

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

CRISTIAN ALDEMAR GASCA SILVA

ESTUDO QUÍMICO BIOMONITORADO DE ESPÉCIES DE AMARYLLIDACEAE:  
*Crinum latifolium* L. e *Hippeastrum psittacinum* (Ker Gawl.) Herb.

BRASÍLIA

2019

CRISTIAN ALDEMAR GASCA SILVA

ESTUDO QUÍMICO BIOMONITORADO DE ESPÉCIES DE AMARYLLIDACEAE:  
*Crinum latifolium* L. e *Hippeastrum psittacinum* (Ker Gawl.) Herb.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dr. Dâmaris Silveira

Coorientador: Prof. Dr. Warley de Souza Borges

BRASÍLIA

2019

CRISTIAN ALDEMAR GASCA SILVA

ESTUDO QUÍMICO BIOMONITORADO DE ESPÉCIES DE AMARYLLIDACEAE:  
*Crinum latifolium* L. e *Hippeastrum psittacinum* (Ker Gawl.) Herb.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em 14 de agosto de 2019.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dâmaris Silveira (presidente)

Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Masrouah Jamal

Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Espírito Santo

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paloma Michelle de Sales

Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Pérola de Oliveira e Magalhães

Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kicia Karinne Pereira Gomes Copeland

Instituto de Química da Universidade de Brasília

Universidade de Brasília

## AGRADECIMENTOS.

Aos meus pais, Ana Elisa Silva e Aldemar Gasca, meus irmãos Bladimir e Danilo, bem como meu primo Freiman, que me apoiam incondicionalmente na minha vida e na minha trajetória acadêmica.

À professora Dâmaris Silveira por sua orientação profissional e pessoal. Foram quase seis anos de conselhos, bate-papos, sorrisos e puxões de orelha, que contribuíram para eu me tornar o profissional que sou hoje.

Aos professores do LaProNat, Pérola Magalhães, Yris Fonseca e Mauricio Mello, por me acolherem e me ofereceram seu apoio durante meus estudos de mestrado e doutorado.

Ao professor Warley Borges e ao meu amigo e pesquisador Jean P. Andrade da UFES, por me acolherem no laboratório de produtos naturais, e por compartilharem seus conhecimentos em alcaloides de Amaryllidaceae, contribuindo ao enriquecimento da minha tese.

Às professoras Catarina Satie, Elza T. Sakamoto, bem como a Natalia Chermont, que me acolheram no laboratório de Citogenética e mutagênese na USP-RP. Muito obrigado por terem compartilhado seus conhecimentos e por se tornarem grandes amigas e colegas,

Aos integrantes da banca examinadora, seus comentários foram muito importantes para o enriquecimento da versão final do documento final.

Ao time de Amaryllidaceae, 'os Silveira', Kicia e Amanda que em tão pouco tempo se tornaram grandes amigas e colegas. Ao João, que foi companheiro constante na luta durante o doutorado.

Aos técnicos, mestrandos, doutorandos e estagiários do LaProNat e do Laboratório de Controle da Qualidade, pelos anos de aprendizado tanto no âmbito profissional como no pessoal.

O Brasil foi minha segunda casa, me acolheu como se fosse brasileiro. Profissionalmente me deu mais uma graduação, além do meu mestrado e doutorado. Para mim, foi e seguirá sendo um orgulho ter concluído meus estudos em uma das melhores universidades da América Latina, UnB sua linda. Obrigado ao DPG-UnB, CAPES, CNPq e FAP-DF por me permitirem representar seu país em eventos científicos no país e no exterior. Muchas gracias;

Finalmente, aos meus amigos Laís, Nicole, Fernanda, Zita, Patrícia, Kicia, Amanda, João, Emilio, Gustavo, Gilmar, Rosane, Jose, Josias, Rodrigo, além das pessoas maravilhosas do grupo Poliglota. Vocês sempre me presentearam com o seu apoio incondicional e fizeram da minha experiência de vida no Brasil, uma das melhores da minha vida.

## RESUMO

GASCA SILVA, Cristian Aldemar. ESTUDO QUÍMICO BIOMONITORADO DE DUAS ESPÉCIES DE AMARYLLIDACEAE: *Crinum latifolium* L. e *Hippeastrum psittacinum* (Ker Gawl.) Herb. Brasília, 2019. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

Plantas da família Amaryllidaceae produzem um grupo de metabólitos característicos, conhecidos como alcaloides de Amaryllidaceae. Extratos brutos e compostos alcaloídicos dessa família têm mostrado atividades biológicas como antitumoral, antiviral, analgésica, inseticida, antifúngica, anti-inflamatória, neuroprotetora e inibidora da acetilcolinesterase (AChE). Estudos recentes têm focado no seu potencial para o tratamento da Doença de Alzheimer. Apesar da importância dessa família, poucos são os estudos desenvolvidos com Amaryllidaceae ocorrentes no Brasil. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar espécies de Amaryllidaceae ocorrentes no Brasil quanto a composição química e atividades biológicas. As espécies selecionadas foram *Hippeastrum* sp., *H. goianum*, *H. psittacinum*, *Hymenocallis litorallis*, *Habranthus irwinianus* e *Crinum latifolium*. O conteúdo alcaloídico foi determinado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Os estudos de citotoxicidade foram realizados em células de macrófagos murinos RAW 264.7, de hepatocarcinoma humano HepG2 e de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Os extratos etanólicos de bulbos de *C. latifolium* e *H. psittacinum* foram os menos citotóxicos, e após 24 horas de tratamento, concentrações menores a 25 µg/mL mantiveram a viabilidade celular acima de 70 % nas três linhagens celulares. Ambos os extratos apresentaram o maior conteúdo alcaloídico, contendo compostos do tipo licorina, homolicorina, haemantamina, galantamina, tazetina, entre outros. Os dois extratos foram escolhidos para o estudo químico biomonitorado por inibição da AChE. Após extração seletiva de alcaloides foi observado que as frações alcaloídicas de *H. psittacinum* foram menos ativas que o extrato bruto. A fração alcaloídica em acetato de etila de *C. latifolium*, que foi mais ativa que o extrato etanólico bruto (CI<sub>50</sub> 10,9 ± 0,4 µg/mL), perdeu atividade após separação por cromatografia em coluna. No teste de atividade anti-inflamatória em macrófagos, ambos os extratos (nas concentrações 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL) protegeram as células do efeito tóxico do lipopolissacarídeo (1 µg/mL), diminuindo a concentração de óxido nítrico liberado no meio de cultura. No teste de neuroproteção, só *H. psittacinum* protegeu as células SH-SY5Y do dano oxidativo do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 µM), em concentrações menores que 25 µg/mL. Os testes cometa e de micronúcleos mostraram que os dois extratos são seguros para células SH-SY5Y e não geram danos genotóxicos em concentrações menores que 12,5 µg/mL. Este trabalho apresenta novas evidências do potencial anti-inflamatório, neuroprotetor e inibidor da AChE de *Crinum latifolium* e *Hippeastrum psittacinum*, sendo necessários outros estudos *in vitro* e *in vivo* que correlacionem os efeitos dos extratos alcaloídicos nos fatores etiopatológicos da Doença de Alzheimer, para determinar seu potencial como insumo de origem natural para obtenção de um fitoterápico.

**Palavras-chaves:** Amaryllidaceae, alcaloides, acetilcolinesterase, neuroproteção, anti-inflamatório, citotoxicidade.

## ABSTRACT

GASCA SILVA, Cristian Aldemar. BIOMONITORING CHEMICAL STUDY OF TWO SPECIES OF AMARYLLIDACEAE: *Crinum latifolium* L. and *Hippeastrum psittacinum* (KER GAWL.) HERB. Brasília, 2019. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

Plants of the Amaryllidaceae family produce a group of characteristic metabolites known as Amaryllidaceae alkaloids. Crude extracts and alkaloid compounds of the family have shown biological activities such as antitumor, antiviral, analgesic, insecticide, antifungal, anti-inflammatory, neuroprotective, and as acetylcholinesterase inhibitors (AChE). Recent studies have focused on their potential for treating Alzheimer's disease. Despite the importance of the family, there are few studies conducted with Amaryllidaceae occurring in Brazil. Therefore, the present study aimed to evaluate the chemical composition and biological activities of Amaryllidaceae species occurring in Brazil. The species selected were *Hippeastrum* sp., *H. goianum*, *H. psittacinum*, *Hymenocallis litorallis*, *Habranthus irwinianus*, and *Crinum latifolium*. The alkaloid content was determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Cytotoxicity studies were developed in murine macrophages RAW 264.7, human hepatocarcinoma HepG2 and human neuroblastoma SH-SY5Y cells. The ethanolic extracts from bulbs of *C. latifolium* and *H. psittacinum* were the least cytotoxic, and after 24 hours of treatment, concentrations below 25 µg/mL maintained cell viability above 70% in the three cell lines. Both extracts presented the highest alkaloid content with alkaloids with lycorine, homolycorine, haemanthamine, galantamine, and tazettine type skeletons, among others. Both extracts were chosen for a chemical study, bioguided by the inhibition of AChE. After selective alkaloid extraction, *H. psittacinum* fractions were less active than crude extract. AChE inhibitory activity of ethyl acetate fraction of *C. latifolium* (IC<sub>50</sub> 10.9 ± 0.4 µg/mL) - more active than crude extract - was lost after column chromatography separation. In the anti-inflammatory activity test, both extracts (tested at 25 µg/mL, 12.5 µg/mL and 6.25 µg/mL) protected macrophage cells from the toxic effect of lipopolysaccharide (1 µg/mL) by decreasing nitric oxide released into the culture medium. In the neuroprotection test, only *H. psittacinum* protected SH-SY5Y cells from oxidative damage caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 µM) at concentrations below 25 µg/mL. Comet and micronucleus assays showed that both extracts are safe for SH-SY5Y cells and do not generate genotoxic damage at concentrations below 12.5 µg/mL. This research presents new evidence of the anti-inflammatory, neuroprotective and AChE inhibitory potential of *Crinum latifolium* and *Hippeastrum psittacinum* extracts. Further *in vitro* and *in vivo* studies, correlating the effects of alkaloid extracts with the ethiopathological factors of Alzheimer's disease must be developed to determine their potential as natural input to obtain an herbal medicine.

**.Keywords:** Amaryllidaceae, alkaloids, acetylcholinesterase, neuroprotection, anti-inflammatory, cytotoxicity

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1. Alcaloides identificados em Amaryllidaceae brasileiras .....</b>	<b>7</b>
<b>Figura 2. Núcleos estruturais dos alcaloides de Amaryllidaceae .....</b>	<b>15</b>
<b>Figura 3. Metabólitos identificados em <i>Crinum latifolium</i> .....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 4. Alcaloides identificados em <i>Hippeastrum psittacinum</i> .....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 5. Representação esquemática da metodologia empregada .....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 6. Representação esquemática da extração seletiva de alcaloides .....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 7. Alcaloides identificados nos extratos etanólicos de bulbos de Amaryllidaceae</b>	<b>54</b>
<b>Figura 8. Espectro de massas dos alcaloides desconhecidos e presentes no extrato etanólico de bulbos de <i>Crinum latifolium</i> (EA) e <i>Habranthus irwinianus</i> (EB).....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 9. Espectro de massas dos alcaloides desconhecidos e presentes no extrato etanólico de bulbos de <i>Hippeastrum psittacinum</i>.....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 10. Compostos não alcaloídicos identificados nos extratos de <i>Crinum latifolium</i> e <i>Hippeastrum</i> sp.....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 11. Citotoxicidade dos extratos etanólicos de bulbos de Amaryllidaceae em células RAW 264.7 pelo método do Vermelho Neutro .....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 12. Citotoxicidade dos extratos etanólicos de bulbos de Amaryllidaceae em células RAW 264.7 pelo método do WST-8.....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 13. Curva de calibração com óxido nítrico .....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 14. Produção de óxido nítrico em células RAW 264.7 tratadas com os extratos etanólicos de <i>Crinum latifolium</i> (AAS 2712) e <i>Hippeastrum psittacinum</i> (GPS 10874) ....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 15. Produção de óxido nítrico em células RAW 264.7 tratadas por 24 horas com os extratos etanólicos de <i>Crinum latifolium</i> (AAS 2712) e <i>Hippeastrum psittacinum</i> (GPS 10874) antes e depois do estímulo com lipopolissacarídeo (LPS) .....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 16. Citotoxicidade dos extratos etanólicos de bulbos de <i>Crinum latifolium</i> (A) e <i>Hippeastrum psittacinum</i> (B) em células HepG2 pelo método do XTT .....</b>	<b>71</b>

<b>Figura 17. Citotoxicidade dos extratos etanólicos de bulbos de <i>Crinum latifolium</i> (A) e <i>Hippeastrum psittacinum</i> (B) em células SH-SY5Y pelo método do XTT .....</b>	<b>78</b>
<b>Figura 18. Viabilidade em células de neuroblastoma SH-SY5Y tratadas com extratos etanólicos de <i>Crinum latifolium</i> (AAS 2712, A) e <i>Hippeastrum psittacinum</i> (GPS 10874, B), e submetidas ao estímulo citotóxico do peróxido de hidrogênio .....</b>	<b>81</b>
<b>Figura 19. Índice de divisão nuclear (IDN) em células tratadas com os extratos de Amaryllidaceae .....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 20. Frequência de micronúcleos (CBMNs), pontes nucleoplasmáticas (CBPNs) e brotos nucleoplasmáticos (CBBNs) em 1000 células binucleadas de neuroblastoma SH-SY5Y .....</b>	<b>84</b>
<b>Figura 21. Ausência de dano no DNA em células de neuroblastoma SH-SY5Y tratadas com os extratos etanólicos de bulbos de <i>Crinum Latifolium</i> (AAS 2712) e <i>Hippeastrum psittacinum</i> (GPS 10874), avaliado pelo ensaio cometa .....</b>	<b>86</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil alcaloídico dos extratos de bulbos de <i>Crinum latifolium</i> .....	55
Tabela 2. Perfil alcaloídico dos extratos de bulbos de <i>Hippeastrum</i> sp., <i>Habranthus irwinianus</i> e <i>Hippeastrum goianum</i> .....	55
Tabela 3. Perfil alcaloídico dos extratos de bulbos de <i>Hippeastrum psittacinum</i> .....	56
Tabela 4. Compostos esteroidais e terpênicos identificados nos extratos de Amaryllidaceae .....	59
Tabela 5. Viabilidade celular dos extratos etanólicos de espécies de Amaryllidaceae .....	62
Tabela 6. Citotoxicidade em células RAW 264.7 e atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos etanólicos de <i>Crinum latifolium</i> , <i>Hippeastrum</i> sp. e <i>Hippeastrum psittacinum</i> .....	62
Tabela 7. Atividade de inibição da acetilcolinesterase e porcentagem de rendimento dos extratos etanólicos e frações alcaloídicas de <i>Crinum latifolium</i> (AAS 2712) e <i>Hippeastrum psittacinum</i> (GPS 10874) .....	73
Tabela 8. Rendimento e atividade biológica das sub-frações alcaloídicas de <i>Crinum latifolium</i> após separação por cromatografia em coluna .....	74
Tabela 9. Alcaloides identificados nas sub-frações alcaloídicas de <i>Crinum latifolium</i> .....	75

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1. Alcaloides identificados em Amaryllidaceae brasileiras .....</b>	<b>3</b>
<b>Quadro 2. Alcaloides identificados em <i>Crinum latifolium</i> .....</b>	<b>19</b>
<b>Quadro 3 Espécies de Amaryllidaceae estudadas nesse trabalho .....</b>	<b>37</b>
<b>Quadro 4. Condições CG-EM para análise de alcaloides .....</b>	<b>38</b>
<b>Quadro 5. Alcaloides identificados nos extratos de Amaryllidaceae e classificação por tipo de núcleo alcaloídico .....</b>	<b>53</b>

## TABELA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade antioxidante
$\alpha$ -Amil	$\alpha$ -amilase
AAS	<i>Crinum latifolium</i>
A $\beta$	Proteína $\beta$ -amiloide
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChEi	Inibidores de acetilcolinesterase
ACN	Acetonitrila
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Agi	Aparato de Golgi
$\alpha$ -Gli	$\alpha$ -glicosidase
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American type culture collection</i>
CAT	Catalase
CBBNs	Brotos nucleoplasmáticos em células binucleadas
CBMN <sub>s</sub>	Micronúcleos em células binucleadas
CBPN <sub>s</sub>	Pontes nucleoplasmáticas em células binucleadas
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50 % da viabilidade celular
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
COX	Ciclooxigenase
DA	Doença de Alzheimer
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DN	Doença neurodegenerativa
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
E <sub>Aq</sub>	Extrato aquoso
EE	Extrato etanólico
E <sub>MeOH</sub>	Extrato metanólico
EH	Extrato hexânico
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EtOH	Etanol
FAP-DF	Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal
F <sub>alcs</sub>	Frações alcaloídicas

F <sub>(AcOEt)</sub>	Fração acetato de etila
F <sub>(AcOEt/MeOH)</sub>	Fração acetato de etila/metanol 1:1
Fc	Fração
F <sub>(hex)</sub>	Fração hexano
FDA	Food and Drug Administration
FNKB	Factor nuclear Kappa-B
FRAP	Poder oxi-reductor de ferro
FtH	Fitohemaglutinina
GPS	<i>Hippeastrum psittacinum</i>
GPx	Glutaciona Peroxidase
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleucina
IDN	Índice de divisão nuclear
eONS	Óxido nítrico sintase endotelial
iONS	Óxido nítrico sintase induzível
nONS	Óxido nítrico sintase neuronal
IR	Índice de retenção
LaProNat	Laboratório de Produtos Naturais
LCQ	Laboratório de Controle da Qualidade de Medicamentos
LDH	Lactato desidrogenase
LPS	Lipopolisacarídeo
MC	Meio completo
CRCMD	Células renais caninas Madin-Darby
MDH	Malondialdeido
MeOH	Metanol
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MI	Meio incompleto
MMS	Metilmetanosulfonato
MN	Ensaio do Micronúcleo
MPR	Macrófagos peritoneais de ratos
MTC	Medicina tradicional e complementar
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NOS	Óxido nítrico sintase
ORAC	Capacidade de absorção do radical oxigênio
OS $\beta$ CA	Oxidação do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PMs	Plantas medicinais
PPMA	Ensaio de redução do fosfomolibdênio
QOR	Quinona óxido reductase
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
REp	Retículo endoplasmático
Sbf	Subfração

SOD	Superóxido Dismutase
SUS	Sistema Único de Saúde
TAT	Teor de alcaloides totais
TDCA	Acetato de 13-tetradecanoilforbol
TFA	Ácido trifluoracético
TFT	Teor de fenois totais
TFvT	Teor de flavonoides totais
TIC	Total ion current
TNF	Factor de necrose tumoral
TTT	Teor de taninos totais
VC	Viabilidade celular
VN	Vermelho neutro
ZI	Zona de inibição

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 FAMILIA AMARYLLIDACEAE .....	1
1.1.1 Alcaloides identificados em Amaryllidaceae brasileiras .....	1
1.1.2 Alcaloides de Amaryllidaceae .....	10
1.1.3 Atividades biológicas de Amaryllidaceae brasileiras .....	11
1.2 ESPÉCIES VEGETAIS SOB ESTUDO .....	16
1.2.1 <i>Crinum latifolium</i> L. ....	16
1.2.2 <i>Hippeastrum psittacinum</i> (Ker Gawl.) Herb. ....	28
1.3 DOENÇA DE ALZHEIMER .....	31
1.4 AMARYLLIDACEAE, ALCALOIDES E NEUROPROTEÇÃO .....	32
1.5 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DOS EXTRATOS DE AMARYLLIDACEAE .....	35
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
<b>3 MATERIAL E METODOS</b> .....	<b>37</b>
3.1 MATERIAL VEGETAL E EXTRATOS .....	37
3.1.1 Extração seletiva de alcaloides .....	37
3.2 ESTUDO FITOQUÍMICO E ANÁLISE CROMATOGRÁFICA .....	38
3.2.1 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) .....	38
3.2.2 Cromatografia em camada delgada (CCD) .....	38
3.2.3 Reagente de Dragendorff .....	41
3.3 CROMATOGRAFIA EM COLUNA .....	41
3.4 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS .....	41
3.4.1 Ensaio <i>in-vitro</i> de inibição da enzima acetilcolinesterase .....	41
3.4.2 Viabilidade celular e atividade citotóxica dos extratos de Amaryllidaceae em células RAW 264.7 .....	43
3.4.3 Potencial anti-inflamatório .....	45
3.4.4 Viabilidade celular e atividade citotóxica em células HepG2 e SH-SY5Y .....	46
3.4.5 Teste de neuroproteção .....	47
3.4.6 Ensaio do Micronúcleo (MN) .....	48
3.4.7 Ensaio cometa .....	49
3.4.8 Análise estatística .....	50
3.4.9 Aspectos legais .....	50
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>
4.1 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG -EM) .....	51
4.1 CITOTOXICIDADE MACRÓFAGOS MURINOS RAW 264.7 .....	61

<b>4.1.1 Produção de óxido nítrico em macrófagos murinos RAW 264.7 .....</b>	<b>65</b>
4.2 CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HEPG2 .....	69
4.1 FRAÇÕES ALCALOÍDICAS DE <i>CRINUM LATIFOLIUM</i> E <i>HIPPEASTRUM PSITTACINUM</i> .....	72
<b>4.1.1 Estudo químico de <i>Crinum latifolium</i> biomonitorado por atividade de inibição da acetilcolinesterase .....</b>	<b>73</b>
4.2 CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y.....	76
4.3 NEUROPROTEÇÃO EM CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y.....	79
4.4 GENOTOXICIDADE EM CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y.....	82
<b>4.4.1 Teste de micronúcleos .....</b>	<b>82</b>
<b>4.4.2 Ensaio cometa .....</b>	<b>84</b>
<b>5 POTENCIAL DOS EXTRATOS ALCALOÍDICOS DE AMARILLADACEAE PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER .....</b>	<b>87</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>93</b>

## **INTRODUÇÃO**

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 FAMILIA AMARYLLIDACEAE

A família Amaryllidaceae compreende, aproximadamente, 14 tribos, 58 gêneros e 870 espécies. Na América do Sul são encontrados cerca de 28 gêneros (HOFMANN et al., 2004). Plantas pertencentes a esta família têm mostrado diferentes atividades biológicas, como antitumoral, antiviral, analgésica, inseticida, citotóxica, anticarcinogênica, inibidora da acetilcolinesterase, entre outras (ADEKANMI et al., 2012; KONRATH et al., 2012; MANI et al., 2012).

Espécies de Amaryllidaceae produzem compostos característicos da família, conhecidos como alcaloides de Amaryllidaceae (ANDRADE et al., 2016). Diversos estudos têm mostrado uma ampla faixa de atividades para esses alcaloides, sendo que a mais relevante é a relacionada com a inibição da acetilcolinesterase (AChE), enzima que atua na inibição do neurotransmissor acetilcolina (CORTES; ALVAREZ; et al., 2015).

A galantamina é o único alcaloide isolado de uma fonte natural, particularmente de Amaryllidaceae, utilizado para o tratamento da doença de Alzheimer nos primeiros estágios da doença. O fármaco, aprovado pela FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2017), é comercializado com o nome de Reminyl® ER e atua na inibição da AChE. Este fato tem motivado a procura por novas moléculas alcaloídicas bioativas nessa família e os resultados mostraram que, em relação a outros alcaloides, os do tipo galantamina são os mais ativos na inibição de AChE (CORTES; POSADA; et al., 2015).

### 1.1.1 Alcaloides identificados em Amaryllidaceae brasileiras

As espécies de Amaryllidaceae brasileiras mais estudadas são as encontradas nas regiões Sul e Sudeste, nos Estados do Rio Grande do Sul e de São Paulo. Um levantamento bibliográfico, visando a identificação das pesquisas que relatam a presença de alcaloides em Amaryllidaceae, levou à identificação de doze espécies de *Hippeastrum*: *H. striatum*, *H. vittatum*, *H. breviflorum*, *H. morelianum*, *H. papilio*, *H. psittacinum*, *H. santacatarina*, *H. glaucescens*, *H. aulycum*, *H. calyptratum*, *H. solandriiflorum*, e *H. goianum*, além das espécies *Rodophiala bifida* e *Crinum amabile*. No Quadro 1 estão descritos os tipos de compostos alcaloídicos identificados em cada espécie, a parte da

planta utilizada e tipo de extrato. Na Figura 1 estão as estruturas químicas dos alcaloides identificados em Amaryllidaceae brasileiras.

Os alcaloides de Amaryllidaceae descritos no Quadro 1 foram identificados nos extratos metanólicos e etanólicos preparados a partir de bulbos e folhas. Nas espécies do gênero *Hippeastrum* foram identificados, majoritariamente, alcaloides de tipo licorina, homolicorina, haemantamina, galantamina e tazetina (Figura 1). Compostos de tipo narciclasina, montanina, além de outros com estruturas diversas (Figura 1), apresentam poucos relatos na literatura. Os alcaloides bufanisina e aulisina, com núcleo estrutural de tipo crinina, só foram identificados em *H. aulycum*. É importante ressaltar que esse tipo de composto é predominante de espécies do gênero *Crinum* (REFAAT et al., 2012).

CARVALHO et al. (2015) investigaram o perfil químico do extrato etanólico de bulbos de *H. solandriiflorum* coletados no Estado do Ceará. Os autores, além de identificarem alcaloides de tipo licorina, homolicorina, galantamina e fenantridina, relataram a presença de compostos fenólicos no extrato.

**Quadro 1. Alcaloides identificados em Amaryllidaceae brasileiras**

Alcaloide	#	Espécie																Extrato	Referências
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N				
<b>Tipo licorina</b>		B	F	B	B	B	F	B	F	B	B	F	B	F	B	B	F	B	B
licorina	1	+	+	+						+			+	+	+		+	+	+
1-O-acetillicorina	2																		+
2-O-acetillicorina	3																		+
pseudolicorina	4												+	+	+	+	+		
galantina	5																		
anidrolicorina	6		+										+						+
11,12-desidroanidrolicorina	7				+														+
incartina	8												+	+					
narcisidina	9																		+
licoreno	10																		+
<b>tipo homolicorina</b>																			
nerinina	11				+								+		+				
homolicorina	12												+	+	+				
2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina	13				+														
2 $\alpha$ -metoxihomolicorina	14				+									+	+				
2 $\alpha$ -7-dimetoxihomolicorina	15				+										+				
8-o-desmetilhomolicorina	16												+						
albomaculina	17													+	+				
hippeastrina	18								+	+									
candimina	19				+														
6-metoxilicorenina	20																		+

A. *Hippeastrum striatum*, B. *H. vittatum*, C. *H. breviflorum*, D. *H. morelianum*, E. *H. papilio*, F. *H. psittacinum*, G. *H. santacatarina*, H. *H. glaucescens*, I. *H. aulycum*, J. *H. calyptrotum*, K. *H. solandriflorum*, L. *H. goianum*, M. *Rodophiala bifida*, N. *Crinum amabile*. Bulbo (B|), Folha (F|)

1. (ANDRADE et al., 2011), 2. (ANDRADE et al., 2014), 3. (ANDRADE et al., 2016), 4. (BETZEL-BESSA, 2016), 5. (CARVALHO et al., 2015), 6. (COSTA et al., 2019), 7. (GIORDANI et al., 2011), 8. (GUO et al., 2016), 9. (SEBBEN et al., 2015), 10. (SILVA et al., 2008), 11. (TALLINI et al., 2018), 12. (VERDANA et al., 2017)

**Quadro 1. Alcaloides identificados em Amaryllidaceae brasileiras (Continuação)**

Alcaloide	#	Espécie																	
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N				
<b>Tipo homollicorina (cont)</b>		Bl	Fl	Bl	Bl	Bl	Fl	Bl	Fl	Bl	Bl	Fl	Bl	Fl	Bl	Bl	Fl	Bl	Bl
7-metoxi-O-metillicorenina	21																		
(1S,2S,4aR,10bS)-2,10b-diidroxí-9-O-desmetilhomollicorina	22																		
hipapilina	23																		
8-desmetoxi-10-O-metilhostasina	24																		
<b>Tipo haemantamina</b>																			
haemantamina	25																		
11-oxohaemantamina	26																		
vitatina	27																		
11-hidroxívitatina	28																		
8-O-desmetilmaritidina	29																		
crinamina	30																		
hamaina	31																		
3-O-desmetil-3-O-(3-hidroxíbutanoil)-haemantamina	32																		
<b>Tipo galantamina</b>																			
galantamina	33																		
11β-hidroxígalantamina	34																		
3-epígalantamina	35																		
N-desmetilgalantamina	36																		
N-formilnorgalantamina	37																		
sanguinina	38																		

A. *Hippeastrum striatum*, B. *H. vittatum*, C. *H. breviflorum*, D. *H. morelianum*, E. *H. papilio*, F. *H. psittacinum*, G. *H. santacatarina*, H. *H. glaucescens*, I. *H. aulycum*, J. *H. calyptatum*, K. *H. solandriiflorum*, L. *H. goianum*, M. *Rodophiala bifida*, N. *Crinum amabile*. Bulbo (Bl), Folha (Fl)  
 1. (ANDRADE et al., 2011), 2. (ANDRADE et al., 2014), 3. (ANDRADE et al., 2016), 4. (BETZEL-BESSA, 2016), 5. (CARVALHO et al., 2015), 6. (COSTA et al., 2019), 7. (GIORDANI et al., 2011), 8. (GUO et al., 2016), 9. (SEBBEN et al., 2015), 10. (SILVA et al., 2008), 11. (TALLINI et al., 2018), 12. (VERDANA et al., 2017)

**Quadro 1. Alcaloides identificados em Amaryllidaceae brasileiras (Continuação)**

Alcaloide	#	Espécie																			
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N						
<b>Tipo galantamina (cont)</b>		Bl	Fl	Bl	Bl	Bl	Fl	Bl	Fl	Bl	Bl	Fl	Bl	Fl	Bl	Bl	Fl	Bl	Bl		
3-O-acetilsanguinina	39																		+	MeOH	11
narwedina	40					+	+				+	+	+	+	+					EtOH, MeOH	1, 2, 3, 4, 8
licoramina	41												+							MeOH	4
9-O-desmetillicoramina	42																		+	MeOH	12
anidrogalaantamina	43					+					+	+								MeOH	3
N-óxido-galantamina	44																		+	EtOH	5
apogalaantamina	45						+													MeOH	8
<b>Tipo tazetina</b>																					
Tazetina	46			+	+			+	+	+	+	+	+	+	+				+	EtOH, MeOH	2, 3, 4, 7
pretazetina	47			+	+			+	+	+	+	+	+						+	EtOH, MeOH	2, 3, 7
3-epidesoxitazetina	48			+	+						+									MeOH	3
desoxitazetina	49			+	+			+	+	+	+	+							+	MeOH	3
6-metoxipretazetina	50			+																MeOH	3
3-epimacronina	51			+	+			+	+	+	+	+	+	+					+	EtOH, MeOH	3, 4, 7
tazetamida	52				+			+	+											MeOH	3
<b>Tipo crinina</b>																					
crinina	53																		+	MeOH	11
3-O-metilepimacowina	54																		+	EtOH	2
bufanisina	55												+						+	MeOH	4, 11
6 $\alpha$ -hidroxibufanidrina	56																		+	MeOH	11
ambellina	57																		+	MeOH	11

A. *Hippeastrum striatum*, B. *H. vittatum*, C. *H. breviflorum*, D. *H. morelianum*, E. *H. papilio*, F. *H. psittacinum*, G. *H. santacatarina*, H. *H. glaucescens*, I. *H. aulycum*, J. *H. calyptratum*, K. *H. solandriflorum*, L. *H. goianum*, M. *Rodophiala bifida*, N. *Crinum amabile*. Bulbo (Bl), Folha (Fl)

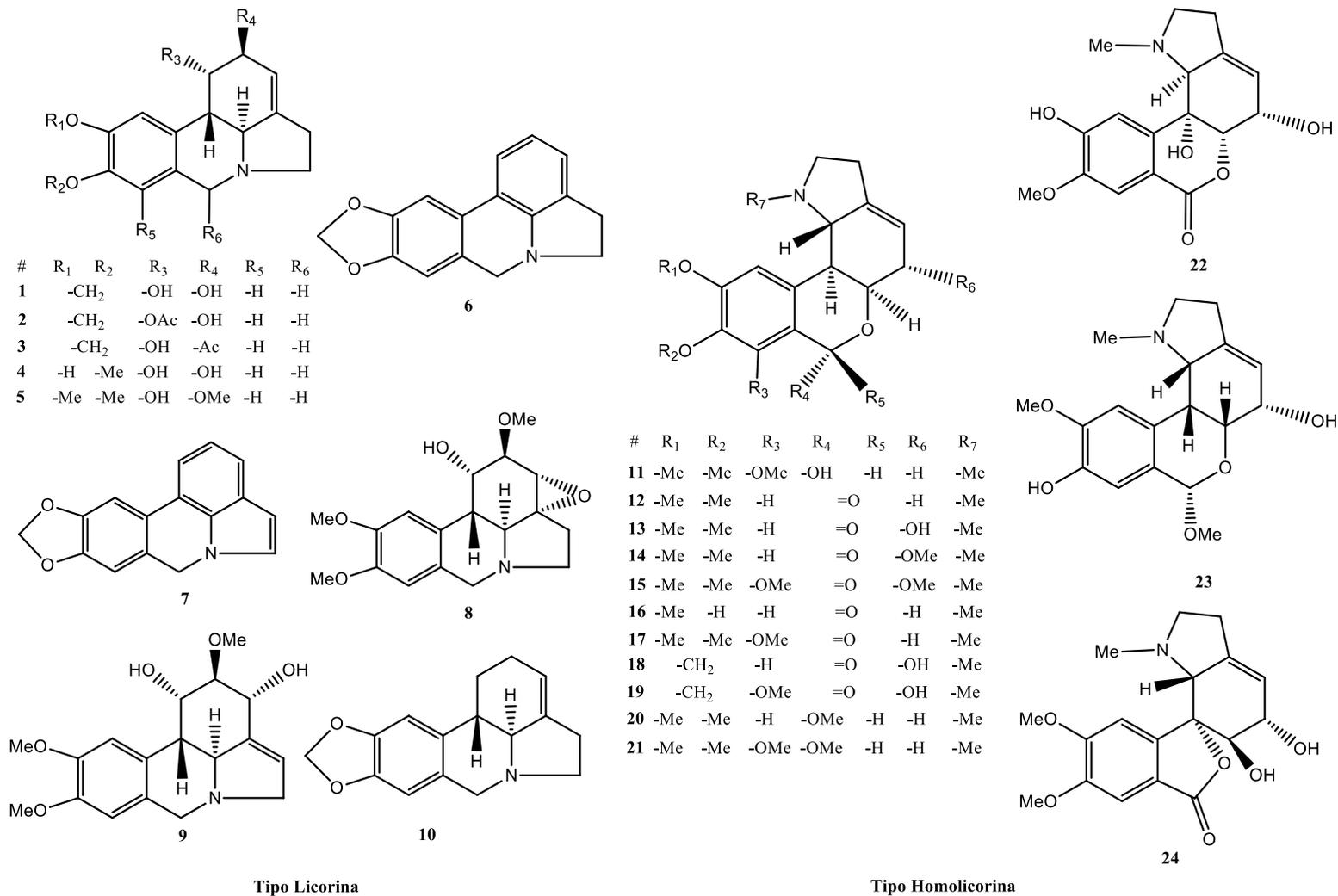
1. (ANDRADE et al., 2011), 2. (ANDRADE et al., 2014), 3. (ANDRADE et al., 2016), 4. (BETZEL-BESSA, 2016), 5. (CARVALHO et al., 2015), 6. (COSTA et al., 2019), 7. (GIORDANI et al., 2011), 8. (GUO et al., 2016), 9. (SEBBEN et al., 2015), 10. (SILVA et al., 2008), 11. (TALLINI et al., 2018), 12. (VERDANA et al., 2017)

**Quadro 1. Alcaloides identificados em Amaryllidaceae brasileiras (Continuação)**

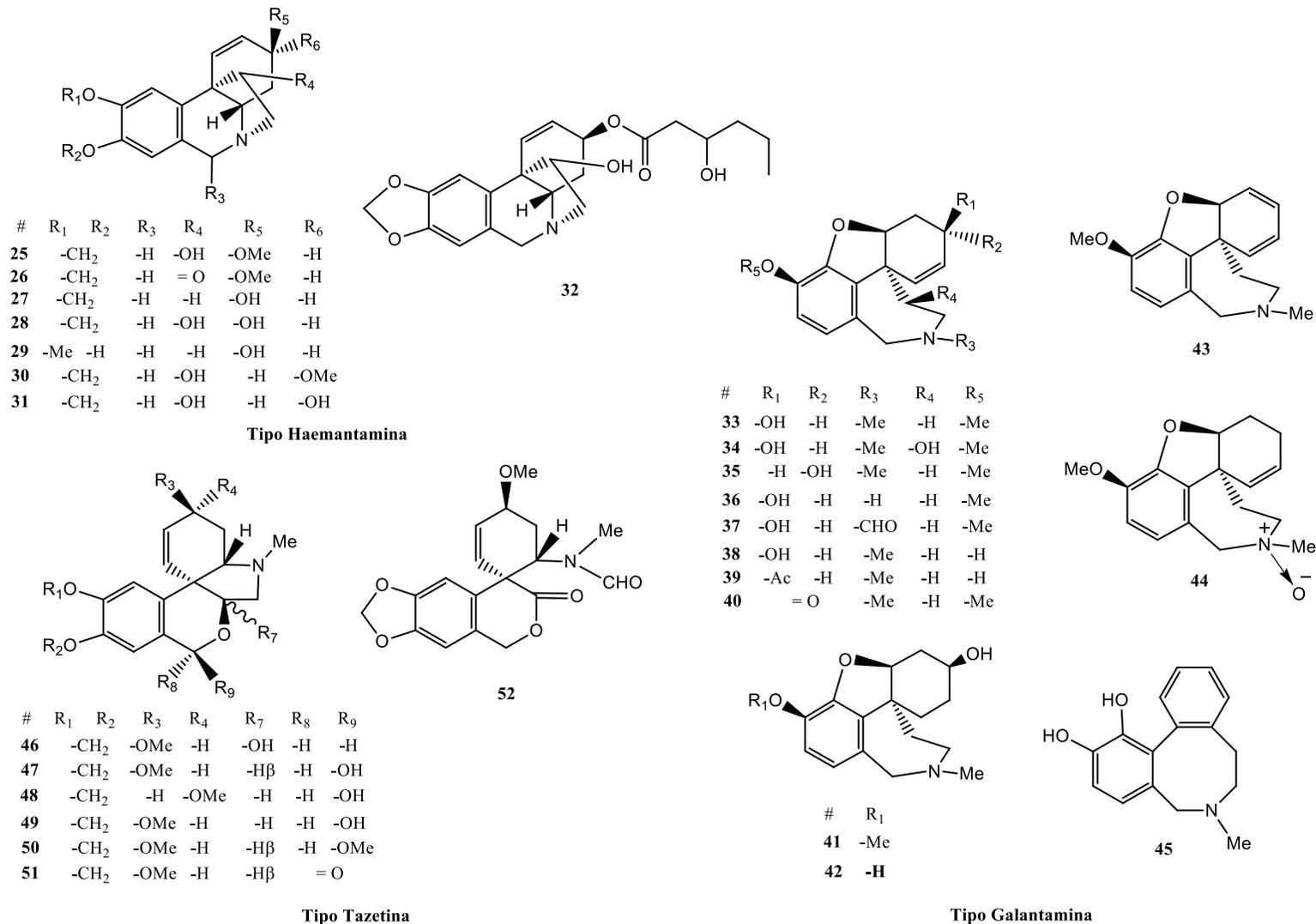
Alcaloide	#	Espécie																Extrato			
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N						
<b>Tipo crinina (cont)</b>		Bl	Fl	Bl	Bl	Bl	Fl	Bl	Fl	Bl	Bl	Fl	Bl	Bl	Bl	Fl	Bl	Bl			
augustina	58																		+	MeOH	11
undulatina	59																		+	MeOH	11
aulicina	60																				
N-óxido-bufanisina	61																				
N-óxido-augustina	62																		+	MeOH	11
<b>Tipo narciclasina</b>																					
narciclasina	63																				
trisferidina	64	+			+			+	+	+	+	+	+	+	+						
7-desoxi-trans-diidronarciclasina	65																+				
<b>Tipo montanina</b>																					
montanina	66		+																		
pancracina	67		+																		
<b>Outros</b>																					
ismina	68			+	+			+	+			+	+	+	+				+	EtOH, MeOH	2, 3, 4, 11
desmetilismina	69																		+	MeOH	11
augustamina	70																		+	MeOH	11
galantindol	71			+	+			+	+						+						
licosinina B	72			+																	
9-O-desmetillicosinina B	73			+		+															
desmetilmesembrenol	74																		+	MeOH	11
papilina	75					+															

A. *Hippeastrum striatum*, B. *H. vittatum*, C. *H. breviflorum*, D. *H. morelianum*, E. *H. papilio*, F. *H. psittacinum*, G. *H. santacatarina*, H. *H. glaucescens*, I. *H. aulycum*, J. *H. calyptrotum*, K. *H. solandriiflorum*, L. *H. goianum*, M. *Rodophiala bifida*, N. *Crinum amabile*. Bulbo (Bl), Folha (Fl)

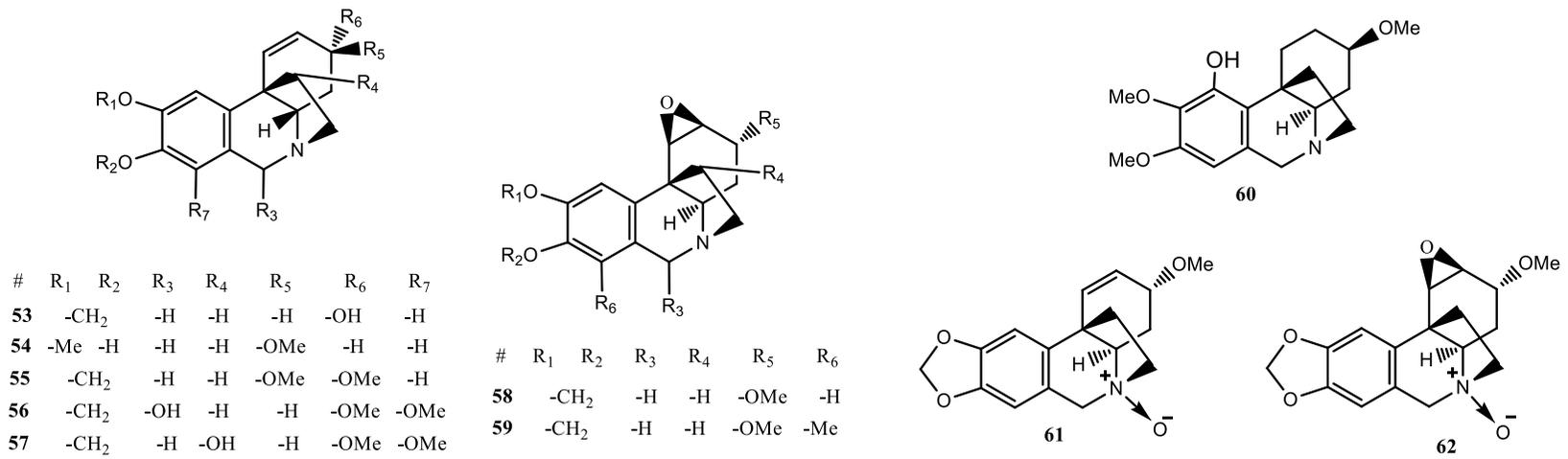
1. (ANDRADE et al., 2011), 2. (ANDRADE et al., 2014), 3. (ANDRADE et al., 2016), 4. (BETZEL-BESSA, 2016), 5. (CARVALHO et al., 2015), 6. (COSTA et al., 2019), 7. (GIORDANI et al., 2011), 8. (GUO et al., 2016), 9. (SEBBEN et al., 2015), 10. (SILVA et al., 2008), 11. (TALLINI et al., 2018), 12. (VERDANA et al., 2017)



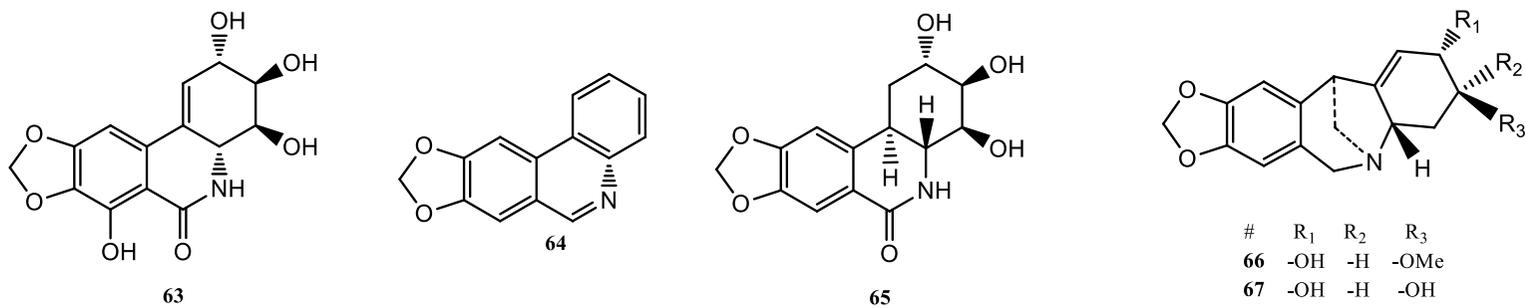
**Figura 1. Alcaloides identificados em Amaryllidaceae brasileiras**



**Figura 1. Alcaloides identificados em Amaryllidaceae brasileiras (continuação)**



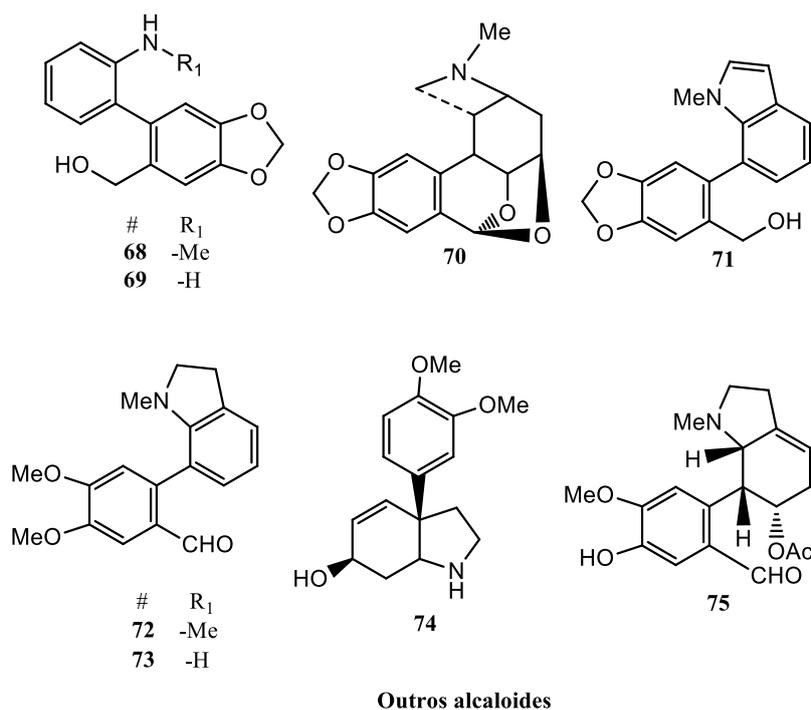
**Tipo Crinina**



**Tipo Narciclasina**

**Tipo Montanina**

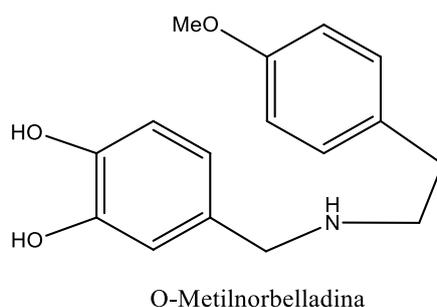
**Figura 1. Alcaloides identificados em Amaryllidaceae brasileiras (continuação)**



**Figura 1. Alcaloides identificados em Amaryllidaceae brasileiras (continuação)**

### 1.1.2 Alcaloides de Amaryllidaceae

Os alcaloides de Amaryllidaceae representam um grupo de alcaloides isoquinolínicos, derivados do precursor biogénico comum O-metilnorbelladina e produzidos via uma rota de acoplamento fenol-oxidativo. Apresentam estrutura do tipo C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>-N-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, na qual a fração C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> é derivada da L-fenilalanina e a fração N-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> é proveniente da L-tirosina. Possuem entre 16 a 20 átomos de carbono, dependendo do número de substituintes na estrutura. Pelo tipo de estrutura são considerados bases fracas com valores de pK<sub>a</sub> entre 6-9. Apresentam um único átomo de nitrogênio na molécula que pode ser secundário, terciário ou quaternário (OSORIO, 2008).



A classificação dos alcaloides de Amaryllidaceae foi definida em função do estudo dos mecanismos de biossíntese. Diferem, na sua diversidade estrutural pelos tipos de acoplamento fenol-oxidativo, além do sistema heterocíclico que apresentem. Na Figura 2 estão descritos oito tipos de núcleos estruturais: licorina, homolicorina, crinina, haemantamina, narciclasina, tazetina, montanina e galantamina. Outros compostos alcaloídicos, com estruturas químicas que diferem dos já descritos, são agrupados separadamente. Alguns autores os reconhecem como outros ou estruturas miscelâneas ou alcaloides de estrutura variada (OSORIO, 2008; CEDRÓN et al., 2010).

### 1.1.3 Atividades biológicas de Amaryllidaceae brasileiras

Poucos são os relatos que se referem aos estudos químicos e atividades biológicas para espécies de Amaryllidaceae encontradas no Brasil e, principalmente, na região Centro-Oeste. Os estudos sobre atividade biológica têm focado principalmente nos compostos alcaloídicos isolados (SILVA et al., 2008; ANDRADE et al., 2011; CARVALHO et al., 2015; ANDRADE et al., 2016; TALLINI et al., 2018) ou de frações alcaloídicas (SILVA et al., 2008; DIETRICH-ROSA, 2017).

DIETRICH-ROSA (2017) investigou a atividade *in vitro* anti-*Acanthamoeba castellanii* de frações alcaloídicas de Amaryllidaceae. As frações em acetato de etila de *Hippeastrum sylvaticus*, *H. canastrense*, *H. diniz-cruzae*, *H. itaobinus*, *H. sanfranciscanum*, *H. puniceum*, *H. striatum*, *H. goianum* e *Crinum giganteum*, apresentaram de 30 a 54 % atividade amebicida quando testadas a 250 µg/mL. Foi determinado o efeito citotóxico das frações alcaloídicas em células renais caninas Madin-Darby (CRCMD). *Hippeastrum diniz-cruzae*, nas concentrações de 250 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL apresentou baixa porcentagem de inibição (5% a 7%) sobre as culturas, enquanto as frações de *H. canastrense*, *H. puniceum* e *C. giganteum* apresentaram valores maiores de inibição ou citotoxicidade.

SILVA et al. (2008) avaliaram o efeito citotóxico das frações alcaloídicas n-butanol e diclorometano obtidas do extrato etanólico de bulbos de *Hippeastrum vittatum*. No experimento, foram utilizadas as linhagens de células humanas de adenocarcinoma de cólon (HT-29), câncer renal humano (RXF-393), câncer de mama (MCF7), câncer de ovário (OVCAR-3) e câncer de pulmão (NCI-H460). As frações em diclorometano e em acetato de etila mostraram elevada citotoxicidade em todas as linhagens estudadas, com

valores de  $CI_{50}$  entre 0,7  $\mu\text{g/mL}$  e 1,6  $\mu\text{g/mL}$ , e entre 2,9  $\mu\text{g/mL}$  e 4,1  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

Os estudos sobre a atividade biológica de extratos brutos de Amaryllidaceae focam principalmente no potencial inibitório da AChE. ANDRADE et al. (2016) estudaram a atividade de extratos metanólicos de Amaryllidaceae na inibição da AChE. Os autores estimaram valores de  $CI_{50}$  de 4,7  $\mu\text{g/mL}$  para o extrato dos bulbos *H. vittatum*; 0,4  $\mu\text{g/mL}$  para os extratos de bulbos e folhas de *H. papilio*; 0,3  $\mu\text{g/mL}$  e 0,5  $\mu\text{g/mL}$  para os extratos de bulbos e folhas de *H. glaucescens*; e 8,4  $\mu\text{g/mL}$  para o extrato de bulbos de *R. bifida*. Para a espécie *H. goianum* foi identificado que o extrato etanólico, obtido de folhas de plântulas micropropagadas *in vitro* a partir de sementes, teve baixa atividade de inibição da AChE com valor de  $CI_{50}$  de 114.8  $\mu\text{g/mL}$  (COSTA et al., 2019).

No Quadro 1 pode ser observado que as espécies *H. vittatum* e *H. papilio* apresentam, majoritariamente, alcaloides dos tipos homolicorina, tazetina e galantamina. A espécie *R. bifida*, com menor atividade de inibição da AChE apresenta alcaloides dos tipos licorina, tazetina e homolicorina. Para o extrato etanólico das folhas de *H. goianum*, foi identificado o alcaloide licorina (**1**) (COSTA et al., 2019), enquanto para extrato metanólico dos bulbos, há relatos da presença de alcaloides de tipo licorina, homolicorina, galantamina e narciclasina (VERDANA et al., 2017).

Os dados da literatura mostram que compostos de tipo galantamina, entre os grupos dos alcaloides, são promissores como inibidores de AChE e apresentam elevada importância para obtenção de derivados de galantamina com maior atividade biológica. (TORRAS-CLAVERIA et al., 2013; CORTES; POSADA; et al., 2015; ANDRADE et al., 2016; TORRAS CLAVERIA et al., 2017; CASTILLO et al., 2018).

Pesquisas relacionadas a extratos – principalmente etanólicos e metanólicos brutos - além de frações obtidas de processos de pré-purificação, têm mostrado outras atividades para Amaryllidaceae, tais como antitumoral, antifúngica, anti-inflamatória, antioxidante, entre outros (JENNY et al., 2011; JIVAD e RABIEI, 2014; ADEWUSI e STEENKAMP, 2015; LOČÁREK et al., 2015; CORTES et al., 2019). Embora esses estudos não tenham levado à identificação de moléculas com maior eficácia que as já descritas, têm permitido identificar novos núcleos estruturais, que podem ser o ponto de partida para a descoberta e o desenvolvimento de novas moléculas ativas com ajuda de técnicas como a síntese orgânica convencional e técnicas de modelagem molecular.

Para espécies da Região Centro-Oeste, descritas na base de dados “Lista de Espécies da Flora do Brasil” (JBRJ, 2019), há poucos estudos químicos e biológicos. Na lista são encontradas três espécies do gênero *Habranthus* (*H. datensis*, *H. itaobinus*, *H. pantanalensis*), uma espécie do gênero *Aidema* (*A. matogrossensis*) e do gênero *Griffinia* (*G. nocturna*), sete espécies do gênero *Hippeastrum* (*H. caiaponicum*, *H. elegans*, *H. leucobasis*, *H. lunaris*, *H. mauroi*, *H. puniceum*, *H. goianum*), duas espécies do gênero *Nothoscordum* (*N. goianum*, *N. pulchellum*) e quatro espécies do gênero *Zephyranthes* (*Z. franciscana*, *Z. láctea*, *Z. cearensis* e *Z. sylvatica*).

Comprometidos com o estudo da biodiversidade vegetal brasileira, visando a identificação de plantas com atividade biológica, o Laboratório de Produtos Naturais (LaProNat) e o Laboratório de Controle da Qualidade de Medicamentos (LCQ) da Universidade de Brasília, sob a Coordenação da Professora Dra. Dâmaris Silveira, formularam o projeto de pesquisa “Estudo de espécies de Amaryllidaceae para obtenção de bioprodutos úteis no combate a doenças crônico-degenerativas” segundo o edital da Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal, FAP-DF 03/2015 - Demanda Espontânea.

Contribuindo com os objetivos do projeto, MERA-LÓPEZ (2018) estudou a atividade inibidora de extratos etanólicos de Amaryllidaceae nas enzimas  $\alpha$ -glicosidase ( $\alpha$ -Gli),  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ -Amil), tirosinase e acetilcolinesterase (AChE). Para o estudo foram escolhidos: bulbos de *Hymenocallis litorallis* (Jacq.) Salisb. coletados no Estado de Roraima, bulbos de *Hippeastrum* sp. e *H. psittacinum* Herb. coletados no Estado de Santa Catarina e bulbos de *Crinum* sp. coletados no Estado de Goiás. No Distrito Federal foram coletados e estudados os bulbos de *Habranthus irwinianus* (Ravenna), bulbos e folhas de *Hippeastrum puniceum* (Lam.) Kuntze e *Crinum erubescens* L.f. ex Aiton, além dos bulbos, folhas, talo, flores e frutos de *Hippeastrum goianum* (Ravenna).

Os extratos de *H. goianum*, preparados a partir dos bulbos, folhas, talos e flores, foram os mais ativos na inibição de  $\alpha$ -Amil, com valores de  $CI_{50}$  entre 53 a 83  $\mu\text{g/mL}$ . Quando testados na enzima  $\alpha$ -Gli, os extratos dos talos e flores de *H. goianum* ( $CI_{50}$  52  $\mu\text{g/mL}$  e 83  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente) foram os mais ativos. Os extratos de *Crinum* sp. e *Hippeastrum* sp., mostraram valores de  $CI_{50}$  de 70  $\mu\text{g/mL}$  e 71  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

Em contrapartida, os extratos das flores de *H. goianum*, e dos bulbos de *Hippeastrum* sp. e *Crinum* sp. foram os mais ativos na inibição da tirosinase com valores  $CI_{50}$  iguais a 37  $\mu\text{g/mL}$ , 60  $\mu\text{g/mL}$  e 85  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Quanto à inibição de

AChE, os extratos etanólicos de bulbos de *C. erubescens*, *H. psittacinum* e *Crinum* sp. foram os mais ativos, com valores de  $CI_{50}$  12  $\mu\text{g/mL}$ , 14  $\mu\text{g/mL}$  e 27  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. O extrato dos bulbos de *H. goianum* exibiu  $CI_{50}$  de 46  $\mu\text{g/mL}$ .

A análise do perfil fitoquímico por CCD mostrou que os extratos etanólicos do talo, flor e folhas de *H goianum* apresentaram compostos fenólicos, enquanto para os extratos de bulbos de *Crinum* sp., *C. erubescens*, *Hippeastrum* sp., *H. psittacinum* e *H goianum* havia, majoritariamente, compostos de natureza fenólica e alcaloídica.

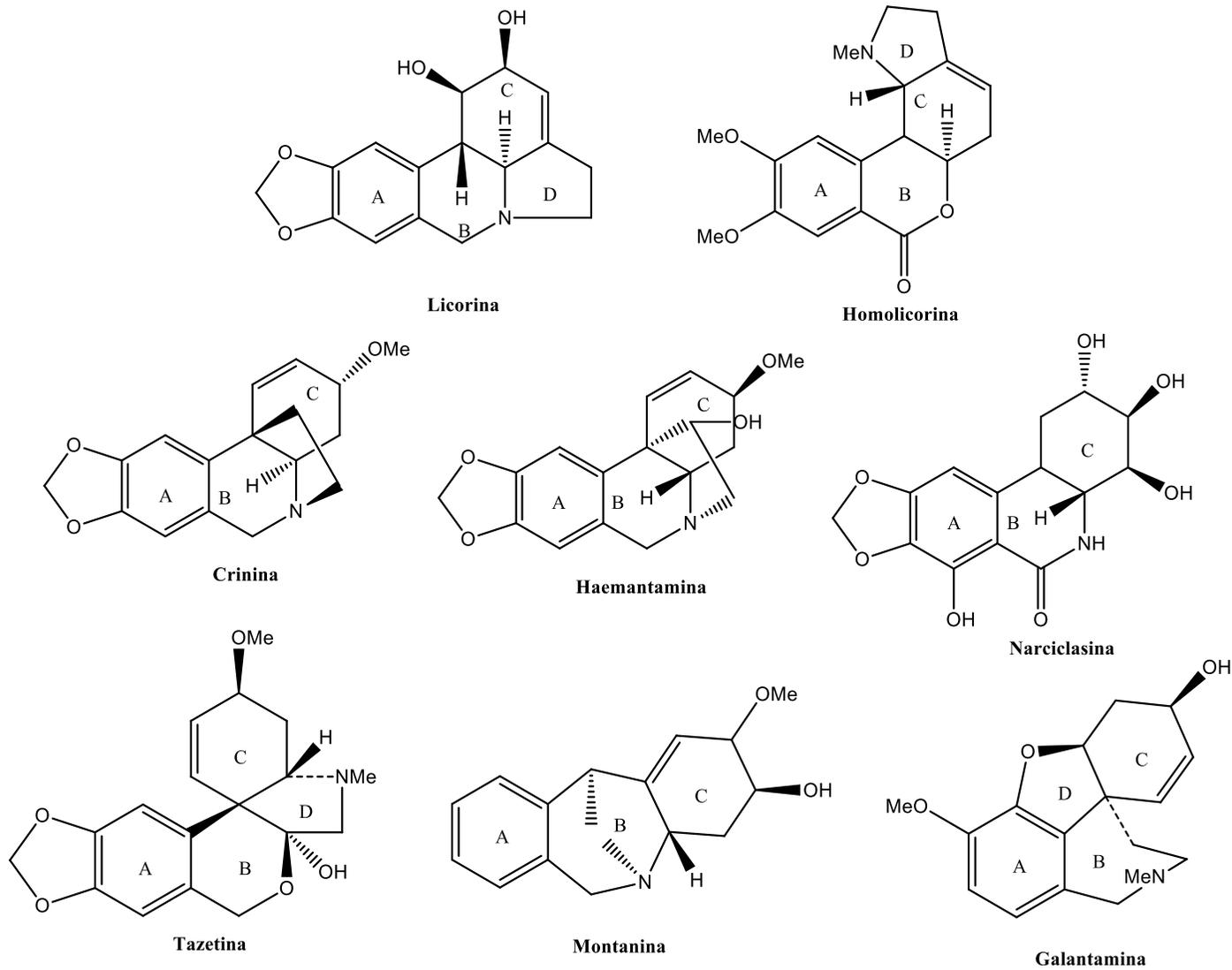


Figura 2. Núcleos estruturais dos alcaloides de Amaryllidaceae

## 1.2 ESPÉCIES VEGETAIS SOB ESTUDO

### 1.2.1 *Crinum latifolium* L.

Pertencente ao gênero *Crinum*, é conhecida como Sukhdarshan/ Sukhdarsan na Índia (AZIZ et al., 2014) e Indohamatu no Japão (KOBAYASHI et al., 1984). Segundo THE PLANT LIST (2019), apresenta como sinônimos: *Amaryllis insignis* Ker Gawl., *Amaryllis moluccana* Ker Gawl., *Crinum cochinchinense*, *Crinum esquirolii* H.Lév., *Crinum insigne* (Ker Gawl.) Sweet, *Crinum jemenicum* Dammann, *Crinum longistylum* Herb. ex Steud., *Crinum moluccanum* Roxb. ex Ker Gawl., *Crinum ornatum* var. *latifolium* (L.) Herb., *Crinum speciosum* Herb e *Crinum yemense* Dammann.

#### **Distribuição geográfica**

*Crinum latifolium* não apresenta distribuição no território brasileiro (JBRJ, 2019).

#### **Usos etnomedicinais**

Essa espécie tem sido utilizada para fins terapêuticos na medicina tradicional asiática. Estão descritas as atividades anti-inflamatória, antitumoral e antimicrobiana da planta (JENNY et al., 2011; NGUYEN et al., 2013; AZIZ et al., 2014). Na medicina tradicional vietnamita e chinesa, extratos aquosos de folhas, preparados por decoção ou infusão, são utilizados para o tratamento de câncer de ovário e de próstata (NAM et al., 2004; JENNY et al., 2011; AZIZ et al., 2014).

Algumas comunidades da Índia utilizam a planta para tratar reumatismo, trombolismo, fístulas, tumores, dores de ouvido, além do uso cosmético, no cuidado de pele avermelhada ou rubefaciente (JENNY et al., 2011; AZIZ et al., 2014). O extrato aquoso do bulbo, obtido por decoção, é utilizado para tratamento de hidrocele (SIKARWAR et al., 2008).

#### **Perfil fitoquímico**

A análise fitoquímica dos extratos etanólicos obtidos de folhas tem mostrado resultados interessantes quanto à diversidade metabólica dessa espécie. DEWAN e DAS (2013) descreveram a presença de glicosídeos, alcaloides, taninos e fenois. AZIZ et al. (2014) estimaram o conteúdo de fenois totais em 18 mg equivalentes de ácido gálico/g de extrato. Da

mesma forma, GHANE et al. (2018) analisaram o extrato metanólico das folhas, e determinaram o teor de fenois totais (TFT, mg equivalentes em ácido tânico/g de extrato), flavonoides totais (TFvT, mg equivalentes em catequina/g de extrato), taninos totais (TTT, mg equivalentes em catequina/g de extrato) e alcaloides totais (TAT, mg equivalentes em colchicina/g de extrato) em 77 mg/g, 144 mg/g, 149 mg/g e 7 mg/g de extrato, respectivamente. O extrato aquoso mostrou valores de 67 mg/g, 51 mg/g, 107 mg/g e 3 mg/g, respectivamente. A análise por CLAE mostrou que o extrato apresenta 3.500 µg de ácido hidrobenzoico/g de extrato seco, enquanto o teor de licorina e galantamina foi estimado em 194 µg/g e 721 µg/g de extrato seco, respectivamente (GHANE et al., 2018).

Alcaloides são os principais compostos identificados nos extratos metanólicos, etanólicos, aquosos e éter de petróleo. No Quadro 2 são apresentados os metabólitos secundários identificados na planta, que compreendem 52 alcaloides e mais 10 compostos que incluem flavonas, chalconas, cumarinas, e outros compostos fenólicos, glicosídeos, lectinas e terpenos.

Nos bulbos de *C. latifolium* têm sido identificados majoritariamente alcaloides do tipo licorina, haemantamina, tazetina, crinina e outros de estrutura variada. As folhas de *C. latifolium* possuem alcaloides do tipo tazetina e, em maior proporção, alcaloides do tipo crinina. ZHANG et al. (2009) identificaram compostos do tipo tazetina e haemantamina na raiz da planta.

Nas flores foram identificados alguns compostos do tipo licorina e tazetina (GHOSAL et al., 1989; ZHANG et al., 2009). TRAM et al. (2003) estimaram a composição porcentual dos voláteis presentes nas folhas da planta. Os autores estabeleceram a composição porcentual em 18,8 % hidrocarbonetos, 5,1 % compostos nitrogenados, 27,1 % terpenos, 4,3 % ácidos, 1,6 % aldeídos e 1,0 % álcoois e compostos fenólicos.

## **Atividades biológicas**

### *Atividade antioxidante*

Para os estudos de atividade antioxidante dos extratos aquosos e metanólicos de folhas e bulbos de *C. latifolium*, têm sido utilizadas as metodologias de inibição/captura dos radicais DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e ABTS<sup>•+</sup> (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico), além das técnicas FRAP (poder oxi-redutor de ferro), PPMA (ensaio de redução do fosfomolibdênio) e ORAC (capacidade de absorção do radical oxigênio). Outros ensaios como

oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico (OS $\beta$ CA), e inibição de peroxidação lipídica têm sido aplicados.

JENNY et al. (2011) estimaram o valor ORAC em 1610  $\mu$ mol equivalentes em trolox/g de extrato aquoso. GHANE et al. (2018) estudaram a atividade antioxidante (AA) dos extratos aquoso ( $E_{Aq}$ ) e metanólico ( $E_{MeOH}$ ), e encontraram valores próximos a 40 mg e 55 mg equivalentes em trolox/g de extrato, para  $E_{Aq}$  e  $E_{MeOH}$ , no método do DPPH; 40 mg e 20 mg equivalentes trolox/g de extrato, para  $E_{Aq}$  e  $E_{MeOH}$ , no método do ABTS; o valor FRAP entre 225 mg e 275 mg Fe(II)/g para os dois tipos de extrato; e, finalmente, o valor do PPMA próximo a 45 mg e 90 mg equivalentes em ácido ascórbico/g para  $E_{Aq}$  e  $E_{MeOH}$ , respectivamente.

NGUYEN et al. (2013) prepararam diferentes extratos a partir de folhas da planta, e determinaram a atividade antioxidante dos extratos etanólico, aquoso e alcaloídico (obtido por extração seletiva de alcaloides). Os autores estimaram valores de  $CI_{50} = 107$  mg/L,  $CI_{50} = 497$  mg/L e  $CI_{50} = 1164$  mg/L, respectivamente. No teste do OS $\beta$ CA foram calculados  $CI_{50} = 1010$  mg/L e  $CI_{50} = 1513$  mg/L para os extratos etanólico e aquoso, respectivamente, enquanto o extrato alcaloídico não mostrou resposta antioxidante nas condições testadas.

**Quadro 2. Alcaloides identificados em *Crinum latifolium***

Alcaloide	#	Parte da planta				Extrato
		Bulbos	Folhas	Raiz	Flores	
<b>Tipo licorina</b>						
licorina	<b>1</b>	3, 7, 9	2, 7, 9			EtOH, MeOH
1-O-acetillicorina	<b>2</b>	9				EtOH
2-epilicorina	<b>76</b>				5	Exsudato
pratorimina	<b>77</b>	3				Éter de Petróleo
pratorinina	<b>78</b>	3				Éter de Petróleo
pratosina	<b>79</b>	3				Éter de Petróleo
hipadina	<b>80</b>	3				Éter de Petróleo
oxoasoanina	<b>81</b>		12			Aquoso
2-epipanocrasidina	<b>82</b>				5	Exsudato
<b>Tipo homolicorina</b>						
Hipeastrina	<b>18</b>	7	7			EtOH
<b>Tipo haemantamina</b>						
3-epicrinamina/haemantamina	<b>25</b>	13				EtOH
crinamina	<b>30</b>	9, 13				EtOH
hamaina	<b>31</b>	9				EtOH
11-O-metilcrinamina	<b>83</b>	13	13	13		EtOH
3-O-acetilhamaina	<b>84</b>	9, 13		13		EtOH
diidro-oxo-desmetoxihaemantamina	<b>85</b>		12			Aquoso
delagoensina	<b>86</b>	13	13	13		EtOH
<b>Tipo galantamina</b>						
galantamina	<b>33</b>		2			MeOH

1. (CHEN et al., 2018), 2. (GHANE et al., 2018), 3. (GHOSAL et al., 1983), 4. (GHOSAL et al., 1985), 5. (GHOSAL et al., 1989), 6. (HANH et al., 2018), 7. (JEFFS et al., 1985), 8. (KAUR et al., 2006), 9. (KOBAYASHI et al., 1984), 10. (NAM et al., 2004), 11. (TOMODA et al., 1985), 12. (TRAM NGUYEN et al., 2002), 13. (ZHANG et al., 2009)

**Quadro 2. Alcaloides identificados em *Crinum latifolium* (continuação)**

Alcaloide	#	Parte da planta				Extrato
		Bulbos	Folhas	Raiz	Flores	
<b>Tipo tazetina</b>						
latifaliumina A	<b>87</b>	13	13	13	13	EtOH
N-desmetillatifaliumina A	<b>88</b>	13			13	EtOH
N-desmetil-4 $\alpha$ -metoxillatifaliumina A	<b>89</b>	13	13	13	13	EtOH
12-O-acetillatifaliumina A	<b>90</b>			13		EtOH
12-O-acillatifaliumina A	<b>91</b>			13		EtOH
latifaliumina B	<b>92</b>	13	13	13		EtOH
diidrolatifaliumina C	<b>93</b>		13			EtOH
<b>Tipo crinina</b>						
crinina	<b>53</b>	9				EtOH
bufanidrina	<b>94</b>		12			Aquoso
6 $\alpha$ -hidroxibufanidrina	<b>56</b>		6, 12			MeOH, aquoso
filifolina	<b>95</b>		6			MeOH
ambellina	<b>57</b>	3	6, 12			MeOH, aquoso
11-O-acetilambellina	<b>96</b>	3, 4				Éter de Petróleo
powellina	<b>97</b>	9	12			EtOH, aquoso
6-hidroxipowellina	<b>98</b>		12			Aquoso
11-O-1,2- $\beta$ -epoxiambellina	<b>99</b>	4				Éter de Petróleo
1 $\beta$ ,2 $\beta$ -epoxiambellina	<b>100</b>		12			Aquoso MeOH, EtOH,
undulatina	<b>101</b>		6, 9, 12			aquoso
6 $\alpha$ -metoxiundulatina	<b>102</b>		6			MeOH
6 $\alpha$ -hidroxiundulatina	<b>103</b>		6, 12			MeOH, Aquoso

1. (CHEN et al., 2018), 2. (GHANE et al., 2018), 3. (GHOSAL et al., 1983), 4. (GHOSAL et al., 1985), 5. (GHOSAL et al., 1989), 6. (HANH et al., 2018), 7. (JEFFS et al., 1985), 8. (KAUR et al., 2006), 9. (KOBAYASHI et al., 1984), 10. (NAM et al., 2004), 11. (TOMODA et al., 1985), 12. (TRAM NGUYEN et al., 2002), 13. (ZHANG et al., 2009)

**Quadro 2. Alcaloides identificados em *Crinum latifolium* (continuação)**

Alcaloide	#	Parte da planta				Extrato
		Bulbos	Folhas	Raiz	Flores	
<b>Tipo crinina (cont)</b>						
crinamidina	<b>104</b>		6, 12, 13			EtOH, MeOH, aquoso
6 $\alpha$ -hidroxicrinamidina	<b>105</b>		12			Aquoso
6 $\alpha$ -metoxicrinamidina	<b>106</b>		6			MeOH
epoxi-3,7-dimetoxicrinano-11-ona	<b>107</b>		12			Aquoso
N-óxido-undulatina	<b>108</b>		6			MeOH
perlolirina	<b>109</b>		6			MeOH
crinan-3 $\alpha$ -ol	<b>110</b>		12			Aquoso
<b>Outros</b>						
cripowellina C	<b>11</b>	1				EtOH
4,8-dimetoxi-cripowellina C	<b>112</b>	1				EtOH
9-metoxi-cripowellina B	<b>113</b>	1				EtOH
4-metoxi-8-hidroxi-cripowellina B	<b>114</b>	1				EtOH
4,8-dimetoxi-cripowellina D	<b>115</b>	1				EtOH
augustamina	<b>70</b>		6, 12			MeOH, aquoso
cherillina	<b>116</b>	9	9			EtOH

1. (CHEN et al., 2018), 2. (GHANE et al., 2018), 3. (GHOSAL et al., 1983), 4. (GHOSAL et al., 1985), 5. (GHOSAL et al., 1989), 6. (HANH et al., 2018), 7. (JEFFS et al., 1985), 8. (KAUR et al., 2006), 9. (KOBAYASHI et al., 1984), 10. (NAM et al., 2004), 11. (TOMODA et al., 1985), 12. (TRAM NGUYEN et al., 2002), 13. (ZHANG et al., 2009)

**Quadro 2. Alcaloides identificados em *Crinum latifolium* (continuação)**

Compostos não alcalóidicos	#	Parte da planta				Extrato
		Bulbos	Folhas	Raiz	Flores	
Ácido hidroxibenzóico	<b>117</b>		2			MeOH
glicano A	-			11		Aquoso
glicano B	-			11		Aquoso
lectina	-	8				Aquoso
4-Senecioiloximetil-6,7-dimetoxicumarina	<b>118</b>		10			MeOH
5,6,3'-Triidroxi-7,8,4'-trimetoxiflavona	<b>119</b>		10			MeOH
Cicloartenol	<b>120</b>		10			MeOH
4',7-diidroxi-3'-metoxiflavana (racemato)	<b>121</b>		10			MeOH
4',7-diidroxi-3'-metoxiflavana (racemato)	<b>122</b>		10			MeOH
2',4',7-triidroxidiidrochalcona	<b>123</b>		10			MeOH

1. (CHEN et al., 2018), 2. (GHANE et al., 2018), 3. (GHOSAL et al., 1983), 4. (GHOSAL et al., 1985), 5. (GHOSAL et al., 1989), 6. (HANH et al., 2018), 7. (JEFFS et al., 1985), 8. (KAUR et al., 2006), 9. (KOBAYASHI et al., 1984), 10. (NAM et al., 2004), 11. (TOMODA et al., 1985), 12. (TRAM NGUYEN et al., 2002), 13. (ZHANG et al., 2009)

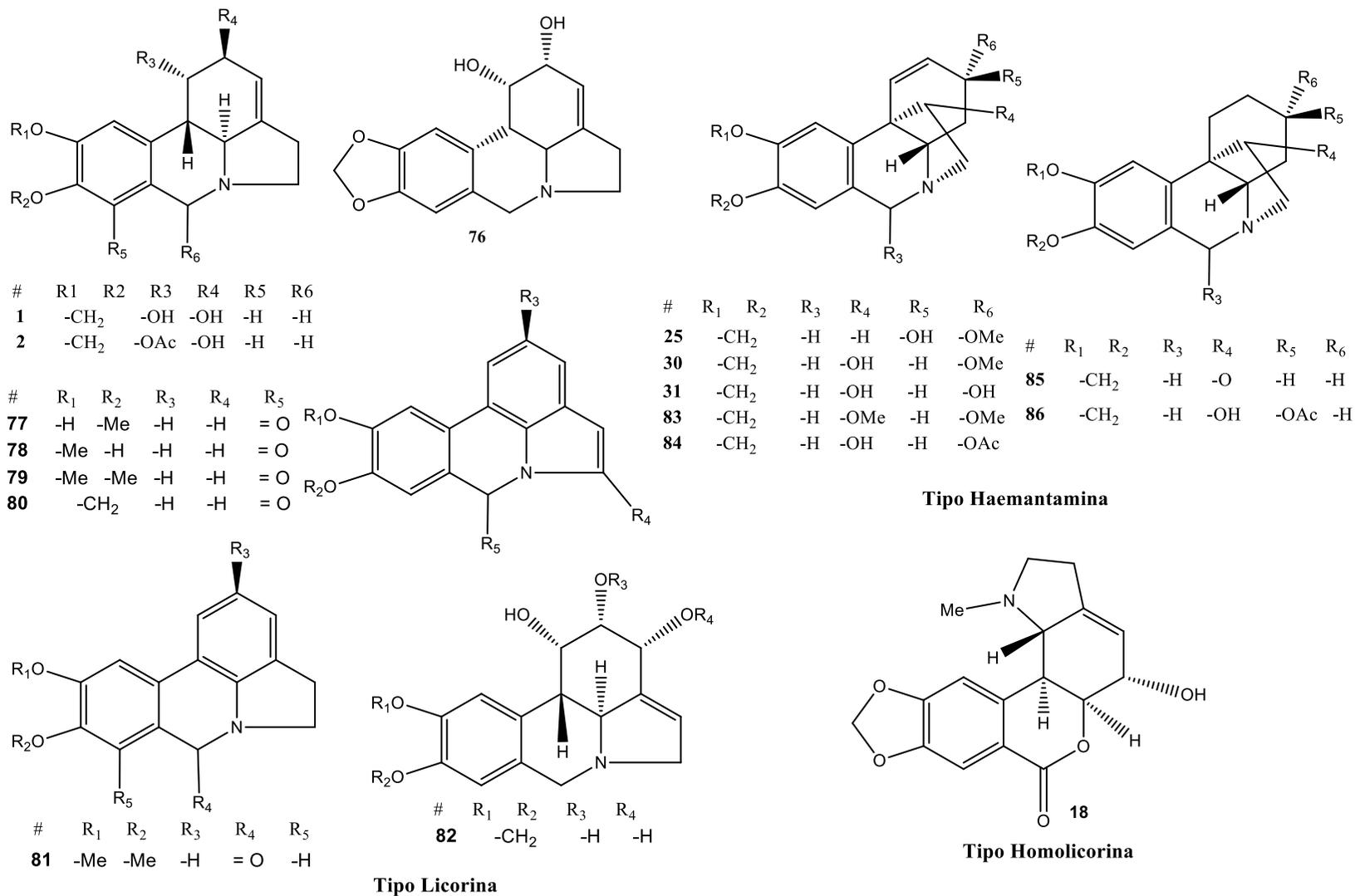
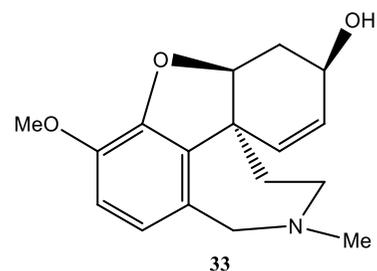
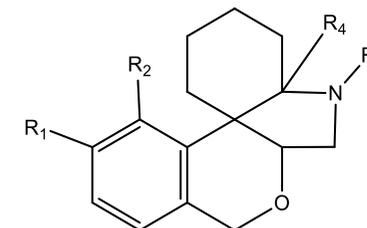
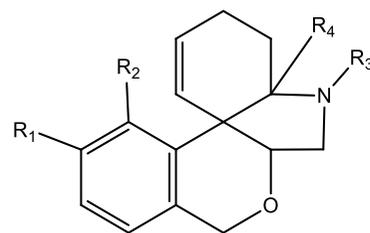


Figura 3. Metabólitos identificados em *Crinum latifolium*



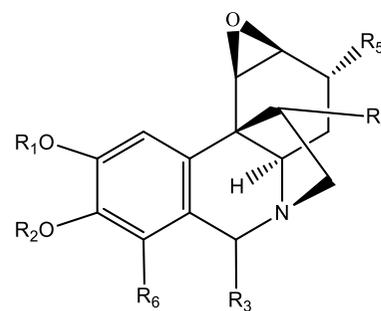
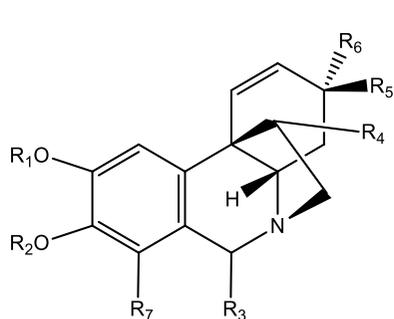
**Tipo Galantamina**



#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
87	-OMe	-OH	-Me	-H
88	-OMe	-OH	-H	-H
89	-OMe	-OH	-H	-OMe
90	-OMe	-OCOMe	-Me	-H
91	-OMe	-COOMe	-Me	-H

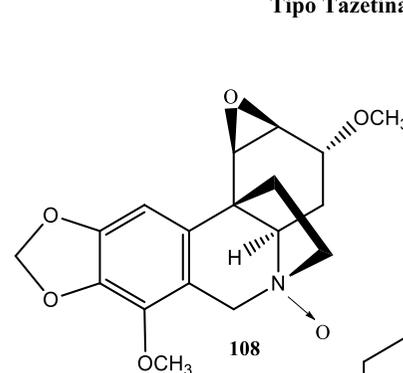
#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
92	-OMe	-OH	-Me	-H
93	-OH	-OH	-Me	-H

**Tipo Tazetina**

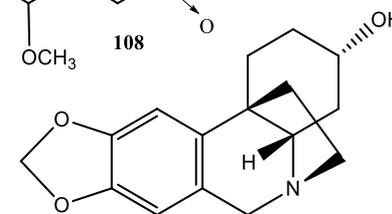


#	R <sub>1</sub>	R	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>
53	-CH <sub>2</sub>	-H	-H	-H	=O	-H	-H
94	-CH <sub>2</sub>	-H	-H	-H	-H	-OMe	-OMe
56	-CH <sub>2</sub>	-OH	-H	-H	-H	-OMe	-OMe
95	-CH <sub>2</sub>	-H	-ONic	-H	-H	-OMe	-OMe
57	-CH <sub>2</sub>	-H	-OH	-H	-H	-OMe	-OMe
96	-CH <sub>2</sub>	-H	-OAc	-H	-H	-OMe	-OMe
97	-CH <sub>2</sub>	-H	-H	-H	-H	-OH	-OMe
98	-CH <sub>2</sub>	-OH	-H	-H	-H	-OH	-OMe

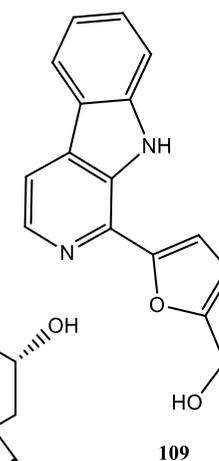
#	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
99	-CH <sub>2</sub>	-H	-OAc	-OMe	-OMe	-OMe
100	-CH <sub>2</sub>	-H	-OH	-OMe	-OMe	-OMe
101	-CH <sub>2</sub>	-H	-H	-OMe	-OMe	-OMe
102	-CH <sub>2</sub>	-OMe	-H	-OMe	-OMe	-OMe
103	-CH <sub>2</sub>	-OH	-H	-OMe	-OMe	-OMe
104	-CH <sub>2</sub>	-H	-H	-OH	-OMe	-OMe
105	-CH <sub>2</sub>	-OH	-H	-OH	-OMe	-OMe
106	-CH <sub>2</sub>	-OMe	-H	-OH	-OMe	-OMe
107	-CH <sub>2</sub>	-H	=O	-OMe	-OMe	-OMe



108



110



109

**Tipo Crinina**

**Figura 3. Metabólitos identificados em *Crinum latifolium* (Continuação)**

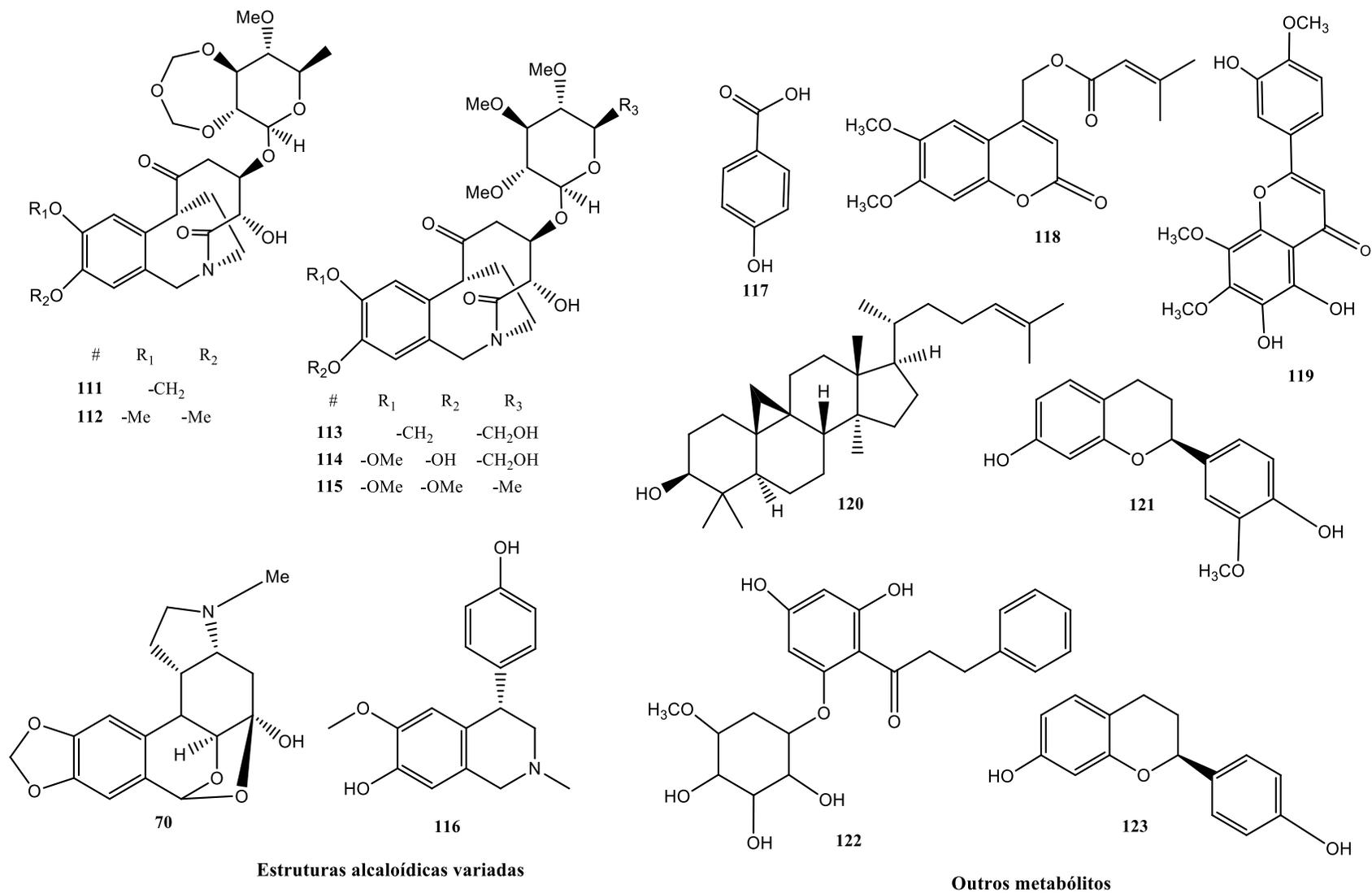


Figura 3. Metabólitos identificados em *Crinum latifolium* (Continuação)

### *Atividade anti-inflamatória*

JENNY et al. (2011) mostraram que o extrato aquoso de folhas de *C. latifolium* apresentou propriedades anti-inflamatórias em células mononucleares de sangue periférico (CMSP) estimuladas com fitohemaglutinina (FtH). O estímulo com FtH ativa vias metabólicas para formação de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e células T. Subsequentemente, aumenta a degradação de triptofano *via* kinurenina, e aumenta a produção de neopterinas em macrófagos. O extrato aquoso inibiu a degradação do triptofano mediada por indolamina-2,3-dioxigenase (kinurenina/triptofano), de forma dose-dependente, tanto em células sob o estímulo com FtH quanto nas não estimuladas, com  $CI_{50}$  igual a 92  $\mu\text{g/mL}$  e 241  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

ZVETKOVA et al. (2001) avaliaram o efeito imunomodulador do extrato aquoso de folhas de *C. latifolium* a 10  $\mu\text{g/mL}$ . Os autores prepararam dois tipos de extrato: extrato aquoso obtido por agitação do material vegetal em água a temperatura ambiente ( $E_{aq1}$ ) e extrato aquoso preparado com água em ebulição por 1 a 2 minutos ( $E_{aq2}$ ). Após 48 horas de incubação das CMSP com o extrato, os autores observaram dois tipos de resposta: as células incubadas com doses menores dos extratos (1:10 e 1:5) aumentaram a produção de neopterinas (de 19 a 35 nmol/L) de forma dose-dependente; as células incubadas com uma dose maior do extrato (1:1), mantiveram a produção de neoptirina semelhante à do grupo controle (5-9 nmol/L). Esse mesmo efeito foi observado em CMSP após o estímulo com FtH (100 U/mL) e IFN- $\gamma$  (10  $\mu\text{g/mL}$ ) (ZVETKOVA et al., 2001).

Os resultados obtidos por ZVETKOVA et al. (2001) e JENNY et al. (2011) são relevantes por que remetem à atividade de estímulo imunológico do extrato aquoso de *C. latifolium*. A neoptirina é produzida tanto por monócitos quanto por macrófagos, durante a resposta imunológica mediada por linfócitos T do tipo TH1, que caracteristicamente produzem IFN- $\gamma$  e IL-2, entre outros (DÉNESA et al., 2018). Os modelos experimentais aplicados pelos autores envolveram o uso desse tipo de proteínas ativadoras dos macrófagos durante a resposta imunológica.

O extrato metanólico das folhas da planta foi testado na inibição do fator nuclear Kappa-B (FNKB) em células de macrófagos RAW 264.7 (NAM e JAE, 2009). FNKB é uma proteína que atua como mediador molecular, ativando fatores transcricionais para expressão gênica de mediadores inflamatórios, como a interleucina IL-1 e o fator de necrose tumoral TNF- $\alpha$ . Na concentração de 36  $\mu\text{g/mL}$ , o extrato inibiu o crescimento das células em 50%, e inibiu FNKB entre 25 a 50%. Os autores concluíram que a atividade anti-inflamatória da planta era forte a moderada.

Em outro trabalho de pesquisa com macrófagos, NGUYEN et al. (2013) descreveram que, na concentração de 25 µg/mL, não houve mudanças na viabilidade celular de macrófagos peritoneais de ratos (MPR) tratados com os extratos aquoso, etanólico e alcaloídico de folhas de *C. latifolium*. Os autores avaliaram a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em células de monócitos humanos e encontraram que a produção basal de ERO diminuiu significativamente quando as células foram tratadas com 25 µg/mL de extrato. Após o estímulo com acetato de 13-tetradecanoilforbol (TDCA, 100 nM) houve uma diminuição significativa na produção de ERO, quando comparado com o grupo controle (células tratadas com TDCA na ausência do extrato). Ainda, os autores mostraram que o extrato aquoso induziu a diferenciação celular dos MPR para macrófagos do Fenótipo M1, levando à expressão de mRNA de TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  e IL-6. Os extratos etanólico e alcaloídico induziram a expressão de mRNA de NADPH-quinona óxido reductase (QOR1) (NGUYEN et al., 2013).

Macrófagos M1 são responsáveis pela produção de ânions superóxido, além de outras espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN). As ERN catalisam o metabolismo da L-arginina em citrulina e óxido nítrico (NO). O sistema em equilíbrio entre o ânion superóxido - NO ( $O_2^{\cdot-}/NO$ ) leva à formação de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), uma espécie reativa que não causa apenas danos oxidativos, mas também pode agir como agente bactericida. Outra das suas funções é a de sinalizar o início de processos metabólicos de necrose e apoptose em células tanto saudáveis como cancerígenas (NGUYEN et al., 2013; RASHEED et al., 2018).

TRAM et al. (1999) relataram que o extrato aquoso, obtido por decocção das folhas, ativou a resposta imune dos linfócitos TCD4 e a linfocitose no sangue periférico de camundongos BALB. Os autores sugeriram que esses resultados são relevantes por sua aplicação no tratamento de vários tipos de câncer, incluindo leucemia, além da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (TRAM et al., 1999).

#### *Atividade anticancerígena*

O extrato aquoso de folhas de *C. latifolium* inibiu o crescimento de células de carcinoma de próstata, nas linhagens PC3, LNCap e BPH-1, de forma dose dependente, com  $CI_{50} = 4,5$  mg/mL,  $CI_{50} = 2,3$  mg/mL e  $CI_{50} = 2,1$  mg/mL, respectivamente (JENNY et al., 2011). NGUYEN et al. (2013) mostraram que os extratos etanólico e alcaloídico de folhas foram tóxicos para células de linfoma murino (EL4-luc2). O valor de luminiscência em células não tratadas foi igual a 3385 UL; para as células tratadas com os extratos a 25 µg/mL, foi

quantificado um valor de luminiscência menor que 2500 UL, 26 % de redução comparado com o grupo controle.

TRAM et al. (2001) induziram tumores do tipo sarcoma em ratos Wistar de 50 a 55 dias de idade, com injeções subcutâneas na região toraco-abdominal com 20-metilcolantreno. O extrato aquoso de *C. latifolium*, obtido por decocção, aumentou a sobrevivência de 39 para 68 dias em comparação com o grupo controle (TRAM et al., 2001).

#### *Outras atividades biológicas*

RAHMAN et al. (2016) determinaram a atividade antibacteriana do extrato metanólico obtido de folhas de *C. latifolium*. No ensaio, discos impregnados com 25 a 100 µL de extrato bruto geraram zonas de inibição (ZI) de 1,0 cm a 1,6 cm, quando testados em *Escherichia coli*. Para *Staphylococcus aureus*, os discos impregnados com 100 µL do extrato bruto geraram uma ZI de 1 cm.

A atividade anti-helmíntica do extrato metanólico de folhas foi avaliada, usando como modelo *Pheretima posthuma* (AZIZ et al., 2014). A maior atividade foi encontrada na concentração de 50 mg/mL. Nessa concentração, o extrato apresentou o menor tempo para paralisia total (24 minutos) e morte (46,4 minutos) dos anelídeos.

AZIZ et al. (2014) e RAHMAN et al. (2016) avaliaram a toxicidade do extrato metanólico de folhas em *Artemia salina* em duas pesquisas diferentes. Os autores determinaram DL<sub>50</sub> em 7 e 16 µg/mL, respectivamente. O extrato metanólico de folhas, quando testado na concentração de 1 mg/mL, inibiu as enzimas α-Amil, α-Gli e AChE em 15 %, 65 % e 77 %, respectivamente (GHANE et al., 2018). Finalmente, o mesmo tipo de extrato foi testado quanto à atividade trombolítica, por meio do ensaio *in vitro* da lise de coágulo de sangue humano (DEWAN e DAS, 2013). A porcentagem de lise se manteve entre 15 % e 34 % nas concentrações de 2-10 mg/mL.

#### **1.2.2 *Hippeastrum psittacinum* (Ker Gawl.) Herb.**

Pertencente ao gênero *Hippeastrum*, é uma espécie endêmica do Brasil (JBRJ, 2019), conhecida popularmente como alho bravo, alho do mato, cebola branca e açucena do campo (SILVA et al., 2012). Apresenta como sinônimos: *Amaryllis psittacina* var. *decorata* (Lem.)

Traub & Uphof; *Aschamia psittacina* (Ker Gawl.) Salisb; *Hippeastrum decoratum* Lem.; *Amaryllis psittacina* Ker Gawl. e *Trisacarpis psittacina* (Ker Gawl.) Raf.

### **Distribuição geográfica**

Segundo os dados do REFLORA, a distribuição geográfica no Brasil abrange as regiões Sudeste (Minas Gerais, São Paulo) e Sul (Paraná) com domínio fitogeográfico da Mata Atlântica (JBRJ, 2019).

### **Usos etnomedicinais**

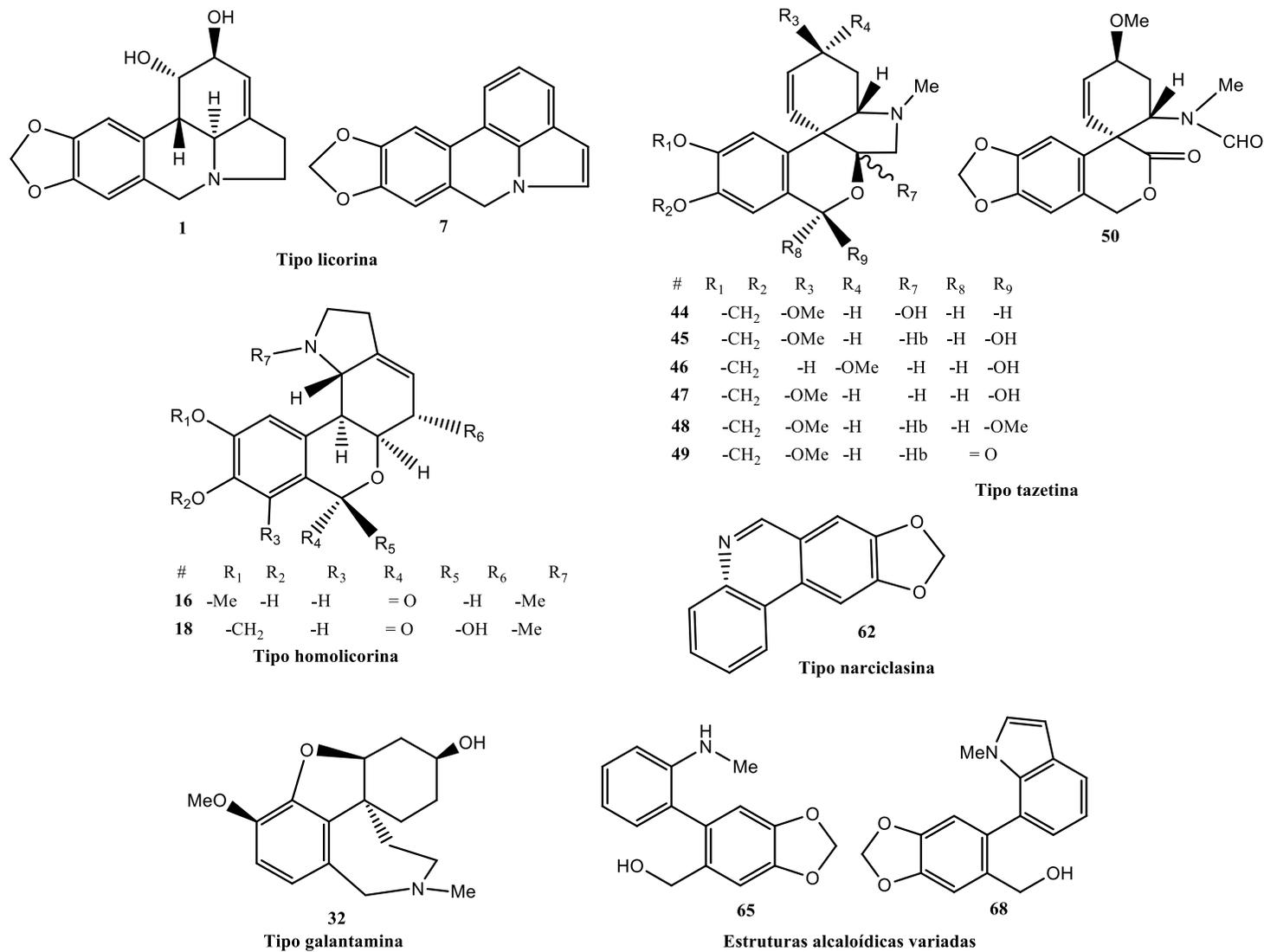
A planta tem sido utilizada para o tratamento da tosse por indígenas e comunidades rurais do Nordeste do Brasil (ALBUQUERQUE et al., 2007). AMARAL (2007) relatou o uso medicinal do suco obtido de raízes de *H. psittacinum*, que apresenta propriedade purgativa. SILVA et al. (2012) descreveram as propriedades afrodisíacas dos bulbos da planta.

### **Metabólitos secundários**

Alcaloides são os principais compostos identificados nos extratos metanólicos e etanólicos dos bulbos e folhas dessa espécie. No Quadro 1 (pag 3) e na Figura 4 estão representados os 15 alcaloides identificados na planta, a parte da planta e o tipo de extrato em que foram identificados. Cabe ressaltar que aproximadamente 50% dos alcaloides descritos na planta são do tipo tazetina, e o restante corresponde aos núcleos estruturais de tipo licorina, haemantamina, galantamina, narciclasina, além de outros com estruturas variadas.

### **Atividades biológicas**

GIORDANI et al. (2008) descreveram qualitativamente as atividades de inibição da AChE e antioxidante do extrato etanólico de bulbos dessa espécie, testado a 10,0 mg/mL, 1,0 mg/mL e 0,1 mg/mL. No teste com DPPH, a atividade do extrato, a 10 mg/mL, foi semelhante à atividade da rutina (1 mg/mL, controle positivo). Contudo, nas concentrações testadas, a atividade de inibição da AChE foi baixa, comparada com fisostigmina (1 mg/mL, controle positivo).



**Figura 4. Alcaloides identificados em *Hippeastrum psittacinum***

### 1.3 DOENÇA DE ALZHEIMER

No início do século XX, o doutor Elois Alzheimer identificou as principais características de uma doença neurodegenerativa que produz a deterioração progressiva de funções cognitivas na idade adulta e que leva a um estado de absoluta incapacidade, seguida de morte, em um período geralmente inferior a duas décadas. A doença foi nomeada, em homenagem ao seu descobridor como doença de Alzheimer (DA) (OLIVEIRA, 2005). Podem ser identificadas três fases na evolução da doença. A primeira, cuja duração é de 2 a 5 anos, é caracterizada pela deterioração gradual da memória; na segunda etapa, com duração de 2 a 10 anos, ocorrem alterações importantes no funcionamento do cérebro e aparecem problemas de disfasia, apraxia e agnosia. Na terceira fase estão comprometidas a maioria das funções cognitivas do cérebro, ocorrem tremores espontâneos no corpo, às vezes convulsões, insônia marcada, colapso nervoso e perda total dos estados de personalidade (ACOSTA, 2011; WORTMANN, 2012; PRINCE et al., 2015).

As características histopatológicas da DA indicam que é um processo que envolve morte seletiva e progressiva das células neuronais em áreas específicas do cérebro, principalmente no neocortex e no hipocampo. Este tipo de quadro clínico de demência é acompanhado pela presença de placas  $\beta$ -amiloide (principal constituinte das placas senis) que se depositam no exterior dos neurônios. Além disso, ocorrem o acúmulo de novelos ou emaranhados neurofibrilares no interior dos neurônios e a degeneração/atrofia dos neurônios do prosencéfalo basal colinérgico. A perda dos neurônios do prosencéfalo basal colinérgico leva à redução da atividade sináptica da acetilcolina que, conseqüentemente, induz à deterioração cognitiva (ANAND et al., 2012; GOMATHI e MANIAN, 2015).

No cérebro, os neurônios se intercomunicam por meio de áreas especializadas, conhecidas como sítios de sinapse neuronal. O mecanismo envolve a transmissão de um sinal elétrico desde a região pré-sináptica de um neurônio com a região pós-sináptica de outro, num processo conhecido como neurotransmissão (COSTA, 2015).

Durante a neurotransmissão colinérgica, é liberada a acetilcolina (ACh), um neurotransmissor dos neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso simpático e parassimpático bem como da medula adrenal. A ACh é liberada na fenda sináptica, e posteriormente, se liga a receptores (nicotínicos e muscarínicos) na região pós-sináptica, onde finaliza a transmissão do sinal por hidrólise da ACh a colina e acetato. A colina liberada pode

ser recapturada no nervo pré-sináptico e o neurotransmissor pode ser sintetizado novamente na presença de acetilcoenzima A e por ação da colina acetiltransferase (ANAND et al., 2012; ATANASOVA et al., 2015; DRACZKOWSKI et al., 2016).

O efeito da ACh na neurotransmissão é determinado pela atividade de uma enzima conhecida como acetilcolinesterase (AChE), capaz de hidrolisar o éster de colina, ACh, em colina e acetato (FAWOLE et al., 2010). A acetilcolinesterase acelera a agregação da proteína  $\beta$ -amiloide formando complexos neurotóxicos estáveis. Esses complexos induzem uma desregulação da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular no hipocampo neuronal, disfunção mitocondrial, distrofia neurítica e apoptose (ATANASOVA et al., 2015).

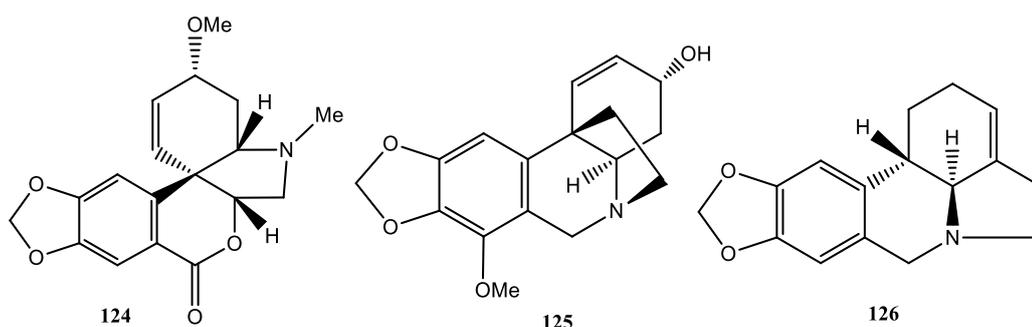
De acordo com a hipótese colinérgica, a inibição da AChE, aumenta os níveis de acetilcolina no cérebro aprimorando as funções colinérgicas em pacientes com Doença de Alzheimer (DRACZKOWSKI et al., 2016). O uso desse tipo de inibidores pode atenuar os sintomas, mas não é capaz de reverter o progresso da doença. Existem no mercado dois tipos de fármacos para o seu tratamento (ATANASOVA et al., 2015): inibidores de N-metil-D-aspartato e inibidores da acetilcolinesterase (AChEi). No último grupo é possível encontrar inibidores sintéticos como tacrina e donepezila, além de inibidores de origem natural como galantamina, rivastigmina e huperzina A. Todavia, alguns desses compostos (rivastigmina, galantamina e donepezila) apresentam atividade limitada e produzem efeitos adversos relacionados com a estimulação colinérgica no cérebro e aos tecidos periféricos (KONRATH et al., 2012). Assim, é importante buscar alternativas, para aumentar o arsenal terapêutico e, idealmente, fármacos mais seguros, com menores efeitos colaterais.

#### 1.4 AMARYLLIDACEAE, ALCALOIDES E NEUROPROTEÇÃO

Poucos são os estudos que relatam o efeito neuroprotetor dos alcaloides de Amaryllidaceae; no entanto, essa atividade, quando estudada, vem sendo atribuída à presença de alcaloides de tipo licorina, homolicorina, galantamina e montanina (CORTES; POSADA; et al., 2015; NG et al., 2015; CORTES et al., 2018). As pesquisas têm sido realizadas em modelos utilizando células de neuroblastoma humano SH-SY5Y submetidas a estímulo citotóxico por  $H_2O_2$ ,  $CoCl_2$  ou proteína  $\beta$ -amiloide  $-A\beta_{25-35}$  (LI et al., 2013; JIN et al., 2014). Para frações alcaloídicas tem sido utilizado o mesmo modelo celular, com glutamato como agente citotóxico (CORTES; POSADA; et al., 2015; CORTES et al., 2018).

CORTES; POSADA; et al. (2015) estudaram o efeito neuroprotetor de frações alcaloídicas ( $F_{alcs}$ ) do extrato etanólico de bulbos de Amaryllidaceae coletadas em Cundinamarca, Colômbia. Foram estudadas as espécies *Crinum jagus*, *C. bulbispermum*, *Hippeastrum puniceum*, *H. barbatum* e *Zephyranthes carinata*. Os testes foram realizados em células neuronais primárias isoladas de embriões de ratos Wistar. As  $F_{alcs}$  foram tóxicas em concentrações superiores a 29,0  $\mu\text{g/mL}$ . Contudo, *C. jagus* (2,9  $\mu\text{g/mL}$ ), *C. bulbispermum* (0,3 e 2,9  $\mu\text{g/mL}$ ), *Z. carinata* (2,9  $\mu\text{g/mL}$ ) e *H. puniceum* (2,9  $\mu\text{g/mL}$ ) protegeram as células do efeito citotóxico do glutamato (125  $\mu\text{M}$ ), reduzindo os níveis de lactato desidrogenase (LDH) liberado no meio de cultura.

A análise da morfologia neuronal revelou que *C. jagus* protegeu as células neuronais da condensação e da fragmentação nuclear induzida por glutamato, sem gerar mudanças na estrutura dendrítica. Os autores sugeriram que licorina (**1**) foi responsável pelo efeito neuroprotetor, mas não descartaram que um efeito sinérgico de outros alcaloides – 1-O-acetillicorina (**2**), 11,12-desidroanidrolícorina (**7**), vitatina (**27**), undulatina (**59**), trisferidina (**64**), macronina (**124**), powellina (**125**) e 11,12-desidrolícoreno (**126**) - presentes no extrato, tenha contribuído com essa atividade. Com exceção de *C. bulbispermum*, todos os extratos inibiram a AChE, apresentando valores de  $CI_{50}$  menores que 50  $\mu\text{g/mL}$ , sendo que *Z. carinata* e *C. jagus* apresentaram o menor valor  $CI_{50}$  (~18  $\mu\text{g/mL}$ ) (CORTES; POSADA; et al., 2015).



As atividades neuroprotetora e antioxidante de frações alcaloídicas de *Phaedranassa lehmannii*, *Eucharis bonplandii*, *E. caucana*, *C. jagus*, *H. elegans* e *C. miniata*, coletadas em Cauca e Antioquia, Colômbia, foram avaliadas em células neuronais primárias isoladas de embriões de ratos Wistar (CORTES et al., 2018).

As frações alcaloídicas ( $F_{alcs}$ ) foram tóxicas em concentrações superiores a 29  $\mu\text{g/mL}$ , sendo que as concentrações menores mantiveram os níveis de lactato desidrogenase abaixo de

20% após o estímulo citotóxico com glutamato 125  $\mu$ M. Quando realizados os experimentos, foram observados dois tipos de resposta: a) aumento na liberação de glutamato no meio de cultura, em células estimuladas com glutamato e em seguida tratadas com  $F_{alcs}$ ; b) um efeito contrário em células pré-tratadas com  $F_{alcs}$  e, logo após, estimuladas com glutamato. *Eucharis bonplandii* (6  $\mu$ g/mL), *E. caucana* (6  $\mu$ g/mL) e *C. miniata* (0,75  $\mu$ g/mL) diminuíram a porcentagem de LDH no meio de cultura. Além disso, protegeram as células da fragmentação nuclear induzida por glutamato, mantendo valores de fragmentação próximos a 18 %, 16 %, 21%, respectivamente, em comparação com o grupo controle, que mostrou um valor aproximado de 45 %. No teste de peroxidação lipídica foi observado que no grupo controle (células estimuladas com glutamato) os níveis de malondialdeído (MDH) passaram de 162 pmol MDH/milhão de neurônios (nível basal) a 321 pmol MDH/milhão de neurônios. O pré-tratamento com  $F_{alcs}$  manteve o MDH no nível basal, enquanto o pós-tratamento diminuiu os níveis de MDH em 53 %, 45 % e 34% para *E. caucana*, *E. bonplandii* e *C. miniata*. Esses resultados sugeriram que os extratos protegeram e repararam as membranas neuronais da peroxidação lipídica causada pelo glutamato (CORTES et al., 2018).

Os autores sugeriram que a atividade antioxidante (AA) teórica dos alcaloides presentes nas  $F_{alcs}$  foi devida a reações de transferência de átomos de hidrogênio, por meio de um mecanismo de estabilização dos radicais livres produzidos em células estimuladas com glutamato. No modelo teórico aplicado, a maior AA foi calculada para *E. bonplandii*, seguido de *E. caucana*, e *C. miniata* (CORTES et al., 2018).

Em outro estudo, aplicando as metodologias descritas anteriormente, foi mostrado que a fração alcaloídica do extrato etanólico de bulbos de *Z. carinata*, coletada em Antioquia, Colômbia, protegeu os neurônios da toxicidade mediada por glutamato 125  $\mu$ M, evidenciado pela diminuição dos núcleos apoptóticos ou da fragmentação nuclear das células neuronais, pela redução da produção de MDH como produto da peroxidação lipídica, e pela conservação e restauração das estruturas dendríticas nos neurônios corticais primários (CORTES et al., 2019). Após a administração intraperitoneal do extrato (10 mg/Kg) por 1 mês a cada 12 horas, foi observado que os camundongos 3xTg-AD (de 18 meses de idade) melhoraram o aprendizado espacial quando submetidos ao teste do labirinto aquático de Morris. Camundongos 3xTg-AD apresentam acúmulo progressivo de A $\beta$  ou  $\beta$ -amiloidosis, desde os 6 meses de idade. A análise histopatológica revelou que houve redução significativa da astrogliose e da tautopatía gerada pela hiperfosforilação da proteína Tau. A fração alcaloídica reduziu significativamente os emaranhados neurofibrilares e os filamentos helicoidais no hipocampo e na amígdala. Ainda,

diminuiu o marcador pró-inflamatório ciclooxigenase-2 (COX-2), e aumentou os níveis de proteína quinase B, envolvida na regulação do crescimento, proliferação e sobrevivência celular.

O extrato etanólico de bulbos de *Caliphruria subdentata*, coletados em Cauca, Colômbia, foi pouco citotóxico para células de neuroblastoma humano SH-SY5Y em concentrações menores a 100 µg/mL. Quando testado em AChE, o extrato apresentou  $CI_{50} = 46$  µg/mL. O extrato, nas concentrações de 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL, aumentou a taxa de sobrevivência das células de neuroblastoma (90 – 100 %) estimuladas com proteína  $\beta$ -amiloide ( $A\beta_{(1-42)}$ ) 10 µM, e diminuiu a porcentagem de células necróticas (CASTILLO et al., 2018). A análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostrou que o extrato protegeu as mitocôndrias da inflamação gerada por  $A\beta_{(1-42)}$  e aumentou o seu número nas células tratadas. Além disso, o extrato protegeu as células de danos no Aparato de Golgi (AGi) e no retículo endoplasmático (REp). As células tratadas com a proteína apresentaram o AGi granuloso e REp dilatado. O extrato protegeu as células da instabilidade genética gerada por  $A\beta_{(1-42)}$ , diminuindo o número de micronúcleos, as pontes nucleoplasmáticas e os brotos nucleares em células binucleadas de neuroblastoma. O extrato protegeu as células da quebra na dupla fita de ADN gerada pela  $A\beta_{(1-42)}$  (CASTILLO et al., 2018).

## 1.5 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DOS EXTRATOS DE AMARYLLIDACEAE

Os dados da literatura relatam poucos estudos *in vitro* de atividades biológicas para Amaryllidaceae brasileiras ou outras Amaryllidaceae cultivadas no Brasil. A maior parte das pesquisas se referem aos compostos puros ou frações alcalóidicas obtidas a partir do material vegetal (bulbos e folhas). Os extratos etanólicos ou metanólicos dessas plantas apresentam resultados promissores quanto à atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena, antibacteriana, além de atividades inibitórias de enzimas como acetilcolinesterase, tirosinase,  $\alpha$ -glicosidase e  $\alpha$ -amilase. Esta pesquisa apresenta novas evidências da atividade anti-inflamatória, neuroprotetora, e inibidora da acetilcolinesterase de extratos etanólicos de Amaryllidaceae coletadas no Brasil.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar espécies de Amaryllidaceae quanto a composição química e atividades biológicas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar o perfil alcaloídico de extratos de Amaryllidaceae por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

Avaliar a citotoxicidade de extratos de Amaryllidaceae em células RAW 264.7

Identificar frações alcaloídicas de *Crinum latifolium* e *Hippeastrum psittacinum* ativas frente à acetilcolinesterase por ensaio de inibição enzimática

Estimar a atividade anti-inflamatória de extratos de *Crinum latifolium* e *Hippeastrum psittacinum* por meio da produção de óxido nítrico.

Determinar a atividade citotóxica de extratos de *Crinum latifolium* e *Hippeastrum psittacinum* em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) e de neuroblastoma humano (SH-SY5Y).

Estimar a atividade neuroprotetora de *Crinum latifolium* e *Hippeastrum psittacinum* em células SH-SY5Y.

Avaliar o efeito genotóxico de *Crinum latifolium* e *Hippeastrum psittacinum* em células SH-SY5Y por meio dos ensaios cometa e de micronúcleos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### 3 MATERIAL E METODOS

O resumo da metodologia empregada no trabalho de pesquisa é mostrado na Figura 5 e a descrição das técnicas empregadas é mostrada a seguir.

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL E EXTRATOS

Para este trabalho foram escolhidos os extratos etanólico e hexânico de bulbos de *Hymenocallis litorallis*, *Hippeastrum* sp., *H. psittacinum*, *H. goianum*, *Crinum latifolium* e *Habranthus irwinianus*, da coleção de extratos de Amaryllidaceae do Laboratório de Produtos Naturais (LaProNat), da Universidade de Brasília. O processamento do material botânico e a obtenção dos extratos foram descritos por MERA-LÓPEZ (2018). Os dados das espécies estudadas são mostrados no Quadro 3.

**Quadro 3 Espécies de Amaryllidaceae estudadas nesse trabalho**

Espécie	Procedência	Herbário	Código
<i>Hymenocallis litorallis</i> (Jacq.) Salisb.	Porto Velho, RO.		MFS 1712
<i>Hippeastrum psittacinum</i> Herb.	Capão Alto, SC.	EMBRAPA - CENARGEN	GPS 10874
<i>Crinum latifolium</i> L.	Alexânia, GO.		AAS 2712
<i>Hippeastrum</i> sp.*	Lages, SC.		EG 1190
<i>Habranthus irwinianus</i> (Ravenna)	Brasília, DF.	Universidade de Brasília	ACA 62
<i>Hippeastrum goianum</i> (Ravenna)	Brasília, DF.	Universidade de Brasília	2387

#### 3.1.1 Extração seletiva de alcaloides

Parte do extrato etanólico bruto ( $E_{EtOH}$ ) de *C. latifolium* e *H. psittacinum* foi solubilizada em solução de ácido sulfúrico 2% (90 mL), pH 2. A fração solúvel em meio ácido ( $E_{aq1}$ ) foi extraída pelo método de extrações sucessivas com éter etílico (3 x 30 mL) e acetato de etila (3 x 30 mL), para remoção de compostos neutros. A fração aquosa remanescente ( $F_{aq1}$ ) foi alcalinizada com uma solução de hidróxido de amônio (25%) até atingir pH 10, seguido de extração sucessiva com n-hexano ( $F_{hex}$ , 6 x 30 mL), acetato de etila ( $F_{AcOEt}$ , 6 x 30 mL) e uma mistura de acetato de etila: metanol ( $F_{AcOEt/MeOH}$  1:1, 6 x

30 mL). O solvente orgânico foi eliminado por rotaevaporação e a solução aquosa foi submetida à liofilização ANDRADE et al. (2016). O esquema geral do processo de extração seletiva de alcaloides é mostrado na Figura 6.

### 3.2 ESTUDO FITOQUÍMICO E ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

#### 3.2.1 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

As análises por CG-EM foram realizadas na Universidade Federal do Espírito Santo – Campus São Mateus, em equipamento Shimadzu GCMS-QP2010 Plus. As condições de operação do equipamento são mostradas no Quadro 4.

**Quadro 4. Condições CG-EM para análise de alcaloides**

Condições CG-EM	
Coluna cromatográfica	RTx-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) Fase estacionária: 5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano (Restek)
Modo de injeção	Splitless (1:20)
Temperatura de injeção	280 °C
Gás de arraste	Hélio; fluxo 0,8 mL/min
Programação de temperatura	100 - 180 °C (↑ 15 °C/min, 180 °C (1 min), 180 - 300 °C (↑ 5 °C/min), 300 °C (10 min)
Faixa de massas	40 - 600 uma
Tipo de ionização	EI (70 eV)

#### 3.2.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Os extratos e/ou frações foram submetidos à análise por CCD com base na metodologia descrita por WAGNER e BLADT (1996). Para a detecção de alcaloides, foi usado o eluente constituído por clorofórmio:acetato de etila:metanol (45:40:15). Como fase estacionária, foram utilizadas placas de sílica-gel 60 com 0,2 mm de espessura (Silica gel on TLC Al foils, Merck®). Após eluição da fase móvel, as placas foram observadas sob luz ultravioleta (365 nm) e reveladas com o reagente Dragendorff.

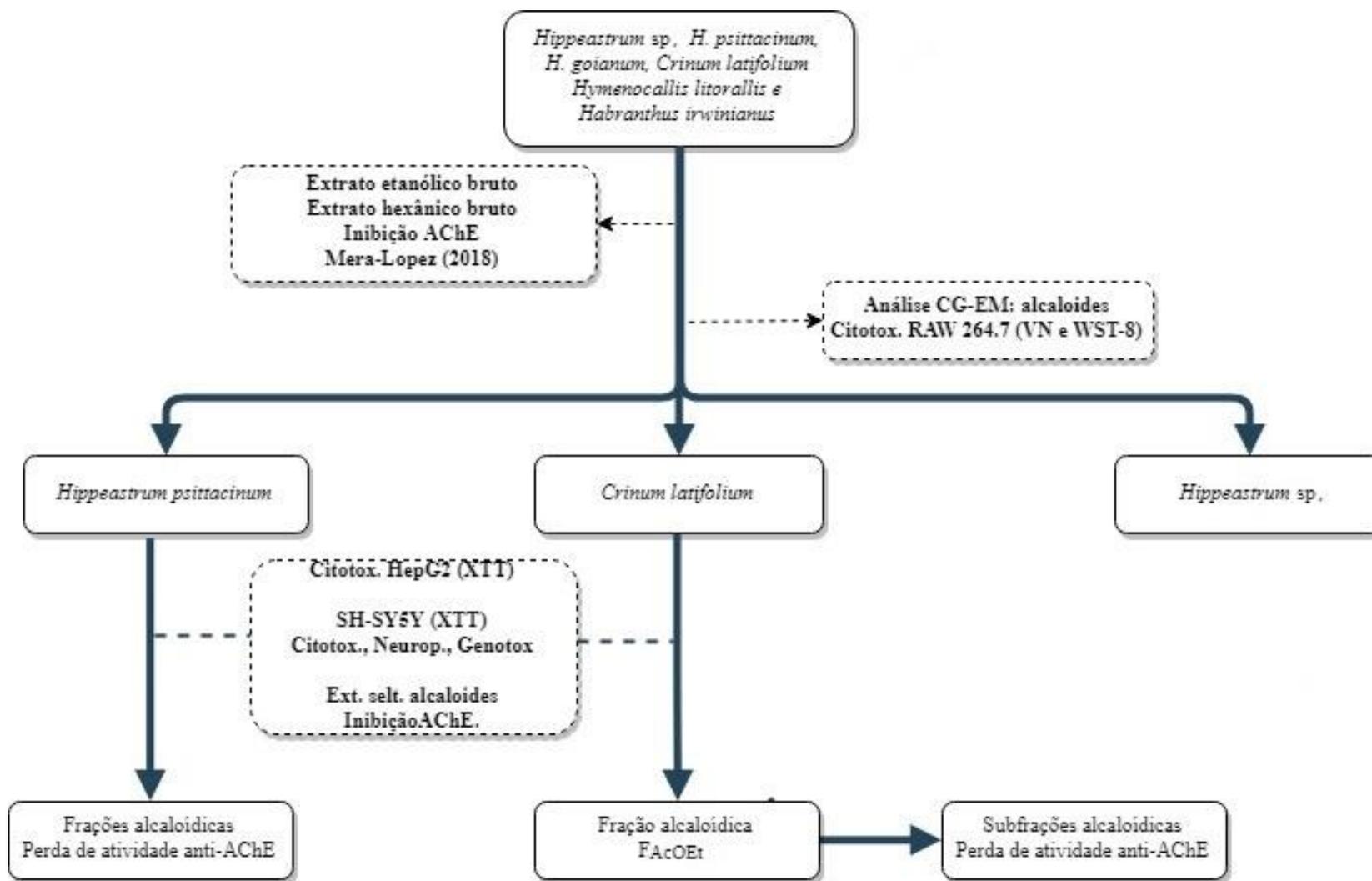


Figura 5. Representação esquemática da metodologia empregada

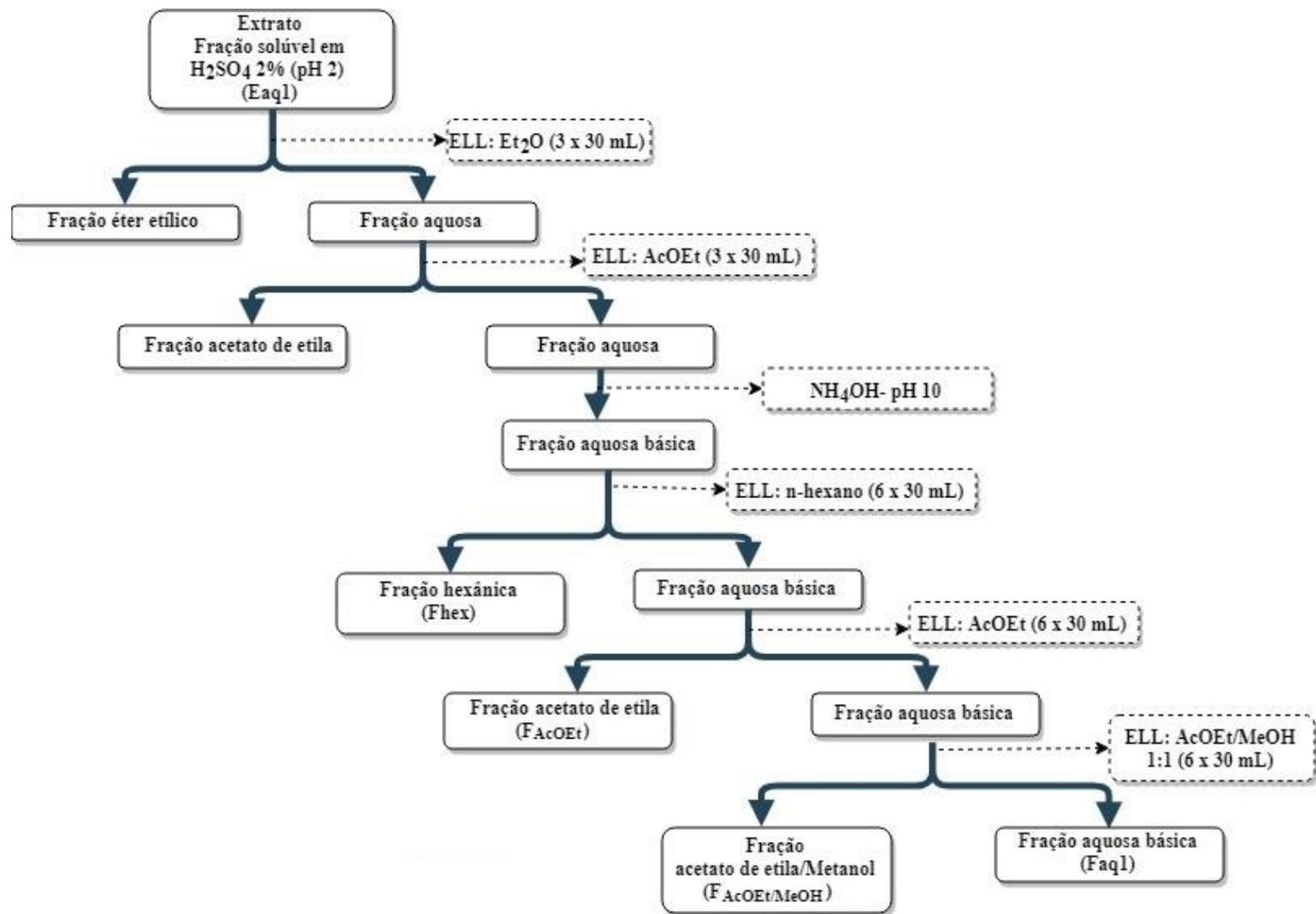


Figura 6. Representação esquemática da extração seletiva de alcaloides

### 3.2.3 Reagente de Dragendorff

O reagente de Dragendorff é usado para detecção de alcaloides e compostos heterocíclicos de nitrogênio. A metodologia envolve a preparação de duas soluções: Solução A, composta de nitrato de bismuto 1,7% (p/v) e ácido acético glacial 20% (v/v); solução B, composta de uma solução aquosa de iodeto de potássio 27% (p/v).

As soluções A e B foram misturadas em proporção 1:1 (solução estoque), para posterior preparação da solução de borrifração contendo 1 mL da solução estoque, 2 mL de ácido acético glacial e 10 mL de água. Após borrifração, os alcaloides apareceram como manchas laranja-marrom.

### 3.3 CROMATOGRAFIA EM COLUNA

No processo de separação por cromatografia em coluna, uma coluna de vidro de 2,3 cm de diâmetro e 49,0 cm de comprimento foi preenchida com 20 g de Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich) previamente acondicionada com Metanol por 24 horas. A fração F<sub>AcOEt</sub> (1,0 g) foi solubilizada em metanol (5 mL) utilizando banho ultrassom e, em seguida, filtrada. A eluição foi realizada utilizando o mesmo solvente.

As frações de 5 mL (Fc, 150 no total) foram reunidas, conforme perfil cromatográfico por CCD revelada com reagente de Dragendorff, nas subfrações (Sbf): Fc 1-5 (Sbf 1), Fc 6-9 (Sbf 2), Fc 10-13 (Sbf 3), Fc 14 (Sbf 4), Fc 15-16 (Sbf 5), Fc 17-18 (Sbf 6), Fc 19-20 (Sbf 7), Fc 21-27 (Sbf 8), Fc 28-29 (Sbf 9) e Fc 30-41 (Sbf 10). As subfrações 42-150 não mostraram resposta positiva para alcaloides quando analisadas por CCD e não foram consideradas para as análises subsequentes. As subfrações Sbf 1-10 foram testadas quanto à inibição de acetilcolinesterase.

### 3.4 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

#### 3.4.1 Ensaio *in-vitro* de inibição da enzima acetilcolinesterase

O ensaio *in vitro* para avaliar a atividade inibitória da acetilcolinesterase foi realizado a partir da metodologia descrita por ELLMAN et al. (1961), com algumas modificações (ANDRADE et al., 2016). A técnica tem como base a hidrólise da

acetiltiocolina pela enzima acetilcolinesterase (AChE), com a produção de tiocolina e acetato. A tiocolina gerada reage com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), produzindo 2-nitrobenzoato-5-mercaptopiocolina e ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, composto de cor amarela, o qual apresenta um máximo de absorção a 405 nm.

No ensaio, 50,0 µL de tampão fosfato (PBS: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,3 mM e NaCl 0,15 M, pH 7.5), 50,0 µL de amostra e 50,0 µL da solução de AChE 0,25 U/mL (AChE de *Electrophorus electricus*, Sigma-Aldrich) foram vertidos numa microplaca de 96 poços, e incubados por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução do substrato: iodeto de acetiltiocolina 0,24 mM (ATCI, Sigma - Aldrich); DTNB 0,2 mM (Sigma - Aldrich) e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,04 M. Após 10 minutos, a reação foi monitorada em um leitor de microplacas (TP-Reader, Biogenic Scientific Product) em comprimento de onda de 405 nm.

Como controle positivo de inibição enzimática foi utilizado o inibidor bromidrato de galantamina, gentilmente cedido por Libbs Farmacêutica Ltda. A curva dose-resposta foi construída com concentrações variando entre 0,013-1,7 µg/mL. Para o cálculo de CI<sub>50</sub> foram construídas curvas de inibição enzimática, plotando a porcentagem de inibição *versus* o logaritmo da concentração da amostra (extrato e padrão). Em seguida, foi realizada uma análise de regressão não linear utilizando o software GraphPad prism 6.0.

As porcentagens de inibição enzimática foram calculadas comparando a absorbância das amostras (ensaio contendo amostra, enzima e substrato) com a do controle da enzima (enzima, substrato e tampão). Os valores de referência para o cálculo da atividade biológica foram os obtidos em 10 minutos, tempo necessário para que a variação de absorbância seja menor que 2%. Na ausência do extrato ou padrão, a enzima não é inibida e, por conseguinte, há maior produção de tiocolina e do composto colorido ácido 5-tio-2-nitro-benzoico. As porcentagens de inibição foram calculadas de acordo com a equação:

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

Onde C representa a absorbância do controle da enzima e A a absorbância da amostra subtraído seu branco (amostra, substrato e tampão).

### **3.4.2 Viabilidade celular e atividade citotóxica dos extratos de Amaryllidaceae em células RAW 264.7**

#### 3.4.2.1 Linhagem celular e cultura de células

Os ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade com os extratos etanólicos de Amaryllidaceae foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Doenças Imunogenéticas e Crônico-Degenerativas da Universidade de Brasília e padronizadas por TEOTÔNIO (2016), utilizando células de macrófagos murinos RAW 264.7 (Banco de Células do Rio de Janeiro-BCRJ)

As células foram cultivadas em garrafa de 75 cm<sup>2</sup> contendo meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), composto por glicose 4500 mg/L, 110 mg de piruvato de sódio e 2 mM de L-glutamina. O meio foi suplementado com soro fetal bovino 10%, 100 U/mL de penicilina-estreptomicina, 1% de aminoácidos não essenciais e 25 mM de HEPES {ácido 2-[4(2-hidroxietil)-piperazin]-1-etanosulfônico} para ser obtido o meio de tratamento completo (MC). As células foram incubadas a 37 °C em estufa com atmosfera úmida, com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% O<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado a cada três dias até as células atingirem 80% de confluência. Em seguida, o MC foi descartado e trocado por 5 mL de meio fresco. As células foram raspadas cuidadosamente com auxílio de uma alça de plástico.

#### 3.4.2.2 Tratamento com amostra

As células foram semeadas em microplacas de 96 poços na concentração de  $1 \times 10^5$  e  $5 \times 10^3$  células/poço (Vf 200µL) para os testes de viabilidade celular com vermelho neutro e WST-8, respectivamente. Após 24 horas de aderência, o meio foi substituído por 200 µL de meio de tratamento incompleto (MI, meio de cultura sem suplementação de SFB) contendo amostra nas diferentes concentrações: 100, 50, 25, 12,5, 6,2, 3,1 e 1,6 µg/mL. Em seguida as células foram incubadas por 24 horas.

As concentrações testadas foram preparadas de forma tal que a concentração de metanol e DMSO, utilizados para solubilizar o extrato, fosse menor que 1% e 0,1 %, respectivamente. Como controle positivo, foi usado Triton X-100 1%; o controle negativo foram células viáveis não tratadas; o controle de solvente foi constituído por solução de metanol 1 % e DMSO 0,1 %.

### 3.4.2.3 Teste de viabilidade celular com vermelho neutro

Após o período de incubação, o meio de cultivo foi descartado e as células lavadas três vezes com solução tampão fosfato salina (PBS, pH 7,4). Em seguida, foram adicionados 100 µL de MC suplementado com vermelho neutro (Sigma - Aldrich) a 50 µg/mL.

As células foram incubadas nas condições estabelecidas, por três horas. Posteriormente, o meio foi descartado e as células submetidas a cinco lavagens com PBS, a fim de remover o excesso de corante não incorporado às células. Em seguida, foram adicionados 100 µL de solução álcool-ácido (50% etanol e 1% de ácido acético) em cada poço. A placa foi agitada por 10 min e a absorbância foi medida a 490 nm em leitora de microplacas (Espectra Max 2E, Molecular Devices, USA). Foi utilizada uma solução branco álcool-ácido (50% etanol e 1% de ácido acético).

Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis, usando a equação:

$$Viabilidade (\%) = \left( \frac{n^{\circ} \text{ de células viáveis}}{\text{número de células totais}} \right) \times 100$$

### 3.4.2.4 Teste de citotoxicidade com o reagente WST-8

Concluído o período de incubação das células, na presença da amostra (seção 3.4.2.2), foram adicionados 10 µL de solução CCK-8 (Cell Counting Kit-8, Sigma-Aldrich), de acordo com as instruções do fabricante. As células foram incubadas por três horas, e após esse período, foi feita a leitura da absorbância a 450 nm em leitora de microplacas (Espectra Max 2E, Molecular Devices, USA). Foi utilizada uma solução branco constituída por meio de cultura e solução CCK-8.

Os resultados foram expressos como porcentagem de células não tratadas, usando a equação:

$$Viabilidade (\%) = \left( \frac{n^{\circ} \text{ de células viáveis}}{\text{número de células totais}} \right) \times 100$$

### 3.4.3 Potencial anti-inflamatório

#### 3.4.3.1 Cultura de células

O objetivo desse ensaio é determinar se o extrato, nas concentrações testadas, estimula ou não a produção de óxido nítrico.

As células RAW 264.7 foram cultivadas conforme descrito na seção 3.4.2.1. As células foram semeadas em placas de 6 poços numa concentração de  $5 \times 10^6$  células/poço. Um primeiro experimento foi realizado com as células em contato com amostra por 6, 24 e 48 horas. Como controle positivo foi utilizado lipopolissacarídeo (LPS, 1  $\mu\text{g/mL}$ ) e como controle negativo foram utilizadas células não tratadas com LPS e/ou amostras vegetais.

Concluído esse experimento, foram escolhidas três concentrações do extrato que mantiveram viabilidade celular superior a 70%. As células foram pré-incubadas com a amostra e, posteriormente, estimuladas com LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) por 24 horas. A produção de óxido nítrico para os dois experimentos foi avaliada conforme descrito na seção 3.4.3.2.

#### 3.4.3.2 Determinação do conteúdo de óxido nítrico

O conteúdo de óxido nítrico foi determinado pelo método de Griess com algumas modificações (GREEN et al., 1981). No procedimento, foram utilizadas placas de 96 poços, sendo que 50  $\mu\text{L}$  da amostra de sobrenadante da cultura de células foram adicionados a cada poço.

Posteriormente, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de solução de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5%. A placa foi incubada por 10 min sob proteção da luz. Finalizado o tempo de incubação, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de solução dicloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina 0,1% e a mistura foi incubada nas condições supracitadas. Após 30 min de incubação, foi determinada a absorbância (540 nm) em leitora de microplacas (Spectra Max 2E, Molecular Devices, USA). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol/L}$  de NO comparando os valores com uma curva padrão de  $\text{NaNO}_2$  (Sigma-Aldrich) variando de 1,6 a 100  $\mu\text{mol/L}$ .

### 3.4.4 Viabilidade celular e atividade citotóxica em células HepG2 e SH-SY5Y

#### 3.4.4.1 Linhagem celular e cultura de células

Os ensaios celulares dos extratos etanólicos brutos de bulbos de Amaryllidaceae foram realizados no Laboratório de Citogenética e Mutagênese, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, utilizando células de neuroblastoma humano, linhagem celular SH-SY5Y (Banco de Células do Rio de Janeiro-BCRJ) e células de hepatocarcinoma humano HepG2 (American Type Culture Collection, ATCC).

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos de cultivo (25 cm<sup>2</sup>) em monocamada e com meio de tratamento completo (MC), constituído de DMEM e HAM-F10 (1:1) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) suplementado com soro fetal bovino 10 % (SFB, Gibco), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich). As células foram mantidas a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% CO<sub>2</sub> e 95% O<sub>2</sub>. Quando as células atingiram 80% de confluência, foram soltas com solução de tripsina 0,25% e ácido etilenodiamino tetra-acético 0,05% (EDTA) para montagem dos experimentos.

As células de neuroblastoma foram semeadas em placas de 24 poços em concentrações de 1x10<sup>5</sup> e 0,6x10<sup>5</sup> células/poço para os tratamentos de 24 ou 120 horas, respectivamente. As células de hepatocarcinoma foram semeadas em placas de 96 poços em concentrações de 1x10<sup>4</sup> e 1x10<sup>3</sup> células/poço para os tratamentos de 24 ou 120 horas, respectivamente. Após 24 horas de aderência, foi realizado o tratamento com os extratos vegetais, segundo descrito no item 3.4.4.2.

#### 3.4.4.2 Tratamento com o extrato

Concluído o tempo de estabilização/aderência das células, o meio foi descartado e trocado por meio de tratamento incompleto (MI, meio de cultura sem suplementação de SFB) contendo o extrato nas diferentes concentrações: 100, 50, 25, 12,5, 6,2, 3,1 e 1,6 µg/mL.

As células foram incubadas por 24 horas com 300 µL de MC, para as células SH-SY5Y e 100 µL para as células HepG2. Para cada extrato, foi preparada uma solução-mãe a 1000 µg/mL. As concentrações testadas foram preparadas de forma tal que a concentração de metanol e DMSO, utilizados para solubilizar o extrato, fosse menor que

1% e 0,1%, respectivamente. Posteriormente, o MC foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X. Logo após, foi adicionado meio completo, e em seguida, as células foram incubadas por 24 ou 120 horas.

#### 3.4.4.3 Teste de Citotoxicidade com WST-8

Concluído o tempo de incubação, o meio completo foi trocado por DMEM sem fenol contendo XTT/elétron (Roche Molecular Biochemicals), na proporção 50:1, de acordo com o protocolo do fabricante. Em seguida, as células foram incubadas por 3 a 4 horas, para as células de neuroblastoma; e por 30 minutos a 1 hora, para as células de hepatocarcinoma, até ser observada mudança da cor para alaranjado. Posteriormente, foi medida a absorvância em espectrofotômetro para microplacas Tecan Infinite M-200 (Tecan Group Ltd, Männedorf/Switzerland) a 492 e 690 nm.

Para obter a citotoxicidade induzida pelo tratamento, a absorvância no meio contendo as células tratadas com amostra foi comparada com a absorvância de seu devido controle negativo (células tratadas apenas com meio de cultura e solução de PBS), que foi estabelecido como 100% de células viáveis. Como controle positivo, foi usado cloridrato de doxorrubicina 0,17  $\mu$ M (Fauldoxo® – Libbs Farmacêutica Ltda.), e o controle do solvente foi uma solução de metanol 1 % e DMSO 0,1 %.

Os resultados foram expressos como porcentagem de células não tratadas, usando a equação:

$$Viabilidade (\%) = \left( \frac{n^\circ \text{ de células viáveis}}{\text{número de células totais}} \right) \times 100$$

#### 3.4.5 Teste de neuroproteção

Para o teste de neuroproteção em células SH-SY5Y, foram adicionadas  $1 \times 10^5$  células/poço em uma placa de 24 poços. Após 24 horas de aderência foram realizados os tratamentos com os extratos. Assim, foram escolhidas três concentrações para cada extrato, 25, 12,5 e 6,25  $\mu$ g/mL.

Concluído o tempo de estabilização/aderência das células, o meio foi descartado e, em seguida, adicionados 300 µL de meio incompleto (MI) contendo o extrato nas diferentes concentrações. Em seguida as células foram incubadas por 24 horas

Para os tratamentos com os extratos foram definidos dois grupos: o grupo 1 em que as células foram incubadas nas condições já descritas, e o grupo 2 em que as células foram estimuladas por 4 horas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 µM (Sigma-Aldrich), antes do término do período de incubação com os extratos. Como controle negativo foram utilizadas células tratadas apenas com meio de cultura e solução de PBS (100% de células viáveis), controle positivo de células tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 µM e, como controle do solvente foi utilizada uma solução de metanol 1 % e DMSO 0,1 %.

Finalizado o período de incubação, o meio de cultura foi descartado e trocado por meio completo, seguido de incubação por 24 horas. O efeito dos tratamentos na viabilidade celular foi determinado utilizando o Kit XTT como descrito na seção 3.4.4.3.

### **3.4.6 Ensaio do Micronúcleo (MN)**

Para o ensaio do micronúcleo, foram semeadas 5 x 10<sup>5</sup> células/poço em uma placa de 6 poços. Depois de 24 horas, as células foram tratadas com os extratos nas concentrações 25, 12,5 e 6,25 µg/mL. Após 24 horas, o meio completo (MC) foi descartado e trocado por meio completo contendo citocalacina B (CitB), 5 µg/mL. As células foram incubadas por 72 horas, tempo para completar um ciclo e meio de desenvolvimento celular. Como controle positivo foi utilizado metilmetanosulfonato (MMS) 150 µM, sendo as células tratadas por 3 horas com a solução de MMS. Como controle negativo foram utilizadas células tratadas apenas com meio de cultura e, como controle do solvente foi utilizada uma solução de metanol 1 % e DMSO 0,1 %.

Após o tratamento com CitB, as células foram soltas e centrifugadas por 5 min a 800 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuscitado em 3 mL de solução hipotônica de citrato de sódio 1% a 4 °C, com posterior homogeneização utilizando pipeta Pasteur. Em seguida, foram adicionados 2 mL de solução fixadora metanol/ácido acético 5:1 e 50 µL de formaldeído, seguido de homogeneização cuidadosa com auxílio de pipeta Pasteur.

A suspensão celular foi centrifugada por 5 min a 800 rpm, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuscitado em 5 mL de solução fixadora metanol/ácido acético 3:1. Este passo foi repetido por mais duas vezes e o sobrenadante

foi descartado. A suspensão celular, 500 µL, foi gotejada em lâminas limpas imersas em água destilada a 4 °C. Posteriormente, as lâminas foram secas a temperatura ambiente.

As lâminas contendo a suspensão de células foram coradas com solução Giemsa 5% em tampão fosfato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,06M e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,06 M, pH 6,8) por 7 min, lavadas com água destilada e secadas a temperatura ambiente para posterior análise.

A análise de micronúcleos foi realizada em microscópio de luz (Nikon, Alphaphot YS) em aumento de 40X. Os micronúcleos, brotos nucleoplasmáticos e pontes nucleoplasmáticas foram contados em 2000 células binucleadas para cada tratamento. O índice de divisão nuclear (IDN) foi calculado a partir da contagem do número de núcleos em 500 células por lâmina utilizando a fórmula:

$$\text{IDN} = [\text{M1} + (\text{M2} \times 2) + (\text{M3} \times 3) + (\text{M4} \times 4)] / \text{N},$$

Onde M1 a M4 representam o número de células mono, bi, tri ou tetranucleadas respectivamente; e N, o número total de células contadas (BARBOSA et al., 2018; CASTILLO et al., 2018).

### **3.4.7 Ensaio cometa**

Para o ensaio cometa, foram adicionadas  $5 \times 10^5$  células/poço em uma placa de 6 poços. As células foram tratadas com os extratos do mesmo modo que para o ensaio de micronúcleos, utilizando MMS 150 µM como controle positivo. Como controle negativo foram utilizadas células tratadas apenas com meio de cultura e, como controle do solvente foi utilizada uma solução de metanol 1 % e DMSO 0,1 %.

Após 24 horas do tratamento, as células foram soltas e centrifugadas por 5 min a 1000 rpm. O sobrenadante foi retirado, deixando apenas 500 µL de suspensão celular, e o pellet de células foi resuspendido em 2 mL do meio de cultura.

Posteriormente, foram transferidos 30 µL do pellet de células e 200 µL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% a 37 °C, para um microtubo, seguido de homogeneização leve. A suspensão de células em agarose, 70 µL, foi transferida para duas lâminas com uma camada de agarose de ponto de fusão normal 1,5% e cobertas com lamínulas. Logo após, as lâminas foram incubadas a 4 °C por 10 min.

Concluído o período de incubação, as lamínulas foram retiradas cuidadosamente e as lâminas, contendo as células, foram imersas em solução de lise a 4 °C (DMSO 10%,

Triton X-100 1%, NaCl 2,2 M, Na<sub>2</sub>-EDTA 90 mM, Tris 9 mM, pH 10,0), por 1 hora. As lâminas foram retiradas da solução de lise e mergulhadas em solução tampão de eletroforese (NaOH 0,3 M e Na<sub>2</sub>-EDTA 1 mM, pH >13) a 4°C por 20 min. Em seguida, as lâminas foram alocadas em uma cuba horizontal e conduzidas à eletroforese a 25 V e 300 mA, por 20 min. As lâminas foram retiradas cuidadosamente da cuba de eletroforese e imersas em solução de neutralização (Tris-HCl, pH 7,5) por 15 min.

Posteriormente, as lâminas foram secadas a temperatura ambiente e, em seguida, mergulhadas por 10 min em etanol absoluto para a fixação. Após secagem a temperatura ambiente, foram adicionados 50 µL de solução de SYBR Green 60X (Invitrogen) sobre a lâmina, para, em seguida, ser recoberta com a lamínula. As lâminas foram analisadas imediatamente após a coloração, usando microscópio de fluorescência (Zeiss, filtro 516 - 560 nm e barreira de filtro de 590 nm) acoplado a um sistema de análise de imagem (Comet Assay IV, Perceptive instruments), usando a lente objetiva de 20X.

Foram analisados 100 nucleoides por lâmina e os parâmetros utilizados para mensuração do dano no ADN foram: *tail length* (comprimento da cauda do cometa), %Tail-DNA [(ADN na cauda do cometa (%))], *tail moment* (momento da cauda do cometa) [definido como: (%Tail-DNA) x (Tail length)], e *tail intensity* (intensidade da cauda do cometa) (CETINKAYA et al., 2016).

### **3.4.8 Análise estatística**

Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata e os resultados foram expressos como o valor médio ± desvio padrão. As análises estatísticas foram feitas utilizando o software estatístico GraphPad prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, Califórnia, USA). Os valores encontrados foram comparados com o controle com o uso da ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey. O limite de significância para todas as análises estatísticas foi de  $p < 0,05$ .

### **3.4.9 Aspectos legais**

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

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A representação esquemática das etapas e métodos empregados no estudo químico biomonitorado de extratos de Amaryllidaceae é mostrada na Figura 5 (p. 39). Os extratos etanólicos e hexânicos de bulbos de *Hymenocallis litorallis*, *Hippeastrum* sp., *H. psittacinum*, *H. goianum*, *Crinum latifolium* e *Habranthus irwinianus*, foram analisados quanto ao perfil alcaloídico por CG-EM. Em seguida, foi analisada a atividade citotóxica em células de macrófagos murinos RAW 264.7. Os dois extratos que apresentaram maior teor alcaloídico e menor citotoxicidade no modelo celular com macrófagos foram escolhidos para os ensaios de citotoxicidade em células HepG2 e SH-SY5Y e, em seguida, testados quanto as atividades anti-inflamatória em células RAW 264.7, neuroprotetora e genotóxica em células SH-SY5Y. Finalmente, foi realizado o estudo químico biomonitorado por inibição da AChE dos extratos mais promissores quanto as atividades biológicas já descritas.

### 4.1 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG -EM)

Foram identificados alcaloides do tipo licorina, galantamina, haemantamina, tazetina, homolicorina, narciclasina, além de ismina (**68**), N-desmetilismina (**69**) e galantindol (**71**), pertencentes ao grupo de alcaloides com estruturas diversas. A proporção de cada componente individual, no extrato ou fração alcaloídica, foi expressa como abundância relativa (%TIC, do inglês *total ion current*).

Os alcaloides com maior %TIC no extrato etanólico de *Crinum latifolium* foram licorina (**1**), 11,12-desidroanidrolicorina (**7**), crinamina (**30**), trisferidina (**64**) e ismina (**68**) (Tabela 1). No extrato foi observada a presença de um composto com abundância relativa de 38% aproximadamente, e íon molecular m/z 315 (Figura 8 – **EA1**). O composto não mostrou semelhança com outros alcaloides quando utilizada a base de dados do CG-EM, porém o perfil de fragmentação por massas apresentou semelhanças com núcleo estrutural do tipo crinina. Outros compostos, com abundância relativa menor, foram detectados no extrato hexânico (**EA2** e **EA3**, Tabela 1). Os alcaloides anidrolicorina (**6**), haemantamina (**25**), 11-oxohaemantamina (**26**), 11-hidroxivitatina (**28**), N-desmetilismina (**69**) e 5,6-diidrobicolorina (**128**) foram identificados nas sub-

frações alcalóidicas Sbf **2** e Sbf **5**, após separação por cromatografia em coluna (seção 4.1 e Quadro 5).

Comparando com os dados mostrados no Quadro 2 (p. 19), esse é o primeiro relato da presença de anidrolícorina (**6**), 11,12-desidroanidrolícorina (**7**), 11-oxohaemantamina (**26**), 11-hidroxitatina (**28**), trisferidina (**64**), ismina (**68**), N-desmetilismina (**69**) e 5,6-diidrobicolorina (**128**) em *C. latifolium*.

No extrato etanólico de *Hippeastrum* sp., os compostos com maior abundância relativa foram haemantamina (**25**), tazetina (**46**), pretazetina (**47**) e trisferidina (**64**) (Tabela 2). A análise do extrato etanólico de *Habranthus irwinianus* revelou a presença de um composto derivado de homolícorina (**EB1**) e com abundância relativa baixa, enquanto no extrato de *Hippeastrum goianum* foram identificados lícorina (**1**) e homolícorina (**12**) (Tabela 2). Baseado nos dados mostrados no Quadro 1, esse é o primeiro relato da presença de homolícorina em *H. goianum*.

O extrato etanólico de *Hippeastrum psittacinum* mostrou o maior número de alcaloides (Tabela 3). Ainda, foram detectados oito alcaloides (**EC1** a **EC8**), com porcentagem relativa entre 0,3 e 2,0 %, que não foram identificados. O espectro de massas desses compostos é mostrado na Figura 9. Entre os compostos com maior área relativa estão albomaculina (**17**), tazetina (**46**), pretazeína (**47**), homolícorina (**25**) e desacetilcantabricina (**128**). Esse é o primeiro relato da presença de homolícorina (**25**), albomaculina (**17**), 11,12-desidrolícoreno (**126**) e desacetilcantabricina (**127**) em *H. psittacinum*.

No Quadro 5 está apresentado um resumo dos alcaloides identificados nos extratos etanólicos e hexânicos de bulbos de Amaryllidaceae. A representação das estruturas químicas desses compostos é mostrada na Figura 8.

**Quadro 5. Alcaloides identificados nos extratos de Amaryllidaceae e classificação por tipo de núcleo alcaloídico**

Alcaloide	Tipo de alcaloide	<i>Hippeastrum psittacinum</i>	<i>Crinum latifolium</i>	<i>Hippeastrum</i> sp.	<i>Hippeastrum goianum</i>
licorina (1)		X	X		X
anidrolicorina (6)			X		
11,12-desidroanidrolicorina (7)	licorina		X		
hipadina (80)			X		
11,12-desidrolcoreno (126)		X			
homolicorina (12)	homolicorina	X			X
albomaculina (17)		X			
haemantamina (25)			X	X	
11-oxohaemantamina (26)			X		
11-hidroxitatina (28)	haemantamina		X		
crinamina (30)			X		
desacetilcantabricina (127)		X			
licoramina (41)	galantamina	X			
tazetina (46)		X		X	
pretazetina (47)	tazetina	X		X	
3-epimacronina (51)				X	
triserferidina (64)	narciclasina		X	X	
5,6-diidrobicolorina (128)			X	X	
ismina (68)			X	X	
n-desmetilismina (69)	outros		X		
galantindol (71)				X	

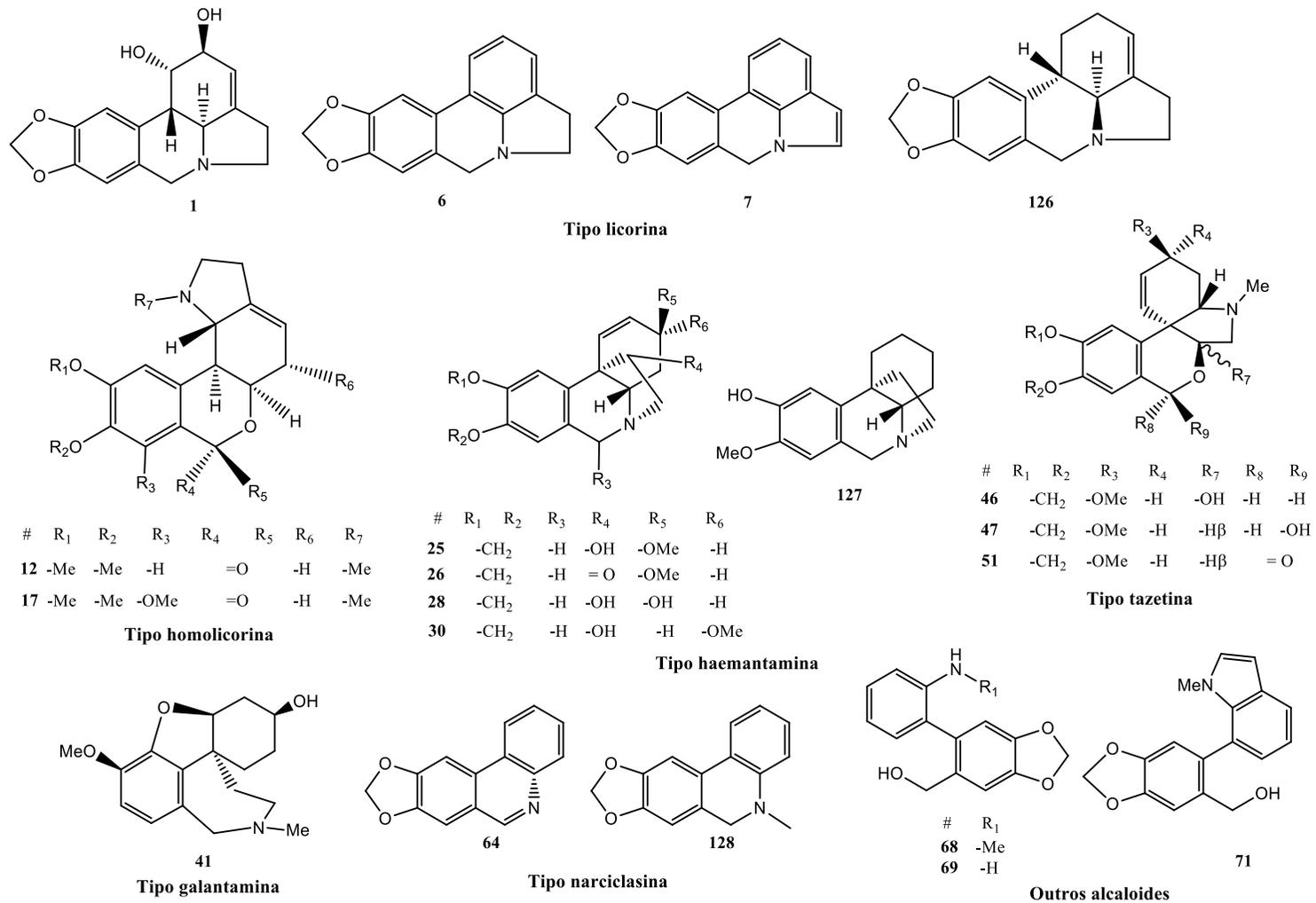


Figura 7. Alcaloides identificados nos extratos etanólicos de bulbos de Amaryllidaceae

**Tabela 1. Perfil alcaloídico dos extratos de bulbos de *Crinum latifolium***

Alcaloide	IR	TIC (%)
<b>Extrato etanólico</b>		
ismina ( <b>68</b> )	2280	0,37
trisferidina ( <b>64</b> )	2282	0,91
crinamina ( <b>30</b> )	2648	13,80
11,12-desidroanidrolícorina ( <b>7</b> )	2697	1,98
lícorina ( <b>1</b> )	2746	4,88
Composto desconhecido ( <b>EA1</b> )	3077	38,04
<b>Extrato hexânico</b>		
trisferidina ( <b>64</b> )	2282	0,33
crinamina ( <b>30</b> )	2648	0,98
hipadina ( <b>77</b> )	2827	2,93
Composto desconhecido ( <b>EA2</b> )	2963	1,39
Composto desconhecido ( <b>EA3</b> )	3286	0,41

IR: índice de retenção; TIC: área relativa

**Tabela 2. Perfil alcaloídico dos extratos de bulbos de *Hippeastrum* sp., *Habranthus irwinianus* e *Hippeastrum goianum***

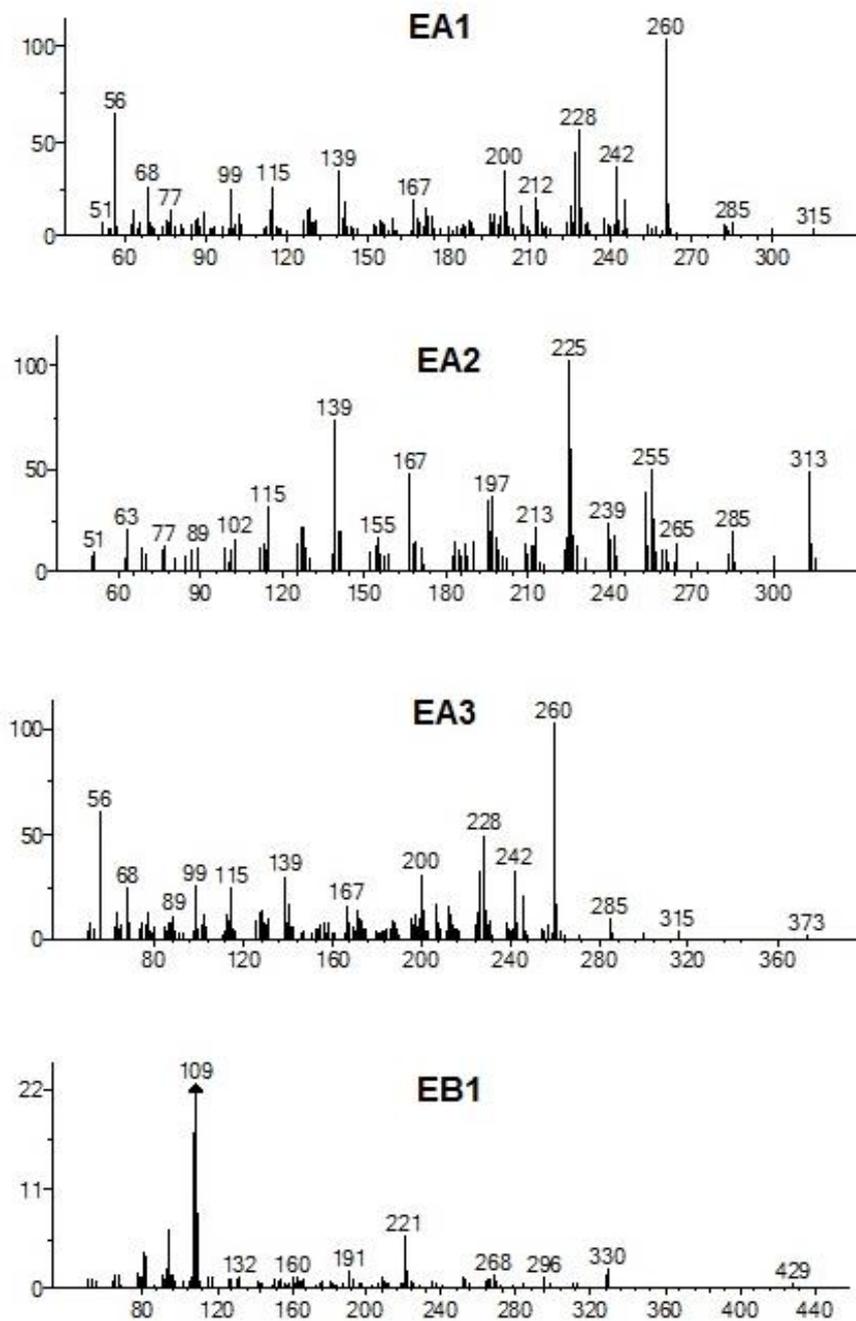
Espécie	Extrato etanólico		
	Alcaloide	IR	TIC (%)
<i>Hippeastrum</i> sp.	ismina ( <b>68</b> )	2280	1,81
	trisferidina ( <b>64</b> )	2282	3,50
	5,6-diidrobicolorina ( <b>128</b> )	2379	0,36
	galantindol ( <b>71</b> )	2487	1,55
	haemantamina ( <b>25</b> )	2667	2,23
	tazetina ( <b>46</b> )/pretazetina ( <b>47</b> )	2653	7,40
	3-epimacronina ( <b>51</b> )	2811	2,13
	<b>Extrato hexânico</b>		
	3-epimacronina ( <b>51</b> )	2811	3,53
<i>Habranthus irwinianus</i>	<b>Extrato etanólico</b>		
	Composto desconhecido ( <b>EB1</b> )	2602	2,11
<i>Hippeastrum goianum</i>	<b>Extrato etanólico</b>		
	lícorina ( <b>1</b> )	2746	3,98
	homolícorina ( <b>12</b> )	2767	2,83

IR: índice de retenção; TIC: área relativa

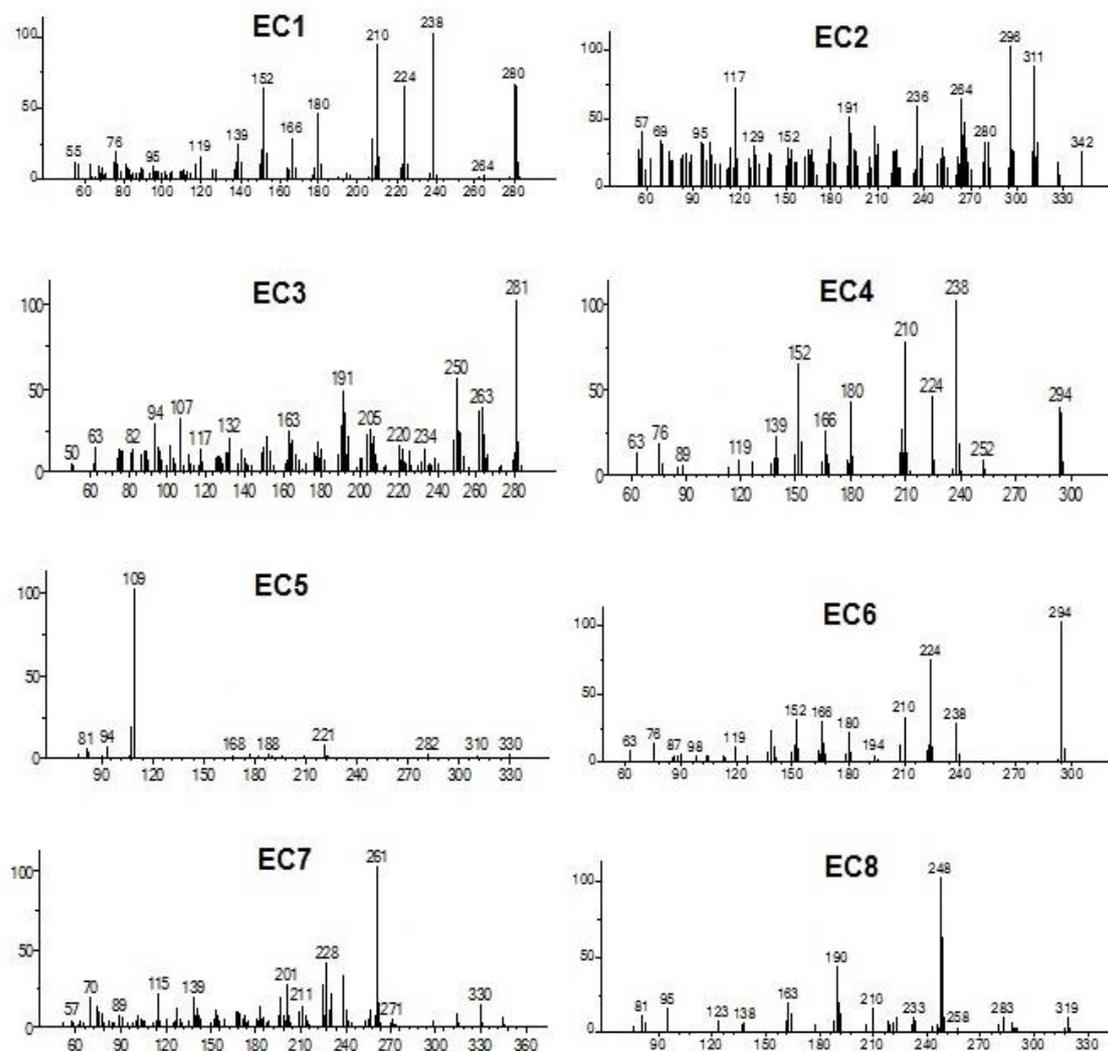
**Tabela 3. Perfil alcaloídico dos extratos de bulbos de *Hippeastrum psittacinum***

Alcaloide	IR	TIC (%)
<b>Extrato etanólico</b>		
11,12-desidrolicoreno ( <b>126</b> )	2068	1,76
licoramina ( <b>41</b> )	2420	0,71
Composto desconhecido ( <b>EC1</b> )	2525	1,99
Composto desconhecido ( <b>EC2</b> )	2542	0,42
desacetilcantabricina ( <b>127</b> )	2559	2,01
Composto desconhecido ( <b>EC3</b> )	2580	1,10
Composto desconhecido ( <b>EC4</b> )	2635	0,68
Composto desconhecido ( <b>EC5</b> )	2654	0,39
Composto desconhecido ( <b>EC6</b> )	2672	0,83
Composto desconhecido ( <b>EC7</b> )	2690	0,91
Composto desconhecido ( <b>EC8</b> )	2695	0,69
tazetina ( <b>46</b> )/pretazetina ( <b>47</b> )	2653	4,68
licorina ( <b>1</b> )	2746	3,49
homolicorina ( <b>12</b> )	2767	2,18
albomaculina ( <b>17</b> )	2815	11,44
<b>Extrato hexânico</b>		
tazetina ( <b>46</b> )/pretazetina ( <b>47</b> )	2653	1,8
licorina ( <b>1</b> )	2746	0,11
homolicorina ( <b>12</b> )	2767	0,41
albomaculina ( <b>17</b> )	2815	2,05

IR: índice de retenção; TIC: área relativa



**Figura 8.** Espectro de massas dos alcaloides desconhecidos e presentes no extrato etanólico de bulbos de *Crinum latifolium* (EA) e *Habranthus irwinianus* (EB)



**Figura 9. Espectro de massas dos alcaloides desconhecidos e presentes no extrato etanólico de bulbos de *Hippeastrum psittacinum***

A análise por CG-EM dos extratos etanólicos brutos (fração solúvel em hexano) mostrou que alguns dos extratos possuem compostos de tipo esteroidal e terpenoidal (Tabela 4). Esse tipo de compostos tem mostrado atividade anti-inflamatória, antitumoral e antifúngica em testes *in vitro* e *in vivo* (MIRANDA, 2014; PALIT et al., 2016). Os dados de revisão da literatura das espécies sob estudo mostraram que cicloartenol (**120**) foi o único composto não alcaloídico identificado no extrato metanólico de folhas de *C. latifolium* (NAM et al., 2004). Dessa forma, este é o primeiro relato da presença de ergost-5-en-3 $\beta$ -ol (**129**), estigmasterol (**130**),  $\beta$ -sitosterol (**131**), acetato de cicloeucalenol (**132**), acetato de cicloartenol (**133**) e 24-metileno-cicloartenol (**134**) em *C. latifolium*. A

representação da estrutura dos compostos esteroidais e triterpênicos presentes nos extratos etanólicos das três espécies estudadas estão mostradas na Figura 10.

**Tabela 4. Compostos esteroidais e terpênicos identificados nos extratos de Amaryllidaceae**

	Extrato etanólico		
	Composto	IR	TIC (%)
<i>Crinum latifolium</i>	derivado de esteroide	3214,3	0,34
	ergost-5-en-3 $\beta$ -ol ( <b>129</b> )	3348,0	1,51
	stigmasterol ( <b>130</b> )	3380,9	7,23
	$\beta$ -sitosterol ( <b>131</b> )	3472,4	2,93
	acetato de cicloeucalenol ( <b>132</b> )	3513,5	4,19
	derivado de esteroide	3531,1	1,9
	acetato de cicloartenol ( <b>133</b> )	3587,9	5,06
	24-metileno-cicloartenol ( <b>134</b> )	3677,0	9,42
	derivado de esteroide	3698,2	6,4
<i>Hippeastrum</i> sp.	$\beta$ -sitosterol ( <b>131</b> )	3472	6,6
	Extrato hexânico		
<i>Habranthus irwinianus</i>	derivado de esteroide	3472,4	2,62

IR: índice de retenção; TIC: área relativa

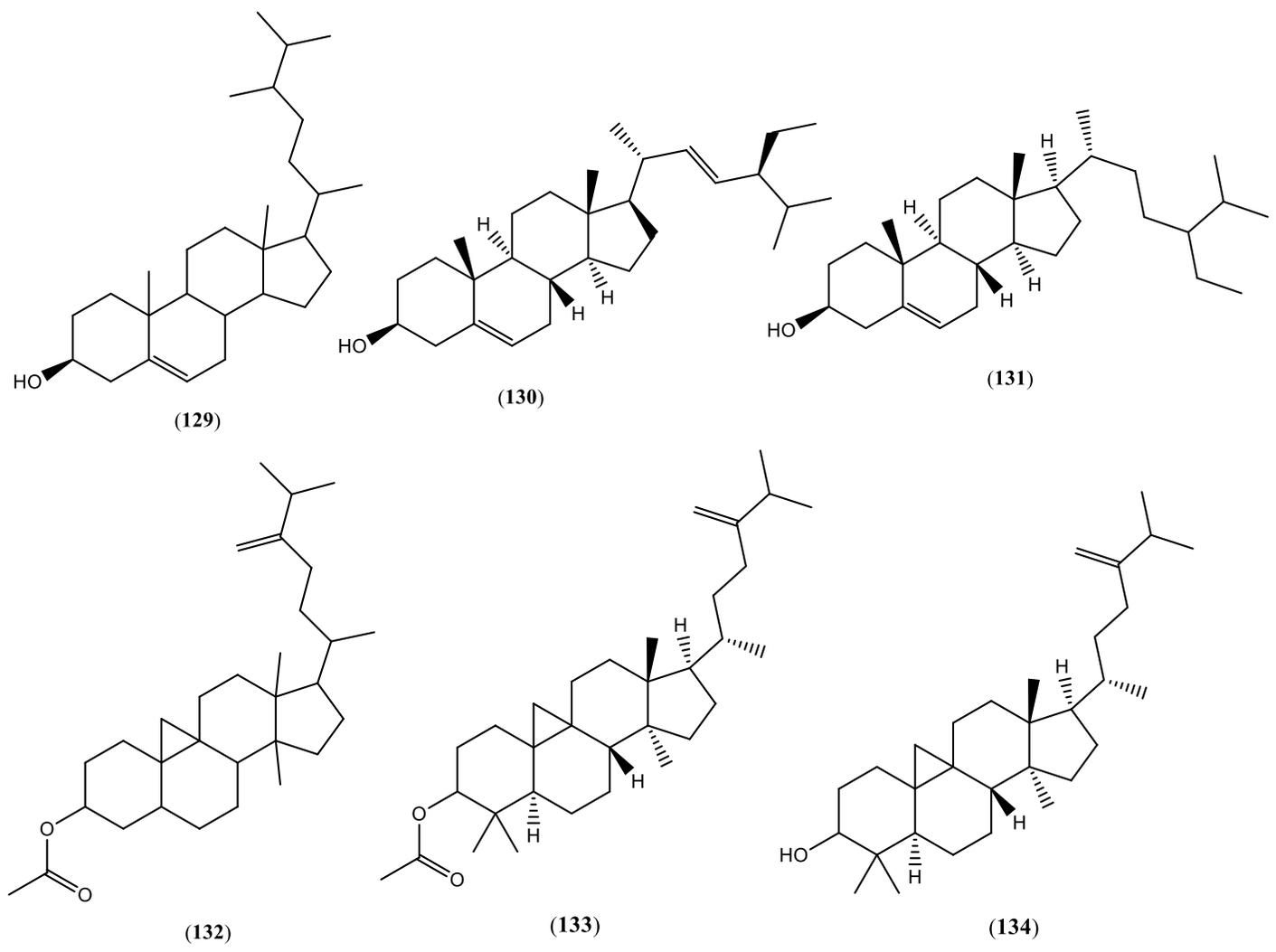


Figura 10. Compostos não alcalóidicos identificados nos extratos de *Crinum latifolium* e *Hippeastrum* sp.

#### 4.1 CITOTOXICIDADE MACRÓFAGOS MURINOS RAW 264.7

Macrófagos são fagócitos especializados que atuam na defesa do corpo contra o ataque de bactérias, protozoários e vírus. Desempenham um papel importante na resposta aos sinais inflamatórios em vários processos fisiológicos dos sistemas cardiovascular, nervoso e imunológico (TEOTÔNIO, 2016) e podem ser classificados em vários subtipos: M1, M2a, TAMs/M2d e MDSCs. Os do tipo M1 são responsáveis pela produção de algumas espécies reativas de oxigênio (ERO) como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), e de nitrogênio (ERN), como o óxido nítrico. A difusão controlada das duas espécies reativas ( $O_2^{\cdot-}/NO$ ), leva à formação de peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot-}$ ), capaz de agir como agente bactericida e como sinalizador de processos de apoptose (NGUYEN et al., 2013; BAILEY et al., 2019).

Estudos com macrófagos vêm sendo desenvolvidos para identificar o efeito citotóxico e anti-inflamatório de fármacos, extratos de plantas ou frações enriquecidas com um ou vários tipos de metabólitos secundários, apresentando evidências da segurança do seu uso no tratamento de vários agravos da saúde (NAM e JAE, 2009; NGUYEN et al., 2013; NAIR et al., 2016).

Assim, foi avaliado o efeito dos extratos etanólicos na viabilidade celular de macrófagos murinos RAW 264.7. O estudo da viabilidade celular ocorreu em duas partes. Inicialmente, um *screening* para avaliar a atividade dos extratos de Amaryllidaceae pelo método do vermelho neutro foi realizado (Tabela 5 e Figura 11). A partir dos resultados do *screening*, foram escolhidos os extratos que mostraram menor citotoxicidade (maior  $CI_{50}$ ), e avaliados quanto à viabilidade celular pelo método WST-8 (Tabela 5).

Os extratos de *Hymenocallis litorallis*, *Hippeastrum goianum* e *Habranthus irwinianus* foram os mais citotóxicos no modelo celular de macrófagos murinos (Tabela 5 e Figura 12).

**Tabela 5. Viabilidade celular dos extratos etanólicos de espécies de Amaryllidaceae**

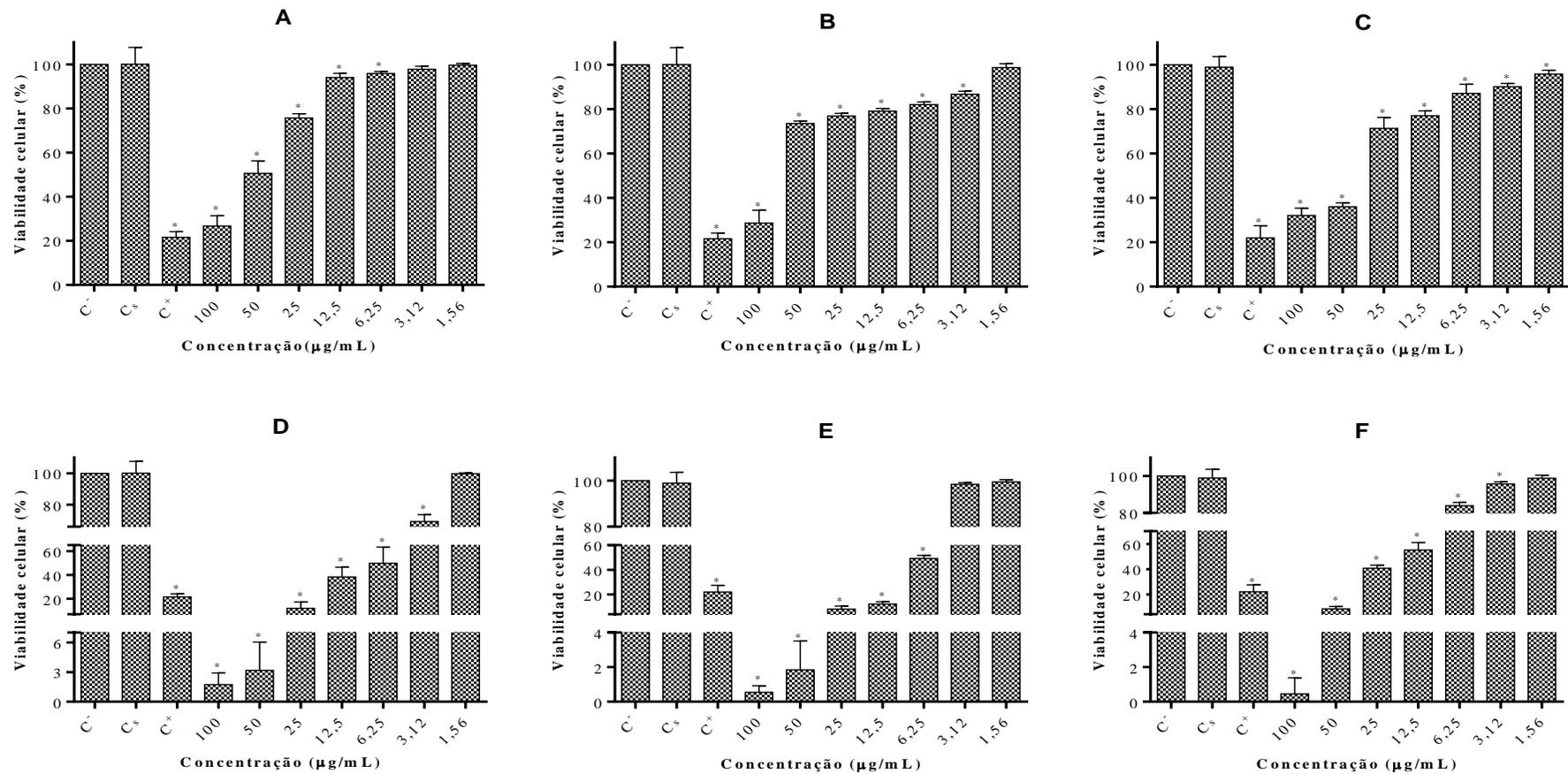
Espécie	Parte da planta	Abreviatura	VN	WST-8
			CI <sub>50</sub> (µg/mL)	
<i>Hymenocallis litorallis</i>	Bulbo	MFS 2712	6,4 ± 0,5	-
<i>Hippeastrum goianum</i>	Bulbo	HG-B	6,8 ± 0,5	-
<i>Habranthus irwinianus</i>	Bulbo	ACA 62	16,2 ± 1,2	-
<i>Crinum latifolium</i>	Bulbo	AAS 2712	51,9 ± 3,3	50,2 ± 2,5
<i>Hippeastrum psittacinum</i>	Bulbo	GPS 10874	70,9 ± 3,6	76,2 ± 4,1
<i>Hippeastrum</i> sp.	Bulbo	EG 1190	41,1 ± 2,0	42,3 ± 3,2

VN, teste de viabilidade celular com vermelho neutro. Os valores estão expressos como o valor médio ± desvio padrão.

**Tabela 6. Citotoxicidade em células RAW 264.7 e atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos etanólicos de *Crinum latifolium*, *Hippeastrum* sp. e *Hippeastrum psittacinum***

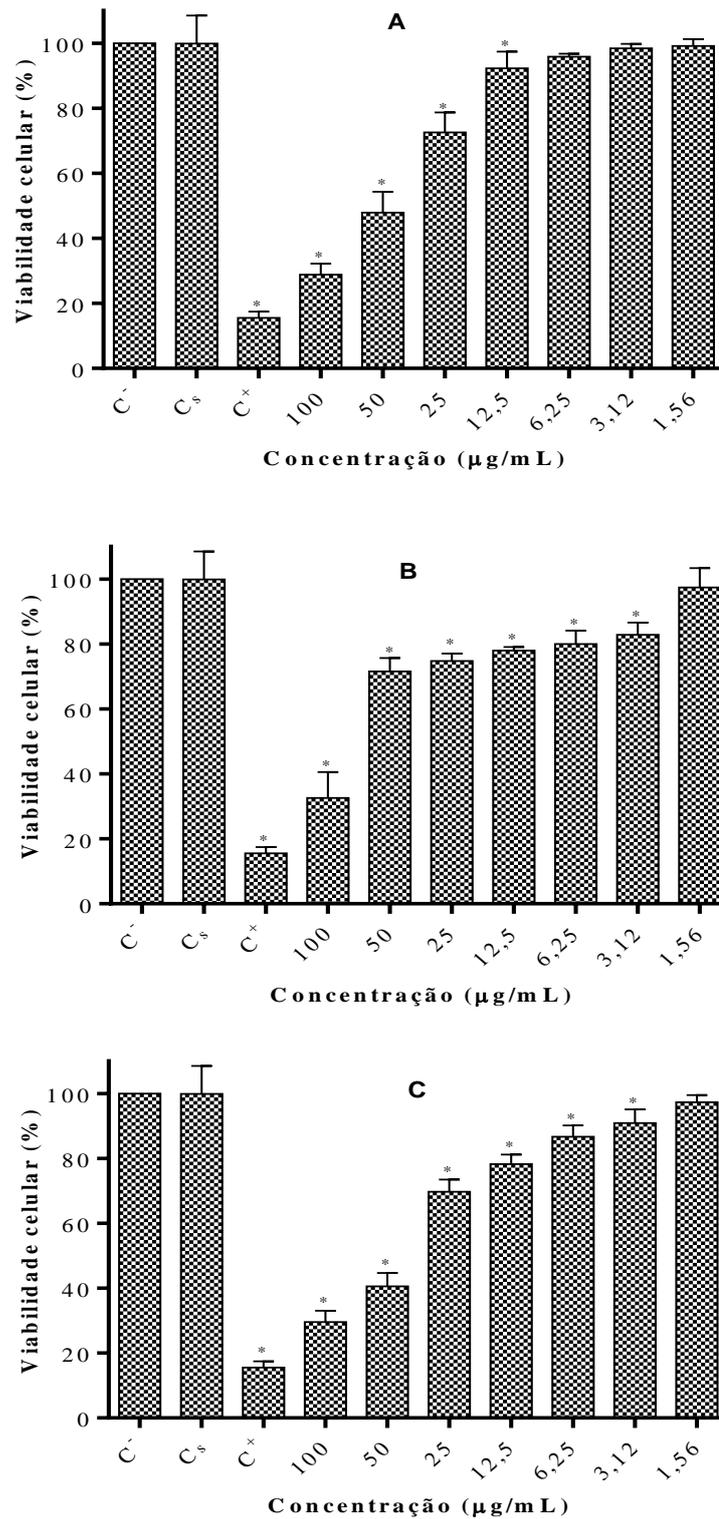
Espécie	Parte da planta	Abreviatura	AChE	VN	WST-8
			CI <sub>50</sub> (µg/mL)		
<i>Crinum latifolium</i>	Bulbo	AAS 2712	27,8 ± 1,4	51,9 ± 3,3	50,2 ± 2,5
<i>Hippeastrum psittacinum</i>	Bulbo	GPS 10874	11,2 ± 0,7	70,9 ± 3,6	76,2 ± 4,1
<i>Hippeastrum</i> sp.	Bulbo	EG 1190	85,8 ± 1,9*	41,1 ± 2,0	42,3 ± 3,2

VN, teste de viabilidade celular com vermelho neutro; AChE, acetilcolinesterase. \* Valor CI<sub>50</sub> calculado por MERA-LÓPEZ (2018).



**Figura 11. Citotoxicidade dos extratos etanólicos de bulbos de Amaryllidaceae em células RAW 264.7 pelo método do Vermelho Neutro**

A. *Crinum latifolium*, B. *Hippeastrum psittacinum*, C. *Hippeastrum* sp., D. *Hippeastrum goianum*, E. *Hymenocallis litorallis*, F. *Habranthus irwinianus*. C<sup>-</sup>: controle negativo, C<sup>+</sup>: controle positivo, C<sup>s</sup>: controle do solvente. \*:  $p < 0,05$  vs C<sup>-</sup>.



**Figura 12. Citotoxicidade dos extratos etanólicos de bulbos de Amaryllidaceae em células RAW 264.7 pelo método do WST-8**

**A.** *Crinum latifolium*, **B.** *Hippeastrum psittacinum*, **C.** *Hippeastrum* sp. C<sup>-</sup>: controle negativo, C<sup>+</sup>: controle positivo, C<sup>s</sup>: controle do solvente. \*:  $p < 0,05$  vs C<sup>-</sup>.

Em avaliação prévia (MERA-LÓPEZ, 2018), os extratos etanólicos de *Hymenocallis litorallis*, *Habranthus irwinianus*, *Hippeastrum* sp. e *H. goianum* mostraram menor atividade inibitória da AChE com  $CI_{50} = 132,3 \mu\text{g/mL}$ ,  $CI_{50} = 121 \mu\text{g/mL}$ ,  $CI_{50} = 85,8 \mu\text{g/mL}$  e  $CI_{50} = 74,5 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente, se comparados com *H. psittacinum* e *C. latifolium* com  $CI_{50} = 11,2 \mu\text{g/mL}$  e  $CI_{50} = 27,8 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Comparando os resultados de inibição de acetilcolinesterase com os dados de citotoxicidade em células RAW 264.7 (Tabela 6), pode ser observado que tanto *C. latifolium* como *H. psittacinum* são promissores, considerando que os valores de  $CI_{50}$  na inibição da enzima se encontravam abaixo da concentração que permite manter 50% de células viáveis. Contudo, para *Hippeastrum* sp., o valor de  $CI_{50}$  na inibição da AChE foi maior que a concentração que permitiu manter 50% de células viáveis. Dessa forma, foi avaliada a atividade anti-inflamatória dos dois extratos menos citotóxicos - em concentrações mostrando viabilidade celular  $\geq 70\%$  - por meio da quantificação do óxido nítrico produzido por células de macrófagos, antes e depois do estímulo com lipopolisacarídeo (LPS).

#### **4.1.1 Produção de óxido nítrico em macrófagos murinos RAW 264.7**

O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora que está envolvida em vários processos fisiológicos e patológicos, incluindo câncer. A molécula é produzida pela ação da enzima óxido nítrico sintase (ONS), responsável pela oxidação da L-arginina em citrulina e NO. As ONS estão subdivididas em óxido nítrico sintase induzível (iONS), óxido nítrico sintase endotelial (eONS) e óxido nítrico sintase neuronal (nONS) (NAIR et al., 2015). A iONS está envolvida em processos patológicos nos quais há sobreprodução de óxido nítrico em resposta a fatores pró-inflamatórios em macrófagos, células endoteliais e do músculo liso, mediados por interleucina -  $1\beta$  (IL-  $\beta$ ), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) e lipopolisacarídeo (LPS) (NAIR et al., 2016). Ainda existe bastante controvérsia quanto ao papel que desempenham as enzimas ONS e o óxido nítrico em doenças neurodegenerativas; porém, a desregulação das ONS e a sobreprodução de NO têm sido associadas a processos de morte neuronal (FAHANIK-BABAEI et al., 2019). Na doença de Alzheimer, os depósitos extracelulares do peptídeo  $\beta$ -amiloide - que consequentemente levam à formação de placas amiloides - induzem a expressão descontrolada de enzimas inflamatórias como iNOS e ciclooxigenase (COX), elevando a

produção de fatores pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$  e IL-6 (FAHANIK-BABAEI et al., 2019).

A citotoxicidade como consequência do aumento na produção de óxido nítrico tem sido associada aos diferentes sinais indutores de apoptose, incluindo condensação da cromatina, quebra da fita dupla de ADN, ativação de caspases e subsequente liberação de citocromo c, supra-regulação da proteína p53 (responsável por controlar o crescimento de células tumorais) e aumento da expressão de proteínas anti e pró-apoptóticas do tipo Bcl2 (NAIR et al., 2015; NAIR et al., 2016).

Os resultados de citotoxicidade mostraram que os extratos etanólicos de *C. latifolium* e *H. psittacinum*, em concentrações menores que 25  $\mu\text{g/mL}$ , mantiveram a viabilidade celular acima de 70 %. Considerando o óxido nítrico como um marcador da resposta inflamatória em células de macrófagos, foi avaliado se os extratos, nas concentrações de 25  $\mu\text{g/mL}$ , 12,5  $\mu\text{g/mL}$  e 6,25  $\mu\text{g/mL}$ , estimulavam a produção de óxido nítrico em células de macrófagos RAW 264.7.

As células foram tratadas com os extratos nas diferentes concentrações, sendo estimada a concentração de óxido nítrico, liberado no meio de cultura, após 6, 24 e 48 horas de tratamento (Figura 14). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol/L}$  de NO, comparando os valores com uma curva de calibração com óxido nítrico (Figura 13). Até 6 horas de tratamento com os extratos nas diferentes concentrações, não houve aumento significativo da concentração de nitrito no meio de cultura.

Concluído o tempo de incubação, foi observado que *H. psittacinum* não estimulou a produção de NO nas três concentrações testadas, mantendo valores semelhantes aos do grupo controle (C<sup>-</sup>). No entanto, para o extrato etanólico de *C. latifolium* foram observadas duas respostas: aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da produção de nitritos após 6 horas de tratamento com o extrato a 25  $\mu\text{g/mL}$  e, aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da produção de nitritos após 24 horas de tratamento com o extrato a 12,5  $\mu\text{g/mL}$  e 6,25  $\mu\text{g/mL}$ . A liberação de nitritos no meio de cultura foi significativamente menor após 48 horas do tratamento com os extratos nas duas menores concentrações (Figura 14).

Com base nos resultados, e considerando que entre as 6 e 24 horas houve aumento na produção de nitritos no grupo de células estimuladas com LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ), foi realizado um segundo experimento em que os macrófagos foram incubados com os extratos e, em seguida estimulados com LPS conforme descrito na seção 3.4.3. Em seguida foi avaliado o efeito protetor do extrato ao dano oxidativo causado pelo LPS (Figura 15).

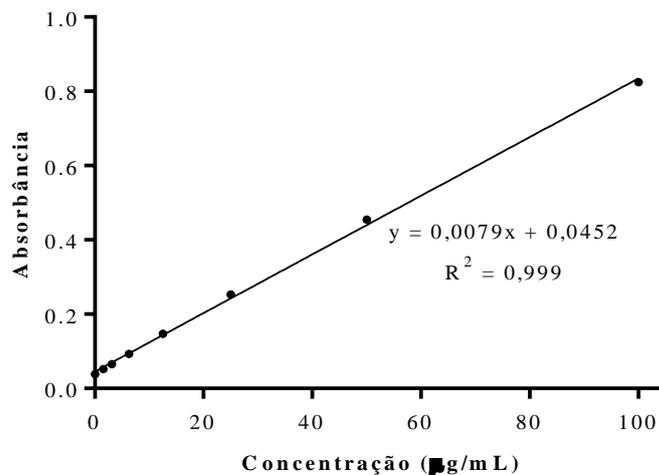


Figura 13. Curva de calibração com óxido nítrico

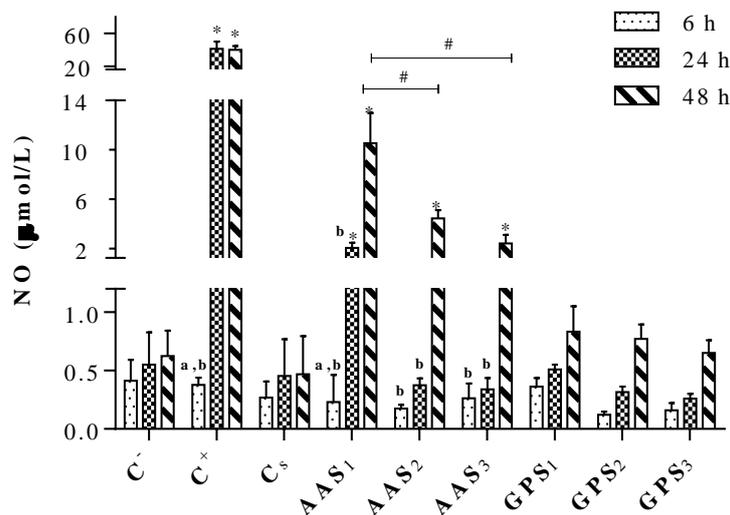


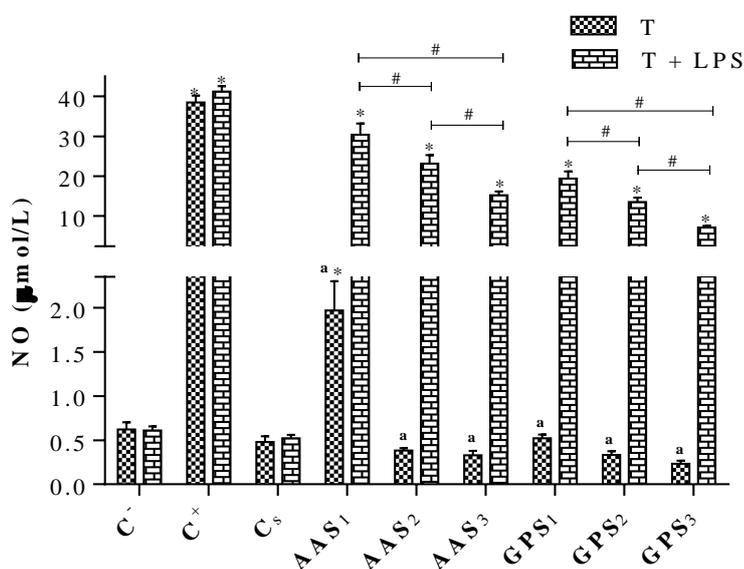
Figura 14. Produção de óxido nítrico em células RAW 264.7 tratadas com os extratos etanólicos de *Crinum latifolium* (AAS 2712) e *Hippeastrum psittacinum* (GPS 10874)

AAS/GPS 1, 2 e 3: Tratamentos (T) a 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6, 25 µg/mL, respectivamente. C<sup>-</sup>: controle negativo, C<sup>+</sup>: controle positivo LPS (1 µg/mL), C<sub>s</sub>: controle do solvente. \*:  $\rho < 0,05$  vs C<sup>-</sup>; #:  $\rho < 0,05$  T<sub>48h</sub>AAS<sub>1</sub> vs T<sub>48h</sub>AAS<sub>2</sub>/AAS<sub>3</sub>; a:  $\rho < 0,05$  vs T<sub>24h</sub>; b:  $\rho < 0,05$  vs T<sub>48h</sub>

Em todos os tratamentos com LPS (Figura 15) foi observado o aumento significativo ( $\rho < 0,05$ ) da concentração de NO, quando comparado com o grupo controle negativo (C<sup>-</sup>; células não tratadas). Considerando os tratamentos (T) na mesma concentração (25 µg/mL, 12,5 µg/mL ou 6, 25 µg/mL), houve um aumento significativo ( $\rho < 0,05$ ) na produção de NO, quando comparados o grupo de células tratadas

exclusivamente com o extrato etanólico (T) e o grupo de células tratadas com o extrato e submetidas ao estímulo com lipopolissacarídeo (T + LPS).

Para todos os tratamentos T + LPS, a concentração de NO diminuiu, quando comparados com o grupo de células tratadas unicamente com LPS (1 µg/mL, controle positivo, C<sup>+</sup>). Além disso, houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) do óxido nítrico com a diminuição das concentrações do extrato (dose-dependente), sugerindo que os extratos etanólicos de *H. psittacinum* e de *C. latifolium* protegeram, ao menos em parte, as células do estresse oxidativo causado pelo LPS, reduzindo a produção de óxido nítrico.



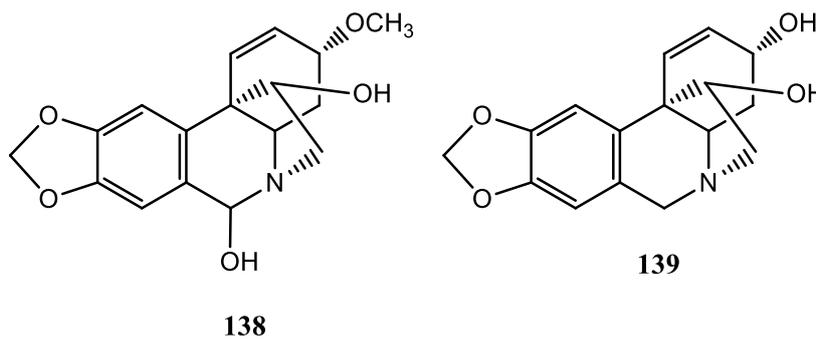
**Figura 15. Produção de óxido nítrico em células RAW 264.7 tratadas por 24 horas com os extratos etanólicos de *Crinum latifolium* (AAS 2712) e *Hippeastrum psittacinum* (GPS 10874) antes e depois do estímulo com lipopolissacarídeo (LPS)**

AAS/GPS 1, 2 e 3: Tratamentos (T) a 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6, 25 µg/mL, respectivamente. C<sup>-</sup>: controle negativo, C<sup>+</sup>: controle positivo LPS (1 µg/mL), C<sup>s</sup>: controle do solvente. \*:  $p < 0,05$  vs C<sup>-</sup>; #:  $p < 0,05$  T + LPS; a:  $p < 0,05$  T vs T + LPS.

Alguns alcaloides de Amaryllidaceae têm mostrado efeito inibidor da produção de óxido nítrico em células de macrófagos peritoneais de ratos submetidos ao estímulo por LPS (10 µg/mL). Compostos como licorina (1), crinamina (30) 6-hidroxicrinamina (138), e bulbispermina (139) mostraram valores CI<sub>50</sub> de 2,5 µM, 1,8 µM, 5,4 µM e 24 µM, respectivamente (ABDEL-HALIM et al., 2004). Os alcaloides 1 e narciclasina (63) inibiram a expressão de TNF-α em células de macrófagos RAW 264.7 estimuladas com LPS (1 µg/mL), com CI<sub>50</sub> de 2,1 µM e 0,02 µM, respectivamente (YAMAZAKI e

KAWANO, 2011). KANG et al. (2012) mostraram que **1** inibe de forma dose dependente a regulação positiva de iONS e COX-2 na mesma linhagem celular de macrófagos, enquanto SHEN et al. (2019) mostraram que **63** – testado entre 0,001 e 0,016  $\mu\text{M}$  - regulou a expressão de iONS, IL-6 e TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e COX-2, e controlou a produção de NO, em células RAW 264.7 estimuladas com LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ).

Poucos são os estudos que mostram o efeito anti-inflamatório de extratos de Amaryllidaceae. Considerando as plantas sob estudo, JENNY et al. (2011) e ZVETKOVA et al. (2001) estimaram o potencial anti-inflamatório do extrato aquoso de folhas *C. latifolium* em células mononucleares do sangue periférico, enquanto NGUYEN et al. (2013) estudaram a mesma atividade, em macrófagos tratados com frações alcaloídicas obtidas do extrato aquoso da planta. Não foram encontrados, na literatura, registros desse tipo de estudos para *H. psittacinum*. Assim, o presente trabalho descreve o primeiro estudo do potencial anti-inflamatório de extratos etanólicos dos bulbos dessas duas espécies. O alcaloide licorina (**1**) foi identificado nos extratos etanólicos das duas espécies, enquanto crinamina (**63**) só foi identificado em *C. latifolium*. Baseado nos resultados descritos por YAMAZAKI e KAWANO (2011), SHEN et al. (2019), e KANG et al. (2012), não deve ser descartada a hipótese de que os alcaloides presentes nos extratos – principalmente do tipo licorina, haemantamina e narciclasina – sejam os responsáveis pela proteção do extrato contra o estímulo citotóxico do LPS, traduzido na diminuição dos níveis de óxido nítrico em células RAW 264.7.



#### 4.2 CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HEPG2

As células HepG2 são uma linhagem celular de hepatocarcinoma humano, utilizadas como modelo para estudos de metabolismo de xenobióticos e de toxicidade no

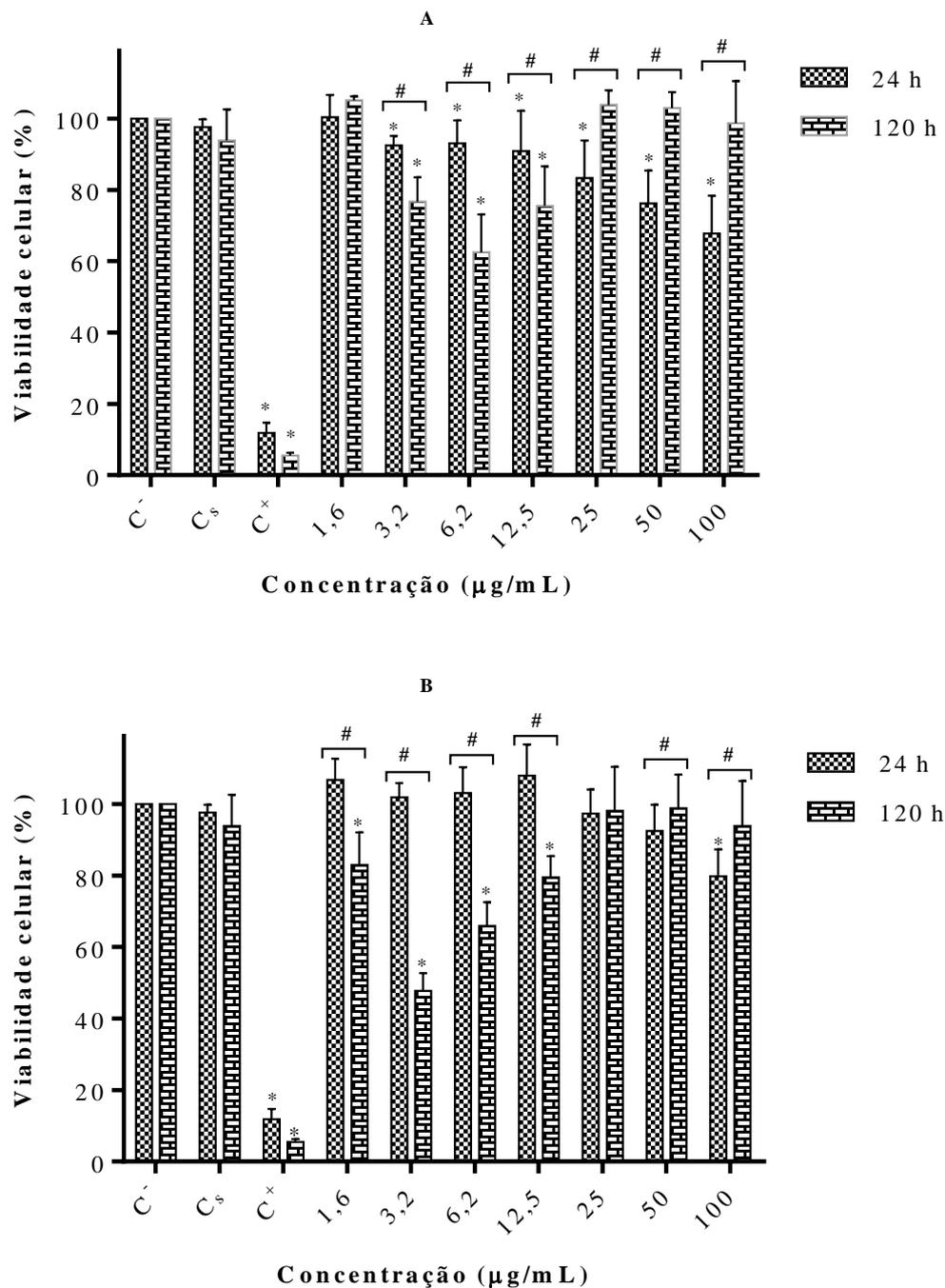
fígado, uma vez que retêm muitas das funções especializadas que caracterizam células de hepatócitos humanos normais e, em particular, retêm a atividade de enzimas antioxidantes das fases I e II do ciclo celular, o que confere boas características para estudo de efeitos citoprotetores, genotóxicos e antígenotóxicos de fármacos e candidatos a fármacos (KNASMÜLLER et al., 1998).

As células HepG2 foram utilizadas para o estudo de citotoxicidade de extratos etanólicos de Amaryllidaceae. Após 24 horas de tratamento, foi observado que *Crinum latifolium* apresentou valores decrescentes de viabilidade celular (VC), com o aumento da concentração do extrato (dose-dependente). A VC foi maior que 70%, em concentrações menores a 25 µg/mL (Figura 16). O extrato de *H. psittacinum* foi menos citotóxico, mostrando valores de VC superiores a 80% em todas as concentrações testadas.

Para os dois extratos foi observado que, entre 24 e 120 horas, houve diminuição da VC nas menores concentrações; entre 1,6 µg/mL e 6,2 µg/mL para *C. latifolium*; e entre 1,6 µg/mL e 3,2 µg/mL para *H. psittacinum*. O efeito contrário foi observado nas concentrações maiores (Figura 16). No experimento com células HepG2 (seção 3.4.4), as células foram semeadas em placas de 96 poços, em concentrações de  $1 \times 10^4$  e  $1 \times 10^3$  células/poço para os tratamentos de 24 e 120 horas, respectivamente. Após 24 horas de aderência, as células foram tratadas com as diferentes amostras por 24 h. Concluído esse tempo, o meio de cultura foi trocado por meio DMEM completo e, em seguida, as células foram cultivadas por mais 24 ou 120 horas. Para o tratamento de 5 dias, o meio de cultura foi trocado por meio completo conforme o requerimento das células. Assim, a diminuição na viabilidade celular, pode ser devida a proliferação rápida das células HepG2, que devido ao exíguo espaço do poço, entraram em processo de apoptose.

Alguns estudos de citotoxicidade em células HepG2 têm sido desenvolvidos com alcaloides e extratos de Amaryllidaceae. LIU et al. (2019) mostraram que licorina (**1**) reduziu a viabilidade celular e promoveu a apoptose em células HepG2 tratadas com concentrações crescentes do alcaloide (0,2-100 µM). HANH et al. (2018) mostraram que, com exceção de perlolirina (**109**,  $CI_{50} = 23 \mu M$ ), os alcaloides de tipo crinina, isolados de *Crinum latifolium*, não mostraram atividade citotóxica significativa em células HepG2 ( $CI_{50} > 100 \mu M$ ). No trabalho de YUN et al. (2016), o extrato etanólico de bulbos de *Lycoris sanguinea* (1 µg/mL e 10 µg/mL) e alcaloides de tipo narciclasina (0,01 µM a 1 µM) inibiram a atividade da fosfoenolpiruvatocarboxiquinase, enzima envolvida em

processos de gliconeogênese em células HepG2. SHAWKY et al. (2015) mostraram que os extratos clorofórmicos de bulbos e raízes de *Narcissus papyraceus* e *Narcissus tazetta*, foram citotóxicos em células HepG2, com valores  $CI_{50}$  entre 2,2 e 4,5  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 16. Citotoxicidade dos extratos etanólicos de bulbos de *Crinum latifolium* (A) e *Hippeastrum psittacinum* (B) em células HepG2 pelo método do XTT**

C<sup>-</sup>: controle negativo, C<sup>+</sup>: controle positivo doxorrubicina (0,17  $\mu\text{M}$ ), C<sup>s</sup>: controle do solvente. \*:  $p < 0,05$  vs C<sup>-</sup>; #:  $p < 0,05$  T<sub>24hs</sub> vs T<sub>120hs</sub>

#### 4.1 FRAÇÕES ALCALOÍDICAS DE *Crinum latifolium* E *Hippeastrum psittacinum*

Os extratos de *H. psittacinum* e *C. latifolium* apresentaram o maior número de compostos alcaloídicos, quando comparados com os outros extratos em estudo (Quadro 5), bem como atividade de inibição de AChE. Dessa forma, foi realizada uma extração seletiva de alcaloides (seção 0).

Conforme mostrado na Figura 6 (p. 40), a partir do extrato bruto foram obtidas frações hexânica ( $F_{\text{hex}}$ ), acetato de etila ( $F_{\text{AcOEt}}$ ) e acetato de etila/metanol 1:1 ( $F_{\text{AcOEt/MeOH}}$ ) que, por sua vez, foram analisadas por CCD para conhecer seu perfil alcaloídico. Os dados de rendimento são apresentados na Tabela 7.

A análise por CCD do extrato etanólico e das frações alcaloídicas de *C. latifolium* mostraram resposta positiva para alcaloides. No entanto, para *H. psittacinum*, só o extrato etanólico e as frações alcaloídicas em hexano,  $F_{\text{hex}}$ , e em acetato de Etila,  $F_{\text{AcOEt}}$ , mostraram manchas características para alcaloides após revelado com o reagente de Dragendorff. As frações  $F_{\text{hex}}$  tiveram menor rendimento (0,39 %), enquanto as frações alcaloídicas  $F_{\text{AcOEt}}$  mostraram rendimentos entre 35% e 59 % (Tabela 7).

Foi avaliada a atividade inibitória dos extratos etanólicos brutos e as frações alcaloídicas, sobre a enzima AChE pelo método colorimétrico de Ellman, com algumas modificações (ANDRADE et al., 2016). Como controle positivo foi utilizado bromidrato de galantamina (**33**). O resumo dos resultados é mostrado na Tabela 7.

As frações alcaloídicas de *H. psittacinum* tiveram menor atividade inibitória da acetilcolinesterase em comparação com o extrato etanólico bruto (Tabela 7), sugerindo que o conjunto de compostos presentes no extrato bruto contribui para a atividade e durante o processo de fracionamento, a separação de determinadas substâncias reduz essa interação.

Assim, considerando o baixo rendimento na obtenção dos extratos etanólico (< 9 %) e hexânico bruto (< 1 %) (MERA-LÓPEZ, 2018), e das frações alcaloídicas (Tabela 7); a perda de atividade inibitória da acetilcolinesterase das frações alcaloídicas (Tabela 7); e a baixa abundância relativa dos compostos desconhecidos, 2 % para **EC1**, e menor a 1% para os compostos **EC2** a **EC8** (Tabela 3), não foi dada continuidade ao estudo químico biomonitorado por inibição da AChE para o extrato etanólico de *H. psittacinum*.

**Tabela 7. Atividade de inibição da acetilcolinesterase e porcentagem de rendimento dos extratos etanólicos e frações alcaloídicas de *Crinum latifolium* (AAS 2712) e *Hippeastrum psittacinum* (GPS 10874)**

Espécie/ padrão*	Tipo de amostra	Abreviatura	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	Massa (g)	R (%)
<i>Crinum latifolium</i>	Extrato etanólico bruto	AAS 2712	27,8 ± 1,4	3,05	-
	Fração hexânica *	AAS-F <sub>hex</sub>	51,5 ± 0,9	0,01	0,39
	Fração em AcOEt *	AAS-F <sub>AcOEt</sub>	10,9 ± 0,4	1,78	58,36
	Fração AcOEt/MeOH 1:1 *	AAS-F <sub>AcOEt/MeOH</sub>	20,1 ± 0,8	0,69	22,62
	Fração aquosa *	AAS-F <sub>aq</sub>	51,3 ± 1,7	0,28	9,18
<i>Hippeastrum psittacinum</i>	Extrato etanólico bruto	GPS 10874	11,2 ± 0,7	0,80	-
	Fração hexânica *	GPS-F <sub>hex</sub>	29,7 ± 1,5	0,01	1,63
	Fração em AcOEt *	GPS-F <sub>AcOEt</sub>	18,9 ± 0,8	0,28	35,00
	Fração AcOEt/MeOH 1:1 *	GPS-F <sub>AcOEt/MeOH</sub>	38,3 ± 1,6	0,21	26,25
	Fração aquosa *	GPS-F <sub>aq</sub>	141,5 ± 2,3	0,23	28,75
Galantamina*	Controle positivo	Gal	0,162 ± 0,015	-	-

Os valores de CI<sub>50</sub> estão expressos como o valor médio ± desvio padrão. R: rendimento. \*: Fração oriunda do extrato etanólico bruto após extração seletiva de alcaloides.

#### 4.1.1 Estudo químico de *Crinum latifolium* biomonitorado por atividade de inibição da acetilcolinesterase

Após a extração seletiva de alcaloides, a partir do extrato etanólico de *C. latifolium*, foi observado que só à fração alcaloídica em acetato de etila (AAS-F<sub>AcOEt</sub>) mostrou significativa atividade inibitória da AChE (CI<sub>50</sub> = 10,9 ± 0,4 µg/mL, Tabela 7), quando comparada com o extrato etanólico bruto (CI<sub>50</sub> = 27,8 ± 1,4 µg/mL, Tabela 7).

Assim, AAS-F<sub>AcOEt</sub> foi escolhida para continuar o estudo químico biomonitorado por inibição da AChE. Após separação por cromatografia em coluna (seção 3.3), foram obtidas 150 frações (Fc), que foram analisadas e reunidas conforme o perfil alcaloídico por CCD. Só as frações Fc 1 a Fc 41, reunidas nas subfrações Sbf 1 a Sbf 10, mostraram resposta positiva para alcaloides e foram analisadas quanto à inibição da AChE nas concentrações de 25 µg/mL e 50 µg/mL (Tabela 8).

Na concentração de 25 µg/mL, só as sub-frações Sbf 2, Sbf 5 e Sbf 6 inibiram a enzima, mostrando valores de inibição de 3,1 %, 10,1 % e 3,8 %, respectivamente.

Quando testadas a 50 µg/mL, Sbf **2** e Sbf **5**, revelaram valores maiores de inibição de 11,6 % e 20,8 %, respectivamente. Com exceção de Sbf **9** e Sbf **10**, que não inibiram as enzimas nas concentrações testadas, todas as demais sub-frações tiveram porcentagens de inibição menor a 7 %.

Considerando o  $CI_{50}$  do extrato etanólico total (27,8 µg/mL) e da fração em acetato de etila (10,9 µg/mL) de *C. latifolium*, pode ser concluído que, após o processo de separação por cromatografia em coluna, houve perda da atividade biológica de interesse, sugerindo que, na fração acetato de etila, a inibição da acetilcolinesterase pode ser devida a um efeito sinérgico entre componentes presentes no extrato.

**Tabela 8. Rendimento e atividade biológica das sub-frações alcalóidicas de *Crinum latifolium* após separação por cromatografia em coluna**

Fração	Sub-fração	Inibição (%)		Massa (mg)	R (%)
		50 µg/mL	25 µg/mL		
Fc 1 - 5	Sbf <b>1</b>	3,3 ± 0,3	-	5,3	0,53
Fc 6 - 9	Sbf <b>2</b>	11,6 ± 0,7	3,1 ± 0,4	3,2	0,32
Fc 10 - 13	Sbf <b>3</b>	5,3 ± 0,5	-	7,9	0,79
Fc 14	Sbf <b>4</b>	4,8 ± 0,5	-	53,1	5,31
Fc 15 - 16	Sbf <b>5</b>	20,8 ± 1,3	10,1 ± 0,6	63,4	6,34
Fc 17 - 18	Sbf <b>6</b>	5,8 ± 0,2	3,8 ± 0,2	28,5	2,85
Fc 19 - 20	Sbf <b>7</b>	6,1 ± 0,5	-	48,3	4,83
Fc 21 - 27	Sbf <b>8</b>	2,5 ± 0,2	-	57,4	5,74
Fc 28 - 29	Sbf <b>9</b>	-	-	69,8	6,98
Fc 30 - 41	Sbf <b>10</b>	-	-	64,6	6,46
Fc 42 -150	-	-	-	503,2	50,32

Os valores de porcentagem inibição estão expressos como o valor médio ± desvio padrão. R: rendimento.

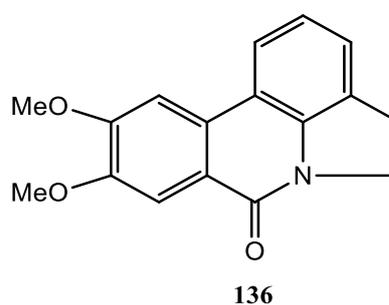
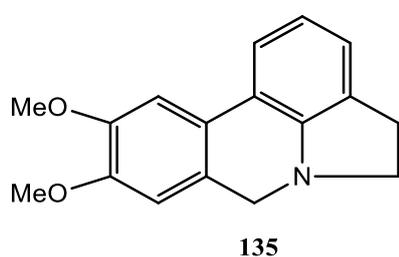
A análise das sub-frações Sbf **2** e Sbf **5**, por CG-EM, permitiu identificar seis alcaloides no extrato etanólico total que não tinham sido identificados no extrato etanólico bruto (Tabela 9): anidrolícorina (**6**), haemantamina (**25**), 11-oxohaemantamina (**26**), 11-hidroxitatina (**28**), N-desmetilísmína (**69**) e 5,6-diídrobicolorina (**128**).

**Tabela 9. Alcaloides identificados nas sub-frações alcalóidicas de *Crinum latifolium***

Alcaloides	IR	TIC (%)
Sbf 2		
11-oxohaemantamina ( <b>26</b> )	2585	0,43
11,12-deshidroanidrolicorina ( <b>7</b> )	2606	2,29
crinamina ( <b>30</b> )	2648	4,81
haemantamina ( <b>25</b> )	2666	6,82
licorina ( <b>1</b> )	2746	63,18
Sbf 5		
ismina ( <b>68</b> )	2280	1,90
triseridina ( <b>64</b> )	2282	5,37
N-desmetilismina ( <b>69</b> )	2293	2,38
5,6-diidrobicolorina ( <b>128</b> )	2379	1,41
anidrolicorina ( <b>6</b> )	2501	0,87
11,12-desidroanidrolicorina ( <b>7</b> )	2606	10,50
11-hidroxivitatina ( <b>28</b> )	2728	5,09
licorina ( <b>1</b> )	2746	1,38
Alcaloide não identifica( <b>EA1</b> )	3076	18,50

IR: índice de retenção; TIC: área relativa; sbf: subfração

Desde que a galantamina (**33**) foi aprovada pela FDA para o tratamento da doença de Alzheimer nos primeiros estágios, os alcaloides pertencentes ao mesmo núcleo estrutural têm sido o foco de inúmeros estudos na procura de novo compostos inibidores da AChE (ANDRADE et al., 2016). Outros alcaloides como sanguinina (**38**), osoanina (**135**) e oxoosoanina (**136**), têm mostrado resultados promissores como inibidores da enzima (HABARTOVÁ et al., 2016).



Os resultados, tanto para *Crinum latifolium* como para *Hippeastrum psittacinum*, sugerem a ocorrência de um efeito sinérgico entre os compostos presentes nos extratos etanólico brutos quando testados na inibição da AChE.

Poucos são os estudos que discutem sobre a ocorrência de efeito sinérgico entre alcaloides de Amaryllidaceae na inibição de AChE. CORTES; POSADA; et al. (2015) mostraram que a fração alcaloídica, obtida do extrato metanólico de bulbos de *Crinum jagus*, apresentou  $CI_{50} = 18,28 \pm 0,29 \mu\text{g/mL}$  no teste de inibição da AChE, e sugeriram que o efeito neuroprotetor do extrato, testado a  $2,9 \mu\text{g/mL}$ , fosse devido à presença de licorina (**1**), 1-O-acetillicorina (**2**), 11,12-desidroanidrolícorina (**7**), vitatina (**27**), undulatina (**59**), trisferidina (**64**), macronina (**124**), powellina (**125**) e 11,12-desidrolicoreno (**126**). CASTILLO et al. (2018) sugeriram que a atividade inibitória da AChE ( $CI_{50} = 45,48 \mu\text{g/mL}$ ), e o efeito neuroprotetor do extrato etanólico de bulbos de *Caliphruria subdentata* (testado a  $6,25 \mu\text{g/mL}$  e  $12,5 \mu\text{g/mL}$ ), poderiam estar correlacionados com a presença de galantamina (**33**), além de outros alcaloides minoritários presentes no extrato. MORAGA-NICOLÁS et al. (2018) sugeriram que compostos com núcleo estrutural do tipo galantamina, são os responsáveis pela atividade inibitória de AChE das frações alcaloídicas de bulbos de *Rhodolirium andicola* ( $CI_{50}$  entre  $11 \mu\text{g/mL}$  e  $58 \mu\text{g/mL}$ ).

Ainda, a pesquisa desenvolvida por TRUJILLO-CHACÓN et al. (2019) resultou em frações alcaloídicas de bulbos de *Rhodolirium speciosum*, *Rhodophiala pratensis*, *Phaedranassa lehmannii* e *Phycella australis* apresentando  $CI_{50} = 35,22 \mu\text{g/mL}$ ,  $CI_{50} = 38,13 \mu\text{g/mL}$ ,  $CI_{50} = 67,73 \mu\text{g/mL}$  e  $CI_{50} = 80,12 \mu\text{g/mL}$ , no teste de inibição da AChE, respectivamente. A espécie *P. australis*, que apresentou a menor atividade de inibição de AChE, mostrou baixa citotoxicidade (entre  $0,38 \mu\text{g/mL}$  e  $1,5 \mu\text{g/mL}$ ), além da maior atividade neuroprotetora ao dano oxidativo causado por rotenona/oligomicina A, em células de neuroblastoma SH-SY5Y. Os autores sugeriram que a atividade neuroprotetora dessa espécie seja devida a mecanismos sinérgicos dos alcaloides, com núcleos estruturais de tipo licorina, haemantamina, galantamina, homolicorina, montanina, narciclasina, além de outros alcaloides (TRUJILLO-CHACÓN et al., 2019).

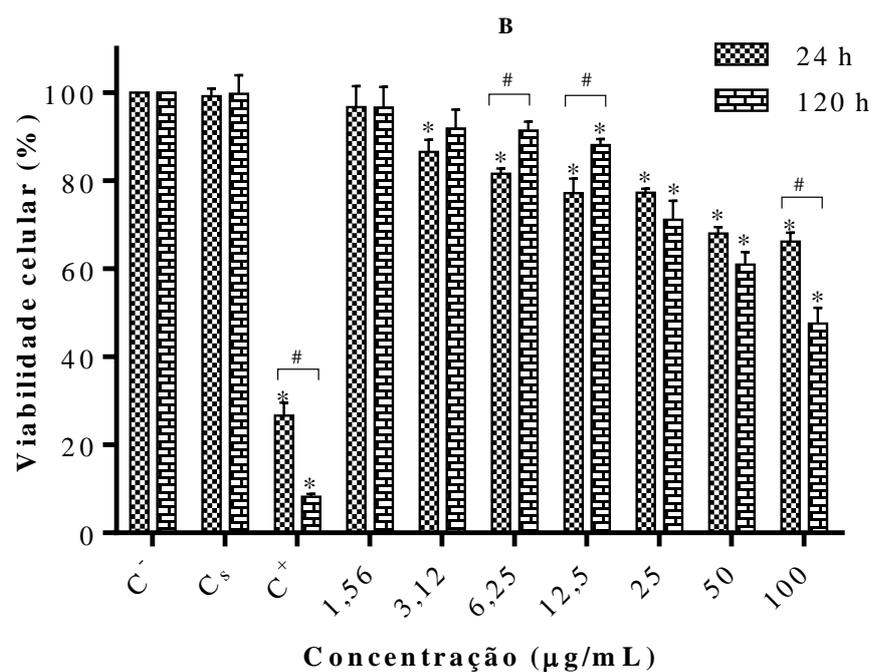
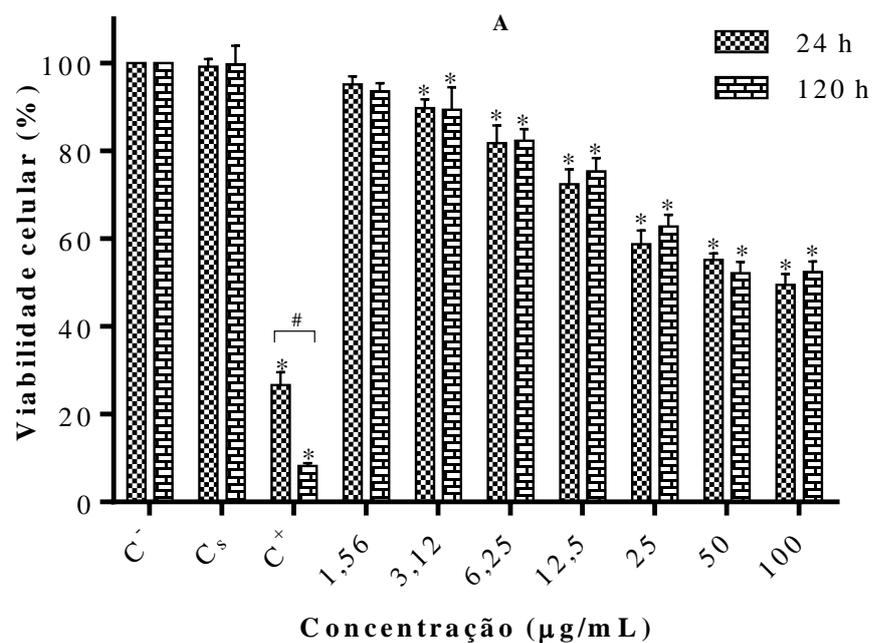
#### 4.2 CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y

Estudos de citotoxicidade e neuroproteção têm sido desenvolvidos em modelos com células de neuroblastoma humano SH-SY5Y não diferenciadas (LI et al., 2013; JIN et al., 2014; KWON et al., 2015; CASTILLO et al., 2018; SHALGUM et al., 2018; TRUJILLO-CHACÓN et al., 2019). Alguns autores sugeriram que, quando diferenciadas, as células SH-SY5Y são mais susceptíveis ao dano oxidativo causado por ERO e ERN,

tornando a linhagem não diferenciada apropriada para estudos de citotoxicidade, neuroproteção e neurodiferenciação (SCHNEIDER et al., 2011; CASTILLO-ORDOÑEZ, 2016; FORSTER et al., 2016). O uso dessa linhagem está em contínuo crescimento, considerando a dificuldade no uso de células neuronais primárias, que apresentam rápida diferenciação celular e dificuldade para serem propagadas *in vitro* (KOVALEVICH e LANGFORD, 2013; CASTILLO-ORDOÑEZ, 2016). Baseado nas considerações anteriores, foram escolhidas células não diferenciadas de neuroblastoma SH-SY5Y para os testes de citotoxicidade, neuroproteção e genotoxicidade.

Os extratos etanólicos brutos de *Crinum latifolium* e *Hippeastrum psittacinum* foram testados quanto à toxicidade em células SH-SY5Y. Os resultados são mostrados na Figura 17. O extrato de *C. latifolium* manteve a viabilidade celular acima de 70% em concentrações menores que 12,5 µg/mL, enquanto o extrato de *H. psittacinum*, manteve a viabilidade celular acima de 70% em concentrações menores que 25 µg/mL. Na Figura 17 (B) pode ser observado que *H. psittacinum* aumentou o número de células viáveis, nas concentrações de 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL, após 120 horas de tratamento com o extrato.

Avançando nos estudos das atividades biológicas de Amaryllidaceae, foi aplicado um teste para avaliar se os extratos dessas duas espécies protegem os neuroblastomas do dano oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio (seção 4.3)



**Figura 17.** Citotoxicidade dos extratos etanólicos de bulbos de *Crinum latifolium* (A) e *Hippeastrum psittacinum* (B) em células SH-SY5Y pelo método do XTT

C<sup>-</sup>: controle negativo, C<sup>+</sup>: controle positivo doxorrubicina (0,17 µM), C<sup>s</sup>: controle do solvente. \*:  $\rho < 0,05$  vs C<sup>-</sup>; #:  $\rho < 0,05$  T<sub>24hs</sub> vs T<sub>120hs</sub>

#### 4.3 NEUROPROTEÇÃO EM CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y

Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathiona Peroxidase (GPx) são enzimas antioxidantes endógenas, responsáveis por manter o balanço redox nas células, evitando os efeitos deletérios das ERO. Em processos metabólicos que desencadeiam estresse oxidativo celular, há um desequilíbrio entre a atividade antioxidante dessas enzimas e as ERO formadas. Em condições fisiológicas normais, a molécula de oxigênio ( $O_2$ ) é reduzida a radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), que, em seguida, é convertido em  $H_2O_2$  e  $O_2$  por ação da SOD. Posteriormente, o  $H_2O_2$  formado, é transformado em água e oxigênio por ação da CAT e a GPx. A enzima GPx pode atuar na inibição de outros hidroperóxidos orgânicos e algumas espécies reativas de nitrogênio (MORILLAS-RUIZ e HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, 2015).

O dano celular, induzido pelo estresse oxidativo, aumenta a concentração de ERN e ERO no interior das células, e principalmente do  $H_2O_2$ . Essa espécie reativa é uma das principais ERO produzidas durante a respiração mitocondrial e é um dos agentes causadores da peroxidação lipídica, disfunção mitocondrial e dano oxidativo no ADN, induzindo o processo de apoptose em vários tipos celulares (KWON et al., 2015).

O  $H_2O_2$  tem sido correlacionado com vários processos fisiológicos do envelhecimento, além de ter sido associado a doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, entre outras (KWON et al., 2015; SHALGUM et al., 2018). Além disso, é considerado uma substância neurotóxica endógena, que pode induzir a morte de células neuronais agindo em alvos como *i*) receptores pré e pós-sinápticos, *ii*) enzimas associadas com a síntese e o metabolismo de neurotransmissores e hormônios, *iii*) bombas e canais de troca iônica nas membranas celulares, *iii*) vesículas de armazenamento e *iv*) ácidos nucleicos (SHALGUM et al., 2018).

Peróxido de hidrogênio tem sido utilizado como agente oxidante, indutor de citotoxicidade, em modelos celulares com linhagens de neuroblastoma humano SH-SY5Y (LI et al., 2013; JIN et al., 2014; KWON et al., 2015; SHALGUM et al., 2018). Considerando que o  $H_2O_2$  é produzido durante processos metabólicos redox nas células, além de sua elevada toxicidade, foi realizado um estudo para determinar a atividade neuroprotetora dos extratos etanólicos de Amaryllidaceae, ao dano oxidativo causado pelo  $H_2O_2$  em células SH-SY5Y.

Os extratos etanólicos brutos de *Crinum latifolium* e *Hippeastrum psittacinum* foram testados quanto à capacidade neuroprotetora nas concentrações de 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL. No experimento, foi utilizado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 µM) como agente indutor do dano oxidativo, e os resultados são mostrados na Figura 18.

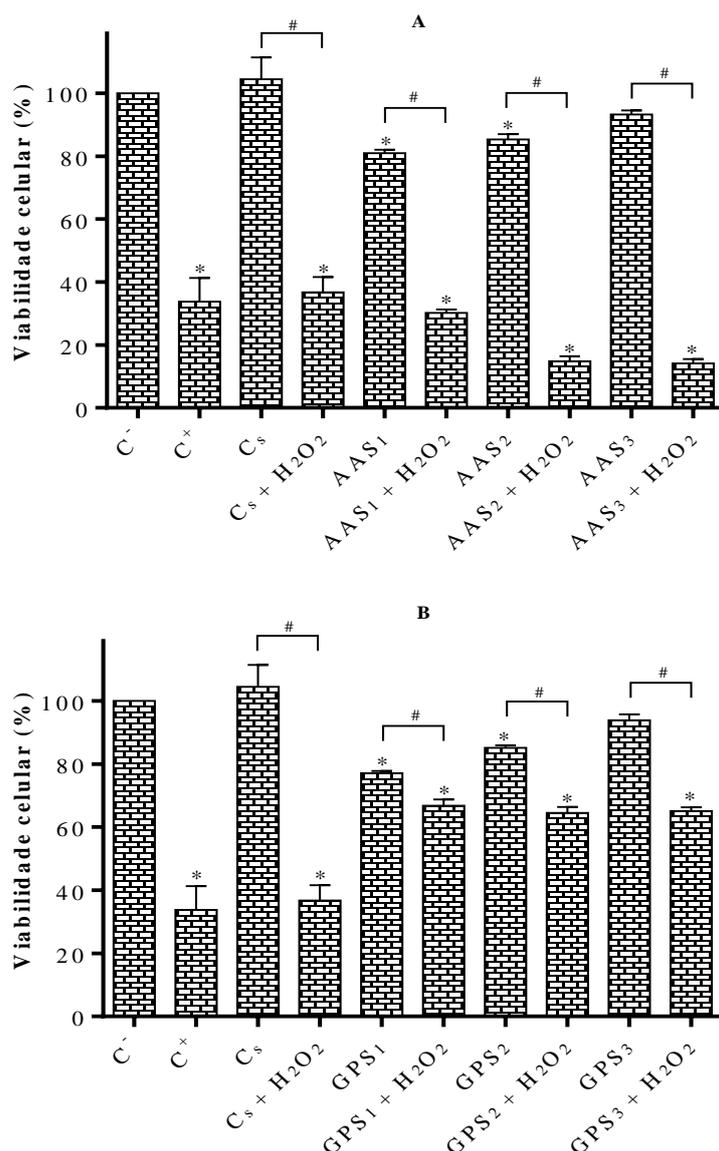
O extrato etanólico de *Crinum latifolium* não protegeu as células do efeito citotóxico do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Figura 18-A**); contudo, o extrato etanólico de *H. psittacinum* mostrou efeito neuroprotetor nas três concentrações testadas, mantendo a viabilidade celular entre 60 e 70 % (**Figura 18-B**). Foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ), na viabilidade celular do grupo de células tratadas exclusivamente com o extrato (GPS<sub>1</sub>, GPS<sub>2</sub> e GPS<sub>3</sub>), e as tratadas com o extrato e peróxido de hidrogênio (GPS<sub>1</sub>/GPS<sub>2</sub>/GPS<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Nesse último grupo foi observado um menor efeito citotóxico, quando comparado com o grupo de células tratadas unicamente com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (controle positivo, C<sup>+</sup>), que diminuiu a viabilidade em 70%, aproximadamente. Assim, o extrato etanólico de *H. psittacinum* protegeu, ao menos em parte, as células de neuroblastoma do estresse oxidativo causado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Os resultados obtidos no experimento de neuroproteção são corroborados por dados da literatura, que mostram o efeito neuroprotetor de extratos etanólicos e metanólicos brutos, além de frações alcaloídicas de Amaryllidaceae (CORTES; POSADA; et al., 2015; CASTILLO et al., 2018; CORTES et al., 2018; MORAGANICOLÁS et al., 2018; CORTES et al., 2019; TRUJILLO-CHACÓN et al., 2019). Todos os autores discutiram o efeito sinérgico dos alcaloides presentes nos extratos de Amaryllidaceae, e sugeriram que a atividade neuroprotetora esteja correlacionada com a presença desse tipo de metabolitos.

É importante ressaltar que este é o primeiro relato do efeito neuroprotetor de extratos alcaloídicos obtidos de *Hippeastrum psittacinum*. Considerando espécies do mesmo gênero, só a fração alcaloídica de *Hippeastrum puniceum* (2,9 µg/mL), mostrou atividade neuroprotetora, protegendo as células neuronais primárias, isoladas de embriões de ratos Wistar, do efeito citotóxico do glutamato (125 µM), reduzindo os níveis de lactato desidrogenase (LDH) liberado no meio de cultura (CORTES; POSADA; et al., 2015).

O extrato etanólico de *Crinum latifolium* foi ativo na inibição da AChE; em concentrações menores que 12,5 µg/mL apresentou baixa citotoxicidade, tanto em células de macrófagos RAW 264.7, como de neuroblastoma SH-SY5Y e de hepatocarcinoma

HepG2; e protegeu as células RAW 264.7 do estresse oxidativo causado pelo lipopolisacarídeo. O extrato etanólico de *Hippeastrum psittacinum* foi ativo na inibição da AChE; em concentrações menores que 25 µg/mL apresentou baixa citotoxicidade em células RAW 264.7, HepG2 e de neuroblastoma SH-SY5Y; protegeu as células RAW 264.7 do estresse oxidativo causado pelo lipopolisacarídeo; e ainda protegeu as células de neuroblastoma do estresse oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio.



**Figura 18. Viabilidade em células de neuroblastoma SH-SY5Y tratadas com extratos etanólicos de *Crinum latifolium* (AAS 2712, A) e *Hippeastrum psittacinum* (GPS 10874, B), e submetidas ao estímulo citotóxico do peróxido de hidrogênio**

AAS/GPS 1, 2 e 3: Tratamentos (T) a 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6, 25 µg/mL, respectivamente. C<sup>-</sup>: controle negativo, C<sup>+</sup>: controle positivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 µM), C<sub>s</sub>: controle do solvente. \*: p < 0,05 vs C<sup>-</sup>; #: p < 0,05 T vs T + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Mesmo que a citotoxicidade dos extratos - testados a 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL - em células de neuroblastoma tenha sido baixa - entre 20 e 30 % (Figura 17) - resulta conveniente discutir se houve ou não mudanças no material genético das células viáveis após o tratamento com os extratos. Visando o melhor entendimento do mecanismo pelo qual os extratos de Amaryllidaceae são tóxicos nessas condições, foram realizados os testes de micronúcleos e do cometa conforme descrito nas seções 3.4.6 e 3.4.7, respectivamente, e os resultados são discutidos na seção 4.4.

#### 4.4 GENOTOXICIDADE EM CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y

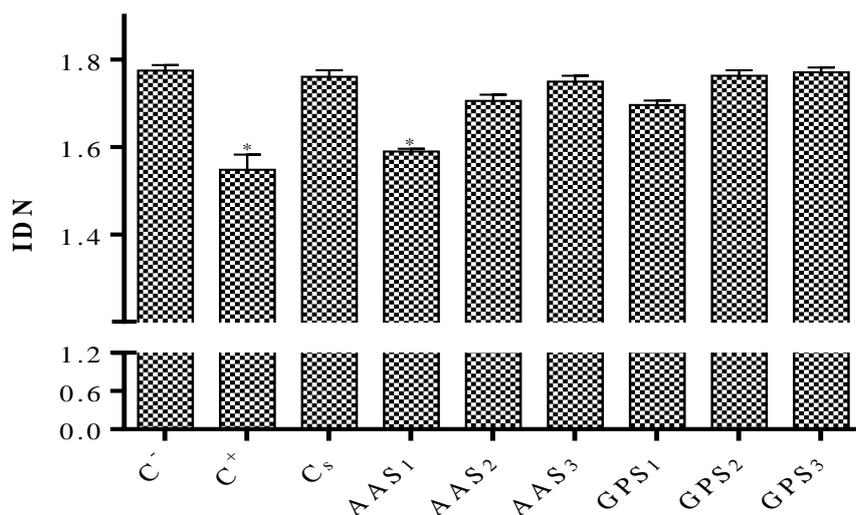
##### 4.4.1 Teste de micronúcleos

O teste de micronúcleos em células binucleadas (CBMNs), também conhecido como teste do citoma, tem sido utilizado em estudos de genotoxicidade de novos fármacos, produtos agrícolas, metais pesados, extratos de plantas, entre outros (AHMED et al., 2011; BARBOSA et al., 2018; CASTILLO et al., 2018). Uma propriedade importante dessa técnica é sua capacidade de detectar a ação de agentes genotóxicos clastogênicos (que causam quebra no ADN) e de agentes genotóxicos aneugênicos (que induzem aneuploidia ou a segregação cromossômica anormal) (BARBOSA et al., 2018).

No teste do CBMNs foram analisados parâmetros como o índice de divisão nuclear (Figura 19), que considera os efeitos citostáticos a partir da contagem de células mono, bi, tri e tetranucleadas, além de marcadores de danos citogenéticos ou de instabilidade genômica (Figura 20) em células binucleadas (CB) como: *i*) micronúcleos, definido como um fragmento cromossômico acêntrico ou cromossômico inteiro que fica fora do núcleo; *ii*) pontes nucleoplasmáticas (CBPNs), que se expressam como ligações contínuas entre os núcleos das células binucleadas; e *iii*) brotos nucleoplasmáticos (CBBNs), estruturas semelhantes ao micronúcleo, mas que permanecem ligadas ao núcleo principal por uma conexão nucleoplasmática (FENECH, 2007).

Os resultados mostraram que o índice de divisão nuclear (IDN), para o grupo controle negativo (C<sup>-</sup>), foi de 1,8 aproximadamente, e corresponde às células de neuroblastoma em condições normais de cultura. Houve uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) do IDN para o grupo de células tratadas com metilmetanosulfonato (MMS) 150 µM

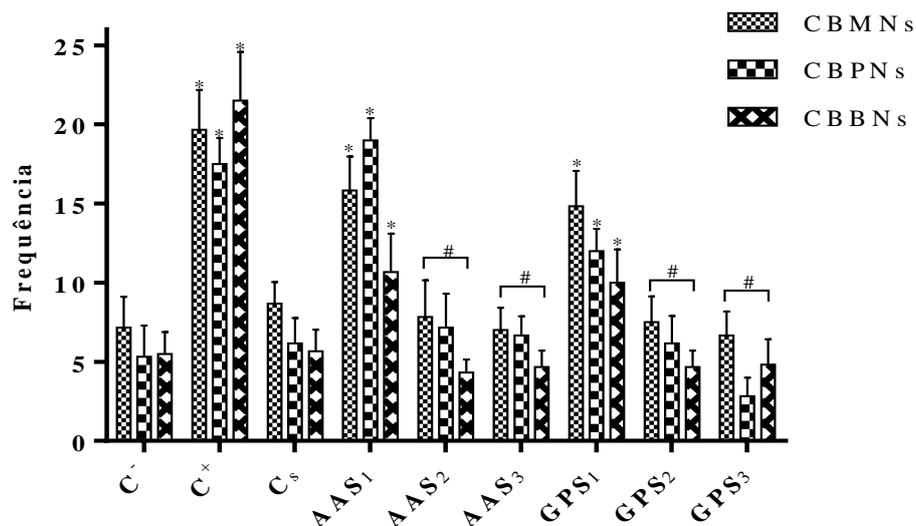
(controle positivo, C<sup>+</sup>), e o extrato etanólico de *Crinum latifolium* a 25 µg/mL. Esses resultados estão de acordo com os dados de viabilidade celular para esse extrato, que foi menos citotóxico em concentrações inferiores a 12,5 µg/mL. O extrato etanólico de *Hippeastrum psittacinum* manteve valores de IDN próximos aos do grupo controle, em acordo com os dados de citotoxicidade em células de neuroblastoma humano (seção 4.2).



**Figura 19. Índice de divisão nuclear (IDN) em células tratadas com os extratos de Amaryllidaceae**

AAS/GPS 1, 2 e 3: Tratamentos a 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6, 25 µg/mL, respectivamente. C<sup>-</sup>: controle negativo, C<sup>+</sup>: controle positivo, metilmetanosulfonato (150 µM), C<sup>s</sup>: controle do solvente. \*:  $p < 0,05$  vs C<sup>-</sup>.

Os dados de frequência de micronúcleos (CBMNs), pontes nucleoplasmáticas (CBPNs) e brotos nucleoplasmáticos (CBBNs), são mostrados na Figura 20, e revelaram que tanto o extrato etanólico de *C. latifolium* quanto de *H. psittacinum*, aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) a frequência desses marcadores de instabilidade genômica, em concentrações superiores a 12,5 µg/mL. A mesma resposta foi observada com o controle positivo MMS.



**Figura 20. Frequência de micronúcleos (CBMNs), pontes nucleoplasmáticas (CBPNs) e brotos nucleoplasmáticos (CBBNs) em 1000 células binucleadas de neuroblastoma SH-SY5Y**

AAS/GPS 1, 2 e 3: Tratamentos a 25  $\mu\text{g/mL}$ , 12,5  $\mu\text{g/mL}$  e 6, 25  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. C<sup>-</sup>: controle negativo, C<sup>+</sup>: controle positivo, metilmetanosulfonato (150  $\mu\text{M}$ ), Cs: controle do solvente. \*:  $\rho < 0,05$  vs C<sup>-</sup>, #:  $\rho < 0,05$  GPS<sub>2</sub>/GPS<sub>3</sub> vs GPS<sub>1</sub>.

#### 4.4.2 Ensaio cometa

O ensaio cometa, também conhecido como teste de eletroforese em gel de uma única célula, é uma técnica que permite avaliar dano no ADN, por meio de evidências visuais (AHMED et al., 2011; CASTILLO-ORDOÑEZ, 2016). Permite identificar sítios abásicos (apurínico/apirimidínico), além de quebras de fitas simples ou de fita dupla no ADN (BARBOSA et al., 2018; CASTILLO et al., 2018).

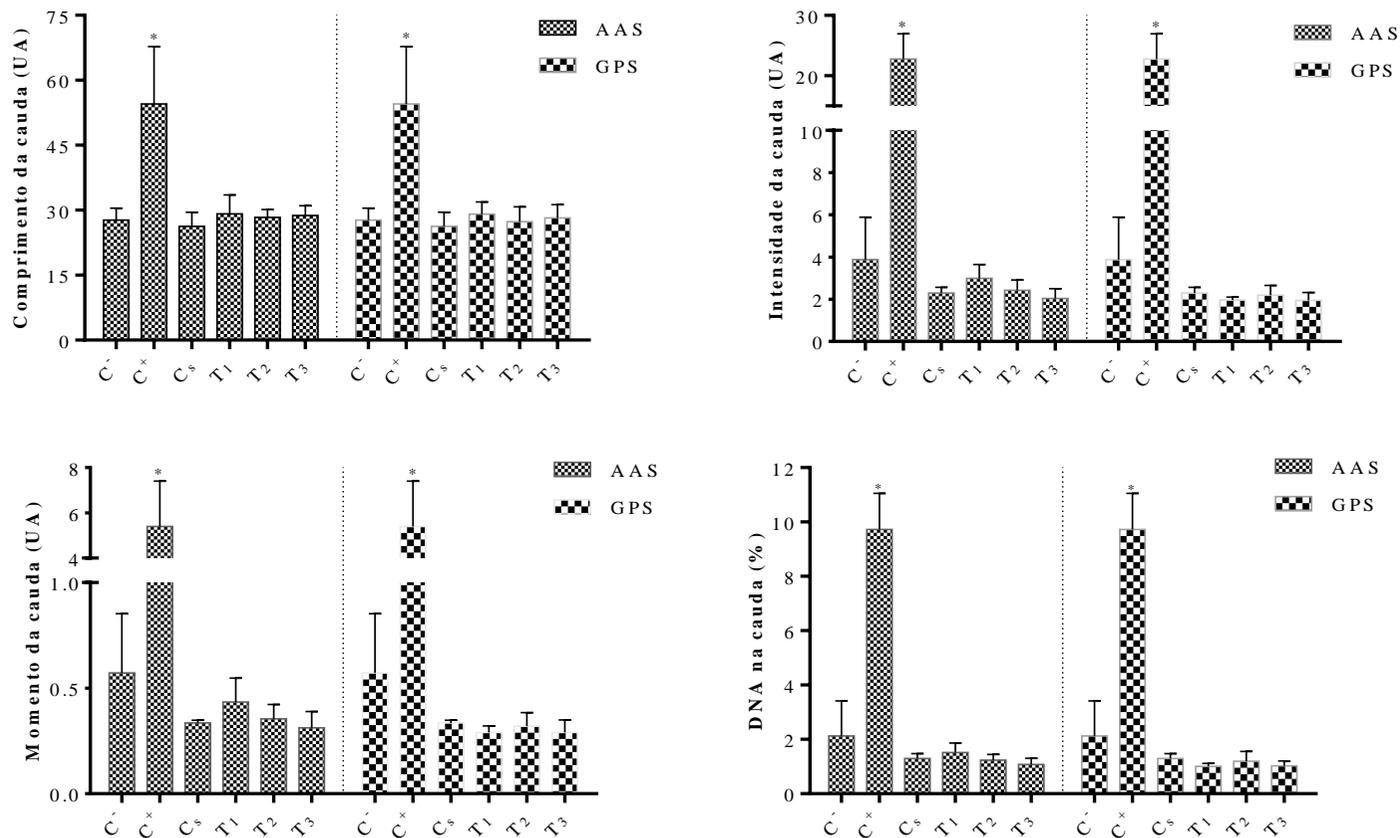
O ensaio consiste na lise de membranas celulares e subsequente descompactação do ADN em condições alcalinas. Em seguida, é induzida a migração do ADN sobre uma matriz de agarose, utilizando a técnica de eletroforese. Na presença de um agente tóxico que possa agir com o ADN, a migração do ADN adquire uma forma aparente de cometa, em que a cauda representa visualmente fragmentos de ADN gerados pelo estímulo genotóxico, enquanto a cabeça representa a região nuclear (SOUZA-ALVES, 2013; CASTILLO-ORDOÑEZ, 2016).

Os resultados do ensaio cometa estão representados na Figura 21. Após a análise de 1000 nucleoides por cada tratamento, não foram observadas mudanças significativas ( $\rho > 0,05$ ) entre o grupo de células tratadas com os extratos de *C. latifolium* ou *H. psittacinum*, e o controle negativo. Parâmetros como *tale lenght* (comprimento da cauda

do cometa), %*Tail-DNA* [ADN na cauda do cometa (%)], *tail moment* [definido como: (%*Tail-DNA*) x (*Tail length*)], e *tail intensity* (intensidade da cauda do cometa) (CETINKAYA et al., 2016), foram semelhantes para todos os tratamentos, com exceção do controle positivo de MMS, um agente genotóxico alquilante das bases nitrogenadas - guanina e timina - do ADN (SOUZA-ALVES, 2013).

Os resultados do ensaio cometa sugerem que os extratos etanólicos de *C. latifolium* e *H. psittacinum* não induzem quebras na fita dupla do ADN; e sua toxicidade, com base nos resultados do teste dos micronúcleos (item 4.4.1), é devida à segregação cromossômica anormal em concentrações superiores a 12,5 µg/mL. Essa instabilidade cromossômica pode gerar ganho ou perda de fragmentos cromossômicos (aneuploidia), causadores de agravos de origem genética (SOUZA-ALVES, 2013; CASTILLO-ORDOÑEZ, 2016; BARBOSA et al., 2018).

O estudo realizado por BARBOSA et al. (2018) mostrou o mesmo tipo de efeito para alcaloides piridínicos, quando testados em células de carcinoma de cólon (RKO-AS45-1). Com relação a extratos de Amaryllidaceae, CASTILLO et al. (2018) encontraram que o extrato etanólico de bulbos de *C. subdentata* (6,25 µg/mL e 12,5 µg/mL) reverteu o efeito genotóxico da proteína β-amiloide 10 µM (Aβ<sub>(1-42)</sub>), em células SH-SY5Y, sugerindo que os alcaloides presentes no extrato fossem os responsáveis por essa atividade. Em outro trabalho de pesquisa, CASTILLO et al. (2016) mostraram que a galantamina (0,1 µM, 1 µM e 10 µM) reverteu o efeito citotóxico e genotóxico do peptídeo Aβ<sub>(1-42)</sub> em células de neuroblastoma humano.



**Figura 21. Ausência de dano no DNA em células de neuroblastoma SH-SY5Y tratadas com os extratos etanólicos de bulbos de *Crinum Latifolium* (AAS 2712) e *Hippeastrum psittacinum* (GPS 10874), avaliado pelo ensaio cometa**

T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>: Tratamentos (T) a 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6, 25 µg/mL, respectivamente. C-: controle negativo, C+: controle positivo, metilmetanosulfonato (150 µM), Cs: controle do solvente, momento da cauda: [%ADN na cauda] x [comprimento da cauda]. \*:  $\rho < 0,05$  vs C

## **5 POTENCIAL DOS EXTRATOS ALCALOÍDICOS DE AMARILLADACEAE PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

As doenças neurodegenerativas (DN) são patologias do sistema nervoso central que envolvem a perda seletiva, progressiva e irreversível dos neurônios (CORTES; POSADA; et al., 2015; CASTILLO et al., 2018). A doença de Alzheimer (DA) é um tipo de DN com etiologia multifatorial e patologicamente complexa, que inclui características patológicas como placas beta-amiloide ( $A\beta$ ), emaranhados neurofibrilares correspondentes aos depósitos intracelulares da proteína tau hiperfosforilada, neuroinflamação, neurodegeneração, entre outros (NG et al., 2015).

Apesar da sua origem desconhecida, os avanços voltados ao estudo da DA têm permitido identificar pontos de ligação em comum na etiopatologia da doença, dentre os quais cabe destacar a disfunção mitocondrial, citotoxicidade glutamatérgica, neuroinflamação, proteinopatia, alterações na via metabólica da quinurenina, entre outras (KUMAR et al., 2015; DÉNESA et al., 2018).

Poucos são os compostos que têm mostrado efetividade para o tratamento da DA. Os fármacos aprovados, rivastigmina (Exelon®), galantamina (Reminil®), tacrina (Cognex®) e donepezila (Aricept®), retardam a degradação do neurotransmissor acetilcolina, atenuando a deterioração cognitiva durante os primeiros estágios da doença. Memantina (Namenda®) é o único fármaco que tem mostrado efetividade em estágios tardios da doença, e atua na via glutamatérgica como antagonista não-competitivo do receptor N-metil-D-aspartato (KUMAR et al., 2015). Esses fármacos têm eficácia terapêutica limitada, e pouca tolerabilidade a longo prazo devido à baixa biodisponibilidade, elevada hepatotoxicidade e pouca seletividade (AGATONOVIC-KUSTRIN et al., 2018).

Os dados de revisão da literatura dos últimos anos mostram que as pesquisas relacionadas com DA estão sendo direcionadas ao estudo de terapias ou de novos fármacos, que visam atuar nos fatores etiopatogênicos em comum (múltiplos alvos) da doença (KUMAR et al., 2015; NG et al., 2015; DÉNESA et al., 2018; CORTES et al., 2019). Pesquisas com produtos de origem natural têm mostrado resultados promissores, mas não tão efetivos quanto os tratamentos convencionais, particularmente quando comparados com a galantamina (KUMAR et al., 2015).

Este trabalho de pesquisa, em conjunto com outros estudos, apresenta evidências preliminares da baixa citotoxicidade em diferentes modelos celulares (utilizando

macrófagos murinos, além de células do sangue periférico, neuroblastoma humano SH-SY5Y, hepatocarcinoma HepG2, entre outras); da atividade anticancerígena, do potencial neuroprotetor; anti-inflamatório; e da capacidade de inibição da acetilcolinesterase, de extratos ou frações alcaloídicas de Amaryllidaceae (CORTES; POSADA; et al., 2015; CASTILLO et al., 2018; CORTES et al., 2018; CORTES et al., 2019; TRUJILLO-CHACÓN et al., 2019).

O relatório sobre medicina tradicional e complementar (MTC), publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), assinalou que as práticas em MTC são recursos importantes - muitas vezes subestimadas - e úteis na prevenção e tratamento de doenças crônicas relacionadas com o estilo de vida, e que devem atender as necessidades de populações em envelhecimento (WHO, 2019).

O mercado de fitoterápicos tem mostrado crescimento contínuo a nível mundial. A estimativa é que alcance valores próximos aos cinco trilhões de dólares em 2050, com taxas de crescimento de 15 a 25% por ano (CHANDRA e SHARMA, 2018). O relatório da OMS mostrou que houve um aumento no número de países que estabeleceram uma política nacional sobre MTC, passando de 25 a 98 países entre 1999 e 2018 (WHO, 2019). Para o Brasil, os dados do mercado de fitoterápicos apontaram valores próximos aos quatrocentos milhões de dólares em 2018, com taxas de crescimento de 12% por ano (CARVALHO et al., 2018).

HASENCLEVER et al. (2017) descreveram que indústria de plantas medicinais e de fitoterápicos pode representar uma excelente alternativa para assegurar o acesso a medicamentos seguros, eficazes, de qualidade e a preços acessíveis para a população brasileira. Os autores consideraram que é uma importante fonte de inovação em saúde, que pode fortalecer a produção e a inovação com base na exploração da biodiversidade brasileira, além de representar a possibilidade de ampliação de opções terapêuticas ofertadas aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), na perspectiva de melhoria da atenção à saúde e de inclusão social (HASENCLEVER et al., 2017).

Considerando a legislação brasileira em MTC, em 2006 foi aprovada Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF) (BRASIL, 2006b) e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS, abrangendo a fitoterapia, homeopatia, acupuntura e termalismo social (BRASIL, 2006a). Ambas as políticas apresentam em suas diretrizes o incentivo à pesquisa e ao desenvolvimento de

plantas medicinais e fitoterápicos, priorizando a biodiversidade do País, valorizando e reconhecendo este recurso como alternativa terapêutica para a população brasileira.

Contudo, entre 2009 e 2015 houve uma redução de quase 72 % do número de registros de medicamentos fitoterápicos no Brasil, passando de 712 a 212 o número de registros (HASENCLEVER et al., 2017). CARVALHO et al. (2018) mostraram que, quanto ao registro de medicamentos fitoterápicos (MF), houve uma redução significativa no número de registros entre 2008 e 2016: 41 em 2008, 24 em 2009, 37 em 2010, 19 em 2011, 24 em 2012, 31 em 2013, 13 em 2014, 1 em 2015 e 2 em 2016. Por outro lado, os dados mostrados por FRANÇA e GUIMARÃES-VASCONCELLOS (2018) revelaram que, quanto ao pedido de patentes nas classificações A61K36 ou A61K35/78, que abrangem o campo tecnológico dos fitoterápicos, houve um aumento entre 2009 e 2016, passando de 61 a 207 solicitações. No entanto, esse valor caiu drasticamente a 63 pedidos de patentes até julho 2017. Essas tendências, traduzidas em reduções significativas nos registros de produtos fitoterápicos e depósito de patentes, podem ser devidas a fatores associados aos entraves burocráticos e às mudanças na legislação brasileira (HASENCLEVER et al., 2017; FRANÇA e GUIMARÃES-VASCONCELLOS, 2018).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define, na RDC n.º 26/2014, art. 2º, §§ 1º e 2º (BRASIL, 2014); as duas categorias que abrangem o termo fitoterápico:

§1º São considerados medicamentos fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade.

§2º São considerados produtos tradicionais fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e efetividade sejam baseadas em dados de uso seguro e efetivo publicados na literatura técnico-científica e que sejam concebidos para serem utilizados sem a vigilância de um médico para fins de diagnóstico, de prescrição ou de monitorização.

As evidências mostradas na literatura, sobre atividades biológicas de extratos de Amaryllidaceae brasileiras, não são suficientes para demonstrar sua segurança e eficácia.

Ainda, as pesquisas não mostram resultados de estudos clínicos. Assim, este trabalho contribui com o estudo das atividades biológicas *in vitro* de extratos de Amaryllidaceae e apresenta novas evidências do seu potencial inibidor da acetilcolinesterase, anti-inflamatório e neuroprotetor. O desafio para os investigadores de plantas medicinais da família Amaryllidaceae, é focar em estudos *in vitro* e *in vivo* que correlacionem os efeitos dos extratos alcaloídicos nos fatores etiopatogênicos da DA. Os resultados desses trabalhos de pesquisa são de grande importância para mostrar à comunidade científica e às indústrias farmacêuticas, o potencial desses extratos como alvos de estudos clínicos voltados à obtenção de um medicamento fitoterápico, útil para o tratamento de doenças neurodegenerativas como a DA.

## 6 CONCLUSÕES

No extrato de etanólico de *Crinum latifolium* foram identificados quatro alcaloides de tipo licorina (licorina, anidrolícorina, 11,12-desidroanidrolícorina e hipadina), quatro com núcleo estrutural do tipo haemantamina (haemantamina, 11-oxohaemantamina, 11-hidroxitatina e crinamina), dois pertencentes ao grupo da narciclasina (triseridina e 5,6-diidrobiclorina), e dois alcaloides com estruturas diversas (ismina e N-desmetilismina). No extrato etanólico de *Hippeastrum psittacinum* foram identificados dois alcaloides de tipo licorina (licorina e 11,12-desidrolícoreno), dois de tipo homolícorina (homolícorina e albomaculina), um com núcleo estrutural do tipo haemantamina (desacetilcantabricina), um do tipo galantamina (licoramina) e dois do tipo tazetina (tazetina e pretazetina). *Hippeastrum* sp. apresentou alcaloides de tipo tazetina (tazetina, pretazetina e 3-epimacronina), narciclasina (triseridina e 5,6-diidrobiclorina), e dois alcaloides com estruturas diversas (ismina e galantindol). Licorina e haemantamina foram os únicos alcaloides identificados no extrato etanólico de *Hippeastrum goianum*.

Este é o primeiro relato da presença de anidrolícorina, 11,12-desidroanidrolícorina, 11-oxohaemantamina, 11-hidroxitatina, triseridina, ismina, N-desmetilismina e 5,6-diidrobiclorina, em *C. latifolium*; o primeiro relato da presença de homolícorina, albomaculina, 11,12-desidrolícoreno e desacetilcantabricina em *H. psittacinum*; e o primeiro relato da presença de homolícorina em *H. goianum*.

Os extratos etanólicos de bulbos de *Hymenocallis litorallis*, *Hippeastrum psittacinum*, *Habranthus irwinianus*, *Crinum latifolium*, *Hippeastrum* sp. e *Hippeastrum goianum* foram testados quanto à sua atividade citotóxica em células de macrófagos murinos. *Crinum latifolium* e *Hippeastrum psittacinum* foram menos citotóxicos em células RAW 264.7, mantendo viabilidade celular acima de 70% em concentrações menores a 25 µg/mL. Ainda, *C. latifolium* protegeu as células do estímulo citotóxico do lipopolissacarídeo (LPS) de forma dose-dependente. As menores concentrações do extrato (12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL) diminuíram significativamente os níveis de óxido nítrico no meio de cultura. O efeito protetor ao LPS foi ainda maior para *H. psittacinum*, mantendo a concentração de óxido nítrico próxima ao grupo controle negativo.

Os testes de citotoxicidade em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y mostraram que *C. latifolium* teve baixa citotoxicidade em concentrações menores a 12,5 µg/mL. O extrato

não protegeu as células do dano oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio. *H. psittacinum* apresentou baixa citotoxicidade em concentrações menores a 25 µg/mL e protegeu as células do estresse oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio. Este é o primeiro relato do efeito neuroprotetor de extratos obtidos de bulbos de *H. psittacinum*.

Os extratos etanólicos de *C. latifolium* e *H. psittacinum* são seguros para as células de neuroblastoma humano em concentrações menores a 12,5 µg/mL e 25 µg/mL, respectivamente. A toxicidade em concentrações maiores não gera quebras na fita dupla do ADN, porém, é devida à segregação cromossômica anormal que induz a produção de fragmentos cromossômicos.

Os testes de citotoxicidade em células de hepatocarcinoma humano HepG2 mostraram que a citotoxicidade dos extratos aumenta de forma dose-dependente com o aumento da concentração (3,2 a 100 µg/mL), até as 24 horas de tratamento com o extrato. Em concentrações menores a 25 µg/mL foram mantidos valores de viabilidade celular superiores a 70%.

Os extratos etanólicos de *C. latifolium* e *H. psittacinum* mostraram o maior teor alcaloídico e a maior atividade anticolinesterase dentre o grupo de plantas estudadas. A atividade inibitória da acetilcolinesterase parece ser devida ao efeito sinérgico dos metabólitos secundários presentes no extrato.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HALIM, O. B. et al. New Crinine-type alkaloids with inhibitory effect on induction of inducible nitric oxide synthase from *Crinum yemense*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 7, p. 1119-1124, 2004.

ACOSTA, D. **La enfermedad de Alzheimer, diagnóstico y tratamiento: una perspectiva latinoamericana**. México: Editorial Médica Panamericana, 2011. 132 ISBN 6077743194.

ADEKANMI, E.; FOUCHE, G.; STEENKAMP, V. Cytotoxicity and acetylcholinesterase inhibitory activity of an isolated crinine alkaloid from *Boophane disticha* (Amaryllidaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 572-578, 2012.

ADEWUSI, E. A.; STEENKAMP, V. Medicinal plants and their derivatives with amyloid beta inhibitory activity as potential targets for drug discovery. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 6, p. 430-440, 2015.

AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; KETTLE, C.; MORTON, D. W. A molecular approach in drug development for Alzheimer's disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 553-565, 2018.

AHMED, M. K. et al. Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test. **Chemosphere**, v. 84, n. 1, p. 143-149, 2011.

ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007.

AMARAL, A. C. **Amaryllidaceae Jaume St.-Hil.: levantamento das espécies do Distrito Federal, Brasil, e estudos de multiplicação *in vitro***. 2007. 115 (Mestre). Departamento de Botânica, Universidade de Brasília, Brasília DF.

ANAND, P.; SINGH, B.; SINGH, N. A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 20, n. 3, p. 1175-1180, 2012.

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

ANDRADE, J. P. et al. The Brazilian Amaryllidaceae as a source of acetylcholinesterase inhibitory alkaloids. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 1, p. 1-14, 2016.

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

ATANASOVA, M. et al. Galantamine derivatives with indole moiety: docking, design, synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 23, n. 17, p. 5382-5389, 2015.

AZIZ, A. et al. Evaluation of *in vitro* anthelmintic activity, total phenolic content and cytotoxic activity of *Crinum latifolium* L. (family: Amaryllidaceae). **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, n. 1, p. 15-19, 2014.

BAILEY, J. D. et al. Nitric oxide modulates metabolic remodeling in Inflammatory macrophages through TCA cycle Regulation and itaconate accumulation. **Cell Reports**, v. 28, n. 1, p. 218-230, 2019.

BARBOSA, M. C. et al. Synthesis and evaluation of the mutagenicity of 3-alkylpyridine marine alkaloid analogues with anticancer potential. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 825, p. 31-39, 2018.

BETZEL-BESSA, C. D. P. Estudo químico e biológico em alcaloides de *Hippeastrum aulicum* (KER GAWL.) HERB.: uma espécie da família Amaryllidaceae. 2016. 120

(Master). Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo.

**BRASIL. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Série B. Textos Básicos de Saúde.** Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica.: 1-60 p. 2006a.

\_\_\_\_\_. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. Cadernos de Saúde Pública.** Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica: 1-92 p. 2006b.

\_\_\_\_\_. **Resolução – RDC No- 26, de 13 de maio de 2014.** AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Brasília DF. 2014.

\_\_\_\_\_. **Consulta a medicamentos e hemoderivados.** Brasília: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária 112363352 2017.

CARVALHO, A. C. B. et al. The Brazilian market of herbal medicinal products and the impacts of the new legislation on traditional medicines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 212, p. 29-35, 2018.

CARVALHO, K. et al. Cytotoxic Alkaloids from *Hippeastrum solandriiflorum* Lindl. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 10, p. 1976-1980, 2015.

CASTILLO-ORDOÑEZ, W. O. **Avaliação dos efeitos neuroprotetores do extrato etanólico de *Caliphurria subedentata* e o fármaco galantamina em células indiferenciadas SH-SY5Y expostas ao peptídeo beta-amiloide(1-42).** 2016. 109 (Doutorado). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto (SP).

CASTILLO, W. O. et al. Galanthamine decreases genotoxicity and cell death induced by  $\beta$ -amyloid peptide in SH-SY5Y cell line. **NeuroToxicology**, v. 57, p. 291-297, 2016.

CASTILLO, W. O. et al. *Caliphurria subedentata* (Amaryllidaceae) decreases genotoxicity and cell death induced by  $\beta$ -amyloid peptide in SH-SY5Y cell line. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 836, p. 54-61, 2018.

CEDRÓN, J. et al. Chemistry and Biology of *Pancreatum* Alkaloids. In: KNÖLKER, H. J. (Ed.). **The Alkaloids: Chemistry and Biology**: Elsevier, v.68, 2010. cap. 1, p.1-37. ISBN 1099-4831.

CETINKAYA, N. et al. Quantification of applied dose in irradiated citrus fruits by DNA comet assay together with image analysis. **Food Chemistry**, v. 192, p. 370-373, 2016.

CHANDRA, P.; SHARMA, V. Marketing information system and strategies for sustainable and competitive medicinal and aromatic plants trade. **Information Development**, v. 1, p. 1-13, 2018.

CHEN, M.-X. et al. Amaryllidaceae alkaloids from *Crinum latifolium* with cytotoxic, antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities. **Fitoterapia**, v. 130, p. 48-53, 2018.

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.

CORTES, N. et al. Amaryllidaceae alkaloids as agents with protective effects against oxidative neural cell injury. **Life Sciences**, v. 203, p. 54-65, 2018.

CORTES, N. et al. Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five Amaryllidaceae species: a comparative study. **Life Sciences**, v. 122, p. 42-50, 2015.

CORTES, N. et al. Neuroprotection and improvement of the histopathological and behavioral impairments in a murine Alzheimer's model treated with *Zephyranthes carinata* alkaloids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 110, p. 482-492, 2019.

COSTA, A. S. **Neurotransmissores e drogas: alterações e implicações clínicas**. 2015. 57 (Mestrado). Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto.

COSTA, G. G. et al. Influence of *in vitro* micropropagation on lycorine biosynthesis and anticholinesterase activity in *Hippeastrum goianum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 2, p. 262-265, 2019.

DÉNESA, Z. et al. Alzheimer's disease: recent concepts on the relation of mitochondrial disturbances, excitotoxicity, neuroinflammation, and kynurenines. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2, n. 62, p. 523-547, 2018.

DEWAN, S. M.; DAS, A. Investigation of *in vitro* thrombolytic potential and phytochemical nature of *Crinum latifolium* L. leaves growing in coastal region of Bangladesh. **International Journal of Biological & Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2013.

DIETRICH-ROSA, M. **Avaliação da atividade anti-*Acanthamoeba castellanii* de frações alcaloídicas de diferentes espécies da família Amaryllidaceae e da licorina**. 2017. 1-76 (Mestrado). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES.

DRACZKOWSKI, P. et al. Determination of affinity and efficacy of acetylcholinesterase inhibitors using isothermal titration calorimetry. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1860, n. 5, p. 967-974, 2016.

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

FAHANIK-BABAEI, J. et al. Trigonelline protects hippocampus against intracerebral A $\beta$ (1-40) as a model of Alzheimer's disease in the rat: insights into underlying mechanisms. **Metabolic Brain Disease**, v. 34, n. 1, p. 191-201, 2019.

FAWOLE, O. A. et al. Anti-inflammatory, anticholinesterase, antioxidant and phytochemical properties of medicinal plants used for pain-related ailments in South Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 235-241, 2010.

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

FORSTER, J. I. et al. Characterization of differentiated SH-SY5Y as neuronal screening model reveals increased oxidative vulnerability. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 21, n. 5, p. 496-509, 2016.

FRANÇA, E.; GUIMARÃES-VASCONCELLOS, A. Patentes de fitoterápicos no Brasil: uma análise do andamento dos pedidos no período de 1995-2017. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 35, n. 4, p. 329-359, 2018.

GHANE, S. G. et al. Antioxidant, anti-diabetic, acetylcholinesterase inhibitory potential and estimation of alkaloids (Lycorine and Galanthamine) from *Crinum* species: An important source of anticancer and anti-Alzheimer drug. **Industrial Crops and Products**, v. 125, n. 1, p. 168-177, 2018.

GHOSAL, S.; RAO, P. H.; SAINI, K. S. Natural occurrence of 11-O-Acetylbambelline and 11-O-Acetyl-1,2- $\beta$ -epoxybambelline in *Crinum latifolium*: Immuno-regulant alkaloids. **Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 5, p. 251-252, 1985.

GHOSAL, S.; SAINI, K. S.; FRAHM, A. W. Alkaloids of *Crinum latifolium*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 10, p. 2305-2309, 1983.

GHOSAL, S.; UNNIKRISHNAN, S.; SINGH, S. K. Occurrence of two epimeric alkaloids and metabolism compared with lycorine in *Crinum latifolium*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 9, p. 2535-2537, 1989.

GIORDANI, R. B. et al. Alkaloids from *Hippeastrum morelianum* Lem. (Amaryllidaceae). **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 668-672, 2011.

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

GOMATHI, R.; MANIAN, S. Analgesic and acetylcholinesterase inhibition potential of polyphenols from *Scolopia crenata* (Flacourtiaceae): an endemic medicinal plant of India. **Industrial Crops and Products**, v. 73, p. 134-143, 2015.

GREEN, L. C. et al. Nitrate biosynthesis in man. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 12, p. 7764-7768, 1981.

GUO, Y. et al. New alkaloids from *Hippeastrum papilio* (Ravenna) Van Scheepen. **Helvetica Chimica Acta**, v. 99, n. 2, p. 143-147, 2016.

HABARTOVÁ, K. et al. The biological activity of alkaloids from the Amaryllidaceae: from cholinesterases inhibition to anticancer activity. **Natural Product Communications**, v. 11, n. 10, p. 1587-1594, 2016.

HANH, T. T. H. et al. Crinane, augustamine, and  $\beta$ -carboline alkaloids from *Crinum latifolium*. **Phytochemistry Letters**, v. 24, p. 27-30, 2018.

HASENCLEVER, L. et al. The Brazilian phytotherapies industry: challenges and opportunities. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 8, p. 2559-2569, 2017.

HOFMANN, J. et al. Avaliação da atividade antiviral e determinação do perfil cromatográfico de *Hippeastrum glaucescens* (Martius) Herbert (Amaryllidaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 7-14, 2004.

JBRJ. Flora do Brasil 2020. Rio de Janeiro, 05/07/2019 Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>.

JEFFS, P. W. et al. Structures of 9-O-demethylhomolycorine and 5- $\alpha$ -hydroxyhomolycorine. Alkaloids of *Crinum defixum*, *C. scabrum*, and *C. latifolium*. Assignment of aromatic substitution patterns from <sup>1</sup>H-coupled carbon-13 spectra. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 50, n. 10, p. 1732-1737, 1985.

JENNY, M. et al. *Crinum Latifolium* leave extracts suppress immune activation cascades in peripheral blood mononuclear cells and proliferation of prostate tumor cells. **Scientia Pharmaceutica**, v. 79, n. 2, p. 323-335, 2011.

JIN, A. et al. Four new compounds from the bulbs of *Lycoris aurea* with neuroprotective effects against CoCl<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced SH-SY5Y cell injuries. **Archives of Pharmacol Research**, v. 37, n. 3, p. 315-323, 2014.

JIVAD, N.; RABIEI, Z. A review study on medicinal plants used in the treatment of learning and memory impairments. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 10, p. 780-789, 2014.

KANG, J. et al. Lycorine inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 up-regulation in RAW 264.7 cells through suppressing P38 and STATs activation and increases the survival rate of mice after LPS challenge. **International Immunopharmacology**, v. 12, n. 1, p. 249-256, 2012.

KAUR, A.; KAMBOJ, S. S.; SINGH, J. Isolation of a New Lectin from the Bulbs of *Crinum latifolium* (L.). **Biological Sci**, v. 6, p. 9-14, 2006.

KNASMÜLLER, S. et al. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 402, n. 1, p. 185-202, 1998.

KOBAYASHI, S. et al. Alkaloidal Constituents of *Crinum latifolium* and *Crinum bulbispermum* (Amaryllidaceae). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 8, p. 3015-3022, 1984.

KONRATH, E. L. et al. Investigation of the *in vitro* and *ex vivo* acetylcholinesterase and antioxidant activities of traditionally used *Lycopodium* species from South America on alkaloid extracts **Journal of ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 58-67, 2012.

KOVALEVICH, J.; LANGFORD, D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. In: AMINI, S. e WHITE, M. K. (Ed.). **Neuronal Cell Culture: Methods and Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. p.9-21. ISBN 978-1-62703-640-5.

KUMAR, A.; SINGH, A.; EKAVALI. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 2, p. 195-203, 2015.

KWON, S.-H. et al. 3',4',7-Trihydroxyflavone prevents apoptotic cell death in neuronal cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**, v. 80, p. 41-51, 2015.

LI, X. et al. Neuroprotective compounds from the bulbs of *Lycoris radiata*. **Fitoterapia**, v. 88, p. 82-90, 2013.

LIU, W.-Y. et al. Lycorine induces mitochondria-dependent apoptosis in hepatoblastoma hepG2 cells through ROCK1 Activation. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 1-11, 2019.

LOČÁREK, M. et al. Antifungal and antibacterial activity of extracts and alkaloids of selected Amaryllidaceae species. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 9, p. 1537-1540, 2015.

MANI, V. et al. Protective effects of total alkaloidal extract from *Murraya koenigii* leaves on experimentally induced dementia. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 3, p. 1036-1044, 2012.

MERA-LÓPEZ, M. H. **Potencial de inibição de enzimas de interesse farmacêutico por espécies de Amaryllidaceae**. 2018. 105 (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, Brasília DF.

MIRANDA, C. **Contribuição à quimiotaxonomia de Anacardiaceae - estudo fitoquímico e das atividades antifúngicas e antitumorais de *Astronium fraxinifolium* Schott ocorrente no Cerrado**. 2014. 109 (Mestre). Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade de Brasília, Brasília.

MORAGA-NICOLÁS, F. et al. *Rhodolirium andicola*: a new renewable source of alkaloids with acetylcholinesterase inhibitory activity, a study from nature to molecular docking. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 1, p. 34-43, 2018.

MORILLAS-RUIZ, J. M.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, P. Oxidative Stress and Antioxidant Defenses Induced by Physical Exercise. In: SIVAKUMAR-GOWDER, J. T. (Ed.). **Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress**. Croatia: IntechOpen, v.1, 2015. cap. 8, p.221-236. ISBN 978-953-51-2200-5.

NAIR, J. J. et al. Mechanistic insights to the cytotoxicity of Amaryllidaceae alkaloids. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 1, p. 171-182, 2015.

NAIR, J. J.; VAN STADEN, J.; BASTIDA, J. Apoptosis-inducing effects of Amaryllidaceae alkaloids. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 2, p. 161-185, 2016.

NAM, N.-H. et al. New constituents from *Crinum latifolium* with inhibitory effects against tube-like formation of human umbilical venous endothelial cells. **Natural Product Research**, v. 18, n. 6, p. 485-491, 2004.

NAM, N.; JAE, Y. NF- $\kappa$ B Inhibitory activities of the methanol extracts and some constituents therein of some Vietnamese medicinal plants. **Scientia Pharmaceutica**, v. 77, n. 2, p. 389-400, 2009.

NG, Y. P.; OR, T. C.; IP, N. Y. Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. **Neurochemistry International**, v. 89, p. 260-270, 2015.

NGUYEN, H.-Y. T. et al. Extracts of *Crinum latifolium* inhibit the cell viability of mouse lymphoma cell line EL<sub>4</sub> and induce activation of anti-tumour activity of macrophages in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 1, p. 75-83, 2013.

OLIVEIRA, M. D. F. **Doença de Alzheimer: perfil neuropsicológico e tratamento** 2005. (Licenciatura). Departamento de Psicologia, Universidade Lusíada do Porto, Porto.

OSORIO, E. **Búsqueda de sustancias bioactivas a partir de dos especies de la flora colombiana: alcaloides de *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae) y biflavonoides de *Garcinia madruno* (Clusiaceae)**. 2008. 217 (Doutorado). Departamento de Productos Naturales, Biología Vegetal y Edafología, Universidad de Barcelona, Barcelona.

PALIT, P.; MANDAL, S. C.; BHUNIA, B. Total steroid and terpenoid enriched fraction from *Euphorbia neriifolia* Linn offers protection against nociceptive-pain, inflammation, and in vitro arthritis model: An insight of mechanistic study. **International Immunopharmacology**, v. 41, p. 106-115, 2016.

PRINCE, M. et al. **World Alzheimer report 2015: the global impact of dementia**. London, p.87. 2015

RAHMAN, M. A. et al. Screenings of antimicrobial, cytotoxic and anti-inflammatory potentials of crude methanolic extracts of *Crinum latifolium* (Leaves). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 1, p. 649-655, 2016.

RASHEED, Z. et al. Protective potential of thymoquinone against peroxynitrite induced modifications in histone H2A: *in vitro* studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 169-174, 2018.

REFAAT, J. et al. *Crinum*; an Endless Source of bioactive principles: a review, part II. *Crinum* alkaloids: crinine-type alkaloids. **International Journal**, v. 3, n. 9, p. 3091-3100, 2012.

SCHNEIDER, L. et al. Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 11, p. 2007-2017, 2011.

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

SHALGUM, A. et al. Neuroprotective effects of *Hibiscus Sabdariffa* against hydrogen peroxide-induced toxicity. **Journal of Herbal Medicine**, p. 100253, 2018.

SHAWKY, E. et al. In vitro cytotoxicity of some Narcissus plants extracts. **Natural Product Research**, v. 29, n. 4, p. 363-365, 2015.

SHEN, C. Y. et al. Identification of narciclasine from *Lycoris radiata* (L'Her.) Herb. and its inhibitory effect on LPS-induced inflammatory responses in macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, v. 125, p. 605-613, 2019.

SIKARWAR, R.; PATHAK, B.; JAISWAL, A. Some unique ethnomedicinal perceptions of tribal communities of Chitrakoot, Madhya Pradesh. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, v. 74, n. 7, p. 613-617, 2008.

SILVA, A. F. 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, C. V.; BORGES, F. M.; VELOZO, E. S. Phytochemistry of some Brazilian Plants with Aphrodisiac Activity. In: RAO, V. (Ed.). **Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**: IntechOpen, 2012. p.307-326. ISBN 978-953-51-0296-0.

SOUZA-ALVES, T. J. **Efeito do tamanho das nanopartículas de prata na indução de danos citotóxicos e genotóxicos nas linhagens celulares CHO-K1 e CHO-XRS5.** 2013. 78 (Mestrado). Faculdade de medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto (SP).

TALLINI, L. R. et al. N-oxide alkaloids from *Crinum amabile* (Amaryllidaceae). **Molecules**, v. 23, n. 6, p. 1277, 2018.

TEOTÔNIO, I. M. **Efeitos anti-inflamatórios de espécies de *Pouteria* spp. sobre macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados com LPS.** 2016. 93 (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, Brasília.

THE PLANT LIST. The Plant List (2013) Version 1.1. 05/07/2019 Disponível em: <http://www.theplantlist.org/>.

TOMODA, M. et al. Isolation and structural features of two glucans from the rhizomes of *Crinum latifolium*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 1, p. 16-21, 1985.

TORRAS-CLAVERIA, L. et al. Daffodils as potential crops of galanthamine. Assessment of more than 100 ornamental varieties for their alkaloid content and acetylcholinesterase inhibitory activity. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 237-244, 2013.

TORRAS CLAVERIA, L. et al. Research in natural products: Amaryllidaceae ornamental plants as sources of bioactive compounds. In: TORRERO, D. M., RIU M. & FELIU C. (Ed.). **Recent Advances in Pharmaceutical Sciences** Research Signpost, v.2, 2017. cap. 5, p.69-82. ISBN 978-81-308-0573-3.

TRAM, N. G. et al. Retarded growth of chemically induced with 20-methylcholanthrene tumours in rats under the action of cold-hot aqueous extracts (decoctions) from Vietnamese plant *Crinum latifolium* (L.). **Experimental Pathology and Parasitology**, v. 4, n. 7, 2001.

TRAM NGUYEN, N. T. et al. GC-MS Of *Crinum Latifolium* L. Alkaloids. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 57, n. 3-4, p. 239, 2002.

TRAM, N. T. et al. Volatiles from *Crinum latifolium*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, n. 3, p. 195-197, 2003.

TRAM, N. T. et al. A novel *in vitro* and *in vivo* T-lymphocyte activating factor in *Crinum latifolium* (L.) aqueous extracts. **Experimental Pathology and Parasitology**, v. 3, p. 21-26, 1999.

TRUJILLO-CHACÓN, L. M. et al. Neuroprotective activity of isoquinoline alkaloids from of Chilean Amaryllidaceae plants against oxidative stress-induced cytotoxicity on human neuroblastoma SH-SY5Y cells and mouse hippocampal slice culture. **Food and Chemical Toxicology**, v. 132, p. 11-11, 2019.

VERDANA, M. H. et al. Alkaloids from *Hippeastrum goianum* (Amarillidaceae). Brazilian Conference on Natural Products, 2017, Vitória ES. BCNP. p.1.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Second. New York: Springer Science & Business Media, 1996. 368 ISBN 3540586768.

WHO. **WHO global report on traditional and complementary medicine 2019**. World Health Organization. Geneva, p.1-228. 2019

WORTMANN, M. Dementia: a global health priority-highlights from an ADI and World Health Organization report. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 4, n. 5, p. 1-3, 2012.

YAMAZAKI, Y.; KAWANO, Y. Inhibitory effects of herbal alkaloids on the tumor necrosis factor- $\alpha$ ; and nitric oxide production in Lipopolysaccharide-stimulated RAW 264 macrophages. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, n. 3, p. 388-391, 2011.

YUN, Y. S. et al. Two alkaloids from bulbs of *Lycoris sanguinea* Maxim. suppress PEPCCK expression by inhibiting the phosphorylation of CREB. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 10, p. 1689-1695, 2016.

ZHANG, X. et al. Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Crinum* by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, n. 18, p. 2903-2916, 2009.

ZVETKOVA, E. et al. Aqueous extracts of *Crinum latifolium* (L.) and *Camellia sinensis* show immunomodulatory properties in human peripheral blood mononuclear cells. **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 12, p. 2143-2150, 2001.