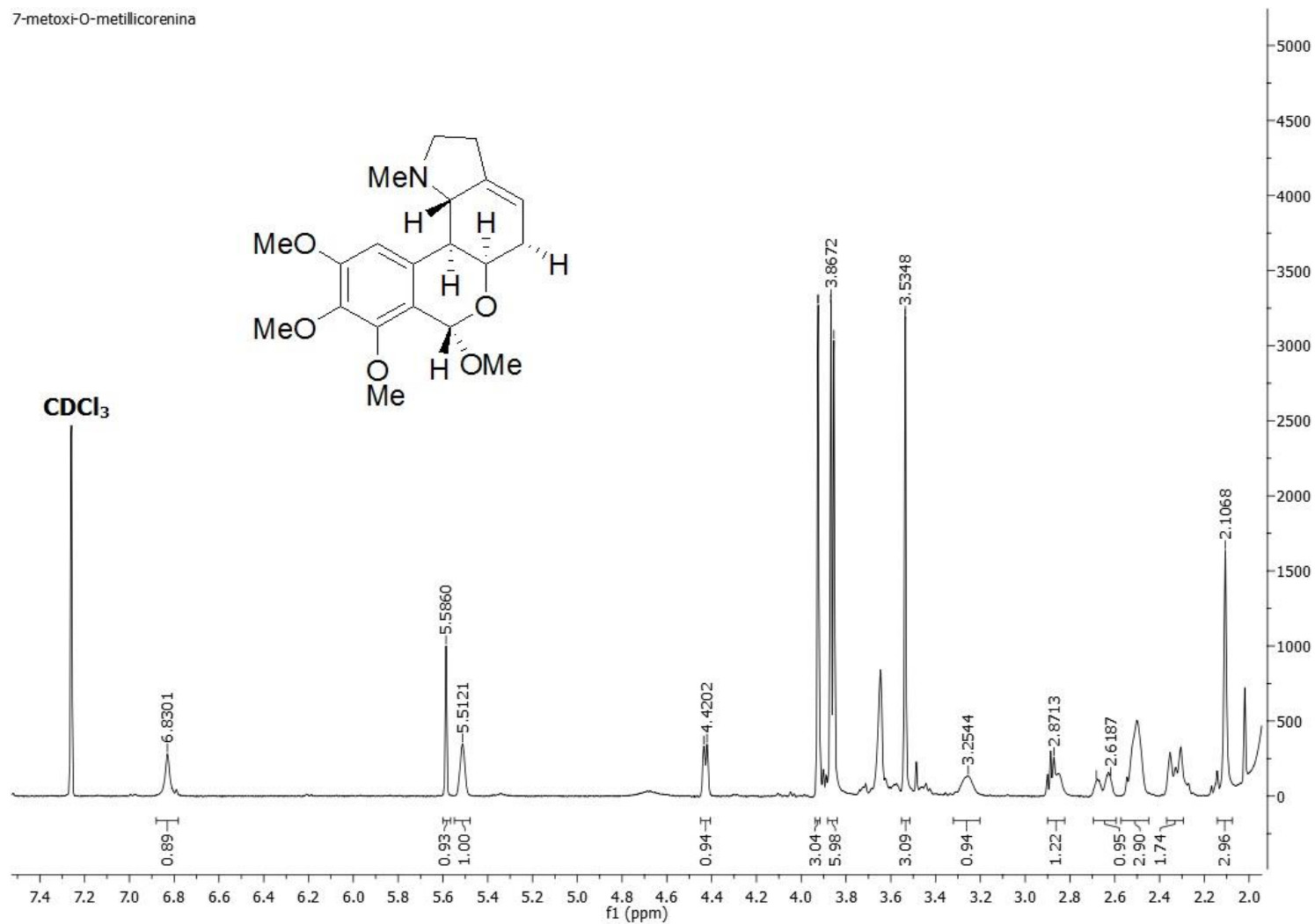


Figura 72 - Espectro de RMN de ^1H do composto **8** e sua estrutura (CDCl_3 , 400 MHz).

Ao comparar o espectro deste composto, com o espectro do alcaloide *O*-metillicorenina, verificou-se grande semelhança, como a presença do grupo NMe, em 2,10 ppm e de um hidrogênio singlete, em 5,58 ppm, característico de hidrogênio da posição C-6, quando esta se encontra substituída.

Pode-se observar no espectro de RMN de ^1H obtido para este composto (Figura 72), a presença de quatro grupamentos OMe, três aromáticos, em 3,92, 3,86 e 3,85 ppm e um alifático, em 3,53 ppm, e de somente um hidrogênio singlete aromático, em 6,83 ppm.

Ao analisar os deslocamentos de todos os hidrogênios observados no espectro do composto **8**, e compará-los com dados da literatura, concluiu-se que se tratava do alcaloide 7-metóxi-*O*-metillicoreinina ($\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NO}_5$), como demonstrado na tabela 16 (DE ANDRADE *et al*, 2014). Diferenciando da *O*-metillicorenina, somente pela presença do grupamento OMe aromático na posição C-7.

Este alcaloide foi isolado pela primeira vez no ano de 2012, pelo pesquisador LUO e colaboradores (2012) e nenhuma atividade biológica foi relatada na literatura.

Tabela 16 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto **8**, e o alcaloide 7-metóxi-O-metillicorenina.

Posição dos hidrogênios	δ experimental do alcaloide isolado (ppm) $CDCl_3$, 400MHz	δ previamente publicado da 7-METÓXI-O-METILLICORENINA (ppm) CD_3OD , 500MHz
H - 1	4,42 d (5,9)	4,40 dl (6,5)
H - 2 α	2,65 ddt (19,7; 6; 3)	2,67 ddt (19; 6,5; 3)
H - 2 β	2,27 – 2,37 m	2,29 dt (19,5; 3)
H - 3	5,58 s	5,55 sl
H - 4a	2,87 m	2,92 dl (10)
H - 6 β	5,51 s	5,52 s
H - 10	6,83 s	6,85 s
H – 10b	2,45 – 2,55 m	2,47 dd (10; 2)
H - 11 α/β	2,45 – 2,55 m	2,49 – 2,58 m
H - 12 α	3,25 sl	3,22 ddd (10,5; 7,5; 3)
H - 12 β	2,45 – 2,55 m	2,42 m
NMe	2,10 s	2,11 s
OMe	3,92 s	3,89 s
OMe	3,86 s	3,87 s
Ome	3,85 s	3,82 s
OMe	3,53 s	3,51 s

4.3.12 Composto 10

Foram isolados 99,9 mg do composto **10**, a partir do fracionamento cromatográfico dos extratos do caule e das folhas de *W. procera*, sendo analisado pela técnica de RMN de 1H uno e bidimensional.

As características principais encontradas no espectro deste composto incluem (Figuras 73 e 74): dois hidrogênios aromáticos singletos, em 7,59 ppm e 7,02 ppm; um hidrogênio olefínico, em 5,51 ppm, como um multipletto; a presença de um sinal, como um singletto, em 2,02 ppm, integrando para três hidrogênios, característico do grupo NMe e de dois sinais, como singletos, integrando para três hidrogênios, em 3,95 e 2,02 ppm, representando os grupamentos OMe e NMe, respectivamente.

A partir das ampliações observadas na figura 74, pode-se verificar o sinal do H-10b, em 2,69 ppm, como um duplo dubletto, apresentando duas constantes de acoplamento, uma de 9,7 Hz, devido ao acoplamento com o H-4a, coerente com o acoplamento trans-diaxial observado em esqueletos do tipo homolicorina, e uma em 1,8 Hz, pelo acoplamento com o H-1. E a ampliação do H-4a, como um dubletto, pelo acoplamento com o H-10b (J - 10 Hz) (BASTIDA *et al*, 2011).

Assim, a partir da observação de todos os sinais dos hidrogênios do espectro de RMN de ^1H deste composto, em comparação com dados da literatura, conclui-se que o composto **10** poderia ser o alcaloide 8-O-desmetilhomolicorina ou 9-O-desmetilhomolicorina, uma vez que, apresentam deslocamentos químicos muito próximos (BASTIDA *et al*, 1987^a; LATVALA *et al*, 1995).

Geralmente, compostos que apresentam substituinte OMe aromático e OH nas posições C-8 e C-9, a confirmação da posição do grupo OMe aromático só é possível através da técnica de RMN de ^1H bidimensional NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy), onde pode-se obter informações sobre a proximidade espacial dos hidrogênios da molécula (BASTIDA *et al*, 2011).

Pode-se observar na figura 75, que o hidrogênio aromático da posição H-10 apresentou correlação NOESY com os hidrogênios correspondentes ao grupamento OMe aromático, com o hidrogênio da posição H-10b e com o grupo NMe, confirmando que o grupo OMe encontrava-se na posição C-9.

Desta forma, a partir do espectro de RMN de ^1H uno e bidimensional deste composto, pode-se concluir que o composto **10** era o alcaloide 8-O-desmetilhomolicorina, que apresenta um grupo OH na posição C-8 (LATVALA *et al*, 1995).

8-O-desmetilhomolicorina

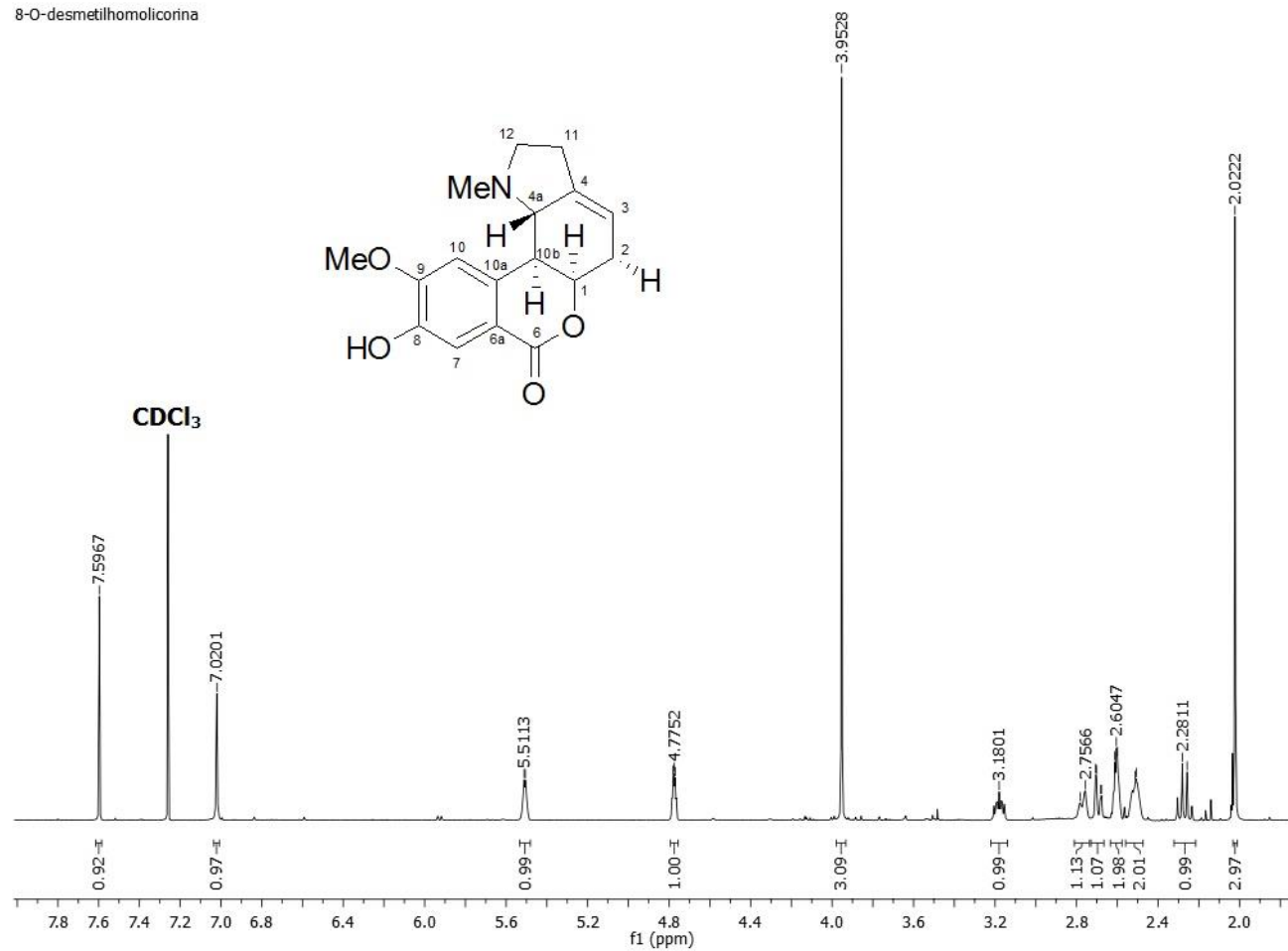


Figura 73 - Espectro de RMN de ^1H do composto **10** e sua estrutura (CDCl_3 , 400 MHz).

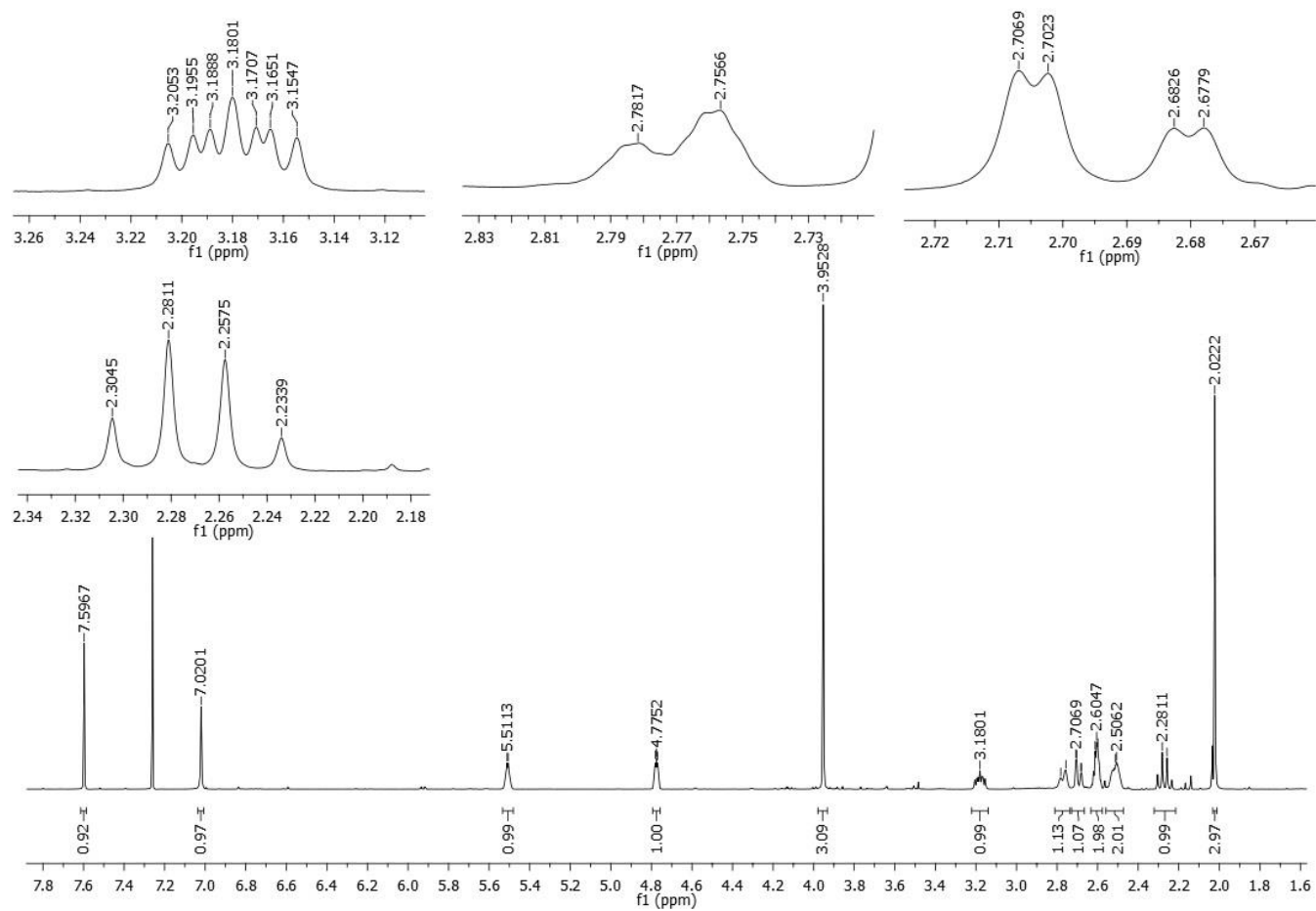


Figura 74 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto **10** (CDCl_3 , 400 MHz).

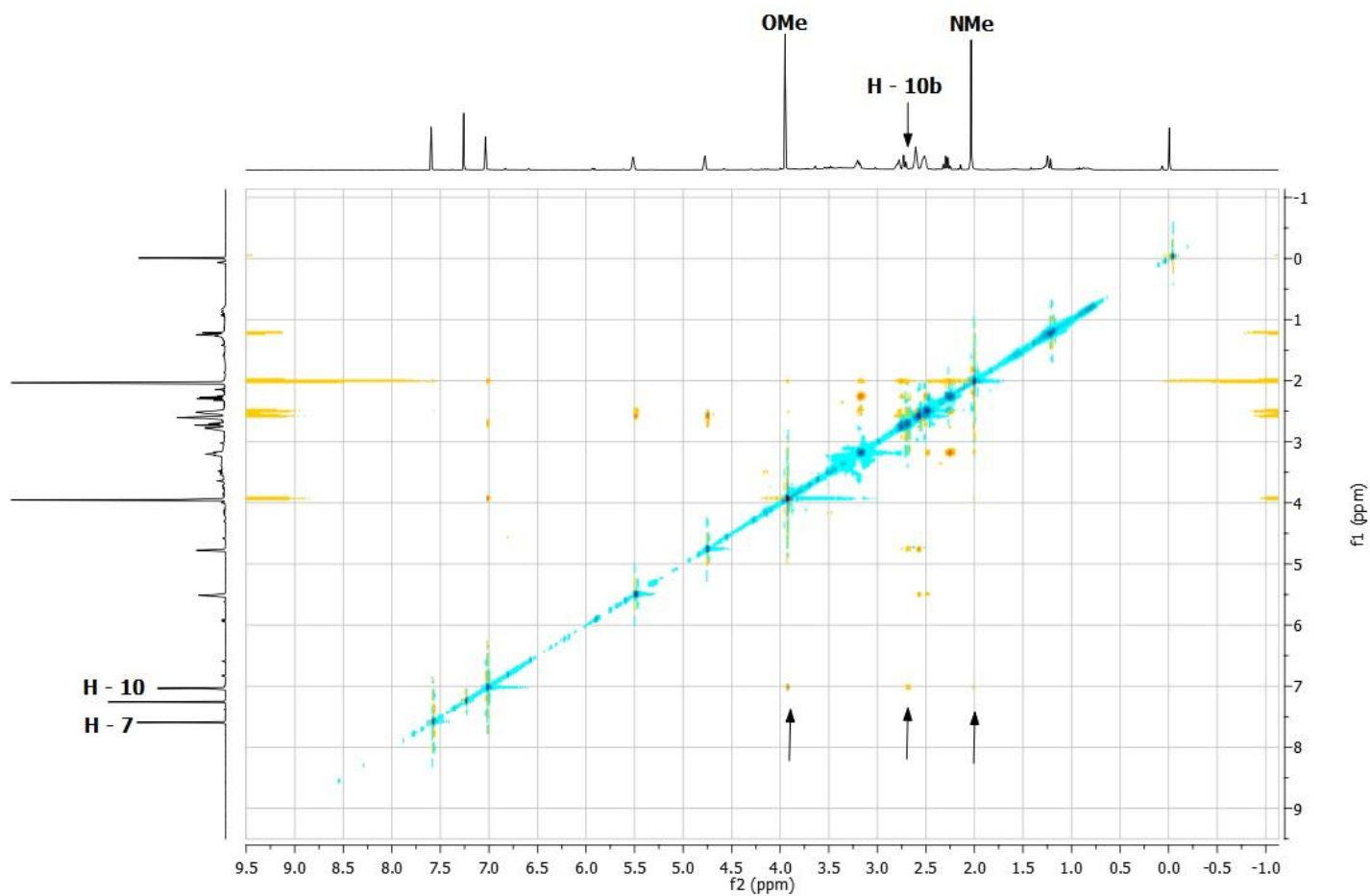


Figura 75 - Espectro de NOESY do composto **10**, onde as seta indicam a correlação NOESY do H-10 com o grupo OMe, com o H-10b e com o grupo NMe (CDCl₃, 400 MHz).

Na tabela 17, pode-se observar os deslocamentos e as multiplicidades do composto **10** (C₁₇H₁₉NO₄), em comparação com dados da literatura para o composto alcaloide 8-O-desmetilhomolicorina (BASTIDA *et al*, 1987), confirmando a estrutura proposta.

Tabela 17 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto **10**, e o alcaloide 8-O-desmetilhomolicorina.

Posição dos hidrogênios	δ experimental do alcaloide isolado (ppm) CDCl ₃ , 400MHz	δ previamente publicado da 8-O-DESMETILHOMOLICORINA (ppm) CDCl ₃ , 400 MHz
H - 1	4,77 m	4,78 m
H - 2 (2H)	2,58 – 2,63 m	2,59 m
H - 3	5,50 m	5,50 d (2,4)
H - 4a	2,76 dl (10)	2,73 dd (9,7; <1)
H - 7	7,59 s	7,60 s
H - 10	7,02 s	6,98 s
H - 10b	2,69 dd (9,7; 1,8)	2,63 dd (9,7; 2,0)
H - 11 (2H)	2,47 – 2,55 m	2,50 m
H - 12 α	3,18 ddd (9,6; 6,3; 3,8)	3,14 ddd (10; 6,6; 3,4)
H - 12 β	2,26 q (9,4)	2,25 dd (18,8; 9,4)
NMe	2,02 s	2,00 s
OMe	3,95 s	3,95 s

A 8-O-demetilhomolicorina é um alcaloide relatado em muitas espécies de plantas da família Amaryllidaceae (BASTIDA *et al*, 1990, LABRAÑA *et al*, 1999, BERKOV *et al*, 2007, DE ANDRADE *et al*, 2012, BOZKURT-SARIKAYA *et al*, 2013).

Estudos de atividade biológica relatam que este composto exibe atividade citotóxica fraca (WENIGER *et al*, 1995, BERKOV *et al*, 2011), efeitos hipotensivos (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al*, 2000) e efeitos neuroprotetores (LI *et al*, 2013).

4.3.13 Composto 13

O composto **13** foi isolado a partir do caule e das folhas de *W. procera*, totalizando 6,5 mg, sendo analisado pela técnica de RMN de ^1H uno e bidimensional.

Ao analisar o espectro de RMN de ^1H obtido deste composto, verificou-se que se tratava de um alcaloide com esqueleto do tipo homolicorina, com alguns sinais característicos (Figura 76): dois hidrogênios singletos *p*-orientados, 6,84 e 7,01 ppm; um sinal característico de olefina, em 5,53 ppm; a presença de dois sinais referentes ao grupo OMe, um aromático em 3,87 ppm e um alifático em 3,52 ppm e a presença do grupamento NMe, em 2,18 ppm.

A OMe alifática foi atribuída à posição C-6, visto que, o espectro deste composto apresenta um hidrogênio singlete em 5,48 ppm, característico de hidrogênio da posição C-6, quando a mesma está substituída por um grupo oxigenado. Vale ressaltar, que ocorre um maior desblindamento do hidrogênio H-10, em comparação com o H-7, característico de alcaloides da série hemiacetal, como o alcaloide *O*-metillicorenina (BASTIDA *et al*, 2011).

Assim como, o alcaloide 8-*O*-desmetilhomolicorina, o composto **13** apresenta somente um grupo OMe aromático, desta forma, para a confirmação da posição deste grupo, foi realizada uma análise de RMN de ^1H bidimensional NOESY. Pode-se observar na figura 77, que o hidrogênio aromático da posição H-10 apresentou correlação NOESY com os hidrogênios correspondentes ao grupamento OMe aromático, com o hidrogênio da posição H-10b e com o grupo NMe, confirmando que este grupamento encontra-se na posição C-9, sendo a posição C-8 substituída por uma hidroxila (OH).

Assim, a partir do espectro de RMN de ^1H uno e bidimensional deste composto, em comparação com dados da literatura, foi caracterizado como sendo o alcaloide 8-*O*-desmetil-*O*-metillicorenina ($\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{NO}_4$) (WANG *et al*, 2007).

A tabela 18 detalha os deslocamentos e as multiplicidades observadas para este composto (**13**), e do alcaloide 8-*O*-desmetil-*O*-metillicorenina, confirmando a estrutura proposta (WANG *et al*, 2007).

8-O-desmetil-O-metillicorena

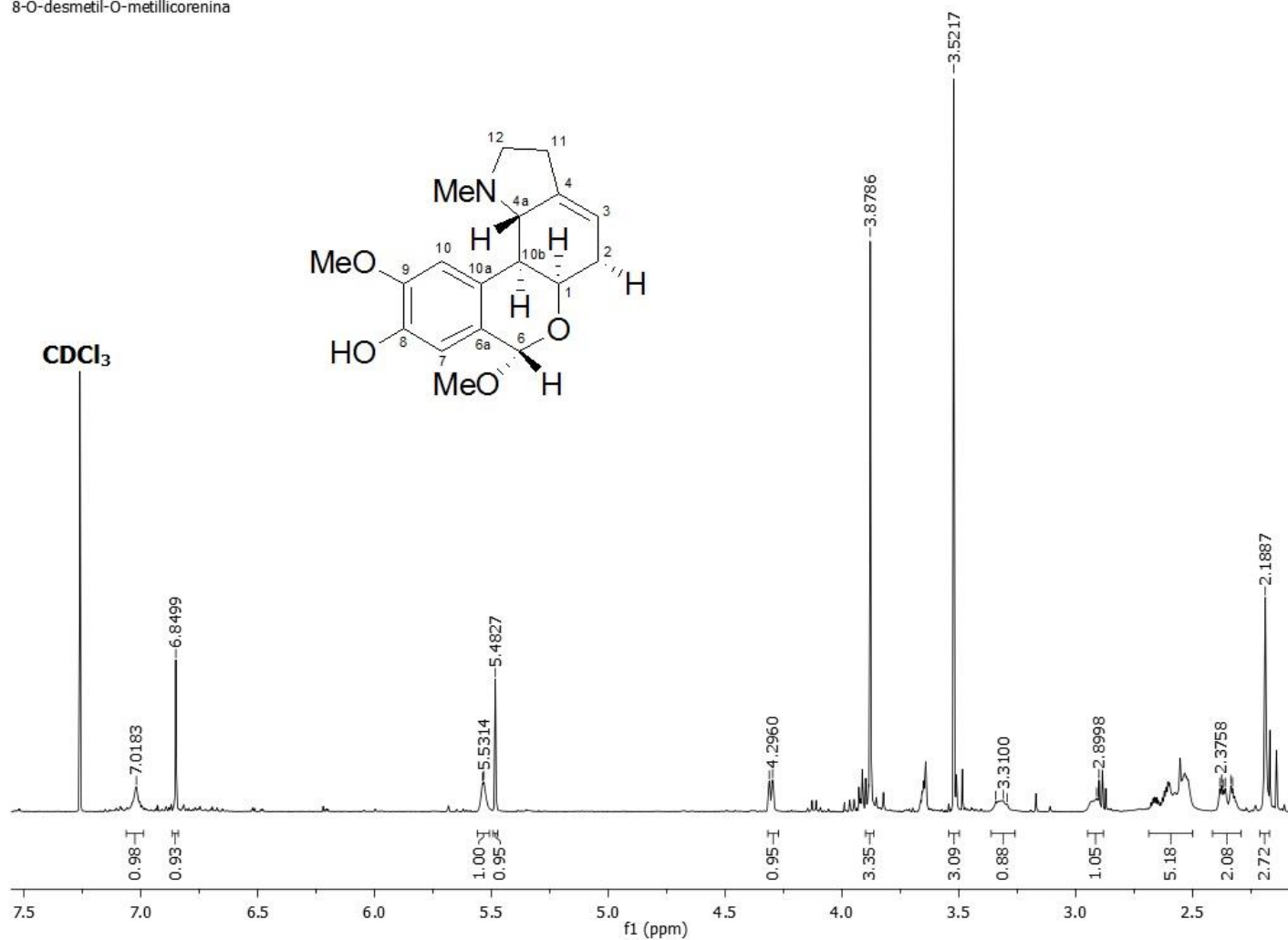


Figura 76 - Espectro de RMN de ^1H do composto 13 e sua estrutura (CDCl_3 , 400 MHz).

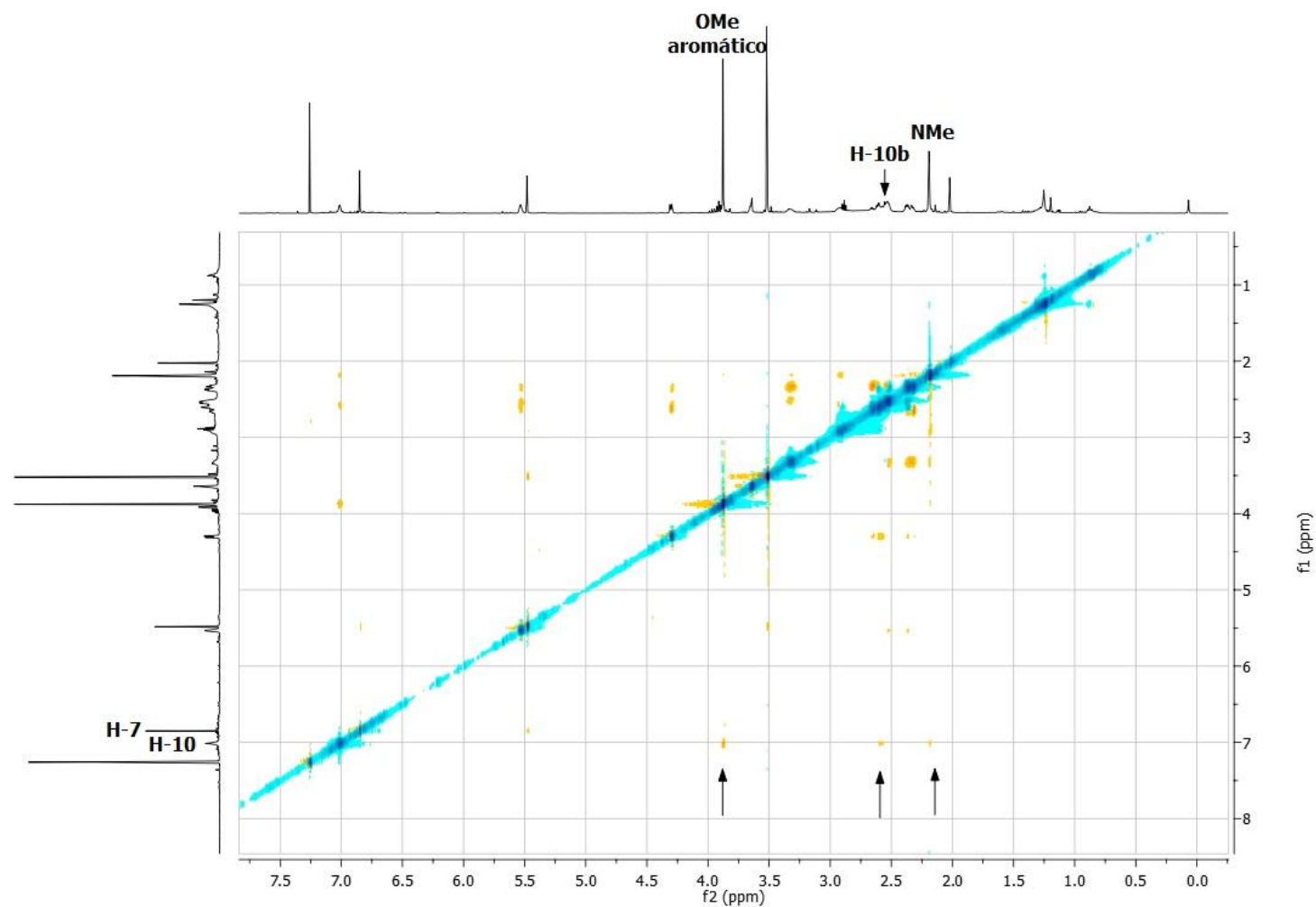


Figura 77 - Espectro de NOESY do composto **13**, onde as setas indicam a correlação NOESY do H-10 com o grupo OMe, com o H-10b e com o grupo NMe (CDCl₃, 400 MHz).

Tabela 18 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto **13**, e o alcaloide 8-O-desmetil-O-metillicorenina.

Posição dos hidrogênios	δ experimental do alcaloide isolado (ppm) CDCl_3 , 400MHz	δ previamente publicado da 8-O-DESMETIL-O-METILLICORENINA (ppm), CDCl_3 , 500 MHz
H - 1	4,30 dl (6)	4,29 dl (5,5)
H - 2	2,60 – 2,69 m	2,65 m
H - 2'	2,30 – 2,40 m	2,34 m
H - 3	5,53 m	5,52 dl (2,0)
H - 4a	2,91 m	2,90 m
H - 6	5,48 s	5,47 s
H - 7	6,84 s	6,83 s
H - 10	7,01 s	7,01 s
H - 10b	2,60 – 2,69 m	2,59 m
H - 11 (2H)	2,50 – 2,57 m	2,52 m
H - 12 α	3,31 m	3,29 m
H - 12 β	2,30 – 2,40 m	2,34 m
NMe	2,18 s	2,17 s
OMe	3,87 s	3,88 s
OMe	3,52 s	3,51 s

Este alcaloide foi isolado apenas uma vez, pelo pesquisador WANG e colaboradores (2007), da espécie *Hosta plantaginea* (Lam.) Aschers, da família Liliaceae. Desta forma, este trabalho relata o isolamento deste composto, pela primeira vez, a partir de uma espécie de planta da família Amaryllidaceae, e nenhum estudo biológico foi relatado para este alcaloide.

4.3.14 Composto 20

O composto **20** foi isolado a partir das folhas de *W. procera*, onde isolou-se 1,1 mg, sendo analisado pela técnica de RMN de ^1H uno e bidimensional. A partir do espectro de RMN de ^1H obtido para este composto, em comparação com dados da literatura, pode-se observar que o composto **20** apresentava grande semelhança com o alcaloide 9-*O*-desmetil-2 α -hidroxihomolicorina (BASTIDA *et al*, 1990^a).

No espectro representado na figura 78, podem-se observar alguns sinais importantes, como: dois hidrogênios singletos *p*-orientados, em 7,58 e 6,99 ppm, atribuídos aos hidrogênios aromáticos das posições H-7 e H-10, respectivamente; a presença de um sinal em 2,03 ppm, característico do grupamento NMe e de um sinal em 3,95 ppm, referente ao grupamento OMe aromático.

Pode-se observar ainda, as multiplicidades de alguns sinais na figura 79, como os sinais dos hidrogênios H-4a e H-10b, onde o sinal em 2,70 ppm, foi atribuído ao H-4a, como um dubleto, que apresenta uma constante de acoplamento de aproximadamente 10 Hz com o H-10b, coerente com o acoplamento trans-diaxial observada para estes hidrogênios em esqueletos do tipo homolicorina, e o sinal em 2,89 ppm, correspondente ao H-10b ($J_{10b,4a} = 9,7$ Hz, $J_{10b,1} = 2,0$ Hz) (BASTIDA *et al*, 2011).

Para a confirmação da posição da OMe aromática, o composto **20** foi analisado pela técnica de RMN de ^1H bidimensional NOESY. Pode-se observar na figura 80, que o hidrogênio aromático da posição H-10 apresentou correlação NOESY com os hidrogênios correspondente ao grupamento OMe amotático, confirmando que este grupo encontrava-se na posição C-9, diferentemente do que ocorre para o composto 9-*O*-desmetil-2 α -hidroxihomolicorina, que apresenta o grupo OMe na posição C-8. As estruturas químicas destes compostos estão representadas na figura 81.

Assim, foi proposto que este composto é o alcaloide 8-*O*-desmetil-2 α -hidroxihomolicorina ($\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_5$), sendo isolado pela primeira vez a partir de uma fonte natural.

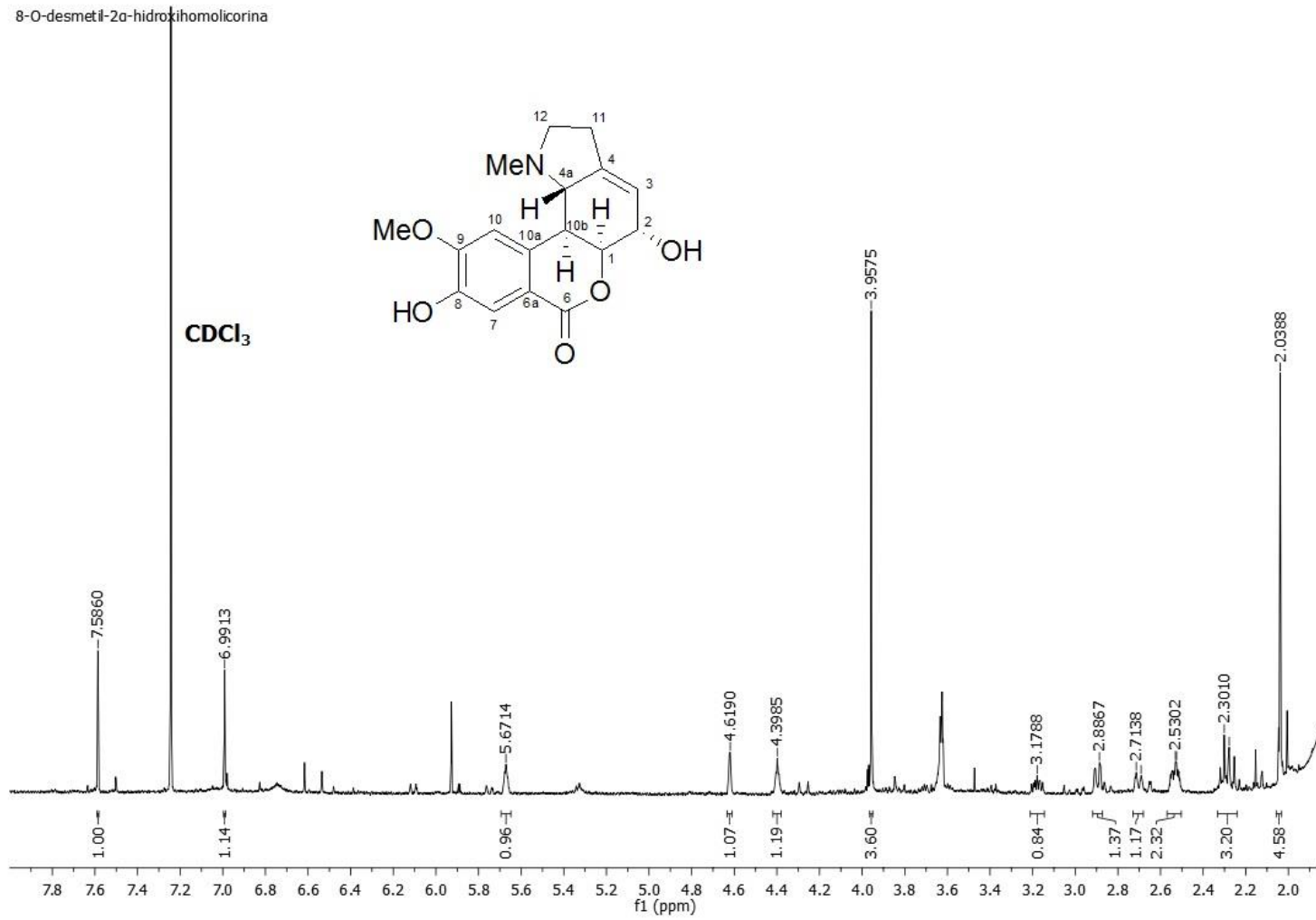


Figura 78 - Espectro de RMN de ¹H do composto **20** e sua estrutura (CDCl₃, 400 MHz).

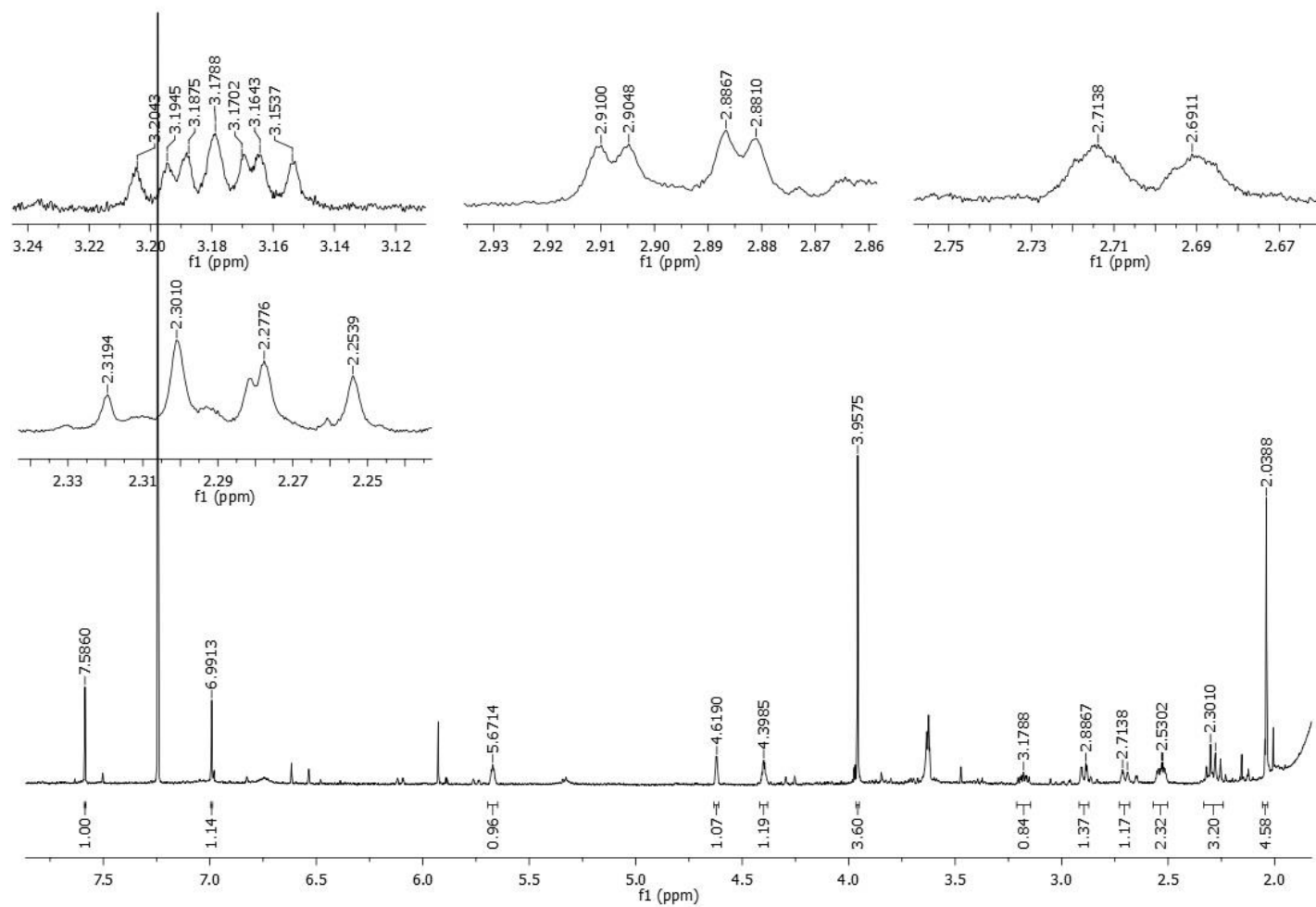


Figura 79 - Ampliações do espectro de RMN de 1H do composto **20** (CDCl₃, 400 MHz).

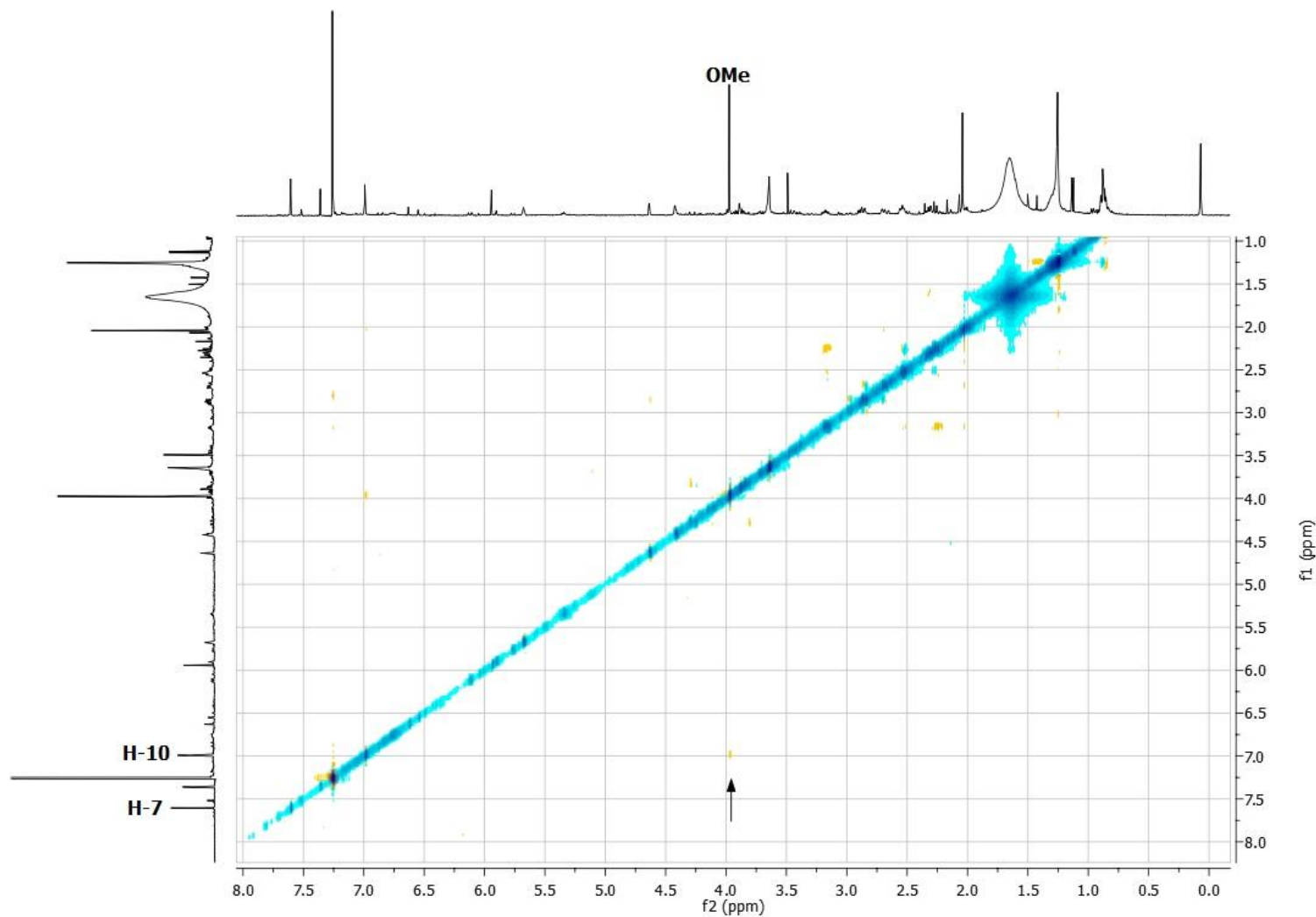


Figura 80 - Espectro de NOESY do composto **20**, onde a seta indica a correlação NOESY do H-10 com o grupo OMe aromático (CDCl₃, 400 MHz).

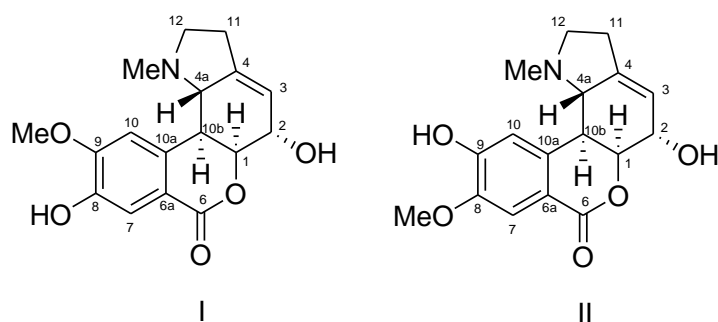


Figura 81 - Estrutura do alcaloide 8-O-desmetil-2 α -hidroxihomolitorina (I) e do alcaloide 9-O-desmetil-2 α -hidroxihomolitorina (II).

Assim como o alcaloide hippeastrina, a 8-O-desmetil-2 α -hidroxihomolitorina apresenta um substituinte hidroxila (OH), na posição C-2, sendo o sinal em 4,39 ppm, atribuído ao H-2 β , visto que, nos esqueletos do tipo homolitorina, quando ocorre substituição da posição C-2 pelos grupos OH, OMe ou AcO, esta geralmente apresenta disposição α (BASTIDA *et al*, 2011).

A tabela 19 compara os deslocamentos e as multiplicidades obtidas para o composto **20**, em comparação com o alcaloide 9-O-desmetil-2 α -hidroxihomolitorina, uma vez que, a substituição do grupo OMe aromático para o C-9, como observado na 8-O-desmetil-2 α -hidroxihomolitorina, não altera de maneira significativa os deslocamentos dos sinais (BASTIDA *et al*, 1990^a).

Como este estudo relata o isolamento deste composto pela primeira vez, nenhuma atividade biológica foi encontrada na literatura, somente para o alcaloide 9-O-desmetil-2 α -hidroxihomolitorina, que apresenta atividade citotóxica moderada (WENIGER *et al*, 1995; BERKOV *et al*, 2011; LI *et al*, 2013).

Tabela 19 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto **20**, e o alcaloide 9-O-desmetil-2 α -hidroxihomolicorina.

Posição dos hidrogênios	δ experimental do alcaloide isolado (ppm) CDCl_3 , 400MHz	δ previamente publicado da 9-O-DESMETIL-2 α -HIDROXIHOMOLICORINA (ppm) CDCl_3 , 200 MHz
H - 1	4,62 m	4,59 dl (1)
H - 2 β	4,39 m	4,28 tl (1)
H - 3	5,67 m	5,68 sl
H - 4a	2,70 dl (9,7)	2,66 dl (9,7)
H - 7	7,58 s	7,47 s
H - 10	6,99 s	6,95 s
H - 10b	2,89 dd (9,4; 2,1)	2,83 dd (9,7; 1,0)
H - 11 (2H)	2,50 - 2,56 m	2,50 - 2,60 m
H - 12 α	3,17 ddd (10,2; 6,2; 3,9)	3,17 ddd (9,7; 7,4; 2,5)
H - 12 β	2,28 q (9,4)	2,31 dd (18,5; 9,7)
NMe	2,03 s	2,08 s
OMe	3,95 s	3,95 s

4.3.15 Composto 12

O composto **12** foi isolado a partir do caule de *W. procera*, em um total de 4,3 mg. Sendo analisado pela técnica de RMN de ^1H e dicroísmo circular (DC).

As características principais encontradas no espectro deste composto incluem (Figura 82): dois hidrogênios singletos *p*-orientados, em 6,47 e 6,83 ppm; um sinal, em 5,89 ppm (dubleto) - 5,88 ppm (dubleto) (J - 1,4 Hz), integrando para dois hidrogênios, característico do grupamento metinelodióxifenila e um sinal, como um singlete, em 3,36 ppm, referente ao grupo OMe alifático. Nas ampliações

observadas na figura 83 verifica-se os sinais referentes aos hidrogênios da posição 6, como dubletos, em 4,33 e 3,71 ppm, que acoplam entre si, por uma constante de acoplamento de 16,8 Hz.

A partir das análises de RMN de ^1H obtidas, concluiu-se que tratava de um alcaloide da série crinano (5,10b-etanofenantridina), representado pelos esqueletos do tipo haemantamina e crinina. Estes esqueletos podem ser diferenciados pela disposição da ponte (5,10b-etano) correspondente aos carbonos C-11 e C-12, na qual, uma disposição α , caracteriza alcaloides com esqueleto do tipo haemantamina, e uma disposição β , caracteriza alcaloides com esqueleto do tipo crinina. A determinação da configuração absoluta da ponte 5,10b-etano nestes alcaloides é realizada através do espectro de dicroísmo circular (CD) (BASTIDA *et al*, 2011).

Nos espectros de RMN de ^1H destes esqueletos, quando se utiliza o solvente CDCl_3 , pode-se prever a configuração do substituinte da posição C-3, de acordo com as constantes de acoplamento observadas entre os hidrogênios olefínicos H-1 e H-2 e o hidrogênio da posição H-3 (BASTIDA *et al*, 2011).

Na figura 83, pode-se observar os sinais referentes aos hidrogênios olefínicos, em 6,43 ppm, como um dubleto, atribuído ao hidrogênio H-1, que apresenta uma constante de acoplamento de magnitude de 10,1 Hz com o hidrogênio da posição H-2; e em 6,38 ppm, como um duplo duplo dubleto, que apresenta uma constante de acoplamento de 10 Hz com o H-1; uma de 4,7 Hz com o hidrogênio da posição H-3 e uma de menor magnitude ($J - <1$ Hz) com o hidrogênio da posição H-4 β .

A constante de acoplamento de magnitude de aproximadamente 5 Hz que o hidrogênio da posição H-2 apresenta com o H-3, é uma característica observada quando o substituinte C-3 apresenta uma relação trans com a ponte (BASTIDA *et al*, 2011).

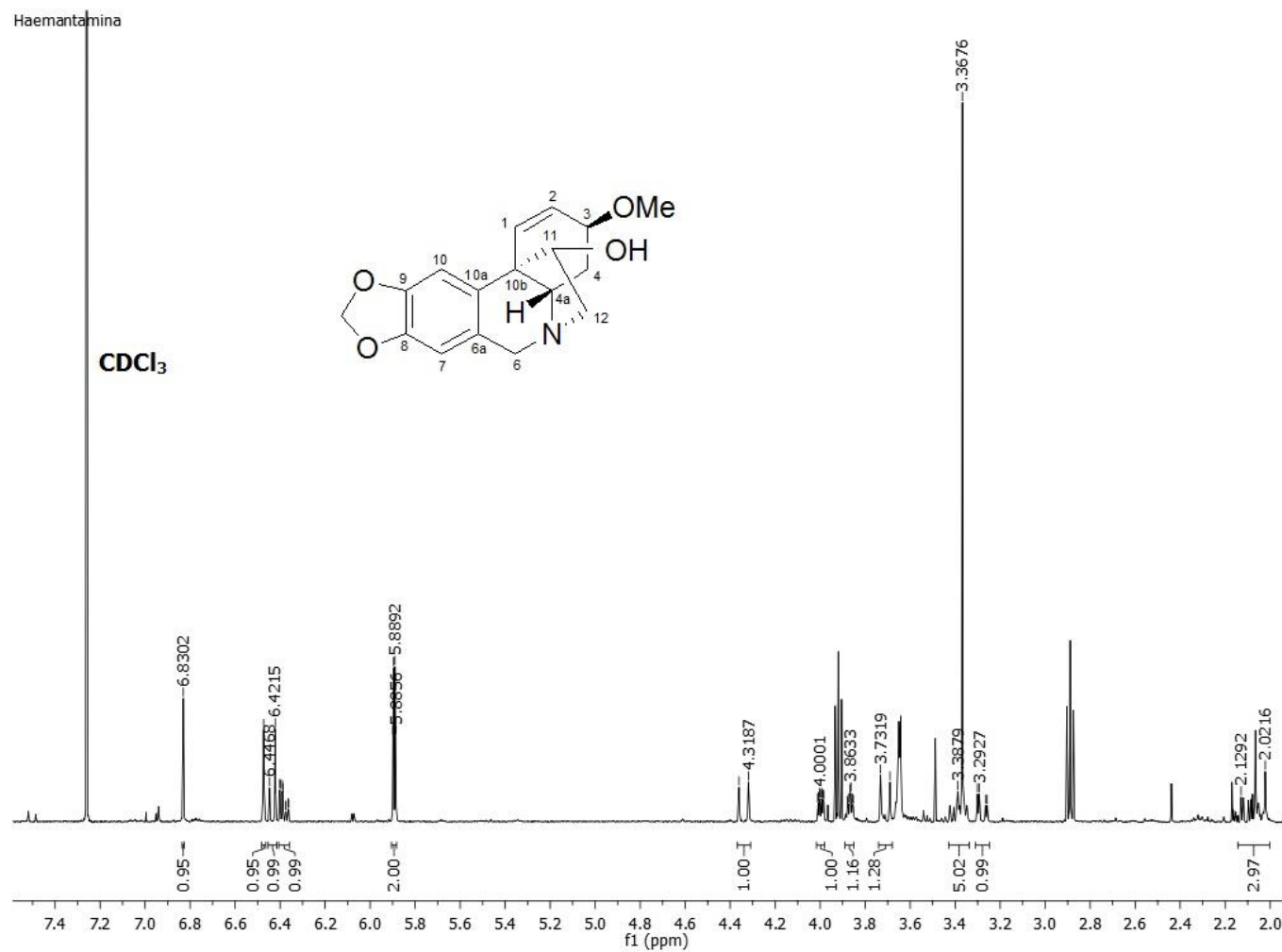


Figura 82 - Espectro de RMN de ^1H do composto 12 e sua estrutura (CDCl_3 , 400 MHz).

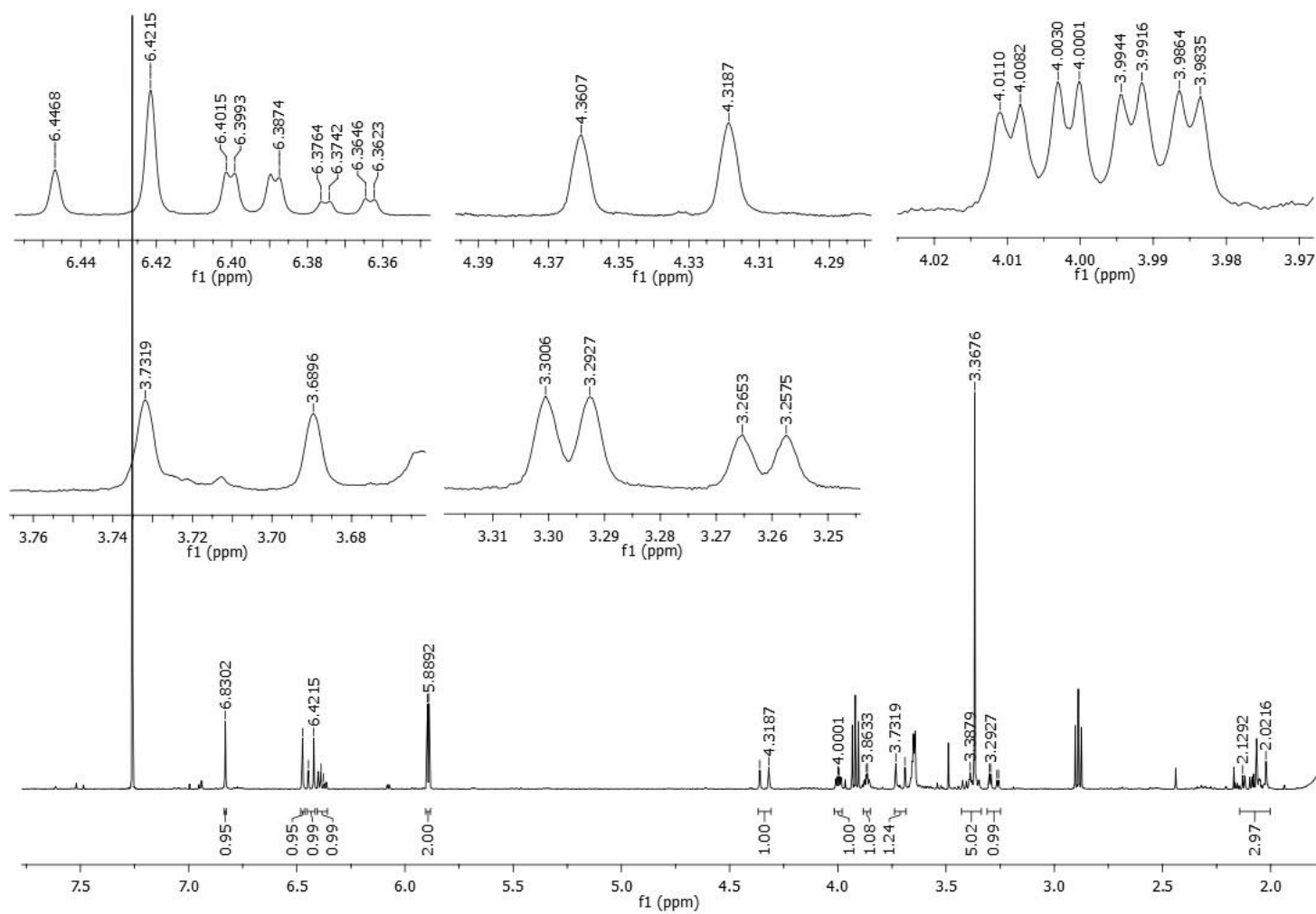


Figura 83 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto **12** (CDCl_3 , 400 MHz).

Desta forma, ao comparar os deslocamentos e as multiplicidades dos hidrogênios deste composto, com dados da literatura, foi proposto que o composto **12** era o alcaloide haemantamina ($C_{19}H_{24}NO_4$) (PABUÇÇUOGLU *et al*, 1989), como demonstrado na tabela 20.

Tabela 20 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto **12**, e o alcaloide haemantamina.

Posição dos hidrogênios	δ experimental do alcaloide isolado (ppm) $CDCl_3$, 400MHz	δ previamente publicado da HAEMANTAMINA (ppm) $CDCl_3$, 360 MHz
H - 1	6,43 d (10,1)	6,36 d (10)
H - 2	6,38 ddd (10; 4,7; <1)	6,25 dd (10; 5)
H - 3	3,86 m	3,82 m
H - 4 α	2,01 – 2,17 m	2,11 ddd (13,7; 13,6; 4,2)
H - 4 β	2,01 – 2,17 m	1,96 ddd (13,7; 4,6; <1)
H - 4a	3,35 – 3,42 m	3,25 dd (13,6; 4,6)
H - 6 α	3,71 d (16,9)	3,72 d (16,8)
H - 6 β	4,33 d (16,8)	4,25 d (16,8)
H - 7	6,47 s	6,41 s
H - 10	6,83 s	6,74 s
H - 11endo	3,99 ddd (6,6; 3,2; 1,1)	3,96 dd (6,7; 3,3)
H - 12endo	3,35 – 3,42 m	3,3 dd (13,9; 6,7)
H - 12exo	3,27 dd (14; 3,1)	3,19 dd (13,9; 3,3)
OCH ₂ O	5,89 d – 5,88 d (1,4)	5,81 d – 5,82 d (1,3)
OMe	3,36 s	3,36 s

Para a confirmação da configuração absoluta do composto **12**, o mesmo foi analisado pela técnica de dicroísmo circular. Os espectros de CD obtidos, a partir dos alcaloides da série crinano, se caracterizam por duas bandas antipodais (efeito

Cotton positivo e negativo), em cerca de 290 e 245 nm, onde a forma do espectro está relacionada à estereoquímica destes alcaloides, sendo que os espectros dos enantiômetros (tipo crinina e tipo haemantamina) são a imagem especular, um do outro, ocorrendo à inversão do efeito Cotton de positivo para negativo e vice-versa (DEANGELIS e WILDMAN, 1969; WAGNER *et al*, 1996).

Na figura 84, pode-se observar um efeito Cotton positivo em 293 nm e um negativo em 242 nm, característico de esqueletos do tipo haemantamina (configuração da ponte em α), confirmando assim, a estrutura proposta (DEANGELIS e WILDMAN, 1969).

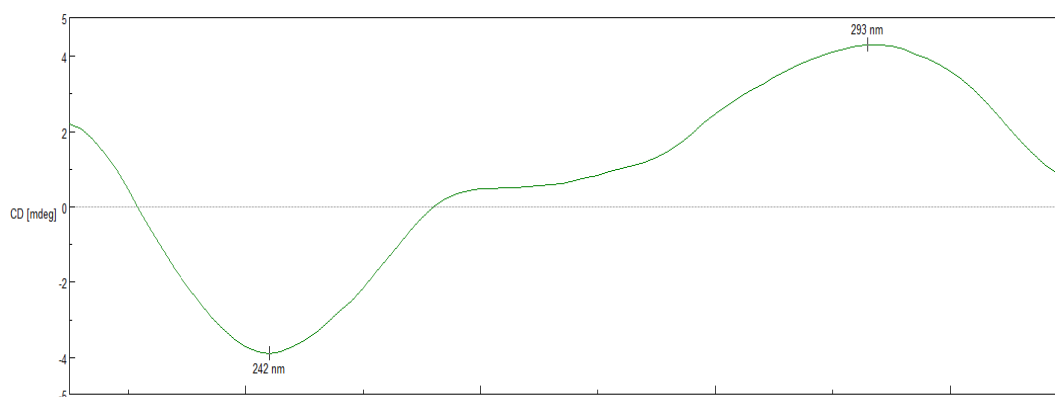


Figura 84 - Análise por dicroísmo circular do composto **12**.

Estudos de biossíntese concluíram que alcaloides da série crinano, são derivados do acoplamento fenol oxidativo para-para' do precursor *O*-metilnorbeladina, assim como, os alcaloides com esqueleto do tipo tazetina. Sendo que as séries enantioméricas (tipo haemantamina e tipo crinina), não são interconversíveis (BASTIDA *et al*, 2011) (Figura 85).

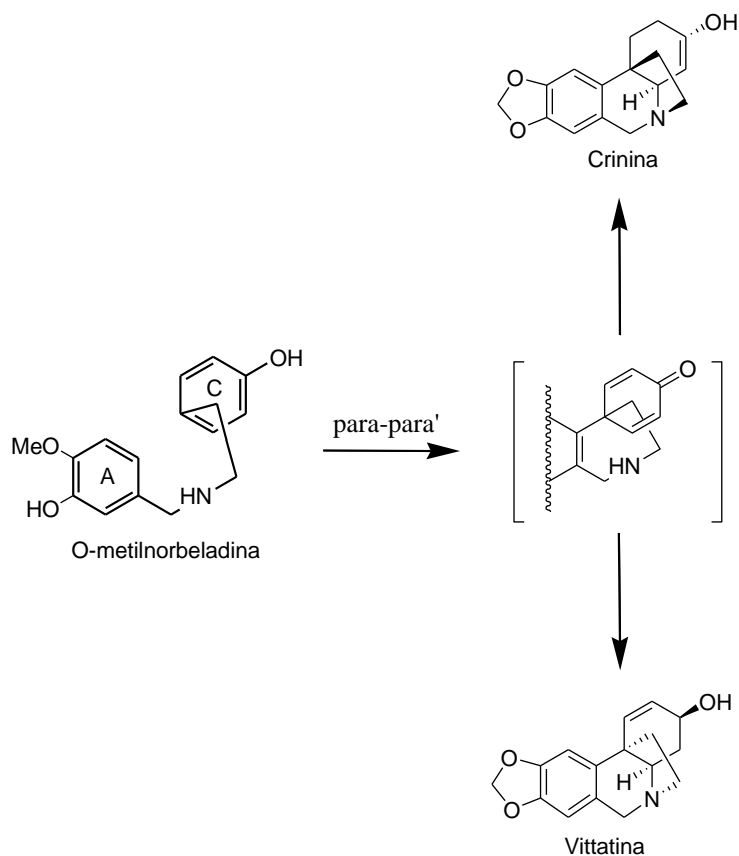


Figura 85 - Biossíntese dos alcaloides da série crinano.

O alcaloide haemantamina foi isolado a partir de muitas espécies de planta da família Amaryllidaceae (BASTIDA *et al*, 1987; LABRAÑA *et al*, 1999; HERRERA *et al*, 2001^b; HOHMANN *et al*, 2002; CABEZA *et al*, 2003; OSORIO *et al*, 2010; GIORDANI *et al*, 2011; GUO *et al*, 2016).

Diversos estudos de análise biológica já foram relatados para este alcaloide, mostrando que a haemantamina apresenta atividade antitumoral (MCNULTY *et al*, 2007; BERKOV *et al*, 2011; NAIR *et al*, 2012), atividade antiproliferativa (HOHMANN *et al*, 2002; JIN, Z, 2013; HAVELEK *et al*, 2014; HE *et al*, 2015), atividade antirretroviral (SZLÁVIK *et al*, 2004), atividade antiparasitária contra *Entamoeba histolytica* e *Plasmodium falciparum* (HERRERA *et al*, 2001^b) e contra *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum* e *Leishmania donovani* (OSORIO *et al*, 2010; KAYA *et al*, 2011). Além de efeitos hipotensivos (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al*, 2000).

4.3.16 Composto 17

Foram isolados 2,0 mg do composto **17**, a partir do fracionamento cromatográfico do caule da planta *W. procera*. Sendo posteriormente, analisado pela técnica de RMN de ^1H e dicroísmo circular.

No espectro representado na figura 86, pode-se observar que se tratava de um alcaloide da série crinano, com algumas características principais, que incluem: a presença de dois sinais correspondente aos hidrogênios singletos *p*-orientados, em 6,49 e 6,84 ppm, atribuídos aos hidrogênios das posições H-7 e H-10 respectivamente; e a presença de um sinal referente ao grupamento metinelodióxifenila, como dois dubletos ($J - 1,2$ Hz), em 5,90-5,88 ppm.

Na figura 87, verifica-se as ampliações referente aos hidrogênios da posição benzílica C-6, em 3,79 ppm, como um dubleto, atribuído ao H-6 α , e em 4,42 ppm, como um dubleto, correspondendo ao H-6 β , que acoplam entre si, com uma constante de acoplamento de 16,8 Hz. Além, dos sinais correspondentes aos hidrogênios olefínicos, em 6,58 ppm, como um dubleto, correspondendo ao H-1 ($J_{1,2} - 9.70$ Hz), e em 5,95 ppm, como um duplo dubleto, referente ao H-2 ($J_{2,1} - 10.0$ Hz e $J_{2,3} - 5.2$ Hz). Onde a constante de acoplamento de aproximadamente 5 Hz entre os H-2 e H-3, é uma característica observada quando o substituinte C-3 apresenta uma relação trans com a ponte (BASTIDA *et al*, 2011).

Pode-se notar, que a principal diferença observada no espectro do composto **17**, em comparação com o espectro da haemantamina, anteriormente mencionado, é a ausência do sinal do grupamento OMe na posição C-3.

Para a confirmação da configuração absoluta deste alcaloide, e assim, caracterizá-lo como pertencente ao esqueleto do tipo haemantamina ou crinina, o mesmo foi analisado pela técnica de dicroísmo circular, como ilustrado na figura 88.

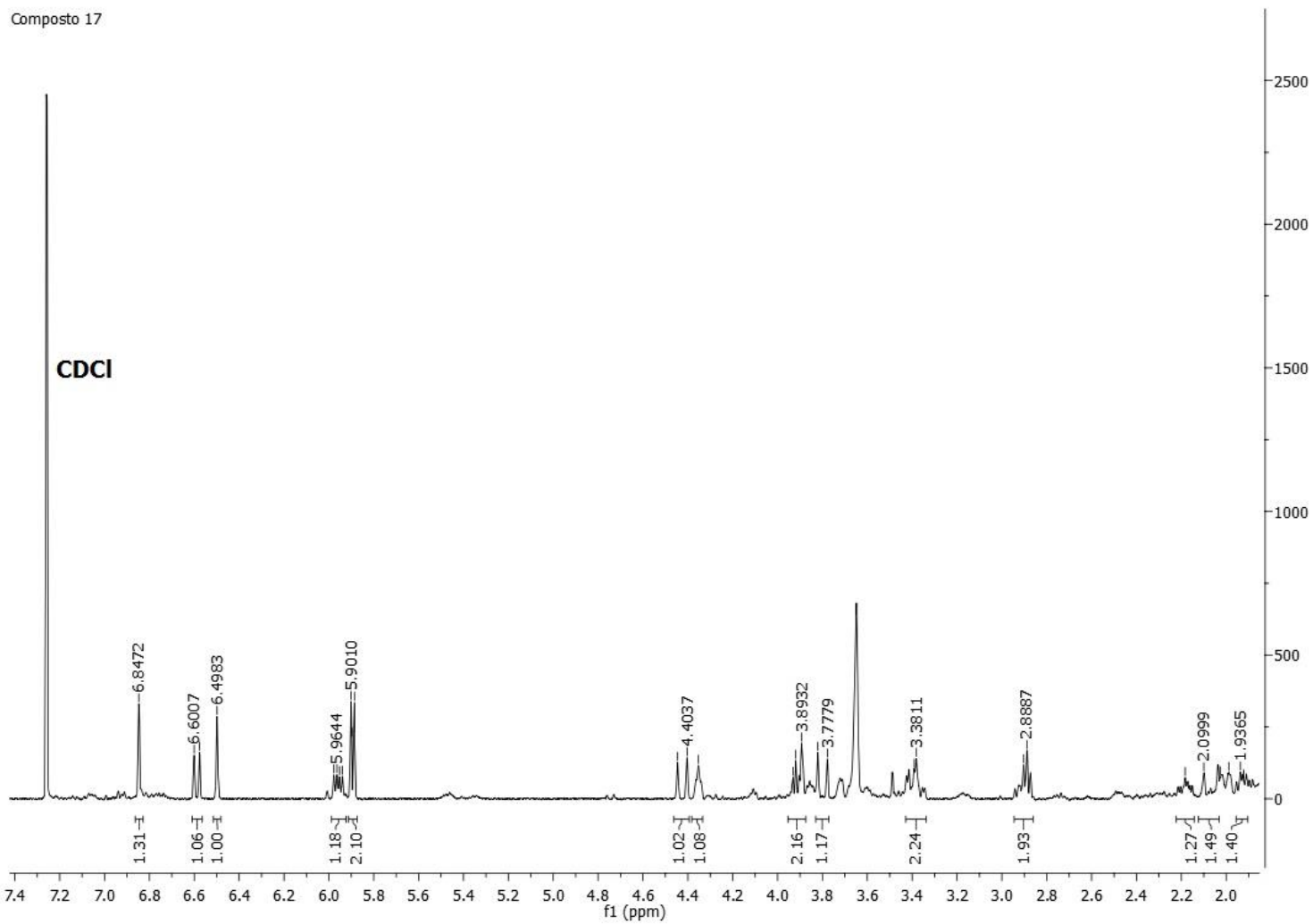


Figura 86- Espectro de RMN de ¹H do composto 17 e sua estrutura (CDCl₃, 400 MHz)..

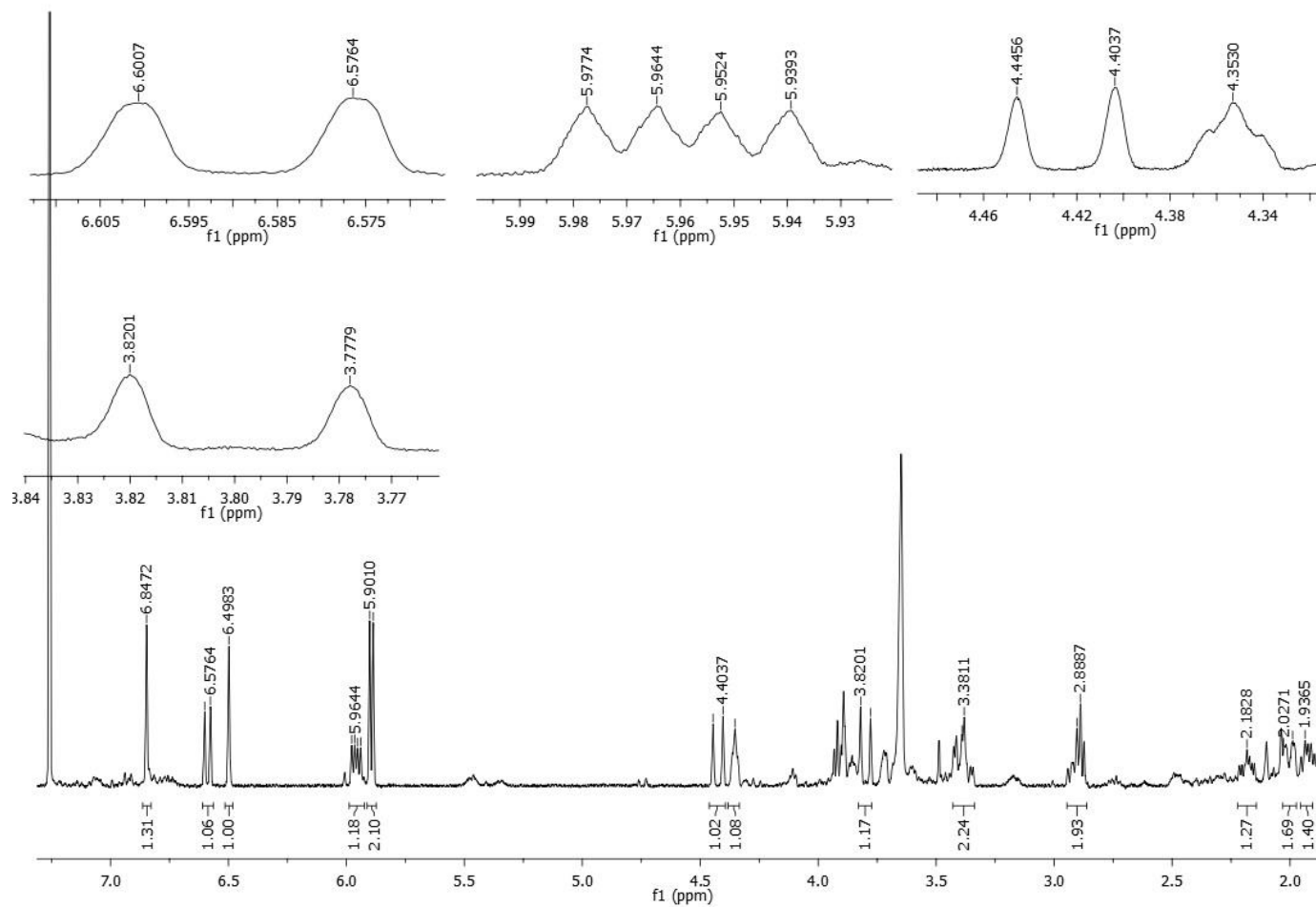


Figura 87 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto **17** (CDCl_3 , 400 MHz)..

O composto **17** apresentou efeito Cotton positivo em 294 nm e negativo em 242 nm, características que estão de acordo com os encontrados para alcaloides com esqueleto do tipo haemantamina, com configuração da ponte em α (Figura 88) (DEANGELIS e WILDMAN, 1969).

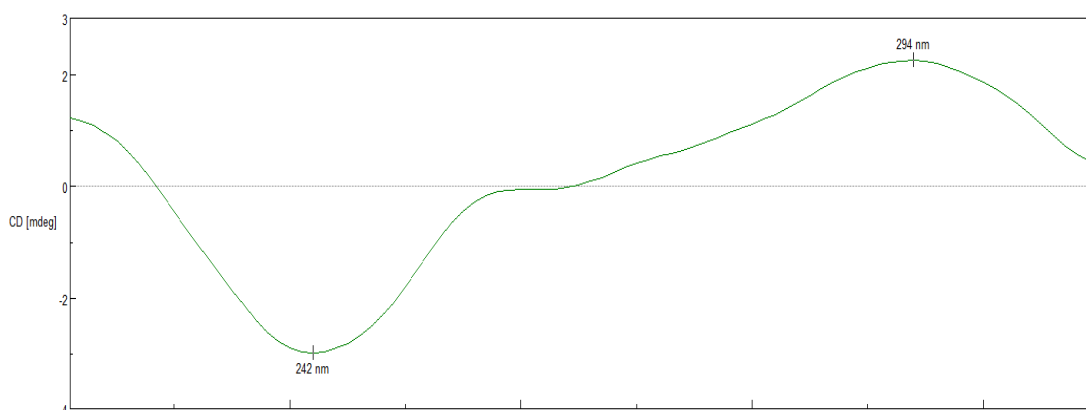


Figura 88 - Análise por dicroísmo circular do composto **17**.

Desta forma, a partir das características dos espectros de RMN de ^1H e de dicroísmo circular, do composto **17**, em comparação com dados da literatura, foi possível atribuir a este composto como pertencente ao esqueleto do tipo haemantamina.

Ao comparar os deslocamentos obtidos deste composto, com dados da literatura (Tabela 21), pode-se observar grande semelhança com o alcaloide vittatina, ilustrado na figura 89 ($\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_3$) (PABUÇÇUOGLU *et al*, 1989). Porém, novas análises serão realizadas para a elucidação completa deste alcaloide.

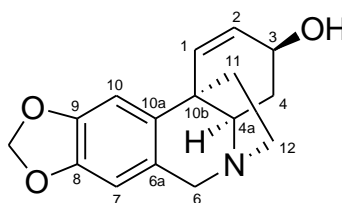


Figura 89 - Estrutura química do alcaloide vittatina.

Tabela 21 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto **17**, e o alcaloide vittatina.

Posição dos hidrogênios	δ experimental do alcaloide isolado (ppm) CDCl_3 , 400MHz	δ previamente publicado da VITTATINA (ppm) CDCl_3 , 360 MHz
H - 1	6,58 d (9,7)	6,44 d (10)
H - 2	5,95 dd (10; 5,2)	6,06 dd (10; 5,2)
H - 3	4,35 m	4,46 m
H - 4 α	1,92 m	1,85 ddd (13,5; 13,5; 4,1)
H - 4 β	2,88 m	2,58 ddd (13,5; 4,5; <1)
H - 4a	3,89 m	3,87 m
H - 6 α	3,79 d (16,8)	4,07 d (16,2)
H - 6 β	4,42 d (16,7)	4,71 d (16,2)
H - 7	6,49 s	6,53 s
H - 10	6,84 s	6,87 s
H - 11 _{endo}	2,09 m	2,15 m
H - 11 _{exo}	2,18 m	2,32 m
H - 12 _{endo}	3,38 m	3,17 m
H - 12 _{exo}	3,92 m	3,95 m
OCH ₂ O	5,90 d - 5,88 d (1,2)	5,95 s

O alcaloide vittatina foi amplamente relatado a partir de espécies de Amaryllidaceae (BASTIDA *et al*, 1995; HERRERA *et al*, 2001; CABEZAS *et al*, 2003; DE ANDRADE *et al*, 2011; KULHÁNKOVÁ *et al*, 2013; EMIR *et al*, 2016). Estudos de atividade biológicas para este alcaloide demonstraram que a vittatina, apresenta atividade citotóxica (KAYA *et al*, 2004), atividade contra a enzima butirilcolinesterase (BuChE) (EMIR *et al*, 2016), atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (EVIDENTE *et al*, 2004). Além de possuir efeitos analgésicos (BASTIDA *et al*, 2011).

4.3.17 Composto 18 e 19

Os compostos **18** e **19** foram isolados como uma mistura de epímeros, a partir do fracionamento cromatográfico das folhas de *W. procera*, onde isolou-se 3,1 mg dos mesmos, sendo analisados pela técnica de RMN de ^1H e dicroísmo circular.

A partir do espectro de RMN de ^1H , pode-se notar que estes compostos pertenciam aos esqueletos do tipo crinano, onde as características principais observadas foram (Figura 90 e 91): quatro sinais de hidrogênios singletos p -orientados, em 6,97 e 6,81 ppm, atribuídos aos hidrogênios das posições H-7, e em 6,80 e 6,77 ppm, correspondendo aos hidrogênios da posição H-10; dois sinais, integrando para dois hidrogênios, em 5,93 e 5,91 ppm, característico do grupamento metilendioxifenila; e dois sinais, integrando para três hidrogênios, em 3,38 e 3,35 ppm, atribuído aos grupamentos OMe alifático, atribuídos às posições C-3. Além, da observação de um multiplete, integrando para quatro hidrogênios, na região de olefinas, sendo atribuído aos hidrogênios H-1 e H-2 (BASTIDA *et al*, 2011).

Na figura 86, observa-se as ampliações referentes aos sinais dos hidrogênios das posições H-4a e H-4 α . Onde o sinal do H-4a, aparece como um duplo dubleto, devido ao acoplamento com o H-4 α (J - 13,2 Hz), e ao acoplamento com o H-4 β (J - 13,6 Hz). E o H-4 α , aparece como um duplo dubleto de dubleto, apresentando três constantes de acoplamento ($J_{4\alpha,4\beta}$ - 13,6 Hz, $J_{4\alpha,4a}$ - 13,3 Hz, $J_{4\alpha,3}$ - 4,4).

O hidrogênio H-4a, nos esqueletos da série crinano, é sempre axial e contrário à ponte (5,10b-etano). A constante de acoplamento de grande magnitude, observada entre os H-4a e H-4 α , é congruente com uma relação trans-diaxial destes hidrogênios. E a pequena constante observada entre os H-4 α e H-3, indica que os mesmos, não possuem relação trans-diaxial. Desta forma, pode-se concluir que o H-3 está em disposição equatorial, com relação *cis* com a ponte, e o substituinte (OMe) em posição axial, com relação *trans* com a ponte (BASTIDA *et al*, 2011).

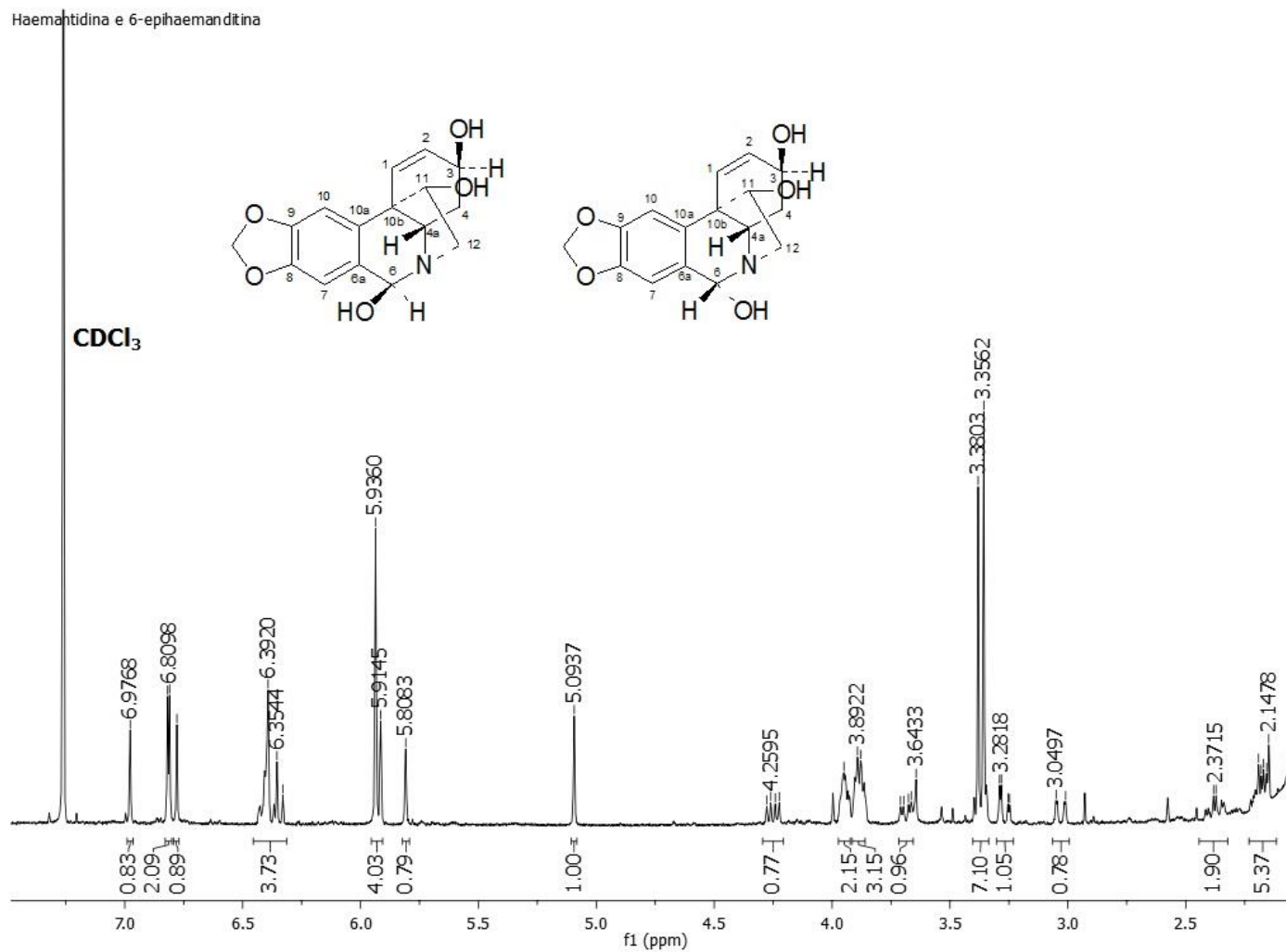


Figura 90 - Espectro de RMN de ¹H dos compostos 18 e 19 e suas estruturas (CDCl₃, 400 MHz).

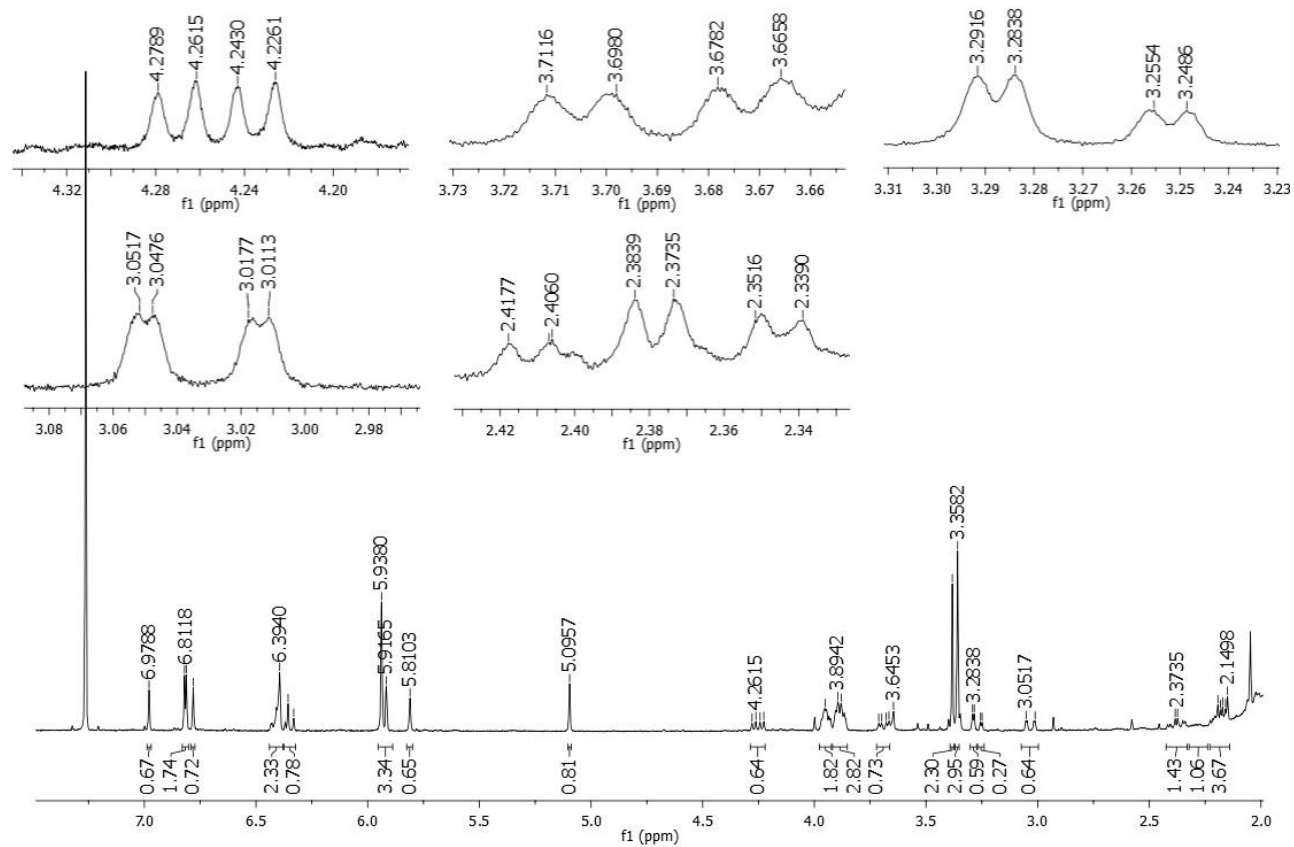


Figura 91 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H dos compostos **18** e **19** (CDCl_3 , 400 MHz).

Devido à ausência dos sinais referentes à posição C-6, que nos esqueletos da série crinano aparecem sempre como um dubleto, apresentando uma constante de acoplamento de magnitude de aproximadamente 16 Hz, foi atribuído que os compostos **18** e **19** eram substituídos na posição C-6 pela hidroxila (OH), onde aparecem como uma mistura de epímeros no espectro de RMN de ^1H .

Segundo BASTIDA e colaboradores, a mistura de epímeros é comum para alcaloides da série crinano que apresentam um substituinte OH na posição C-6, sendo estes epímeros de difícil separação, até pela técnica de HPLC (BASTIDA *et al*, 2011).

Para a confirmação da configuração absoluta desses alcaloides, estes foram enviados para análise de dicroísmo circular, onde apresentaram efeito Cotton positivo em 290 nm e negativo em 245 nm, características que estão de acordo com os encontrados para alcaloides com esqueleto do tipo haemantamina (configuração da ponte em α), como observado na figura 92 (DEANGELIS e WILDMAN, 1969).

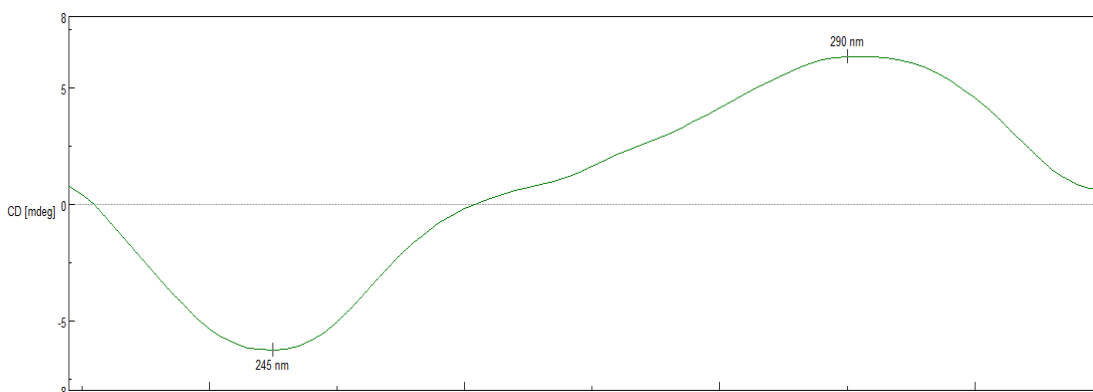


Figura 92 - Análise por dicroísmo circular, dos compostos **18** e **19**.

Assim, a partir dos dados obtidos dos compostos **18** e **19**, em comparação com dados da literatura, foram caracterizados como sendo os alcaloides epímeros haemantidina ($\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_5$) e 6-epihaemantidina ($\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_5$) (PABUÇÇUOGLU *et al*, 1989), como observado na tabela 22.

Tabela 22 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto **18** e **19**, e os alcaloides haemantidina e 6-epihaemantidina.

Posição dos Hidrogênios	δ experimental dos alcaloides isolados (18 e 19) (ppm) CDCl_3 , 400MHz	δ previamente publicado da HAEMANTIDINA e 6-EPIHAEMANTIDINA (ppm) CDCl_3 , 500 MHz
H - 1	6,39 – 6,44 m	6,33 d (10,1)
H – 2	6,32 – 6,39 m	6,27 dd (10,1; 4,8)
H - 3	3,85 – 3,91 m	3,85 m
H - 4 α	2,37 ddd (13,6; 13,2; 4,4) / 2,14 – 2,23 m	2,36 ddd (13,5; 13,5; 4,3) / 2,21 ddd (13,7; 13,7; 4,3)
H - 4 β	2,14 – 2,23 m / 2,05 m	2,12 ddd (13,5; 4,3; <1) / 2,00 ddd (13,7; 4,5; <1)
H - 4a	3,68 dd (13,2; 5) / 3,34 – 3,40 m	3,56 dd (13,5; 4,3) / 3,20 m
H - 6 α	--- / 5,09 s	--- / 5,02 s
H - 6 β	5,80 s / ---	5,69 s / ---
H - 7	6,97 s / 6,81 s	6,94 s / 6,79 s
H - 10	6,80 s / 6,77 s	6,70 s / 6,73 s
H – 11endo	3,93 – 3,97 m	3,92 m
H – 12endo	4,25 dd (14,2; 6,8) / 3,64 m	4,20 dd (14,1; 6,9) / 3,30 m
H – 12exo	3,02 dd (14,2; 1,9) / 3,26 dd (14,2; 2,9)	2,96 dd (14,1; 2,7) / 3,20 m
OCH ₂ O	5,93 s / 5,91 s	5,83 d (1,3) / 5,86 d (1,3)
OMe	3,38 s / 3,35 s	3,32 s / 3,28 s

Estes alcaloides foram isolados em mistura por diversos pesquisadores da área de produtos naturais a partir espécies de planta da família Amaryllidaceae (HERRERA *et al*, 2001^a; HERRERA *et al*, 2001^b; HOHMANN *et al*, 2002; DE ANDRADE *et al*, 2012; LEE *et al*, 2014^a). Segundo dados da literatura, estes compostos apresentam atividade antiproliferativa (HOHMANN *et al*, 2002; JIN, Z, 2013; HAVELEK *et al*, 2014; HE *et al*, 2015) e atividade antiparasitária contra

Trypanosoma brucei rhodesiense e *Trypanosoma cruzi* (HERRERA *et al*, 2001^a; HERRERA *et al*, 2001^b) e contra *Plasmodium falciparum* (HERRERA *et al*, 2001^b).

4.3.18 Composto 11

Foram isolados 14 mg do composto **11**, a partir do fracionamento cromatográfico do caule e das folhas de *W. procera*. Sendo analisado pela técnica de RMN de ¹H.

A partir do espectro obtido (Figura 93 e 94), em comparação com dados da literatura, foi atribuído que o composto **11**, era o alcaloide trisfaeridina (C₁₄H₉NO₂) (SUAAU *et al*, 1990).

A trisfaeridina apresenta sinais característicos em seu espectro de RMN de ¹H, que incluem (Figura 93): um sinal do grupamento metilnodióxifenila, que integra para dois hidrogênios, em 6,17 ppm; seis sinais na região dos hidrogênios aromáticos e um sinal, em 9,10 ppm, como um singleto, integrando para um hidrogênio, atribuído ao hidrogênio da posição C-6. Aos hidrogênios singletos *para*-orientados, em 7,93 e 7,35 ppm, foram atribuídos às posições H-10 e H-7.

Nas ampliações ilustradas na figura 94, pode-se observar os sinais dos hidrogênios aromáticos, que apresentam constantes de acoplamento características de anel benzênico 1,2-dissubstituídos, como o sinal em 8,38 ppm, como um duplo dubleto, atribuído ao H-1, devido ao acoplamento *orto* com o H-2 ($J_{1,2}$ - 8,1) e ao acoplamento *meta* com o H-3 ($J_{1,3}$ - 1,5 Hz), e o sinal em 7,63 ppm, como um duplo duplo dubleto, corresponde ao H-2, devido ao acoplamento deste hidrogênio, com o H-1 ($J_{2,1}$ - 8,2 Hz), com o H-3 ($J_{2,3}$ - 7,0 Hz) e com o H-4 ($J_{2,4}$ - 1,4 ppm).

Trisfaeridina

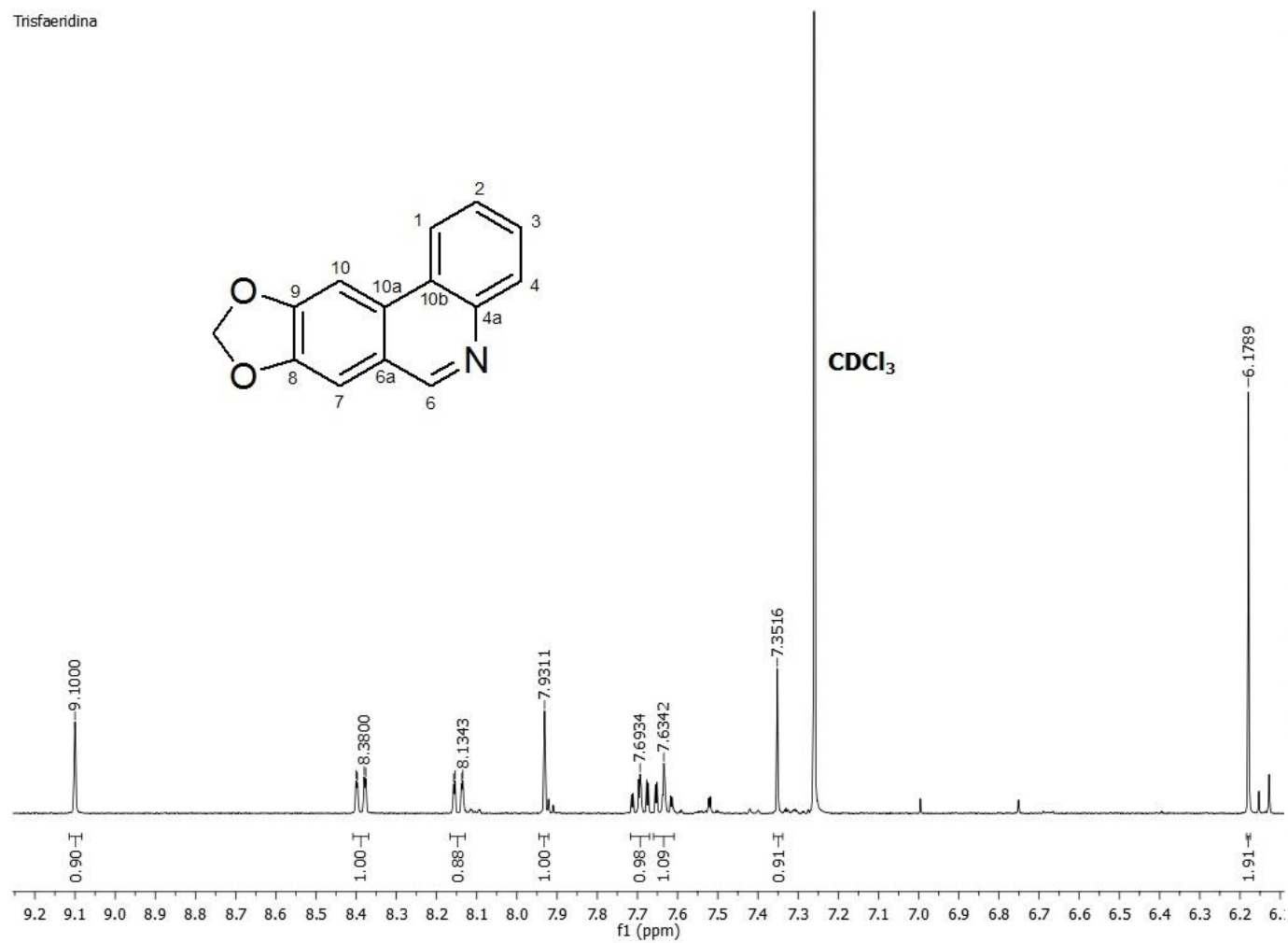


Figura 93 - Espectro de RMN de ¹H do composto 11 e sua estrutura (CDCl₃, 400 MHz).

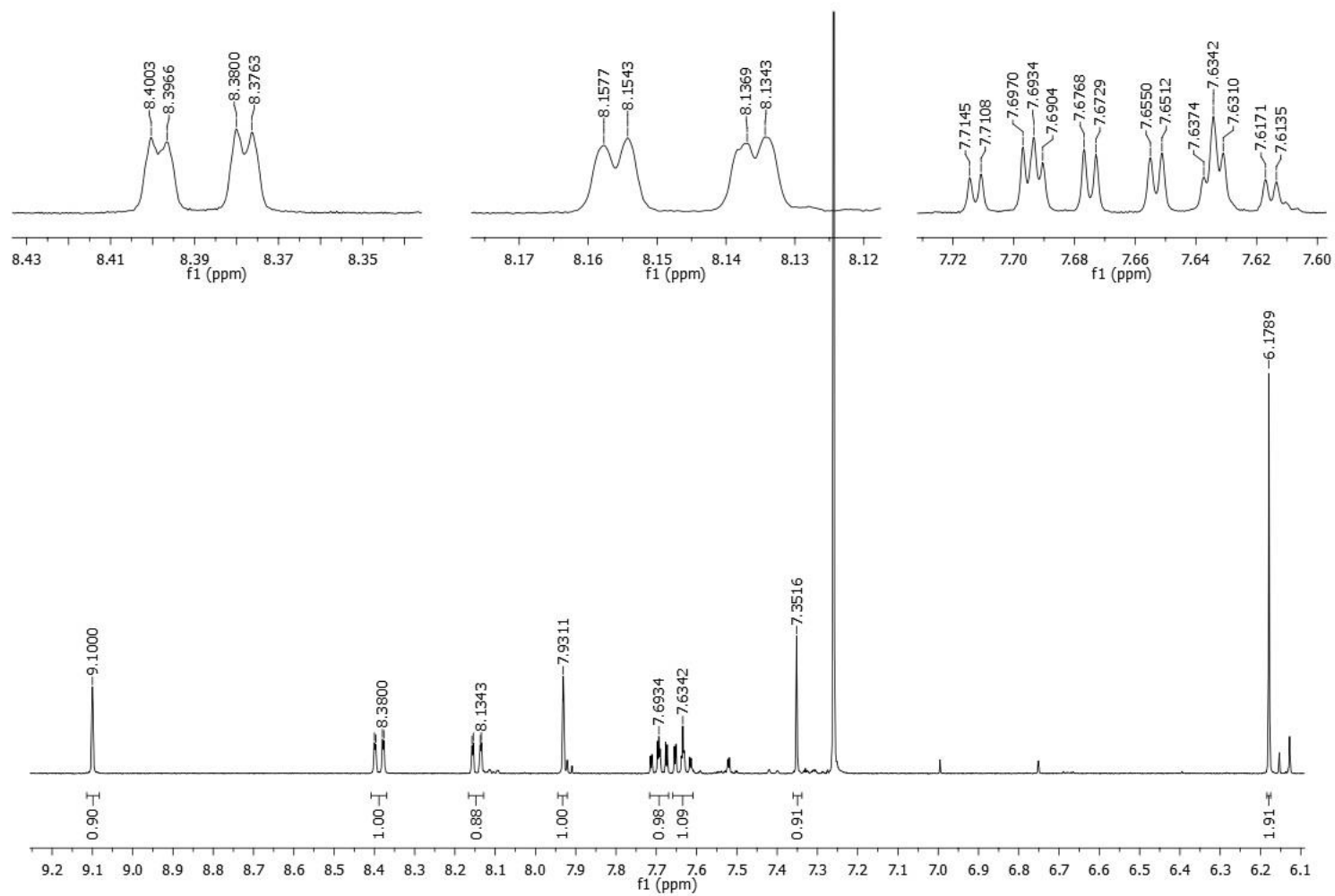


Figura 94 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto **11** (CDCl_3 , 400 MHz).

Os hidrogênios das posições H-3 e H-4, apresentaram as mesmas características dos hidrogênios H-1 e H-2. Sendo o sinal em 8,14 ppm, como um duplo dubleto, atribuído ao H-4 ($J_{4,3}$ - 8,2 Hz e $J_{4,2}$ - 1,2 Hz) e o sinal em 7,69 ppm, como um duplo duplo dubleto, atribuído ao hidrogênio da posição H-3 ($J_{3,4}$ - 8,2 Hz, $J_{3,2}$ - 7,0 Hz e $J_{3,1}$ -1,4 Hz).

Na tabela 23, pode-se verificar a comparação dos deslocamentos e multiplicidades observados no espectro de RMN de ^1H do composto **11**, em comparação com o alcaloide trisfaeridina, previamente publicado, confirmando a estrutura proposta (SUAU *et al*, 1990).

Tabela 23 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto **11**, e o alcaloide trisfaeridina.

Posição dos hidrogênios	δ experimental do alcaloide isolado (ppm) CDCl_3 , 400MHz	δ previamente publicado da TRISFAERIDINA (ppm) CDCl_3 , 200 MHz
H - 1	8,38 dd (8,1; 1,4)	8,36 dddd (8; 1,8; 1; 1)
H - 2	7,63 ddd (8,2; 6,9; 1,4)	7,61 ddd (8; 7; 1,7)
H - 3	7,69 ddd (8,2; 6,9; 1,4)	7,67 ddd (7; 7; 1,8)
H - 4	8,14 dd (8,1; 1,2)	8,11 ddd (7; 1,7; 1)
H - 6	9,10 s	9,06 s
H - 7	7,35 s	7,32 s
H - 10	7,93 s	7,89 s
OCH_2O	6,17 s	6,15 s

A trisfaeridina é um alcaloide comum na família Amaryllidaceae, encontrado em muitas espécies pertencentes a esta família (BRINE *et al*, 2002; CABEZA *et al*, 2003; HOHMANN *et al*, 2002; GIORDANI *et al*, 2011; DE ANDRADE *et al*, 2012; LEE *et al*, 2014^a). Estudos de atividade biológica com este alcaloide, comprovaram que apresenta citotoxicidade frente a linhagens de células tumorais (ZUPKÓ *et al*, 2009) e atividade antirretroviral (SZLÁVIK *et al*, 2004).

4.3.19 Composto 14

O composto **14** foi isolado a partir do caule e das folhas de *W. procera*, totalizando 16,9 mg, sendo posteriormente analisado pela técnica de RMN de ^1H (Figura 95 e 96).

O espectro de RMN deste composto apresentou algumas características importantes, como a presença do grupamento metilenodioxifenila, em 6,00 ppm; a presença de um sinal, como um singlete, em 2,75 ppm, integrando para três hidrogênios, característico do grupamento NMe.

Desta forma, ao comparar os deslocamentos e multiplicidades encontrados para o composto **14**, com dados da literatura, conclui-se que se tratava do alcaloide ismina ($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_3$) (SUAU *et al*, 1990).

Este composto, assim como o alcaloide trisfaeridina, apresenta dois hidrogênios singletos *p*-orientados, correspondendo aos hidrogênios H-7 e H-10, em 7,02 e 6,68 ppm, respectivamente. Além de, quatro hidrogênios característicos de anel benzênico 1,2-dissubstituídos, correspondendo ao hidrogênio da posição H-1, em 7,00 ppm, como um duplo dubleto ($J_{1,2} - 7,4$ Hz, $J_{1,3} - 1,6$ Hz), da posição H-2, em 6,83 ppm, como um duplo duplo dubleto ($J_{2,1} - 7,4$ Hz, $J_{2,3} - 7,4$ Hz e $J_{2,4} - 1,1$ Hz), da posição H-3, em 7,30 ppm, como um duplo duplo dubleto ($J_{3,4} - 8,1$, $J_{3,2} - 7,4$ e $J_{3,1} - 1,6$ Hz), e da posição H-4, em 6,74 ppm ($J_{4,3} - 8,2$, $J_{4,2} - 1,0$ Hz).

Ainda, pode-se observar a presença de dois sinais como dubletos, atribuídos aos hidrogênios da posição C-6, que apresentam uma constante de acoplamento entre si de magnitude de aproximadamente 12 Hz, como pode ser verificado na ampliação deste sinal, na figura 96.

Na tabela 24, estão representados todos os deslocamentos e multiplicidades dos hidrogênios obtidos do composto **14**, comparados aos deslocamentos do alcaloide ismina, previamente publicado (SUAU *et al*, 1990), onde pode-se observar que se trata do mesmo composto.

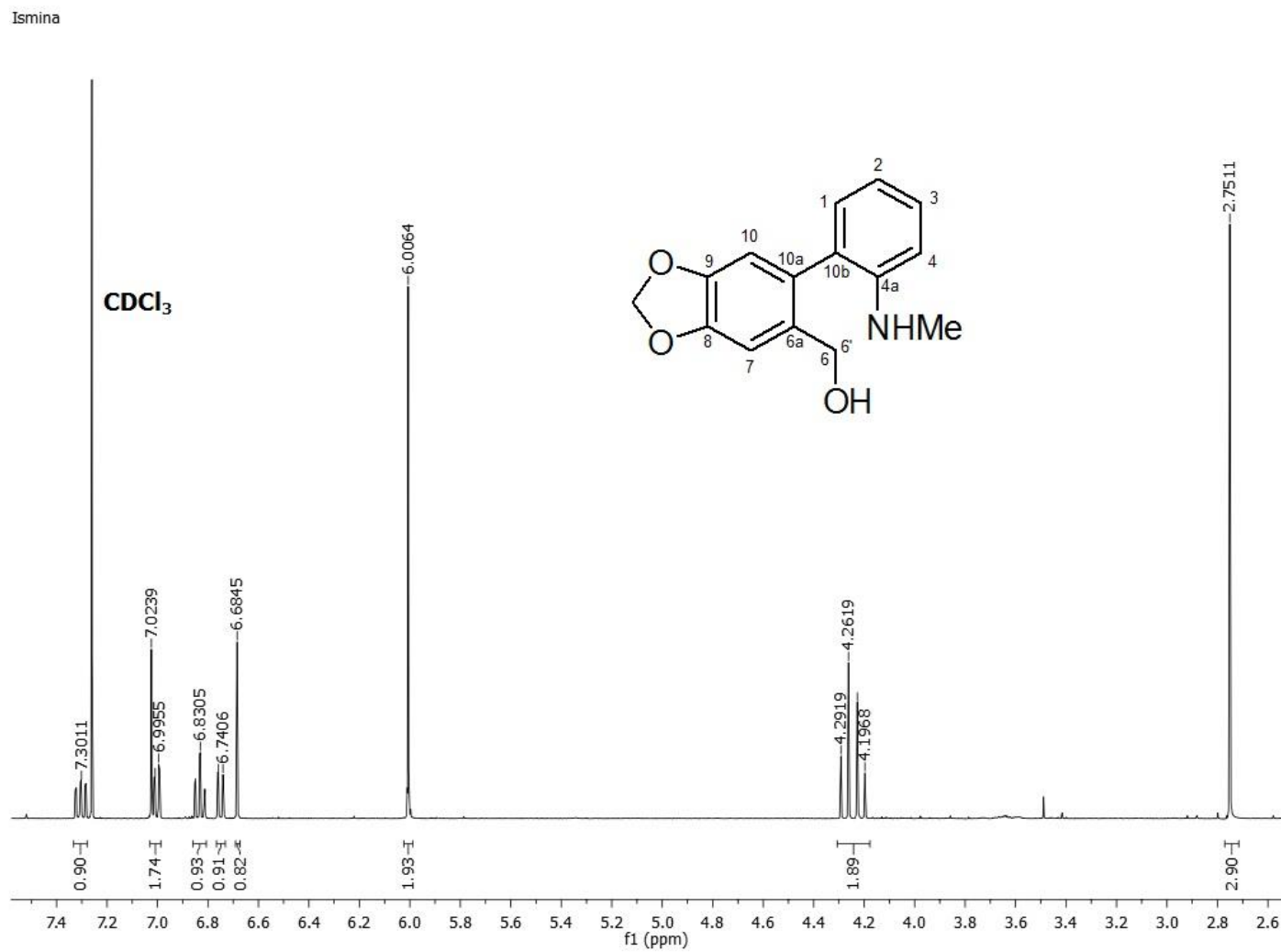


Figura 95 - Espectro de RMN de ^1H do composto **14** e sua estrutura (CDCl_3 , 400 MHz).

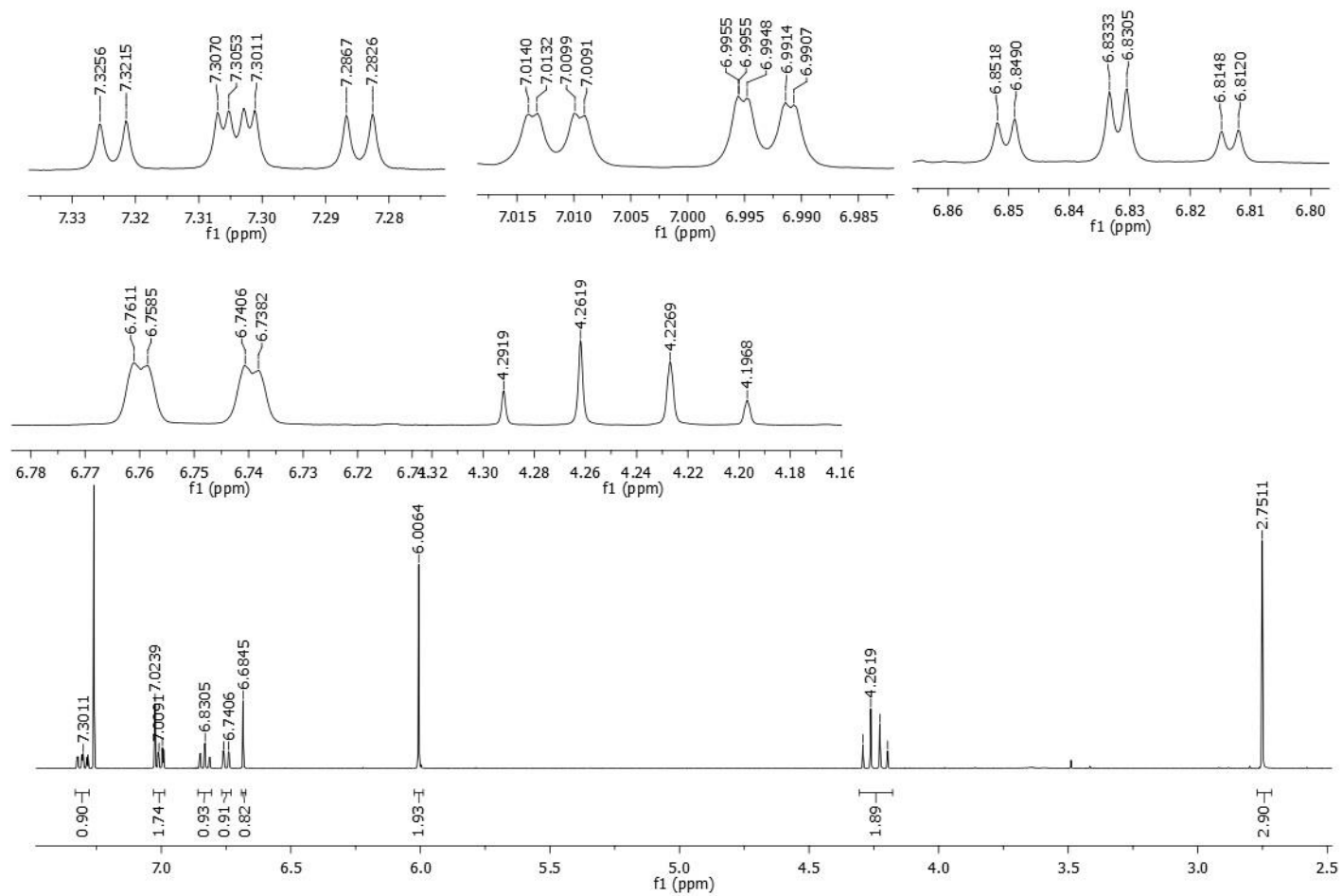


Figura 96 - Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto **14** (CDCl₃, 400 MHz).

Tabela 24 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto **14**, e o alcaloide ismina.

Posição dos hidrogênios	δ experimental do alcaloide isolado (ppm) CDCl_3 , 400MHz	δ previamente publicado da ISMINA (ppm) CDCl_3 , 200 MHz
H - 1	7,00 dd (7,3; 1,6)	6,98 dd (7,3; 1,7)
H - 2	6,83 ddd (7,4; 7,3; 1,1)	6,81 ddd (7,3; 7,3; 1,1)
H - 3	7,30 ddd (8,1; 7,4; 1,6)	7,28 ddd (8; 7,3; 1,7)
H - 4	6,74 dd (8,1; 1)	6,73 dd (8,1; 1,1)
H - 6	4,27 d (12)	4,26 d (12)
H - 6'	4,21 d (12)	4,20 d (12)
H - 7	7,02 s	7,00 s
H - 10	6,68 s	6,67 s
OCH ₂ O	6,00 s	5,99 s
NMe	2,75 s	2,73 s

Em estudos de biossínese do alcaloide ismina, demonstra que o mesmo, é derivado do acoplamento fenol oxidativo para-para' do precursor O-metilnorbellaína, sendo um produto de transformação da série crinano-haemantamina (Figura 97).

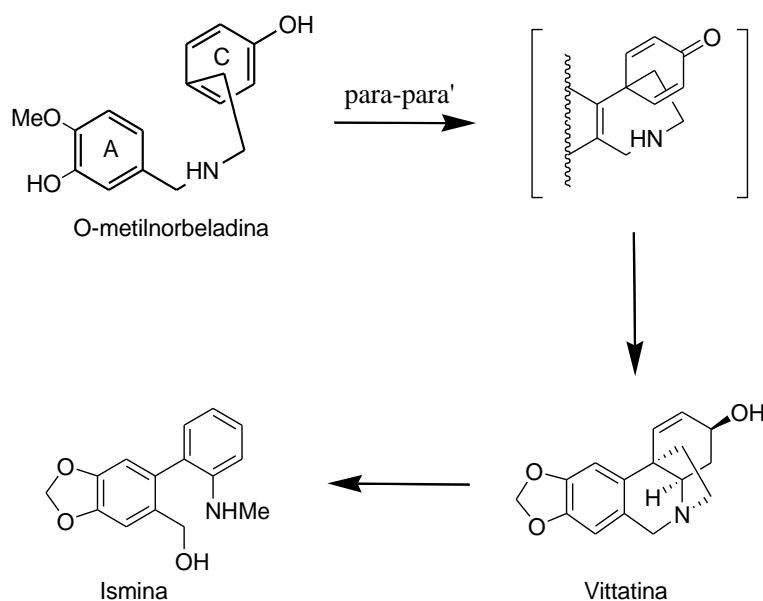


Figura 97 - Biosíntese resumida do alcaloide ismina.

O alcaloide ismina foi isolado a partir de muitas espécies de Amaryllidaceae (HOHMANN *et al*, 2002; CABEZA *et al*, 2003; BERKOV *et al*, 2007^b; BERKOV *et al*, 2009; DE ANDRADE *et al*, 2012; LEE *et al*, 2014^a). Estudos de atividade biológica para este composto demonstram que a ismina possui efeitos hipotensivos (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al*, 2000) e atividade inibidora da enzima AChE (LEE *et al*, 2014^a).

4.2.20 Composto 21

O composto **21** foi isolado a partir do fracionamento cromatográfico das folhas de *W. procera*, onde isolou-se 3,2 mg, sendo analisado pela técnica de RMN de ¹H, onde pode-se observar que o mesmo apresentava-se como uma mistura de isômeros (Figuras 98 e 99).

No espectro de RMN de ¹H deste composto, podem-se observar alguns sinais importantes do isômero em maior proporção, como: seis hidrogênios aromáticos, dois hidrogênios singletos *p*-orientados e quatro hidrogênios apresentando constantes de acoplamento características de anel benzênico 1,2-dissubstituído, e um grupamento metilenodioxifenila, em 5,99 ppm.

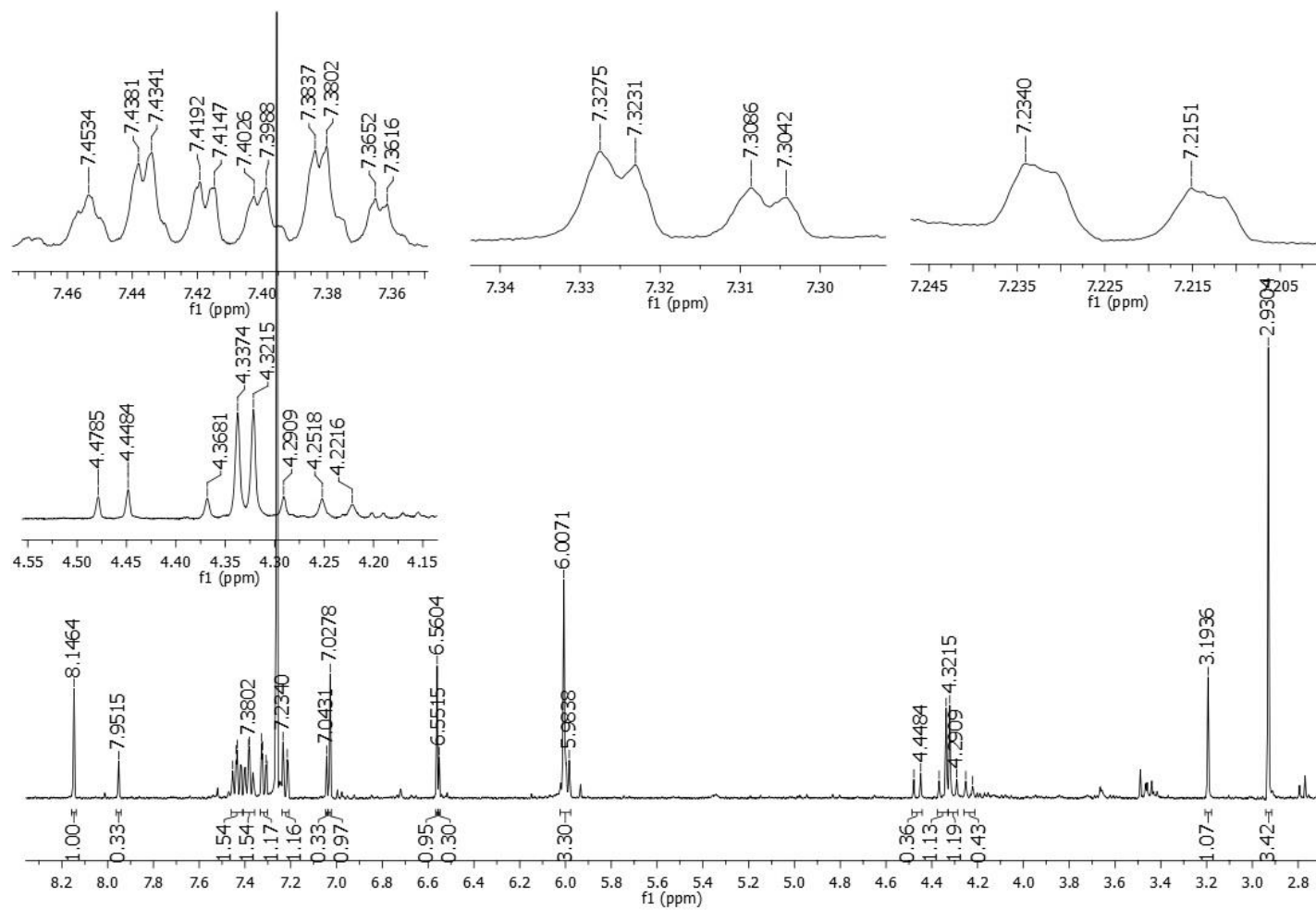


Figura 99 – Ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto **21** (CDCl_3 , 400 MHz).

Na região dos alifáticos, encontramos um sinal, integrando para três hidrogênios, característico do grupo NMe e dois sinais, como dubletos, caracterizando um grupo metileno isolado. Desta forma, foi sugerido que este composto era análogo da ismina, anteriormente mencionada, diferenciando pelo maior desblindamento do grupo NMe, em 2,93 ppm, em que na ismina está em 2,75 ppm, e por um sinal em 8,13 ppm, inexistente no alcaloide ismina.

Assim, ao comparar os deslocamentos desses isômeros, pode-se concluir que se tratava do alcaloide *N*-formilissima ($C_{16}H_{15}NO_4$) (ÜNVER *et al*, 2001), como demonstrado na tabela 25.

Tabela 25 - Deslocamentos dos hidrogênios em ppm (δ) do composto **21**, e do alcaloide *N*-formilissima, onde os deslocamentos da esquerda se referem ao isômero em maior proporção.

Posição dos hidrogênios	δ experimental do alcaloide isolado (ppm) $CDCl_3$, 400MHz	δ previamente publicado da <i>N</i> -FOLMILISMINA (ppm) $CDCl_3$, 200 MHz
CHO	8,14 s / 7,95 s	8,13 s / 7,94 s
H - 1	7,31 dd (7,5; 1,7)	7,31 dd (7,5; 1,5)
H - 2	7,38 td (7,4; 1,4)	7,37 td (7,5; 1,3)
H - 3	7,43 td (7,6; 1,8)	7,43 td (7,6; 1,6) / 7,44 td (7,6; 1,5)
H - 4	7,22 dd (7,6; 1,3) / 7,24 dd (6,6; 1,7)	7,21 dd (7,8; 1) / 7,24 dd (7,5; 1,5)
H - 7	7,02 s / 7,04 s	7,03 s
H - 10	6,56 s / 6,55 s	6,55 s
H - 6	4,35 d (12,2) / 4,46 d (12)	4,33 d (12,4) / 4,45 d (12,2)
H - 6'	4,30 d (12,2) / 4,23 d (12)	4,30 d (12,4) / 4,23 d (12,2)
OCH ₂ O	6,00 s / 5,98 s	5,99 s / 5,97 s
NMe	2,93 s / 3,19 s	2,92 s / 3,18 s

A *N*-formilissima foi isolada pela primeira vez, no ano de 2001, por ÜNVER e colaboradores, a partir da espécie *Galanthus plicatus* subsp. *byzantinus*

(Amaryllidaceae) e nenhum outro relato de isolamento e de atividade biológica deste composto, foi encontrado na literatura (ÜNVER *et al*, 2001).

4.4 Avaliação de atividade antimicrobiana

Nove alcaloides isolados a partir da espécie *W.Procera* [3-epimacronina (1), albomaculina (2), licorina (3), galatina (4), tazetina (5), hippeastrina (6), O-metillicorenina (7), 7-metoxi-O-metillicorenina (8) e 8-O-desmetilhomolicorina (10)] foram avaliados quanto a atividade antimicrobiana frente algumas bactérias bucais.

Na tabela 26 pode-se observar os valores de concentração inibitória mínima (CIM) a partir da concentração mais baixa dos alcaloides, capaz de inibir o crescimento de micro-organismos.

Todos os alcaloides testados apresentaram atividade muito fraca frente às bactérias testadas. Pode-se observar que a CIM dos alcaloides foram de 200 – 400 µg/mL, muito superior a CIM do controle positivo (clorexidina).

Tabela 26 – Resultado da atividade antimicrobiana dos alcaloides testados: 3-epimacronina (1), albomaculina (2), licorina (3), galatina (4), tazetina (5), hippeastrina (6), O-metillicorenina (7), 7-metoxi-O-metillicorenina (8) e 8-O-desmetilhomolicorina (10).

Microorganismos	1	2	3	4	5	6	7	8	10	Clorexidina
<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175)	>400	400	>400	>400	>400	400	400	>400	400	0,922
<i>Streptococcus mitis</i> (ATCC 49456)	400	400	400	400	400	400	400	200	400	3,688
<i>Streptococcus sobrinus</i> (ATCC 33478)	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	0,922
<i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC 10556)	400	400	>400	>400	400	400	400	200	400	0,922
<i>Streptococcus salivarius</i> (ATCC 25975)	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	400	>400	0,922
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 4082)	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	1,844
<i>Lactobacillus casei</i> (ATCC 11578)	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	0,922
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (ATCC 43717)	>400	>400	>400	>400	>400	400	>400	>400	400	0,460

* Concentrações expressas em µg/mL.

4.5 Resumo dos resultados

Como resultado do fracionamento cromatográfico das partes aéreas da espécie *Worsleya procera*, foram isolados 19 alcaloides e uma mistura dos alcaloides **18** e **19**:

- Licorina e galantina (alcaloides com esqueleto do tipo licorina);
- Tazetina, 3-epimacronina, 6-O-metilpretazetina e pretazetina (alcaloides com esqueleto do tipo tazetina);

- Homolicorina, albomaculina, hippeastrina, O-metillicorenina, 7-metoxi-O-metillicorenina, 8-O-desmetilhomolicorina, 8-O-desmetil-O-metillicorenina e 8-O-desmetil-2 α -hidroxihomolicorina (alcaloides com esqueleto do tipo homolicorina);

- Haemantamina, composto **17**, haemantidina e 6-epihaemantidina (alcaloides com esqueleto do tipo haemantamina);

- Trisfaeridina, ismina e N-fomilismina (considerados produtos de catabolismo do esqueleto crinano).

As estruturas desses alcaloides foram elucidadas através das técnicas de RMN de ^1H uno e bidimensional e de dicroísmo circular, em comparação com dados disponíveis na literatura.

A tabela 26 detalha as massas totais dos alcaloides obtidos a partir das partes aéreas da planta *W. procera*, onde pode-se observar que os alcaloides isolados em maior proporção foram os alcaloides licorina, albomaculina, 8-O-desmetilhomolicorina, galantina e tazetina, respectivamente. Sendo estes compostos pertencentes aos alcaloides com esqueleto do tipo licorina, homolicorina e tazetina.

Tabela 27 - Massas totais dos alcaloides obtidos a partir das partes aéreas da planta *W. procera*.

Composto	Alcaloide isolado	Massa obtida (mg)		
		Caule	Folha	Total
1	3-epimacronina	7,3	27,4	34,7
2	Albomaculina	71,3	45,7	117
3	Licorina	693,6	39,5	733,1
4	Galantina	46,5	33,3	79,8
5	Tazetina	16,8	41,1	57,9
6	Hippeastrina	12,2	1,1	13,3
7	O-metillicorenina	25,4	8,3	33,7
8	7-metóxi-O-metillicorenina	11,8	3,9	15,7
9	Homolicorina	9,0	4,3	13,3
10	8-O-desmetillicorenina	15,1	84,8	99,9
11	Trisfaeridina	4,7	6,1	14,0
12	Haemantamina	4,3	-	4,3
13	8-O-desmetil-O-metillicorenina	2,2	4,3	6,5
14	Ismina	6,9	10	16,9
15	6-O-metilpretazetina	2,7	-	2,7
16	Pretazetina	33,6	9,6	43,2
17	Tipo haemantamina	2,0	-	2,0
18	Haemantidina	-	3,1	3,1
19	6-epihaemantidina	-	-	-
20	8-O-desmetil-2 α -hidroxihomolicorina	-	1,1	1,1
21	N-formilismina	-	3,2	3,2

5. CONCLUSÕES

Este trabalho relata o primeiro estudo fitoquímico realizado com a espécie de planta *Worsleya procera* (Amaryllidaceae), onde pode-se observar o isolamento de diversos alcaloides isoquinolínicos, típicos desta família de plantas.

O alcaloide 8-O-desmetil-2 α -hidroxihomolicorina foi isolado pela primeira vez a partir de uma fonte natural e o alcaloide 8-O-desmetil-O-metillicorenina foi descrito somente em uma espécie representante da família Liliaceae, desta forma, este trabalho relata o isolamento deste composto pela primeira vez de uma espécie de planta da família Amaryllidaceae.

A técnica de CG-EM mostrou ser uma técnica rápida e eficiente de identificação de alcaloides, visto que, os resultados das análises dos extratos da planta *W.procera* verificaram que os alcaloides majoritários eram os alcaloides com esqueleto do tipo homolicorina, esqueleto do tipo licorina e esqueleto do tipo tazetina, coerente com as massas totais dos alcaloides isolados.

A análise de atividade antimicrobiana mostrou que os alcaloides testados apresentam atividade muito fraca frente as bactérias bucais utilizadas para a realização do teste.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, U.P.; DE MEDEIROS, P.M.; DE ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; NETO, E.M.F.L.; DE MELO, J.G. e DOS SANTOS, J.P. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v.114, p. 325-354, 2007.

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

AWAN, A. R., SHAW, W. M. e ELLIS, T. Biosynthesis of therapeutic natural products using synthetic biology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2016.

BALUNAS, M. J. e KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431– 441, 2005.

BARREIRO, E. J. e FRAGA, C. A. M. A utilização do safrol, principal componente químico do óleo de sassafráz, na síntese de substâncias bioativas na cascata do ácido araquidônico: antiinflamatórios, analgésicos e anti-trombóticos. **Química Nova**, v.2, n.5, p.744 – 759 1999.

BARTON, D.H.R. e COHEN, T. Some biogenetic aspects of phenol oxidation. **Festschrift Arthur Stoll**, p.117-143, 1957.

BASTIDA, J., LLABRÉS, J. M., VILADOMAT, F., CODINA, C., RUBIRALTA, M. e FELIZ, M. *Narcissus* alkaloids, III. 9-O-demethylhomolycorina from *om Narcissus confusus*. **Journal of Natural Products**, v.50, n.2, p.199-202, 1987^a.

BASTIDA, J., VILADOMAT, F., LLABRES, J. M., CODINA, C., FELIZ, M. e RUBIRALTA, M. Alkaloids from *Narcissus confusus*. **Phytochemistry**, v.26, n.5, p.1519-1524, 1987^b.

BASTIDA, J., VILADOMAT, F., LLABRÉS, J.M., RAMIREZ, G., CODINA, C., RUBIRALTA, M. *Narcissus* alkaloids, VIII. Mesembrenone: an unexpected alkaloid from *Narcissus pallidulus*. **Journal of Natural Products**, n.3, v.52, p.478-480, 1989.

BASTIDA, J., CODINA, C., VILADOMAT, F., RUBIRALTA, M., QUIRION, J-C. e HUSSON, H-F. 9-O-demethyl-2a-hydroxyhomolycorine, an alkaloid from *Narcissus tortifolius*. **Phytochemistry**, v.29, n.8, p.2683-2684, 1990^a.

BASTIDA, J.; CARLES CODINA, C.; VILADOMAT, F.; RUBIRALT, M.; QUIRION, J.; HUSSON, H. e MA, G. *Narcissus* alkaloids, XIII. Complete assignment of the NMR spectra of papyramine and 6-epi-papyramine by two-dimensional NMR spectroscopy. **Jornal of Natural Products**, v.53, n 6, p.1456-1462, 1990^b.

BASTIDA, J., CODINA, C., VILADOMAT, F., RUBIRALTA, M., QUIRION, J-C. e WENIGER, B. *Narcissus* alkaloids, XIV. (+)-8-o-acetylhomolycorine and vasconine, two novel alkaloids from *Narcissus vasconicus*. **Journal of Natural Products**, v.55, n.1, p.122-125, 1992.

BASTIDA, J., CONTRERAS, J. L., CODINA, C., WRIGHT, C. W., e J. PHILLIPSON, D. Alkaloids from *Narcissus cantabricus*. **Phytochemistry**, v.40, n.5, p.1549-1551, 1995.

BASTIDA, J.; RODOLFO LAVILLA, R. e VILADOMAT, F. Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. **The Alkaloids**, v. 63, c.3, p. 87-179, 2006.

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

BERKOV, S., REYES-CHILPA, R., CODINA, C., VILADOMAT, F. E BASTIDA, J. Revised NMR data for Incartine: an Alkaloid from *Galanthus elwesii*. **Molecules**, v.12, p.1430-1435, 2007^a.

BERKOV, S.; CODINA, C.; VILADOMAT, F. e BASTIDA, J. Alkaloids from *Galanthus nivalis*. **Phytochemistry**, v. 68, p.1791–1798, 2007^b.

BERKOV, S.; CUADRADO, M.; OSORIO, E.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. e BASTIDA, J. Three New Alkaloids from *Galanthus nivalis* and *Galanthus elwesii*. **Planta Med**, v. 75, p.1351–1355, 2009.

BERKOV, S., ROMANI, S., HERRERA, M., VILADOMAT, F., CODINA, C., MOMEKOV, G., IONKOVA, I e BASTIDA, J. Antiproliferative Alkaloids from *Crinum zeylanicum*. **Phytotherapy Research**, v.25, p.686-1692, 2011.

BOZKURT-SARIKAYA, B.; KAYA,G. I.; ONUR, M. A.; BASTIDA, J. S. e UNVER-SOMER, N. Phytochemical investigation of *Galanthus woronowii*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, p. 276–279, 2013.

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

BOZKURT-SARIKAYA, B.; KAYA,G. I.; ONUR, M. A.; BASTIDA, J. S. e UNVER-SOMER, N. Phytochemical investigation of *Galanthus woronowii*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, p. 276–279, 2013.

BRUNETON, J. Farmacognosia: Fitoquímica – Plantas Medicinales. 2. edição. Zaragoza: **ACRIBIA S. A.**, p. 1099, 2001.

CABEZAS, F. RAMÍREZ, A., VILADOMAT, F., CODINA, C. e BASTIDA, J. Alkaloids from *Eucharis amazonica* (Amaryllidaceae). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.51, n.3, p.315-317, 2003.

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

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

CHASE, M.W., REVEAL, J.L., FAY, M.F. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p.132-136, 2009.

CODINA, C.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; FERNANDEZ, J. M.; BERGONON, S.; RUBIRALTA, M e QUIRION, J. C. Alkaloids from *Narcissus munozii-garmendiae*. **Phytochemistry**, v.32, n. 5, p.1354- 1356, 1993.

CORRÊA, M. P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. **Rio de Janeiro: Imprensa Nacional**, v.4, 1984.

CORTES, N., ALVAREZ, R., OSORIO, E. H., ALZATE, F., BERKOV, S. e OSORIO, E. Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five Amaryllidaceae plants. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.102, p. 222–228, 2015.

DAHEGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T. e YEO, P. F. The families on the monocotyledons: structure, evolution, and taxonomy. **Berlin: Springer – Verlag**, p. 204-206, 1985.

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

DE ANDRADE, J. P.; PIGNI, N. B.; TORRAS-CLAVERIA, L.; BERKOV, S.; CODINA, C.; VILADOMAT, F. e BASTIDA, J. Bioactive alkaloid extracts from *Narcissus broussonetii*. Mass spectral studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.70, p. 13-25, 2012.

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

DE ANDRADE, J. P.; GIORDANI, R. B.; TORRAS-CLAVERIA, L.; PIGNI, N. B.; BERKOV, S.; FONT-BARDIA, M., CALVET, T.; KONRATH, E.; BUENO, K.; SACHETT, L. G.; DUTILH, J. H.; BORGES, W. S.; VILADOMAT, F.; HENRIQUES, A. T.; NAIR, J. J.; ZUANAZZI, J. A. S. e BASTIDA, J. The Brazilian Amaryllidaceae as a source of acetylcholinesterase inhibitory alkaloids. **Phytochemistry Reviews**, 2015.

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

DEMAIN, A. L. e FANG, A. The natural functions of secondary metabolites. History of Modern Biotechnology I. **Advances in Biochemical Engineering/Biotecnology**, v. 69, p. 1-39, 2000.

DUTILH, J. H. A. e OLIVEIRA, R. S. Amaryllidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB43>>. Acesso em: 23 de Outubro, 2014.

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

EMIR, A., EMIRA, C., BOZKURTA, B., ONURA, M. A., BASTIDA, J. e SOMERA, N. U. Alkaloids from *Galanthus fosteri*. **Phytochemistry Letters**, v.17, p.167–172, 2016.

EVIDENTE, A.; ANDOLFI, A.; ABOU-DONIA, A. H.; TOUEMA, S. M., B; HAMMODA, H. M.; SHAWKY, E. e MOTTA, A. (-) Amarbellisine, a lycorine-type

alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. **Phytochemistry**, v.65, p.2113–2118, 2004.

GHOSAL, S.; KUMAR, Y. e SINGH, S. Glucosyloxy alkaloids from *Pancratium biflorum*. **Phytochemistry**, v.23, n.5, p.1167-11711, 1984.

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

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

GIORDANI, R. B.; CELSO O. R.; JUNIOR, C. O. R.; DE ANDRADE, J. P.; BASTIDA, J.; ZUANAZZI, J. A. S.; TASCA, T. e DE ALMEIDA, M. V. Lycorine Derivatives Against *Trichomonas vaginalis*. **Chemical Biology & Drug Desing**, v. 80, p.129–133, 2012.

GUERRA, M. P. e NODARI, R. O. Biodiversidade: Aspectos biológicos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. e PETROVICK, P. R. Farmacognosia – da Planta do medicamento. 5ª Ed. Rev. e Ampli.; Porto Alegre, **Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / UFRGS**, cap.1, p.13-28, 2003.

GUERRIERI, C. G.; PIGNI, N. B.; DE ANDRADE, J. P.; DOS SANTOS, V. D.; BINNS, F.; BORGES, W. S.; VILADOMAT, F. e BASTIDA, J. Alkaloids from *Crinum erubescens* Aiton. **Arabian Journal of Chemistry**, p.1-6, 2016.

GUO, Y., DE ANDRADE, J. P., PIGNIA, N. B., TORRAS-CLAVERIAA, L., TALLINIA, L. R., BORGES, W. S., VILADOMATA, F., NAIRA, J. J., ZUANAZZID, J. A. S. e BASTIDA, J. New Alkaloids from *Hippeastrum papilio* (Ravenna) Van Scheepen. **Helvetica Chimica Acta**, v.99, p.143–147, 2016.

HAVELEK, R., SEIFRTOVA, M., KRALOVEC, K., BRUCKOVA, L., CAHLIKOVA, L., DALECKA, M., VAVROVA, J., REZACOVA, M., OPLETAL, L. e BILKOVA, Z. The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells. **Phytomedicine**, v.21, p.479-490, 2014.

HE, J., QI, W-B, WANG, L., TIAN, J., JIAO, P-R, LIU, G-Q., YE, W-C. e LIAO, M. Amaryllidaceae alkaloids inhibit nuclear-to-cytoplasmic export of ribonucleoprotein (RNP) complex of highly pathogenic avian influenza virus H5N1. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v.7, n.6, p.922–931, 2013.

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

HERRERA, M. R.; MACHOCHO, A. K.; BRUN, R.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. e BASTIDA, J. Crinane and Lycorane Type Alkaloids from *Zephyranthes citrina*. **Planta Medica**, v.67, p.191–193, 2001^a.

HERRERA, M. R., MACHOCHO, A. K., NAIR, J.J., CAMPBELL, W.E., BRUN, R., VILADOMAT, F., CODINA, C. e BASTIDA, J. Alkaloids from *Cyrtanthus elatus*. **Fitoterapia**, v.72, p.444-448, 2001^b.

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

HOHMANN, J. e FORGO, P. Leucovernine and Acetylleucovernine, alkaloids from *Leucojum vernum*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1588-1591, 2005.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROS, E. F. e VIEIRA, P. C. Princípios ativos de plantas superiores. São Carlos: **EduFSCar**, p. 152 (Série de texto da Escola de Verão em Química, Vol. IV), 2003.

HUTCHINGS, A.; SCOTT, A.H.; LEWIS, G. CUNNINGHAM, A. B. Zulu Medicinal Plants: an inventory. Pietermatitzburg: **University of Natal Press**, p.520, 1996.

IANNELLO, C.; PIGNI, N. B.; ANTOGNONI, F.; POLI, F.; MAXIA, A.; DE ANDRADE, J. P. e BASTIDA J. A potent acetylcholinesterase inhibitor from *Pancreaticum illyricum* L. **Fitoterapia**, v. 92, p.163–167, 2014.

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

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

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

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

KAYA, G. I.; SARIKAYA, B.; ONUR, M. A.; UNVER-SOMER, N.; VILADOMAT, F.; CODINA, C.; BASTIDA, J.; LAUINGER, I. L.; KAISER, M. e TASDEMIR, D. Antiprotozoal alkaloids from *Galanthus trojanus*. **Phytochemistry Letters**, v.4, p. 301–305, 2011.

KIHARA, M.; KOIKE, T.; IMAKURA, Y.; KIDA, K.; SHINGU, T. e SHIGERU KOBAYASHI. Alkaloidal Constituents of *Hymenocallis rotata* HERB. (Amaryllidaceae). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.35, n.3, p.1070-1075, 1987.

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

KULHÁNKOVÁ, A., CAHLÍKOVÁ, L., NOVÁK, Z., MACÁKOVÁ, K., KUNES, J. e OPLETAL, L. Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and Their Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase-Inhibitory Activity. **Chemistry & Biodiversity**, v.10, p.1120-1127, 2013.

LABRAÑA, J.; CHOY, G.; SOLANS, X.; FONT-BARDIA, M.; DE LA FUENTE, G.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. e BASTIDA, J. Alkaloids from *Narcissus bujei* (Amaryllidaceae). **Phytochemistry**, v.50, p.183-188, 1999.

LATVALA, A.; ONUR, M. A.; GOZLER, T.; LINDEN, A.; KIVÇAK, B. e HESSE, M. Nitrogen Inversion in 9-O-demethylhomolycorine. **Tetrahedron: asymmetry**, v.6, n.2, p.361-364, 1995.

LAMORAL-THEYS, D., DECAESTECKER, C., MATHIEU, V., DUBOIS, J., KORNIENKO, A., KISS, R., EVIDENTE, A. e POTTIER, L. Lycorine and its Derivatives for Anticancer Drug Design, **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.10, p.41-50, 2010.

LEE, J. Y., CHA, M-R., LEE, J. E., KIM, J., CHO, H., PARK, W. K., CHOI, S. U. e RYU, S. Y. A New Amaryllidaceae Alkaloid from the Bulbs of *Lycoris radiata*. **Bulletin Korean Chemical Society**, v.35, n.12, p.3665-3667, 2014^a.

LEE, D. G., LEE, A. Y., KIM, S. J., JUNG, Y-S., LEE, D. H., CHO, E. J. e LEE, S. Antibacterial Phytosterols and Alkaloids from *Lycoris radiata*. **Natural Product Sciences**, v.20, n.2, p.107-112, 2014^b.

LI, X., YU, H. Y., WANG, Z.Y., PI, H. F., ZHANG, P. e RUAN H. L. Neuroprotective compounds from the bulbs of *Lycoris radiata*. **Fitoterapia**, v.88, p.82–90, 2013.

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

LORENZI, H. e MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas. **Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA**, p.512, 2002.

LUCKNER, M. Secondary metabolism in microorganisms, Plants and Animals. **VEB G. Fischer Verlag**, Jena, 1990.

LUO, Z., WANG, F., ZHANG, J., LI, X., ZHANG, M., HAO, X., XUE, Y., LI, Y., HORGAN, F. D., YAO, G. e ZHANG, Y. Cytotoxic Alkaloids from the Whole Plants of *Zephyranthes candida*. **Journal of Natural Products**, v.75, p.2113-2120, 2012.

MACIEL, M. A. M., GOMES, F. E. S., PINTO, A. C., CÓLUS, I. M. S., MAGALHÃES, N. S. S., GRYNBERG, N. F. E ECHEVARRIA, A. Aspects of Natural Products on the Discovery of New Antitumoral and Antimutagenic Agents. **Revista Fitos**, v.3 n.01, 2007.

MANACH, C.; SEALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MARIENHAGEN, J e BOTT, M. Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products. **Journal of Biotechnology**, v.163, p.166– 178, 2013.

MARTINELLI, G. e MORAES, M. A. Conservação e manejo de *Worsleya rayneri* (J. D. Hooker) Traub & Moldenke – resultados preliminares de projeto para recuperação de uma espécie criticamente ameaçada. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl.1, p. 24-26, 2007.

MARTINELLI, G. e MORAES, M. A. (Orgs.) Livro Vermelho da flora do Brasil. In: DUTILH, J. H.; FERNANDEZ, E. P.; PENEDO, T. S. A.; MORAES, M. M. V e MESSINA, T. Amaryllidaceae. 1. ed – Rio de Janeiro: **Anchea Jakobsson**: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 135-136, 2013.

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

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

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

MORTON, J.F. Atlas of Medicinal Plants of Middle America. Bahamas to Yucatan. Illinois, EUA: **Thomas C.C. Publisher**, 1981.

NAIR, J.J., RAROVA, L., STRNAD, M., BASTIDA, J. e VAN STADEN, J. Apoptosis-inducing effects of distichamine and narciprimine, rare alkaloids of the plant family Amaryllidaceae. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.22, p.6195-6199, 2012.

NAIR, J. J., MACHOCHO, A. K., CAMPBELL, W. E., BRUN, R., VILADOMAT, F., CODINA, C. e BASTIDA, J. Alkaloids from *Crinum macowanii*. **Phytochemistry**, v.54, p.945-950, 2000.

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

NCCLS. The National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – 6ª edição. NCCLS document M07-A6. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2003.

NEWMAN, D. J. e CRAG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v.79, p.629-661, 2016.

OLIVEIRA, A. B.; LONGHI, J. G.; ANDRADE, C. A.; MIGUEL, O. G. e MIGUEL, M. D. A normatização dos Fitoterápicos no Brasil. **Visão Acadêmica**, v.7, n. 2, 2006.

OKPO, S. O. e ADEYEMI, O. O. Effects of *Crinum glaucum* aqueous extract on intestinal smooth muscle activity. **Phytotherapy Research**, v. 12, n. 6, p. 413-416, 1998.

ORTIZ, J. E.; PIGNI, N. B.; ANDUJAR, S. A.; ROITMAN, G.; SUVIRE, F. D.; ENRIZ,, R. D.; TAPIA, A.; BASTIDA, J. e FERESIN, G. E. Alkaloids from *Hippeastrum argentinum* and Their Cholinesterase-Inhibitory Activities: An in Vitro and in Silico Study. **Journal of Natural Products**, v. 79, p.1241–1248, 2016.

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

PABUÇÇUOĞLU, V., RICHOMME, P., GOZLER, T., KIVAÇAK, B., FREYER, A. J. E SHAMMA, M. Four new crinine-type alkaloids from *Sternbergza species*. **Journal of Natural Products**, v.52, n..4, p.785-791, 1989.

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

PATRIDGE E., GAREISS, P., KINCH M. S., e DENTON HOYER, D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, v.21, n.2, 2016.

PIGNI, N. B.; BERKOV, S.; ELAMRANI, A.; BENAÏSSA, M.; VILADOMAT, F.; CODINA, C e BASTIDA, J. Two New Alkaloids from *Narcissus serotinus* L. **Molecules**, v. 15, p.7083-7089, 2010.

PINTO, A.C. O Brasil dos Viajantes e dos Exploradores e a Química de Produtos Naturais Brasileira. **Química Nova**, v.18, n.6, p. 608-615, 1995.

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

PETTIT, G. R.; GADDAMIDI, V.; HERALD, D. L.; SINGH, S. B.; CRAGG, G. M. e SCHMIDT, J. M. Antineoplastic agents, 120. *Pancratium littorale*. **Journal of Natural Products**, v.49, n.6, p.995-1002, 1986.

RAZIK, A., ADLY, F., MOUSSAID, M., BERHAL, C., MOUSSAID, H., ELAMRANI, A., BELLAHCEN, T. O., BOURHIM, N., EDDINE, J. J., CARLES CODINA, C., BASTIDA, B. e LOTFI, M. Antimicrobial, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of the extract of a Moroccan endemic *Narcissus: Narcissus broussonetii*. **International Journal of Scientific Research in Science and Technology**, v.2, p.6-11, 2016.

RIOS, J. L. e RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal Ethnopharmacology**, v.100, n.1-2, p.80-84, 2005.

RENARD-NOZAKI, J., KIM, T., IMAKURA, Y., KIHARA, M. e KOBAYASHI, S. Effect of alkaloids isolated from amaryllidaceae on *herpes simplex vírus*. **Research in Virology**, v.140, p.115-128, 1989.

SARIKAYA, B. B.; KAYA, G. I.; ONUR, M. A.; BASTIDA, J. e UNVER-SOMER, N. Phytochemical investigation of *Galanthus woronowii*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, p. 276–279, 2013.

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

SEBBEN, C.; GIORDANI, R. B.; DE ANDRADE, J. P.; BERKOV, S.; OSORIO, E. J.; SOBRAL, M.; DE ALMEIDA, M. V.; HENRIQUES, A. T.; BASTIDA, J. e ZUANAZZI, J. S. Z. New lycosinine derivative from *Hippeastrum breviflorum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 353–355, 2015.

SHAWKY, E.; ABOU-DONIAA, A. H.; DARWISHA, F. A.; TOAIMAA, S. M.; TAKLAA, S. S.; PIGNIB, N. B. e BASTIDA, J. HPTLC and GC/MS Study of Amaryllidaceae Alkaloids of Two *Narcissus* Species. **Chemistry & biodiversity**, v. 12, p. 1184 – 1199, 2015.

SILVA, C.V., BORGES, F. M., VELOSO, E.S. Phytochemistry of some Brazilian plants with aphrodisiac activity. **Phytochemicals - A global perspective of their role in nutrition and health**, p, 307-326, 2012.

SUAU, R., Gomez, A. I., e RICO, R. Ismine and related alkaloids from *Lapiedra martinezii*. **Phytochemistry**, v.29. n.5, p.1110-1712, 1990.

SZLÁVIK, L., GYURIS, A., MINÁRAVITS, J., FORGO, P., MOLNÁR, J. e HOHMANN, J. Alkaloids from *Leucojum vernum* and Antiretroviral Activity of Amaryllidaceae Alkaloids. **Planta Medica**, v.70, p.871-873, 2004.

TORRAS-CLAVERIA, L.; BERKOV, S.; CODINA, C.; VILADOMAT, F. e BASTIDA, J. Metabolomic analysis of bioactive Amaryllidaceae alkaloids of ornamental varieties of *Narcissus* by GC–MS combined with k-meanscluster analysis. **Industrial Crops and Products**, v.56, p.211–222, 2014.

ÜNVER, N., NOYAN, S., GÖZLER, B., GÖZLER, T., WERNER, C. e HESSE, M. Four new amaryllidaceae alkaloids from *Galanthus gracilis* and *Galanthus plicatus* subsp. *byzantinus*. **Heterocycles**, v.55, n.4, 2001, p.641- 652, 2001.

VIEIRA, P. B., GIORDANI, R. G., DE CARLI, G. A., ZUANAZZI, J. A. S. e TASCA, T. Screening and Bioguided Fractionation of Amaryllidaceae Species with Anti-Trichomonas vaginalis Activity. **Planta Medica**, v.77, p.1054–1059, 2011.

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

THEIS, N. e LERDAU, M. The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites. **International Journal of Plant Sciences**, v. 164, p. 93-103, 2003.

VILADOMAT, F., BASTIDA, J., TRIBO, G., CODINA, C. e RUBIRALTA, M. Alkaloids from *Narcissus bicolor*. **Phytochemistry**, v.29, n.4, p.1307-1310, 1990.

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

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

WILDMAN, W.C. e BAILEY, D.T. Novel alkaloids containing the [2]benzopyrano[3,4-c]indole nucleus. **The Journal of Organic Chemistry**, v.33, p.3749-3753, 1968.

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

WILLIAMS, P., SORRIBAS, A., e HOWES, M. J. R. Natural products as a source of Alzheimer's drug leads. **Natural Products Reports**, v. 28, p. 48-77, 2011.

YUAN, H., MA, Q, LI YE, L. e PIAO, G. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. **Molecules**, v. 21, p. 559 – 576, 2016.

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

ZUPKÓ, I., RÉTHY, B., HOHMANN, J., MOLNÁR. J., OCSOVSZKI, I. e FALKAY, G. Antitumor Activity of Alkaloids Derived from Amaryllidaceae Species. **In vivo**, v.23, p.41-48, 2009.