

AMANDA GOMES TORRES

**MONITORAMENTO SAZONAL DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA ESPÉCIE
HIPPEASTRUM GOIANUM (RAVENNA) MEEROW E SUA INFLUÊNCIA NA
ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE**

Brasília, 2019

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AMANDA GOMES TORRES

**MONITORAMENTO SAZONAL DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA ESPÉCIE
HIPPEASTRUM GOIANUM (RAVENNA) MEEROW E SUA INFLUÊNCIA NA
ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE**

Dissertação de Mestrado apresentada
como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dâmaris Silveira
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Kicia Karinne Pereira Gomes Copeland

Brasília
2019

AMANDA GOMES TORRES

**MONITORAMENTO SAZONAL DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA ESPÉCIE
HIPPEASTRUM GOIANUM (RAVENNA) MEEROW E SUA INFLUÊNCIA NA
ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em ____ de _____ de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Dâmaris Silveira (presidente)
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Dr.^a. Izulmé Rita Imaculada Santos
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Prof.^a Dr.^a Yris Maria Fonseca-Bazzo
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Prof. Dr Christopher William Fagg (suplente)
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir vivenciar está incrível experiência.

À minha família, em especial minha mãe, Consolação Torres, pelo exemplo de perseverança e amor incondicional, aos meus irmãos Matheus Gandra e Lucas Gandra, bem como minha tia, Fátima Torres, pelo suporte e conselhos que juntos, formaram minha base de motivação e superação.

Aos meus amigos Joaci Alves e Filipe França, pelo apoio e amizade oferecidos desde minha chegada à Brasília.

À minha Orientadora Dr^a. Dâmaris Silveira, por me proporcionar está oportunidade e confiar no meu potencial. Obrigado por me permitir fazer parte dos “Silveiras”.

À minha querida Coorientadora Dr^a. Kicia Karinne Pereira Gomes Copeland, que foi quase uma segunda mãe para mim. Me ajudou e me ensinou com toda dedicação e paciência.

Ao professor Jaume Batisda pela contribuição nas análises de minhas amostras.

Ao professor Christopher William Fagg pela coleta e identificação do material vegetal utilizado neste trabalho.

Às alunas de estágio Thalita Silva e Júlia Machado, bem como a Marcela Oliveira, aluna de TCC, por toda ajuda nos experimentos e lavagem das vidrarias, em especial os infinitos tubos de ensaio.

Aos meus colegas de Pós-Graduação, João Gomes, Manuel Mera, Cristian Gasca e Diegue Martins pela troca de experiência e ensinamentos.

Aos demais alunos dos laboratórios de Produtos Naturais e Controle de Qualidade pelos momentos de descontração.

Às técnicas de laboratório, Patrícia Rodrigues e Júlia Müller, que contribuíram direta e indiretamente para esta conquista.

Aos meus amigos da graduação, onde mesmo distantes permanecemos unidos através dos “Los chicos y las índias” (grupo de whatsapp), obrigada pelo incentivo e amizade sincera oferecida.

A CAPES, FAP-DF e CNPq pelo suporte financeiro.

“Julgue seu sucesso pelas coisas que você teve que renunciar para conseguir”
(Dalai Lama)

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.
(Simone de Beauvoir)

RESUMO

TORRES, AMANDA. **Monitoramento sazonal da composição química de *Hippeastrum goianum* (Ravenna) Meerow e sua influência na atividade de inibição da acetilcolinesterase.** Brasília, 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

Hippeastrum goianum (Amaryllidaceae) é uma espécie endêmica do Cerrado, que apresenta alcaloides de interesse farmacológico. Contudo, a concentração de alcaloides pode ser afetada por fatores ambientais e pelo tipo de tecido vegetal no qual esses compostos são encontrados. Portanto, foi avaliada a influência da sazonalidade no perfil de alcaloides e na atividade biológica de folhas e bulbos de *H. goianum*. O material vegetal foi coletado em três períodos (outubro/2017, fevereiro/2018 e maio/2018). Um perfil químico de extratos etanólicos brutos e frações acetato de etila foi obtido por CG-EM. Os extratos brutos, frações acetato de etila e aquosas foram avaliados quanto à atividade de inibição *in vitro* da acetilcolinesterase (AChE). Os dados obtidos por CG-EM foram explorados por análise multivariada (HCA e ACP). Os dados sobre a porcentagem de inibição da AChE foram analisados por análise de variância (ANAVA). A análise por CG-EM mostrou a presença de onze diferentes alcaloides, sendo licorina o alcaloide majoritário tanto em bulbos quanto em folhas. Cherilina e norlicoramina, estão descritos pela primeira vez para o gênero *Hippeastrum*. Todos os demais alcaloides identificados no perfil químico, exceto licorina, estão descritos pela primeira vez para *H. goianum*. A amostra coletada em fevereiro/2018 apresentou a maior variabilidade de alcaloides, enquanto que aquela coletada em outubro/2017 apresentou a menor variação de compostos alcaloídicos. Entretanto, a análise multivariada sugeriu que, em relação ao perfil químico, o tipo de extrato e parte da planta exerceram maior influência do que o período de coleta. A ANAVA mostrou diferenças estatísticas em relação a sazonalidade e tipo de extrato para a atividade de inibição da AChE, onde fevereiro/2018 foi considerado o melhor período para coleta de folhas, visando a utilização desse material vegetal para atividade biológica uma vez que durante esse período as folhas apresentaram a maior atividade de inibição enzimática enquanto que para os bulbos, o período de maio/2018 mostrou a melhor porcentagem de inibição. Outra observação interessante refere-se ao fato de que tanto folhas quanto bulbos de *H. goianum* podem ser fontes de alcaloides de interesse farmacológico, principalmente licorina. Dessa forma, a utilização de folhas contribuem para a preservação da espécie, pois a coleta das mesmas mantém a planta viva.

Palavras-chave: Amaryllidaceae; *Hippeastrum*; alcaloides; Cerrado

ABSTRACT

TORRES, AMANDA. **Seasonal monitoring of the chemical composition of the species *Hippeastrum goianum* (Ravenna) Meerow and its influence on inhibition activity of acetilcolinesterase.** Brasília, 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

Hippeastrum goianum (Amaryllidaceae) is an endemic species from Cerrado, with alkaloids presenting pharmacological activity. The concentration of alkaloids can be affected by environmental factors and the type of plant tissue; therefore, the influence of seasonality on the alkaloid profile and biological activity of *H. goianum* leaves and bulbs was evaluated. The plant material was collected in three periods (October/2017, February/2018 and May/2018). Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) was used to obtain the chemical profile of crude ethanol extracts and ethyl acetate fractions. The crude extracts, as well as the ethyl acetate and aqueous fractions, were evaluated for *in vitro* inhibition of acetylcholinesterase (AChE). The obtained GC-MS were explored by multivariate analysis (HCA and PCA). Variance analysis (ANOVA) was used for inhibition of AChE results. The GC-MS analysis showed eight different alkaloids, and the major component was lycorine. Among them, cheryline and norlicoramine, are described, in the first time, for the genus *Hippeastrum*. With exception of lycorine, all other identified alkaloids are described for the first time for *H. goianum*. February/2018 presented the highest variability of alkaloids, while October/2017 showed the smallest variation of alkaloid compounds. However, multivariate analysis suggested that concerning the chemical profile, the type of extract, and the part of the plant exerted more influence than the collection period. The ANOVA showed statistical differences in seasonality and extract type for AChE inhibition activity. Concerning AChE activity, February/2018 was considered the best period for leaves collection, and May/2018 was the best period for bulbs. Another interesting find refers to the fact that leaves and bulbs present alkaloids. Therefore, the use of leaves instead of bulbs, for alkaloid extraction purpose, can contribute to the preservation of this species.

Keywords: Amaryllidaceae; *Hippeastrum*; alkaloids; Cerrado

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1. Alguns alcaloides de origem natural utilizados na terapêutica (ZANCA, 2015). ... 17
- Quadro 2. Alcaloides identificados em espécies do gênero *Hippeastrum*. 22

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Diversidade de fatores que influenciam na produção de metabólitos secundários (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). 15
- Figura 2. *Hippeastrum goianum*. À esquerda, material já coletado. À direita, espécie de estudo no local da coleta. 26
- Figura 3. Etapas de obtenção de extratos e frações de folhas e bulbos de *Hippeastrum goianum*. 30
- Figura 4. Dados referentes à média mensal do índice pluviométrico (mm), radiação global (MJ/m²-d), temperatura máxima (°C), temperatura mínima (°C), umidade relativa máxima (%) e umidade relativa mínima (%), obtidos entre os períodos da primeira e última coleta. 36
- Figura 5. Comparação entre os períodos de coletas (outubro/2017, fevereiro/2018 e maio/2018) em relação as médias mensais dos dados climatológicos. ns (não significativo)..... 37
- Figura 6. Dendrograma bidimensional representando a similaridade entre as amostras obtidas em diferentes períodos para os compostos identificados e rendimento... 45
- Figura 7. Distribuição dos alcaloides identificados em *H. goianum* em relação aos dois principais componentes por meio da análise de componentes principais (ACP)..... 46
- Figura 8. Curva dose-resposta da galantamina e fisostigmina usados na atividade de inibição da AChE e seus respectivos PI. 49

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Rendimentos e teores de umidade das amostras obtidas a partir de folhas e bulbos de *Hippeastrum goianum*. 39
- Tabela 2. Alcaloides identificados nas partes aéreas de espécies de *Hippeastrum goianum* por CG/EM. Os valores estão expressos como porcentagem relativa do total de íons corrente (% TIC). 39
- Tabela 3. Coeficientes de correlação para os alcaloides identificados (C01 a C11) e rendimento dos extratos e frações obtidos em diferentes coletas de folhas e bulbos do *H. goianum*. 47
- Tabela 4. Porcentagem de inibição dos extratos e frações (EEtOH/FAcOEt/FA), em função da parte da planta (folha e bulbo) e época de coleta. 51

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

- AChE** - Enzima acetilcolinesterase
- ACP** - Análise de Componentes Principais
- ATCh** - Acetiltiocolina
- ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CG\EM** - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
- CI₅₀** - Concentração para inibição de 50% da atividade enzimática máxima
- COFID** - Coordenação de Medicamentos Fitoterápicos e Dinamizados
- DA** - Doença de Alzheimer
- DTNB** - Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico
- EE** - Extrato etanólico
- EH** - Extrato hexânico
- EM** - Espectrometria de massas
- FA** - Fração aquosa
- FAE** - Fração acetato de etila
- HCA** - Análise de Agrupamento Hierárquico
- IE** - Ionização de elétrons
- IR** - Índice de retenção
- LA** - Lavado ácido
- MCTIC** - Ministério da Ciência, Tecnologia, Informação e Comunicações
- MeOH** - Metanol
- MMA** - Ministério do Meio Ambiente
- NMDA** - N-metil-D-aspartato
- PBS** - Tampão salina fosfato
- Ph** - Potencial Hidrogeniônico
- PI** - Porcentagem de Inibição
- RNM** - Ressonância Magnética Nuclear
- SNC** - Sistema Nervoso Central
- UnB** - Universidade de Brasília
- UK** - Composto desconhecido
- UV** - Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 ESTUDO DA SAZONALIDADE	15
1.2 ALGUNS ALCALOIDES DE ORIGEM VEGETAL UTILIZADOS NA TERAPÊUTICA	16
1.3 ACETILCOLINESTERASE E A DOENÇA DE ALZHEIMER	17
1.4 FAMÍLIA AMARYLLIDACEAE E SEUS ALCALOIDES	19
1.4.1 Gênero <i>Hippeastrum</i>	20
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL.....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 MATERIAL VEGETAL	29
3.1.1 Secagem do material.....	29
3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES	29
3.3 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTOMETRIA DE MASSAS (CG/EM).....	31
3.3.1 Identificação dos alcaloides por CG/EM.....	31
3.4 ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE.....	32
3.5 DADOS CLIMATOLÓGICOS	33
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 DADOS CLIMATOLÓGICOS.....	35
4.2 RENDIMENTO.....	38
4.3 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTOMETRIA DE MASSAS (CG/EM).....	38
4.3.1 Identificação dos alcaloides	38
4.3.2 Análise multivariada do perfil químico.....	44
4.4 ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE.....	49
5 CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

A flora brasileira, que abriga cerca de 19% da flora mundial, é conhecida por ser uma das mais ricas do planeta (BENINI et al., 2011). O território brasileiro possui cerca de 46 mil espécies vegetais, sendo considerado o detentor da maior diversidade biológica do mundo. Entretanto, isso representa apenas uma pequena fração de toda a sua biodiversidade, estimada em cerca de 1,8 milhões de espécies (SOUSA et al., 2018).

A biodiversidade depende de fatores como clima, solo e características de cada ecossistema, também chamado de bioma, onde seus limites e delimitações são estabelecidos pelo clímax da vegetação de cada região. Os principais biomas brasileiros são: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Pantanal, Mata Atlântica e o Pampa, também conhecido como Campos do Sul (SANTOS et al., 2009).

A região biogeográfica do Cerrado ocupa grande parte da área central do Brasil, com cerca de 200 milhões de hectares distribuídos principalmente na região do Centro-Oeste (VIOLANTE et al., 2009; BOTTEGA et al., 2013). Este bioma, é berço das nascentes de rios sul-americanos, como Araguaia, São Francisco, Tapajós e Paraguai. Entretanto, apesar desta relevância, o Cerrado já perdeu quase metade de sua paisagem original (SANTOS, 2010). Dados do Ministério do Meio Ambiente (MMA) e da Ciência, Tecnologia, Informação e Comunicações (MCTIC) mostraram que apesar do desmatamento na região do Cerrado ter diminuído em 11%, nos períodos entre 2017 e 2018, o total da área desmatada correspondeu a 51% (BRASIL, 2018).

Considerado a savana mais rica do mundo, o Cerrado é conhecido por apresentar elevado grau de endemismo da fauna e da flora (LENZA et al., 2011). É composto por solos enriquecidos em alumínio, bastante ácidos e com baixo teor de substâncias nutritivas, suportando, portanto, uma vegetação característica de pastagem, savana, pântanos, florestas, dentre outras (SOUZA et al., 2016). Ainda, o solo do Cerrado pode ser caracterizado como profundo, com baixa fertilidade e elevada acidez, devido ao aparecimento de sílica. Seu escoamento é perene e os cursos d'água não são constantes (BASTOS e FERREIRA, 2010). A fitofisionomia da vegetação compreende campos com arbustos, árvores pequenas e florestas fechadas, com árvores de até 13 metros de altura (SILVA PINHEIRO e DURIGAN, 2012). A elevada heterogeneidade ambiental contribui para que as espécies de origem vegetal deste bioma estejam entre as mais diversificadas de todo o Brasil, sendo intercaladas por florestas e campos (PEREIRA et al., 2011).

As espécies vegetais do Cerrado respondem de forma distinta ao regime de queimadas. A literatura sugere que em áreas com alta frequência e intensidade de fogo, os modelos de vida menores, como as ervas por exemplo, são favorecidos em detrimento das formas de vida maiores, a exemplo das árvores. Isso ocorre devido ao sincronismo de floração em relação ao fogo e uma melhor exploração dos nutrientes deixados pelo consumo da biomassa na superfície do solo, gerando uma transferência indireta de energia das espécies arbóreas e arbustivas para os subarbustos e gramíneas (GIROLDO, 2017).

Dentre as espécies de origem vegetal, aproximadamente 7.000 são nativas, com crescente interesse etnobotânico, farmacêutico e biológico, pertencentes a diversas famílias, como Amaranthaceae, Anacardiaceae, Amaryllidaceae, Bignoniaceae, Bromeliaceae, Cactaceae, Erythroxylaceae, Fabaceae, Rubiaceae, Myrtaceae, Tiliaceae, dentre outras (PASA e NETO, 2009; OLIVEIRA et al., 2010).

Essas plantas produzem diversas substâncias e, os compostos que apresentam o maior interesse químico são produzidos pelo metabolismo secundário, ainda que produzidos em menor quantidade, se comparados aos compostos provenientes do metabolismo primário. Essas moléculas são peculiares para cada espécie, fazendo com que sejam produzidas por diversas rotas metabólicas e apresentem atividades biológicas importantes no processo de adaptação ou preservação da espécie vegetal (ZANCA, 2015).

Contudo, várias espécies vegetais encontradas no Cerrado, que possuem compostos oriundos do metabolismo secundário com grande interesse farmacológico e biológico, estão ameaçadas de extinção. Conforme apontaram dados da Fundação Biodiversitas, algumas plantas das famílias Fabaceae e Amaryllidaceae sofrem o risco de desaparecerem do Cerrado (BIODIVERSITAS, 2006). Assim é imperativo buscar mecanismos que contribuam para a preservação das espécies do Cerrado.

O monitoramento da sazonalidade pode constituir uma alternativa viável para auxiliar no processo de preservação da biodiversidade e, ao mesmo tempo, explorar a potencialidade de compostos de interesse, uma vez que a quantidade e o tipo de metabólitos secundários não permanecem constantes no decorrer do ano. Dessa forma, monitorar o período de coleta da planta é um fator de extrema importância para permitir conhecer qual a época em que determinada parte da planta produzirá uma maior quantidade dos compostos de interesse (MORAIS, 2015).

1.1 ESTUDO DA SAZONALIDADE

A síntese dos compostos secundários está associada a fatores ambientais e intrínsecos das plantas, os quais podem atuar de forma isolada ou em conjunto (FERNANDES, 2017). A compreensão dessas variáveis fisiológicas permite o entendimento de como as espécies vegetais se estabelecem em um determinado ambiente, externando fenótipos, possibilitando-lhes sua estadia e, portanto, o seu desenvolvimento (TROVÃO et al., 2007).

As concentrações de metabólitos especiais nas plantas são heterogêneas, modificando com vários fatores bióticos e abióticos, como por exemplo: sazonalidade, temperatura, radiação UV, índice pluviométrico, dentre diversos outros (GOBBO-NETO e LOPES, 2007), como esquematizado na Figura 1.

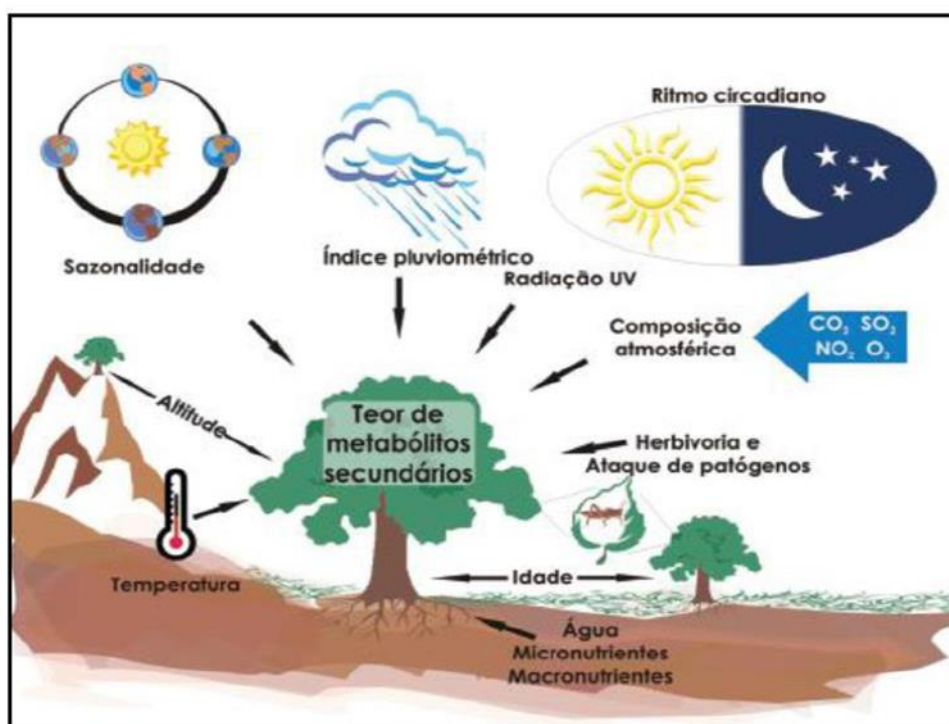


Figura 1. Diversidade de fatores que podem influenciar na produção de metabólitos secundários (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

As modificações temporais e espaciais, bem como as proporções referentes aos metabólitos secundários - também chamados de metabólitos especiais - nas espécies vegetais ocorrem em níveis distintos (circadiana; intraplanta, interplantas, sazonais e interespecíes) onde a presença de um domínio genético, como o genótipo e a expressão gênica, pode sofrer

variações resultantes da influência de processos ecológicos, bioquímicos e fisiológicos (AMARAL, 2008).

A sazonalidade, portanto, refere-se a mudanças climáticas de um ambiente delimitado, induzindo as plantas a se ajustarem conforme o período variante. Pode ocorrer um adiantamento do final de uma fase, ou adiamento do começo de outra fase, por exemplo, quebra de dormência de sementes. Desta maneira, a sazonalidade é uma variação fisionômica da população vegetal (COELHO, 2013).

As distintas estações que ocorrem durante o ano são devidas à inclinação da Terra em relação ao Sol e se caracterizam por fatores climáticos, como radiação solar, temperatura, luminosidade, índice pluviométrico e duração dos dias (SOLETTI, 2015). Dessa maneira, o fator sazonal expõe as plantas a mudanças constantes, onde as mesmas são forçadas a se adequarem fisiologicamente a estas condições (MAGALHÃES et al., 2005).

1.2 ALGUNS ALCALOIDES DE ORIGEM VEGETAL UTILIZADOS NA TERAPÊUTICA

As substâncias produzidas pelas plantas são classificadas em metabólitos primários ou secundários, também conhecidos como especiais. Os metabólitos primários são aqueles responsáveis pela estrutura funcional da planta (carboidratos, aminoácidos, ácidos nucleicos). Os metabólitos secundários desenvolvem um importante papel no processo de adaptação das plantas em seus ambientes e defesa dessas espécies contra patógenos externos, predadores, agressões ambientais, sinalizadores químicos para polinizadores, dentre outros (FUMAGALI et al., 2008; MORAIS et al., 2016). Estima-se que mais de 100.000 metabólitos secundários são sintetizados (PÉREZ-ALONSO e JIMÉNEZ, 2011).

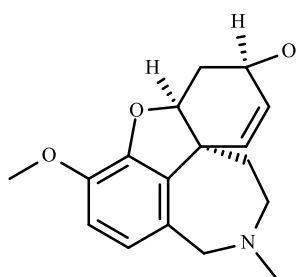
Os metabólitos de origem secundária vêm sendo estabelecidos como substâncias pouco abundantes, com uma ocorrência abaixo a 1% do carbono total, ou ainda, devido ao fato de seu armazenamento ocorrer em células específicas. Entretanto, os produtos secundários possuem um papel significativo na adequação das plantas aos seus meios; essas moléculas colaboram para que as espécies consigam ter uma bom contato com os variados ecossistemas (FUMAGALI et al., 2008). Essas substâncias, desempenham papéis importantes na bioquímica e fisiologia dos vegetais (GOMES et al., 2014).

Os alcaloides são compostos orgânicos oriundos do metabolismo secundário que contêm nitrogênio em sua estrutura (VICENTE, 2016). Com relação à sua aplicabilidade farmacêutica, vários alcaloides são utilizados como material de partida para a síntese de

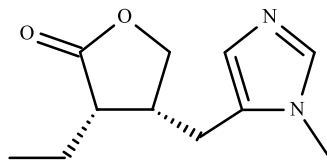
fármacos para tratamento de diversas doenças (ZANCA, 2015). Exemplos de alcaloides utilizados na terapêutica são mostrados no Quadro 1.

Quadro 1. Alguns alcaloides de origem natural utilizados na terapêutica (ZANCA, 2015).

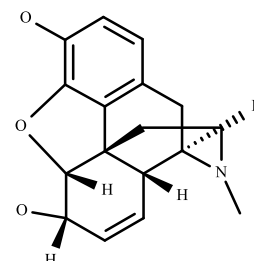
Alcaloide	Ação	Agravo
Galantamina (1)	Inibidor da acetilcolinesterase	Alzheimer
Pilocarpina (2)	Inibidor da acetilcolinesterase	Alzheimer
Morfina (3)	Analgésico	Dores severas
Quinina (4)	Antiarrítmico e antimalárico	Arritmias cardíacas e malária



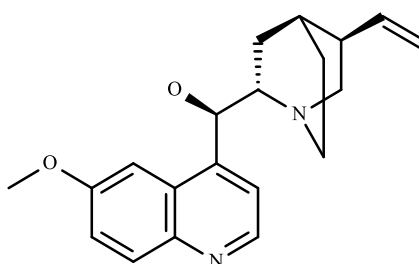
Galantamina (1)



Pilocarpina (2)



Morfina (3)



Quinina (4)

O alcaloide galantamina (1) apresenta grande atividade biológica, principalmente em relação à atividade de inibição da acetilcolinesterase, que está envolvida na Doença de Alzheimer (DA) (BARREIRO & BOLZANI, 2009).

1.3 ACETILCOLINESTERASE E A DOENÇA DE ALZHEIMER

A doença de Alzheimer é conhecida por ser uma patologia neurodegenerativa com processo evolutivo, causando diminuição do nível de memória e alteração nas funções intelectuais, sendo considerada a maior causa de declínio cognitivo em pessoas com idade

avançada. É relacionada a diversos fatores de risco, tais como: genótipo da apolipoproteína, idade avançada, traumatismo, diabetes, hipertensão, dentre outros. E normalmente, o paciente é levado a óbito após 10 anos do início do quadro clínico (MOREIRA, 2014).

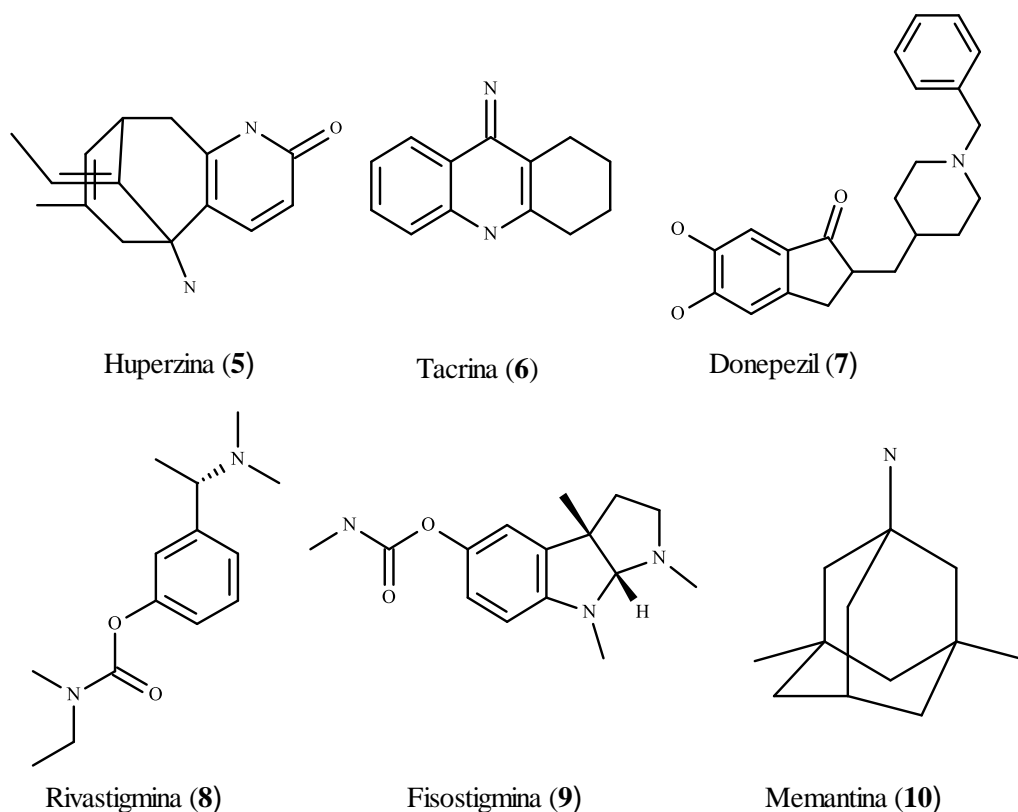
Dados da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), apontaram que o número de pessoas afetadas pela doença triplicará nos próximos 30 anos (OPAS, 2017). KHANAHMADI et al. (2015) relataram que, em pacientes com DA, a neurotransmissão colinérgica é afetada, mostrando um acúmulo do fragmento de uma proteína beta-amiloide fora dos neurônios e o acúmulo de uma proteína anormal chamada de tau dentro dos neurônios. Estas, são duas das várias alterações cerebrais associadas à DA (STERNER et al., 2016). As áreas patologicamente mais afetadas pela DA no cérebro são o neocórtex e o hipocampo. Estas áreas estão relacionadas às atividades do sistema nervoso central (SNC) de forma mais proeminente (MARQUES et al., 2013).

Atualmente, existem no mercado diversos fármacos que têm como alvo as sinapses colinérgicas, agindo na acetilcolinesterase, podendo inibi-la ou reativá-la, assim como podem atuar em receptores da enzima AChE como antagonistas ou agonistas. A AChE, quando bloqueada, torna-se incapaz de hidrolisar a acetilcolina; o neurotransmissor continua ativo na fenda sináptica por um período maior, favorecendo a transmissão colinérgica (ARAÚJO et al., 2016).

Os inibidores da acetilcolinesterase são uma das opções para o tratamento dos sintomas da DA, pois diminuem a degradação da acetilcolina. Outra opção de tratamento é o uso de um antagonista do receptor N-metil-D-aspartato glutaminérgico memantina, que atua inibindo a neurotoxicidade mediada por esse mesmo receptor (STERNER et al., 2016). Esses fármacos podem relacionar-se com o sistema colinérgico central, melhorando a memória e os déficits cognitivos, reduzindo a destruição da acetilcolina do local sináptico na região cerebral (SIRVANIS et al., 2013). No entanto, retardam apenas temporariamente a progressão da doença, além de apresentarem alguns efeitos colaterais (THAKUR et al., 2019).

Existem estudos com várias substâncias inibidoras da enzima acetilcolinesterase para o desenvolvimento de fármacos eficazes no tratamento e controle dos sintomas da DA, onde os principais fármacos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) são: galantamina (1), huperzina (5), tacrina (6), donepezil (7), rivastigmina (8) e fisostigmina (9) (KONRATH, 2011). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), registrou quatro fármacos para tratamento da DA: galantamina (1), donepezil (7), rivastigmina (8) e memantina (10), sendo que os três primeiros fármacos são inibidores da acetilcolinesterase (BRASIL,

2017), enquanto a memantina (**10**) atua como antagonista do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (ARAÚJO & PONDÉ, 2006).



Entretanto, esses fármacos retardam apenas temporariamente a progressão da doença, além de apresentar efeitos colaterais (FORLENZA, 2005). Dessa forma, tem aumentado o interesse científico na descoberta de novos potenciais inibidores da acetilcolinesterase, por vias não sintéticas.

1.4 FAMÍLIA AMARYLLIDACEAE E SEUS ALCALOIDES

A família Amaryllidaceae faz parte de um grupo de plantas caracterizadas como angiospermas que possuem um único cotilédone na semente (monocotiledôneas). As Amaryllidaceae são herbáceas e apresentam folhas espiraladas ou dísticas, centralizadas na parte de suporte da planta; inflorescência cimosa, flores bissexuais, levemente zigomorfas ou actinomorfas. As espécies dessa família exibem um elevado potencial ornamental, em razão de suas flores vistosas, coloridas e grandes (SEBBEN, 2005; SILVA, 2016a).

Essa família apresenta 85 gêneros e 1100 espécies distribuídas nas zonas tropical e subtropical, abrangendo a América do Sul, Sul da África e Região Mediterrânea (FELIX et al., 2009). No Brasil há 19 gêneros e 148 espécies já catalogados, sendo *Cearanthes* Ravenna., *Griffinia* Ker-Gawler, *Tocantinia* Ravenna. e *Worsleya* (W. Watson ex Traub) Traub, gêneros considerados endêmicos (AMARAL, 2011).

As delimitações da taxonomia desta família são pouco conhecidas, havendo a necessidade de um aprimoramento quanto às distinções de gêneros e espécies das Amaryllidaceae. Essa carência no processo de delimitação é devida a uma grande dificuldade na identificação botânica das monocotiledôneas, ocorrendo inclusive com vários gêneros desta família, como é o caso do gênero *Hippeastrum* (MARQUES, 2016).

Extratos de espécies de Amaryllidaceae têm sido objeto de estudos devido ao interesse em seus metabólitos especiais, principalmente, os alcaloides oriundos das isoquinolinas e que apresentam uma expressiva atividade biológica, como mostram pesquisas já realizadas com espécies desta família (ROSA, 2017).

Embora o crescente interesse quanto aos aspectos botânicos, farmacológicos e químicos, tenha sido mostrado em pesquisas científicas sobre plantas medicinais, para alguns gêneros dessa família, há somente estudos preliminares (MARQUES, 2016).

1.4.1 Gênero *Hippeastrum*

O gênero *Hippeastrum* apresenta cerca de 90 espécies, sendo que 34 ocorrem no Brasil (MARQUES, 2016). Esse gênero é restrito à região Sul-Americana, distribuindo-se entre México, Antilhas e Argentina (SEBBEN, 2005). Apresenta bulbo com um colo, podendo ser alongado ou curto; folhas alternas, simples, comumente dorsiventrais e planas, glabras, às vezes ausentes na época de floração. As espécies pertencentes a este gênero são adequadas a habitats notoriamente secos ou ambientes inteiramente xéricos (MONTEIRO e DE OLIVEIRA, 2010). Como outras Amaryllidaceae, as espécies são apreciadas para uso ornamental, e se destacam pela variedade de cores em suas flores. Na medicina popular, algumas espécies são comumente usadas para o tratamento de feridas e distúrbios gástricos (OLIVEIRA, 2017).

Ainda que existam poucos estudos relacionados a *Hippeastrum*, algumas substâncias bioativas, consideradas relevantes, foram relatadas para diversas espécies do gênero. Por exemplo, montanina (**11**), isolada de *H. vittatum*, apresentou ação inibitória da enzima acetilcolinesterase (SOPRANI, 2017); candimina (**12**), isolada de *H. morelianum*, mostrou

toxicidade para *Trichomonas vaginalis*; licorina (**13**) apresentou significativa ação antioxidante (GIORDANI et al., 2008; BESSA, 2016; OLIVEIRA, 2017).

Os principais alcaloides identificados em espécies desse gênero e suas respectivas atividades encontram-se sintetizados no Quadro 2.

Quadro 2. Alcaloides identificados em espécies do gênero *Hippeastrum*.

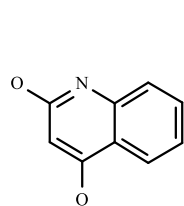
Alcaloide	Atividades	Referência
Galantamina (1)	Citotóxica, antitumoral, inibidora da colinesterase, anti-inflamatória, antioxidante	ANDRADE, 2010; CABRAL, 2011
Montanina (11)	Analgésica, antitumoral, antiviral, citotóxica, antitumoral	GIORDANI et al., 2008
Candimina (12)	Antiparasitária	DIELLO, 2012
Licorina (13)	Analgésica, antibacteriana, citotóxica, antitumoral	ANDRADE et al., 2014; SEBBEN, 2005; HOFMAN JR et al., 2003
Tazetina (14)	Citotóxica, antibacteriana, antioxidante	GIORDANI et al., 2011; HOFMAN et al., 2003
Pseudolicorina (15)	Antitumoral	CARVALHO, 2014
Haemantamina (16)	Antioxidante; antitumoral	CARVALHO, 2014
Narcissidina (17)	Antitumoral	SEBBEN, 2005
Hipeastidina (18)	Citotóxica	ANDRADE, 2007
Galantina (19)	Antitumoral	CARVALHO, 2014
Vitacarbolina (20)	-	ANDRADE, 2007
Trisferidina (21)	-	ANDRADE, 2014

Quadro 2 (cont.). Alcaloides identificados em espécies do gênero *Hippeastrum*.

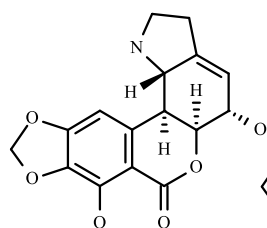
2-O-acetilcorina (22)	-	CARVALHO, 2014
Ungeremina (23)	-	CARVALHO, 2014
Vitatina (24)	Aitotóxica; antitumoral; antiviral	SILVA, 2006
Normaritudina (25)	Antibacteriana	ANDRADE, 2014; CARVALHO, 2014
Hamaina (26)	Antitumoral; citotóxica; antiparasitária	RIBEIRO, 2016; GIORDANI et al., 2011
Undulatina (27)	Antitumoral; antiviral	HOFMANN et al., 2003
Homolicorina (28)	Antimalarial	CARVALHO, 2014
11- <i>oxo-epi</i> -macronina (29)	Antiviral	ANDRADE, 2014
2 α - dimetoxihomolicorina (30)	Citotóxica	ANDRADE, 2014; CARVALHO, 2014
Hidroxivitatina (31)	Antiparasitária	BESSA, 2015
Neirina (32)	Antiviral	ANDRADE, 2014
Egonina (33)	-	CARVALHO, 2014
Trisfagridina (34)	Antitumoral, antiviral, citotóxica	CARVALHO, 2014
3-O-dimetilhippeastidina (35)	-	SEBBEN, 2005

Quadro 2 (cont.). Alcaloides identificados em espécies do gênero *Hippeastrum*.

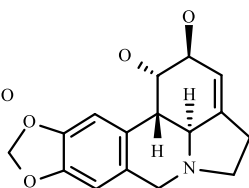
Galantindol (36)	Antiviral	ANDRADE, 2014
O-metilismina (37)	-	CARVALHO, 2014
Hidroxihomolicorina (38)	-	GIORDANI, 2011
Licoramina (39)	-	BESSA et al, 2017
8-O-desmetilmaritidina (40)	-	SOPRANI, 2017
Anidrolícorina (41)	-	GUO, 2015
Assoanina (42)	inibidora da colinesterase	SOPRANI, 2017
Kirkina (43)	-	SOPRANI, 2017
Pancratina C (44)	-	SOPRANI, 2017
Mecambrina (45)	-	GUIMARÃES et al., 2017
Undulatina (46)	-	SILVA, 2005



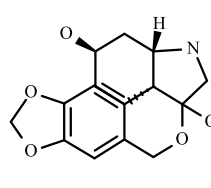
Montanina (11)



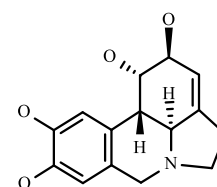
Candimina (12)



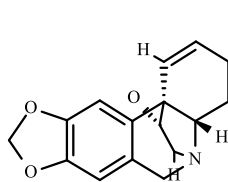
Licorina (13)



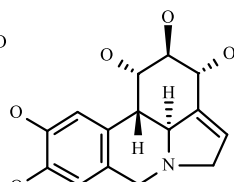
Tazetina (14)



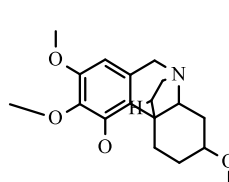
Pseudolicorina (15)



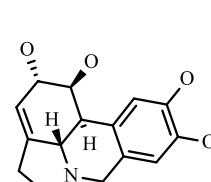
Haemantamina (16)



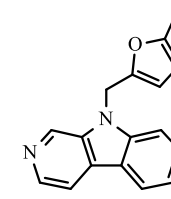
Narcissidina (17)



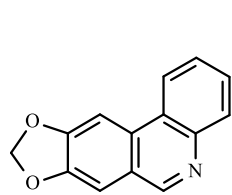
Hipeastidina (18)



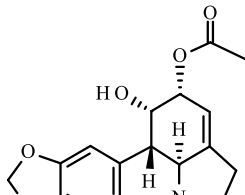
Galantina (19)



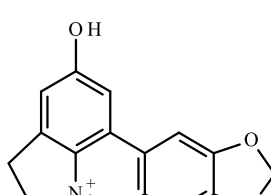
Vitacarbonila (20)



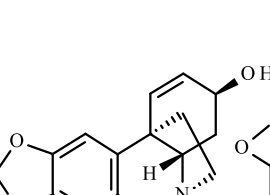
Trisferidina (21)



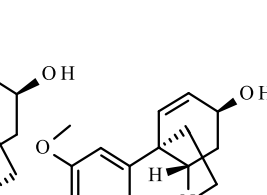
2-O-acetilicorina (22)



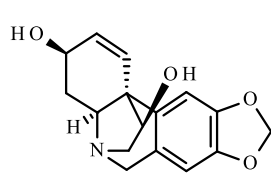
Ungeremina (23)



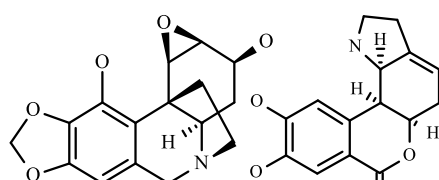
Vitatina (24)



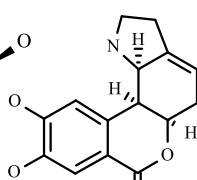
Normaritidina (25)



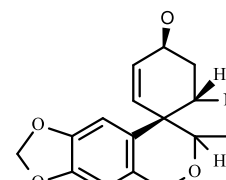
Hamaina (26)



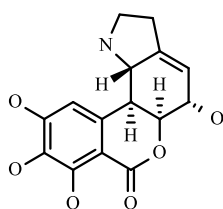
Undulatina (27)



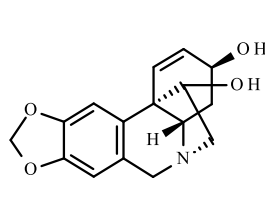
Homolicorina (28)



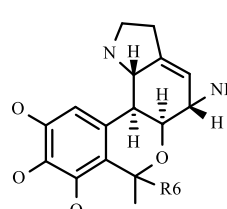
11-oxo-epi-macronina (29)



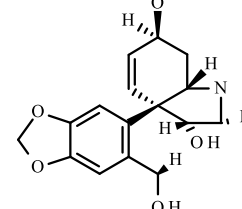
2α-Dimetoxihomolicorina (30)



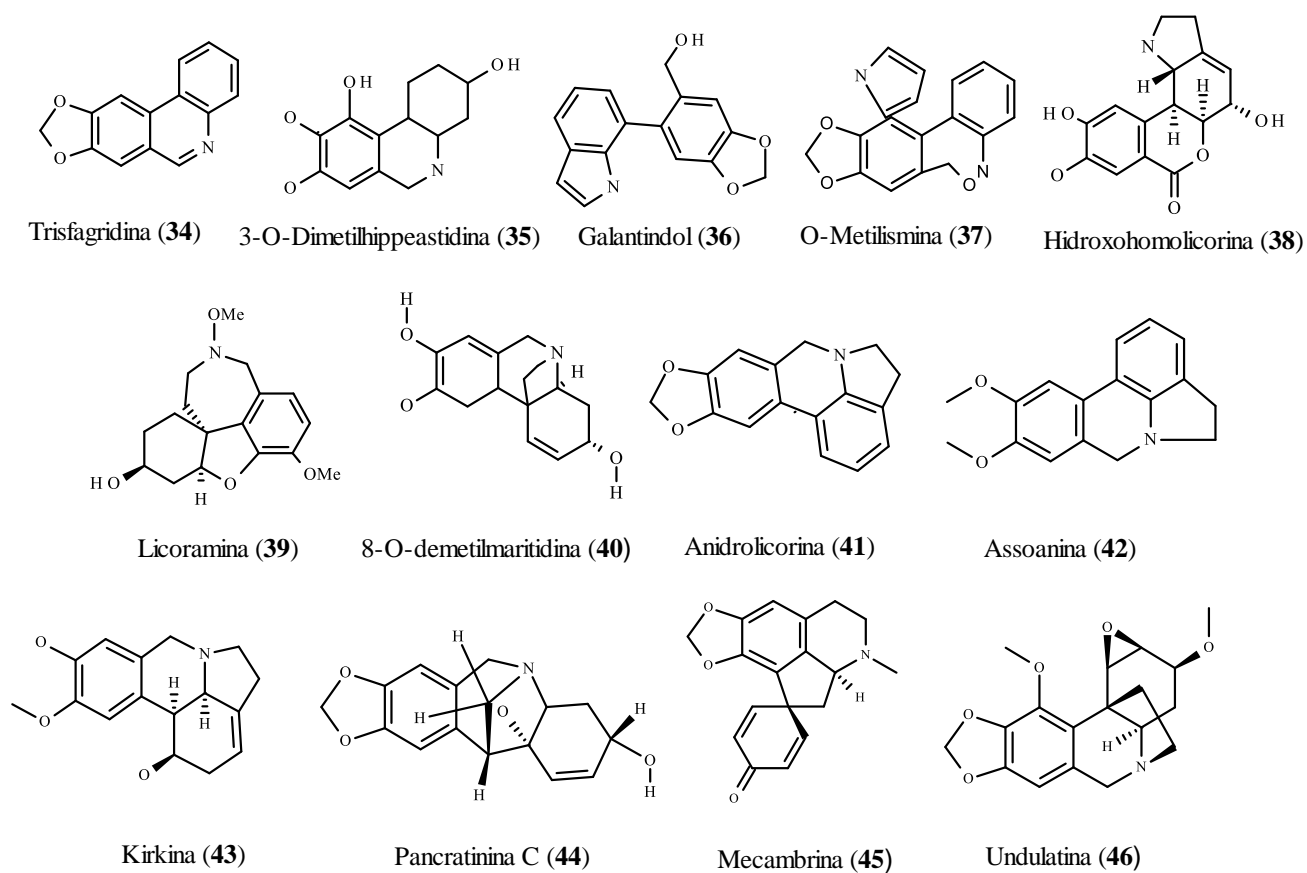
Hidroxivitatina (31)



Neirine (32)



Egonina (33)



A espécie *Hippeastrum goianum*, objeto desse trabalho, é uma espécie endêmica que ocorre em Goiás e no Distrito Federal. É uma planta ornamental que habita o Cerrado de forma isolada, ou em populações com poucos indivíduos (FLORA, 2012).

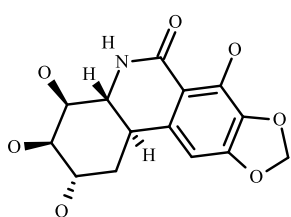
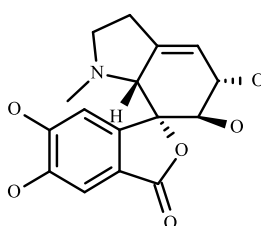
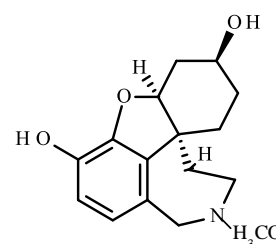


Figura 2. *Hippeastrum goianum*. À esquerda, material já coletado. À direita, espécie de estudo no local da coleta.

Essa espécie é morfológicamente semelhante a *H. solandriflorum* (Lindl.) Herb. Ambas apresentam folhas e bulbos com formatos muito semelhantes e são coletadas, geralmente, em solo recentemente queimado, durante os meses de julho e dezembro, com o surgimento de flores e frutos, sugerindo que a incidência desta espécie esteja intimamente ligada à ocorrência de incêndios (MARQUES, 2016).

Apesar de *H. goianum* estar presente na lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (BIODIVERSITAS, 2006), pode ser encontrada em cinco Unidades de Conservação, sendo quatro delas de grande relevância para o Distrito Federal; Jardim Botânico de Brasília, Fazenda Água Limpa, adjacentes do Parque Nacional de Brasília e Reserva Ecológica do IBGE (AMARAL, 2007).

Como membro da família Amaryllidaceae, apresenta, em sua composição química, alcaloides característicos para os quais são relatadas diversas atividades farmacológicas importantes como antitumoral, analgésica, citotóxica, antibacteriana e inibidora da acetilcolinesterase (SEBBEN, 2005; ANDRADE et al., 2014; CARVALHO, 2014; SILVA, 2016b). Alguns alcaloides já foram identificados no extrato de bulbos dessa espécie, como licorina (**13**), pseudolicorina (**15**), 7-desoxi-trans-diidronarciclasina (**47**), 8-desmetoxi-10-O-metilostasina (**48**), e 9-O-desmetillicoramina (**49**) (VERDAN et al., 2017). Contudo, há carência de relatos sobre a composição química e propriedades biológicas de extratos e frações de *Hippeastrum goianum*.

7-desoxi-trans-diidronarciclasina (**47**)8-desmetoxi-10-O-metilostasina (**48**)9-O-desmetillicoramina (**49**)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil químico e atividade de inibição da acetilcolinesterase por *Hippeastrum goianum* (Ravenna) Meerow, coletada em diferentes períodos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o perfil cromatográfico dos extratos e frações de folhas e bulbos de *H. goianum*
- Avaliar a atividade de inibição da acetilcolinesterase dos extratos e respectivas frações, por meio do ensaio de inibição enzimática *in vitro*
- Avaliar possíveis variações sazonais nos compostos químicos presentes nos diferentes extratos e frações
- Avaliar possíveis variações sazonais quanto à atividade de inibição da acetilcolinesterase nos diferentes extratos e frações

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

Os exemplares de *Hippeastrum goianum* (Ravenna) Meerow, foram coletados na Região Administrativa da Estrutural, Distrito Federal, Brasil (15°47'22.8S48°02'25W) pelo Prof. Dr. Christopher Willian Fagg (Universidade de Brasília -UnB) e uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade de Brasília (UB), sob o número Fagg 2387. As coletas foram realizadas pela manhã, nos seguintes períodos: 10 de outubro/2017 (1ª coleta), 01 de fevereiro/2018 (2ª coleta) e 14 de maio/2018 (3ª coleta).

3.1.1 Aspectos legais

Esse trabalho foi realizado sob o cadastro número 163E599, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen), para autorização de acesso.

3.1.2 Secagem do material

O material coletado foi secado em estufa com circulação e renovação de ar (Solab® SL 102), com temperatura controlada entre 37-40 °C, conforme preconiza o Consolidado de normas da Coordenação de Medicamentos Fitoterápicos e Dinamizados (COFID) (BRASIL, 2015).

3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

O material vegetal rasurado foi submetido a extração por maceração, utilizando percoladores de aço inox. A proporção entre o material botânico e os solventes utilizados foi 1:10. O material vegetal, referente às três coletas, foi submetido ao mesmo procedimento de extração.

O material vegetal foi inicialmente extraído por hexano P.A, por 72 h. Após esse período, a solução extrativa foi esgotada. O processo foi repetido por três vezes. O material vegetal remanescente foi então submetido ao mesmo procedimento, utilizando etanol P.A. como solvente. As soluções extrativas foram submetidas à evaporação sob temperatura inferior

a 40 °C, sob vácuo, para eliminação dos solventes, utilizando rotaevaporador Hei-VAP Advantage, ML, G1, 115v – Heidolph.

Ao material vegetal remanescente (torta) foi adicionada solução de ácido clorídrico 0,01 M (pH 2,0), e o conjunto foi aquecido até ebulição. A mistura foi mantida sob agitação por 10 min e, posteriormente, submetida a filtração. O filtrado foi neutralizado até pH 7,0, utilizando uma solução de hidróxido de amônio 25 %, e foi então submetido a fracionamento líquido-líquido com acetato de etila. Foram feitas três extrações sucessivas.

A fração orgânica foi lavada com água destilada, para eliminação de resíduo de NH_4OH , secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente foi eliminado sob temperatura inferior a 40 °C, sob vácuo. A fração aquosa neutralizada, foi congelada e submetida a liofilização (Liofilizador Advantage Plus XL-70, SP Scientific). Todas as frações e extratos obtidos foram devidamente depositados em recipientes e armazenados em freezer a -20 °C até sua utilização nos ensaios subsequentes.

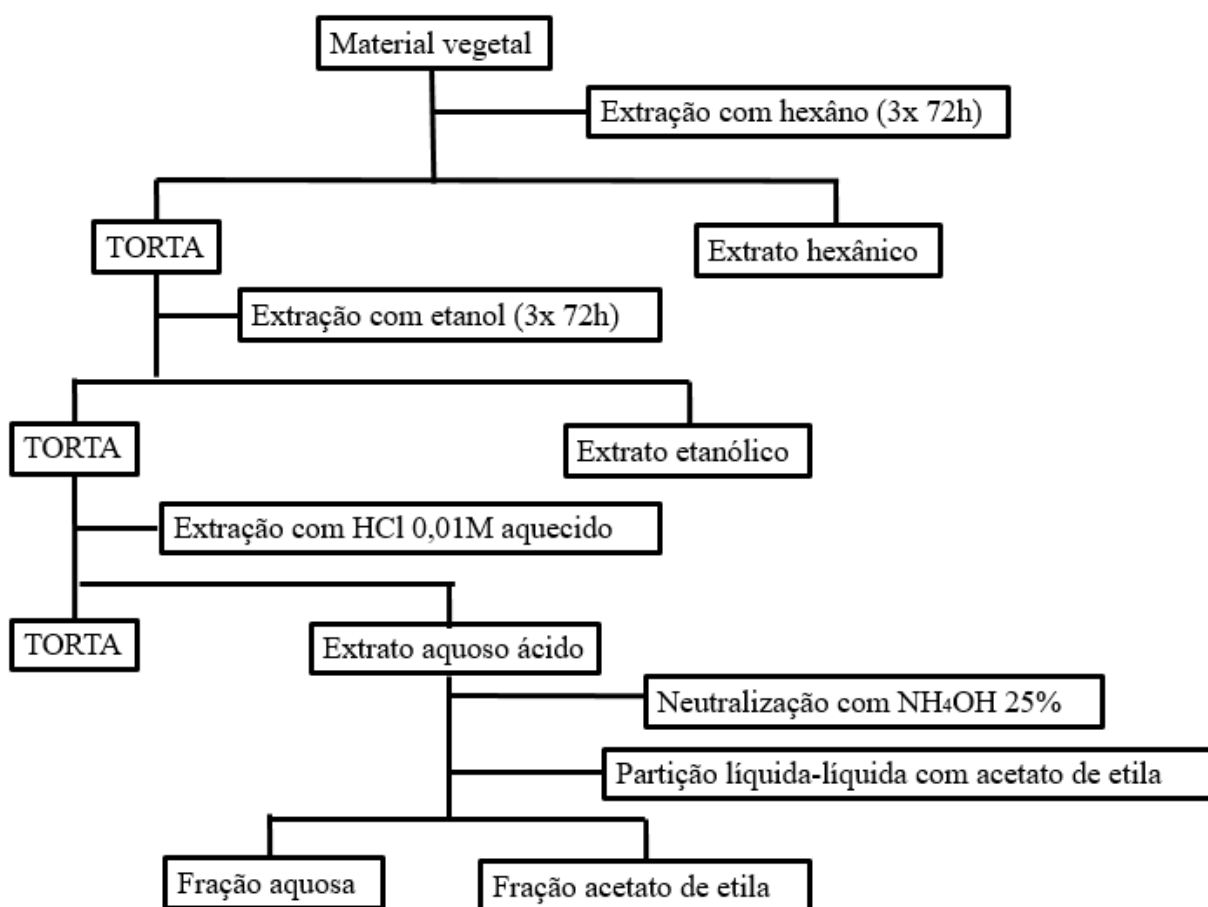


Figura 3. Etapas de obtenção de extratos e frações de folhas e bulbos de *Hippeastrum goianum*.

Desta forma, foram obtidos os extratos etanólicos (EEtOH), fração aquosa (FA) e fração acetato de etila (FAcOEt), para os três períodos de coleta realizadas (Figura 3).

A extração por hexano, teve por finalidade realizar uma limpeza prévia no material vegetal (desengorduramento); dessa forma, os extratos hexânicos obtidos não foram utilizados na análise do perfil químico e ensaio biológico.

O rendimento dos extratos etanólicos e frações acetato de etila e aquosas, foi calculado conforme a equação:

$$\% \text{ Rendimento} = (\text{Extrato seco} / \text{Material seco}) \times 100$$

3.3 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTOMETRIA DE MASSAS (CG/EM)

Os extratos e/ou frações analisadas foram constituídos de 2 mg de cada amostra, dissolvidos em 1 mL de MeOH (extratos brutos) e CHCl₃ (frações). O material solubilizado foi injetado diretamente no cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas Agilent Technologies 6890N acoplado com MSD5975 inerte XL, operando no modo de ionização de elétrons (IE) em 70 eV. Foi utilizada a coluna Sapiens-X5 MS (30 m - 0,25 mm i.d., espessura do filme 0,25 m). O gradiente de temperatura foi: 12 min a 100 °C, 100 °C – 180 °C a 15 °C/min, 180 °C – 300 °C a 5 °C/min e 10 min em 300 °C. O modo de injeção utilizado foi Splitless (1:50). As temperaturas do injetor e do detector foram de 280 °C, respectivamente, e a taxa de fluxo do gás de arraste (He) foi 1 mL/min. O volume de injeção foi de 1 µL.

3.3.1 Identificação dos alcaloides por CG/EM

Os alcaloides foram identificados comparando os espectros de massas referentes a cada pico/tempo de retenção apresentado no cromatograma e o índice de retenção (IR, Kovats) com um banco de dados contendo dados de alcaloides de Amaryllidaceae (ANDRADE et al., 2012; ANDRADE et al., 2014; BESSA, 2016) que foram isolados e identificados usando outras técnicas espectroscópicas, como ressonância magnética nuclear (RMN), ultravioleta (UV), dicroísmo circular (DC) e espectrometria de massas (EM), bem como dados da literatura que estão sendo continuamente atualizados e revisados. Os espectros de massas foram analisados

usando o software AMDIS 2.64 (AMBIENTE) (WA, EUA), e os IR foram registrados com uma mistura de calibração de padrões de hidrocarbonetos (C9-C36).

A proporção de cada alcaloide presente nos extratos e frações analisados por CG/EM foi expressa como porcentagem relativa da área do pico.

3.4 ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE

O ensaio *in vitro* para avaliar a atividade inibitória da acetilcolinesterase (AChE) foi realizado a partir do método desenvolvido por ELLMAN et al. (1961) e modificado por LÓPEZ et al. (2002). A técnica baseia-se na hidrólise da acetiltiocolina (ATCh) pela enzima acetilcolinesterase para produzir tiocolina e acetato. A tiocolina gerada reage com o composto DTNB [ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)], produzindo 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina e ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, composto de cor amarela, que apresenta um máximo de absorção a 405 nm. No ensaio, se a enzima AChE for inibida pelos compostos presentes no extrato ou as frações, será menor a quantidade de tiocolina produzida a partir da hidrólise da ATCh. Conseqüentemente, a concentração do cromóforo produzido a partir da reação da tiocolina com o DTNB será menor, sendo um indicativo da eficácia do extrato na inibição enzimática. Essa atividade pode ser monitorada a 405 nm.

Para este ensaio, foram preparadas soluções (tampão, de enzima e de substrato), de candidatos a inibidores e de inibidores padrão. O tampão utilizado no ensaio foi uma solução salina fosfato (PBS), constituída de K_2HPO_4 8 mM (Vetec®, 98%), NaH_2PO_4 2,3 mM (Sinth®, 98%), NaCl 0,15 M (Vetec®, 99%), pH 7,5.

A enzima acetilcolinesterase (AChE) de *Electrophorus electricus* (137,0 U/mg sólido em 217 U/mg de proteína, Sigma Aldrich®) foi dissolvida em PBS (pH 7,5), a fim de ser obtida uma solução de 137 U/mL (1 mg de AChE em 1 mL de PBS), denominada solução-estoque. Esta solução foi armazenada a -20 °C. Dessa, foi preparada uma solução de trabalho (0,25 U/mL), constituída de 16,41 μ L da solução-estoque adicionados a de PBS q.s.p 9 mL.

A solução de substrato foi preparada com iodeto de acetiltiocolina 0,24 mM (Sigma Aldrich®, 98%), Na_2HPO_4 0,04 mM (Merck®, 99%), DTNB 0,2 mM (Sigma Aldrich®, 99%) em água destilada, q.s.p 20 mL.

As amostras (extratos etanólicos e frações aquosas e em acetato de etila) foram preparadas na concentração de 500 μ g/mL. O volume final na etapa de pré-incubação foi 150

μL . O solvente utilizado para diluir o extrato etanólico foi etanol, enquanto que para as frações foi usada uma mistura de etanol 5%/ DMSO 0,1%.

Os inibidores da enzima acetilcolinesterase utilizados neste estudo como controle positivo de inibição foram galantamina (**1**) e fisostigmina (**9**) (Sigma Aldrich®, > 99%). Foram preparadas soluções estoque em água destilada destilada (1 mg/mL), armazenadas a -20°C .

Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 50 μL de tampão, 50 μL de candidato a inibidor (amostra ou controle positivo) e 50 μL de solução da enzima. Esta mistura foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 100 μL da solução do substrato. Após 10 minutos, foi feita a leitura a 405 nm em leitor de microplaca Multimode Plate Reader Perkin Elmer EnSpire (ENSPIRE ALPHA).

Para verificar a capacidade inibitória e calcular o valor da porcentagem de inibição para cada ensaio, os extratos e frações foram avaliados utilizando a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$. A atividade foi estimada como o máximo de absorvância, equivalendo a 100%, para cada ensaio, e teve como referência a equação:

$$\% \text{ de inibição} = (C - A/C) \times 100$$

Onde: C é a absorvância do controle da enzima e A é absorvância do extrato menos o branco.

3.5 DADOS CLIMATOLÓGICOS

O estudo sazonal foi realizado por meio de uma coleta de folhas e bulbos de *H. goianum* em três períodos diferentes (Outubro/2017, Fevereiro/2018 e Maio/2018). As três coletas foram feitas na Região Administrativa da Estrutural, DF, Brasil.

Os dados climáticos referentes a radiação global, temperatura máxima, temperatura mínima, umidade relativa máxima, umidade relativa mínima e precipitação pluviométrica dos meses em que as coletas foram feitas, foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Agroclimatologia da FAL – UnB.

Com os dados obtidos, foram calculadas médias mensais dos parâmetros climáticos citados entre o primeiro e o último período de coleta.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados climáticos obtidos foram submetidos à análise de variância (ANAVA) one-way, seguida pelo pós-teste de Kruskal-Wallis, considerando a anormalidade da distribuição dos dados verificado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. O nível significativo adotado foi de 5%, ou seja, $p < 0,05$.

Para o perfil químico, foram realizadas duas análises multivariadas com agrupamento e análise de componentes principais (ACP), utilizando o software Statistica. Posteriormente, foi construída uma matriz de dissimilaridade baseada na composição química dos extratos e frações de folhas e bulbos de *H. goianum* obtidos em diferentes períodos, a partir de suas distâncias euclidianas. A matriz de dissimilaridade foi simplificada com dendrogramas, usando o método de agrupamento de Ward. Foi realizada análise de correlação entre todos os alcaloides detectados nas amostras analisadas.

Os dados da porcentagem de inibição (%) dos extratos brutos (EEtOH), frações acetato de etila (FAcOEt) e frações aquosas (FA), de folhas e bulbos de *Hippeastrum goianum* coletados em diferentes períodos, foram submetidos a análise de variância, considerando um delineamento inteiramente casualizado com parcelas subdivididas no tempo (Split plot in time). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey 5% de probabilidade, por meio do programa Sisvar.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DADOS CLIMATOLÓGICOS

O clima predominante na região do Cerrado é o tropical sazonal (KLEIN, 2000 apud MARTINS, 2015).

A precipitação na área das coletas no período avaliado (Outubro/2017 – Maio/2018), de acordo com os dados obtidos, foi de 1.218 mm, o que mostrou uma estacionalidade climática deste bioma, uma vez que, seu nível de precipitação média anual fica entre 1.200 e 1.800 mm (KLEIN, 2000 apud MARTINS, 2015). A média mensal da temperatura máxima também não mostrou grandes variações (27,3–31,7 °C) entre o período de outubro/2017 a maio/2018 (Figura 4).

Na Figura 4 também estão apresentados os meses com maior incidência dos parâmetros meteorológicos em questão, considerando os períodos das coletas. Para a precipitação pluviométrica, a maior incidência ocorreu no mês de dezembro/2017 (9,3 mm), seguida de janeiro/2018 (8,5 mm) e novembro/2017 (3,9 mm).

Para a radiação global, foi verificada a maior incidência no mês de outubro/2017 (19,7 MJ/m²-d), seguida de setembro/2017 (19,3 MJ/m²-d) e janeiro/2018 (17,3 MJ/m²-d).

Para os dados referentes à temperatura máxima, a maior incidência ocorreu no mês de outubro/2017 (31,7 °C); e os demais meses mostraram temperaturas muito próximas a esse valor. Para a temperatura mínima, a maior incidência foi no mês de dezembro/2017 (17,1 °C), seguido de novembro/2017 (16,9 °C) e março/2018 (16,6 °C).

Quanto à umidade relativa máxima, os períodos entre novembro/2017 e fevereiro/2018, mostraram uma média similar (cerca de 99%); os demais períodos apresentaram uma média próxima ao valor de 90%. A umidade relativa mínima apresentou uma maior variabilidade numérica quanto às médias mensais, onde a maior incidência foi no mês de abril/2018 (55,1%), seguida de dezembro/2017 (55,8%) e novembro/2017 (53,6%).

Considerando apenas os períodos das coletas (outubro/2017, fevereiro/2018 e maio/2018), a análise estatística não mostrou variação significativa entre os meses de cada coleta em relação aos dados climatológicos (Figura 5).

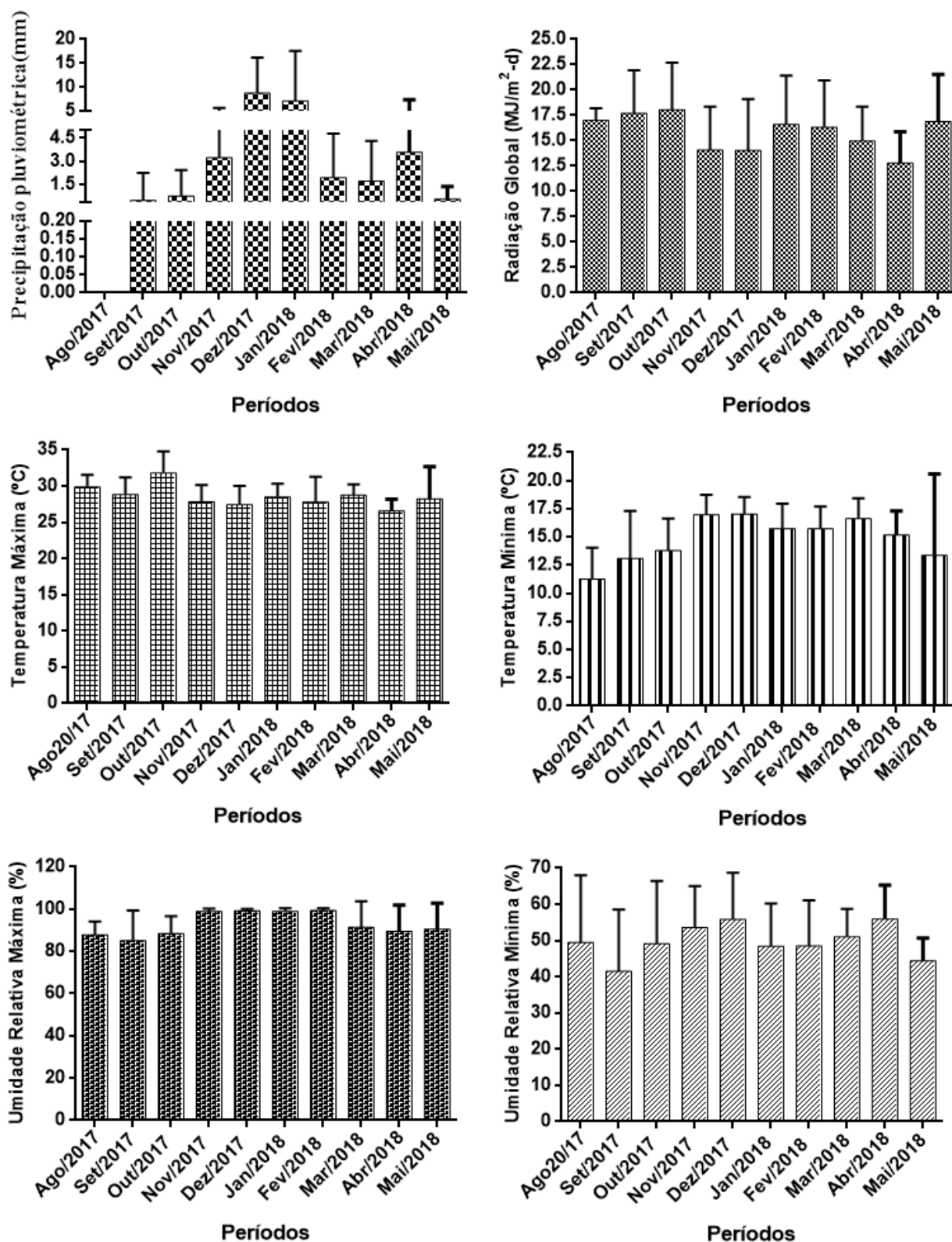


Figura 4. Dados climatológicos obtidos considerando os períodos entre a primeira e última coleta. Média mensal e desvio padrão do índice pluviométrico (mm), radiação global (MJ/m²-d), temperatura máxima (°C), temperatura mínima (°C), umidade relativa máxima (%) e umidade relativa mínima (%).

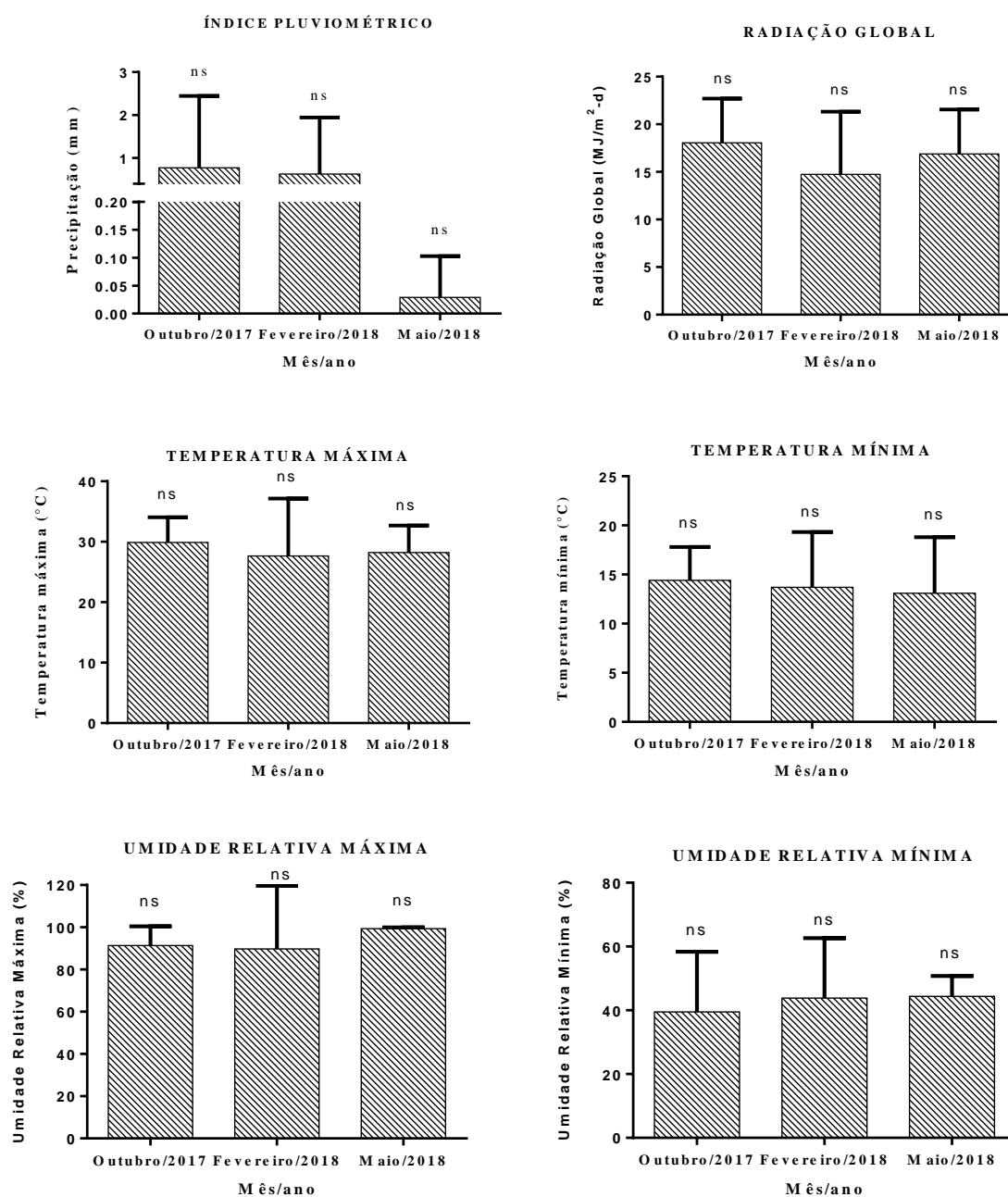


Figura 5. Comparação entre os períodos de coletas (outubro/2017, fevereiro/2018 e maio/2018) em relação as médias mensais dos dados climatológicos. ns (não significativo). Teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância de $p < 0,05$.

4.2 RENDIMENTO

Foram realizadas três coletas de folhas e bulbos da espécie *Hippeastrum goianum*, entre o período de outubro de 2017 a maio de 2018, sendo obtidos 06 extratos brutos e 12 frações, totalizando 18 amostras.

A Tabela 1 mostra que em relação ao rendimento dos extratos brutos e frações, os extratos etanólicos brutos das folhas e bulbos apresentaram um rendimento maior, em todas as coletas realizadas, se comparados com as demais amostras.

4.3 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTOMETRIA DE MASSAS (CG/EM)

4.3.1 Identificação dos alcaloides

A metodologia por CG/EM utilizada para diferentes extratos e frações de *Hippeastrum goianum* permitiu detectar onze alcaloides (Tabela 2), sendo que nove foram identificados pela comparação de seus espectros de massas e índice de retenção de Kovats com banco de dados.

A proporção de cada composto nas amostras analisadas por CG/EM (Tabela 2) foi expressa como porcentagem relativa da área do pico. A área sob os picos do CG/EM não depende só da concentração do composto correspondente, mas também da intensidade da sua fragmentação espectral de massas. Embora os dados apresentados na Tabela 2 não expressem uma quantificação real, podem ser usados para uma comparação relativa.

As amostras referentes as frações aquosas (FA) de todas as coletas realizadas, não apresentaram compostos alcaloídicos, não sendo possível apresentar seus resultados quanto ao perfil fitoquímico.

Tabela 1. Rendimentos e teores de umidade das amostras obtidas a partir de folhas e bulbos de *Hippeastrum goianum*.

Período	Parte vegetal	Extrato/Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
Outubro/2017	Folhas	EEtOH	3,6	8,40
		FAcOEt	0,024	0,12
		FA	4,4	12,47
	Bulbos	EEtOH	4,1	23,01
		FAcOEt	0,038	0,36
		FA	6,6	22,32
Fevereiro/2018	Folhas	EEtOH	1,3	9,86
		FAcOEt	0,022	0,25
		FA	6,4	14,31
	Bulbos	EEtOH	2,4	15,91
		FAcOEt	0,012	0,08
		FA	3,9	15,61
Maio/2018	Folhas	EEtOH	7,3	18,87
		FAcOEt	0,012	0,007
		FA	2,6	1,38
	Bulbos	EEtOH	21,79	14,71
		FAcOEt	0,042	0,29
		FA	18,76	16,91

EEtOH: Extrato etanólico; FAcOEt: Fração acetato de etila; FA: Fração aquosa.

A variação mais significativa dos alcaloides detectados foi observada nas frações acetato de etila dos bulbos em todas as coletas. Em contrapartida, o menor número de alcaloides foi observado nos extratos brutos das folhas e bulbos, em todas as coletas (Tabela 2). Licorina (**13**) foi o principal componente detectado nas folhas e bulbos nos três períodos de coleta, sendo 21,1-49,4 % para bulbos e 35-45,6 % para folhas, quando comparado com os demais compostos, exceto nos extratos brutos das folhas em que não foi detectado. Esse alcaloide já foi descrito para outras espécies do gênero *Hippeastrum* (ANDRADE et al., 2016). O aumento da porcentagem relativa da licorina (**13**), nas frações acetato de etila de folhas e bulbos (Tabela 2), pode ser justificado pelo fato dessas amostras corresponderem a frações mais purificadas e enriquecidas de alcaloides, enquanto que os extratos brutos apresentam outros compostos além dos alcaloide (CORTES et al., 2015).

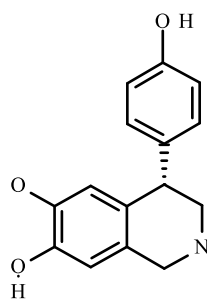
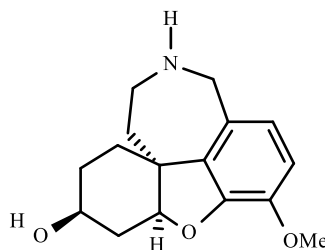
Tabela 2. Alcaloides identificados nas partes aéreas de espécies de *Hippeastrum goianum* por CG/EM. Os valores estão expressos como porcentagem relativa do total de íons corrente (% TIC).

Alcaloide	IR	M+	Outubro/2017				Fevereiro/2018				Maio/2018				MS [m/z (%)]
			Folhas		Bulbos		Folhas		Bulbos		Folhas		Bulbos		
			A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	
Licorina (13)	2774.7	287	-	45,6	45,8	46,5	-	42,6	21,1	46,4	-	35,0	30,3	49,4	286(19), 268(24), 250(15), 227(79), 226(100), 211(7), 147(15)
Vitatina (24)	2503.4	271	-	7,3	-	9,0	-	11,3	-	16,0	-	-	-	6,5	228(25), 199(95), 187(85), 173(28), 128(32), 115(33), 56(22)
Hidroxivitatina (31)	2739.3	287	-	8,6	-	5,0	-	14,4	-	2,0	-	-	-	15,7	258(100), 211(15), 186(20), 181(23), 153(13), 128(24), 115(23)
Hidroxihomolicorina (38)	3001.6	315	12,1	-	-	-	12,5	1,1	-	-	12,9	19,1	-	-	333(80), 304 (45), 286(100), 274(98), 256(58), 231(87)
Licoramina (39)	2443.8	289	-	5,6	-	4,9	-	3,8	-	6,2	-	-	-	4,5	299(3), 191(1), 179(1), 110(9), 109(100), 108(17), 94 (2), 82(2), 44(4)

Tabela 2. (cont.). Alcaloides identificados nas partes aéreas de espécies de *Hippeastrum goianum* por CG/EM. Os valores estão expressos como porcentagem relativa do total de íons corrente (% TIC).

8-O-desmetilmaritidina (40)	2529.5	273	-	-	-	1,8	-	-	-	2,0	-	-	-	1,9	256(22), 230(20), 201(83), 189(42), 174(22), 128(23), 115(24)
8-O-desmetilmaritidina (40)	2529.5	273	-	-	-	1,8	-	-	-	2,0	-	-	-	1,9	256(22), 230(20), 201(83), 189(42), 174(22), 128(23), 115(24)
Anidrolícorina (41)	2532.9	251	-	-	-	1,4	-	-	-	1,6	-	-	-	0,6	250(100), 192(13), 191(11), 165(4), 164(3), 139(2), 124(7)
Cherilina (47)	2583.3	285	-	-	-	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	301(100), 258(20), 246(20), 220(61), 217(40) 272(41), 254(45), 229(45),
Norlicoramina (48)	2465.5	275	-	4,6	-	6,0	-	8,0	-	8,0	-	-	-	6,1	228(100), 214(13), 186(10), 147(8), 91(8), 77(12)
UK ^a	2662.3	-	-	-	-	12,0	-	-	-	4,0	-	-	-	9,5	349/318/291/232
UK ^b	2734.7	-	-	-	-	6,6	-	-	-	18,8	-	-	-	6,6	281/258

A: Extrato bruto das folhas de *H. goianum* (EEtOH); B: Fração acetato de etila das folhas de *H. goianum* (FACoEt); C: Extrato bruto dos bulbos de *H. goianum* (EEtOH); D: Fração acetato de etila dos bulbos de *H. goianum* (FACoEt); -: não identificado; IR: índice de retenção; M+: íon molecular; ^a: composto desconhecido 1; ^b: composto desconhecido 2.

Cherilina (**47**)Norlicoramina (**48**)

A Tabela 2 mostra que entre as partes das plantas analisadas (folhas e bulbos), os valores das porcentagens relativas em relação a licorina (**13**) são bastante semelhantes. Assim, para uma eventual utilização dessa espécie com vistas à obtenção desse alcaloide, não há necessidade de coleta de bulbos. Isso contribui para a manutenção das populações de *H. goianum*, pois folhas constituem material vegetal renovável. Considerando que essa espécie está em risco de extinção, segundo o Ministério do Meio Ambiente (2018), a utilização de folhas de *H. goianum* constitui uma alternativa sustentável para obter licorina (**13**). Em outro estudo, os autores também observaram que não houve uma diferença numérica significativa entre o extrato metanólico de folhas e bulbos de *Galanthus woronowii* Losinsk. (Amaryllidaceae), em relação a composição relativa dos compostos licorina (**13**) e galantamina (**1**) (BERKOV et al., 2011).

A Tabela 2 também mostra que a hidroxihomolicorina (**38**) foi encontrada apenas nas amostras das folhas, em todas as coletas. Isso justificaria a coleta apenas das folhas do *H. goianum* com a finalidade em se obter esse composto. Em contraste, em um estudo realizado com *H. puniceum* (Lam.), a hidroxihomolicorina (**38**) foi identificada apenas no extrato metanólico de bulbos (JAMAL et al., 2017). Outro alcaloide, licoramina (**39**), foi identificado nas frações acetato de etila das folhas e bulbos (Tabela 2). Em um estudo, com *H. puniceum* e *H. aulicum* (Ker-Gawler) Herb., o composto **38** foi identificado a partir do extrato metanólico de bulbos (BESSA et al., 2017; JAMAL et al., 2017). Ambos os compostos **38** e **39** estão sendo descritos pela primeira vez para o *H. goianum*.

Vitatina (**24**) é outro alcaloide descrito pela primeira vez em *H. goianum*. Este composto estava presente apenas nas frações acetato de etila das folhas e bulbos em todas as coletas (Tabela 2). Este alcaloide já foi identificado e isolado a partir do extrato de folhas e bulbos de *Hippeastrum vittatum* (L'Her) Herb., coletados no sul do Brasil, durante a floração (SILVA et al., 2008) e apresenta algumas atividades biológicas, como antitumoral e antidepressiva (KAUR et al., 2017) e, em estudos preliminares, contra o vírus da influenza NA (SHAWKY, 2017).

Conforme mostrado na Tabela 2, é possível perceber que os alcaloides 8-O-desmetilmaritidina (**40**) e anidrolícorina (**41**) foram encontrados apenas nas frações acetato de etila dos bulbos em todos os períodos de coleta. O composto **40** foi primeiramente descrito em espécies do gênero *Narcissus* (Amaryllidaceae) (HOSHINO, 1998), e em *Hippeastrum*, o mesmo já foi encontrado nas espécies *H. aulicum*, *H. puniceum* e *H. papilio* (Ravenna) (ANDRADE et al., 2011; BESSA et al., 2017; JAMAL et al., 2017). GUO (2015) relatou que 8-O-desmetilmaritidina (**40**) possui propriedade antimicrobiana e significativa atividade inibitória da AChE. O composto anidrolícorina (**41**), foi identificado anteriormente nas espécies *H. aulicum* e *H. calyptratum* (Ker-Gawler) Herb., e apresentou alta capacidade de inibição da síntese de ácido ascórbico (ANDRADE et al., 2012). Ambos os compostos foram identificados pela primeira vez na espécie *H. goianum*.

Cherilina (**47**) é um alcaloide fenólico não muito comum, isolado e identificado pela primeira vez em *Crinum powellii* Hort. (GUO, 2015). Possui uma estrutura única entre os alcaloides de Amaryllidaceae (MANOLOV et al., 2015). Esse composto só foi identificado na fração acetato de etila dos bulbos na amostra referente ao período de outubro/2017, embora com uma porcentagem relativa baixa (0,9%) quando comparado a outros alcaloides identificados nas amostras analisadas. Esse é o primeiro relato de identificação da cherilina (**47**) no gênero *Hippeastrum*.

A Tabela 2 também mostra que os compostos hidroxivitatina (**31**) e norlícoramina (**48**) foram identificados nas frações acetato de etila das folhas e bulbos em todos os períodos de coleta. Norlícoramina (**48**) é outro alcaloide que foi identificado pela primeira vez no gênero *Hippeastrum*. O mesmo já havia sido identificado em espécies do gênero *Lycoris* e *Narcissus* em Amaryllidaceae (GUO, 2015).

De acordo com a Tabela 2, é possível observar que as frações acetato de etila dos bulbos apresentam a maior variabilidade de alcaloides em relação às folhas. Isso pode estar atribuído ao fato de que os bulbos representam fonte de armazenamento de substâncias para o desenvolvimento da planta (SILVA, 2009). Esses achados corroboram outro estudo, onde os autores observaram que os níveis dos alcaloides identificados foram significativamente maiores nos bulbos em comparação com as folhas (MU et al., 2010). Em um estudo semelhante, os autores verificaram que além de uma maior variedade de alcaloides presentes nos bulbos de *Narcissus carlton* (LUBBE et al., 2013), também foi observado que apenas os bulbos apresentaram precursores de alcaloides tirosina e 4-hidroxifenilpiruvato (4-HPP), enquanto que nas folhas, essas substâncias estavam ausentes. A presença desses precursores poderia sugerir

que o aumento do número de alcaloides identificados nos bulbos do presente estudo, esteja associado à presença dessas substâncias.

4.3.2 Análise multivariada do perfil químico

A análise multivariada, em sentido amplo, é o conjunto de métodos destinado a analisar simultaneamente conjuntos de dados. Isso é, para cada indivíduo ou objeto em estudo, várias variáveis são analisadas (MENGUAL-MACENLLE et al., 2015). Dentro da análise multivariada existem técnicas de avaliação da interdependência das variáveis, tais como: análises de agrupamento hierárquicos (HCA) e dos componentes principais (ACP).

A HCA, baseia-se em uma técnica aglomerativa, que calcula, hierarquicamente, a distância entre as amostras, onde são formados grupos que se correlacionam pelo índice de similaridade, de forma que as amostras mais próximas (semelhantes) formarão grupos com maior similaridade (MARTINS, 2008).

A técnica ACP, por outro lado, fornece uma visão geral das informações consideradas mais importantes, tais como tendências, valores divergentes, agrupamentos e desvios, que podem ser identificados, tornando mais visíveis e fáceis de serem analisados e compreendidos (TEOFILO et al., 2009). Esta ferramenta é aplicada para reduzir o conjunto de dados e manter o máximo de informações originais possível, buscando a similaridade entre elas, de forma que estes possam ser representadas pelos componentes mais representativos do sistema (componentes principais) (BATISTA, 2018).

Considerando que a maioria das pesquisas avalia muitas variáveis que podem dificultar a interpretação do real comportamento dos dados, a utilização da ACP possibilita o uso de um menor número de variáveis que podem indicar a mesma quantidade de informação presente no conjunto total (PACHECO et al., 2013).

Uma correlação positiva significa que as variáveis movem juntas, e a relação é considerada forte quando a correlação se aproxima do valor 1, enquanto que a correlação negativa indica que as variáveis movem-se em direções opostas e a relação é considerada forte quando a correlação se aproxima do valor -1. De acordo com a classificação de DANCEY e REIDY (2018), uma correlação: $r=0,10$ até $r=0,30$ (fraco); $r=0,40$ até $r=0,60$ (moderado); $r=0,70$ (significativo) $r=0,80$ até $r=1$ (forte).

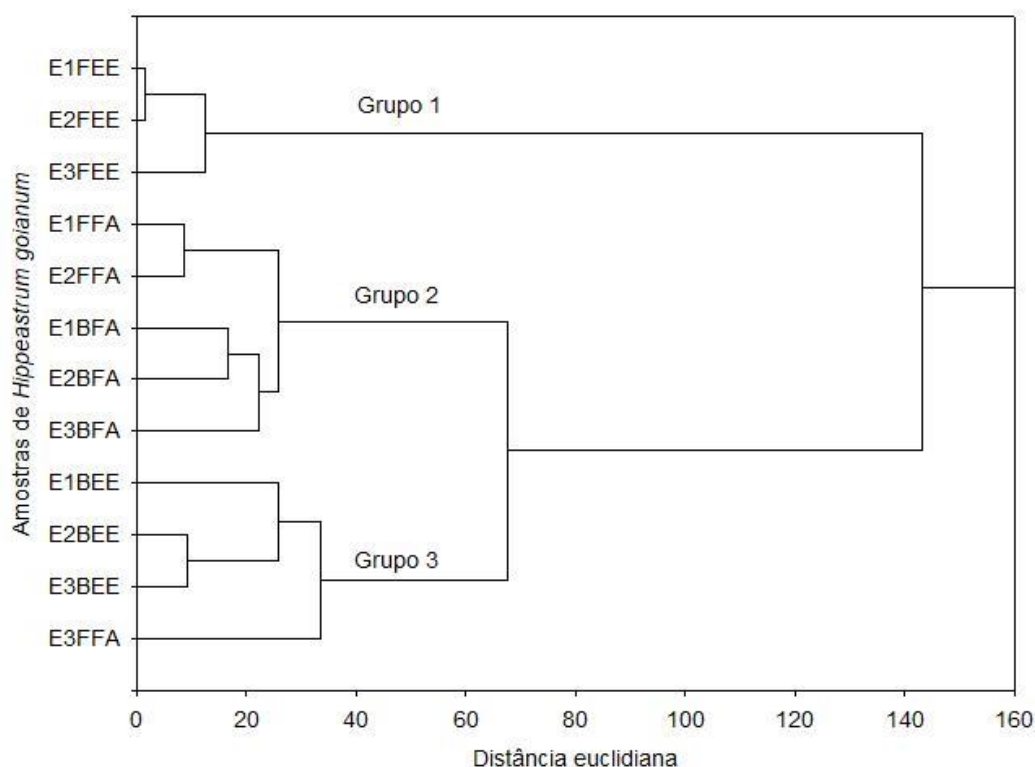


Figura 6. Dendrograma bidimensional representando a similaridade entre as amostras de *Hippeastrum goianum* obtidas em diferentes períodos para os compostos identificados e rendimento. E1FEE: Coleta 1, folha, extrato etanólico; E2FEE: Coleta 2, folha, extrato etanólico; E3FEE: Coleta 3, folha, extrato etanólico; E1FFA: Coleta 1, folha, fração acetato de etila; E2FFA: Coleta 2, folha, fração acetato de etila; E3FFA: Coleta 3, folha, fração acetato de etila; E1BFA: Coleta 1, bulbo, fração acetato de etila; E2BFA: Coleta 2, bulbo, fração acetato de etila; E3BFA: Coleta 3, bulbo, fração acetato de etila; E1BEE: Coleta 1, bulbo, extrato etanólico; E2BEE: Coleta 2, bulbo, extrato etanólico; E3BEE: Coleta 3, bulbo, extrato etanólico.

Dessa forma, a análise multivariada no presente estudo mostrou que os compostos encontrados em maiores quantidades no perfil químico foram: licorina (**13**), vitatina (**24**), hidroxivitatina (**31**), hidroxihomolicorina (**38**), licoramina (**39**), e norlicoramina (**48**), que definiram a formação de três grupos de acordo com a análise de agrupamento (Figura 6).

Em relação ao agrupamento das variáveis (tipo de extrato/fração, parte da planta, período de coleta, rendimento e alcaloides identificados) envolvidas nesse estudo, os grupos foram caracterizados como: Grupo 1: E1FEE, E2FEE e E3FEE com hidroxihomolicorina (**38**) (12,1-12,9%) e rendimento (12,3%); Grupo 2: E1FFA, E2FFA, E1BFA, E2BFA e E3BFA com licorina (**13**) (45,6-49,4%), vitatina (**24**) (6,5-16%), hidroxivitatina (**31**) (2,0-15,7%), licoramina (**39**) (3,8-6,2%), 8-O-desmetilmaritidina (**40**) (1,8-2,0%), anidrolícorina (**41**) (0,6-1,6%), cherilina (**47**) (0,9%), UK^a (4-12%), UK^b (6,6-18,8%), norlicoramina (**48**) (4,6-8,0%) e

rendimento (2,6%); Grupo 3: E1BEE, E2BEE, E3BEE e E3FFA com licorina (**13**) (21,1-45,8%) e rendimento (13,4%) (Figura 6 e 7).

De acordo com a análise de componentes principais (Figura 7), o componente principal primário representou 59,46% da variância total e foi positivamente relacionado aos compostos licorina (**13**) ($r=0,75$), vitatina (**24**) ($r=0,82$), hidroxivitatina (**31**) ($r=0,85$), licoramina (**39**) ($r=0,85$), norlicoramina (**48**) ($r=0,79$); e negativamente com hidroxihomolicorina (**38**) ($r=-0,61$) e rendimento ($r=-0,53$). O componente principal secundário representou 13,86% da variação total e correlacionou-se positivamente com os alcaloides 8-O-desmetilmaritidina (**40**) ($r=0,85$), anidrolícorina (**41**) ($r=0,92$), cherilina (**47**) ($r=0,73$), UK^a ($r=0,82$) e UK^b ($r=0,74$); e negativamente com hidroxivitatina (**31**) ($r=-0,05$), hidroxihomolicorina (**38**) ($r=-0,18$) e rendimento ($r=-0,2$).

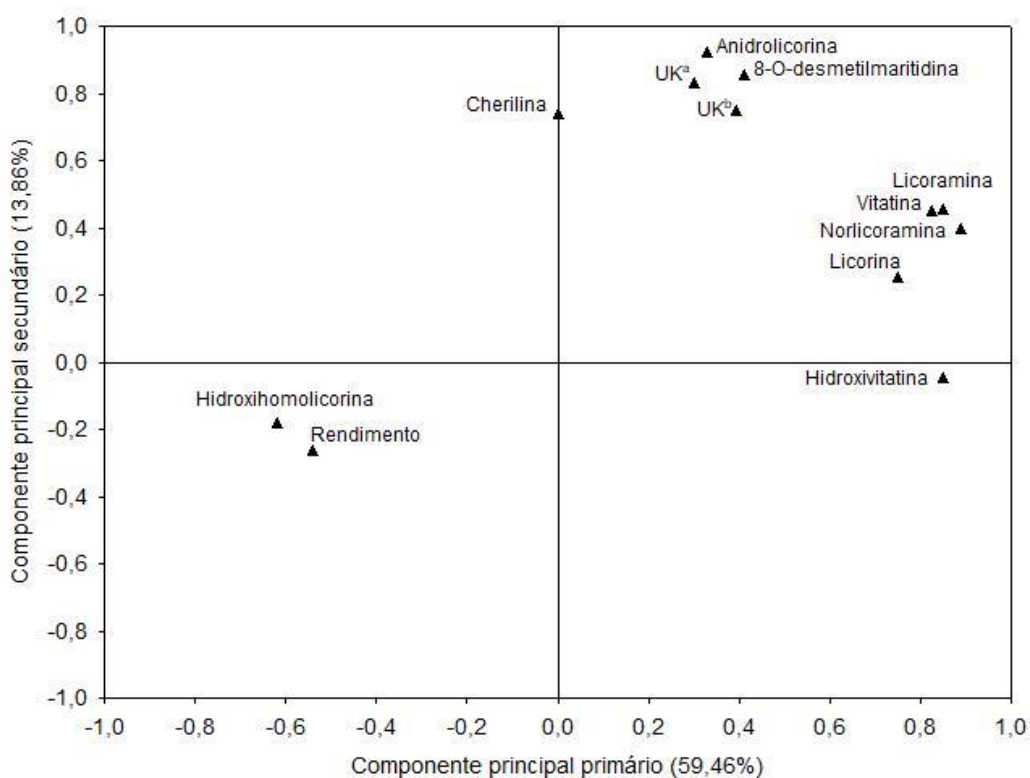


Figura 7. Distribuição dos alcaloides identificados em *Hippeastrum goianum* em relação aos dois principais componentes, por meio da análise de componentes principais (ACP).

Houve alta correlação positiva entre alguns compostos identificados nos extratos e frações analisadas de folhas e bulbos de *H. goianum* (Tabela 3). Entre os compostos do grupo II, a vitatina (**24**) mostrou uma correlação positiva e forte com norlicoramina (**48**) ($r=0,97$) e

uma correlação significativa com anidrolicorina (**41**) ($r=0,74$) e UK^b ($r=0,76$). A licoramina (**39**) foi correlacionada com compostos de vitatina (**24**) ($r=0,93$); 8-O-desmetilmaritidina (**40**) ($r=0,72$) e anidrolicorina (**40**) ($r=0,70$). Uma forte correlação foi observada no composto 8-O-desmetilmaritidina (**40**) com anidrolicorina (**41**) ($r=0,93$); UK^a ($r=0,89$) e UK^b ($r=0,87$).

Anidrolicorina (**41**) também mostrou uma forte correlação com UK^b ($r=0,92$) e uma correlação significativa com UK^a ($r=0,78$). Cherilina (**47**) mostrou uma correlação significativa com UK^a ($r=0,74$). Hidroxivitatina (**31**) também apresentou correlação significativa com a norlicoramina (**48**) ($r=0,76$). Entre os compostos do grupo I, a hidroxihomolicorina (**38**) apresentou moderada correlação negativa com licoramina (**39**) ($r=-0,56$). Em relação aos compostos do grupo III, licorina (**13**) apresentou correlação positiva moderada com a licoramina (**39**) ($r=0,69$). Coeficientes de correlação acima de 0,70 foram observados entre os compostos não identificados (UK^a e UK^b).

Tabela 3. Cálculo de correlação para os alcaloides identificados (C01 a C11) e rendimento dos extratos e frações obtidos em diferentes coletas de folhas e bulbos do *Hippeastrum goianum*.

Alcaloide	C02	C03	C04	C05	C06	C07	C08	C09	C10	C11	R
C01	-0,66	0,69	0,63	0,52	0,47	0,26	0,48	0,43	0,56	0,67	-0,36
C02		-0,56	-0,52	-0,41	-0,38	-0,21	-0,37	-0,35	-0,44	-0,54	-0,05
C03			0,93	0,72	0,70	0,34	0,60	0,68	0,67	0,94	-0,64
C04				0,69	0,74	0,27	0,49	0,76	0,58	0,97	-0,66
C05					0,93	0,48	0,89	0,87	0,38	0,69	-0,32
C06						0,59	0,78	0,92	0,15	0,67	-0,43
C07							0,74	0,22	0,06	0,30	-0,31
C08								0,56	0,44	0,57	-0,25
C09									0,14	0,66	-0,37
C10										0,76	-0,36
C11											-0,63

(C01) licorina, (C02) hidroxihomolicorina, (C03) licoramina, (C04) vitatina, (C05) 8-O-desmetilmaritidina, (C06) anidrolicorina, (C07) cherilina, (C08) UK^a, (C09) UK^b, (C10) hidroxivitatina, (C11) norlicoramina. R: rendimento.

A análise multivariada (Figura 6 e 7) e correlação (Tabela 3) mostraram que a variável rendimento, não apresentou correlação positiva com qualquer dos alcaloides identificados nos extratos e frações de folhas e bulbos obtidos em diferentes períodos de coleta, indicando que não há correlação rendimento e o perfil químico.

O agrupamento das amostras analisadas com base na similaridade dos alcaloides sugeriu que o principal fator responsável pela variabilidade dos compostos alcaloídicos identificados, seja o tipo de extrato e parte da planta, enquanto que o período de coleta não apresentou influência significativa (Figura 6 e 7).

Embora a análise multivariada não tenha mostrado diferença estatística do período de coleta em relação à composição química dos alcaloides identificados no perfil químico, é importante ressaltar que cherilina (**47**) foi identificada apenas em um extrato referente a outubro/2017 (Tabela 2).

Outro dado importante refere-se a licorina (**13**), detectado no extrato etanólico de bulbos, que no período de outubro/2017 apresentou quase o dobro da porcentagem relativa em relação aos demais períodos de coleta (Tabela 2).

Os alcaloides mais comumente detectados e relatados em trabalhos envolvendo espécies do gênero *Hippeastrum* são galantamina (**1**), montanina (**11**), licorina (**13**), tazetina (**14**), haemantamina (**16**), e homolicorina (**28**) (GUO, 2015; SEBBEN et al., 2015; BESSA et al., 2017). Entretanto, no presente estudo, dos esqueletos mais comuns em *H. goianum*, apenas licorina (**13**) (21,1-49,4%) foi detectado como composto majoritário e característico. Contudo, outros compostos como vitatina (**24**) (6,5-16%), hidroxivitatina (**31**) (2-15,7%), hidroxihomolicorina (**39**) (1,1-19,1%), cherilina (**47**) (0,9%) e norlicoramina (**48**) (4,6-8%) foram identificados, com ênfase para cherilina (**47**) e norlicoramina (**48**), pois esse é o primeiro relato de ambos os compostos para o gênero *Hippeastrum*.

A grande variabilidade dos compostos observados nos extratos e frações de *H. goianum*, pode estar relacionada à capacidade do precursor O-metilnorbeladina na biossíntese de diferentes alcaloides de Amaryllidaceae (BASTIDA et al., 2006; ANDRADE et al., 2012).

Essa informação poderia justificar as fortes correlações (acima de 0,80) observadas entre alcaloides como vitatina (**24**) e norlicoramina (**48**); vitatina (**24**) e licoramina (**39**); 8-O-desmetilmaritidina (**37**) com anidrolícorina (**41**), UK^a e UK^b; anidrolícorina (**41**) com UK^b (Tabela 3), uma vez que a via de síntese dos compostos que possuem intermediários comuns, pode ter fortes correlações. Ou seja, quando há síntese de um composto, poderá haver síntese de outro também.

As informações referentes às correlações entre os compostos não identificados (UK^a e UK^b) podem ser relevantes durante o processo de identificação dos mesmos, principalmente devido à possibilidade de serem isômeros entre si, ou mesmo isômeros de compostos conhecidos.

4.4 ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE

A atividade biológica do *Hippeastrum goianum* em relação à inibição da acetilcolinesterase é consequência da composição química de seus extratos (GIORDANI et al., 2008).

Foi avaliada a atividade de inibição da acetilcolinesterase em extratos brutos etanólicos (EEtOH), frações acetato de etila (FACoEt) e aquosas (FA) obtidos a partir de folhas e bulbos coletados em diferentes períodos. O ensaio *in vitro* foi realizado por meio do método desenvolvido por ELLMAN et al. (1961) e modificado por LÓPEZ et al. (2002) em placa de 96 poços. Como controle positivo foi utilizado galantamina (1) e fisostigmina (9).

Os resultados obtidos, referentes à curva de calibração dos controles positivos na atividade de inibição da AChE e suas respectivas porcentagens de inibição (PI), são apresentados na Figura 8. Por sua vez, os resultados referentes à porcentagem de inibição dos extratos e frações, em função da parte da planta e época de coleta estão sumarizados na Tabela 4.

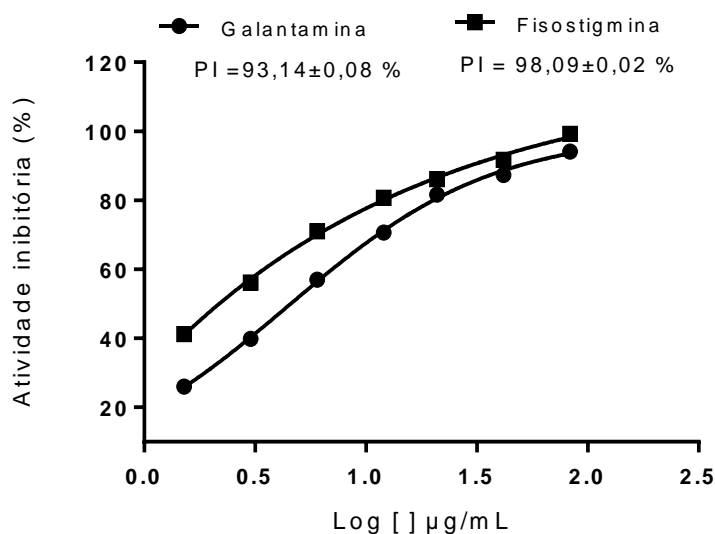


Figura 8. Curva dose-resposta da galantamina e fisostigmina usados na atividade de inibição da AChE e seus respectivos porcentagem de inibição máxima (PI).

A galantamina (1) é reconhecida como um potente inibidor da enzima acetilcolinesterase e utilizada na terapia de controle sintomático da doença de Alzheimer (CORTES et al., 2015), enquanto que a fisostigmina (9) é um potente inibidor reversível de curta duração da AChE (MUKHERJEE et al., 2007).

A Tabela 4 mostra que a análise de variância (ANAVA) dos extratos e frações (EEtOH, FAcOEt e FA), quando testados a uma concentração de 500 µg/mL, revelou uma interação significativa ($p < 0,05$) entre os períodos de coleta e as partes da planta. Todas as amostras analisadas, com exceção das frações aquosas, apresentaram atividade de inibição acima de 55%, independentemente do tipo de amostra e parte da planta.

A Tabela 4 também mostra que, com relação à atividade de inibição da AChE, os extratos etanólicos brutos (EEtOH) dos bulbos diferiram estatisticamente das folhas, em todas as coletas realizadas. Os bulbos apresentaram uma atividade de inibição da AChE superior. Variações quanto ao teor de alcaloides em uma mesma espécie podem ocorrer devido à variação ontogênica, uma vez que durante o período biológico, a concentração de alcaloides variam entre os diversos tecidos da planta (HANKS, 2003). Por exemplo, em um estudo com extrato metanólico de folhas e bulbos de *Crinum jagus* L. (ELUFIOYE et al., 2010), os autores observaram que o extrato das folhas apresentou uma porcentagem de inibição da AChE superior em comparação com os bulbos (74,25% e 42,87%, respectivamente).

VINUTHA et al. (2007), em seu estudo de inibição da AChE com extratos metanólicos e aquosos de plantas medicinais indianas, propôs a classificação dos extratos analisados em: inibidores potentes ($> 50\%$ de inibição), inibidores moderados (30-50% de inibição) e inibidores fracos ($< 30\%$ de inibição). Todos os extratos etanólicos de folhas e bulbos, analisados no presente estudo, apresentaram uma taxa de inibição enzimática alta ($> 60\%$). Com base nessa classificação, são inibidores potentes da AChE.

Com relação às coletas, o extrato de bulbos obtidos em outubro/2017 foi o que apresentou a maior porcentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase (79,96%), enquanto que maio/2018 foi o melhor período para o extrato de folhas, com 67,47% (Tabela 4). Tal achado, mostra a importância do estudo da sazonalidade das espécies vegetais para o conhecimento do momento em que a planta apresentará a melhor atividade biológica.

A Tabela 4 também mostra que nas frações acetato de etila (FAcOEt), a porcentagem de inibição de bulbos em relação a folhas difere estatisticamente apenas nos meses de outubro/2017 e maio/2018, nos quais os bulbos mostraram um taxa de inibição da enzima acetilcolinesterase superior à das folhas. A porcentagem de inibição da AChE da fração acetato de etila dos bulbos referente a coleta de maio/2018 (Tabela 4), foi numericamente maior que todos os demais extratos e frações analisados nos diferentes períodos. A melhor atividade das frações acetato de etila dos bulbos em comparação com as folhas, pode ser facilmente explicada, pela maior variabilidade de compostos identificados no perfil químico para essa fração (Tabela

2), além de que os bulbos desempenham uma importante função de reserva para as plantas. Ainda, devido as frações, corresponderem aos compostos enriquecidos de alcaloides, que por sua vez são inibidores da acetilcolinesterase (CORTES et al., 2015). A atividade dos alcaloides na inibição da AChE é atribuída às suas complexas estruturas de nitrogênio, que quando carregadas positivamente ligam-se facilmente no sítio ativo da AChE, desencadeando um bloqueio competitivo da enzima (HOSTETTMANN et al., 2006).

Tabela 4. Porcentagem de inibição dos extratos e frações (EEtOH/FAcOEt/FA), em função da parte da planta (folha e bulbo) de *Hippeastrum goianum* e época de coleta.

Amostra	Parte vegetal	Coleta		
		Outubro/2017	Fevereiro/2018	Maior/2018
		%		
EEtOH	Bulbos	79,96 aA	70,10 aC	74,94 aB
	Folhas	63,21 bC	65,43 bB	67,47 bA
CV-a (%) = 0,74				
CV-b (%) = 0,57				
FAcOEt	Bulbos	84,12 aB	85,72 aB	89,53 aA
	Folhas	76,44 bB	85,72 aA	73,23 bC
CV-a (%) = 1,88				
CV-b (%) = 0,90				
FA	Bulbos	41,85 aA	42,39 aA	54,17 bB
	Folhas	27,15 bB	42,39 aA	24,51 aB
CV-a (%) = 2,81				
CV-b (%) = 5,07				
Galantamina ¹				93,14
Fisostigmina ¹				98,09

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para interpretação uma comparação entre letras minúsculas é feita na vertical e entre letras maiúsculas na horizontal. CV-a = coeficiente de variação nas parcelas. CV-b = coeficiente de variação nas parcelas subdivididas; 1: padrões.

A Tabela 4 também mostra que para as folhas, a maior porcentagem de inibição enzimática foi observada na fração acetato de etila durante o período de fevereiro/2018 (85,72%), sendo considerada portanto, a melhor época de coleta para essa parte vegetal, visando sua utilização na atividade biológica. Ao passo que para os bulbos, maio/2018 foi o período que apresentou a maior atividade, onde foi verificado na fração acetato de etila uma taxa de inibição de 89,53%. Tal fato pode ser justificado devido a maior variabilidade de alcaloides identificados no perfil químico, durante os períodos de fevereiro/2018 e maio/2018 (Tabela 2), uma vez que

os compostos alcaloídicos são considerados potentes inibidores da enzima AChE, por apresentarem efeitos colinérgicos reversíveis sobre a enzima (ARAÚJO et al., 2016).

Com relação às frações aquosas (FA), ainda na Tabela 4, as amostras analisadas foram consideradas de fracas a moderadas inibidores da AChE, de acordo com a classificação proposta por VINUTHA et al. (2007), com exceção a FA dos bulbos referente a coleta de maio/2018, que apresentou uma porcentagem de inibição de 54,17%, podendo ser considerada dessa forma uma potente inibidora da acetilcolinesterase. De modo geral, todas as frações aquosas apresentaram a menor atividade de inibição da AChE, quando comparadas com as demais amostras analisadas, que apresentaram uma taxa inibitória superior a 60%. (Tabela 4). O que reforça o fato de que essas amostras carecem de compostos alcaloídicos, uma vez que no perfil químico não foi possível identificar alcaloides nessas frações.

A distribuição dos alcaloides nas folhas e bulbos desta espécie em diferentes períodos de coleta resultou em um contraste da atividade de inibição desta enzima em relação aos diferentes tipos de extratos e frações obtidos durante os três períodos de coleta. Esses achados concordam com os observados em outros estudos, que relataram diferenças significativas na atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase em diferentes tipos de extratos obtidos de folhas e bulbos de espécies dos gêneros *Narcissus*, *Crinum* e *Hippeastrum* (Amaryllidaceae) (LÓPEZ et al., 2002; CAHLÍKOVÁ et al., 2011; ANDRADE et al., 2016; SHAWKY, 2017).

Embora a análise multivariada do perfil químico não tenha mostrado diferenças estatísticas em relação aos alcaloides identificados em diferentes períodos (Figura 6 e 7), a análise de variância da atividade inibitória da AChE mostrou uma diferença estatística, embora pequena, em relação aos diferentes períodos de coleta e partes da planta analisadas (Tabela 4).

No geral, esses achados permitiram observar que, quanto à atividade de inibição da AChE, fevereiro/2018 foi a melhor época de coleta, visto que a fração acetato de etila das folhas e de bulbos apresentaram atividade de inibição semelhante, o que pode ser interessante, pois a utilização do material vegetal folha auxilia a preservação da espécie, pois preserva o bulbo e, consequentemente, o espécimen.

Os resultados apresentados para a atividade de inibição da acetilcolinesterase sugerem que a capacidade inibição dos extratos e frações obtidos por diferentes partes da planta de *H. goianum* seja atribuída à composição química dos alcaloides presentes em cada amostra. Em um estudo sobre a relação estrutura-atividade de 24 alcaloides isolados em diferentes espécies de Amaryllidaceae, quanto à inibição da AChE, ELGORASHI et al. (2006) observaram que os

compostos substituintes tanto do anel aromático quanto do anel-C desempenham papéis importantes na inibição desta enzima.

Assim a atividade biológica do *H. goianum* em relação à inibição da acetilcolinesterase está atrelada à composição química de seus extratos e frações. Este é o primeiro relato da influência da sazonalidade na atividade de inibição da AChE na espécie *H. goianum* com relação aos diferentes períodos de coleta e partes da planta analisadas, mostrando a importância da análise da sazonalidade química em espécies vegetais, a fim de estabelecer e monitorar qual o período e parte da planta apresentará melhor atividade. E com base nos resultados obtidos, é possível sugerir que tanto as folhas quanto os bulbos da espécie em estudo, têm grande potencial terapêutico para a doença de Alzheimer.

5 CONCLUSÃO

Este estudo destacou que *Hippeastrum goianum* é uma fonte potencial de alguns alcaloides de importância farmacológica. No entanto, esta espécie endêmica é considerada ameaçada de extinção. Assim, estudos sobre conservação e uso racional dessa planta são obrigatórios.

Foram identificados onze alcaloides no perfil químico. Desses, licorina foi o composto mais abundante identificado tanto em folhas quanto em bulbos, em todas as coletas realizadas.

Dos onze compostos detectados, licorina (**13**), vitatina (**24**), hidroxivitatina (**31**), hidroxihomolicorina (**39**), licoramina (**39**) e norlicoramina (**48**) foram os mais abundantes. Pela primeira vez, cherilina (**47**) e norlicoramina (**48**) são descritas para o gênero *Hippeastrum*. Além disso, vitatina (**24**), hidroxivitatina (**31**), hidroxihomolicorina (**38**), licoramina (**39**), 8-O-desmetilmaritidina (**40**), anidrolícorina (**41**) são descritas pela primeira vez em *H. goianum*.

O período de fevereiro/2018 apresentou a maior variabilidade de compostos identificados no perfil químico, enquanto que em outubro/2017 foi observado a menor variabilidade de alcaloides. Entretanto a análise multivariada sugere que a sazonalidade não apresentou influência significativa no perfil químico apresentado pela espécie *H. goianum*.

Para a atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase a análise de variância mostrou que a sazonalidade influenciou na atividade biológica, sendo que maio/2018 apresentou a melhor atividade de inibição para os bulbos, enquanto que para as folhas o melhor período foi em fevereiro/2018.

Esse é o primeiro relato da influência da sazonalidade na atividade de inibição da AChE na espécie *H. goianum* em relação aos diferentes períodos de coleta e partes da planta analisadas.

Esses achados podem contribuir para a preservação da espécie que atualmente encontra-se na lista de espécies vegetais ameaçadas de extinção, bem como a manutenção e conservação do espécimen em seu habitat natural.

REFERÊNCIAS

AMARAL, A. C. **Amaryllidaceae Jaume St.-Hil.: levantamento das espécies do Distrito Federal, Brasil, e estudos de multiplicação *in vitro***. 2007. 132 (Mestrado) Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

AMARAL, A. C. ***Habranthus* Herb.(Amaryllidaceae) no Brasil: estudo taxonômico, caracterização morfológica e relações filogenéticas**. 2011. 186 (Doutorado). Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

AMARAL, J. **Estudos das variações sazonais e intrapopulacional dos metabólitos secundários majoritários das folhas de *Eremanthus glomerulatus* Less (Asteraceae)**. 2008. 156 (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

ANDRADE J. P. Análise química e biológica em alcaloides do gênero *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). 2007. 121 (Mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, RS.

ANDRADE, J. P. et al. The Brazilian Amaryllidaceae as a source of acetylcholinesterase inhibitory alkaloids. **Phytochemistry reviews**, v. 15, n. 1, p. 147-160, 2016.

ANDRADE, J. P. et al. Crinine-type alkaloids from *Hippeastrum aulicum* and *H. calyptratum*. **Phytochemistry**, v. 103, p. 188-195, 2014.

ANDRADE, J. P. et al. Alkaloids from the *Hippeastrum* genus: chemistry and biological activity. **Revista latinoamericana de química**, v. 40, n. 2, p. 83-98, 2012.

ANDRADE, J. P. D. et al. Alkaloids from *Hippeastrum papilio*. **Molecules**, v. 16, n. 8, p. 7097-7104, 2011.

ARAÚJO, A. S.; PONDÉ, M. P. Eficácia da memantina na doença de Alzheimer em seus estágios moderado a grave. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 55, n. 2, p. 148-153, 2006.

ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. D. A.; GONSALVES, A. Acetilcolinesterase-AChE: uma enzima de interesse farmacológico. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818-1834, 2016.

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

BASTIDA, J.; LAVILLA, R.; VILADOMAT, F. Chemical and biological aspects of *Narcissus alkaloids*. **Journal the alkaloids: chemistry and biology**, v. 63, n. 2, p. 87-179, 2006.

BASTOS, L. A.; FERREIRA, I. M. Composições fitofisionômicas do bioma cerrado: estudo sobre o subsistema de Vereda. **Espaço em Revista**, v. 12, n. 1, p. 97-108, 2010.

BATISTA, A. S. **Identificação da qualidade e origem de amêndoas de cacau produzidas no estado da bahia usando quimiometria**. 2018. 75 (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia, BA.

BENINI, E. B. et al. Valorização da flora nativa quanto ao potencial fitoterápico. **Revista destaques acadêmicos**, v. 2, n. 3, p. 73-78, 2011.

BERKOV, S. et al. Development and validation of a GC–MS method for rapid determination of galanthamine in *Leucojum aestivum* and *Narcissus ssp.*: A metabolomic approach. **Talanta**, v. 83, n. 5, p. 1455-1465, 2011.

BESSA, C. D. et al. Identification of alkaloids from *Hippeastrum aulicum* (Ker Gawl.) Herb.(Amaryllidaceae) using CGC-MS and ambient ionization mass spectrometry (PS-MS and LS-MS). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 5, p. 819-830, 2017.

BESSA, C. D. P. B. **Estudo Químico e Biológico em alcaloides de *Hippeastrum aulicum* (KER GAWL.) HERB.: uma espécie da família Amaryllidaceae**. 2016. 112 (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES.

BIODIVERSITAS. **Lista da flora brasileira ameaçada de extinção**. Belo Horizonte: Biodiversitas, 23 p. 2006.

BOTTEGA, E. L. et al. Variabilidade espacial de atributos do solo em sistema de semeadura direta com rotação de culturas no cerrado brasileiro. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 1, p. 1-9, 2013.

BRASIL. **Consolidado de normas da COFID (Versão V)**. Brasília: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, p.737, 2015.

BRASIL. **Protocolo Clínico de Diretrizes Terapêuticas para a Doença de Alzheimer**. Brasília: Ministério da Saúde. p.38. 2017.

CAHLÍKOVÁ, L. et al. Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by GC/MS and their cholinesterase activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 575-580, 2011.

CARVALHO, K. R. **Alcaloides bioativos e fenólicos de *Hippeastrum solandriiflorum* (Lindl.) - Amaryllidaceae**. 2014. 140 (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE.

COÊLHO, M. R. V. **Evidências de sucessão e dos efeitos da sazonalidade em uma comunidade vegetal sobre um afloramento rochoso na Serra da Jibóia, Santa Terezinha, Bahia, Brasil**. 2013. 47 (Trabalho de conclusão de curso - TCC). Programa de Graduação em Bacharelado em Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das almas, BA.

CORTES, N. et al. 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.

DANCEY, C.; REIDY, J. **Estatística Sem Matemática para Psicologia**. 7ª Edição. Porto Alegre: Penso Editora, 2018.

DORES, R. D. **Análise morfológica e fitoquímica da fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.)**. 2007. 396 (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

ELGORASHI, E. et al. Quantitative structure–activity relationship studies on acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. **South African Journal of Botany**, v. 72, n. 2, p. 224-231, 2006.

ELISHA, I. L. **Characterization of an acetylcholinesterase inhibitor isolated from *Ammocharis coranica* (Amaryllidaceae)**. 2013. 89 (Master). Faculty of Veterinary Sciences, University of Pretoria, Pretoria, South Africa.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

ELUFIOYE, T. O. et al. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some selected Nigerian medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 472-477, 2010.

FELIX, W. J. P.; ALMEIDA, A.; FELIX, L. Citogenética de duas espécies de *Zephyranthes* Herb.(Amaryllidaceae-Hippeastreae) cultivadas. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 294-296, 2007.

FERNANDES, T. O. M. **Variação sazonal no óleo essencial e densidade de tricomas de acessos de erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.)**. 2017. 47 (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, MG.

FLORA, 2012. Centro Nacional de Conservação da Floras. Disponível em: <<http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Hippeastrum>>. Acessado em mai. 2018.

FORLENZA, O. V. **Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer**. *Revista Psiquiatria Clínica*, v. 32, n. 3, p. 137-148, 2005.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GIORDANI, R. B. et al. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2042-2046, 2008.

GIORDANI, R. B. et al. Alkaloids from *Hippeastrum morelium* Lem. (Amaryllidaceae). **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 49, p. 668-672, 2011

GIROLDO, A. B. **Pequenas plantas, grandes estratégias: adaptações e sobrevivência no Cerrado**. 2017. 62 (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOMES, A. D.; LIMA, R. A.; FACUNDO, V. A. Identification of the class of secondary metabolites of fruit extract ethanolic *solanum acanthodes* hook and its potential on fungicidal *candida albicans* *in vitro*. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, n. 2, p. 736-744, 2014.

GUIMARÃES, N. F. et al. Análise dos alcaloides nos diferentes órgãos de *Hippeastrum X hibrydum* Hort. (2017). XIX Congresso de Iniciação Científica da UMC. Universidade de Mogi das Cruzes. Mogi das Cruzes, São Paulo.

GUO, Y. **Research on the Alkaloids of Amaryllidaceae plants: genera *Lycoris* and *Hippeastrum***. 2015. 196 (Thesis). Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona.

HANKS, G. R. **Narcissus and daffodil: the genus *Narcissus***. 1ª Edição. United Kingdom: Taylor & Francis library. 2003.

HOSHINO, O. The amaryllidaceae alkaloids. **Journal The Alkaloids: Chemistry and Biology**, v. 51, n. 1. p. 323-376. 1998.

HOSTETTMANN, K. et al. Natural product inhibitors of acetylcholinesterase. **Current Organic Chemistry**, v. 10, n. 8, p. 825-847, 2006.

JAMAL, C. M. et al. **Isolated and / or identified alkaloids of *Hippeastrum puniceum* (LAM.) Kuntze (Amaryllidaceae).** (2017). Brazilian Conference On Natural Products. Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES.

KAUR, R.; MATTA, T.; KAUR, H. Plant Derived Alkaloids. **Journal of Life Sciences**, v. 2, n. 5, p. 154-159, 2017.

KHANAHMADI, M.; FARHUD, D. D.; MALMIR, M. Genetic of Alzheimer's disease: A narrative review article. **Iranian journal of public health**, v. 44, n. 7, p. 892-901, 2015.

KLEIN, A. L. Eugen Warning e o cerrado brasileiro: Um século depois. 1ª Edição. Editora UNESP. São Paulo. 2000.

KONRATH, E. L. **Química e atividades antioxidante e anticolinesterásica de espécies de *Huperzia* e *Lycopodium*.** 2011. 189 (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, RS.

LENZA, E. et al. Comparação da vegetação arbustivo-arbórea de uma área de cerrado rupestre na Chapada dos Veadeiros, Goiás, e áreas de cerrado sentido restrito do Bioma Cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 34, n. 3, p. 247-259, 2011.

LÓPEZ, S. et al. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts. **Life sciences**, v. 71, n. 21, p. 2521-2529, 2002.

LUBBE, A. et al. Seasonal accumulation of major alkaloids in organs of pharmaceutical crop Narcissus Carlton. **Phytochemistry**, v. 88, n. 1, p. 43-53, 2013.

MAGALHÃES, M. et al. Influência da sazonalidade nos processos de regeneração espontânea na serra Madureira-Mendanha, RJ. 05 (2005). VI SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE ÁREAS DEGRADADAS, e II CONGRESSO LATINO AMERICANO DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

MANOLOV, S. P. et al. A brief review of Cherylline synthesis. **Indian Journal Of Chemitry**, v. 54, N. 1, p. 1301-1320, 2015.

MARQUES, G. G. L. **Anatomia do escapo floral e da folha de espécies de *Hippeastrum* Herb. e *Habranthus* Herb.(Amaryllidaceae J. St.-Hil.) ocorrentes no Distrito Federal, Brasil.** 2016. 76 (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

MARQUES, T. H. C. et al. Atividade anticolinesterásica e perfil químico de uma fração cromatográfica ativa do extrato etanólico das flores *Bellis perennis* L.(Asteraceae). **Revista Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 549-553, 2013.

MARTINS, D. H. N. **Avaliação da sazonalidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante de folhas de *Erythroxylum daphnites* Mart.** 2015. 102 (Mestrado). Faulcade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

MARTINS, L. R. R. **Perfil Cromatográfico e Análise Multivariada para o Controle de Qualidade de Amostras Comerciais do gênero *Phyllanthus* (quebra-pedra).** 2008. 154 (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

MENGUAL-MACENLLE, N. et al. Multivariate analysis in thoracic research. **Journal of thoracic disease**, v. 7, n. 3, p. 02-06, 2015.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Desmatamento no Cerrado em 2018.** Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/informma/item/15309-desmatamento-no-bioma-cerrado-em-2018>>. Acessado em Nov. 2018.

MONTEIRO, R. F.; DE OLIVEIRA, R. S. A família Amaryllidaceae no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. **Boletim de Botânica**, v. 28, n. 1, p. 9-13, 2010.

MORAIS, N. et al. Prospecção fitoquímica e avaliação do potencial antioxidante de *Cnidus colusphyllacanthus* (müll. Arg.) Pax&k. hoffm. Oriundo de apodi–RN. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 180-185, 2016.

MORAIS, N. D. A. **Monitoramento sazonal da atividade antioxidante das folhas de *Erythroxylum suberosum* A. St.-Hil.: correlação com o teor de hiperosídeo e isoquercitrina.** 2015. 91 (Mestrado). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

MOREIRA, B. O. **Estudo químico e avaliação das atividades biológicas de *Schinopsis brasiliensis* (Anacardiaceae) e quantificação dos bioativos de *Cenostigma macrophyllum* (Leguminosae).** 2014. 261 (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA.

MU, H.-M. et al. Alkaloid accumulation in different parts and ages of *Lycoris chinensis*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 65, n. 7-8, p. 458-462, 2010.

MUKHERJEE, P. K. et al. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. **Phytomedicine**, v. 14, n. 4, p. 289-300, 2007.

NCUBE, B. et al. Seasonal pharmacological properties and alkaloid content in *Cyrtanthus contractus* NE Br. **South African Journal of Botany**, v. 97, p. 69-76, 2015.

OLIVEIRA, M. **Estudo químico em alcaloides de *Hippeastrum reginae* (L.) herb.(amaryllidaceae).** 2017. 140 (Mestrado). Program de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES.

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

OPAS - ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE -. **Demência em 2017.** Distrito Federal: OPAS. Disponível em: <<https://www.paho.org/bra/>>. Acessado em jul. 2018.

PACHECO, J.; CASADO, S.; PORRAS, S. Exact methods for variable selection in principal component analysis: Guide functions and pre-selection. **Computational statistics & data analysis**, v. 57, n. 1, p. 95-111, 2013.

PASA, M. C.; NETO, G. Estudo etnobotânico em uma área de cerrado no município de Acorizal, Mato Grosso. **FLoVEt-Boletim do Grupo de Pesquisas da Flora, Vegetação e Etnobotânica**, v. 1, n. 1, p. 5-14, 2009.

PEREIRA, B. A. D. S.; VENTUROLI, F.; CARVALHO, F. A. Seasonal forests in the Brazilian savannah: an overview. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, n. 3, p. 446-455, 2011.

PEREIRA, P. B. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marruboides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 533-538, 2010.

PÉREZ-ALONSO, N.; JIMÉNEZ, E. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. **Biotecnología vegetal**, v. 11, n. 4, p. 195-211, 2011.

PRADO, L. A.; MALHEIROS, R. Perda da biodiversidade do cerrado goiano mediante o tráfico ilegal de fauna silvestre. 12 (2012). III Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental, Instituto Brasileiro de Estudo Ambientais, Goiânia, GO.

RIBEIRO, M. C. M. Uso tradicional terapêutico de espécies pertencentes ao gênero vegetal *Eucharis Planchon & Linden* (Amaryllidaceae). **Etnobotânica**, v. 10, n. 1, p.01-93. 2016

ROSA, M. D. **Avaliação da atividade anti-Acanthamoeba castellanii de frações alcalóidicas de diferentes espécies da família Amaryllidaceae e da licorina**. 2017. 78 (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES.

SANTOS, I. D. **Influência dos teores de lignina, holocelulose e extrativos na densidade básica e na contração da madeira e no rendimento e densidade do carvão vegetal de cinco espécies lenhosas do cerrado**. 2008. 57 (Mestrado). Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

SANTOS, J. M.; LAHM, R. A.; BORGES, R. M. R. Avaliação de um estudo de biomas brasileiros mediante sensoriamento remoto: contribuições à formação de professores de Ciências. **Alexandria: Revista de Educação em Ciência e Tecnologia**, v. 2, n. 3, p. 83-105, 2009.

SANTOS, M. R. M. **Composição terpénica e actividade anti-oxidante de plantas e infusões**. 2010. 175 (Mestrado). Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Portugal.

SEBBEN, C. **Investigação química e biológica em *Hippeastrum breviflorum* Herb.(Amaryllidaceae)**. 2005. 140 (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RGS.

SEBBEN, C. et al. New lycosinine derivative from *Hippeastrum breviflorum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 4, p. 353-355, 2015.

SHAWKY, E. In-silico profiling of the biological activities of Amaryllidaceae alkaloids. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 11, p. 1592-1605, 2017.

SILVA, A. et al. Screening for cytotoxic activity of extracts and isolated alkaloids from bulbs of *Hippeastrum vittatum*. **Phytomedicine**, v. 15, n. 10, p. 882-885, 2008.

SILVA, F. A. *Hippeastrum Vittatum* (L´ Her.) Herbert e *Hippeastrum striatum* (Lam.) Moore: análise química e avaliação biológica dos alcaloides isolados. 2005. 207 (Doutorado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS.

SILVA, C. A. G. **Contribuição ao estudo químico e de atividade biológica de *Eugenia dysenterica* Mart. ex. DC. Berg (Myrtaceae)**. 2016a. 128 (Mestrado). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

SILVA, M. D. S. S. D. **Alcaloides de plantas da família Amaryllidaceae: isolamento, caracterização e testes de inibição de Acetilcolinesterase**. 2009. 260 (Doutorado). Departamento de Química Orgânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

SILVA PINHEIRO, E.; DURIGAN, G. Diferenças florísticas e estruturais entre fitofisionomias do cerrado em Assis, SP, Brasil. **Revista Árvore**, v. 36, n. 1, p. 181-193, 2012.

SILVA, R. R. et al. Espécies herbáceas e lenhosas de Leguminosae numa área de Cerrado no Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 4, 2010.

SILVA, S. M. D. **Correlação metabólica entre fungos endofíticos de amaryllidaceae e as plantas hospedeiras na busca por substâncias bioativas**. 2016b. 98 (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Pará, Belém, PA.

SILVEIRA, E. P. Florística e estrutura da vegetação de Cerrado sensu stricto em terra indígena no noroeste do Estado do Mato Grosso. 2010. 62 (Mestrado). Faculdade de Engenharia Florestal, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, MT.

SIRVANIS, M. C.; SOUSA, W. C.; DE AQUINO, G. L. B. A atividade anticolinesterásica in vitro de derivados de furilchalconas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 10, n. 1, p. 1-1, 2013.

SOLETTI, A. G. **Efeitos da sazonalidade sobre a composição química, potencial antimicrobiano, citotóxico e mutagênico dos óleos essenciais e frações diclorometano e acetato de etila de *Piper amplum* e *Piper cernuum***. 2015. 184 (Doutorado), Programa de Doutorado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC.

SOPRANI, L. **Estudo Químico e Biológico de *Hippeastrum puniceum* (lam.) Kuntze (Amaryllidaceae)**. 2017. 79 (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES.

SOUSA, I. J. O. et al. A diversidade da flora brasileira no desenvolvimento de recursos de saúde. **Revista Uningá Review**, v. 31, n. 1, p.35-39. 2018.

SOUZA, R. C. et al. Shifts in taxonomic and functional microbial diversity with agriculture: How fragile is the Brazilian Cerrado? **BMC microbiology**, v. 16, n. 1, p. 16-42, 2016.

STERNER, R. M.; TAKAHASHI, P. Y.; AIMEE, C. Active vaccines for Alzheimer disease treatment. **Journal of the American Medical Directors Association**, v. 17, n. 9, p.11-15, 2016.

TEOFILO, R. F.; MARTINS, J. P. A.; FERREIRA, M. M. Sorting variables by using informative vectors as a strategy for feature selection in multivariate regression. **Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society**, v. 23, n. 1, p. 32-48, 2009.

THAKUR, A. et al. Potential of South African medicinal plants targeting the reduction of A β 42 protein as a treatment of Alzheimer's disease. **Journal of ethnopharmacology**, v. 231, n. 1, p. 363-373, 2019.

TROVÃO, D. M. et al. Variações sazonais de aspectos fisiológicos de espécies da Caatinga. **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, v. 11, n. 3, p. 307-311, 2007.

TUBELIS, D. P. Veredas and their use by birds in the Cerrado, South America: a review. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 3, p. 363-374, 2009.

VERDAN, M. et al. **Alkaloids from *Hippeastrum goianum* (Amarillidaceae)**. Brazilian Conference On Natural Products (2017). Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES.

VICENTE, A. R. **Alcaloides isoquinolínicos e atividade citotóxica in vitro de *Hippeastrum canastrense* J. Dutilh & RS Oliveira (Amaryllidaceae)**. 2016. 207 (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES.

VINUTHA, B. et al. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 109, n. 2, p. 359-363, 2007.

VIOLANTE, I. M. et al. Avaliação in vitro da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2, p. 452-457, 2009.

VOGEL, H. F.; ZAWADZKI, C. H.; METRI, R. Florestas ripárias: importância e principais ameaças. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 4, n. 1, p. 24-30. 2009.

ZANCA, S. S. **Análise fitoquímica sazonal e cultura de tecidos in vitro de *Duroia macrophylla* Huber**. 2015. 136 (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Botânica. Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas, Manaus, AM.