## Universidade Estadual de Campinas Instituto de Química Departamento de Química Orgânica



#### TESE DE DOUTORADO

# Alcalóides de Plantas da Família Amaryllidaceae: Isolamento Caracterização e Testes de Inibição de Acetilcolinesterase.

Tese apresentada à Universidade Estadual de Campinas, como parte das exigências do curso de pós-graduação do Instituto de Química, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Maria do Socorro Sousa da Silva Orientadora: Profa. Dra. Raquel Marques Braga

> Campinas – SP 12 de Março de 2009

## FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

Si38a

Silva, Maria do Socorro Sousa da.

Alcalóides de plantas da família *Amaryllidaceae*: isolamento, caracterização e testes de inibição de acetilcolinesterase / Maria do Socorro Sousa da Silva. -- Campinas, SP: [s.n], 2009.

Orientadora: Raquel Marques Braga.

Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

- 1. Amaryllidaceae. 2. Amacrinum. 3. Alcalóides.
- 4. Acetilcolinesterase. I. Braga, Raquel Marques.
- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

**Título em inglês:** Alkaloids from plants of *Amaryllidac*eae family: isolation, characterization and determination of acetylcholinesterase inhibition

Palavras-chaves em inglês: Amaryllidaceae, Amacrinum, Alkaloids, Acetylcholinesterase

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Profa. Dra. Raquel Marques Braga (orientadora), Profa. Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó (DQ -UFPI), Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva (DQ-UFSCar), Prof. Dr. Paulo Mitsuo Imamura (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli (IQ-UNICAMP)

**Data de defesa: 12/03/2009** 

Aos meus pais (Maria das Graças e Antonio)
pelo amor e todo o incentivo aos meus estudos.

Aos meus irmãos (Reginalva, Sidney e Marcos)

pelo constante apoio, compreensão e amor.

Agradeço...

À Profa. Raquel, pela orientação, compreensão e disponibilidade.

Aos Profs. Paulo Imamura, Anita, Graça e Fátima por aceitarem julgar este trabalho.

À Profa. Graça Citó, em especial, pela primeira oportunidade de trabalhar com PN, e aos demais professores da UFPI, pela amizade e aprendizagem.

À Georgina, irmã de coração, sempre companheira e amiga para todas as horas.

Ao meu namorado Sidney pelo amor, carinho e compreensão e a sua família por me acolher com tanto carinho.

Aos amigos de com quem morei em Campinas: Georgiana, Alex, Sergio Antonio, Elidiane e Diana, pela boa convivência.

Aos amigos: Sergio Henrique, Charllyton, Edgar, Fátima, Hilris, Jairelda, Mariane, e Saul, que mesmo a distância sempre torceram por mim.

Aos amigos de UNICAMP: Adriana Pianaro, Adriana Schioser, Alex, Aloizio (Virgu), Bruna, Carla Porto, Eduardo, Eva, Fernanda, Fernando Cabeça, Júlio, Lucas, Márcio, Sergio Antonio, Simone e Rita.

Aos amigos da colônia piauienses e companheiros de UNICAMP: Alessandra, Clécio, Diana, Elidiane, Herbert, Irlany, Márcia, João Paulo, Juliana, Reginaldo e Samuel.

Ao casal Sidney e Leonilda bela boa acolhida e pela amizade.

À Isabel, amiga baiana, sempre disponível a ajudar.

Aos alunos de IC ou estágio do nosso lab: Ariana, Caroline, Karina, Laila, Natália, Paula, Ricardo, Rafaela, Tássia, Viviane e Will.

À professora Anita, por disponibilizar o FLASHScan para os testes de inibição enzimática e pelos experimentos de RMN.

À Simone por me ensinar a utilizar o FLASHScan e ao Lucas por realizar os experimentos de RMN.

A toda equipe do RMN que foram fundamentais para a execução desse trabalho.

Ao pessoal do almoxarifado, sempre alegres e prestativos.

À Bel e toda a equipe da CPG, sempre dispostos a ajudar na parte burocrática.

A todos os funcionários do IQ/UNICAMP que direta ou indiretamente colaboram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida e a FAPESP por financiar parte da execução deste trabalho

#### **CURRICULUM VITAE**

#### 1. DADOS PESSOSAIS

Nome: Maria do Socorro Sousa da Silva Nascimento: 23/03/1976, Caxias - MA

## 2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2005 - 2009: Doutorado em Química.

 Alcalóides de Plantas da Família Amaryllidaceae: Isolamento, Caracterização e Testes de Inibição de Acetilcolinesterase.

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas - SPI.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Marques Braga.

Bolsista: CNPq.

#### 2002 - 2004: Mestrado em Química.

Constituintes Químicos de Própolis de Teresina - PI.

Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina - PI.

Orientadora: Antônia Maria das Graças Lopes Citó

Bolsista: CAPES.

#### 1996 - 2001: Graduação em Licenciatura Plena em Química.

Universidade Federal do Piauí (UFPI).

#### 3. EXPERIÊNCIAS PROFISSIONAIS

Centro de Ensino Santos Dumont – Caxias/MA

Professor Efetivo (2004)

Disciplina: Química I e Química II

Universidade Estadual do Piauí

Professor (2004)

Disciplina: Química Orgânica III (90 horas).

Universidade Estadual do Piauí

Iniciação Científica (2000-2001)

Projeto: Estudos de Novos Constituintes Químicos de Própolis Produzida na

Cidade de Teresina.

Iniciação Científica (1997-1999)

Projeto: Estudo Químico de Óleos Essenciais de Plantas do Cerrado Piauiense.

## 6. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

#### 6.1. Artigo científico

Sousa, M. S. S.; Citó, A. M. G. L.; Chaves, M. H.; Lopes, J. A. D. **Triterpenóides tipo** cicloartano de própolis de Teresina - Pl. *Química Nova*, **2005**, 28, 801-804.

Sousa, M. S. S.; De Lima, S. G.; Oliveira, E. H.; Lopes, J. A. D.; Chaves, M. H.; Reis, F. A. M.; Citó, A. M. G. L. Anacardic acid derivatives from brazilian propolis and their antibacterial activity. *Eclética Química*, 2008, 33, 53-58.

#### 6.2. Trabalhos apresentados em congressos

21 trabalhos apresentados de 1998-2008, dos quais os apresentados durante o doutorado foram:

Silva, M. S. S.; Braga, R. M. Estudo fitoquímico de *Amacrinum* e *Ismene festalis*. Il congresso de fitoterápicos do Mercosul e VI Reunião da Sociedade latino-americana de Fitoquímica, 2008, Belo Horizonte - MG.

Silva, M. S. S.; Braga, R. M., Carvalho, T. C. C. Estudo de três variedades de Hippeastrum (Amaryllidaceae) por GC-MS e avaliação da inibição a acetilcolinesterase. 31ª. Reunião da SBQ, 2008, Águas de Lindóia - SP.

**Silva, M. S. S.**; Braga, R. M. **Alcalóides de Amacrinum (Amaryllidaceae).** 30ª. Reunião da SBQ, **2007**, Águas de Lindóia – SP.

Silva, M. S. S.; Lorenzetti, L. J., Braga, R. M. Alcalóides de Ismene festalis (Amaryllidaceae). VI Symposium on Natural Products and its applications, 2007, Chillián, Region de Bío-Bío/Chile.

Silva, M. S. S.; Braga, R. M. Alcalóides tipo crinano de Amacrinum (Amaryllidaceae). 29ª. Reunião da SBQ, 2006, Águas de Lindóia – SP.

#### **RESUMO**

Nosso trabalho tem por objetivo o estudo dos alcalóides das espécies Amacrinum (híbrido Amaryllis x Crinum), Ismene festalis e três variedades de Amaryllis ("sidney", "desire" e "belladonna") todas pertencentes a família Amaryllidaceae. As espécies desta família são fontes de alcalóides, e estes apresentam diversas atividades biológicas, entre elas a inibição da enzima acetilcolinesterase. O material utilizado nesse estudo (bulbos) foi adquirido de um produtor de plantas ornamentais da cidade de Holambra/SP. Os extratos EtOH e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foram submetidos à extração ácido-base. Os extratos CHCl<sub>3</sub> II de *Amacrinum* e *Ismene festalis* foram submetidos a purificações em cromatografia em coluna a pressão reduzida e cromatografia em camada semipreparativa e preparativa. Isolamos e identificamos nove alcalóides no extrato CHCl<sub>3</sub> II de Amacrinum: beladina, N-desmetil-beladina, crinina, bufanidrina, 1-O-acetil-licorina, 11-O-acetilambelina, undulatina, ambelina, bufanisina e dois alcalóides tazetina e haemantidina do extrato CHCl<sub>3</sub> de I. festalis. Os extratos das três variedades de Amaryllis foram analisados por Cromatografia em fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), resultando na detecção dos alcalóides: montanina, hipeastrina, 1,2-diidro-clidantina, licorina e nerinina. Estes dados foram comparados aos obtidos em nosso estudo sobre *Amacrinum* e aos literários, permitindo-nos concluir que o híbrido *Amacrinum* possui em sua composição principalmente alcalóides que têm larga distribuição no gênero Crinum; sendo que undulatina e ambelina, também são observados na espécie A. belladonna. A avaliação qualitativa para inibição da acetilcolinesterase (AChE) por CCD (Métodos de Rhee e Marston) mostrou resultados positivos para o extrato CHCl<sub>3</sub> de *Amacrinum* e para os alcalóides bufanisina, 1-Oacetil-licorina e undulatina. A avaliação quantitativa para inibição da AChE, pelo método colorimétrico baseado na metodologia de Rhee, mostrou que os alcalóides possuem IC<sub>50</sub> maiores que os padrões galantamina e fisostigmina. A interação dos alcalóides fisostigmina, crinina e ambelina com a AChE foram avaliadas por RMN-1H, onde observou-se que as interações mais fortes são com os hidrogênios aromáticos dos alcalóides.

#### **ABSTRACT**

The alkaloids from Amacrinum (a hybrid Amaryllis x Crinum), Ismene festalis and three varieties of *Amaryllis* ("sidney", "desire", "belladonna") of the family Amaryllidaceae were isolated and characterized. The species of this family are sources of alkaloids with wide range of interesting physiological effects, including inhibition acetylcholinesterase. The bulbs were obtained in the city of Holambra, São Paulo, Brazil. The EtOH and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extracts were submitted to acid-base extraction. The CHCl<sub>3</sub> extracts of Amacrinum and Ismene festalis were submitted to repeated fractionation using flash-chromatography CC and preparative TLC on silica gel. We isolated and identified nine alkaloids in the CHCl<sub>3</sub> extract of Amacrium: belladine, Ndemethyl-belladine, crinine, buphanidrine, 1-O-acetyl-lycorine, 11-O-acetyl-ambelline, undulatine, ambelline, and buphanisine; and two alkaloids in the CHCl<sub>3</sub> extract of I. festalis: tazetine and haemathidine. The extracts of the three varieties of Amaryllis were analyzed by gas chromatography coupled-mass spectrometry (GC-MS), resulting in detection of the alkaloids: montanine, hippeastrine, 1,2-dihydroclidantine, lycorine, and nerinine. Comparing these data with those obtained for the Amacrinum hybrid and literature data, we concluded that the Amacrinum hybrid contains mainly alkaloids that are widely distributed in the genus Crinum. The CHCl<sub>3</sub> extract of Amacrinum and buphanisine, undulatine, and 1-O-acetyllycorine alkaloids showed a positive result for the evaluation of the inhibition of acetylcholinesterase by CCD (the Rhee and Marston method). The acetylcholinesterase inhibitory activity of the extracts and alkaloids of Amaryllidaceae was evaluated by the colorimetric method in a microplate reader. The majority of the extracts gave good results. The IC<sub>50</sub> values for the *Amacrinum* alkaloids were lower that those determined for physostigmine and galanthamine. Interactions of physostigmine, crinine, and ambelline alkaloids with AChE were evaluated by RMN-1H, which showed that the interactions were stronger with the aromatic hydrogens of alkaloids.

## ÍNDICE

	LISTA D	E ABREVIATURAS E SIMBOLOS	XX
	LISTA D	E TABELAS	xxii
	LISTA D	E QUADROS	xxiii
	LISTA D	E ESQUEMAS	xxiii
	LISTA D	E FIGURAS	xxiv
	LISTA D	E ESPECTROS	xxviii
1.	INTROD	UÇÃO	1
	1.1. Ald	calóides	1
	1.2. Fa	ımília Amaryllidaceae	1
	1.3. Ald	calóides de Amaryllidaceae	2
	1.4. A	família Amaryllidaceae e medicina tradicional	5
	1.5. At	tividades biológicas relacionadas à família Amaryllidaceae	6
	1.6. G	êneros da família Amaryllidaceae	9
	1.6.1.	Gênero Crinum.	9
	1.6.2.	Gênero Amaryllis	11
	1.6.3.	Gênero Ismene (Hymenocallis)	13
	1.6.4.	Gênero Hippeastrum	15
	1.7. Bi	ossíntese dos alcalóides de Amaryllidaceae	17
	1.7.1.	Esqueleto tipo-beladina	18
	1.7.2.	Esqueleto tipo-galantamina	18
	1.7.3.	Esqueleto tipo-crinina	18
	1.7.4.	Esqueleto tipo-cherilina	18
	1.7.5.	Esqueleto tipo-pancracina	18
	1.7.6.	Esqueleto tipo-buflavina	18
	1.7.7.	Esqueleto tipo-licorina	19
	1.7.8.	Esqueleto tipo-homolicorina	19
	1.7.9.	Esqueleto tipo-pancratistatina	19
	1.7.10.	Esqueleto tipo-tazetina	19
	1.7.11.	Esqueleto tipo-plicamina	19
	1.7.12.	Esqueleto tipo-gracilina	20

	1.7.13. Esqueleto tipo-augustamina
	1.7.14. Esqueleto tipo-gracilamina
	1.7.15. Esqueleto tipo cripovelina
	1.8. Doença de Alzheimer
	1.9. Tratamento da doença de Alzheimer
	1.10. Caracterização de alcalóides de Amaryllidaceae por Dicroísmo
	Circular (DC)
	JUSTIFICATIVA
	OBJETIVOS
	PARTE EXPERIMENTAL
	4.1. Materiais e métodos
	4.2. Obtenção do material vegetal
	4.3. Obtenção dos extratos EtOH e CH <sub>2</sub> CI <sub>2</sub> das espécies de
	Amaryllidaceae
	4.4. Extração ácido-base do extrato EtOH dos bulbos de
	Amacrinum
	4.5. Isolamento dos alcalóides de <i>Amacrinum</i>
	4.5.1. Purificação da fração ama 6-7
	4.5.2. Purificação da fração ama 8-12
	4.5.3. Purificação da fração ama 13-14
	4.5.4. Purificação da fração ama 18-19
	4.5.5. Purificação da fração ama 20-21
	4.5.6. Purificação da fração ama 22-24
	4.5.7. Purificação da fração ama 25-26
	4.5.8. Purificação da fração ama 30-36
	4.5.9. Purificação da fração ama 64-66
	4.6. Extração ácido-base do extrato EtOH dos bulbos de Ismene
	festalis
	4.7. Isolamento dos alcalóides de <i>Ismene festalis</i>
	4.7.1. Purificação da fração ifb 16-18
	4.7.2. Purificação da fração ifb 58-62
	4.7.3 Purificação da fração ifb 79-90

	4.8. Extração acido-base dos extratos CH <sub>2</sub> CI <sub>2</sub> e EtOH dos buibos de	
	Amaryllis	59
	4.9. Fracionamento dos extratos de <i>Amaryllis</i>	61
	4.9.1. Extrato de Amaryllis "sidney"	61
	4.9.2. Extrato de Amaryllis "desire"	61
	4.9.3. Extrato de <i>Amaryllis</i> "belladonna"	62
	4.10. Testes de inibição de acetilcolinesterase (AChE)	62
	4.10.1. Soluções utilizadas	62
	4.10.2. Inibição qualitativa da AChE por CCDA	63
	4.10.2.1. Metodologia de Rhee	63
	4.10.2.2. Metodologia de Marston	64
	4.10.2.3. Testes com alcalóides de Amacrinum	64
	4.10.3. Testes em microplaca no FLASHScan	64
	4.10.3.1. Parâmetros de medidas	65
	4.10.3.2. Obtenção da medida de referência	65
	4.10.3.3. Procedimento para montagem dos testes	66
	4.10.3.4. Testes de inibição de AChE em microplaca - Extratos de	
	Amacrinum e Ismene festalis	67
	4.10.3.5. Testes de inibição de AChE em microplaca - Alcalóides de	
	Amacrinum e Ismene festalis	67
5.	RESULTADO E DISCUSSÃO	69
	5.1. Extrações	70
	5.2. Amacrinum	71
	5.2.1. Análise Espectroscópica dos Alcalóides de Amacrinum	72
	5.2.1.1. Alcalóides tipo-beladina	72
	5.2.1.1.1. Beladina ( <b>1</b> )	72
	5.2.1.1.2. <i>N</i> -desmetil-beladina ( <b>2</b> )	82
	5.2.1.2. Alcalóides tipo-crinina	92
	5.2.1.2.1. Crinina ( <b>3</b> )	92
	5.2.1.2.2. Bufanidrina ( <b>4</b> )	106
	5.2.1.2.3. Undulatina ( <b>7</b> )	117
	5.2.1.2.4. Ambelina (8)	129

5.2.1.2.5. 11- <i>O</i> -acetil-ambelina ( <b>6</b> )	141
5.2.1.2.6. Bufanisina ( <b>9</b> )	151
5.2.1.3. Alcalóides tipo-licorina	164
5.2.1.3.1. 1-O-acetil-licorina (5)	164
5.3. Ismene festalis	176
5.3.1. Análise Espectroscópica dos Alcalóides de Ismene festalis	176
5.3.1.1. Alcalóide tipo-tazetina	176
5.3.1.1.1. Tazetina ( <b>10</b> )	176
5.3.1.2. Alcalóide tipo-crinina	186
5.3.1.2.1. Haemantidina ( <b>11</b> )	186
5.4. Caracterização de alcalóides de Amaryllidaceae por Dicroísmo	
Circular (DC)	197
5.4.1. Crinina (3), bufanisina (9) e haemantidina (11)	197
5.4.2. Alcalóides bufanidrina (4) e undulatina (7)	198
5.4.3. Alcalóides ambelina (8) e 11-O-acetil-ambelina (6)	200
5.4.4. Alcalóide 1-O-acetil-licorina (5)	201
5.4.5. Alcalóide tazetina (10)	202
5.5. Estudos por Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de	
Massas (CG-EM)	203
5.5.1. Extrato de CHCl <sub>3</sub> II de <i>Amacrinum</i>	203
5.5.2. Estudo de extratos de Amaryllis	204
5.5.2.1. Montanina ( <b>12</b> )	208
5.5.2.2. Hipeastrina (13)	209
5.5.2.3. 1,2-diidro-clidantina ( <b>14</b> )	210
5.5.2.4. Licorina ( <b>15</b> )	211
5.5.2.5. Nerinina ( <b>16</b> )	213
5.5.3. Comparações entre alcalóides de Amacrinum, Amaryllis, Crinum	
e Hippeastrum	214
5.5.3.1. Amacrinum e o gênero Amaryllis	214
5.5.3.2. Amaryllis ("sidney", "desire" e "belladonna")	215
5.5.3.3. Espécies de <i>Amaryllis</i> relatadas na literatura	215
5.5.3.4 Espécies de <i>Hippeastrum</i> relatadas na literatura	217

	5.5.3.5. Espécies de <i>Crinum</i> relatadas na literatura	218
	5.6. Testes de Inibição de AChE por CCD	220
	5.6.1. Testes com extratos CHCl <sub>3</sub> II de <i>Amacrinum</i> e <i>Ismene festali</i> s	221
	5.6.2. Testes com alcalóides de <i>Amacrinum</i>	222
	5.7. Testes de Inibição da AChE em Microplaca	223
	5.7.1. Modificações na metodologia de Rhee	223
	5.7.2. Padronização da metodologia para análise da inibição de AChE	
	no FLASHScan 530	223
	5.8. Testes de inibição de AChE em microplaca - Extratos de	
	Amacrinum, Ismene festalis e Amaryllis	227
	5.9. Teste de inibição de AChE em microplaca - Alcalóides de	
	Amacrinum e Ismene festalis	229
	5.10. Estudo de interações alcalóides/AChE por RMN <sup>1</sup> H	231
6.	CONCLUSÕES	233

#### LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AChE ..... Enzima acetilcolinesterase

ATCI..... lodeto de acetiltiocolina

ama..... Extrato CHCl<sub>3</sub> II dos bulbos de Amacrinum

ama2..... Extrato AcOEt II dos bulbos de Amacrinum

BSA..... albumina sérica bovina

CCDA..... Cromatografia em camada delgada analítica

CCDP...... Cromatografia em camada delgada preparativa

CCDSP...... Cromatografia em camada delgada semi-preparativa

CCF...... Cromatografia em coluna a média pressão, tipo Flash

CCPA...... Cromatografia em coluna a pressão ambiente

CG...... Cromatografia Gasosa

CG-EM..... Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa

COSY ...... Correlated spectroscopy (Experimento 2D de RMN

homonuclear que mostra correlações entre sinais de <sup>1</sup>H e <sup>1</sup>H)

DA..... Doença de Alzheimer

DC...... Dicroísmo Circular

DEPT...... Distortionless enhancent by polarization transfer (experimento

de RMN empregado para distinguir os sinais de CH, CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>)

DTNB...... 5,5'-ditio-bis(2-ácido nitro benzóico) – reagente de Ellman

EM..... Espectrometria de Massa

eV..... Elétrons Volt

Hertz..... Hz

HMBC...... Heteronuclear shift correlactions via multiple bond conectivies

(Experimento 2D de RMN heteronuclear que mostra correlações

entre <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C)

HSQC...... Heteronuclear multiple quantum coherence (Experimento 2D

RMN heteronuclear que mostra correlações entre <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C)

IC<sub>50</sub>...... Concentração que causa 50% de inibição da reação enzimática

ifb..... Extrato CHCl<sub>3</sub> II dos bulbos de *Ismene festalis* 

ifb2..... Extrato AcOEt II dos bulbos de Ismene festalis

IV...... Infravermelho

J..... Constante de acoplamento

L-Phe..... L-fenilamina

L-Tyr..... L-tirosina

MM..... Massa Molar

m/z..... Razão massa/carga

NOE...... Nuclear overhauser effect (Experimento 1D de RMN

homonuclear que mostra correlações entre sinais de <sup>1</sup>H e <sup>1</sup>H)

RMN <sup>1</sup>H..... Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1

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

STD..... Saturation Transfer Difference

TIC..... Cromatograma de íons Totais

TMS..... Tetrametilsilano

W..... Watts

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1.	Espécies de Amaryllidaceae estudadas e massa dos extratos	34
Tabela 2.	Fracionamento do extrato ama de <i>Amacrinum</i>	38
Tabela 3.	Fracionamento do extrato ifb de Ismene festalis	54
Tabela 4.	Massa dos extratos de Amaryllis obtidos por fracionamento ácido-	
	base	59
Tabela 5.	Fracionamento do Ext. CHCl <sub>3</sub> II de <i>Amaryllis</i> "sidney"	61
Tabela 6.	Fracionamento do Ext. CHCl <sub>3</sub> II de <i>Amaryllis</i> "desire"	61
Tabela 7.	Fracionamento do Ext. CHCl <sub>3</sub> II de <i>Amaryllis</i> "belladonna"	62
Tabela 8.	Espécies Amarllidaceae estudadas e massa dos extratos EtOH e	
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	70
Tabela 9.	Massa dos extratos de Amarllidaceae obtidos por fracionamento	
	ácido-base	70
Tabela 10.	Alcalóides isolados do extrato de CHCl <sub>3</sub> II de <i>Amacrinum</i>	71
Tabela 11.	Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C para o alcalóide beladina (1)	74
Tabela 12.	Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C para o alcalóide <i>N</i> -desmetil-beladina (2)	85
Tabela 13.	Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C para o alcalóide crinina (3)	97
Tabela 14.	Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C para o alcalóide bufanidrina (4)	110
Tabela 15.	Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C para o alcalóide undulatina ( <b>7</b> )	121
Tabela 16.	Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C para o alcalóide ambelina (8)	133
Tabela 17.	Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C para o alcalóide 11- <i>O</i> -acetil-ambelina ( <b>6</b> )	144
Tabela 18.	Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C para o alcalóide bufanisina ( <b>9</b> )	155
Tabela 19.	Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C para o alcalóide 1- <i>O</i> -acetil-licorina (3)	168
Tabela 20.	Alcalóides isolados do extrato de CHCl <sub>3</sub> de <i>Ismene festalis</i>	176
Tabela 21.	Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C para o alcalóide tazetina ( <b>10</b> )	179
Tabela 22.	Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C para o alcalóide haemandina ( <b>11</b> )	188
Tabela 23.	Dados da análise por CG-EM do extrato CHCl <sub>3</sub> de <i>Amacrinum</i>	204
Tabela 24.	IC <sub>50</sub> dos Alcalóides de <i>Amacrinum</i> avaliados, quanto ao seu poder	
	inibitório contra AChE	230

#### **LISTA DE QUADROS**

Tipos de estruturas conhecidas dos alcalóides da família

Amaryllidaceae e gênero onde foi encontrada.....

Alcalóides detectados por CG-EM nos extratos de Amaryllis.....

2

207

Quadro 1.

Quadro 2.

Quadro 3.	Alcalóides isolados em Amacrinum e em espécies de Crinum	218
Quadro 4.	Extratos de Amaryllidaceae avaliados, por teste em microplaca,	
	quanto ao seu poder inibitório contra AChE	228
	LISTA DE ESQUEMAS	
Esquema 1.	Fracionamento ácido-base, dirigido à obtenção de extratos ricos em	
	alcalóides dos bulbos de Amacrinum	37
Esquema 2.	Fracionamento de ama 6-7	39
Esquema 3.	Fracionamento de ama 8-12	40
Esquema 4.	Fracionamento de ama 13-14	43
Esquema 5.	Fracionamento de ama 18-19	44
Esquema 6.	Fracionamento ama 20-21	45
Esquema 7.	Fracionamento de ama 22-24	47
Esquema 8.	Fracionamento por CCDP de ama 25-26	49
Esquema 9.	Fracionamento por CCDP de ama 30-36	50
Esquema 10	. Fracionamento por CCDP de ama 64-66	52
Esquema 11	. Fracionamento ácido-base, dirigido à obtenção de extratos ricos em	
	alcalóides dos bulbos de Ismene festalis	53
Esquema 12	. Fracionamento de ifb 16-18	55
Esquema 13	. Fracionamento de ifb 58-62	57
Esquema 14	. Fracionamento de ifb 79-90	58
Esquema 15	. Fracionamento ácido-base, dirigido à obtenção de extratos ricos em	
	alcalóides dos bulbos de Amaryllis	60

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1.	Exemplos de alcalóides	1
Figura 2.	Estrutura dos alcalóides: IV, XVII, XVIII, XIX e XX	7
Figura 3.	Estrutura dos alcalóides: XXI, XXII, VII, VIII e XV	8
Figura 4.	Estruturas dos alcalóides III e XXIII, inibidores AChE	8
Figura 5.	Exemplos de alcalóides tipo-crinina isolados de espécies do gênero	
	Crinum	10
Figura 6.	Exemplos de alcalóides tipo-licorina isolados de espécies do gênero	
	Crinum	11
Figura 7.	Alcalóides isolados de espécies do gênero Amaryllis	12
Figura 8.	Alcalóides isolados de espécies de Himenocallis	13
Figura 9.	Alcalóides isolados de espécies de Himenocallis littoralis Salisb	13
Figura 10.	Alcalóides identificados por CG-EM em 5 espécies de	
	Hymenocallis	14
Figura 11.	Alcalóides identificados em duas espécies de Hippeastrum	
	brasileiras	15
Figura 12.	Alcalóides identificados em espécies de Hippeastrum de Hanoi e	
	Berlim	16
Figura 13.	Formação biossintética dos precursores dos alcalóides de	
	Amaryllidaceae	17
Figura 14.	Caminho biossintético proposto para os alcalóides de tipo	
	cripovelina	20
Figura 15.	Caminho biossintético proposto para os alcalóides de Amaryllidaceae	
	(parte I)	21
Figura 16.	Caminho biossintético proposto para os alcalóides de Amaryllidaceae	
	(parte II)	22
Figura 17.	Fármacos utilizados no tratamento da doença de Alzheimer	24
Figura 18.	Tipos gerais de fusão anelar B:C, trans, ilustradas pelo modelo de	
	dois anéis ciclohexano fundido (conformação cadeira)	26
Figura 19.	Tipos gerais de fusão anelar B:C, cis, ilustradas pelo modelo de dois	
	anéis ciclohexano fundido (conformação cadeira)	26

Figura 20.	Estruturas dos alcalóides II e LXII e a curva de DC destes alcalóides	27
Figura 21.	Espécies híbrido Amacrinum e Ismene festalis, produzidas em	
	Holambra - SP	69
Figura 22.	Espécies de Amaryllis ("sidney", "desire" e "belladonna"), produzidas	
	em Holambra - SP	64
Figura 23.	Estrutura do alcalóide beladina (1)	72
Figura 24.	Fragmentação proposta para o alcalóide beladina (1)	73
Figura 25.	Estrutura do alcalóide N-desmetil-beladina (2)	82
Figura 26.	Fragmentação proposta para o alcalóide N-desmetil-beladina (2)	84
Figura 27.	Estrutura do alcalóide crinina (3)	92
Figura 28.	Proposta de formação dos íons $m/z$ 254, 243 e 242 para o alcalóide ${\bf 3}$	94
Figura 29.	Proposta de formação dos íons m/z 228 e 199 para o alcalóide 3	95
Figura 30.	Proposta de formação dos íons <i>m/z</i> 216, 215, 187 e 157 para o	
	alcalóide 3	95
Figura 31.	Estrutura do alcalóide bufanidrina 4	106
Figura 32.	Proposta de formação dos íons $m/z$ 284, 300 e 245 para o alcalóide 4	108
Figura 33.	Proposta de formação dos íons $m/z$ 260 e 245 para o alcalóide 4	109
Figura 34.	Estrutura do alcalóide undulatina 7	117
Figura 35.	Proposta de formação dos íons m/z 303 e 302 para o alcalóide 7	118
Figura 36.	Proposta de formação dos íons m/z 302 e 272 para o alcalóide 7	119
Figura 37.	Proposta de formação dos íons m/z 303 e 302 para o alcalóide 7	120
Figura 38.	Estrutura do alcalóide ambelina 8	129
Figura 39.	Proposta de formação dos íons <i>m/z</i> 299, 298, 270, 241 e 211 a partir	
	de <b>8</b>	131
Figura 40.	Proposta de formação do íon <i>m/z</i> 287 a partir de <b>8</b>	132
Figura 41.	Estrutura do alcalóide 11-O-acetil-ambelina 6	141
Figura 42.	Proposta de formação dos íons $m/z$ 342, 298, 258 e 314 a partir de	
	6	143
Figura 43.	Estrutura do alcalóide bufanisina 9	151
Figura 44.	Proposta de formação dos íons $m/z$ 254, 270 e 215 para o alcalóide <b>9</b>	153
Figura 45.	Proposta de formação dos íons <i>m/z</i> 257, 256, 255 e 254 para o	
	alcalóide 9	153

Figura 46.	Proposta de formação dos ions <i>m/z</i> 225 e 224 para o alcaloide <b>9</b>	154
Figura 47.	Proposta de formação dos íons m/z 230 e 215 para o alcalóide 9	154
Figura 48.	Estrutura do alcalóide 1-O-acetil-licorina (5)	16
Figura 49.	Proposta de fragmentação para a formação dos íons $m/z$ 227 e 226 a	
	partir de <b>5</b> .	160
Figura 50.	Proposta de fragmentação para a formação dos íons $m/z$ 252 e 250 a	
	partir de 5	16
Figura 51.	Estrutura do alcalóide tazetina (10)	170
Figura 52.	Estrutura do alcalóide haemantidina (11)	180
Figura 53.	Estruturas dos alcalóides 3, 9 e 11	197
Figura 54.	Curvas de DC dos alcalóides 3, 9 e 11	198
Figura 55.	Estruturas dos alcalóides 4 e 7	199
Figura 56.	Curvas de DC dos alcalóides 4 e 7	199
Figura 57.	Estruturas dos alcalóides 6 e 8	200
Figura 58.	Curvas de DC dos alcalóides 6 e 8	200
Figura 59.	Estrutura do alcalóide 5	20
Figura 60.	Curvas de DC e estrutura do alcalóide 5	20
Figura 61.	Estrutura do alcalóide 10	202
Figura 62.	Espectro de DC e estrutura do alcalóide 10	202
Figura 63.	Programa de aquecimento usado no CG	203
Figura 64.	TIC do extrato CHCl <sub>3</sub> II de Amacrinum	204
Figura 65.	TIC da F2 do extrato CHCl <sub>3</sub> II de <i>Amaryllis</i> "sidney"	20
Figura 66.	TIC da F2 do extrato CHCl <sub>3</sub> II de <i>Amaryllis</i> "desire"	20
Figura 67.	TIC da F2 do extrato CHCl3 II de <i>Amaryllis</i> "belladonna"	200
Figura 68.	TIC do extrato AcOEt II de Amaryllis "sidney"	200
Figura 69.	Proposta de fragmentação para formação dos íons $m/z$ 270, 252 e	
	223 a partir de <b>12</b>	208
Figura 70.	Proposta de fragmentação para formação dos íons m/z 257 a partir	
	de <b>12</b>	209
Figura 71.	Proposta de fragmentação para formação dos íons $m/z$ 125 e 96 a	
	partir de 13	21
Figura 72.	Estrutura do alcalóide 1,2-dihidro-clidantina (14)	21

Figura 73.	Proposta de fragmentação para formação dos ions <i>m/z</i> 286, 268, 252	
	e 250 a partir de <b>15</b>	212
Figura 74.	Proposta de fragmentação para formação dos íons $m/z$ 287, 227 e	
	226 a partir de <b>15</b>	212
Figura 75.	Proposta de fragmentação para formação dos íons m/z 108 e 108a	
	partir de <b>16</b>	213
Figura 76.	Alcalóides isolados e identificados no híbrido Amacrinum	214
Figura 77.	Alcalóides isolados e detectados nas três variedades de Amaryllis	215
Figura 78.	Alcalóides relatados em espécies do gênero Amaryllis	216
Figura 79.	Alcalóides relatados em espécies do gênero Hippeastrum	217
Figura 80.	Reações envolvidas no método de Rhee	220
Figura 81.	Reações envolvidas no método de Marston	221
Figura 82.	Inibição da AChE em CCD. Extratos CHCl <sub>3</sub> II de <i>Amacrinum</i> e	
	Ismene festalis e o inibidor Galantamina	221
Figura 83.	Inibição da AChE em CCD. Alcalóides isolados de Extratos CHCl <sub>3</sub> II	
	de Amacrinum e o inibidor Galantamina	222
Figura 84.	Estrutura do inibidor de AChE: Fisostigmina	223
Figura 85.	Gráficos de inibição de AChE pela fisostigmina em diferentes	
	tempos	225
Figura 86.	Gráficos de IC <sub>50</sub> e % de inibição de AChE pela fisostigmina em	
	diferentes temperaturas, experimento realizado 5 minutos após	
	adição dos reagentes	226
Figura 87.	Gráficos de % de inibição de AChE pelos extratos de	
	Amaryllidaceae	229
Figura 88.	Estruturas dos alcalóides avaliados quanto as suas interações com	
_	AChE	231
Figura 89.	Epitopo de ligação da fisostigmina com AChE	231
Figura 90.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H – STD (499,88 MHz, tampão fosfato pH = 8,0, 1	
J	mmolL <sup>-1</sup> , D <sub>2</sub> O/DMSO, 25 °C e tempo de saturação = 2,05 s) para	
	uma solução de AChE com crinina (3), ambelina (8) e	
	fisostigmina	237

## LISTA DE ESPECTROS

Esp. 1.	Espectro de RMN $^1$ H (498,88 MHz; CDCl $_3$ ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>1</b>	75
Esp. 2.	Espectro de RMN $^1$ H (498,88 MHz; CDCl $_3$ ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>1</b> -	
	Expansão da região $\delta$ 2,30 a 4,00 ppm	75
Esp. 3.	Espectro de RMN $^1$ H (498,88 MHz; CDCl $_3$ ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>1</b> -	
	Expansão da região $\delta$ 6,50 a 7,38 ppm	76
Esp. 4.	Espectro de RMN $^{13}$ C (125,69 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>1</b>	76
Esp. 5.	Espectro de DEPT 90 e 135° (125,69 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de	
	1	77
Esp. 6.	Espectro de RMN gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHSQC (499,88 MHz x 125,69	
	MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de <b>1</b>	77
Esp. 7.	Espectro de RMN gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHSQC (499,88 MHz x 125,69	
	MHz; CDCl3; $\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de $\textbf{1}$ - Expansão da região $\delta$ 0,7 a 4,5	
	ppm e $\delta$ 25 a 66 ppm	78
Esp. 8.	Espectro de RMN gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHSQC (499,88 MHz x 125,69	
	MHz; CDCl3; $\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de <b>1</b> - Expansão da região $\delta$ 6,5 a 8,0	
	ppm e δ109 a 132 ppm	78
Esp. 9.	Espectro de RMN de gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H (499,88 MHz x 499,88 MHz;	
	CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de 1	79
Esp. 10.	Espectro de RMN gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHMBC (499,88 MHz x 125,69	
	MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de 1	79
Esp. 11.	Espectro de RMN gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHMBC (499,88 MHz x 125,69	
	MHz; CDCl3; $\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de <b>1</b> - Expansão da região $\delta$ 0,7 a 4,5	
	ppm e $\delta$ 26 a 66 ppm	80
Esp. 12.	Espectro de RMN gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHMBC (499,88 MHz x 125,69	
	MHz; CDCl3; $\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de $\boldsymbol{1}$ - Expansão da região $\delta$ 6,74 a 7,52	
	ppm e $\delta$ 32 a 81 ppm	80
Esp. 13.	Espectro de RMN gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHMBC (499,88 MHz x 125,69	
	MHz; CDCl3; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>1</b> - Expansão da região $\delta$ 6,60 a 7,34	
	ppm e $\delta$ 110 a 159 ppm	76

Esp. 14.	Espectro de Massas (IE; 70 eV) de 1	76	
Esp. 15.	Espectro de RMN $^{1}$ H (498,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>2</b>		
Esp. 16.	Espectro de RMN $^1H$ (498,88 MHz; CDCl3; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de $\boldsymbol{2}$ -		
	Expansão da região $\delta$ 6,50 a 7,38 ppm	86	
Esp. 17.	Espectro de RMN $^{13}$ C (125,69 MHz; CDCl $_3$ ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>2</b>	87	
Esp. 18.	Espectro de DEPT 90 e 135° (125,69 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de	87	
Esp. 19.	<b>2</b>	07	
	MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de <b>2</b>	88	
Esp. 20.	Espectro de RMN gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHSQC (499,88 MHz x 125,69		
	MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>2</b> - Expansão da região $\delta$ 2,7 a 4,0 ppm e 32 a 57 ppm	88	
Esp. 21.	Espectro de RMN gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHSQC (499,88 MHz x 125,69		
	MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de <b>2</b> - Expansão da região $\delta$ 6,6 a 7,3 ppm e 108 a 131 ppm	89	
Esp. 22.	Espectro de RMN gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ;		
_op:	$\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>2</b>	89	
Esp. 23	Espectro de RMN gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHSQC (499,88 MHz x 125,69		
•	MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>2</b>	90	
Esp. 24	Espectro de Massas (IE; 70 eV) de 2	90	
Esp. 25	Espectro de IV (pastilha de KBr) de 3	98	
Esp. 26	Espectro de RMN $^1$ H (498,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>3</b>	98	
Esp. 27	Espectro de RMN $^1$ H (498,88 MHz; CDCl $_3$ ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de 2 -		
	Expansão da região $\delta$ 1,1 a 2,5 ppm	99	
Esp. 28	Espectro de RMN $^1$ H (498,88 MHz; CDCl $_3$ ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de 2 -		
	Expansão da região $\delta$ 2,6 a 4,8 ppm	99	
Esp. 29	Espectro de RMN $^1$ H (498,88 MHz; CDCl $_3$ ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>2</b> -		
	Expansão da região δ 5,7 a 7,4 ppm	100	
Esp. 30	Espectro de RMN $^{13}$ C (125,69 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>3</b>	100	
Esp. 31	Espectro de DEPT 90 e 135° (125,69 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de		
	3	101	

Esp. 32	Espectro de RMN gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHSQC (499,88 MHz x 125,69	
	MHz; CDCl $_3$ ; $\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de <b>3</b>	101
Esp. 33	Espectro de RMN gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHSQC (499,88 MHz x 125,69	
	MHz; CDCl3; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de ${\bf 3}$ - Expansão da região $\delta$ 1,5 a 4,5	
	ppm e δ 30 a 67 ppm	102
Esp. 34	Espectro de RMN gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHSQC (499,88 MHz x 125,69	
	MHz; CDCl3; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de ${\bf 3}$ - Expansão da região $\delta$ 5,6 a 7,0	
	ppm e δ 97 a 135 ppm	102
Esp. 35	Espectro de RMN gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ;	
	$\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de <b>3</b>	103
Esp. 36	Espectro de gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHMBC (499,88 MHz x 125,69 MHz;	
	CDCl $_3$ ; $\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de <b>3</b>	103
Esp. 37	Espectro de NOESY 1D (499,88 MHz; CDCl3; $\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm),	
	irradiação do hidrogênio em $\delta$ 1,73 ppm de <b>3</b>	104
Esp. 38	Espectro de NOESY 1D (499,88 MHz; CDCl3; $\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm),	
	irradiação do hidrogênio em $\delta$ 2,86 ppm de <b>3</b>	104
Esp. 39	Espectro de Massas (IE; 70 eV) de 3	105
Esp. 40	Espectro de RMN $^1$ H (498,88 MHz; CDCl $_3$ ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>4</b>	111
Esp. 41	Espectro de RMN $^{1}$ H (498,88 MHz; CDCl $_{3}$ ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>4</b> -	
	expansão da região $\delta$ 1,5 a 2,2 ppm	111
Esp. 42	Espectro de RMN $^1$ H (498,88 MHz; CDCl $_3$ ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>4</b> -	
	expansão da região $\delta$ 2,8 a 3,4 ppm	112
Esp. 43	Espectro de RMN $^{13}$ C (125,69 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>4</b>	112
Esp. 44	Espectro de DEPT 90 e 135° (125,69 MHz; CDCl3; $\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de	
	4	113
Esp. 45	Espectro de RMN gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHSQC (499,88 MHz x 125,69	
	MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de <b>4</b>	113
Esp. 46	Espectro de RMN gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHSQC (499,88 MHz x 125,69	
	MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>4</b> – Expansão da região $\delta$ 1,2 a 4,7	
	ppm e δ 16 a 78 ppm	114

Espectro de RMN gCOSY 'H-'H (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ;	
$\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>4</b>	114
Espectro de RMN gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ;	
$\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>4</b> – Expansão da região $\delta$ 1,0 a 4,5 ppm e $\delta$ 1,0 a	
4,5 ppm	115
Espectro de RMN gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C – gHMBC (499,88 MHz x 125,69	
MHz; CDCI <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>4</b>	115
Espectro de Massas (IE; 70 eV) de 4	116
Espectro de IV (pastilha de KBr) de 7	122
Espectro de RMN $^1$ H (300,07 MHz; CDCl $_3$ ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>7</b>	122
Espectro de RMN $^1H$ (300,07 MHz; CDCl3; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de $\boldsymbol{7}$ –	
Expansão da região $\delta$ 4,3 a 1,2 ppm	123
Espectro de RMN $^{13}$ C (75,45 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>7</b>	123
Espectro de DEPT (75,45 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; δ <sub>TMS</sub> 0,00 ppm) de <b>7</b>	124
Espectro gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHSQC (499,88 MHz x 125,69 MHz; CDCl <sub>3</sub> ;	
$\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>7</b>	124
Espectro gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHSQC (499,88 MHz x 125,69 MHz; CDCl <sub>3</sub> ;	
$\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de <b>7</b> – Expansão da região $\delta$ 66 a 23 ppm e 4,5 a 1,0	
ppm	125
Espectro gCOSY $^1$ H- $^1$ H (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl $_3$ ; $\delta_{TMS}$ 0,00	
ppm) de <b>7</b>	125
Espectro gCOSY $^1$ H- $^1$ H (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ 0,00	
ppm) de <b>7</b> – $\delta$ 4,5 a 1,0 ppm e $\delta$ 4,5 a 1,0 ppm	126
Espectro NOESY 1D (499,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; δ <sub>TMS</sub> 0,00 ppm), irradiação	
do hidrogênio em δ 3,06 ppm de <b>7</b>	126
Espectro de NOESY 1D (499,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm),	
irradiação do hidrogênio em $\delta$ 1,40 ppm de <b>7</b>	127
Espectro NOESY 1D (499,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; δ <sub>TMS</sub> 0,00 ppm), irradiação	
do hidrogênio em δ 4,20 ppm de <b>7</b>	127
Espectro de Massas (IE, 70 eV) de <b>7</b>	128
Espectro de IV (pastilha de KBr) de 8	134
	δ <sub>TMS</sub> 0,00 ppm) de 4.  Espectro de RMN gCOSY ¹H-¹H (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; δ <sub>TMS</sub> 0,00 ppm) de 4 – Expansão da região δ 1,0 a 4,5 ppm e δ 1,0 a 4,5 ppm.  Espectro de RMN gCOSY ¹H-¹³C – gHMBC (499,88 MHz x 125,69 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; δ <sub>TMS</sub> 0,00 ppm) de 4.  Espectro de Massas (IE; 70 eV) de 4.  Espectro de RMN ¹H (300,07 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; δ <sub>TMS</sub> 0,00 ppm) de 7.  Espectro de RMN ¹H (300,07 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; δ <sub>TMS</sub> 0,00 ppm) de 7.  Espectro de RMN ¹H (300,07 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; δ <sub>TMS</sub> 0,00 ppm) de 7.  Espectro de RMN ¹G (75,45 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; δ <sub>TMS</sub> 0,00 ppm) de 7.  Espectro de DEPT (75,45 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; δ <sub>TMS</sub> 0,00 ppm) de 7.  Espectro gCOSY ¹H-¹³C - gHSQC (499,88 MHz x 125,69 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; δ <sub>TMS</sub> 0,00 ppm) de 7.  Espectro gCOSY ¹H-¹³C - gHSQC (499,88 MHz x 125,69 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; δ <sub>TMS</sub> 0,00 ppm) de 7.  Espectro gCOSY ¹H-¹¹H (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; δ <sub>TMS</sub> 0,00 ppm) de 7.  Espectro gCOSY ¹H-¹H (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; δ <sub>TMS</sub> 0,00 ppm) de 7.  Espectro gCOSY ¹H-¹H (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; δ <sub>TMS</sub> 0,00 ppm) de 7.  Espectro gCOSY ¹H-¹H (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; δ <sub>TMS</sub> 0,00 ppm) de 7.  Espectro gCOSY ¹H-¹H (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; δ <sub>TMS</sub> 0,00 ppm), irradiação do hidrogênio em δ 3,06 ppm de 7.  Espectro de NOESY 1D (499,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; δ <sub>TMS</sub> 0,00 ppm), irradiação do hidrogênio em δ 1,40 ppm de 7.  Espectro NOESY 1D (499,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; δ <sub>TMS</sub> 0,00 ppm), irradiação do hidrogênio em δ 4,20 ppm de 7.  Espectro de Massas (IE, 70 eV) de 7.

Esp. 65	Espectro de RMN $^1$ H (300,07 MHz; CDCl $_3$ ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>8</b>	134
Esp. 66	Espectro de RMN $^{1}H$ (300,07 MHz; CDCl3; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de $\boldsymbol{8}$ -	
	Expansão da região $\delta$ 1,9 a 4,5 ppm	135
Esp. 67	Espectro de RMN $^1$ H (300,07 MHz; CDCl $_3$ ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>8</b> -	
	Expansão da região $\delta$ 4,9 a 5,6 ppm	135
Esp. 68	Espectro de RMN $^{13}$ C (125,69 MHz; CDCl $_3$ ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>8</b>	136
Esp. 69	Espectro de DEPT (125,69 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>8</b>	136
Esp. 70	Espectro gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHSQC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl <sub>3</sub> ;	
	$\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de <b>8</b>	137
Esp. 71	Espectro gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHSQC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl <sub>3</sub> ;	
	$\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de $\boldsymbol{8}$ - Expansão da região $\delta$ 2,3 a 5,0 ppm e $\delta$ 45 a 95	
	ppm	137
Esp. 72	Espectro gCOSY $^{1}\text{H-}^{1}\text{H}$ (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl $_{3}$ ; $\delta_{\text{TMS}}$ 0,00	
	ppm) de <b>8</b>	138
Esp. 73	Espectro gCOSY $^{1}\text{H-}^{1}\text{H}$ (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl $_{3}$ ; $\delta_{\text{TMS}}$ 0,00	
	ppm) de <b>8</b> – Expansão da $\delta$ 1,5 a 4,6 ppm e $\delta$ 1,5 a 4,6 ppm	138
Esp. 74	Espectro gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHMBC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl <sub>3</sub> ;	
	$\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de <b>8</b>	139
Esp. 75	Espectro gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHMBC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl <sub>3</sub> ;	
	$\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de <b>8</b> – Expansão da $\delta$ 1,2 a 6,7 ppm e $\delta$ 26 a 92 ppm	139
Esp. 76	Espectro gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHMBC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl <sub>3</sub> ;	
	$\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de <b>8</b> – Expansão da $\delta$ 1,6 a 7,0 ppm e $\delta$ 95 a 157 ppm	140
Esp. 77	Espectro de Massas (IE; 70 eV) de 8	140
Esp. 78	Espectro de RMN $^1$ H (300,07 MHz; CDCl $_3$ ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>6</b>	145
Esp. 79	Espectro de RMN $^{1}$ H (300,07 MHz; CDCl $_{3}$ ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de $\bf{6}$ -	
	Expansão da região $\delta$ 1,6 a 2,9 pmm	145
Esp. 80	Espectro de RMN $^{1}H$ (300,07 MHz; CDCl3; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de $\boldsymbol{6}$ -	
	Expansão da região $\delta$ 2,6 a 6,7 ppm	146
Esp. 81	Espectro de RMN $^{1}$ H (300,07 MHz; CDCl $_{3}$ ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de $\bf{6}$ -	
	Expansão da região $\delta$ 5,1 a 6,7 ppm	146
Esp. 82	Espectro de RMN $^{13}$ C (125,70 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>6</b>	147

Esp. 83	Espectro de DEPT (125,70 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>6</b>	147
Esp. 84	Espectro gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHSQC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl <sub>3</sub> ;	
	$\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>6</b>	148
Esp. 85	Espectro gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHSQC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl <sub>3</sub> ;	
	$\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de $\textbf{6}$ – Expansão da região $\delta$ 1,0 a 4,9 ppm e $\delta$ 17 a 80	
	ppm	148
Esp. 86	Espectro gCOSY $^1\text{H-}^1\text{H}$ (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{\text{TMS}}$ 0,00	
	ppm) de <b>6</b>	149
Esp. 87	Espectro gCOSY $^1\text{H-}^1\text{H}$ (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{\text{TMS}}$ 0,00	
	ppm) de <b>6</b> – Expansão da região $\delta$ 1,0 a 5,5 ppm e $\delta$ 1,0 a 5,5 ppm	149
Esp. 88	Espectro gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHMBC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl <sub>3</sub> ;	
	$\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de <b>6</b>	150
Esp. 89	Espectro de Massas (IE; 70 eV) de 6	150
Esp. 90	Espectro de IV (pastilha de KBr) de 9	156
Esp. 91	Espectro de RMN $^1$ H (498,88 MHz; CDCl $_3$ ; $\delta_{TMS}$ = 00,00 ppm) de <b>9</b>	156
Esp. 92	Espectro de RMN $^{1}$ H (498,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ = 0 ppm) de <b>9</b> -	
	Expansão da região de $\delta$ 1,3 a 3,0 ppm	157
Esp. 93	Espectro de RMN $^1$ H (498,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS} = 0,000$ ppm) de <b>9</b> -	
	Expansão da região de $\delta$ 2,6 a 4,3 ppm	157
Esp. 94	Espectro de RMN $^{1}$ H (498,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ = 0,00 ppm) de <b>9</b> -	
	Expansão da região de δ 5,8 a 6,9 ppm	158
Esp. 95	Espectro de RMN $^{13}$ C (125,69 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ = 0,00 ppm) de <b>9</b>	158
Esp. 96	Espectro de DEPT (125,69 MHz; CDCI <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ = 0,00 ppm) de <b>9</b>	159
Esp. 97	Espectro gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHSQC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl <sub>3</sub> ;	
	$\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de <b>9</b>	159
Esp. 98	Espectro gCOSY $^1$ H- $^1$ H (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ 0,00	
	ppm) de <b>9</b>	160
Esp. 99	Espectro gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHMBC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl <sub>3</sub> ;	
	$\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de <b>9</b>	160

Esp. 100	Espectro gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHMBC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl <sub>3</sub> ;	
	$\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de $\textbf{9}$ – Expansão da região $\delta$ 1,2 a 4,6 ppm e $\delta$ 26 a 83	
	ppm	161
Esp. 101	Espectro gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHMBC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl <sub>3</sub> ;	
	$\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de <b>9</b> – Expansão da região $\delta$ 4,9 a 7,6 ppm e $\delta$ 25 a 85	
	ppm	161
Esp. 102	Espectro gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHMBC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl <sub>3</sub> ;	
	$\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de <b>9</b> - Expansão da região $\delta$ 1,5 a 5,0 ppm e $\delta$ 96 a	
	153 ppm	162
Esp. 103	Espectro gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHMBC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl <sub>3</sub> ;	
	$\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de <b>9</b> - Expansão da região $\delta$ 5,0 a 7,6 ppm e $\delta$ 96 a	
	155 ppm	162
Esp. 104	Espectro de Massas (IE; 70 eV) de 9	163
Esp. 105	Espectro de IV (pastilha de KBr) de 5	169
Esp. 106	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (498,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS} = 0,00$ ppm) de <b>5</b>	169
Esp. 107	Espectro de RMN $^{1}$ H (498,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS} = 0.00$ ppm) de <b>5</b> -	
	Expansão de $\delta$ 2,2 a 3,6 ppm	170
Esp. 108	Espectro de RMN $^{1}$ H (498,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ = 0,00 ppm) de <b>5</b> -	
	Expansão de $\delta$ 4,3 a 6,6 ppm	170
Esp. 109	Espectro de RMN $^{13}$ C (125,69 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ = 0,00 ppm) de <b>5</b>	171
Esp. 110	Espectro de DEPT (125,69 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ = 0,00 ppm) de <b>5</b>	171
Esp. 111	Espectro gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHSQC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl <sub>3</sub> ;	
	$\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>5</b>	172
Esp. 112	Espectro gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H - gHSQC (499,88 MHz x 498,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ;	
	$\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de <b>5</b>	172
Esp. 113	Espectro gCOSY $^1\text{H-}^1\text{H}$ (499,88 MHz x 498,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{\text{TMS}}$ 0,00	
	ppm) de <b>5</b> – Expansão de $\delta$ 1,7 a 5,9 ppm e $\delta$ 1,7 a 5,9 ppm	173
Esp. 114	Espectro gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H – gHMBC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl <sub>3</sub> ;	
	$\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>5</b>	173
Esp. 115	Espectro NOESY 1D (499,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>5</b> –	
	irradiação em δ 2,85 ppm	174

Esp. 116	Espectro NOESY 1D (499,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>5</b> –	
	irradiação em δ 2,76 ppm	174
Esp. 117	Espectro de Massas (IE; 70 eV) de 5	175
Esp. 118	Espectro de IV (pastilha de KBR) de 10	180
Esp. 119	Espectro de RMN $^1$ H (498,88 MHz; CDCl $_3$ ; $\delta_{TMS}$ = 0,00 ppm) de <b>10</b>	180
Esp. 120	Espectro de RMN $^1$ H (498,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ = 0,00 ppm) de <b>10</b> -	
	Expansão da região $\delta$ 0,5 a 4,4 ppm	181
Esp. 121	Espectro de RMN $^1$ H (498,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ = 0,00 ppm) de <b>10</b> -	
	Expansão da região $\delta$ 5,6 a 6,9 ppm	181
Esp. 122	Espectro de RMN $^{13}$ C (125,69 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ = 0,00 ppm) de <b>10</b>	182
Esp. 123	Espectro de DEPT (125,69 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{TMS}$ = 0,00 ppm) de <b>10</b>	182
Esp. 124	Espectro gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHSQC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl <sub>3</sub> ;	
	$\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de <b>10</b>	183
Esp. 125	Espectro gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHSQC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl <sub>3</sub> ;	
	$\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de $\boldsymbol{10}$ – Expansão da região $\delta$ 1,2 a 7,2 ppm e $\delta$ 22 a	
	77 ppm	183
Esp. 126	Espectro gCOSY $^1\text{H-}^1\text{H}$ (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{\text{TMS}}$ 0,00	
	ppm) de <b>10</b>	184
Esp. 127	Espectro gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHMBC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl <sub>3</sub> ;	
	$\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de <b>10</b>	184
Esp. 128	Espectro NOESY 1D (499,88 MHz; CDCl3; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de ${f 10}$ ,	
	irradiação em δ 2,86 ppm	185
Esp. 129	Espectro de IV (pastilha de KBr) de 11	189
Esp. 130	Espectro de RMN $^{1}$ H (498,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> + CD <sub>3</sub> OD; $\delta_{TMS}$ = 0,00 ppm)	
	de 11	189
Esp. 131	Espectro de RMN $^{1}$ H (498,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> + CD <sub>3</sub> OD; $\delta_{TMS}$ = 0,00 ppm)	
	de <b>11</b> – Expansão da região δ 1,8 a 4,2 ppm	190
Esp. 132	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (498,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> + CD <sub>3</sub> OD; $\delta_{TMS}$ = 0,00 ppm)	
	de <b>11</b> – Expansão da região δ 4,9 a 7,0 ppm	190
Esp. 133	Espectro de RMN $^{13}$ C (125,70 MHz; CDCl <sub>3</sub> + CD <sub>3</sub> OD; $\delta_{TMS}$ = 0,00 ppm)	
	de <b>11</b>	191

Esp. 134	Espectro de DEPT (125,70 MHz; CDCl <sub>3</sub> + CD <sub>3</sub> OD; $\delta_{TMS}$ = 0,00 ppm) de <b>11</b>	191
Esp. 135	Espectro gCOSY $^{1}$ H- $^{13}$ C - gHSQC (499,88 MHz x 125,70 MHz; CDCl <sub>3</sub> + CD <sub>3</sub> OD; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>11</b>	192
Esp. 136	Espectro gCOSY <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C - gHSQC (499,88 MHz x 125,70 MHz; CDCl <sub>3</sub> + CD <sub>3</sub> OD; δ <sub>TMS</sub> 0,00 ppm) de <b>11</b> – Expansão da região δ 2,5 a 6,5 ppm e δ 38 a 95 ppm	192
Esp. 137	Espectro gCOSY $^{1}$ H- $^{1}$ H (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> + CD <sub>3</sub> OD; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>11</b>	193
Esp. 138	Espectro gCOSY $^{1}$ H- $^{1}$ H (499,88 MHz x 125,70 MHz; CDCl <sub>3</sub> + CD <sub>3</sub> OD; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>11</b> Expansão da região $\delta$ 1,8 a 4,3 ppm e $\delta$ 1,8 a 4,3 ppm.	193
Esp. 139	Espectro gCOSY $^{1}$ H- $^{13}$ C – gHMBC (499,88 MHz x 125,70 MHz; CDCl <sub>3</sub> + CD <sub>3</sub> OD; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>11</b>	194
Esp. 140	Espectro gCOSY $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ – gHMBC (499,88 MHz x 125,70 MHz; CDCl <sub>3</sub> + CD <sub>3</sub> OD; $\delta_{\text{TMS}}$ 0,00 ppm) de <b>11</b> – Expansão da região $\delta$ 1,6 a 4,4 ppm e $\delta$ 38 a 151 ppm	194
Esp. 141	Espectro gCOSY $^{1}$ H- $^{13}$ C – gHMBC (499,88 MHz x 125,70 MHz; CDCl <sub>3</sub> + CD <sub>3</sub> OD; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>11</b> – Expansão da região $\delta$ 5,3 a 7,3 ppm e $\delta$ 20 a 160 ppm	195
Esp. 142	Espectro NOESY 1D (499,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> + CD <sub>3</sub> OD; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>11</b> , irradiação em $\delta$ 3,64 ppm	195
Esp. 143	Espectro NOESY 1D (499,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> + CD <sub>3</sub> OD; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>11</b> , irradiação em $\delta$ 2,14 ppm	196
Esp. 144	Espectro NOESY 1D (499,88 MHz; CDCl <sub>3</sub> + CD <sub>3</sub> OD; $\delta_{TMS}$ 0,00 ppm) de <b>11</b> , irradiação em $\delta$ 4,92 ppm	196
Esp. 145	Espectro de massas (IE, 70 eV) do alcalóide <b>12</b>	208
Esp. 146	Espectro de massas (IE, 70 eV) do alcalóide <b>13</b>	209
Esp. 147	Espectro de massas (IE, 70 eV) do alcalóide <b>14</b>	210
Esp. 148	Espectro de massas (IE, 10 eV) do alcalóide <b>15</b>	211
Esp. 149	Espectro de massas (IE, 70 eV) do alcalóide <b>16</b>	213

## 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1. Alcalóides

Alcalóides são bases orgânicas nitrogenadas encontradas principalmente em plantas, mas também, em menor extensão, em microorganismos e animais<sup>1</sup>. Pelletier definiu alcalóide como substância orgânica, de origem natural, cíclica contendo um átomo de nitrogênio em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada dentro dos organismos vivos<sup>2</sup>. Esta definição englobaria todos os compostos que foram considerados até o momento como alcalóides, mas excluiria compostos nitrogenados tais como: aminas simples, aminoácidos, peptídeos, proteínas, ácidos nucléicos, nucleotídeos, porfirinas, vitaminas e compostos nitro e nitroso<sup>3</sup>. Alguns exemplos de alcalóides são apresentados na **Figura 1**.

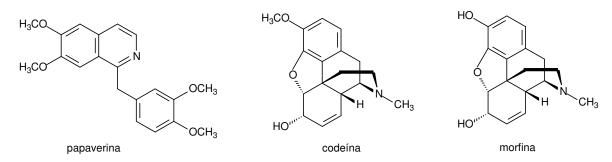


Figura 1: Exemplos de alcalóides.

#### 1.2. Família Amaryllidaceae

A família Amaryllidaceae, um grupo de monocotiledôneas que consiste de aproximadamente 1110 espécies em 85 gêneros, está distribuída ao longo dos trópicos e regiões temperadas quentes. Espécies desta família são utilizadas em muitos países em ornamentação devido à beleza das suas flores e apresentam grande teor de alcalóides. Esta família é considerada uma das 20 famílias mais importantes entre as que apresentam alcalóides em sua composição<sup>4</sup>.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Dewick, P. M. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach 2nd. Ed. Chinchester, John Wiley & Sons. **2002**, 524 p.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Pelletier, S. W. (ed.) Alkaloids chemical and biological perspectives. v. 1-6, New York: Willey, **1983-1988**.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Simões, C. M. O. *et al.* Farmacognosia da planta ao medicamento 5ª. Ed. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da UFRGS/Editora da UFSC, **2004**, 1102 p.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Unver, N. Phytochemistry Review, 2007, 6, 125-135.

#### 1.3. Alcalóides de Amaryllidaceae

Os alcalóides produzidos por plantas da família Amaryllidaceae têm atraído a atenção de químicos a mais de um século e o uso medicinal dos extratos de tais plantas pode ser datado aos tempos de Hipócrates e Plínio<sup>5</sup>.

Segundo Ghosal<sup>6</sup> o estudo dos alcalóides de Amaryllidaceae iniciou-se com o isolamento da licorina de *Narcissus pseudonarcissus* em 1877. No decorrer dos anos um extenso estudo fitoquímico, em espécies Amaryllidaceae, resultou em um grande número de alcalóides com diversas estruturas e um grande número de efeitos fisiológicos interessantes.

Segundo Jin<sup>7</sup> até o ano de 2007 cerca de 500 alcalóides foram isolados de Amaryllidaceae. Estes alcalóides são classificados em grupos, de acordo com suas semelhanças estruturais. Neste trabalho adotaremos a classificação sugerida por Jin<sup>7</sup>, que está representada no **Quadro 1**.

**Quadro 1**: Tipos de estruturas conhecidas dos alcalóides da família Amaryllidaceae e gênero onde foi encontrada<sup>7</sup>.

Tipo de estrutura	Alcalóide representante	Gêneros
Johnard	11.00	
beladina	H <sub>3</sub> CO CH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub>	Crinum, Nerine
	beladina ( <b>I</b> )	
	OH	Ammocharis, Brunsvigia,
crinina		Crinum, Eucharis, Narcissus,
	H""\	Nerine, Pancratium (agora
	crinina ( <b>II</b> )	Hymenocallis)
galantamina	H <sub>3</sub> CO OH CH <sub>3</sub>	Amaryllis, Hymenocallis (Pancratium), Leucojum, Lycoris, Narcissus
	galantamina ( <b>III</b> )	

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> McNulty, J.; Nair, J. J.; Codina, C.; Bastida, J.; Pandey, S.; Gerasimoff, J.; Griffin, C. *Phytochemistry*, **2007**, 68, 1068-1074.

2

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Ghosal, S.; Saini, K. S.; Razdan, S. *Phytochemistry*, **1985**, 10, 2141-2156.

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> Jin, Z. *Natural Products Reports*, **2007**, 24, 886-905.

licorina	HO, HO NO	Clivia, Galanthus, Haemanthus, Lycoris, Narcissus
homocolina	$H_3CO$ $H_3C$	Amaryllis, Ammocharis, Brunsvigia, Crinum, Eucharis, Hippeastrum, Hymenocalis (Pancratium), Leucojum, Narcissus, Zephyranthes
pancracina	OH OH OH pancracina (VI)	Boophane, Haemanthus, Hymenocallis, (Pancratium), Narcissus
cripovelina	$\begin{array}{c} OR_2 \\ OCH_3 \\ OH \\ \\ Cripovelina A: R_1, R_2 = -CH_2OCH_2 - (VII) \\ Cripovelina B: R_1, R_2 = CH_3 (VIII) \\ \end{array}$	Crinum
cherilina	H <sub>3</sub> CO  HO  CH <sub>3</sub> Cherilina ( <b>IX</b> )	Crinum
buflavina	H <sub>3</sub> CO  N  CH <sub>3</sub> buflavina (X)	Boophane

plicamina	OCH <sub>3</sub> H CH <sub>3</sub> OH  plicamina ( <b>XI</b> )	Cyrtanthus, Galanthus
tazetina	OCH <sub>3</sub> H CH <sub>3</sub> OH tazetina ( <b>XII</b> )	Crinum, Eucharis, Galanthus, Hippeastrum, Hymenocallis (Pancratium)
gracilina	gracilina ( <b>XIII</b> )	Galanthus
augustamina	augustamina (XIV)	Crinum
pancratistatina	OH HO OH OH OH O pancratistatina (XV)	Crinum, Hippeastrum, Hymenocallis, (Pancratium), Zephyranthes

#### 1.4. A família Amaryllidaceae e medicina tradicional

Muitas espécies desta família são fortemente exploradas na medicina tradicional<sup>8</sup>. Os bulbos de *Crinum asiaticum L*. são usados na Índia como tônico, laxativo e expectorante<sup>9</sup>. No sudoeste da Nigéria *C. glaucum* e *C. jagus* são utilizados para tratar perda de memória em idosos<sup>10</sup>, o segundo é também usado para tratar feridas abertas e em preparações anticonvulsivantes, além disso, é usado como uma planta medicinal veterinária em Camarões<sup>11</sup>. As folhas e bulbos de *Crinum bulbispermum* são usados na África do Sul para tratar diversas doenças entre elas podem ser citadas: abscessos, ferimentos, dores de ouvido, infecções de rim e bexiga e redução de inchaços em articulações. As espécies *Amaryllis belladonna* L., *A. formossisima* L. e *A. zeylanica* L. são usadas para tratamento de câncer<sup>12</sup>. A espécie *Pancratium maritimum* é relatada como emético<sup>13</sup>. As propriedades cardiotônicas e estomacais são relatadas para *Galanthus nivalis*<sup>14</sup>. Os bulbos de *Nerine filifolia* são usados por tribos africanas em decocções para tratar tosses e resfriados, doenças renais e hepáticas, para alívio de dores nas costas e como remédio para infertilidade<sup>15</sup>.

<sup>8</sup>Elgorashi, E. E.; Drewes, S. E.; Morris, C.; Staden, J. V. *Biochemical Systematic and Ecology*, **2003**, 31, 601-603.

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> Tram, N. T. N.; Titorenkova, T. V.; Bankova, V. St.; Handjieva, N. V.; Popov, S. S. *Fitoterapia*, **2002**, 73, 183-208.

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> Houghton, P. J.; Agbedahunsi, J. M.; Adegbulugbe, A. *Phytochemistry*, **2004**, 65, 2893-2896.

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup> Fennell, C. W.; van Staden, J. Jounal of Etnopharmacology, **2001**, 78, 15-26.

<sup>&</sup>lt;sup>12</sup> Pettit, G. R.; Gaddamidi, V.; Goswami, A.; Cragg, G. M. *Journal of Natural Products*, **1984**, 47, 796-801.

<sup>&</sup>lt;sup>13</sup> Sür-Altiner, D.; Gurkan, E.; Mutlu, G.; Tuzlaci, E.; Ang, O. *Fitoterapia*, **1999**, 70, 187-189.

<sup>&</sup>lt;sup>14</sup> Kaya, G. I.; Gözler, B. *Fitoterapia*, **2005**, 76, 340-343.

<sup>&</sup>lt;sup>15</sup> Nair, J. J.; Campbell, W. E.; Brun, R.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J. *Phytochemistry*, **2005**, 66, 373-382.

#### 1.5. Atividades biológicas relacionadas à família Amaryllidaceae

Os vários relatos de aplicações em medicina tradicional motivaram diversos estudos sobre espécies desta família. Entre eles pode-se citar o estudo com extratos de *C. macowanii* que exibiram atividade antifúngica (contra *Candida albicans*) e atividade antiviral contra uma variedade de vírus de RNA exótico<sup>16</sup>. Extrato MeOH de *Pancratium maritimum* L. (concentração de 60 µg/disco) foi avaliado quanto a sua atividade antifúngica contra *C. pseudotropicalis* KUEN 1014, *C. krusei* ATCC 6285, *C. tropicalis* KUEN 1025, *C. guillermondii* KUEN 998 e *C. albicans* ATCC 10231 e comparado com o padrão miconazol (10 µg/disco); sendo que para os quatro primeiros os resultados foram tão bons quanto para o padrão<sup>13</sup>. Extratos de *Sternbergia sicula* e *Sternbergia lutea* apresentaram atividade antimicrobiana<sup>4</sup>. Os extratos etanólicos de *Pancratium maritimum*, *Leucojum aestivum* e *Narcissus tazetta* ssp tazeta apresentaram bons resultados em teste antimalarial<sup>17</sup>. O extrato aquoso de folhas de *C. latifolium* causou ativação *in vitro* de T-linfócito e, também, retardou o crescimento de tumores quimicamente induzidos em ratos<sup>9</sup>.

Entre os alcalóides de Amaryllidaceae que apresentam atividade biológica podese citar a licorina (IV) que possui atividade: antiviral, antimalarial, antitumoral<sup>4</sup>, inibição da biossíntese do ácido ascórbico e do crescimento e divisão celular em plantas superiores e algas<sup>18</sup> A hipadina (XVII), isolada em algumas espécies de *Crinum*, produziu inibição reversível da fertilidade de ratos machos e associada a 1,2-*O*-diacetillicorina (XVIII) exibe atividade antimalarial e citotóxica<sup>19</sup>. Acetilcaranina (XIX) e ambelina (XX), isoladas de *A. belladonna*, apresentaram atividade *in vitro* contra leucemia linfócita murina P-388<sup>20</sup>. As estruturas dos alcalóides estão apresentadas na **Figura 2**.

<sup>1 (</sup> 

<sup>&</sup>lt;sup>16</sup> Nair, J. J.; Machocho, A. K.; Campbell, W. E.; Brun, R.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J. *Phytochemistry*, **2000**, 54, 945-950.

<sup>&</sup>lt;sup>17</sup> Sener, B.; Orhan, I.; Satayavivad, J. *Phytotherapy Research*, **2002**, 17, 1220-1223.

Evidente, A.; Cicala, M. R.; Randazzo, G.; Riccio, R.; Calabrese, G.; Liso, R.; Arrigoni, O. *Phytochemistry*, **1983**, 22, 581-584.

<sup>&</sup>lt;sup>19</sup> Machocho, A. K.; Bastida, J.; Codina, C.; Viladomat, F.; Brun, R.; Chhabra, C. *Phytochemistry*, **2004**, 65, 3143-3149.

<sup>&</sup>lt;sup>20</sup> Pettit, G. R.; Gaddamid, V.; Goswami, A.; Cragg, G. M. *Journal of the Natural Products*, **1984**, 47, 796-801.

Figura 2: Estrutura dos alcalóides: IV, XVII, XVIII, XIX e XX.

O alcalóide montanina (**XXI**), tipo pancracina, apresenta atividade citotóxica<sup>21</sup>. Os alcalóides cripovelina A e B (**VII** e **VIII**) apresentam atividade inseticida<sup>22</sup>. A pancratistatina (**XV**), isolada de *Pancratium littorale* (agora *Hymenocallis littorale*), mostrou possuir promissora atividade antineoplásica. Estudos bioquímicos indicam que este alcalóide pode induzir seletivamente apoptose em células cancerígenas e que as mitocôndrias podem ser o sítio de ação<sup>7</sup>. Narciclasina (**XXII**), tipo pancratistatina, possui um forte efeito de inibição sobre células de calos em tabaco e trigo, podendo ser utilizado como inibidor do crescimento de plantas<sup>7</sup>. As estruturas destes alcalóides estão apresentadas na **Figura 3**.

<sup>22</sup> Velten, R.; Erdelen, C.; Gehling, M. et al. *Tetrahedron, Letters*, **1998**, 39, 1737.

<sup>&</sup>lt;sup>21</sup> Silva, A. F. S.; Andrade, J. P.; Machado, K. R. B.; Rocha, A. B.; Apel, M. A.; Sobral, M. E. G.; Henriques, A. T.; Zuanazzi, J. A. S. *Phytomedicine*, **2008**, 15, 882-885.

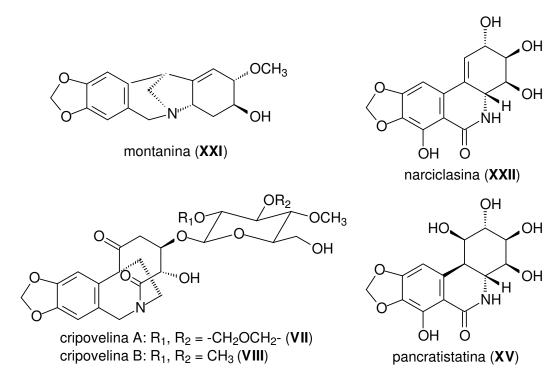


Figura 3: Estrutura dos alcalóides: XXI, XXII, VII, VIII e XV.

O alcalóide galantamina (III), isolado em 1950 de *Galanthus nivalis* e presente em outros gêneros da família Amaryllidaceae, tais como: *Narcissus*, *Lycoris* e *Leucojum*, apresenta inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE)<sup>23</sup>. Sanguinina (XXIII), outro alcalóide tipo-galantamina, apresentou em estudo atividade inibitória de AChE mais potente que galantamina (III)<sup>24</sup>. Estruturas químicas dos alcalóides III E XXIII estão apresentadas na Figura 4.

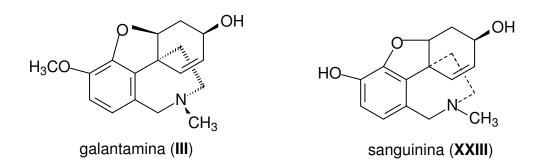


Figura 4: Estruturas dos alcalóides III e XXIII, inibidores AChE.

<sup>23</sup> Hostettmann, K.; Borloz, A.; Urbain, A.; Marston, A. *Current Organic Chemistry*, **2006**, 10, 825-847.

<sup>24</sup> a)Berkov, S.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C. *Phytochemical Analisys*, **2008**, 19, 285-293. b)López, S.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C. *Life Sciences*, **2002**, 71, 2521-2529.

# 1.6. Gêneros da família Amaryllidaceae

Como citado anteriormente à família Amaryllidaceae está dividida em 85 gêneros, destes alguns apresentam muitos estudos na literatura: *Amaryllis*, *Crinum*, *Galanthus*, *Narcissus*, *Brunvigia* e *Lycoris*. Algumas espécies desta família ainda apresentam problemas relativos à taxonomia, pois existem muitas divergências entre os pesquisadores do assunto. A facilidade com que estas plantas produzem híbridos<sup>9</sup>, também, dificulta a comparação entre espécies e a identificação botânica destas.

Uma discussão sobre todos os gêneros da família Amaryllidaceae seria demasiadamente longa, então será feito algumas observações sobre os gêneros estudados em neste trabalho.

#### 1.6.1. Gênero *Crinum*

O gênero *Crinum* pertence à família Amaryllidaceae, incluindo cerca de 160 espécies distribuídas nas regiões tropicais e temperadas quentes do mundo: Ásia, Austrália, África e América. As espécies deste gênero apresentam flores muito bonitas, por isso, muito populares na ornamentação de jardins. Suas espécies também atraem uma atenção considerável devido às várias propriedades medicinais como: antitumoral, imunoestimulador, analgésica, antiviral, antibacteriana, antifúngica, entre outras<sup>9</sup>. Existem vários relatos dos usos medicinais das plantas desse gênero, como descrito anteriormente.

Tram e colaboradores<sup>9</sup> apresentaram em 2002 uma revisão sobre o gênero Crinum relatando que das 160 espécies descritas apenas, aproximadamente, 30 espécies foram investigadas quimicamente.

Os alcalóides tipo-crinina, também conhecidos como 5,10b-etanofenatridina, compõem o grupo mais numeroso neste gênero. A variedade de alcalóides deste grupo é decorrente das variações estruturais no anel C (ligação dupla, anel oxirano, substituintes)<sup>9</sup>. Alguns exemplos destes alcalóides são apresentados na **Figura 5**, sendo que estes foram isolados de: *C. asiaticum*, *C. americanum*, *C. bulbispermum*, *C. latifolium*, *C. macowanii*, *C. amabile*, *C. erubescence* e *C. augustum*.

$$R_1 = R_2 = R_3 = H: crinina (\textbf{II})$$

$$R_1 = R_2 = H, R_3 = OH: 6\alpha - hidroxi - crinina (\textbf{XXVI})$$

$$R_1 = R_3 = H, R_2 = OH: 6\beta - hidroxi - crinina (\textbf{XXVI})$$

$$R_1 = CH_3, R_2 = R_3 = H: bufanisina (\textbf{XXVI})$$

$$R_1 = CH_3, R_2 = H, R_3 = OH: 6\beta - hidroxi - bufanisina (\textbf{XXVIII})$$

$$R_1 = CH_3, R_3 = H, R_2 = OH: 6\beta - hidroxi - bufanisina (\textbf{XXVIII})$$

$$R_1 = CH_3, R_2 = R_3 = H: povelina (\textbf{XXIX})$$

$$R_1 = CH_3, R_2 = CH_3COO: 11 - O-acetil-ambelina (\textbf{XXXX})$$

$$R_1 = CH_3, R_2 = CH_3COO: 11 - O-acetil-ambelina (\textbf{XXXI})$$

$$R_1 = CH_3, R_2 = CH_3COO: 11 - O-acetil-ambelina (\textbf{XXXIII})$$

$$R_1 = OCH_3, R_2 = CH_3COO: 11 - O-acetil-ambelina (\textbf{XXXIII})$$

$$R_1 = OCH_3, R_2 = CH_3COO: R_3 = OCH_3: 11 - O-acetil-1, 2\beta - epoxiambelina (\textbf{XXXIII})$$

$$R_1 = R_2 = R_3 = H: flexinina (\textbf{XXXIII})$$

$$R_1 = R_2 = R_3 = H: flexinina (\textbf{XXXIII})$$

$$R_1 = R_2 = R_3 = H: flexinina (\textbf{XXXIII})$$

$$R_1 = CH_3, R_2 = CH_3COO: 11 - O-acetil-1, 2\beta - epoxiambelina (\textbf{XXXIII})$$

$$R_1 = CH_3, R_2 = CH_3COO: 11 - O-acetil-1, 2\beta - epoxiambelina (\textbf{XXXIII})$$

$$R_1 = R_2 = R_3 = H: flexinina (\textbf{XXXIII})$$

$$R_1 = R_2 = R_3 = H: flexinina (\textbf{XXXIII})$$

$$R_1 = R_2 = R_3 = H: flexinina (\textbf{XXXIII})$$

$$R_1 = CH_3, R_2 = CH_3COO: 11 - O-acetil-1 - O-acetil-1, 2\beta - epoxiambelina (\textbf{XXXIII})$$

$$R_1 = CH_3, R_2 = CH_3COO: 11 - O-acetil-1 - O-acetil-1, 2\beta - epoxiambelina (\textbf{XXXIII})$$

$$R_1 = CH_3, R_2 = CH_3COO: 11 - O-acetil-1 - O-acetil-1, 2\beta - epoxiambelina (\textbf{XXXIII})$$

$$R_1 = CH_3, R_2 = CH_3COO: 11 - O-acetil-1 - O-acetil-1, 2\beta - epoxiambelina (\textbf{XXXIII})$$

$$R_1 = CH_3, R_2 = CH_3COO: 11 - O-acetil-1 - O-acetil-1, 2\beta - epoxiambelina (\textbf{XXXIII})$$

$$R_1 = CH_3, R_2 = CH_3COO: 11 - O-acetil-1 - O-ace$$

Figura 5: Exemplos de alcalóides tipo-crinina isolados de espécies do gênero Crinum.

Os alcalóides tipo-licorina também são isolados em espécies do gênero *Crinum*. Eles diferem entre si, principalmente, na quantidade e na posição das ligações duplas localizadas nos anéis C e D e no tipo dos substituintes no anel C, bem como sua posição e estereoquímica<sup>9</sup>. Alguns exemplos de alcalóides tipo-licorina isolados de espécies Crinum estão apresentados na **Figura 6**. Estes alcalóides foram isolados de: *C. amabile, C. asiaticum, C. augustum, C. bulbispermum, C. moorei, C. natans, C. ornatum* e *C. pratense*<sup>6,9</sup>.

 $R_1 = R_2 = H, R_3 + R_4 = -CH_2$ : licorina (IV)

 $R_1 = R_2 = CH_3CO$ ,  $R_3 + R_4 = -CH_2$ : 1,2-O-diacetil-licorina (XVIII)

 $R_1 = CH_3CO$ ,  $R_2 = H$ ,  $R_3 + R_4 = -CH_2$ : 1-O-acetil-licorina (**XXXVI**)

 $R_1 = H$ ,  $R_2 = R_3 = R_4 = CH_3$ : galantina (**XXXVII**)

 $R_1 = R_2 = R_4 = H$ ,  $R_4 = CH_3$ : pseudolicorina (**XXXVIII**)

Figura 6: Exemplos de alcalóides tipo-licorina isolados de espécies do gênero Crinum.

Os alcalóides tipo-licorina e tipo-crinina são os principais encontrados em espécies do gênero *Crinum*, mas além destes também ocorrem alcalóides tipo: tazetina, galantamina, beladina, homolicorina, augustamina e cherilina<sup>6,9</sup>.

## 1.6.2. Gênero Amaryllis

As espécies do gênero Amaryllis são conhecidas por serem usadas como ornamentais, reserva de alcalóides e tratamento de doenças. *Amaryllis belladonna* é a espécie mais estudada desse gênero. Em um estudo sobre esta espécie, utilizando exemplares de origem australiana, observou-se que suas frações apresentaram atividade *in vivo* contra leucemia linfócita murina P-388 (PS) e resultou no isolamento do alcalóide licorina (**IV**)<sup>20</sup>.

Pettit e colaboradores<sup>20</sup> estudaram outro exemplar de *A. belladonna*, americana, realizando uma separação guiada pelos bioensaios de PS *in vitro* (9 PS) e *in vivo* (3 PS); resultando no isolamento de acetilcaranina (**XIX**), ambelina (**XXX**), undulatina (**XXXV**) e cloridrato de anidrolicorina (**XXXIX**); sendo que **XXXIX** apresentou o melhor resultado para 3 PS e **XXXV** apresentou-se inativo para ambos os ensaios.

Evidente e colaboradores<sup>25</sup> estudaram um exemplar de *A. belladonna* egípcia, resultando o isolamento de seis alcalóides: licorina (**IV**), pancracina (**VI**), vitatina (**XL**) e 11-hidroxivitatina (**XLI**) e hipeastrina (**XLII**).

Ghosal e Razdan<sup>26</sup>, na busca dos intermediários reativos dos alcalóides de Amaryllidaceae, estudaram o fluído do talo da flor da espécie *A. vittata* identificando o alcalóide rilistina (**XLIII**). As estruturas dos alcalóides isolados em espécies Amaryllis estão apresentadas na **Figura 7**.

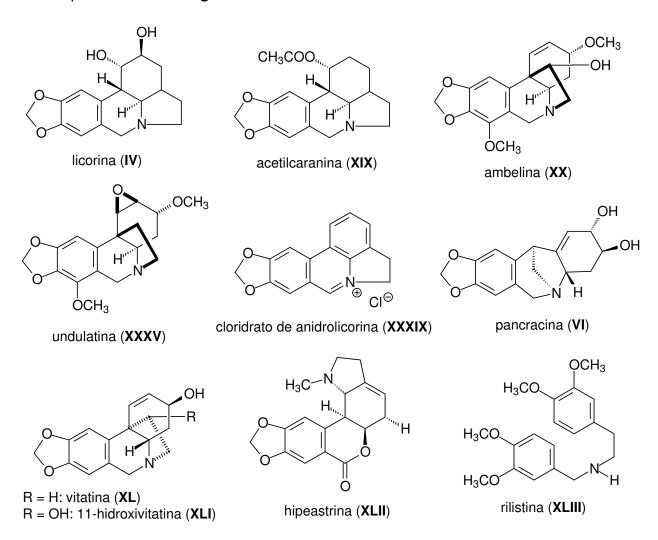


Figura 7: Alcalóides isolados de espécies do gênero Amaryllis.

<sup>&</sup>lt;sup>25</sup> Evidente, A.; Andolfi, A.; Abou-Donia, A. H.; Touema, S. M.; Hammoda, H. M.; Shawky, E.; Motta, A. *Phytochemistry*, **2004**, 65, 2113-2118.

<sup>&</sup>lt;sup>26</sup> Ghosal, S.; Razdan, S. Journal of Chemical Research, 1984, S, 412-413.

# 1.6.3. Gênero Ismene (Hymenocallis)

Segundo Rivero e Gómez licorina (**IV**) foi o primeiro alcalóide isolado do gênero *Hymenocallis*, em 1920<sup>27</sup>. Antoun e colaboradores<sup>28</sup> estudaram a espécie *Hymenocallis expansa*, após observarem que os extratos dos bulbos e das folhas apresentaram significante citotoxicidade; neste estudo isolaram três alcalóides: tazetina (**XII**), hipeastrina (**XLII**) e haemantidina (**XLIV**) que apresentaram significante atividade citotóxica contra linhagens de células humanas e murinas. As estruturas dos alcalóides isolados estão apresentadas na **Figura 8**.

Figura 8: Alcalóides isolados de espécies de Himenocallis.

Em 1993 foi isolado o alcalóide pancratistatina (**XV**) da espécie *Pancratium littorale* Jacq., que depois foi reclassificada como *Hymenocallis littoralis* Salisb. Este alcalóide apresentou atividade antineoplásica bem como mostrou-se ativo contra sistema PS (P-388), sarcomas, melanomas e vírus. Os alcalóides narciclasina (**XXII**) e 7-desoxi-narciclasina (**XLV**), também foram isolados da mesma planta, e apresentaram interessantes atividades<sup>27</sup>. Os alcalóides citados estão apresentados na **Figura 9**.

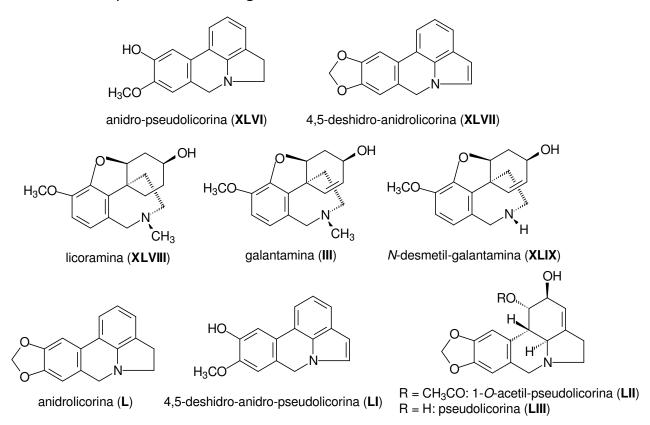


Figura 9: Alcalóides isolados de espécies de *Hymenocallis littoralis* Salisb.

<sup>28</sup> Antoun, M. D.; Mendoza, N. T.; Ríos, Y. R.; Proctor, G. R. *Journal of Natural Products*, **1993**, 56, 1423-1425.

<sup>&</sup>lt;sup>27</sup> Rivero, N.; Gómez, M.; Medina, J. D. *Pharmaceutical Biology*, **2004**, 42, 280-285.

Rivero e colaboradores<sup>27</sup> em uma tentativa de encontrar novos alcalóides em espécies *Hymenocallis*, principalmente tipo pancratistatina, estudaram cinco espécies: *H. bolivariana* Traub., *H. guianensis* (Ker Gawler) Herb., *H. lobata* Klotzsch, *H. tubiflora* Salisb. e *H. venezuelensis* Traub. Seus extratos foram analisados por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM) resultando na identificação de nove alcalóides, sendo dois deles inéditos, anidro-pseudolicorina (**XLVI**) de *H. guianensis*, *H. lobata* e *H. tubiflora*, e 4,5-deshidro-anidropseudolicorina (**XLVII**) de *H. lobata*. Os demais foram identificadas como licoramina (**XLVIII**), galantamina (**III**), *N*-desmetil-galantamina (**XLIX**), anidrolicorina (**L**), 4,5-deshidro-anidrolicorina (**LI**), 1-*O*-acetil-pseudolicorina (**LII**), e pseudolicorina (**LIII**). Os alcalóides identificados neste estudo estão apresentados na **Figura 10**.



**Figura 10**: Alcalóides identificados por CG-EM em 5 espécies de *Hymenocallis* estudadas por Rivero e colaboradores

## 1.6.4. Gênero Hippeastrum

Este gênero apresenta problemas taxonômicos, sendo muitas vezes confundido com o gênero Amaryllis, mas o Bureau de Taxonomia decidiu oficialmente que *Amaryllis* são as espécies africanas. Portanto o gênero americano deve ser considerado como *Hippeastrum*<sup>29</sup>, sendo este distribuído principalmente na América Central e do Sul<sup>30</sup>.

A espécie *Hippeastrum vittatum*, coletada no sul do Brasil, foi investigada e desta foram isolados e identificados os alcalóides licorina (**IV**), pancracina (**VI**), montanina (**XXI**) e vitatina (**XL**)<sup>21,31</sup>. Os dois últimos alcalóides foram avaliados quanto a suas atividades citotóxicas contra linhagens de células humanas e o alcalóide **XXI** apresentou um elevado nível de citotoxicidade. Na espécie *Hippeastrum glaucescens*, coletada no nordeste do Rio Grande do Sul foram identificadas licorina (**IV**), tazetina (**XII**) e pretazetina (**LV**)<sup>32</sup>. Os alcalóides citados estão apresentados na **Figura 11**.

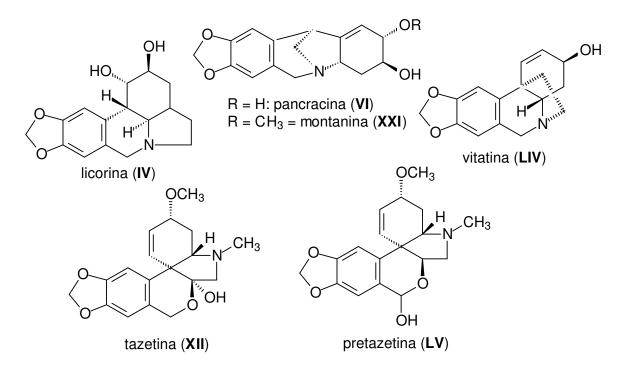


Figura 11: Alcalóides identificados em duas espécies de Hippeastrum brasileiras.

<sup>30</sup> Mügge, C.; Schablinski, B.; Obst, K.; Döpke, W. *Pharmazie*, **1994**, 49, 444-447.

<sup>&</sup>lt;sup>29</sup> Dutilh, J. H. A. **1996**. Biossistemática de quatro espécies de Hippeastrum Herb. (Amaryllidaceae). Tese de doutorado. UNICAMP (SP).

<sup>&</sup>lt;sup>31</sup> Silva, A. F. S. **2005**. *Hippeastrum vittatum* (L´Hér) Herbert e *Hippeastrum striatum* (Lam.) Moore: análise química e avaliação biológica dos alcalóides isolados. Tese de doutorado. UFMG.

<sup>&</sup>lt;sup>32</sup> Hofmann Jr., A. E.; Seben, C.; Montanha, J. A.; Dutilh, J.; Sobral, M.; Henriques, A. T.; Zuanazzi, J. A. S. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **2004**, 14, 7-14.

Estudos químicos da espécie *H. equestre* Herb, coletada em Bornova (Turkia) e Hanói (Vietnã), possibilitaram a identificação dos alcalóides: licorina (**IV**), tazetina (**XII**), hipeastrina (**XLII**), 8,9-metilenodioxifenantridina (**LV**), *N*-metilcrinasiadina (**LVI**)<sup>33</sup>, ismina (**LVII**), 11-hidroxivitatina (**XLI**), 9-*O*-desmetil-homolicorina (**LVIII**), pretazetina (**LIV**) e 3-epimacronina (**LIX**)<sup>34</sup>, (**Figura12**).

Uma espécie híbrida de *Hippeastrum*, cultivada em Berlin, foi estudada por Mügge e colaboradores<sup>30</sup> e apresentou os alcalóides licorina (**IV**), tazetina (**XII**), hipeastrina (**XLI**), haemantamina (**LX**), vitatina (**XL**), 11-hidroxivitatina (**XLI**), montanina (**XXI**) e pancracina (**VI**), (**Figura 12**).

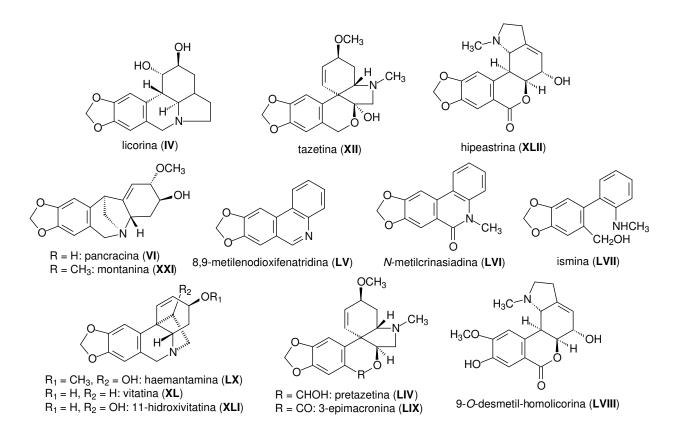


Figura 12: Alcalóides identificados em espécies de *Hippeastrum* de Hanoi e Berlim.

<sup>&</sup>lt;sup>33</sup> Döpke, W.; Pham, L. H.; Gründemann, E.; Bartoszek, M.; Flatau, S. *Pharmazie*, **1995**, 50, 511-512.

<sup>&</sup>lt;sup>34</sup> Pham, L. H.; Gründemann, E.; Döpke, W. *Pharmazie*, **1997**, 52, 160-162.

# 1.7. Biossíntese dos Alcalóides de Amaryllidaceae

Embora os alcalóides de Amaryllidaceae tenham diversos tipos estruturais, eles são todo biogeneticamente derivados da norbeladina ou de seus derivados que são produzidos em plantas a partir do aldeído aromático 3,4-diidroxibenzaldeido e da tiramina, sendo estes precursores formados a partir da fenilamina e da tirosina, respectivamente<sup>7</sup>. A formação biossintética dos precursores dos alcalóides de Amaryllidaceae está apresentada na **Figura 13**.

Os esqueletos básicos dos alcalóides desta família podem ser formados pelos seguintes processos<sup>7</sup>:

- a) acoplamento fenólico intramolecular;
- b) hidrólise biocatalítica da ligação C-N benzílica;
- c) redução da ligação C=O;
- d) oxidação de ligações C-O e C-H;
- e) O- e N-metilações.

Figura 13: Formação biossintética dos precursores dos alcalóides de Amaryllidaceae.

# 1.7.1. Esqueleto tipo-beladina

A norbeladina e seus derivados são considerados alcalóides e classificados como tipo beladina<sup>7</sup>. Estes são produzidos principalmente pela redução do produto da reação via base de Schiff e pela metilação com a *S*-adenosil-metionina (SAM)<sup>1,7</sup> (**Figura 13**).

# 1.7.2. Esqueleto tipo-galantamina

O acoplamento oxidativo fenólico intramolecular p - o na norbeladina produz um intermediário dienona, que após ciclização, resultante do ataque da hidroxila a dienona, e subsequente redução da carbonila produz o esqueleto tipo-galantamina (**Figura15**).

# 1.7.3. Esqueleto tipo-crinina

O acoplamento oxidativo fenólico intramolecular p'- p na norbeladina produz um intermediário dienona que sofre adição nucleofílica da amina, por fim a redução da carbonila produz o esqueleto tipo-crinina<sup>7</sup>. A formação do esqueleto tipo-crinina está apresentada na **Figura 15**.

# 1.7.4. Esqueleto tipo-cherilina

A adição intramolecular entre a posição p do anel aromático, rico em elétrons, e a posição benzílica da forma de quinonóide oxidada (caminho a) dá os alcalóides tipocherillina (4-ariltetraidroisoquinolina) após aromatização do seu intermediário dienona  $^7$ . A formação do esqueleto tipo-cherilina está apresentada na **Figura 15**.

# 1.7.5. Esqueleto tipo-pancracina

Os alcalóides tipo-pancracina são originados por uma rota adicional na qual o intermediário da cherilina sofre uma adição entre a amina secundária e a parte dienona<sup>7</sup>, **Figura 15**.

# 1.7.6. Esqueleto tipo-buflavina

Os alcalóides de tipo-buflavina podem ser originados de adição intramolecular da posição *p´* do anel aromático rico em elétrons com a posição *meta* da forma quinonóide

(caminho b) ou por algum outro acoplamento oxidativo fenólico intermediário<sup>7</sup>, **Figura 15**.

# 1.7.7. Esqueleto tipo-licorina

Estas estruturas são possivelmente biossintetizadas por acoplamento oxidativo fenólico intramolecular p'- o da norbeladina ou ciclização intramolecular concertada da forma iminoquinonóide; a subseqüente redução dará o esqueleto tipo-licorina (também conhecido como pirrolo[c]fenantridina)<sup>7</sup>, **Figura 15**.

# 1.7.8. Esqueleto tipo-homolicorina

Os alcalóides tipo-homolicorina são espécies derivadas dos alcalóides tipolicorina. A sua biossíntese envolve hidrólise/oxidação biocatalítica da ligação benzílica C-N dos alcalóides tipo-licorina e a ciclização do produto 7-arilindole hidrogenado produz o correspondente esqueleto tipo-homolicorina<sup>7</sup>, **Figura 15**.

# 1.7.9. Esqueleto tipo-pancratistatina

Os alcalóides tipo-pancratistatina são provavelmente derivados dos alcalóides tipo-crinina, após perda de uma unidade de dois carbonos (**Figura 15**), mas necessitase de evidências adicionais para comprovar esta hipótese<sup>7</sup>.

# 1.7.10. Esqueleto tipo-tazetina

Os alcalóides tipo-crinina quando sofrem clivagem da ligação C-N dão origem as estruturas 3a-arilindoles hidrogenadas. Um processo de oxidação da posição 3 do produto, seguido de uma ciclização com perda de água dá origem ao esqueleto tipotazetina<sup>7</sup>, **Figura 16**.

# 1.7.11. Esqueleto tipo-plicamina

Os esqueletos deste tipo seguem a mesma rota biossintética que os do tipotazetina, mas após a oxidação da posição 3 dos produtos 3a-arilindoles hidrogenados estes sofrem nova oxidação, seguida pela inserção de uma unidade tiramina dando origem aos esqueletos tipo-plicamina<sup>7</sup>, **Figura 16**.

## 1.7.12. Esqueleto tipo-gracilina

Os esqueletos deste também são originados a partir da clivagem da ligação C-N, da crinina, que dá origem as estruturas 3a-arilindoles hidrogenadas. Estas após oxigenação, ciclização e hidrogenação originam os alcalóides tipo-gracilina<sup>7</sup>, **Figura 16**.

# 1.7.13. Esqueleto tipo-augustamina

Os esqueletos deste tipo, também, são originados a partir da clivagem da ligação C-N, da crinina, que dá origem as estruturas 3a-arilindoles hidrogenadas. Estas após oxigenação e ciclização com perda de uma molécula de H<sub>2</sub>O originam os alcalóides tipo-augustamina<sup>7</sup>, **Figura 16**.

# 1.7.14. Esqueleto tipo-gracilamina

Os alcalóides com esqueleto tipo-gracilamina também são originados a partir da clivagem da ligação C-N, da crinina, que dá origem as estruturas 3a-arilindoles hidrogenadas. Estas após oxigenação, adição de uma unidade de leucina e ciclização originam os alcalóides tipo-gracilamina<sup>7</sup>, **Figura 16**.

# 1.7.15. Esqueleto tipo-cripovelina

Os dois únicos membros dos alcalóides tipo-cripovelina glicosídicas, **VII** e **VIII**, foram isoladas por pesquisadores da Bayer AG em 1997. A sua aglicona comum possui núcleo biciclo [5.3.2] que pode ser originado da clivagem oxidativa da ligação C2-C3 do agrupamento tetraidroisoquinolina no esqueleto tipo crinina<sup>7</sup>, **Figura 14**.

Figura 14: Caminho biossintético proposto para os alcalóides de tipo cripovelina<sup>7</sup>.

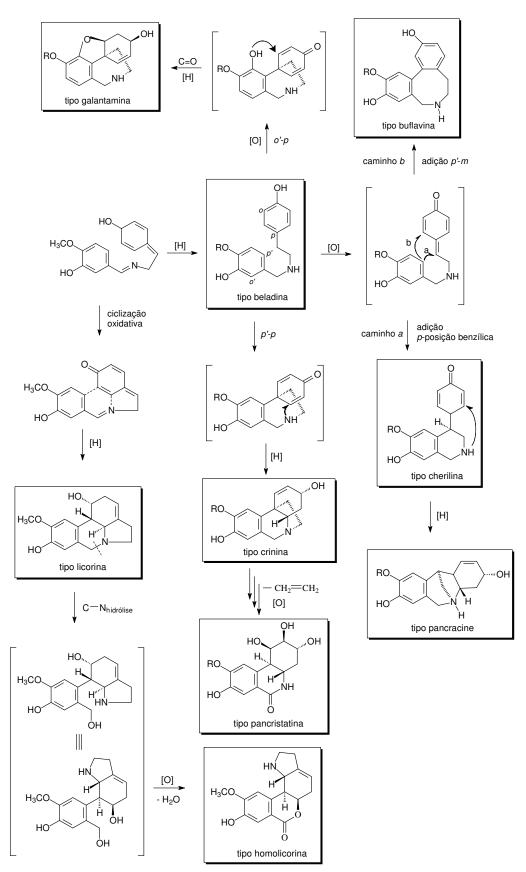


Figura 15: Caminho biossintético proposto para os alcalóides de Amaryllidaceae (parte I)<sup>7</sup>.

 $\textbf{Figura 16} : Caminho \ biossint\'etico \ proposto \ para \ os \ alcal\'oides \ de \ Amaryllidaceae \ (parte \ II)^7.$ 

## 1.8. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) foi descrita originalmente pelo neuropatologista alemão Alois Alzheimer em 1907, depois de efetuar uma autópsia em uma paciente de 55 anos, morta devido a um caso de demência, nesta ele observou uma série de anormalidades que o levaram a caracterizar esta doença<sup>35</sup>.

Nos primeiros anos do século 20 a DA era menos comum, mas de acordo com a Associação de Alzheimer, a DA é, atualmente, a causa mais comum de demência em idosos. Embora a incidência de DA seja ligeiramente variável entre diferentes grupos étnicos e populações, geralmente afeta 3% de pessoas com idade entre 65-74 anos, 19% entre 75-84 anos e 47% dos que possuem 85 anos ou mais. De acordo com a Organização Mundial de Saúde 35 milhões de pessoas em países industrializados sofrerão de DA até 2010. A expectativa é que o número de pacientes com DA aumente diretamente com a expectativa de vida e o crescimento da população idosa<sup>36</sup>.

A DA é uma desordem neurodegenerativa, que afeta as regiões cerebrais associadas às funções mentais superiores, particularmente o córtex frontal e o hipocampo $^{37}$ . As características neurodegenerativas da DA incluem mudanças patológicas no cérebro, tais como: formações de placas  $\beta$ -amilóides e emaranhados neurofibrilares $^{38}$ .

As principais conseqüências da DA são comprometimento da memória, da coordenação motora e do raciocínio, além de perda de capacidade cognitiva e demência<sup>36</sup>. A doença freqüentemente começa com perdas de memória de curto prazo, e continua com disfunção emocional e cognitiva mais generalizada<sup>35</sup>.

No final dos anos 1970 descobriu-se que os cérebros de pacientes com DA são deficientes em acetilcolina, um dos principais neurotransmissores do sistema nervoso central que serve para aumentar a atenção e facilitar a aprendizagem. Observa-se que muitos relatos de déficits cerebrais ligados a DA estão associados ao sistema colinérgico, resultando na criação da hipótese colinérgica que afirma que disfunções cognitivas, funcionais e comportamentais associadas com DA podem ser causadas por uma incapacidade de transmitir impulsos neurológicos em toda sinapse colinérgica<sup>35</sup>.

<sup>36</sup> Heinrich, M.; Teoh, H. L. *Journal of Etnopharmacology*, **2004**, 92, 147-162.

<sup>&</sup>lt;sup>35</sup> Informativo do CRIM, **2004**, 12, 1-4.

<sup>&</sup>lt;sup>37</sup> Viegas Jr., C.; Bolzani, V. S.; Furlan, M. *Química Nova*, **2004**, 27, 655-660.

<sup>&</sup>lt;sup>38</sup> Mukherjee, P. K.; Kumar, V.; Houghton, P. J. *Phytotherapy Research*, **2007**, 21, 1142-1145.

# 1.9. Tratamento da doença de Alzheimer

Entre os diferentes tipos de drogas que podem modificar a transmissão colinérgica a única classe de drogas conhecidas que apresenta eficiência no tratamento sintomático da DA são os inibidores acetilcolinesterase. Estas drogas atuam diminuindo a quebra bioquímica da acetilcolina e assim, pelo menos teoricamente prolongam a neurotransmissão colinérgica<sup>35</sup>. Compostos com estes efeitos ocorrem em plantas tradicionalmente usadas para tratar falhas na memória e outros declínios cognitivos associados à terceira idade<sup>10</sup>.

O primeiro fármaco sintético aprovado pelo FDA ("Food and Drug Administration") nos Estados Unidos para uso terapêutico, no tratamento da DA, foi a tacrina (THA, Cognex®) que demonstra efeito moderado, mas significativo no alívio dos sintomas de intensidade média e leve, entretanto sua aplicação tem sido limitada devido aos sérios efeitos colaterais. Nos Estados Unidos e Europa outros três fármacos estão sendo comercializados: donepezil (Aricept®), rivastigmina (Exelon®) e galantamina, (Reminyl®)<sup>36</sup>. As vantagens da galantamina em relação aos demais são: longa ação, seletividade, reversibilidade e competitividade, por isso é considerado o mais efetivo no tratamento de DA<sup>39</sup>. Além disso, este é utilizado como protótipo para desenvolvimento de novos fármacos anticolinesterásicos. As estruturas químicas destes fármacos estão na **Figura 17**.

Figura 17: Fármacos utilizados no tratamento da doença de Alzheimer.

A busca por produtos naturais com atividade biológica deve ter associada ao isolamento e a determinação de estruturas a possibilidade de realização de testes de atividade que sejam rápidos, não sejam caros e não exijam pessoal especializado. Os

24

<sup>&</sup>lt;sup>39</sup> Rhee, I. K.; van de Meent, M.; Ingkaninam, K.; Verpoorte, R. *Journal of Chromatography A.* **2001**, 915, 217-223.

testes descritos por Rhee *et al.*<sup>39</sup> e Marston *et al.*<sup>40</sup> para avaliação de inibição de acetilcolinesterase, em CCD, estão classificados neste grupo.

# 1.10. Caracterização de alcalóides de Amaryllidaceae por Dicroísmo Circular (DC).

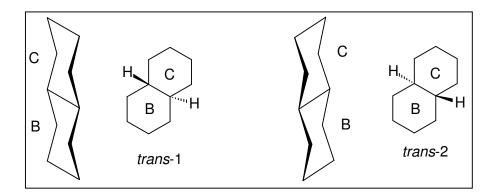
A espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC) é uma ferramenta muito utilizada em análises estereoquímicas, incluindo aspectos conformacionais e configuracionais de compostos opticamente ativos. Os espectros de DC diferem em formato, amplitude e sinal. As informações configuracionais estão usualmente relacionadas aos sinais das bandas de DC, ou seja, espectros de DC de enantiômeros são imagens especulares<sup>41</sup>.

DeAngelis e colaboradores<sup>42</sup> observaram que o formato dos espectros de DC de alcalóides de Amaryllidaceae depende da estereoquímica do carbono benzílico opticamente ativo em sistemas policíclicos rígidos, tais como o carbono 10b dos alcalóides crinina e vitatina (**Figura 20**). A configuração deste carbono cabeça de ponte (10b) é causada pelo tipo de fusão anelar, por exemplo, junção anelar B:C *trans* na crinina (**II**) e vitatina (**XLII**)<sup>41</sup>. Wagner e colaboradores<sup>41</sup> apresentaram um tratamento geral dos tipos de junção anelar B:C, dado nas **Figuras 18** e **19**. Para distinguir entre todas as possíveis configurações *trans* e *cis* das respectivas fusões anelares B:C, nas estruturas dos alcalóides usados em seu estudo, eles simplificaram todas as configurações estereoquímicas dentro do modelo de dois anéis ciclohexanos fundidos (conformação cadeira) para nomear as várias estereoconfigurações dos carbonos cabeça-de-ponte.

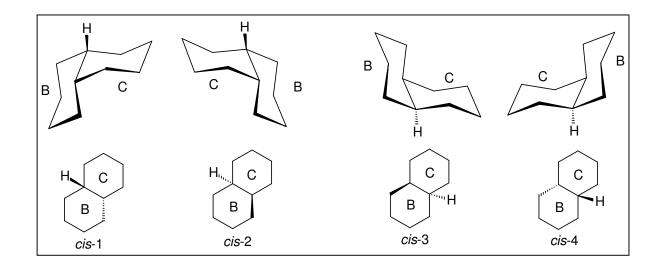
Nas **Figuras 18 e 19** estão apresentadas duas configurações *trans* (hidrogênios diaxiais) e quatro configurações *cis*.

<sup>&</sup>lt;sup>40</sup> Marston, A.; Kissling, J.; Hostettmann, K. *Phytochemical Analysis*, **2002**, 13, 51-54.

<sup>&</sup>lt;sup>41</sup> Wagner, J.; Pham, H. L.; Döpke, W. *Tetrahedron*, **1996**, 52, 6591-6600. <sup>42</sup> DeAngelis, G. G.; Wildman, W. C. *Tetrahedron*, **1969**, 25, 5099-5112.



**Figura 18**: Tipos gerais de fusão anelar B:C, *trans*, ilustradas pelo modelo de dois anéis ciclohexano fundido (conformação cadeira)<sup>35</sup>.



**Figura 19**: Tipos gerais de fusão anelar B:C, *cis*, ilustradas pelo modelo de dois anéis ciclohexano fundido (conformação cadeira)<sup>35</sup>.

Os substituintes no anel C não possuem nenhuma influência substancial sobre o formato geral do espectro de DC. A ponte 5,10b-etileno parece acentuar a rigidez do sistema policíclico, causando um aumento na magnitude de DC<sup>41</sup>.

Para exemplificar podemos observar os alcalóides **II** e **LXII**, que são enantiômeros e possuem como cromóforo dominante o grupo metilenodioxifenila, seus espectros de DC apresentam duas bandas antipodais que são imagens especulares e exibem uma sequência de sinais em -/+(294 nm/245 nm) do correspondente efeito Cotton<sup>40</sup> (**Figura 20**).

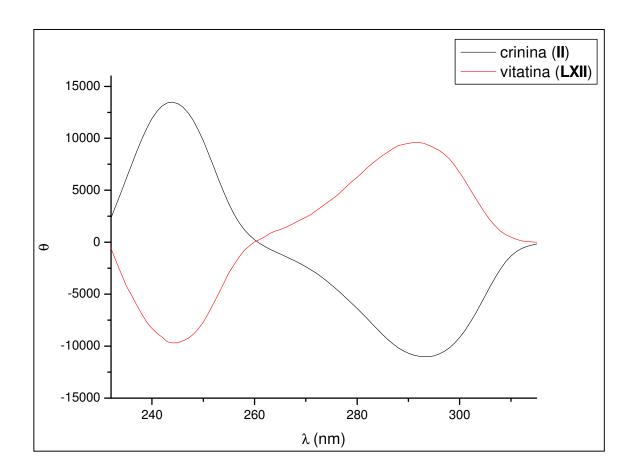


Figura 20: Estruturas dos alcalóides II e LXII e a curva de DC destes alcalóides.

### 2. JUSTIFICATIVA

A família Amaryllidaceae é conhecida por ser rica em alcalóides, por isso foi escolhida como foco deste trabalho, esperava-se que dentre estes fossem encontrados novos alcalóides que apresentassem bons resultados em testes de inibição de AChE.

Em Holambra - SP, cidade situada próxima a Campinas, algumas plantas da família Amaryllidaceae são produzidas e comercializadas para fins ornamentais, exigindo pradonização de cultivo e pouca variabilidade. Este tipo de cultivo permite a obtenção de material adicional para estudo, caso haja interesse.

As plantas escolhidas para este trabalho foram: o híbrido *Amacrinum* (*Amaryllis* x *Crinum*), *Ismene festalis* e três variedades de *Amaryllis* ("sidney", "desire" e "belladonna").

# 3. OBJETIVOS

Este trabalho foi desenvolvido com ênfase nos seguintes tópicos:

- ✓ Identificação dos alcalóides isolados utilizando as técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Dicroísmo Circular (DC), Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM) e Infravermelho (IV).
- ✓ Analise de extratos e de seus alcalóides por CG-EM, para a obtenção de um perfil cromatográfico;
- ✓ Padronização de um método, baseado no método descrito por Rhee *et al.*<sup>39</sup> para realização de teste quantitativos de inibição de AChE utilizando os extratos obtidos e os alcalóides isolados e identificados neste estudo.

#### 4. PARTE EXPERIMENTAL

#### 4.1. Materiais e Métodos

Os espectros de RMN  $^1$ H, RMN  $^{13}$ C (totalmente desacoplado e DEPT), NOE e espectros bidimensionais (gHSQC, gHMBC e gCOSY) foram obtidos em espectrômetro INOVA 500 (Varian) com campo de 11 Tesla, à temperatura ambiente. As amostras foram solubilizadas em CDCl<sub>3</sub>, com 0,03 % de tetrametilsilano (TMS), Aldrich, ou mistura de CDCl<sub>3</sub>/MeOH-d<sub>4</sub> (Aldrich). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são indicados em ppm, as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz) e ao TMS usado como padrão interno é atribuído  $\delta$  = 0.

Os espectros de Dicroísmo Circular (DC) foram obtidos em espectropolarímetro Japan Spectrometry Company (JASCO) modelo J-720, com lâmpada de Xenônio de 450 W e campo de varredura de 190 a 330 nm. As concentrações iniciais para a obtenção dos espectros foi 1 mg/mL dos alcalóides em MeOH (P. A.).

Os dados de rotação óptica  $(\alpha_D)$  foram obtidos em espectropolarímetro Perkin-Elmer modelo 341, com lâmpada de Na/Hal de 75 W e comprimento de onda 589 nm. As concentrações foram de aproximadamente 20 mg/mL dos alcalóides em metanol. Os alcalóides com pequena massa tiveram seus dados de  $\alpha_D$  obtidos no mesmo equipamento que os espectros de DC em concentração de aproximadamente 1,5 mg/mL.

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em pastilha de KBr, empregando um espectrofotômetro Perkin-Elmer 298 e 1660 FTIR.

As análises por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM) foram realizadas em um aparelho HP 5890/MS 5970, utilizando Hélio como gás de arraste, com fluxo de 1,0 mL/min., coluna capilar HP5-MS da Agilent (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), temperatura do injetor a 250 °C e detector a 280 °C. Empregou-se programa de temperatura com início em 200 °C, que permaneceu constante por 2 minutos e em seguida aumentando 10 °C/minuto até atingir 280 °C, mantida constante nos 10 minutos finais. A energia de ionização empregada foi de 70 eV. As amostras foram solubilizadas em metanol em concentração de 1mg/mL para compostos puros e 10 mg/mL para extratos, sendo o volume de injeção 1 μL.

Os espectros de massas foram obtidos a partir do Cromatograma de Íons Totais

(TIC) e comparados com os espectros de massas da biblioteca do aparelho (Wiley 275), da base de dados NIST (National Institute of Standards and Tecnology) e com propostas de fragmentações da literatura.

O fracionamento por Cromatografia em Coluna a Pressão Ambiente (CCPA) foi realizado com gel de sílica 60 (0,063 – 0,200 mm – Merck) e sistemas de eluentes CHCl<sub>3</sub>:MeOH em gradiente de polaridade. Para fracionamento por Cromatografia em Coluna a Média Pressão, tipo Flash, (CCF) utilizamos gel de sílica 60 (0,040 – 0,063 mm) da Merck e sistemas de eluentes CHCl<sub>3</sub>:MeOH em gradiente de polaridade.

As análises por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) foram realizadas em cromatoplacas de vidro com sílica gel 60 F<sub>254</sub> de 0,25 mm (Merck). As placas de CCDA foram reveladas utilizando luz ultravioleta, reagente de Dragendorff e a mistura MeOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1:1) seguidas de aquecimento em placa.

A inibição qualitativa da acetilcolinesterase (AChE) foi avaliada em Sílica gel 60 F254, 0,2 mm, suportada em alumínio (Merck) seguindo as metodologias de Rhee<sup>38</sup> e Marston<sup>39</sup>.

A purificação dos compostos por Cromatografia em Camada Delgada Semi-Preparativa (CCDSP) foi realizada em cromatoplacas de vidro com sílica gel 60  $F_{254}$  (Merck), medidas de 20 x 20 cm e espessura de 0,5 mm.

A purificação dos compostos por Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) foram realizadas em cromatoplacas de vidro com mistura de sílica gel  $GF_{254}$  (Fluka) e sílica gel  $60 HF_{254}$  (Merck), medidas de  $20 \times 20$  cm e espessura de gel 1 mm, preparadas em nosso laboratório.

A eluição das amostras nas placas foi realizada utilizando os sistemas de solventes heptano:AcOEt ou CHCl<sub>3</sub>:MeOH, associados à atmosfera de NH<sub>3</sub>, quando necessário, para uma melhor separação das substâncias nas cromatoplacas. Nas CCDSP e CCDP após a observação sob luz ultravioleta os compostos tiveram a sua área delimitada e retirados da placa por raspagem e posterior extração com sistema de solvente CHCl<sub>3</sub>:MeOH (15%), seguida de filtração a vácuo e eliminação do solvente em evaporador rotativo à pressão reduzida.

A presença de alcalóides nos extratos obtidos foi observada pelo teste de Mayer<sup>43</sup>.

Os solventes utilizados foram EtOH, MeOH, AcOEt, CHCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e heptano, analiticamente puros e/ou purificados.

Os reagentes utilizados foram sulfato de sódio anidro (Nuclear), hidróxido de amônio (Synth), bicarbonato de sódio (Nuclear), cloreto de sódio (Nuclear), ácido acético (Synth), idodeto de potássio, nitrato de bismuto monohidratado (Nuclear), Cloreto de mercúrio (Merck), trisidroxi-metil-aminometano (Vetec), cloridratado de trisidroxi-metil-aminometano (Merck), 5,5'-ditio-bis(2-ácido nitro benzóico) - DTNB (Sigma), iodeto de acetiltiocolina - ATCI (Sigma), cloreto de magnésio hexaidratado (Synth), albumina sérica bovina (BSA), acetilcolinesterase de *Electrophorus eletricus* (Sigma), sal fast blue B (Sigma-Aldrich) e acetato de 1-naftila (Acros Organic), hidrobrometo de galantamina (Sigma) e fisostigmina (Fluka).

# 4.2. Obtenção do material vegetal

O material vegetal (bulbos) foi adquirido na cidade de Holambra - (SP), junto ao produtor André Boersen que produz e comercializa plantas da família Amaryllidaceae para fins ornamentais. As espécies *Amacrinum* (catálogo nº 04) e *Ismene festalis* (catálogo nº 23) foram adquiridas nos meses de agosto e novembro de 2005, respectivamente. Os bulbos das espécies *Amaryllis*: "sidney" (catálogo nº 06), "desire" (catálogo nº 06) e "belladonna" (catálogo nº 05), foram adquiridas no mês de agosto de 2007.

# 4.3. Obtenção dos extratos EtOH e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> das espécies de Amaryllidaceae

Os bulbos, das espécies adquiridas, foram cortados em pequenos pedaços, secos em estufa com circulação de ar a 40 °C e moídos. As extrações foram realizadas em aparelhagem Soxhlet, sendo que as espécies *Amacrinum* e *Ismene festalis* foram extraídas com EtOH e as três variedades de *Amaryllis* "sidney", "desire" e "belladonna" foram extraídas inicialmente com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e depois com EtOH. Os processos extrativos

<sup>&</sup>lt;sup>43</sup> Ugaz, O. L. *Investigation Fitoquimica*, **1988**, Pontificia Universidad Catolica Del Peru – Fondo Editorial, p. 192.

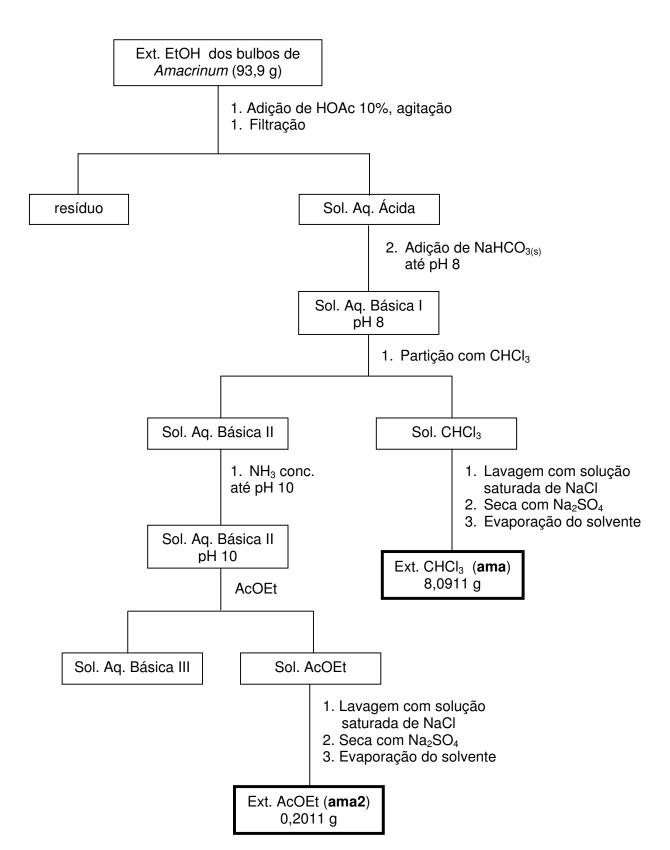
foram mantidos até teste de Mayer negativo. Os extratos foram concentrados, em evaporador rotativo à pressão reduzida e as massas estão apresentadas na **Tabela 1**.

**Tabela 1**. Espécies de Amaryllidaceae estudadas e massa dos extratos.

Espécie (bulbos)	Peso	Peso seco	Massa dos extratos (g)	
	fresco (g)	(g)	EtOH	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
Amacrinum	3.297,0	1.018,0	93,9	-
Ismene festalis	4.980,0	1.328,0	49,7	-
Amaryllis "sidney"	1.534,7	224,1	13,4	3,9
Amaryllis "desire"	1.160,0	134,9	13,3	2,3
Amaryllis "belladonna"	1.157,5	156,3	14,8	2,1

# 4.4. Extração ácido-base do extrato EtOH dos bulbos de Amacrinum

O extrato EtOH (93,9 g) dos bulbos de *Amacrinum* (**Tabela 2**) foi submetido à extração ácido-base, direcionada para o isolamento de seus alcalóides, conforme o **Esquema 1**, fornecendo os extratos **CHCI**<sub>3</sub> e **AcOEt**, codificados como **ama** e **ama2**, respectivamente.



**Esquema 1**: Fracionamento ácido-base, dirigido à obtenção de extratos ricos em alcalóides dos bulbos de *Amacrinum*.

# 4.5. Isolamento dos alcalóides de Amacrinum

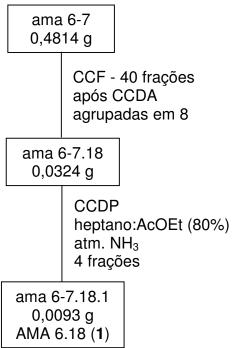
O isolamento dos alcalóides foi realizado a partir de 5,0 g do extrato **ama** (**Esquema 1**), que foi fracionado por CCF, em coluna com 50 mm de diâmetro e 18 cm de altura, resultando em 72 frações, que depois de analisadas por CCDA foram reagrupadas em 21 frações. Após serem reunidas as frações receberam um código que representa o extrato estudado e as frações reunidas, como apresentado na **Tabela 2**.

**Tabela 2**: Fracionamento do **extrato ama** de *Amacrinum*.

Código	Massa (g)	Eluente	
ama 1-4	0,0056	CHCl <sub>3</sub> : MeOH (2%)	
ama 5	0,0189	u	
ama 6-7	0,4814	"	
ama 8-12	0,3250	ű	
ama 13-14	0,1885	ű	
ama 15-17	0,2448	и	
ama 18-19	0,0876	CHCl₃: MeOH (5%)	
ama 20-21	0,1307	"	
ama 22-24	0,8140	ű	
ama 25-26	0,2340	ű	
ama 27-29	0,0708	и	
ama 30-36	0,3412	"	
ama 37-46	0,4777	и	
ama 47-57	0,2427	CHCl <sub>3</sub> : MeOH (10%)	
ama 58-61	0,1309	ű	
ama 62	0,2043	CHCl₃: MeOH (15%)	
ama 63	0,2862	"	
ama 64-66	0,4759	CHCl <sub>3</sub> : MeOH (20%)	
ama 67-68	0,0723	CHCl <sub>3</sub> : MeOH (25%)	
ama 69	0,0163	и	
ama 70-72	0,0355	и	
Total recuperado	4,8843 ou 98%		

#### 4.5.1. Purificação da fração ama 6-7

A fração ama 6-7 (0,4814 g), **Tabela 3**, foi submetida à CCF, em coluna com 25 mm de diâmetro, obtendo-se 40 frações, de 20 mL cada, que foram reagrupadas em 8 frações, de acordo com suas características em CCDA. O Esquema 2 mostra a purificação da fração ama 6-7 por CCF e CCDP. Desta fração isolamos o alcalóide AMA 6.18 (1) – beladina.



Esquema 2: Fracionamento de ama 6-7.

 $C_{19}H_{25}NO_3 - MM 315.411$ 

Isolado de: Nerine filifolia<sup>15</sup>, Nerine bowdenii W. Wats.<sup>44</sup> e Crinum latifolium<sup>45</sup>

Descrição física: sólido amarelo

<sup>44</sup> Lyle, R. E.; Kielar, E. A.; Crowder, J. R.; Wildman, W. C. *Journal of the Americam Chemical Society*, **1960**, 82, 2620-2625.

<sup>45</sup> Ghosal, S.; Saini, K. S.; Arora, V. K. *Journal of Chemical Research*, **1983**, S, 238-239.

RMN <sup>1</sup>H: **Esp. 1**, pág. 70; **Tabela 11**, pág. 69.

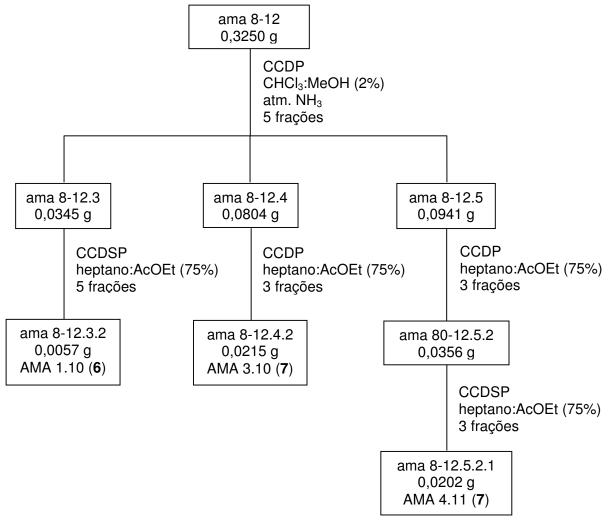
RMN <sup>13</sup>C: **Esp. 4**, pág. 71; **Tabela 11**, pág. 69.

DEPT, HSQC, COSY e HMBC – **Esp. 5**, pág. 72; **Esp. 6**, pág. 72; **Esp. 9**, pág. 74., **Esp. 10**, pág. 74.

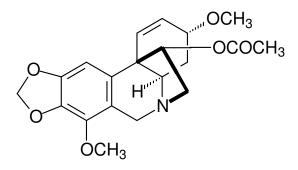
EM: **Esp. 14**, pág. 76, [*m/z* (%)]: 151 (100) e 194 (32).

# 4.5.2. Purificação da fração ama 8-12

A fração ama 8-12 (0,3250 g), **Tabela 3**, foi aplicada em 3 placas de CCDP, eluída com heptano:AcOEt (75%), em atmosfera de NH<sub>3</sub>, resultando em 8 novas frações, sendo que três destas sofreram novas purificações por CCDSP e CCDP. A purificação da fração ama 8-12 está apresentada no **Esquema 3**. Neste fracionamento isolamos os alcalóides AMA 1.10 (**6**), AMA 3.10 (**7**) e AMA 4.11 (**7**).



Esquema 3: Fracionamento de ama 8-12.



AMA 1.10: 11-O-acetil-ambelina (6)

 $C_{20}H_{23}NO_6 - MM 373$ 

Isolado dos bulbos de: *Nerine filifolia*<sup>15</sup>, *Ammocharis tinneana*<sup>46</sup>, *Brunsvigia josephinae*<sup>47</sup>.

Descrição física: sólido branco amorfo

RMN <sup>1</sup>H: **Esp. 78**, pág. 140; **Tabela 18**, pág. 139.

RMN <sup>13</sup>C: **Esp. 82**, pág. 142; **Tabela 18**, pág. 139.

DEPT, HSQC, COSY e HMBC: **Esp. 83**, pág. 142; **Esp. 84**, pág. 143; **Esp. 86**, pág. 144 e **Esp. 88**, pág. 145.

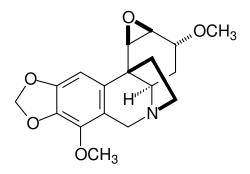
EM: **Esp. 89**, pág. 145,  $[m/z\ (\%)]$ : 211 (25), 241 (27), 254 (56), 270 (23), 282 (45), 214 (64) e 373  $[M^{+}]$  (100).

DC (em MeOH):  $[\theta]_{252}$  + 4.206,68;  $[\theta]_{282}$  - 2.639,61, **Figura 58**, pág. 195.

Rotação óptica: - 15° (c, 0,5 mg/mL, CHCl<sub>3</sub>)

<sup>&</sup>lt;sup>46</sup> Machocho, A.; Chhabra, S. C.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J. *Phytochemistry*, **1999**, 51, 1185-1191.

<sup>&</sup>lt;sup>47</sup> Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J.; Mathee, S.; Campbell, W. E. *Phytochemistry*, **1995**, 40, 961-965.



AMA 3.10, AMA4.11, AMA 9.28, AMA 11.30: undulatina (7)

 $C_{18}H_{21}NO_5 - MM 331$ 

Isolado dos bulbos de: Nerine filifolia<sup>15</sup>, Crinum macowanni<sup>16</sup>, Nerine bowdenii W. Wats<sup>44</sup>, Ammocharis tinneana<sup>46</sup>, Brunsvigia josephinae<sup>47</sup>, Crinum moorei<sup>48</sup>, Brunsvigia orientalis<sup>49</sup>, Amaryllis belladonna<sup>20</sup>.

Descrição física: cristais incolores em formato de agulha

IV: **Esp. 51**, pág. 117, (pastilha de KBr)  $v_{\text{máx.}}$  (cm<sup>-1</sup>): 3.433, 2.942, 1.666, 1.476, 1.398, 1279, 1.210, 1.083, 1.049, 923, 805.

RMN <sup>1</sup>H: **Esp. 52**, pág. 117; **Tabela 16**, pág. 116.

RMN <sup>13</sup>C: **Esp. 54**, pág. 118; **Tabela 16**, pág. 116.

DEPT, HSQC e COSY: **Esp. 55**, pág. 119; **Esp. 56**, pág. 119 e **Esp. 58**, pág. 120.

EM: **Esp. 63**, pág. 123, [m/z (%)]: 205 (36), 215 (8), 272 (6), 286 (15), 302 (11), 300 (10), 316 (7) e 331 $[M^{+}]$  (100).

DC (em MeOH):  $[\theta]_{250} + 3.592,56$ ;  $[\theta]_{285} - 374,02$ ; **Figura 56**, pág. 194.

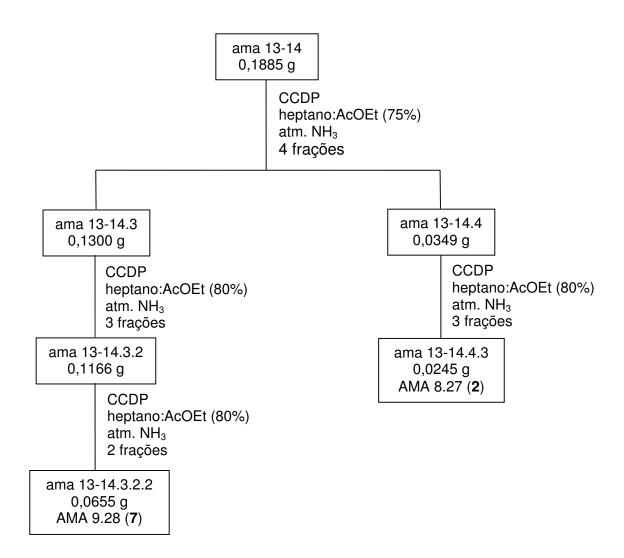
Rotação óptica: - 47° (c, 18 mg/mL, CHCl<sub>3</sub>).

# 4.5.3. Purificação da fração ama 13-14

A fração ama 13-14 (0,1885 g), **Tabela 3**, foi aplicada em 2 placas de CCDP, eluída com heptano:AcOEt (75%), em atmosfera de NH<sub>3</sub>, duas das novas frações que sofreram purificações por CCDP. A purificação da fração ama 13-14 está apresentada no **Esquema 4**. Desta fração isolamos AMA 9.28 (**7**) e AMA 8.27 (**2**).

<sup>&</sup>lt;sup>48</sup> Fennell, C. W.; Elgorashi, E. E.; van Staden, J. *Journal of Natural Products*, **2003**, 66, 1524-1526

<sup>&</sup>lt;sup>49</sup> Viladomat, F. Almanza, G. R.; Codina, c.; Bastida, J.; Campbell, W. E.; Mathee, S. *Phytochemistry*, **1996**, 43, 1379.



Esquema 4: Fracionamento de ama 13-14.

AMA 8.27 e AMA 10.30: N-desmetilbeladina (2)

 $C_{17}H_{23}NO_3 - MM 301$ 

Isolado dos bulbos de: Nerine filifolia<sup>15</sup>

Descrição física: sólido amarelo

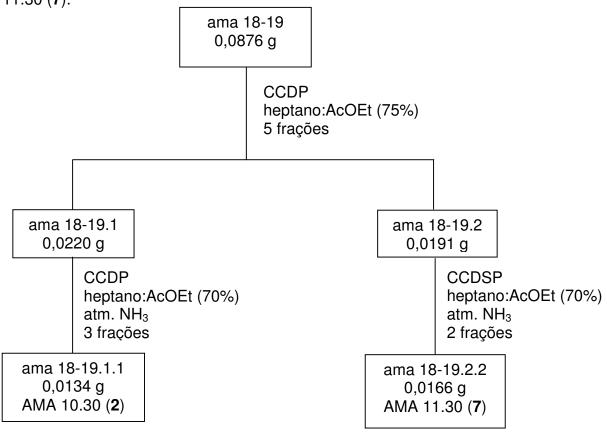
RMN <sup>1</sup>H: **Esp. 15**, pág. 81; **Tabela 13**, pág. 80. RMN <sup>13</sup>C: **Esp. 17**, pág. 83; **Tabela 13**, pág. 80.

DEPT, HSQC, COSY e HMBC: **Esp. 18**, pág. 82; **Esp. 19**, pág. 83; **Esp. 22**, pág. 84, **Esp. 23**, pág. 85.

EM: **Esp. 24**, pág. 85, [m/z (%)]: 151 (100) e 180 (18).

# 4.5.4. Purificação da fração ama 18-19

A fração ama 18-19 (0,0876 g), **Tabela 3**, foi aplicada em 1 placa de CCDP, eluída com heptano:AcOEt (75%) resultando em 5 novas frações e duas destas sofreram novas purificações por CCDP. A purificação da fração ama 18-19 está apresentada no **Esquema 5**. Deste fracionamento isolamos AMA 10.30 (**2**) e AMA 11.30 (**7**).

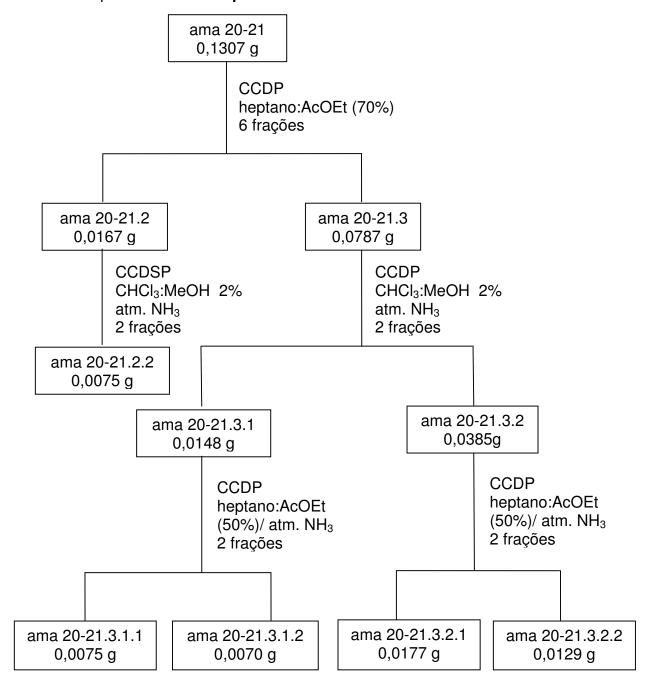


**Esquema 5**: Fracionamento de ama 18-19.

# 4.5.5. Purificação da fração ama 20-21

A fração ama 20-21 (0,1307 g), **Tabela 3**, foi aplicada em duas placas de CCDP, eluída com heptano:AcOEt (80%) resultando em 6 novas frações, sendo que duas destas sofreram novas purificações por CCDSP e CCDP. A purificação da fração ama

#### 20-21 está apresentada no Esquema 6.



Esquema 6: Fracionamento de ama 20-21.

As frações 20-21.2.2, 20-21.3.1.1 e 20-21.3.2.1, purificadas conforme o **Esquema 6**, foram analisadas por CCDA, reunidas, denominada AMA 13.34 e identificada como o alcalóide **4**.

AMA 13.34 e AMA 15.40: bufanidrina (4)

 $C_{18}H_{21}NO_4 - MM 315$ 

Isolado dos bulbos de: *Nerine bowdenii* W. Wats<sup>44</sup>, *Ammocharis tinneana*<sup>46</sup>, *Brunsvigia josephinae*<sup>47</sup>, *Crinum macowanii*<sup>16</sup>.

Descrição física: cristais incolores em formato de agulha

RMN <sup>1</sup>H: **Esp. 40**, pág. 106; **Tabela 15**, pág. 105.

RMN <sup>13</sup>C: **Esp. 43**, pág. 107; **Tabela 15**, pág. 105.

DEPT, HSQC, COSY e HMBC: **Esp. 44**, pág. 108; **Esp. 45**, pág. 108; **Esp. 47**, pág. 109, **Esp. 49**, pág. 110.

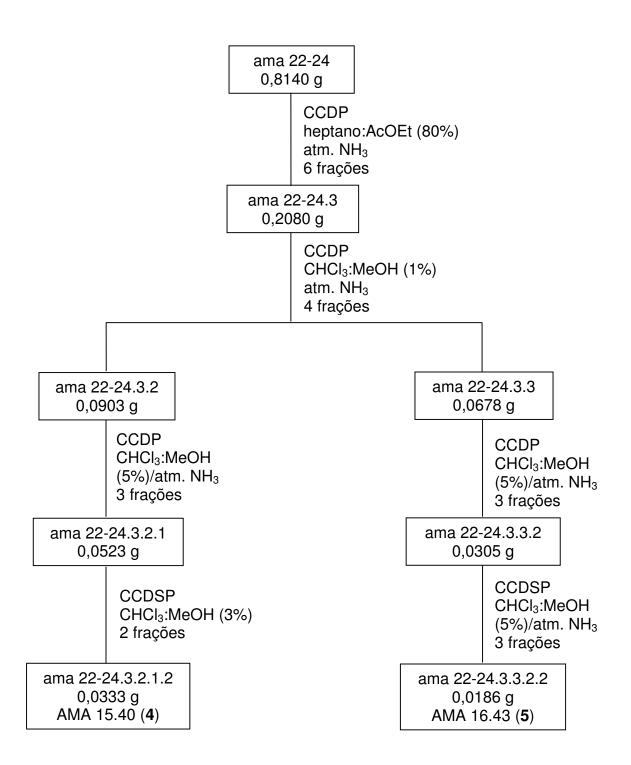
EM: **Esp. 50**, pág. 111,  $[m/z \ (\%)]$ :245 (46), 260 (28), 284 (35), 300 (28) e 315  $[M^{+}]$  (100).

DC (em MeOH):  $[\theta]_{250} + 5.455,52$ ;  $[\theta]_{286} - 2.279,96$ ; **Figura 56**, pág. 194.

Rotação óptica: - 27° (c, 19 mg/mL, CHCl<sub>3</sub>).

# 4.5.6. Purificação da fração ama 22-24

A fração ama 22-24 (0,8140 g), **Tabela 3**, foi aplicada em 7 placas de CCDP, eluída com heptano:AcOEt (80%), em cuba com atmosfera de NH<sub>3</sub>, resultando em 6 novas frações, sendo que a fração ama 22-24.3 sofreu nova purificação por CCDP e duas de suas frações foram repurificadas por CCDP e CCDSP. A purificação da fração ama 22-24 está apresentada no **Esquema 7**. Este fracionamento resultou no isolamento dos alcalóides AMA 15.40 (**4**) e AMA 16.43 (**5**).



Esquema 7: Fracionamento de ama 22-24.

AMA 16.43: 1-*O*-acetil-licorina (**5**)

 $C_{18}H_{19}NO_5 - MM 329$ 

Isolado dos bulbos de: Crinum moorei, Nerine bowdenii W. Wats<sup>44</sup>, Crinum kirkii<sup>19</sup>

Descrição física: sólido amorfo amarelo

IV: **Esp. 105**, pág. 164, (pastilha de KBr)  $\nu_{\text{máx.}}$  (cm<sup>-1</sup>): 3.444, 2.878, 1734, 1.505, 1483, 1.246, 1.040.

RMN <sup>1</sup>H: **Esp. 106**, pág. 164; **Tabela 20**, pág. 163.

RMN <sup>13</sup>C: **Esp. 109**, pág. 166; **Tabela 20**, pág. 163.

DEPT, HSQC, COSY e HMBC: **Esp. 110**, pág. 166; **Esp. 111**, pág. 167; **Esp. 112**, pág. 167 e **Esp. 114**, pág.168.

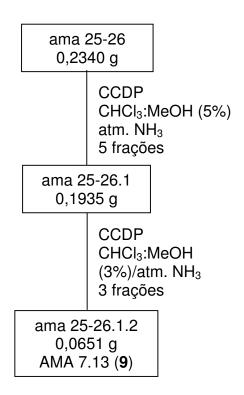
EM: **Esp. 118**, [m/z (%)]: 226 (100), 227(79), 240 (13), 250, 27(), 268 (38), 329 [M<sup>+-</sup>] (44).

DC (em MeOH):  $[\theta]_{244}$  + 5.946,66;  $[\theta]_{291}$  – 5.743,47; **Figura 60**, pág. 196.

Rotação óptica: - 116° (c, 1,6 mg/mL, CHCl<sub>3</sub>)

# 4.5.7. Purificação da fração ama 25-26

A fração ama 25-26 (0,2340 g), **Tabela 3**, foi aplicada em duas placas de CCDP e eluída com CHCl<sub>3</sub>:MeOH (5%), em cuba com atmosfera de NH<sub>3</sub>. A fração ama 25-26.1 foi purificada, também, por CCDP como apresentado no **Esquema 8**.



Esquema 8: Fracionamento por CCDP de ama 25-26.

AMA 7.13: bufanisina (9)

C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub> - MM 285

Isolado dos bulbos de: *Nerine bowdenii* W. Wats<sup>44</sup>, *Ammocharis tinneana*<sup>7</sup>, *Crinum moorei*<sup>10</sup>, *Crinum amabile*<sup>50</sup>, *Crinum bulbispermum*<sup>51</sup>

Descrição física: cristais incolores em formato de agulha

IV: **Esp. 90**, pág. 151; (pastilha de KBr)  $\nu_{m\acute{a}x.}$  (cm<sup>-1</sup>): 3.436, 2.955, 2987, 1635, 1615, 1508, 1.480, 1231, 1034, 931.

<sup>&</sup>lt;sup>50</sup> **a)** Pham, L. H.; Döpke, W.; Wagner, J.; Mügge, C. *Phytochemistry*, **1998**, 48, 371-376. **b)** Likhitwitayawuid, K.; Angerhofer, C. K.; Chai, H.; Pezzuto, J. M.; Cordell. G. A. *Journal of Natural Products*, **1993**, 56, 1331-1338.

<sup>&</sup>lt;sup>51</sup> Ali, A. A.; Ramadan, M. A.; Frahm, A. W. *Planta Medica*, **1984**, 50, 424-427.

RMN <sup>1</sup>H: **Esp. 91**, pág. 151; **Tabela 19**, pág. 150.

RMN <sup>13</sup>C: **Esp. 95**, pág. 153; **Tabela 19**, pág. 150.

DEPT, HSQC, COSY e HMBC: **Esp. 96**, pág. 154; **Esp. 97**, pág. 154; **Esp. 98**, pág. 155 e **Esp. 99**, pág. 155.

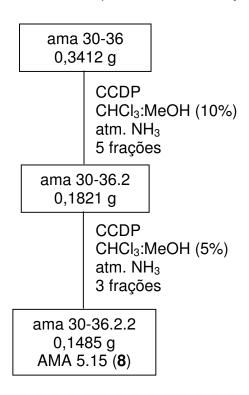
EM: **Esp. 104**, pág. 158 [m/z (%)]:215 (44), 216 (13), 230(12), 254 (28), 279 (11), 285 [M<sup>+-</sup>] (100).

DC (em MeOH):  $[\theta]_{244} + 10.612,60$ ;  $[\theta]_{293} - 11.021,91$ , **Figura 54**, pág. 193.

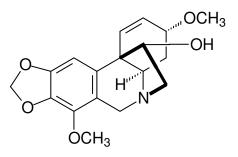
Rotação óptica:  $[\alpha]_D = -27^\circ$  (c, 19 mg/mL, CHCl<sub>3</sub>)

## 4.5.8. Purificação da fração ama 30-36

A fração ama 30-36 (0,3412 g), **Tabela 3**, foi aplicada em 4 placas de CCDP, eluída com CHCl<sub>3</sub>:MeOH (10%), em cuba com atmosfera de NH<sub>3</sub>, resultando em 6 novas frações, sendo que a fração ama 30-36.2 sofreu nova purificação por CCDP. A purificação da fração ama 30-36 está apresentada no **Esquema 9**.



Esquema 9: Fracionamento por CCDP de ama 30-36.



AMA 5.15: ambelina (8)

 $C_{18}H_{21}NO_5 - MM 331$ 

Isolado dos bulbos de: *Nerine bowdenii* W. Wats<sup>44</sup>, *Nerine filifolia*<sup>16</sup>, *Ammocharis tinneana*<sup>46</sup>, *Crinum amabile*<sup>50</sup>, *Crinum bulbispermum*<sup>15</sup>, *Brunsvigia littoralis*<sup>52</sup>

Descrição física: sólido amorfo amarelo

IV: **Esp. 64**, pág. 129 (pastilha de KBr)  $v_{\text{máx.}}$  (cm<sup>-1</sup>): 3.433, 3.084, 2927, 1.618, 1482, 1.404, 1.098, 1.060, 1.038.

RMN <sup>1</sup>H: **Esp. 65**, pág. 129; **Tabela 17**, pág. 128.

RMN <sup>13</sup>C: **Esp. 68**, pág. 131; **Tabela 17**, pág. 128.

DEPT, HSQC, COSY e HMBC: **Esp. 69**, pág. 131; **Esp. 70**, pág. 8; **Esp. 72**, pág. 133 e **Esp. 74**, pág. 134.

EM: **Esp. 77**, pág. 135, [m/z (%)]: 211 (38), 241 (40), 270 (32), 287 (92), 298 (34) e 331[M<sup>+-</sup>] (91).

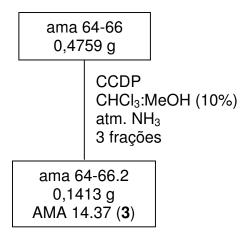
DC (em MeOH):  $[\theta]_{253} + 703,67$ ;  $[\theta]_{282} - 2.639,61$ ; **Figura 58**, pág. 195.

Rotação óptica:  $[\alpha]_D = +36^{\circ}$  (c, 20 mg/mL, CHCl<sub>3</sub>)

# 4.5.9. Purificação da fração ama 64-66

A fração ama 64-66 (0,4759 g), **Tabela 3**, foi aplicada em 5 placas de CCDP, eluída com CHCl<sub>3</sub>:MeOH (75%), em cuba com atmosfera de NH<sub>3</sub>, resultando em 3 novas, sendo que a fração ama 64-66.2 foi codificada como AMA 14.37 e identificada como alcalóide **3**. A purificação da fração ama 64-66 está apresentada no **Esquema 10**.

<sup>&</sup>lt;sup>52</sup> Campbell, W. E.; Nair, J. J.; Gammon, D. W.; Bastida, J.; Codina, C.; Viladomat, F.; Smith, P. J.; Albrecht, C. F. *Planta Medica*, **1998**, 64, 91-93.



Esquema 10: Fracionamento por CCDP de ama 64-66.

 $C_{16}H_{17}NO_3 - MM 271$ 

Isolado dos bulbos de: *Crinum kirkii*<sup>19</sup>, *Crinum moorei*, *Nerine bowdenii* W. Wats<sup>44,48</sup>, *Brunsvigia josephinae*<sup>47</sup>, *Ammocharis tinneana*<sup>46</sup>, *Crinum bulbispermum*<sup>51</sup>, Brunsvigia littoralis<sup>52</sup>

Descrição física: cristais incolores em formato de agulha

IV: **Esp. 25**, pág. 93, (pastilha de KBr)  $v_{\text{máx.}}$  (cm<sup>-1</sup>): 3.147, 2.910, 2.874, 1.618, 1.502, 1.482, 1.251, 1.233, 1.033, 931, 847.

RMN <sup>1</sup>H: **Esp. 26**, pág. 93; **Tabela 14**, pág. 92.

RMN <sup>13</sup>C: **Esp. 30**, pág. 95; **Tabela 14**, pág. 92.

DEPT, HSQC, COSY e HMBC: **Esp. 31**, pág. 96; **Esp. 32**, pág. 96; **Esp. 35**, pág. 98 e **Esp. 36**, pág. 98.

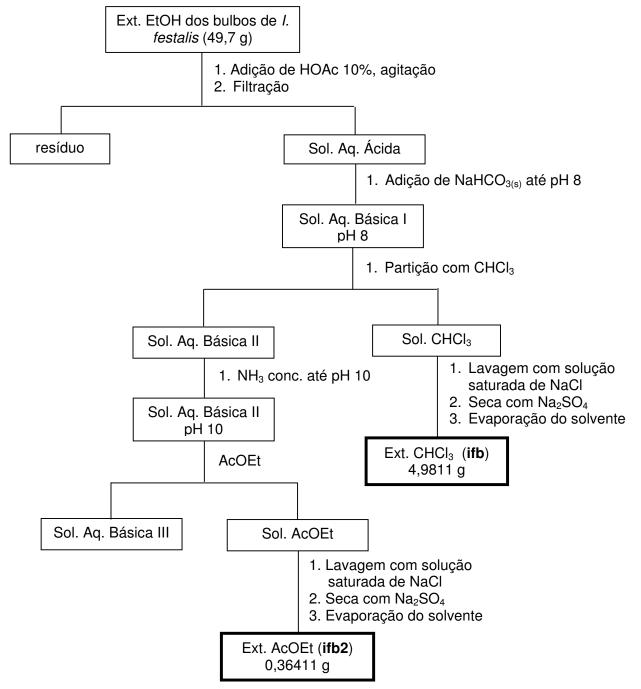
EM: **Esp. 39**, pág. 100 [m/z (%)]: 157 (8), 187 (36), 199 (44), 215 (10), 228 (20), 242 (12) 252 (13), 254 (12), 271 [M<sup>+-</sup>] (100)

DC (em MeOH):  $[\theta]_{244}$  + 10.612,60;  $[\theta]_{293}$  – 8.651,95; **Figura 54**, pág.193.

Rotação óptica:  $[\alpha]_D = -18^{\circ}$  (c, 20 mg/mL, CHCl<sub>3</sub>)

# 4.6. Extração ácido-base do extrato EtOH dos bulbos de *Ismene* festalis

O extrato EtOH (49,7 g) dos bulbos de *I. festalis* foi submetido à extração ácidobase, conforme o **Esquema 11**, fornecendo os **extratos CHCI<sub>3</sub>** e **AcOEt** que foram codificados como **ifb** e **ifb2**, respectivamente.



**Esquema 11**: Fracionamento ácido-base, dirigida à obtenção de extratos ricos em alcalóides dos bulbos de *I. festalis*.

# 4.7. Isolamento dos alcalóides de Ismene festalis

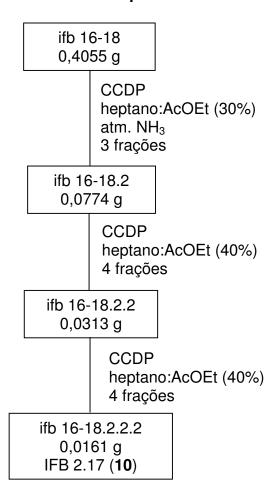
O isolamento dos alcalóides foi realizado a partir de 3,8 g do extrato **ifb** (**Esquema 11**), que foi fracionado por CCF, em coluna com 50 mm de diâmetro e 19 cm de altura, resultando em 90 frações, que depois de analisadas por CCDA foram reagrupadas em 21 frações. Após serem reunidas as frações receberam um código que representa o extrato estudado e as frações reunidas, como apresentado na **Tabela 3**.

Tabela 3. Fracionamento do extrato ifb de Ismene festalis.

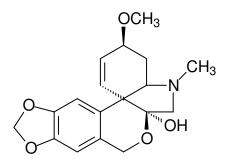
Código	Massa (g)	Eluente
ifb 1-3	0,0387	CHCl <sub>3</sub> :MeOH (2%)
ifb 4	0,0212	ű
ifb 5-8	0,1536	ű
Ifb 9-11	0,0019	u
ifb 12-14	0,0069	ű
ifb 15	0,0080	ű
ifb 16-18	0,4055	ű
ifb 19-21	0,1995	ű
ifb 22-24	0,0620	CHCl₃:MeOH (5%)
ifb 25-26	0,0209	ű
ifb 27-28	0,0259	и
ifb 29-34	0,0656	и
Ifb 35-41	0,3400	CHCl₃:MeOH (10%)
ifb 42-52	0,2492	u
ifb 53-57	0,2050	CHCl₃:MeOH (15%)
Ifb 58-62	0,1242	ű
ifb 63-66	0,0401	u
ifb 67-68	0,0137	u
ifb 69-73	0,0328	ű
ifb 74-78	0,0464	ű
Ifb 79-90	1,0984	CHCl₃:MeOH (20%)
Total recuperado	3,1595 g ou 83%	

# 4.7.1. Purificação da fração ifb 16-18

A fração ifb 16-18 (0,4055 g), **Tabela 4**, foi aplicada em 4 placas de CCDP, eluída com heptano:AcOEt (30%), em cuba com atmosfera de NH<sub>3</sub>, resultando em 3 novas, sendo que duas de suas frações foram repurificadas por CCDP. A purificação da fração ifb 16-18 está apresentada no **Esquema 12**.



Esquema 12: Fracionamento de ifb 16-18.



IFB 1.09 e IFB 2.17: tazetina (**10**)

 $C_{18}H_{21}NO_5 - MM 331$ 

Isolado dos bulbos de: Himenocallis expansa<sup>28</sup>, Hippeastrum glaucens<sup>32</sup>, Hippeastrum eqüestre Herb.<sup>33,53</sup>, Hippeastrum (híbrido)<sup>30</sup>, Galanthus gracilis<sup>4</sup>, Galanthus caucasicus, Cyrtanthus breviflorus, Narcissus bulbocodium<sup>7</sup>, Sprekelia formosissima<sup>54</sup>

Descrição física: cristais incolores em formato de agulha

IV: **Esp. 118**, pág.175 (pastilha de KBr)  $v_{\text{máx.}}$  (cm<sup>-1</sup>): 3.350, 2.972, 2.942, 2.491, 1.658, 1.501, 1.488, 1.460.

RMN <sup>1</sup>H: **Esp. 119**, pág. 175; **Tabela 22**, pág. 174.

RMN <sup>13</sup>C: **Esp. 122**, pág. 177; **Tabela 22**, pág. 174.

DEPT, HSQC, COSY e HMBC: **Esp. 123**, pág. 177; **Esp. 125**, pág. 178; **Esp. 126**, pág. 179, **Esp. 127**, pág. 179.

DC (em MeOH):  $[\theta]_{240}$  + 30.677,48;  $[\theta]_{290}$  – 3.330,11; **Figura 62**, pág. 197.

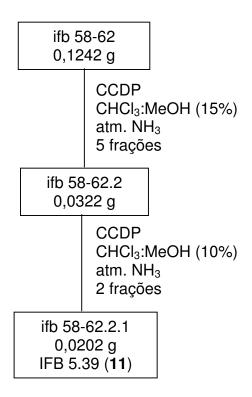
Rotação óptica: +135° (c, 22 mg/mL, CHCl<sub>3</sub>)

# 4.7.2. Purificação da fração ifb 58-62

A fração ifb 58-62 (0,1242 g), **Tabela 4**, foi aplicada em 2 placas de CCDP, eluída com CHCl<sub>3</sub>:MeOH (15%), em cuba com atmosfera de NH<sub>3</sub>, resultando em 5 frações, sendo que ifb 58-62.2 sofreu nova purificação por CCDP. A purificação da fração ifb 58-62 está apresentada no **Esquema 13**.

<sup>&</sup>lt;sup>53</sup> Pham, L. H.; Gründemann, E.; Wagner, J.; Bartozek, M.; Döpke, W. *Phytochemistry*, **1999**, 51, 327.

<sup>&</sup>lt;sup>54</sup> Hohmann, J.; Forgo, P.; Molnár, J.; Wolfard, K.; Molnár, A.; Thalhammer, T.; Máthé, I.; Sharples, D. *Planta Medica*, **2002**, 68, 452-454.



Esquema 13: Fracionamento de ifb 58-62.

IFB 5.39: haemantidina (11)

 $C_{17}H_{19}NO_5 - MM 317$ 

Isolado dos bulbos de: Himenocallis expansa<sup>28</sup>, Pancratium sickenbergeri<sup>55</sup>, Pancratium maritimum<sup>56</sup>, Zephyranthes citrina<sup>57</sup>, Sprekelia formosissima<sup>54</sup>

Descrição física: sólido branco amorfo

IV: **Esp. 129**, pág. 184, (pastilha de KBr)  $v_{\text{máx.}}$  (cm<sup>-1</sup>): 3.421, 2.923, 2.897, 1.503, 1.483, 932.

RMN <sup>1</sup>H: **Esp. 130**, pág. 184; **Tabela 23**, pág. 183.

<sup>55</sup> Abou-Donia, A. H.; Amer, M. E.; Darwish, F. A.; Kassen, F. F.; Hammoda, H. M.; Abel-Kader, M. S.; Zhou, B. N.; Kingston, D. G. I. *Planta Medica*, **2002**, 68, 377-381.

<sup>&</sup>lt;sup>56</sup> Tato, M. P. V.; Castedo, L.; Riguera, R. *Heterocycles*, **1988**, 27, 2833-2838.

<sup>&</sup>lt;sup>57</sup> Herrera, M. R.; Machocho, A. K.; Brun, R.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J. *Planta Medica*, **2001**, 67, 191-193.

RMN <sup>13</sup>C: **Esp. 133**, pág.186; **Tabela 22**, pág. 183.

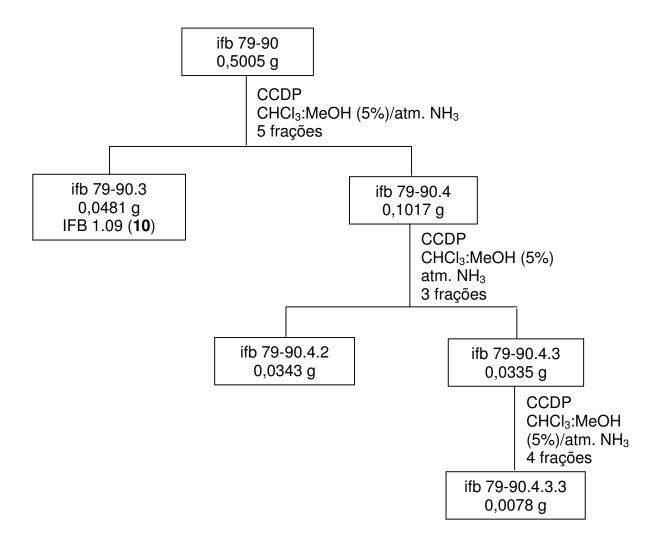
DEPT, HSQC, COSY e HMBC: **Esp. 134**, pág. 186; **Esp. 135**, pág.187; **Esp. 137**, pág. 188, **Esp. 139**, pág. 189.

DC (em MeOH):  $[\theta]_{244}$  - 9.692,90;  $[\theta]_{292}$  + 9.588,31; **Figura 54**, pág. 193.

Rotação óptica: - 8° (c 1,5 mg/mL, CHCl<sub>3</sub>)

# 4.7.3. Purificação da fração ifb 79-90

A fração ifb 79-90 (1,0984 g), **Tabela 4**, foi dividida em duas partes. Em 5 placas de CCDP foram aplicados 0,5005 g desta fração, que foi eluída com CHCl<sub>3</sub>:MeOH (5%), em cuba com atmosfera de NH<sub>3</sub>, resultando em 5 frações. A purificação da fração ifb 79-90 está apresentada no **Esquema 14**.



Esquema 14: Fracionamento de ifb 79-90.

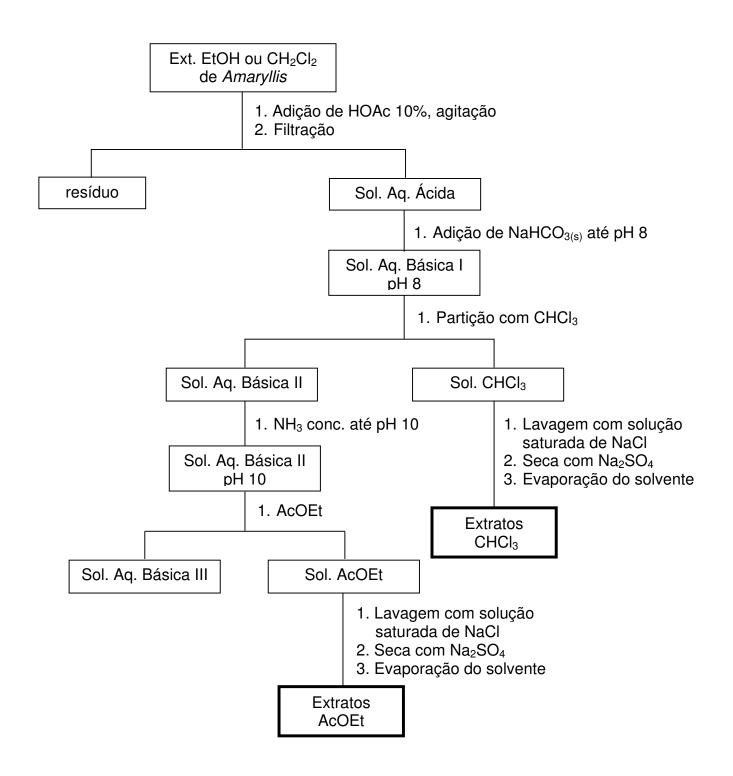
As frações ifb 79-90.4.2, ifb 79-90.4.3.3 e o alcalóide **10** (IFB 1.09 e IFB 2.17) foram analisados por CCDA, onde apresentaram as mesmas características e mesmo Rf.

# 4.8. Extração ácido-base dos extratos CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e EtOH dos bulbos de Amaryllis

Os extratos CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e EtOH dos bulbos das três espécies de *Amaryllis* foram submetidos à extração ácido-base, direcionada para a obtenção de frações ricas em alcalóides, conforme o **Esquema 15**, fornecendo para todas as espécies dois extratos CHCl<sub>3</sub> e dois extratos AcOEt (**Tabela 4**).

**Tabela 4**: Massa dos extratos de Amaryllis obtidos por fracionamento ácido-base.

	Massa dos extratos (g)			
Espécie (bulbos)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		EtOH	
	CHCl₃ I	AcOEt I	CHCl₃ II	AcOEt II
Amaryllis "sidney"	0,1837	0,1321	0,5793	0,0280
Amaryllis "desire"	0,3515	0,1086	0,2461	0,0137
Amaryllis "belladonna"	0,5269	0,2424	0,4098	0,0408



**Fluxograma 15**: Fracionamento ácido-base, dirigida à obtenção de extratos ricos em alcalóides dos bulbos de *Amaryllis*.

# 4.9. Fracionamento dos extratos de Amaryllis

# 4.9.1. Extrato *Amaryllis* "sidney"

O extrato CHCl<sub>3</sub> II de *Amaryllis* "sidney" (0,1285 g), **Tabela 4**, foi fracionado por CCPA, obtendo-se 5 frações de 100 mL cada, como apresentado na **Tabela 5**.

Tabela 5: Fracionamento do Ext. CHCl<sub>3</sub> II de Amaryllis "sidney"

Frações	Massa (g)	Eluente
1	0,0045	CHCl <sub>3</sub>
2	0,0728	CHCl₃: Metanol (5%)
3	0,0181	CHCl₃: Metanol (10%)
4	0,0150	CHCl₃: Metanol (20%)
5	0,0146	и
Total recuperado	0,1250 ou 97%	

# 4.9.2. Extrato Amaryllis "desire"

O extrato CHCl<sub>3</sub> II de *Amaryllis* "desire" (0,2440 g), **Tabela 6**, foi fracionado por CCPA, obtendo-se 5 frações de 100 mL cada, como apresentado na **Tabela 7**.

Tabela 6: Fracionamento do Ext. CHCl<sub>3</sub> II de Amaryllis "desire"

Frações	Massa (g)	Eluente
1	0,0070	CHCl₃
2	0,1258	CHCl <sub>3</sub> : Metanol (5%)
3	0,0397	CHCl <sub>3</sub> : Metanol (10%)
4	0,0348	CHCl <sub>3</sub> : Metanol (20%)
5	0,0142	и
Total recuperado	0,2215 ou 91%	

# 4.9.3. Extrato Amaryllis "belladonna"

O extrato CHCl<sub>3</sub> II de *Amaryllis* "belladonna" (0,3800 g), **Tabela 5**, foi fracionado por CCPA, obtendo-se 5 frações de 100 mL cada, como apresentado na **Tabela 7**.

Frações	Massa (g)	Eluente
1	0,0361	CHCl₃
2	0,1647	CHCl <sub>3</sub> : Metanol (5%)
3	0,0675	CHCl <sub>3</sub> : Metanol (10%)
4	0,0602	CHCl <sub>3</sub> : Metanol (20%)
5	0,0166	u
Total recuperado	0,3451 ou 91%	

**Tabela 7.** Fracionamento do Ext. CHCl<sub>3</sub> II de *Amaryllis* "belladonna"

### 4.10. Testes de Inibição de Acetilcolinesterase (AChE)

### 4.10.1. Soluções utilizadas

**Tampão A** - Tris-HCl 50 mM, pH 8: 4,34 g de cloridratado de trishidroxi-metilaminometano e 2,65 g de tris-hidroximetil-amino metano foram utilizados para preparar 1 litro de solução com água Milli-Q, para a verificação do pH utilizamos papel indicador de pH da Merck.

**Tampão B** - Tris-HCl 50 mM contendo 0,1% de BSA.

**Tampão C** - Tris-HCl 50 mM contendo NaCl 0,1 M (m = 0,5850 g) e MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,02 M (m = 0,4066 g).

Enzima acetilcolinesterase – fornecida na forma de pó liofilizado contendo 1,75 mg, 705,25 unidades de enzima (U), que foi dissolvido com 1,5 mL de tampão A para produzir uma solução estoque de 470 U/mL, que em seguida foi dividida em alíquotas de 127 μL (60 U). Estas foram diluídas a 1 mL e divididas em alíquotas de 200 μL produzindo soluções de 12 U, que foram diluídas com solução tampão A para produzir soluções com 6 U/mL para ensaios em CCDA; ou então diluídas com tampão B para produzir soluções de 0,25 U/mL, usadas nos ensaios em microplaca.

ATCI – solução 2 mM (0,0058 g) para 10 mL de solução produzida com tampão

A, para os ensaios em CCDA e solução 15 mM (0,0433 g) para 10 mL de solução produzida com água Milli Q, para ensaios em microplaca.

**DTNB** – solução 2 mM (0,0079 g) para 10 mL de solução produzida com tampão A, para ensaios em CCDA e solução 3 mM (0,0297 g) para 25 mL de solução produzida com tampão C, para ensaios em microplaca.

Acetato de 1-naftila - 0,2500 g de acetato de 1-naftila em 100 mL de EtOH.

Sal Fast Blue B - 0,4000 g de sal Fast Blue B em 160 mL de água destilada.

Reagente de Dragendorff – solução 1 (0,85 g de subnitrato de bismuto, 10 mL de ácido acético e 40 mL de água destilada), solução 2 (8,0 g de iodeto de potássio em 20 mL de água destilada), sendo as soluções 1 e 2 misturadas em concentração de 1:1 e reservada. Para a pulverização das placas de CCDA 1 mL da solução reservada é adicionada a uma solução de ácido acético 20%.

**Inibidores de referência** – hidrobrometo de galantamina 0,1 mM em metanol foi utilizado, para ensaios em CCDA e fisostigmina 0,5 mM para ensaios em microplaca.

# 4.10.2. Inibição qualitativa da AChE por CCDA

A avaliação qualitativa da inibição da acetilcolinesterase por CCDA foi realizada por dois métodos. O primeiro método segue o procedimento adotado por Rhee<sup>39</sup>, baseado no método de Ellman e o segundo segue o procedimento descrito por Masrton<sup>40</sup>.

# 4.10.2.1. Metodologia de Rhee

Na metodologia adotada por Rhee, baseada no método de Ellmann, os extratos foram diluídos em metanol a uma concentração de 10 mg/mL, então 2,5 μL de cada extrato foram aplicados na placa de CCDA e eluídos com CHCl<sub>3</sub>:MeOH (10%); 2,5 μL da solução de galantamina, também, foi aplicado e utilizado como referência de inibição. Após o desenvolvimento da placa de CCDA e evaporação do solvente a placa foi borrifada com ATCI , DTNB e AChE, nesta ordem e com um pequeno intervalo de tempo entre elas. Observa-se então uma coloração amarela na placa com manchas brancas nos locais de inibição da AChE, em aproximadamente 5 minutos, esta coloração desaparece em aproximadamente 10 minutos.

### 4.10.2.2. Metodologia de Marston

Na metodologia proposta por Marston 1 mg dos extratos foram solubilizados em 1 mL de MeOH, então 15 μL de cada extrato foi aplicada na placa e eluídos com CHCl<sub>3</sub>:MeOH (10%); 2,5 μL da solução de galantamina foi aplicado para ser utilizado como referência de inibição. Após o desenvolvimento da placa de CCDA e da evaporação do solvente, a placa foi nebulizada com solução de AChE. Após secagem, a placa de CCDA foi colocada sobre uma placa de petri, que estava depositada dentro de um pirex contendo um pouco de água. Desta forma a água não entra diretamente em contato com a placa de CCDA, mas a atmosfera permanece úmida. O pirex foi fechado com a tampa e foi colocado em estufa, e mantida a 37 °C, por 20 minutos. Em seguida a placa de CCDA foi nebulizada com uma mistura das soluções 1-naftil acetato (10 mL) de e sal Fast Blue B (40 mL), preparadas imediatamente antes do uso para evitar decomposição. Após um intervalo de 1-2 minutos, a placa desenvolve uma coloração púrpura com manchas brancas resultantes da inibição da enzima, que desaparece após 10 minutos.

Em ambos os experimentos seguindo o médoto de Rhee ou Marston uma réplica da placa com os extratos analisados foi obtida nas mesmas condições e borrifada com solução de Dragendorff, objetivando a visualização dos constituintes dos extratos.

#### 4.10.2.3. Testes com alcalóides de *Amacrinum*

Para verificar se os alcalóides isolados de *Amacrinum* apresentavam potencial para inibição da AChE foi seguido o mesmo procedimento adotado para os extratos, sendo a concentração dos alcalóides ~5 mM. Os alcalóides: beladina (1), *N*-desmetilbeladina (2), crinina (3), bufanidrina (4), 1-*O*-acetil-licorina (5), 11-*O*-acetilambelina (6), undulatina (7), ambelina (8), bufanisina (9) e o controle galantamina (R) foram avaliados.

# 4.10.3. Testes em microplaca no FLASHScan

Os testes foram realizados no leitor FLASHScan 530 (Analytik Jena AG) pertencente ao grupo da professora Dra. Anita Marsaioli (IQ/UNICAMP), em microplaca de 96 poços.

#### 4.10.3.1. Parâmetros de medidas

A programação adotada neste aparelho foi a descrita abaixo:

#### **Método:**

Método de medida: absorbância

Acessório: nenhum

Pontos de medição por poço: 1

Controle de temperatura: 25, 30 ou 37 °C Agitação: linear, 10 s, pequena e lenta

#### Extensão espectral:

Comprimento de onda individual: 405 nm

#### Absorbância/Transmitância:

Medições por poço: 4

Medida de referência: a partir do arquivo referente à leitura da microplaca

vazia

#### Ciclo:

Medidas em ciclos: ativado

Número de ciclos: 10

Tempo de espera (delay): 10 s

Intervalo de tempo entre os ciclos: 0 s

# 4.10.3.2. Obtenção da medida de referência

A programação descrita acima é, também, utilizada para a obtenção da medida de referência, que pode ser descrita como uma leitura da microplaca vazia que deverá ser subtraída da medida do experimento de hidrólise enzimática.

Para obter esta medida de referência deve-se selecionar e ativar o ícone Medida de Referência, inserir no aparelho a microplaca vazia, que deverá ser a mesma utilizada no experimento de hidrólise, ao terminar a leitura ativar o ícone salvar na janela **Absorbância/Transmitância** e nomear o arquivo que deverá ser utilizado na programação descrita acima.

### 4.10.3.3. Procedimento adotado para a montagem dos testes

As soluções de ATCI e DTNB foram preparadas imediatamente antes das análises, em seguida forma preparadas às soluções **A** e **B**, seguindo as proporções dadas abaixo.

Foram realizadas medidas para observar a hidrólise enzimática e a hidrólise espontânea do substrato de forma simultânea.

Para a medida da hidrólise enzimática utilizou-se:

200  $\mu$ L de solução **A** (25  $\mu$ L de ATCI 15 mM + 125  $\mu$ L de DTNB 3 mM + 50  $\mu$ L de solução tampão B)

25 μL de inibidor (alcalóides)

25 μL de AChE

Para a medida da hidrólise espontânea utilizamos:

225  $\mu$ L de Solução **B** (25  $\mu$ L de ATCI 15 mM + 125  $\mu$ L de DTNB 3 mM + 75  $\mu$ L de solução tampão B)

25 μL de inibidor (alcalóides)

A medida de 100% de atividade enzimática foi realizada substituindo o inibidor por 25  $\mu$ L de MeOH, para compostos puros e 25  $\mu$ L de solução 10% de MeOH em tampão A, para extratos.

Os testes foram realizados em duplicata em dois momentos distintos obtendo-se, portanto, a média de quatro medidas, que são representados na forma de valores de porcentagens ou IC<sub>50</sub>. A fisostigmina em concentração de 0,5 mM foi utilizada como referência de inibição contra AChE.

A velocidade de reação foi calculada pelo software Microsoft Office Excel 2007. O acréscimo em absorbância devido à hidrólise espontânea foi corrigido pela subtração entre a velocidade de reação por hidrólise enzimática e a velocidade de reação por hidrólise espontânea. As porcentagens de inibição foram calculadas por comparação entre as velocidades das amostras e a velocidade do experimento usando MeOH (100% de atividade enzimática). Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados utilizando o software Microcal Origin 6.1.

# 4.10.3.4. Teste de inibição de AChE em microplaca – Extratos de *Amacrinum* e *Amaryllis*.

Os extratos foram solubilizados em metanol, concentração de 10 mg/mL, e em seguida diluídos 10 vezes com tampão A. Os extratos avaliados foram: AcOEt II de *Amacrinum* (A), CHCl<sub>3</sub> II de *Amacrinum* (B), AcOEt II de *Ismene festalis* (C), CHCl<sub>3</sub> II de *I. festalis* (D), AcOEt I de *Amaryllis* "sidney" (E), CHCl<sub>3</sub> I de *A.* "sidney" (F), AcOEt II de *Amaryllis* "sidney" (G), CHCl<sub>3</sub> II de *A.* "sidney" (H), AcOEt I de *A.* "desire" (I), CHCl<sub>3</sub> I de *A.* "desire" (J), AcOEt II de *A.* "desire" (L), CHCl<sub>3</sub> II de *A.* "desire" (M), AcOEt I de *A.* "belladonna" (N), CHCl<sub>3</sub> I de *A.* "belladonna" (O), AcOEt II de *A.* "belladonna" (P), CHCl<sub>3</sub> II de *A.* "belladonna" (Q).

# 4.10.3.5. Teste de inibição de AChE em microplaca - Alcalóides de *Amacrinum* e *Ismene festalis*.

Os alcalóides (3, 5, 7, 8, 9, 10 e 11) foram submetidos ao testes de inibição de AChE em microplaca, usando a metodologia descrita anteriormente, em concentrações que resultassem em inibição da reação enzimática entre 10 e 80%.

# 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

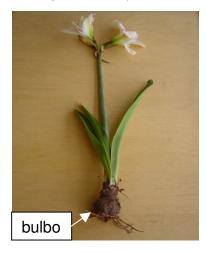
As plantas da família Amaryllidaceae utilizadas neste estudo foram obtidas na cidade de Holambra - SP, cidade situada próxima à Campinas, em decorrência das plantas serem produzidas e comercializadas para fins ornamentais, exigindo assim pradonização de cultivo e pouca variabilidade. Permitindo a obtenção de material adicional para estudo, caso seja encontrado algum alcalóide com atividade interessante.

As espécies adquiridas para estudo foram: o híbrido *Amacrinum* (*Amaryllis* x *Crinum*), *Ismene festalis* (*Hymenocallis festalis*) e três espécies de *Amaryllis* ('sidney", "desire" e "belladonna"), **Figuras 21** e **22**. As duas primeiras foram submetidas ao estudo fitoquímico para identificação de seus alcalóides e as três espécies de *Amaryllis* foram utilizadas para verificar a contribuição química do gênero *Amaryllis* para a produção do híbrido *Amacrinum*.





Figura 21: Espécies: híbrido Amacrinum e Ismene festalis, cultivadas em Holambra - SP.







**Figura 22**: Espécies de *Amaryllis* ("sidney", "desire" e "belladonna", respectivamente), cultivadas em Holambra - SP.

# 5.1. Extrações

Os bulbos das espécies de Amaryllidaceae foram secos em estufa a 40 °C, moídas e submetidos à extração com EtOH e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de acordo com a espécie, enquanto foi observada a formação de precipitado branco com o reagente de Mayer, que indicava teste positivo para a presença de alcalóides. As massas dos extratos obtidos estão apresentadas na **Tabela 8**.

**Tabela 8**: Espécies Amaryllidaceae estudadas e massa dos extratos EtOH e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Egnásia	Massa vegetal	Massa vegetal	Extrato	Extrato
Espécie	fresca (g)	seca (g)	EtOH (g)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (g)
Amacrinum	3.297	1.018	93,9	-
Ismene festalis	4.980	1.328	49,7	-
Amaryllis "sidney"	1.535	224	13,4	3,9
Amaryllis "desire"	1.160	135	13,3	2,3
Amaryllis "belladonna"	1.157	156	14,8	2,1

Os extratos EtOH e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foram submetidos a tratamento ácido base, devido ao caráter básico dos alcalóides, com a finalidade de direcionar o estudo para o isolamento destes compostos. As massas dos extratos obtidos estão apresentadas na **Tabela 9**.

**Tabela 9**: Massa dos extratos de Amaryllidaceae obtidos após fracionamento ácidobase.

	Massa dos extratos (g)			
Espécie (bulbos)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> EtOH	
	CHCl₃ I	AcOEt I	CHCl₃ II	AcOEt II
Amacrinum	-	-	8,09	0,20
Ismene festalis	-	-	4,98	0,36
Amaryllis "sidney"	0,1837	0,13	0,58	0,03
Amaryllis "desire"	0,35	0,11	0,25	0,01
Amaryllis "belladonna"	0,53	0,24	0,41	0,04

Os extratos obtidos após o fracionamento ácido-base, CHCl<sub>3</sub> e AcOEt, foram analisados por CCDA em busca de um sistema eluente que ocasionasse uma boa separação dos componentes, usando cromatografia em coluna e/ou sucessivas separações por CCDP.

#### 5.2. Amacrinum

O estudo fitoquímico do extrato CHCl<sub>3</sub> II dos bulbos do híbrido *Amacrinum*, codificado como **ama**, resultou no isolamento de nove alcalóides conhecidos (**Tabela 10**). As estruturas químicas foram deduzidas a partir dos dados espectroscópicos dos alcalóides purificados, que foram analisados e comparados com dados existentes na literatura.

**Tabela 10**: Alcalóides isolados do extrato de CHCl<sub>3</sub> II de *Amacrinum*.

Alcalóide	Tipo de estrutura	Quantidade (mg)
beladina (1)	tipo-beladina	9,3
N-desmetil-beladina (2)	tipo-beladina	37,9
crinina (3)	tipo-crinina	141,3
bufanidrina ( <b>4</b> )	tipo-crinina	65,5
1-O-acetil-licorina (5)	tipo-licorina	18,6
11-O-acetil-ambelina (6)	tipo-crinina	5,7
undulatina ( <b>7</b> )	tipo-crinina	123,8
ambelina (8)	tipo-crinina	148,5
bufanisina ( <b>9</b> )	tipo-crinina	65,1

# 5.2.1. Análise Espectroscópica dos Alcalóides de Amacrinum

# 5.2.1.1. Alcalóides tipo-beladina

# 5.2.1.1.1. Beladina (1)

Figura 23: Estrutura do alcalóide beladina (1).

O espectro de RMN <sup>1</sup>H de **1** (**Esp. 1**) possui dois dupletos de hidrogênios aromáticos em  $\delta$  7,10 e 6,81 (J = 8,5 Hz), integrados a dois hidrogênios cada e caracterizam um padrão de anel aromático dissubstituído em posição *para*; um simpleto largo em  $\delta$  6,88 e um dupleto em  $\delta$  6,79, integrados a um e dois hidrogênios,respectivamente; três grupos metilênicos (CH<sub>2</sub>) em  $\delta$  3,53 (s), 2,78 (m) e 2,64 (m), quatro simpletos de metilas (CH<sub>3</sub>) em 3,87, 3,85, 3,78 e 2,30, o alto valor do deslocamento das metilas deve ser decorrente de ligação com oxigênio e nitrogênio.

Nos espectros de RMN  $^{13}$ C e DEPT (**Esp. 4** e **5**) de **1** observou-se a presença de 16 sinais referentes a 4 CH<sub>3</sub>, 3 CH<sub>2</sub>, 7 CH e 5 C quaternários. Os sinais em  $\delta$  157,9, 148,9, 148,1, 132,5, 131,6, 129,6 (2 carbonos), 121,2, 113,7 (2 carbonos), 112,0, 110,7 indicam a presença de dois anéis aromáticos, os sinais em  $\delta$  55,8 (2 carbonos) e 55,2 indicam metoxilas e o sinal em  $\delta$  42,0 é característico de metila ligada a nitrogênio.

Uma atribuição completa dos sinais dos hidrogênios aos seus respectivos carbonos foi obtida a partir das correlações observadas no espectro gHSQC (**Esp. 6**) e está apresentada na **Tabela 11**. Estes dados sugerem que o alcalóide **1** apresente um esqueleto tipo-beladina.

No espectro gCOSY  $^1$ H- $^1$ H (**Esp. 9**) observou-se as correlações entre: o sinal de H-2 ( $\delta$  2,78) com os sinais de H-1 ( $\delta$  2,64) e H-4/H-8 ( $\delta$  7,10); este último correlaciona-

se com o sinal de H-5/H-7 ( $\delta$  6,81); o sinal em H-1' ( $\delta$  3,53) correlaciona-se com H-3' ( $\delta$  6,88) e os hidrogênios da metila ligada ao nitrogênio ( $\delta$  2,30).

As correlações observadas no espectro gHMBC (**Esp. 10**) permitiram definir a posição do nitrogênio e dos centros quaternários. Os sinais dos hidrogênios do grupo NCH<sub>3</sub> ( $\delta$  2,30, s) apresentaram correlação com os sinais em  $\delta$  58,9 (C-1) e 61,8 (C-1'), confirmando que o átomo de nitrogênio está ligado aos substituintes dos anéis aromáticos. A dissubstituição em posição *para*, do anel A, foi observada no padrão de acoplamento (dois dupletos com J = 8,5 Hz) dos hidrogênios H-4/H-8 e H-5/H-7 e confirmada com a existência das correlações entre o sinal de H-4/H-8 ( $\delta$  7,10) com o sinal de C-2 ( $\delta$  32,7) e entre o sinal de C-6 ( $\delta$  157,9) com sinais dos hidrogênios do grupo OCH<sub>3</sub> ( $\delta$  3,78, s) e dos hidrogênios aromáticos H-5/H-7 ( $\delta$  6,81).

A posição dos substituintes no anel B foi determinada utilizando as correlações entre os sinais dos hidrogênios 4'-OCH<sub>3</sub> ( $\delta$  3,85, s) com C-4' ( $\delta$  148,9) e 5'-OCH<sub>3</sub> ( $\delta$  3,87, s) com C-5' ( $\delta$  148,1); bem como as correlações entre H-3' ( $\delta$  6,88, s) com C-1' ( $\delta$  61,8), C-5' ( $\delta$  148,1) e C-7' ( $\delta$  121,2) e de H-6' ( $\delta$  6,67, s) com C-4' ( $\delta$  148,9).

O espectro de massas (**Esp. 14**) do alcalóide **1**, não apresentou o íon molecular m/z 315 [C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>3</sub>]<sup>-+</sup>, apenas outros íons característicos, sendo os principais: m/z 194 [C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (21%) e m/z 151 [C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (100%), **Figura 24**.

$$H_3CO$$
 $CH_3$ 
 $C_{19}H_{25}NO_3$  315.18

 $CH_3$ 
 $C_{19}H_{25}NO_3$  315.18

 $CH_3$ 
 $C_{10}H_{14}NO$ 
 $C_{19}H_{25}NO_3$  315.18

 $C_{11}H_{14}NO$ 
 $C_{19}H_{25}NO_3$  315.18

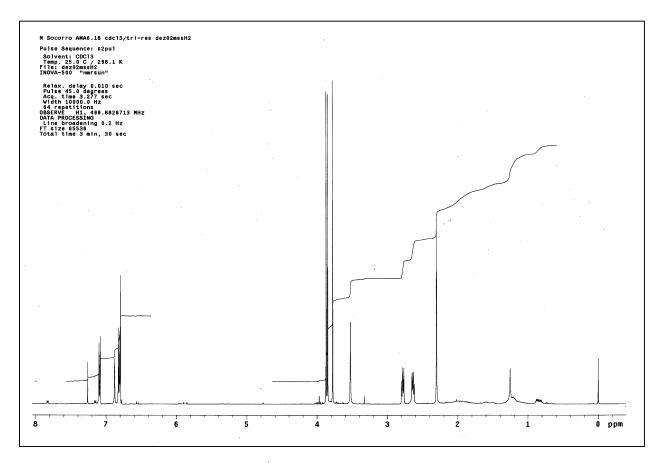
 $C_{19}H_{25}NO_3$  315.18

Figura 24: Fragmentação proposta para o alcalóide beladina (1).

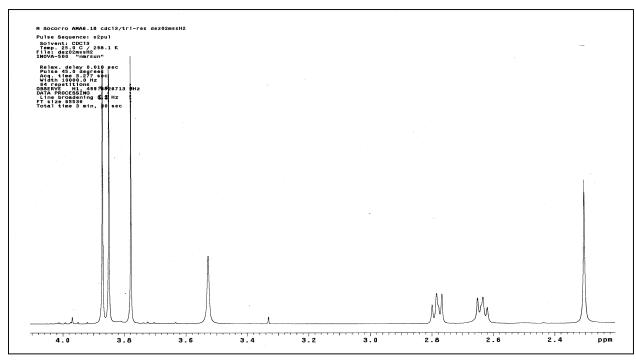
A análise dos dados espectroscópicos de RMN e EM resultou na sugestão da estrutura da beladina para o alcalóide **1**, **Figura 23**, esta foi confirmada após comparação dos dados obtidos para o alcalóide **1** com os relatado na literatura <sup>15</sup>.

**Tabela 11**: Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para o alcalóide beladina (1).

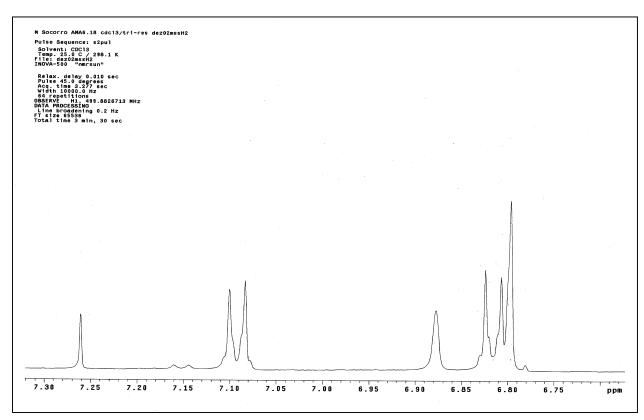
Carbono	$\delta$ (ppm) de $^{13}$ C	Tipo de Carbono	δ (ppm) de <sup>1</sup> H	J (Hz)
1	58,9	CH <sub>2</sub>	2,64 ( <i>m</i> )	-
2	32,7	CH <sub>2</sub>	2,78 ( <i>m</i> )	-
3	132,5	С	-	-
4	129,6	СН	7,10 ( <i>d</i> )	8,5
5	113,7	СН	6,81 ( <i>d</i> )	8,5
6	157,9	С	-	-
7	113,7	СН	6,81 ( <i>d</i> )	8,5
8	129,6	CH	7,10 ( <i>d</i> )	8,5
1'	61,8	CH <sub>2</sub>	3,53 ( <i>s</i> )	-
2'	131,6	С	-	-
3'	112,0	СН	6,88 ( <i>sl</i> )	-
4'	148,9	С	-	-
5'	148,1	С	-	-
6'	110,7	СН	6,79 ( <i>d</i> )	8,5
7'	121,2	СН	6,79 ( <i>d</i> )	8,5
6-OCH₃	55,2	CH₃	3,78 ( <i>s</i> )	-
4'- OCH <sub>3</sub>	55,8	CH₃	3,85 ( <i>s</i> )	-
5'-OCH <sub>3</sub>	55,8	CH <sub>3</sub>	3,87 ( <i>s</i> )	-
N-CH₃	42,0	CH <sub>3</sub>	2,30 ( <i>s</i> )	-



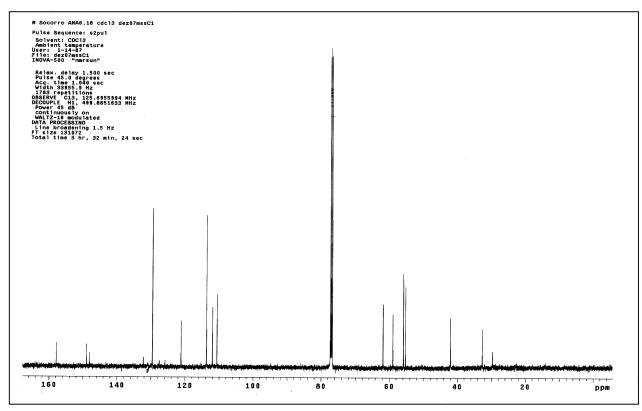
**Esp. 1**: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (498,88 MHz; CDCl $_3$ ;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de 1.



**Esp. 2**: Espectro de RMN  $^1$ H (498,88 MHz; CDCl $_3$ ;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **1** - Expansão da região  $\delta$  2,30 a 4,00 ppm.

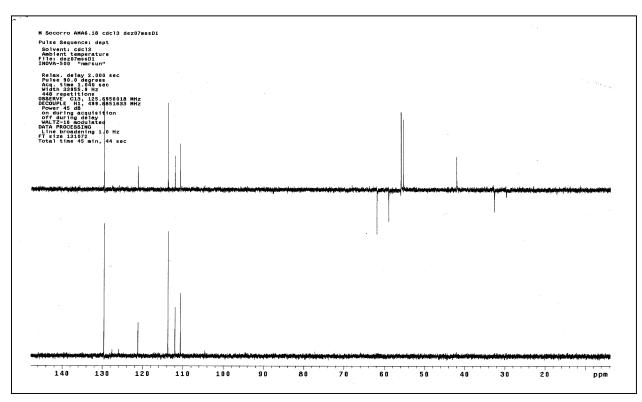


**Esp. 3**: Espectro de RMN  $^1$ H (498,88 MHz; CDCl $_3$ ;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **1** - Expansão da região  $\delta$  6,50 a 7,38 ppm.

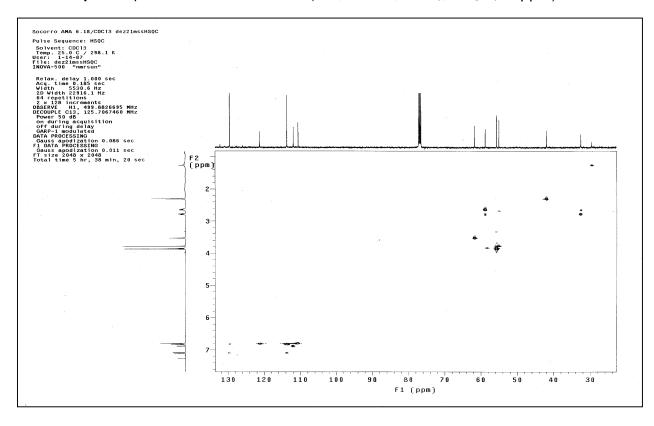


Esp. 4: Espectro de RMN <sup>13</sup>C (125,69 MHz;

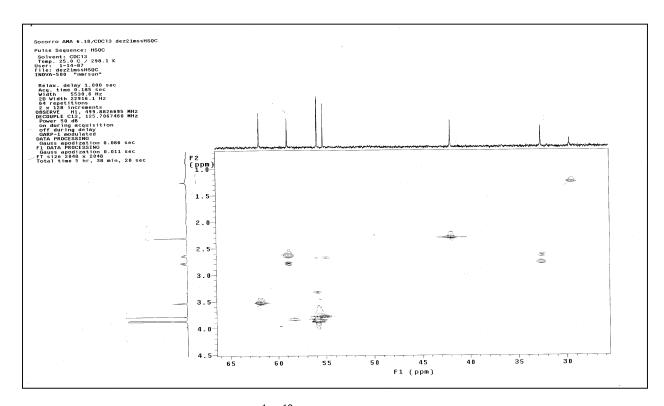
 $\text{CDCI}_3;\,\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de 1.



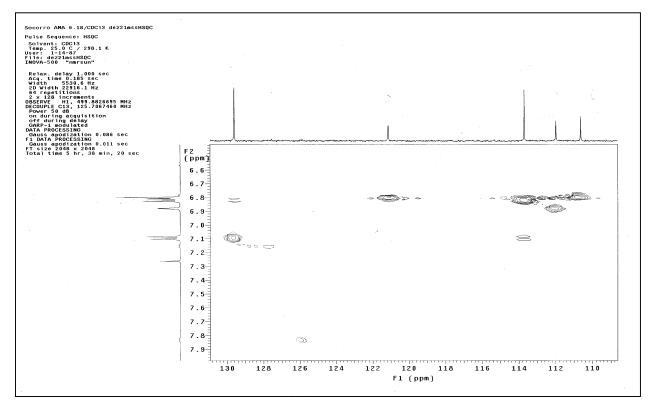
**Esp. 5**: Espectro de DEPT 90 e 135° (125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de 1.



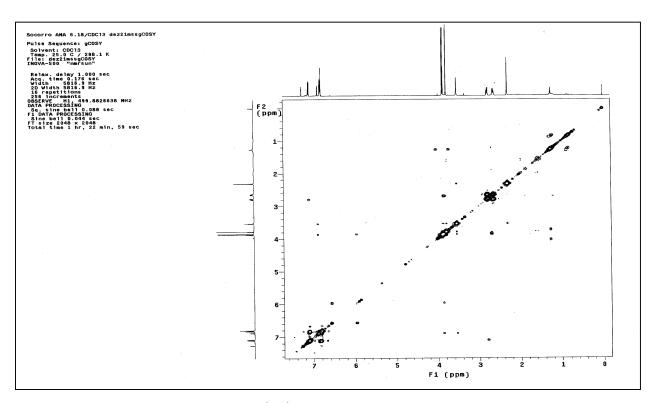
**Esp. 6**: Espectro de RMN gCOSY  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  - gHSQC (499,88 MHz x 125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de **1**.



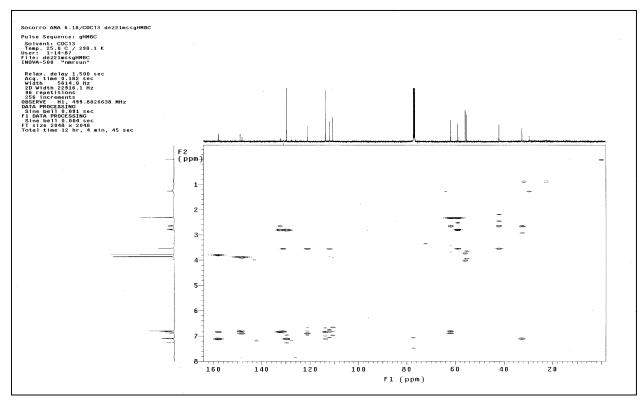
**Esp. 7**: Espectro de RMN gCOSY  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  - gHSQC (499,88 MHz x 125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de **1** - Expansão da região  $\delta$  0,7 a 4,5 ppm e  $\delta$  25 a 66 ppm.



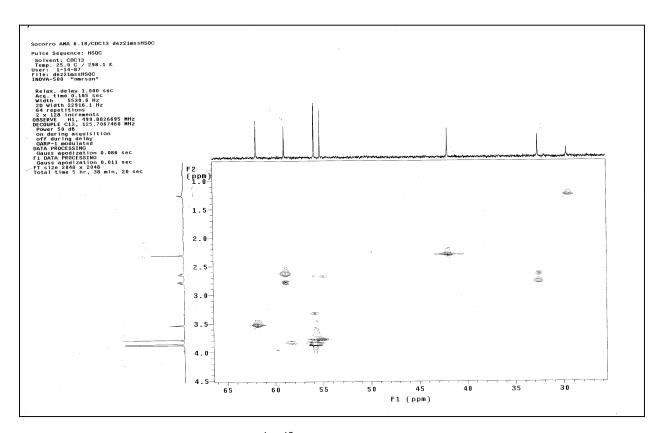
**Esp. 8**: Espectro de RMN gCOSY  $^1$ H- $^{13}$ C - gHSQC (499,88 MHz x 125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **1** - Expansão da região  $\delta$  6,5 a 8,0 ppm e  $\delta$ 109 a 132 ppm.



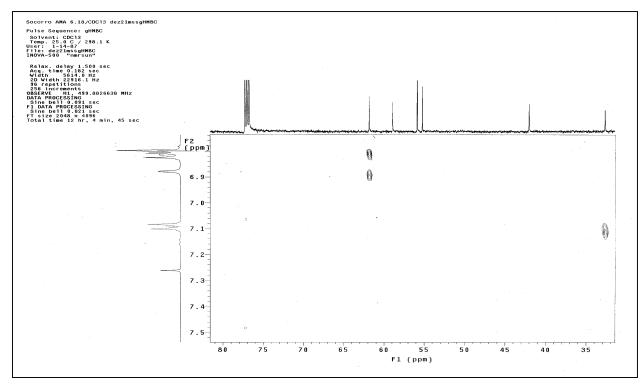
**Esp. 9**: Espectro de RMN de gCOSY  $^1\text{H-}^1\text{H}$  (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de **1**.



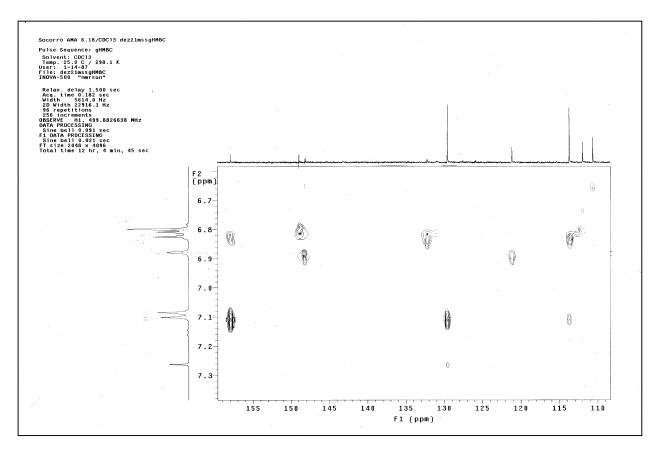
**Esp. 10**: Espectro de RMN gCOSY  $^1$ H- $^{13}$ C - gHMBC (499,88 MHz x 125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **1**.



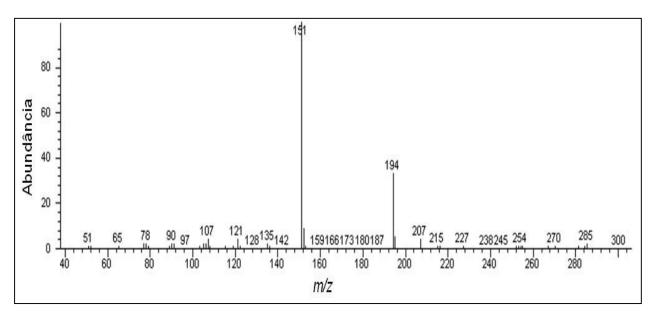
**Esp. 11**: Espectro de RMN gCOSY  $^1$ H- $^{13}$ C - gHMBC (499,88 MHz x 125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de **1** - Expansão da região  $\delta$  0,7 a 4,5 ppm e  $\delta$  26 a 66 ppm.



**Esp. 12**: Espectro de RMN gCOSY  $^1$ H- $^{13}$ C - gHMBC (499,88 MHz x 125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de **1** - Expansão da região  $\delta$  6,74 a 7,52 ppm e  $\delta$  32 a 81 ppm.



**Esp. 13**: Espectro de RMN gCOSY  $^1$ H- $^{13}$ C - gHMBC (499,88 MHz x 125,69 MHz; CDCI<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **1** - Expansão da região  $\delta$  6,60 a 7,34 ppm e  $\delta$  110 a 159 ppm.



Esp. 14: Espectro de Massas (IE; 70 eV) de 1.

# 5.2.1.1.2. *N*-desmetil-beladina (2)

Figura 25: Estrutura do alcalóide *N*-desmetil-beladina (2).

O espectro de RMN  $^{1}$ H de **2** (**Esp. 15**) possui cinco sinais de hidrogênios aromáticos sendo: dois dupletos em  $\delta$  7,10 e 6,82 (J = 8,5 Hz), integrados a dois hidrogênios cada e caracterizam um padrão de anel aromático dissubstituído em posição *para*, dois dupletos em  $\delta$  6,86 (J = 1,5 Hz) e 6,79 (J = 7,5 Hz) e um duplo dupleto em 6,81 (J = 7,5 e 1,5 Hz); três grupos metilênicos em  $\delta$  3,76 (s), 2,87 (m) e 2,78 (m), três simpletos de metilas em 3,96, 3,84 e 3,78, o alto valor do deslocamento das metilas deve ser decorrente de ligação com oxigênio.

Nos espectros de RMN  $^{13}$ C e DEPT (**Esp. 17** e **18**) de **2** observou-se a presença de 14 sinais referentes a 3 CH<sub>3</sub>, 3 CH<sub>2</sub>, 7 CH e 5 C quaternários. Os sinais em  $\delta$  158,1, 149,0 (2 carbonos), 148,1, 131,6 (2 carbonos), 129,6 (2 carbonos), 120,5, 113,9 (2 carbonos), 111,4, 110,9 indicam a presença de dois anéis aromáticos e os sinais em  $\delta$  55,8 (2 carbonos) e 55,2 indicam metoxilas.

A análise do espectro de gHSQC (**Esp. 19**) permitiu a atribuição completa dos sinais dos hidrogênios aos seus respectivos carbonos, que está apresentada na **Tabela 12**. Estes dados sugerem um esqueleto tipo-beladina para o alcalóide **2**.

Os seus espectros de RMN  $^1$ H e  $^{13}$ C possuem aspectos semelhantes aos do alcalóide **1**, as diferenças significativas foram devidas a ausência do grupo CH<sub>3</sub> ligado ao nitrogênio. O sinal em  $\delta$  2,87 atribuído a hidrogênios metilênicos (H-1) e o sinal em  $\delta$  3,76 (2H-1') apresentam-se levemente desblindados ( $\Delta\delta$  = + 0,23, ambos) e C-1 ( $\delta$  50,1) e C-1' ( $\delta$  53,1) acentuadamente blindados ( $\Delta\delta$  = - 8,8 e - 8,7, respectivamente), em relação aos correspondentes sinais do alcalóide beladina (**1**).

No espectro gCOSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (**Esp. 22**) observou-se as correlações entre: o sinal

de H-2 ( $\delta$  2,78) com os sinais de H-1 ( $\delta$  2,87), H-4/H-8 ( $\delta$  7,10) e H-5/H-7 ( $\delta$  6,82); este último correlaciona-se com o sinal de H-4/H-8 ( $\delta$  7,10); o sinal de H-1' ( $\delta$  3,76) correlaciona-se com H-3' ( $\delta$  6,86), H-6' ( $\delta$  6,79), H-7' ( $\delta$  6,81) e H-1( $\delta$  2,87) e H-2( $\delta$  2,78).

Assim como em **1** a dissubstituição *para*, no anel A, em **2** foi observada a partir do padrão de acoplamento dos sinais (dois dupletos com J = 8,5 Hz) e confirmada a partir das correlações observadas no espectro HMBC (**Esp. 23**) entre o sinal em  $\delta$  158,1 (C-6) com o dupleto em  $\delta$  7,10, atribuídos aos hidrogênios H-4/H-8, e o simpleto em  $\delta$  3,78, atribuído a OCH<sub>3</sub>, bem como as correlações dos hidrogênios H-1 ( $\delta$  2,87), H-5/H-7 ( $\delta$  6,82) com C-3 ( $\delta$  131,6).

O padrão de substituição do anel B de **2** foi atribuído pela multiplicidade dos sinais de RMN  $^{1}$ H; sendo o dupleto em  $\delta$  6,86 (J = 1,5 Hz) atribuído ao H-3' que apresenta acoplamento *meta* com H-7'; um duplo dupleto em  $\delta$  6,81 (J = 7,5 e 1,5 Hz) que também possui acoplamento em *orto* com H-6', um dupleto em 6,79 (J = 7,5 Hz).

A localização dos substituintes no anel B em **2**, também, foi determinada utilizando as correlações, gHMBC (**Esp. 23**), entre os simpletos em  $\delta$  3,84 e 3,96, atribuídos as metoxilas ligadas a C-4' (149,0) e C-5' ( $\delta$  148,1); bem como as correlações entre o dupleto em  $\delta$  6,86 (H-3') com C-1' ( $\delta$  53,1) e C-5' ( $\delta$  148,1) e o dupleto em  $\delta$  6,79 (H-6') com C-2' ( $\delta$  131,6) e C-4' ( $\delta$  148,9) e a correlação do duplo dupleto em  $\delta$  6,81 (H-7') com C-5' ( $\delta$  148,1).

O espectro de massas do alcalóide **2** (**Esp. 25**), não apresentou o íon molecular m/z 301 [C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, apenas outros íons característicos, sendo os principais: m/z 110 [C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (13%) e 151 [C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (100%). As propostas para fragmentações originando os íons m/z 110 e 151 estão apresentadas na **Figura 26**.

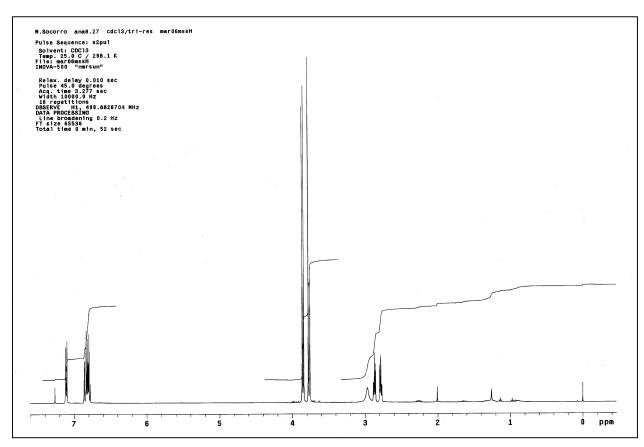
$$H_3CO$$
 $H_3CO$ 
 $H_3CO$ 

Figura 26: Fragmentação proposta para o alcalóide N-desmetil-beladina (2).

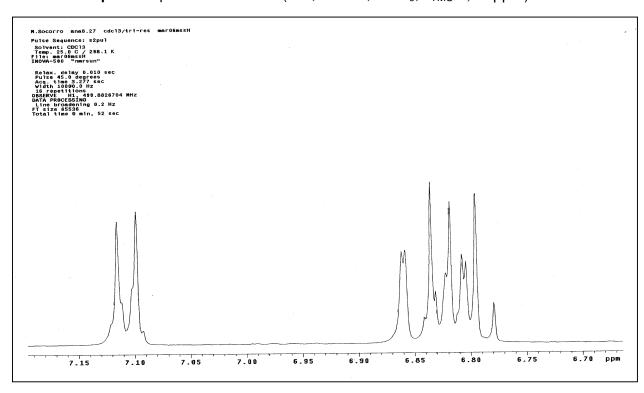
A análise dos dados espectroscópicos de RMN e EM resultou na sugestão da estrutura da *N*-desmetil-beladina para o alcalóide **2**, **Figura 25**, esta foi confirmada após comparação dos dados obtidos para o alcalóide **2** com os relatado na literatura <sup>15</sup>.

**Tabela 12**: Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para o alcalóide *N*-desmetil-beladina (2).

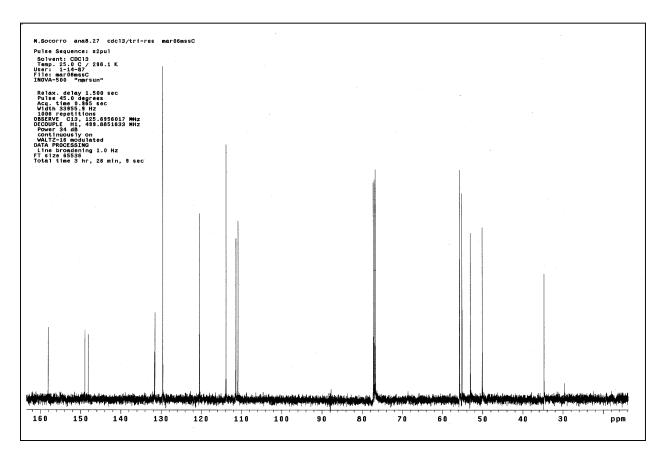
Carbono	$\delta$ (ppm) de $^{13}$ C	Tipo de Carbono	δ (ppm) de <sup>1</sup> H	J (Hz)
1	50,1	CH <sub>2</sub>	2,87 (t)	-
2	34,8	CH <sub>2</sub>	2,78 (t)	-
3	131,6	С	-	-
4	129,6	СН	7,10 ( <i>d</i> )	8,5
5	113,9	СН	6,82 ( <i>d</i> )	8,5
6	158,1	С	-	-
7	113,9	СН	6,82 ( <i>d</i> )	8,5
8	129,6	СН	7,10 ( <i>d</i> )	8,5
1'	53,1	CH <sub>2</sub>	3,76 ( <i>s</i> )	-
2'	131,6	С	-	-
3'	149,0	СН	6,86 ( <i>d</i> )	1,5
4'	149,0	С	-	-
5'	148,1	С	-	-
6'	111,4	CH	6,79 ( <i>d</i> )	7,5
7'	120,5	СН	6,81 ( <i>dd</i> )	7,5 e 1,5
6-OCH₃	55,2	CH₃	3,78 (s)	-
4'-OCH <sub>3</sub>	55,8	CH₃	3,84 (s)	-
5'-OCH₃	55,8	CH₃	3,96 ( <i>s</i> )	-



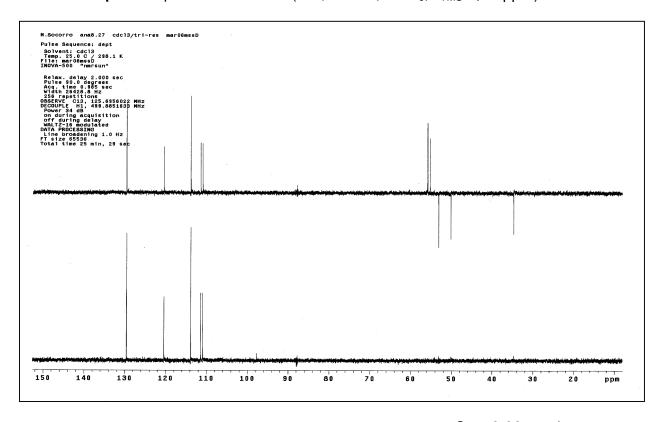
Esp. 15: Espectro de RMN  $^1H$  (498,88 MHz; CDCl3;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de 2.



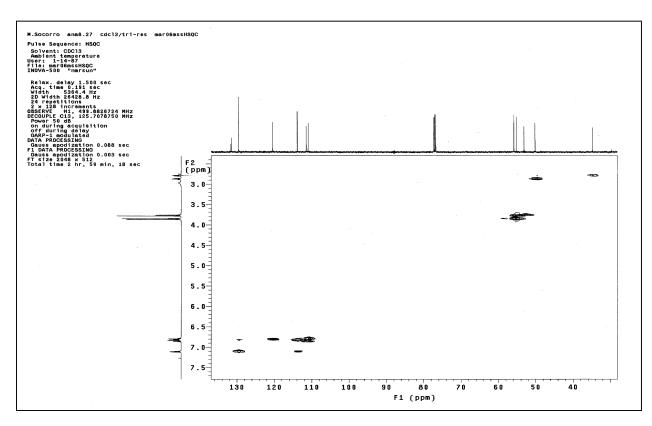
**Esp. 16**: Espectro de RMN  $^1$ H (498,88 MHz; CDCl $_3$ ;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **2** - Expansão da região  $\delta$  6,50 a 7,38 ppm.



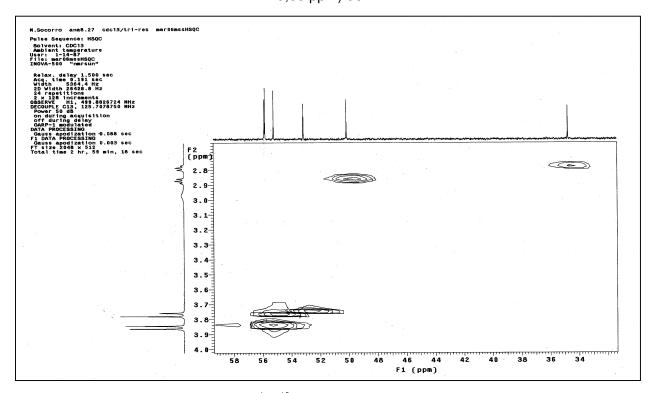
**Esp. 17**: Espectro de RMN  $^{13}$ C (125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **2**.



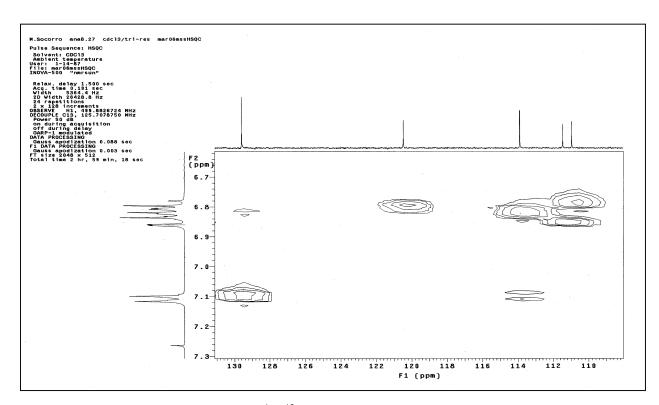
**Esp. 18**: Espectro de DEPT 90 e 135° (125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **2**.



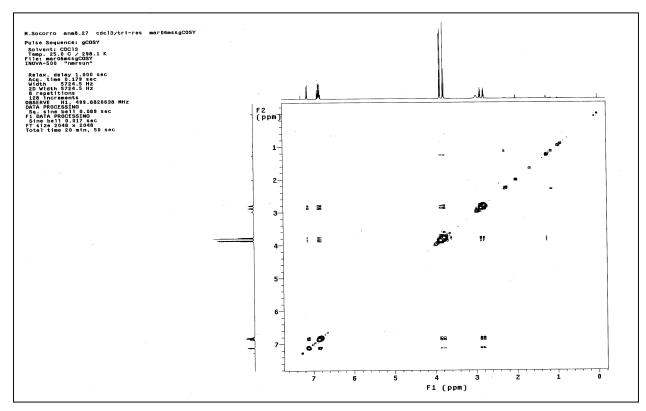
**Esp. 19**: Espectro de RMN gCOSY  $^1$ H- $^{13}$ C - gHSQC (499,88 MHz x 125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **2**.



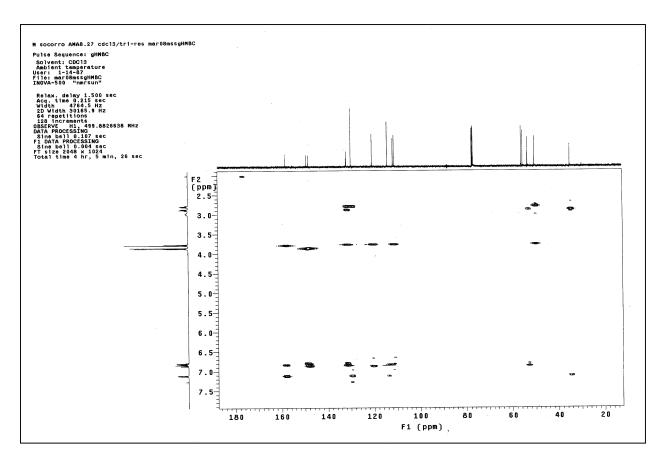
**Esp. 20**: Espectro de RMN gCOSY  $^1$ H- $^{13}$ C - gHSQC (499,88 MHz x 125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **2** - Expansão da região  $\delta$  2,7 a 4,0 ppm e 32 a 57 ppm.



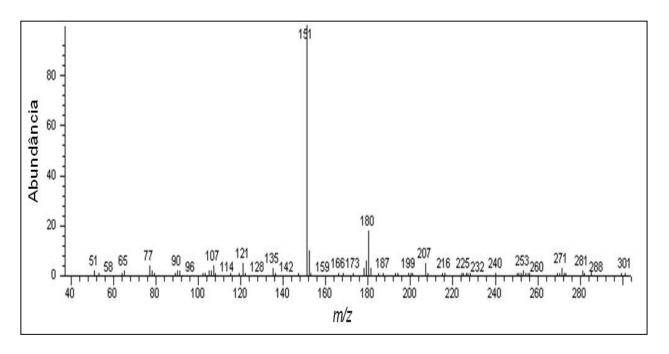
**Esp. 21**: Espectro de RMN gCOSY  $^1$ H- $^{13}$ C - gHSQC (499,88 MHz x 125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **2** - Expansão da região  $\delta$  6,6 a 7,3 ppm e 108 a 131 ppm.



Esp. 22: Espectro de RMN gCOSY  $^1\text{H-}^1\text{H}$  (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCI $_3$ ;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de



**Esp. 23**: Espectro de RMN gCOSY  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  - gHSQC (499,88 MHz x 125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de **2**.



Esp. 24: Espectro de Massas (IE; 70 eV) de 2.

A norbeladina e seus derivados são os primeiros alcalóides produzidos na rota biossintética dos alcalóides de Amaryllidaceae (**Figura 11**). As metilações biológicas que dão origem a estes compostos podem produzir compostos totalmente *O*-metilados , tais como **1** e **2**, que não poderão ser facilmente oxidados (por acoplamento fenólico) para originar os esqueletos dos alcalóides de Amaryllidaceae. Portanto a norbeladina e seus derivados são facilmente encontrados entre as bases orgânicas de plantas da família Amaryllidaceae<sup>44</sup>. O alcalóide **1** foi isolado anteriormente das espécies *Nerine bowdenii* W. Wats.<sup>44</sup>, *Nerine filifolia*<sup>15</sup> e *Crinum latifolium*<sup>44</sup> e o alcalóide **2** foi isolado de *Nerine filifolia*<sup>15</sup>.

## 5.2.1.2. Alcalóides tipo-crinina

## 5.2.1.1.1. Crinina (3)

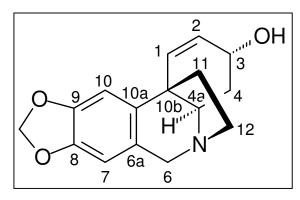


Figura 27: Estrutura do alcalóide crinina (3).

O espectro de IV (**Esp. 25**) apresentou as seguintes bandas: deformação axial de O-H em 3.147 cm<sup>-1</sup>, deformação axial de C-H em 2.955–3.024 cm<sup>-1</sup>, deformação axial de C=C de anel aromático e olefina em 1.504 e 1.481 cm<sup>-1</sup> e deformação angular de C-H do grupo metilenodioxila (-OCH<sub>2</sub>O-) em 931 cm<sup>-1</sup> 58.

Alguns dos sinais observados no espectro de RMN  $^{1}$ H (**Esp. 26**) foram: um dupleto em  $\delta$  6,55 (J= 9,8 Hz) e um duplo dupleto em  $\delta$  5,95 (J = 9,8 e 5,2 Hz), um simpleto largo em  $\delta$  4,32, dois simpletos em  $\delta$  6,41 e 6,84, um multipleto em  $\delta$  3,36 e dois dupletos em  $\delta$  5,88 e 5,87, relativos ao grupo metilenodioxila.

Nos espectros de RMN  $^{13}$ C e DEPT (**Esp. 30 e 31**) de **3** observou-se a presença de 16 sinais referentes a 5 CH<sub>2</sub>, 6 CH e 5 C quaternários. Os sinais em  $\delta$  146,1, 145,7, 138,3, 131,7, 127,8, 126,1, 106,9 e 102,9 indicam a presença de um anel aromático e uma ligação olefínica e o sinal em  $\delta$  100,8 (CH<sub>2</sub>) indica um grupo metilenodioxila.

Uma atribuição completa dos sinais dos hidrogênios aos seus respectivos carbonos (**Tabela 13**) foi realizada usando as correlações dos espectros gHSQC (**Esp. 32**). Estes dados sugerem um alcalóide com esqueleto tipo-crinina.

O espectro gCOSY  $^{1}$ H- $^{1}$ H (**Esp. 35**) apresenta correlações entre o sinal em  $\delta$  5,95 (H-2) com os sinais em  $\delta$  4,32 (H-3) e  $\delta$  6,55 (H-1). O sinal em  $\delta$  2,02 (H-4)

<sup>&</sup>lt;sup>58</sup> Silverstein, R. M.; Webster, F. X. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos 6ed. Livros Técnicos e Científicos Editora S. A. **2000**, 460 p.

correlaciona-se com  $\delta$  1,73 (H-4) e 3,35 (H-4a) e o sinal em  $\delta$  1,92 (H-11) correlaciona-se com  $\delta$  2,26 (H-11), 2,86 (H-12) e 3,34 (H-12).

O espectro gHMBC (**Esp. 36**) possibilitou observar as correlações carbono hidrogênio a duas ou três ligações, neste observou-se que o sinal de hidrogênio em  $\delta$  6,55 (H-1) correlaciona-se com o sinal de carbono em  $\delta$  63,7 (C-3). O sinal em  $\delta$  3,69 (H-6) correlaciona-se com os sinais em  $\delta$  138,3 (C-10a), 126,1 (C-6a) e 62,8 (H-4a). Os sinais dos hidrogênios do grupo metilenodioxila em  $\delta$  5,88 e 5,87 apresentam correlação com 146,1 (C-9) e 146,7 (C-8). O sinal de H-7 em  $\delta$  6,41 correlaciona-se com os carbonos em  $\delta$  146,1 (C-9), 146,7 (C-8) e 138,3 (C-10a). O sinal de H-10 em  $\delta$  6,84 correlaciona-se com 146,7 (C-8), 146,1(C-9), 126,1(C-6a) e 44,2 (C-10b).

A curva de DC do alcalóide **3** (**Figura 54**) apresentou formato compatível as observadas para os alcalóides do tipo 5,10b-etanofenatridina (crinina) que apresenta a ponte 5,10b-etano na face  $\beta^{40,41,59}$  da molécula e que o hidrogênio H-4a está na face  $\alpha$ . O valor da rotação óptica  $[\alpha]_D = -18^\circ$  foi compatível com o relatado na literatura para o alcalóide crinina ( $[\alpha]_D = -9^\circ$ )<sup>46</sup>, portanto considerou-se que H-3 está na face  $\beta$  da molécula.

A utilização da técnica NOESY 1D permitiu a confirmação da configuração relativa dos demais carbonos quirais do alcalóide **3**. A irradiação do hidrogênio em  $\delta$  1,73 (H-4) (**Esp. 37**) levou a incrementos em  $\delta$  4,32 (H-3), 3,34 (H-12) e 2,02 (H-4). A interação entre os sinais em  $\delta$  4,32 (H-3) e 1,73 (H-4) levou a considerar que o segundo, também, está na face  $\beta$  da molécula; a interação entre os hidrogênios em  $\delta$  1,73 (H-4 $\beta$ ) e 3,34 (H-12) levou a considerar este como o hidrogênio 12-exo a face da molécula.

A irradiação em 2,86 (H-12 $_{endo}$ ) (**Esp. 38**) levou a incrementos nos sinais em  $\delta$  3,69 (H-6  $\beta$ ), 2,16 (H-1 $_{endo}$ ) e 3,34 (H-12 $_{exo}$ ).

O espectro de massas dos alcalóides com esqueleto tipo crinina apresentam fragmentações características, sendo estas dependentes dos substituintes presentes no esqueleto base. As fragmentações observadas no alcalóide 3 caracterizam os

<sup>&</sup>lt;sup>59</sup> DeAngelis, G. G.; Wildman, W. C. *Tetrahedron Letters*, **1969**, 9, 729-732.

alcalóides da classe que possuem ligação dupla entre C-1 e C-2 e substituinte na posição C-3 no anel C<sup>60</sup>.

O espectro de massas do alcalóide **3** (**Esp. 39**) possui como pico base o íon molecular m/z 271 [C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>]<sup>-+</sup>, comportamento característico destes compostos. A perda do radical hidroxila de C-3, localizado em posição gama ao nitrogênio, gera o íon m/z 254 [C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>. A perda da ponte (C-11/C-12) resulta no pico m/z 243 [C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>]<sup>-+</sup> e este íon radical perde o radical hidrogênio, aparentemente para ganhar estabilidade, gerando o íon m/z 242 [C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>3</sub>]<sup>+60</sup>. Proposta de formação destes íons na **Figura 28**.

**Figura 28**: Proposta de formação dos íons m/z 254, 243 e 242 para o alcalóide **3**.

A formação do pico [M-43] é decorrente da eliminação de  $C_2H_5N$  através de um mecanismo envolvendo um estado de transição de seis membros para produzir o íon radical m/z 228  $[C_{14}H_{12}O_3]^{-1}$ . Este íon radical pode perder o radical CHO produzindo o íon m/z 199  $[C_{13}H_{11}O_2]^{+60}$ . Proposta de mecanismo de formação dos íons m/z 228 e 199 na **Figura 29**.

94

\_

<sup>&</sup>lt;sup>60</sup> Longevialle, P.; Smith, D.H.; Burlingame, A. L.; Fales, H. M.; Highet, R. J. *Organic Mass Spectrometry*, **1973**, 7, 401-415.

Figura 29: Proposta de formação dos íons m/z 228 e 199 para o alcalóide 3.

Neste alcalóide também se observou uma fragmentação caracterizada pela perda da molécula  $C_3H_5N$ , decorrente da quebra das ligações entre C-4a/C-10b e C-3/C-4, produzindo o íon radicalar benzílico m/z 216  $[C_{13}H_{12}O_3]^{-1}$ . Este pode perder hidrogênio radicalar produzindo o íon m/z 215  $[C_{13}H_{11}O_3]^{+}$ . A hidroxila em C-3 favorece a formação do íon m/z 187  $[C_{12}H_{11}O_2]^{+}$  pela perda do radical CHO. A perda do grupo CH<sub>2</sub>O, do grupo metilenodioxila, a partir do íon m/z 187 produz íon m/z 157  $[C_{11}H_9O]^{+60}$ . Proposta de mecanismo de formação dos íons m/z 216, 215, 187 e 157 na **Figura 30**.

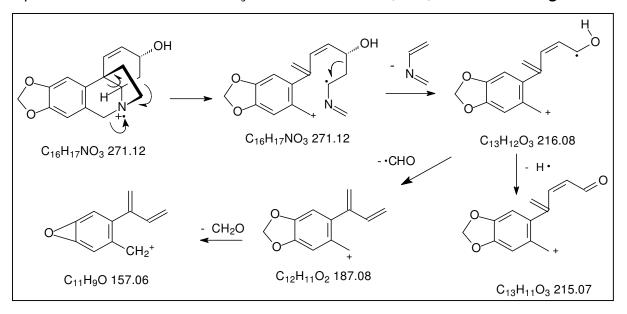


Figura 30: Proposta de formação dos íons m/z 216, 215, 187 e 157 para o alcalóide 3.

Ao alcalóide  $\bf 3$  foi atribuída a estrutura da crinina e está foi confirmada por comparação dos seus dados espectroscópicos de RMN, EM, IR,  $\alpha_D$  e DC com os dados da literatura  $^{47,59,61,62}$ .

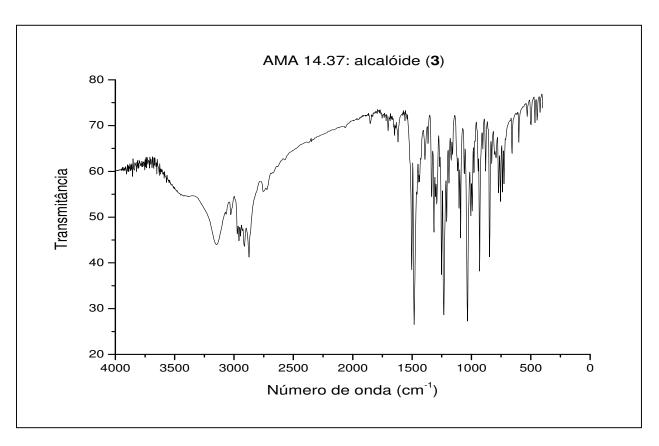
O alcalóide crinina foi isolado anteriormente dos bulbos de: *Crinum kirkii*<sup>19</sup>, *Crinum moorei*, *Nerine bowdenii* W. Wats<sup>44,48</sup>, *Brunsvigia josephinae*<sup>47</sup>, *Ammocharis tinneana*<sup>46</sup>, *Crinum bulbispermum*<sup>51</sup>, *Brunsvigia littoralis*<sup>52</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>61</sup> Zetta, L.; Gatti, G.; Fungati, C. *Journal of the Chemical Society*, **1973**, 2, 1180-1184.

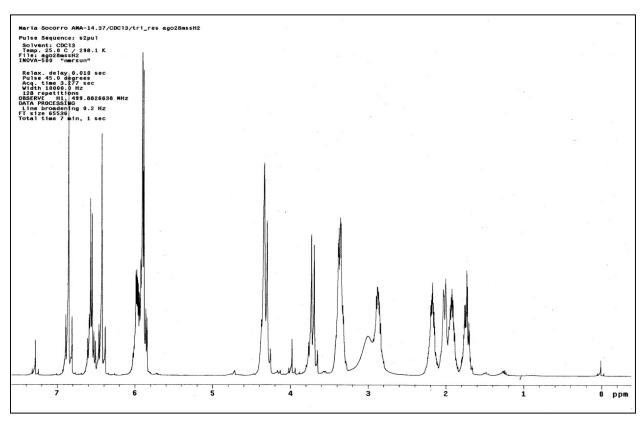
<sup>&</sup>lt;sup>62</sup> Frahm, A. W.; Ali, A. A.; Ramadan, M. A. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **1985**, 23, 804-808.

**Tabela 13**: Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para o alcalóide crinina (**3**).

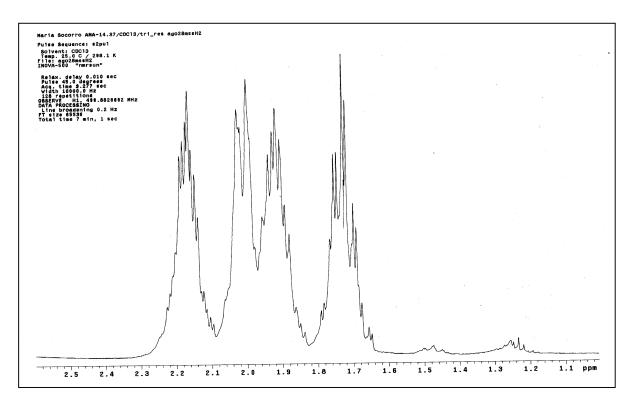
Carbono	$\delta$ (ppm) de $^{13}{ m C}$	Tipo de Carbono	Hidrogênio	$\delta$ (ppm) de $^{1}\text{H}$	J (Hz)
1	131,7	СН	1	6,55 ( <i>d</i> )	9,8
2	127,8	СН	2	5,95 ( <i>dd</i> )	9,8 e 5,2
3	63,7	СН	3	4,32 (s)	-
4	32,8	CH <sub>2</sub>	4α	2,02 ( <i>dl</i> )	14
			4β	1,73 ( <i>td</i> )	14 e 4
4a	62,8	СН	4a	3,36 ( <i>m</i> )	
6	62,1	CH <sub>2</sub>	6α	4,30 ( <i>d</i> )	17
			6β	3,69 ( <i>d</i> )	17
6a	126,1	С	-	-	-
7	106,9	СН	7	6,41( <i>s</i> )	-
8	145,7	С	-	-	-
9	146,1	С	-	-	-
10	102,9	СН	10	6,84 ( <i>s</i> )	-
10a	138,3	С	-	-	-
10b	44,2	С	-	-	-
11	44,0	CH <sub>2</sub>	11 <i>exo</i>	1,92 ( <i>m</i> )	-
			11 <i>endo</i>	2,16 ( <i>m</i> )	-
12	53,5	CH <sub>2</sub>	12 <i>exo</i>	3,34 ( <i>m</i> )	-
			12 <i>endo</i>	2,86 ( <i>m</i> )	-
-OCH₂O-	100,8	CH <sub>2</sub>	-OCH <sub>2</sub> O-	5,88 ( <i>d</i> ) e 5,87 ( <i>d</i> )	1,5



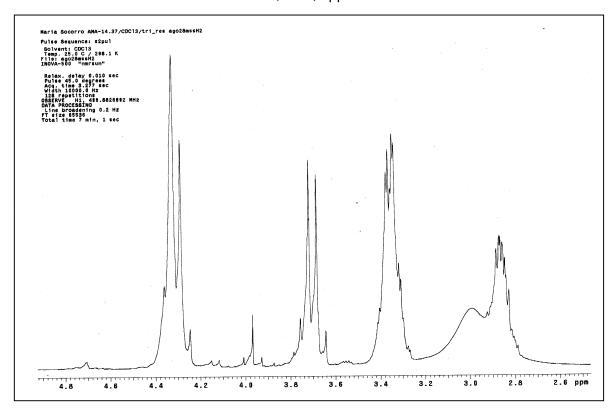
Esp. 25: Espectro de IV (pastilha de KBr) de 3.



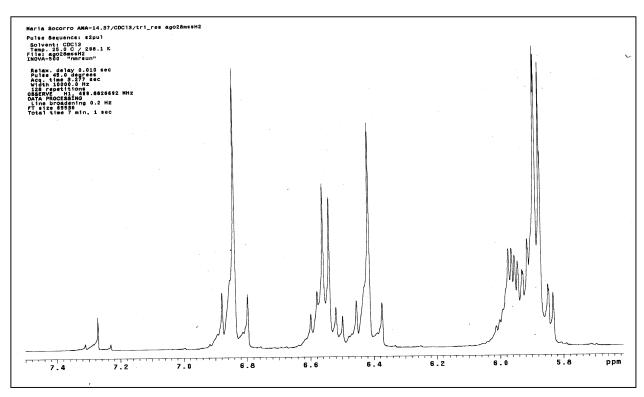
**Esp. 26**: Espectro de RMN  $^1$ H (498,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **3**.



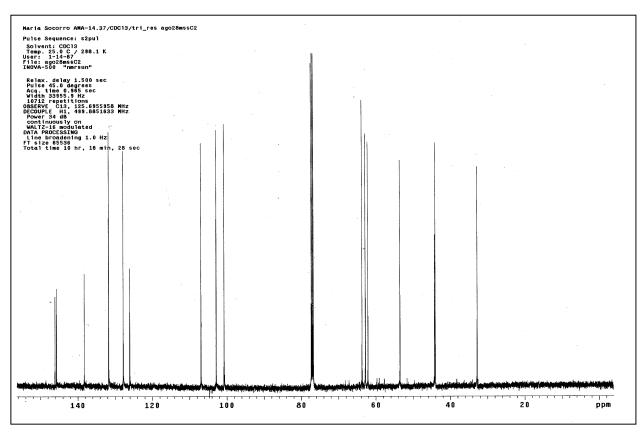
**Esp. 27**: Espectro de RMN  $^1$ H (498,88 MHz; CDCl $_3$ ;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **2** - Expansão da região  $\delta$  1,1 a 2,5 ppm.



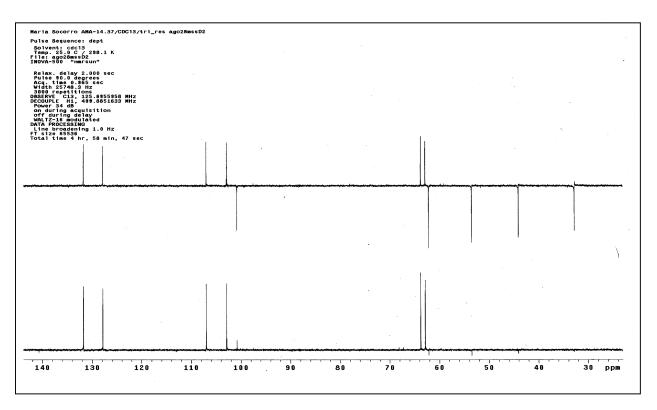
**Esp. 28**: Espectro de RMN  $^1$ H (498,88 MHz; CDCl $_3$ ;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **2** - Expansão da região  $\delta$  2,6 a 4,8 ppm.



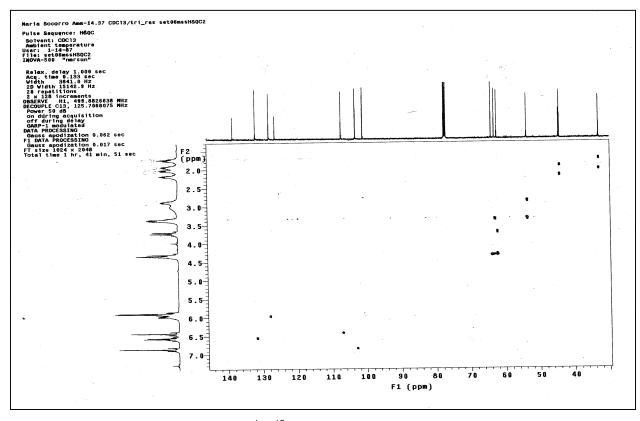
**Esp. 29**: Espectro de RMN  $^1$ H (498,88 MHz; CDCl $_3$ ;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **2** - Expansão da região  $\delta$  5,7 a 7,4 ppm.



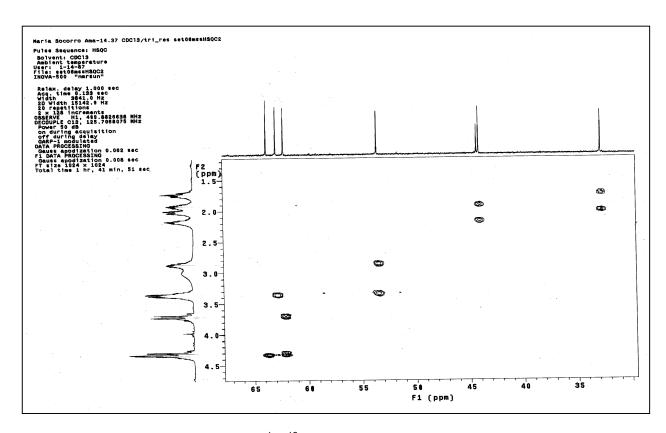
**Esp. 30**: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de **3**.



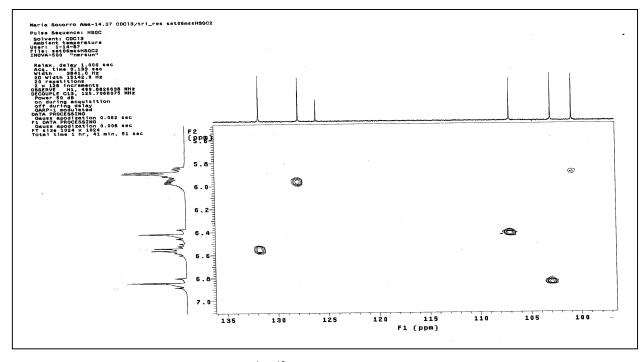
**Esp. 31**: Espectro de DEPT 90 e 135° (125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **3**.



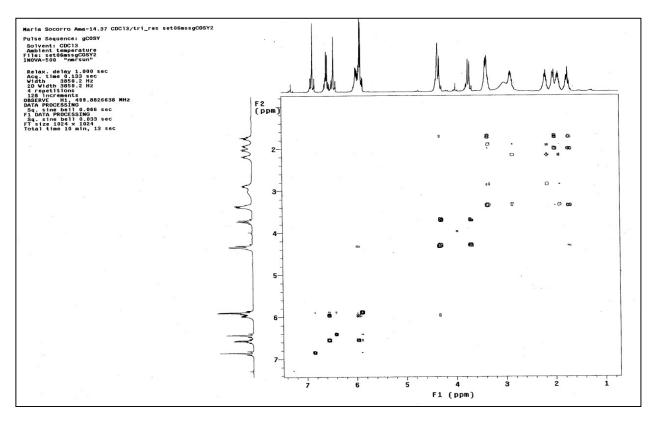
**Esp. 32**: Espectro de RMN gCOSY  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  - gHSQC (499,88 MHz x 125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de **3**.



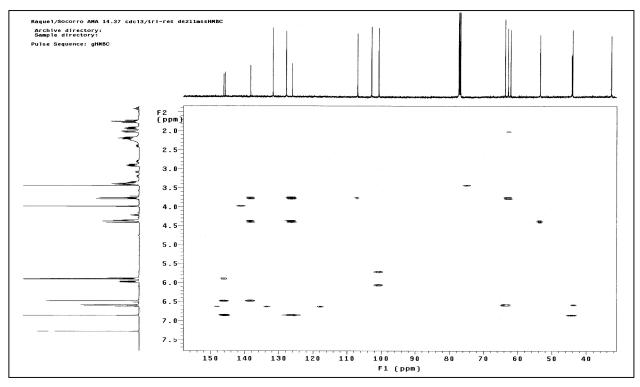
**Esp. 33**: Espectro de RMN gCOSY  $^1$ H- $^{13}$ C - gHSQC (499,88 MHz x 125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **3** - Expansão da região  $\delta$  1,5 a 4,5 ppm e  $\delta$  30 a 67 ppm.



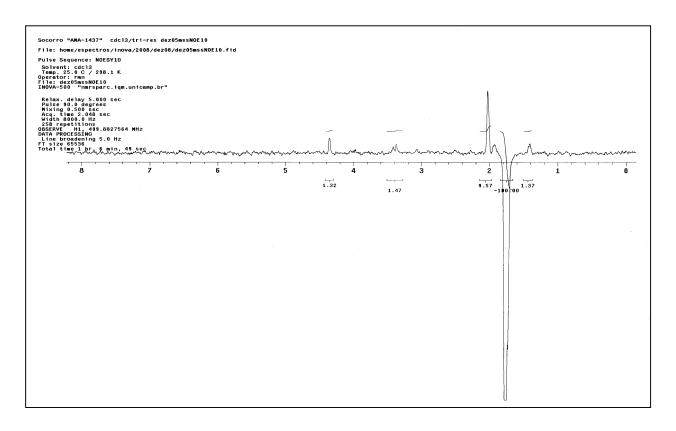
**Esp. 34**: Espectro de RMN gCOSY  $^{1}$ H- $^{13}$ C - gHSQC (499,88 MHz x 125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **3** - Expansão da região δ 5,6 a 7,0 e δ 97 a 135.



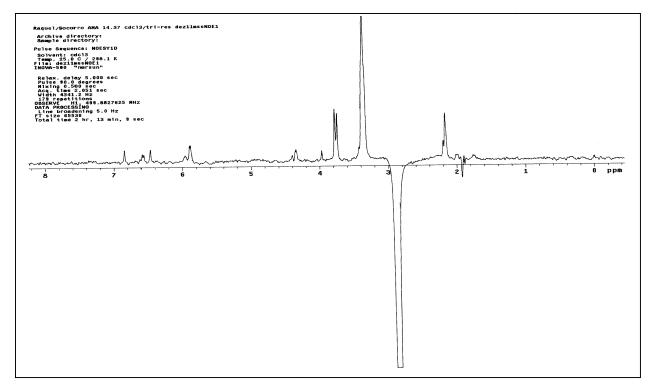
**Esp. 35**: Espectro de RMN gCOSY  $^1$ H- $^1$ H (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **3**.



**Esp. 36**: Espectro de gCOSY  $^1$ H- $^{13}$ C - gHMBC (499,88 MHz x 125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **3**.

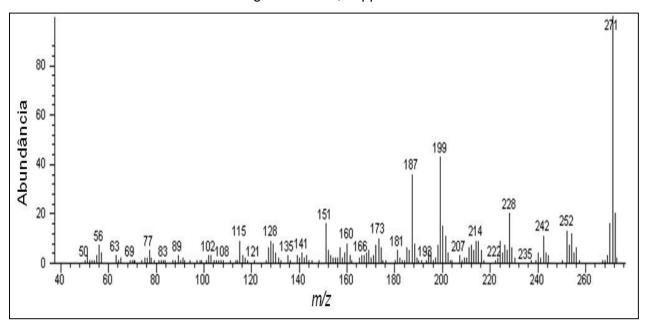


**Esp. 37**: Espectro de NOESY 1D (499,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm), irradiação do hidrogênio em  $\delta$  1,73 ppm de **3**.



**Esp. 38**: Espectro de NOESY 1D (499,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm), irradiação do

# hidrogênio em $\delta$ 2,86 ppm de $\boldsymbol{3}.$



Esp. 39: Espectro de Massas (IE; 70 eV) de 3.

## 5.2.1.1.2. Bufanidrina (4)

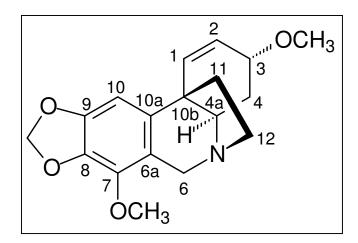


Figura 31: Estrutura do alcalóide bufanidrina 4.

Entre os sinais do espectro de RMN <sup>1</sup>H de **4** (**Esp. 40**) observou-se a presença de um dupleto em  $\delta$  6,57 (J = 10 Hz), um duplo duplo dupleto em  $\delta$  5,96 (J = 10, 5,2 e 1,2 Hz) e um multipleto em  $\delta$  3,82, um simpleto em  $\delta$  6,59, um duplo dupleto em  $\delta$  3,33 (J = 13 e 4 Hz), dois dupletos em  $\delta$  5,86 e 5,84 (J = 1,5 Hz) atribuídos ao grupo metilenodioxila e dois simpletos em  $\delta$  3,35 e 3,96 característicos de hidrogênios em grupo metoxila<sup>58</sup>.

Analisando os espectros de RMN  $^{13}$ C e DEPT (**Esp. 43** e **44**) de **7** observou-se a presença de 18 sinais referentes a 2 CH<sub>3</sub>, 5 CH<sub>2</sub>, 5 CH e 6 C quaternários. Os sinais em  $\delta$  148,0, 140,9, 139,3, 133,4, 132,8, 125,3, 117,1 e 96,9 indicam a presença de um anel aromático e uma ligação olefínica, o sinal em  $\delta$  100,5 (CH<sub>2</sub>) indica um grupo metilenodioxila e os sinais em  $\delta$  56,4 e 59,1 característicos de metoxilas.

Uma atribuição completa dos sinais dos hidrogênios aos seus respectivos carbonos (**Tabela 14**) foi realizada usando as correlações dos espectros gHSQC (**Esp. 45**). Estes dados sugerem um alcalóide com esqueleto tipo-crinina.

A atribuição dos sinais foi confirmada pelas correlações observadas nos espectros de gCOSY  $^1$ H- $^1$ H (**Esp. 47**). O sinal em  $\delta$  5,96 (H-2) correlaciona-se com  $\delta$  3,82 (H-3) e 6,57 (H-1); o sinal em  $\delta$  3,37 (H-12) apresenta correlações com os sinais em  $\delta$  1,92 (H-11), 2,17 (H-11) e 2,88 (H-12); o sinal em  $\delta$  1,92 ((H-11) correlaciona-se com os sinais em  $\delta$  2,17 (H-11), 2,88 e 3,37 (ambos H-12); e o sinal em 1,60 (H-4)

apresenta correlação com δ 2,12 (H-4), 3,33 (H-4a) e 3,82 (H-3).

As correlações observadas no espectro gHMBC (**Esp. 49**), também, estão de acordo com a atribuição dos sinais. O sinal em  $\delta$  6,57 (H-1) correlaciona-se com os carbonos  $\delta$  125,2 (C-2), 72,5 (C-3), 62,7 (C-4a), 139,3 (C-10a), 44,3 (C-10b) e 44,0 (C-11); o sinal em  $\delta$  3,33 (H-4a) correlaciona-se com os sinais em  $\delta$  139,3 (C-10a), 44,3 (C-10b), 58,5 (C-6), 28,6 (C-4), 44,0 (C-11) e 53,6 (C-12); o sinal em  $\delta$  4,25 (H-6) apresenta correlação com os sinais em  $\delta$  117,1 (C-6a), 140,9 (C-7), 139,3 (H-10a), 44,3 (C-10b), 53,6 (C-12); o sinal em  $\delta$  1,92 (H-11) apresenta correlação com  $\delta$  132,8 (C-1), 139,2 (C-10a), 44,3 (C-10b), 53,6 (C-12); o sinal em  $\delta$  6,56 (H-10) correlaciona-se com os sinais em  $\delta$  148,0 (C-9), 139,3 (C-10a), 117,1 (C-6a); e os sinais em  $\delta$  5,86 e 5,84 do grupo metilenodioxila apresentam correlação com os carbonos em  $\delta$  148,0 (C-8) e 133,4(C-9).

A curva de DC (**Figura 56**) forneceu a configuração absoluta do alcalóide **4**, apresenta formato compatível as observadas para os alcalóides do tipo crinina que apresenta a ponte 5,10b-etano na face  $\beta^{40,41,58}$  da molécula e que o hidrogênio H-4a está na face  $\alpha$ . O sinal da rotação óptica  $[\alpha]_D = -36^\circ$  foi compatível com o relatado na literatura para o alcalóide bufanidrina ( $[\alpha]_D = -39^\circ$ )<sup>63</sup>.

O alcalóide **4**, apresenta esqueleto tipo crinina, e seu espectro de massas assim como o do alcalóide **3** apresenta fragmentações características deste tipo de esqueleto. As fragmentações observadas no alcalóide **4** caracterizam os alcalóides da classe que possuem ligação dupla entre C-1 e C-2 e substituinte na posição C-3 no anel C.

O espectro de massas do alcalóide **4** (**Esp. 50**) possui como pico base o íon molecular m/z 315 [C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>]<sup>-+</sup>, comportamento característico destes compostos. A perda do radical metoxila de C-3, localizado em posição gama ao nitrogênio, gera o íon m/z 284 [C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>3</sub>]<sup>+60</sup> (**Figura 32**).

O íon molecular m/z 315  $[C_{16}H_{17}NO_3]^{-1}$  pode sofrer um rearranjo, seguido de perda de metila produzindo o íon benzílico m/z 300  $[C_{17}H_{18}O_4]^+$ , que perde a molécula  $C_3H_5N$ , originando o íon m/z 245  $[C_{14}H_{13}NO_4]^{+60}$  (**Figura 32**).

<sup>&</sup>lt;sup>63</sup> Bates, A. N.; Cooke, J. K.; Dry, L. J.; Goosen, A.; Krüsi, H.; Warren, F. L. *Journal of the Chemical Society*, **1957**, 2537-2540.

**Figura 32**: Proposta de formação dos íons m/z 284, 300 e 245 para o alcalóide **4**.

Neste alcalóide, também, observou-se a fragmentação caracterizada pela perda da molécula  $C_3H_5N$ , decorrente da quebra das ligações entre C-4a/C-10b e C-3/C-4, produzindo o íon radicalar benzílico m/z 260 [ $C_{15}H_{16}O_4$ ], este pode perder o radical metila, também, produzindo o íon m/z 245 [ $C_{14}H_{13}O_4$ ]<sup>+60</sup> (**Figura 33**).

Figura 33: Proposta de formação dos íons m/z 260 e 245 para o alcalóide 4.

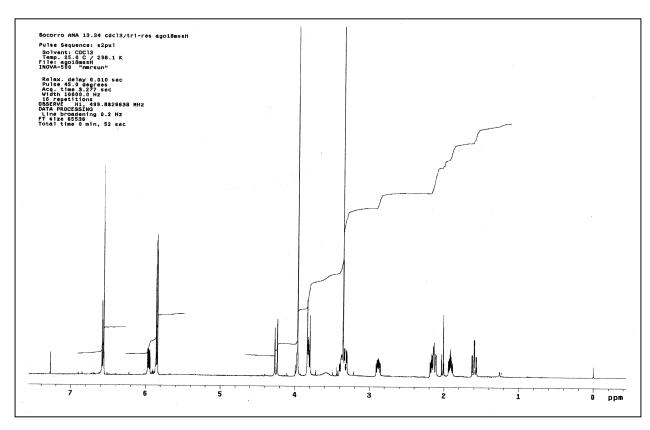
A análise dos dados espectroscópicos de RMN, EM, DC e  $[\alpha]_D$  resultou na sugestão da estrutura da bufanidrina para o alcalóide **4**, esta foi confirmada após comparação dos dados obtidos com os relatado na literatura<sup>40,47,60,63</sup>.

Este alcalóide foi isolado anteriormente dos bulbos de: *Crinum macowanii*<sup>16</sup>, *Nerine bowdenii* W. Wats<sup>44</sup>, *Ammocharis tinneana*<sup>46</sup> e *Brunsvigia josephinae*<sup>47</sup>, *Boöphane disticha* Herb<sup>63</sup>.

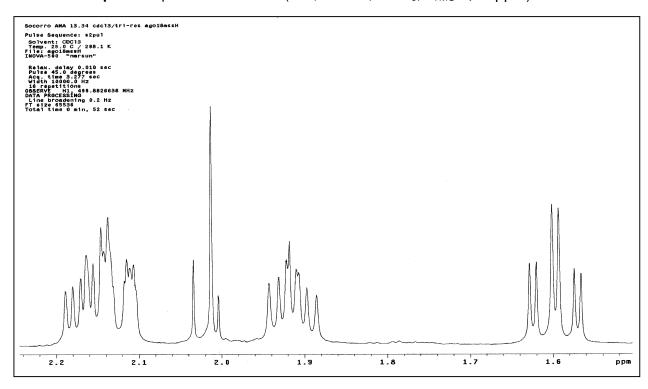
bufanidrina (4)

**Tabela 14**: Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para o alcalóide bufanidrina (**4**).

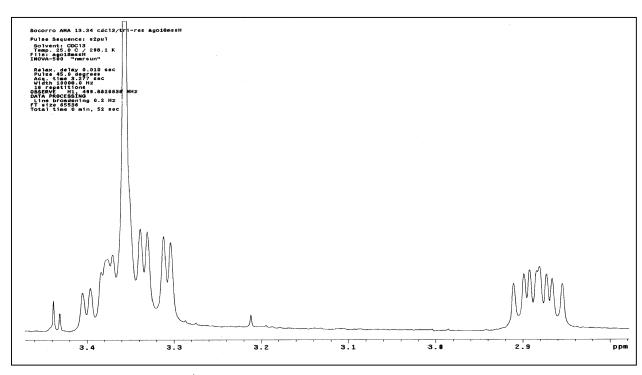
Carbono	$\delta$ (ppm) de $^{13}{ m C}$	Tipo de Carbono	Hidrogênio	δ (ppm) de <sup>1</sup> H	J (Hz)
1	132,8	CH	1	6,57 ( <i>d</i> )	10
2	125,2	СН	2	5,96 ( <i>ddd</i> )	10 e 5,2
3	72,5	СН	3	3,82 ( <i>m</i> )	-
4	28,6	CH <sub>2</sub>	4α	2,12 ( <i>m</i> )	-
			4β	1,60 ( <i>dt</i> )	13,5, 13,5 e 4
4a	62,7	СН	4a	3,33 ( <i>dd</i> )	13 e 4
6	58,5	CH <sub>2</sub>	6α	4,25 ( <i>d</i> )	17
			6β	3,82 ( <i>d</i> )	17
6a	117,1	С	-	-	-
7	140,9	С	-	-	-
8	133,4	С	-	-	-
9	148,0	С	-	-	-
10	96,9	СН	10	6,56 ( <i>s</i> )	-
10a	139,3	С	-	-	-
10b	44,3	С	-	-	-
11	44,0	СН	11 <i>exo</i>	2,17 ( <i>m</i> )	-
			11 <i>endo</i>	1,92 ( <i>ddd</i> )	12,5, 10,7 e 6
12	53,6	CH <sub>2</sub>	12 <i>exo</i>	3,37 ( <i>m</i> )	-
			12 <i>endo</i>	2,88 ( <i>ddd</i> )	13,2, 9,2 e 6
-OCH <sub>2</sub> O-	100,5	CH <sub>2</sub>	-OCH₂O-	5,86 e 5,84 ( <i>d</i> )	1,5
3-OCH₃	56,4	CH₃	OCH <sub>3</sub>	3,35 ( <i>s</i> )	-
7-OCH <sub>3</sub>	59,1	CH <sub>3</sub>	OCH₃	3,96 ( <i>s</i> )	-



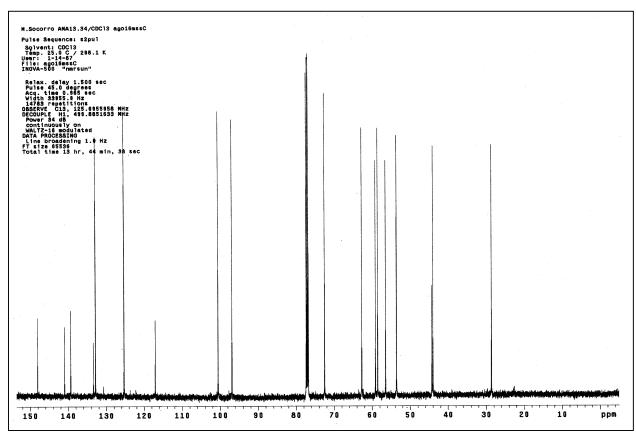
**Esp. 40**: Espectro de RMN  $^1$ H (498,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **4**.



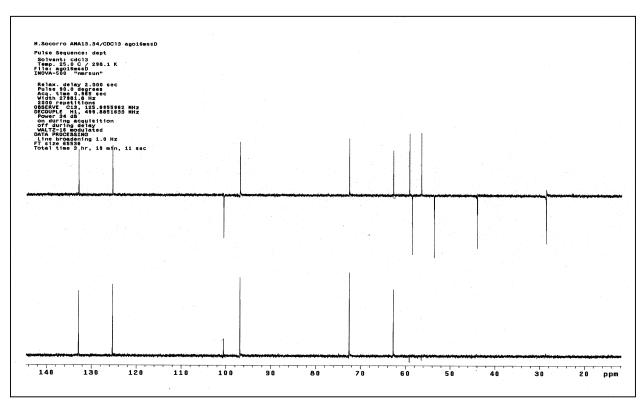
**Esp. 41**: Espectro de RMN  $^1$ H (498,88 MHz; CDCl $_3$ ;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **4** – expansão da região  $\delta$  1,5 a 2,2 ppm.



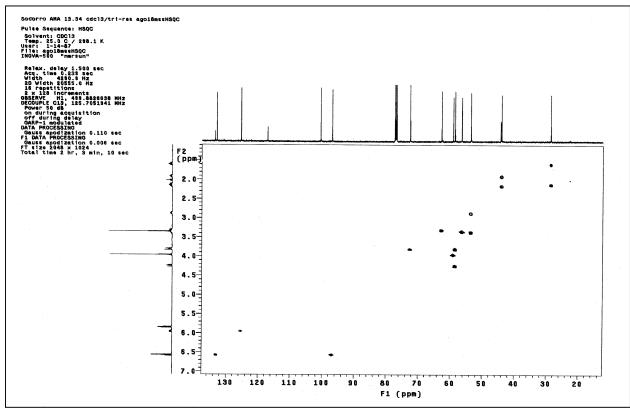
**Esp. 42**: Espectro de RMN  $^1$ H (498,88 MHz; CDCl $_3$ ;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **4** – expansão da região  $\delta$  2,8 a 3,4 ppm.



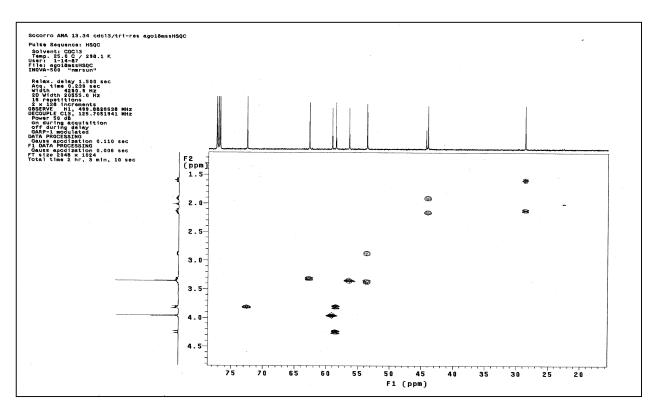
Esp. 43: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125,69 MHz; CDCl3;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de 4.



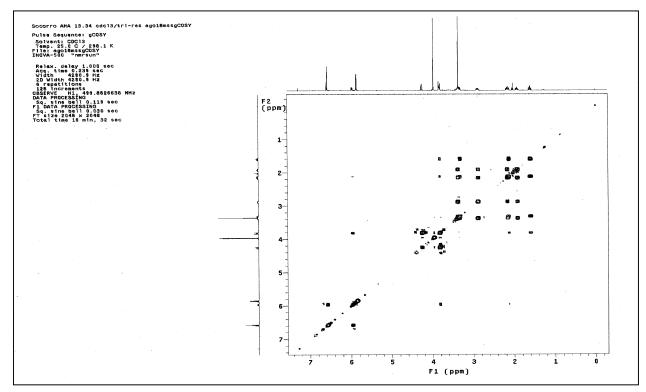
**Esp. 44**: Espectro de DEPT 90 e 135° (125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **4**.



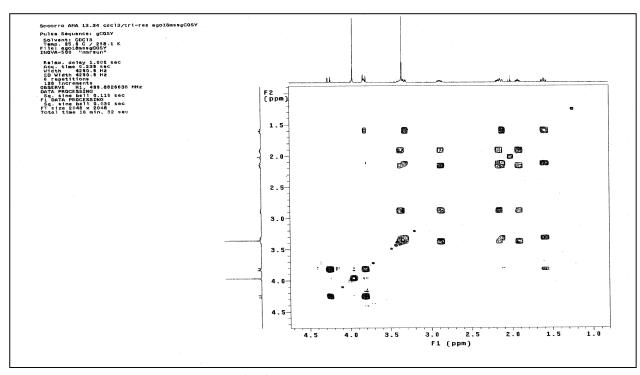
**Esp. 45**: Espectro de RMN gCOSY  $^1$ H- $^{13}$ C - gHSQC (499,88 MHz x 125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **4**.



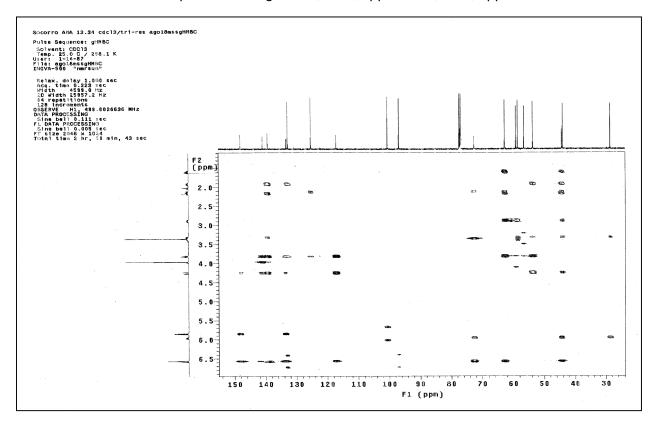
**Esp. 46**: Espectro de RMN gCOSY  $^1$ H- $^{13}$ C - gHSQC (499,88 MHz x 125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **4** – Expansão da região  $\delta$  1,2 a 4,7 ppm e  $\delta$  16 a 78 ppm.



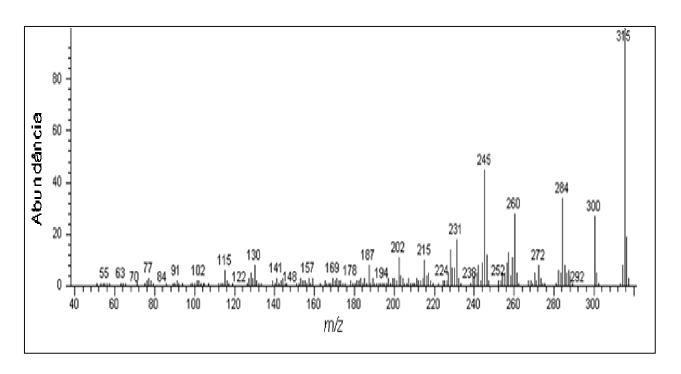
**Esp. 47**: Espectro de RMN gCOSY  $^1$ H- $^1$ H (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **4**.



**Esp. 48**: Espectro de RMN gCOSY  $^{1}$ H- $^{1}$ H (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **4** – Expansão da região  $\delta$  1,0 a 4,5 ppm e  $\delta$  1,0 a 4,5 ppm.



**Esp. 49**: Espectro de RMN gCOSY  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  – gHMBC (499,88 MHz x 125,69 MHz; CDCl $_3$ ;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de **4**.



Esp. 50: Espectro de Massas (IE; 70 eV) de 4.

## 5.2.1.1.3. Undulatina (7)

Figura 34: Estrutura do alcalóide undulatina (7).

O espectro de IV (**Esp. 51**) apresentou as seguintes bandas: deformação axial C-H em 2.992-2.891 cm<sup>-1</sup>, deformação axial de C=C de anel aromático em 1.614 cm<sup>-1</sup>, deformação axial do anel epóxido em 1.280 cm<sup>-1</sup> e deformação angular de C-H do grupo metilenodioxila (-OCH<sub>2</sub>O-) em 921 cm<sup>-1</sup> 58.

No espectro de RMN <sup>1</sup>H (**Esp. 52**) observou-se a presença de dois simpletos largos em  $\delta$  3,32 e 3,97, um simpleto em  $\delta$  6,62, um duplo dupleto em  $\delta$  3,06, um simpleto em  $\delta$  5,86 atribuído ao grupo metilenodioxila e dois simpletos em  $\delta$  3,43 e 3,97, que caracterizam hidrogênios em grupo metoxila. O dupleto em  $\delta$  3,77 (J = 3,7 Hz), que pode ser atribuída ao acoplamento entre hidrogênios vicinais *cis* em anel epóxido<sup>57</sup>.

Nos espectros de RMN  $^{13}$ C e DEPT (**Esp. 54** e **55**) de **7** observou-se a presença de 18 sinais referentes a 2 CH<sub>3</sub>, 5 CH<sub>2</sub>, 5 CH e 6 C quaternários; seis deles típicos de anel aromático 148,0, 141,0, 138,9, 133,4, 117,8 e 96,4, o único relativo a CH; o sinal em  $\delta$  100,6 (CH<sub>2</sub>) indica um grupo metilenodioxila e os sinais em  $\delta$  53,9 e 55,1 indicam o anel epóxido característico deste composto.

O espectro de gHSQC (**Esp. 56**) possibilitou a atribuição dos sinais de hidrogênios a seus respectivos sinais de carbono, como apresentado na **Tabela 15**.

A atribuição dos sinais foi confirmada pelas correlações observadas nos espectros de gCOSY  $^{1}$ H- $^{1}$ H (**Esp. 58**). O sinal em  $\delta$  3,32 (H-2) correlaciona-se com  $\delta$  3,77 (H-1) e 3,97 (H-3); o sinal em  $\delta$  1,40 (H-4) apresenta correlação com 1,75 (H-4),

3,06 (H-4a) e 3,97 (H-3); o sinal em  $\delta$  2,01 (H-11); o sinal em 3,17 (H-12) correlacionase com os sinais em  $\delta$  2,01 e 2,38 (ambos H-11), 2,78 (H-12);

A curva de DC (**Figura 56**) permitiu definir a configuração absoluta de **7**, com a ponte 5,10b-etano na face  $\beta^{41,42,59}$  da molécula e que o hidrogênio H-4a ( $\delta$  3,06) está na face  $\alpha$ . O valor da rotação óptica [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = - 47° foi compatível com o relatado na literatura para o alcalóide undulatina ([ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = - 46°) <sup>47</sup>.

A utilização da técnica NOESY 1D permitiu a confirmação da configuração relativa dos demais carbonos quirais do alcalóide **7.** No espectro NOESY (**Esp. 60**) a irradiação em  $\delta$  3,06 (H-4a,  $\alpha$ ) apresentou acréscimo dos sinais em  $\delta$  4,20 (H-6 $\alpha$ ), 3,43 (3-OCH<sub>3</sub>,  $\alpha$ ) e 1,75 (H-4 $\alpha$ ). A irradiação do sinal em  $\delta$  1,40 (H-4 $\beta$ ) (**Esp. 61**) resultou no acréscimo dos sinais de hidrogênios em  $\delta$  3,97 (H-3 $\beta$ ), 1,75 (H-4 $\alpha$ ), 3,17 (H-12) e 2,38 (H-11). As interações deste com os sinais de H-11 e H-12 permitiram atribuir  $\delta$  2,38 como H-11<sub>exo</sub> e 3,17 como H-12<sub>exo</sub>.

No **Esp. 62** observou-se que a irradiação em  $\delta$  4,20 (H-6 $\alpha$ ) levou a um incremento em  $\delta$  3,71 (H-6 $\beta$ ) e 3,06 (H-4a,  $\alpha$ ), a interação com este último sinal permitiu confirmar que o sinal em  $\delta$  4,20 está na face  $\alpha$  da molécula.

O espectro de massas do alcalóide **7** (**Esp. 63**) possui como pico base o íon molecular m/z 331 [C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>]<sup>-+</sup>, comportamento característico destes compostos. A perda da ponte (C-11/C-12) resulta no pico m/z 303 [C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub>]<sup>-+</sup> e este íon radical perde o radical hidrogênio, aparentemente para ganhar estabilidade, gerando o íon m/z 302 [C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>5</sub>]<sup>+60</sup>. A **Figura 35** apresenta uma proposta para formação dos íons m/z 303 e 302.

Figura 35: Proposta de formação dos íons *m/z* 303 e 302 para o alcalóide 7.

Rearranjos de elétrons em **7** no íon molecular podem favorecer a perda do radical CHO produzindo o íon radical m/z 302  $[C_{17}H_{20}NO_4]^+$  que pode perder a ponte etano gerando o íon radical m/z 272  $[C_{15}H_{14}NO_4]^{+}$  64. A **Figura 36** apresenta uma proposta para formação dos íons m/z 302 e 272.

Figura 36: Proposta de formação dos íons m/z 302 e 272 para o alcalóide 7.

O rearranjo de elétrons em **7**, observado na **Figura 36**, também possibilita a perda do radical metila em C-3 gerando o íon m/z 316  $[C_{17}H_{18}NO_5]^+$  que pode perder o radical 'CHO gerando o íon m/z 287  $[C_{16}H_{17}NO_4]^{-+}$ , que por perda de radical H<sup>-</sup> gera o íon m/z 286  $[C_{16}H_{16}NO_4]$ . A perda do radical metoxila de C-3, no íon molecular gera o íon m/z 300  $[C_{17}H_{18}NO_4]^{+64}$ . A **Figura 37** apresenta uma proposta para formação dos íons m/z 300, 316, 287 e 286.

\_

<sup>&</sup>lt;sup>64</sup> Samuel, E. H. Organic Mass Spectrometry, 1975, 10, 427-431

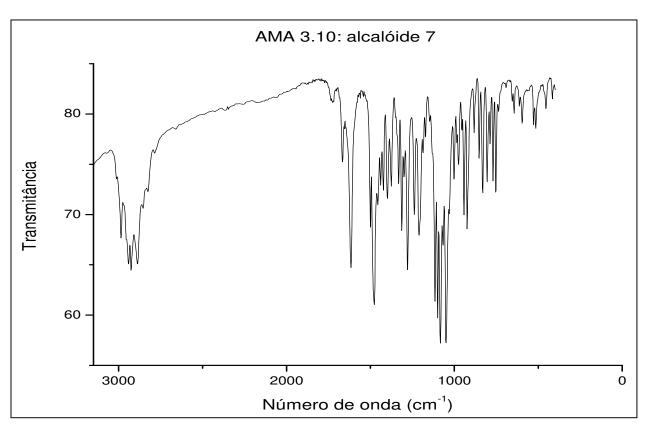
**Figura 37**: Proposta de formação dos íons m/z 316, 287, 286 e 300 para o alcalóide **7**.

Os dados espectroscópicos RMN, IV, EM, DC e  $[\alpha]_D$  do alcalóide **7** foram comparados com dados da literatura<sup>40,47,49</sup> e a este foi atribuída à estrutura da undulatina.

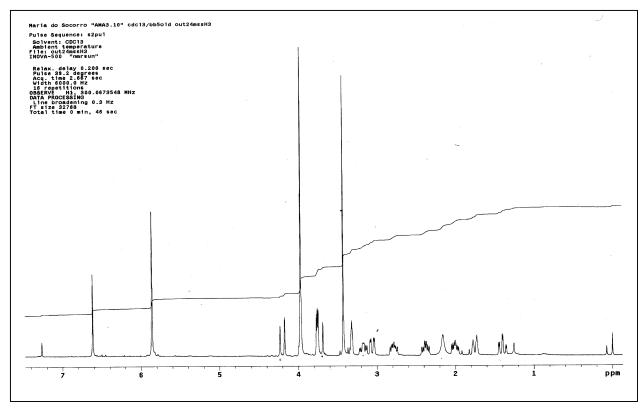
Este alcalóide foi isolado anteriormente dos bulbos de: *Nerine filifolia*<sup>15</sup>, *Crinum macowanni*<sup>16</sup>, *Nerine bowdenii* W. Wats<sup>44</sup>, *Ammocharis tinneana*<sup>46</sup>, *Brunsvigia josephinae*<sup>47</sup>, *Crinum moorei*<sup>48</sup>, *Brunsvigia orientalis*<sup>49</sup>, *Amaryllis belladonna*<sup>20</sup>.

**Tabela 15**: Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para o alcalóide undulatina (**7**).

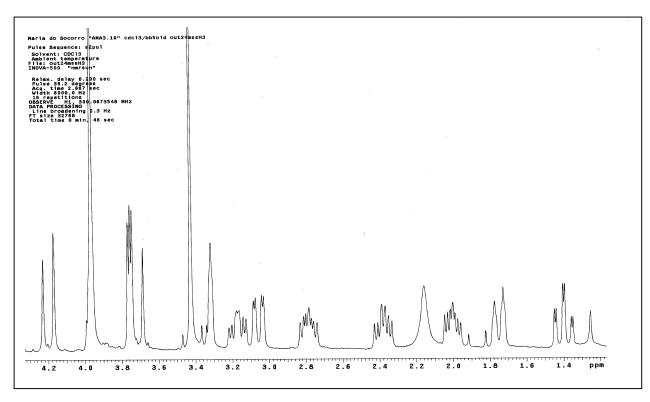
Carbono	$\delta$ (ppm) de $^{13}{ m C}$	Tipo de Carbono	Hidrogênio	$\delta$ (ppm) de $^{1} H$	J (Hz)
1	53,9	СН	1	3,77 ( <i>d</i> )	3,7
2	55,1	СН	2	3,32 ( <i>sl</i> )	-
3	74,9	СН	3	3,97 (s)	-
4	25,2	CH <sub>2</sub>	4α	1,75 ( <i>dl</i> )	14
			4β	1,40 (td)	14, 14 e 4
4a	61,2	СН	4a	3,06 ( <i>dd</i> )	14 e 4
6	58,6	CH <sub>2</sub>	6α	4,20 ( <i>d</i> )	17,6
			6β	3,71 ( <i>d</i> )	17,6
6a	117,8	С	-	-	-
7	141,0	С	-	-	-
8	133,4	С	-	-	-
9	148,0	С	-	-	-
10	96,4	СН	10	6,62 ( <i>s</i> )	-
10a	138,9	С	-	-	-
10b	41,5	С	-	-	-
11	39,2	CH <sub>2</sub>	11 <i>exo</i>	2,38 (td)	11, 11 e 5
			11 <i>endo</i>	2,02 ( <i>ddd</i> )	13, 9 e 4
12	53,5	CH <sub>2</sub>	12 <i>exo</i>	3,17 ( <i>td</i> )	11, 11 e 4
			12 <i>endo</i>	2,78 ( <i>ddd</i> )	13, 9 e 5
-OCH <sub>2</sub> O-	100,8	CH <sub>2</sub>	-OCH <sub>2</sub> O-	5,86 ( <i>s</i> )	-
3-OCH <sub>3</sub>	57,5	CH <sub>3</sub>	OCH₃	3,43 ( <i>s</i> )	-
7-OCH <sub>3</sub>	59,1	CH <sub>3</sub>	7-OCH₃	3,97 ( <i>s</i> )	-



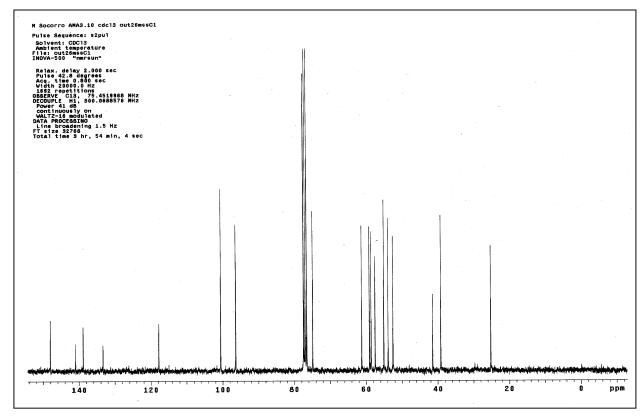
Esp. 51: Espectro de IV (pastilha de KBr) de 7.



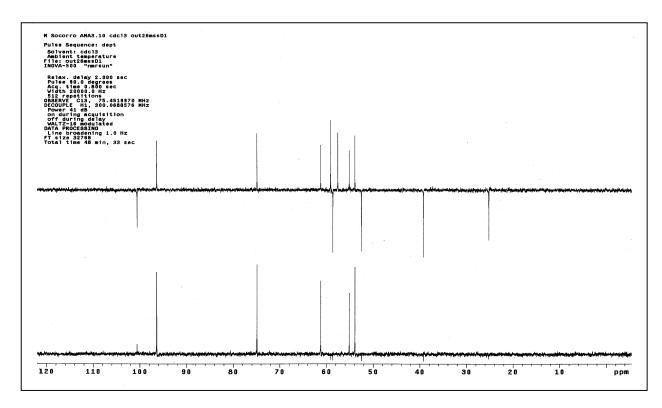
**Esp. 52**: Espectro de RMN  $^1H$  (300,07 MHz; CDCl3;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **7**.



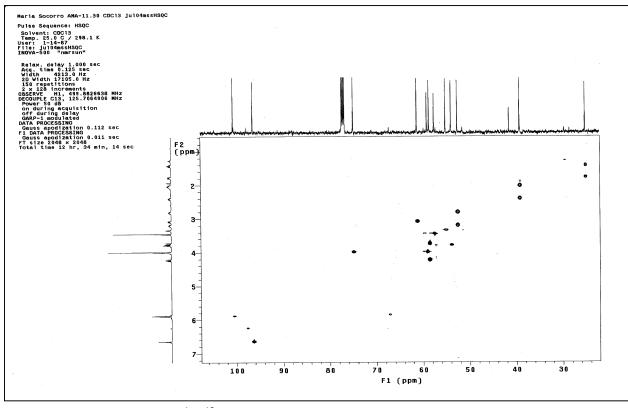
**Esp. 53**: Espectro de RMN  $^1$ H (300,07 MHz; CDCl $_3$ ;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **7** – Expansão da região  $\delta$  4,3 a 1,2 ppm.



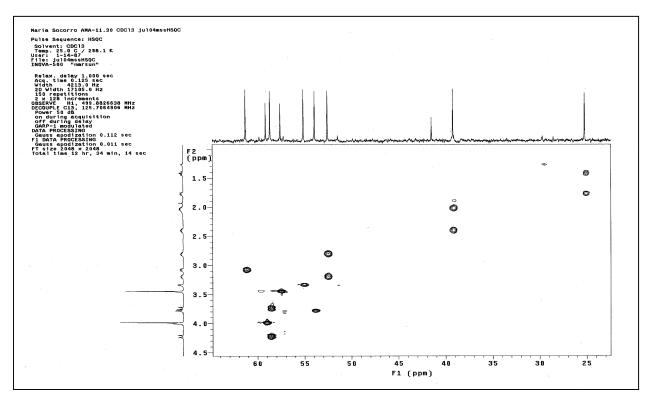
**Esp. 54**: Espectro de RMN  $^{13}$ C (75,45 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **7**.



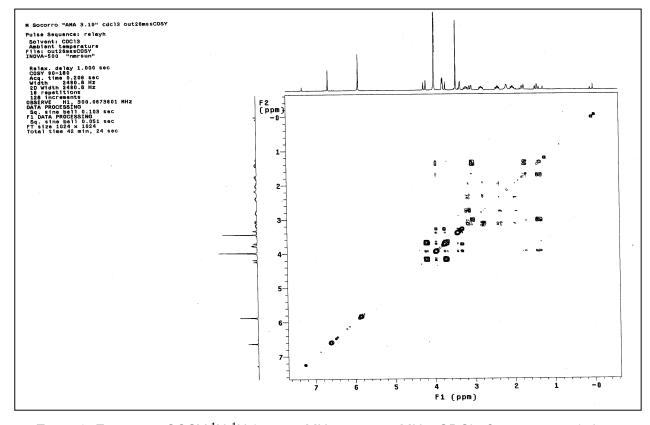
**Esp. 55**: Espectro de DEPT (75,45 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **7**.



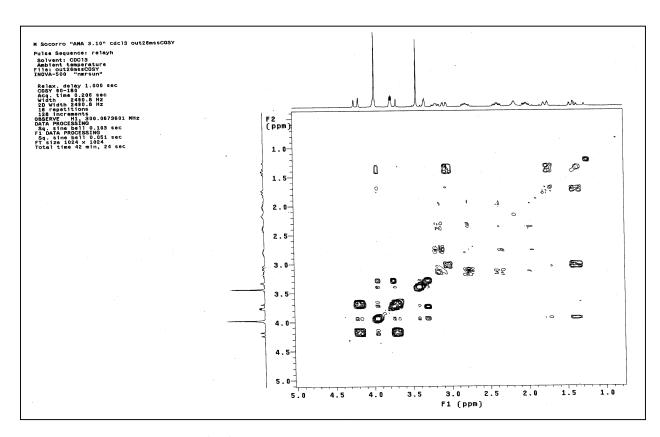
**Esp. 56**: Espectro gCOSY  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  - gHSQC (499,88 MHz x 125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de **7**.



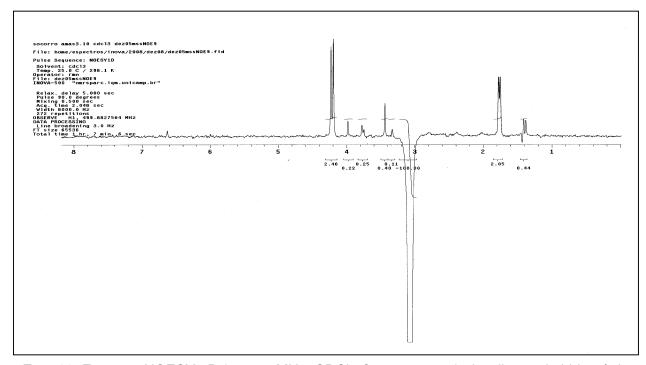
**Esp. 57**: Espectro gCOSY  $^{1}$ H- $^{13}$ C - gHSQC (499,88 MHz x 125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **7** – Expansão da região δ 66 a 23 ppm e 4,5 a 1,0 ppm.



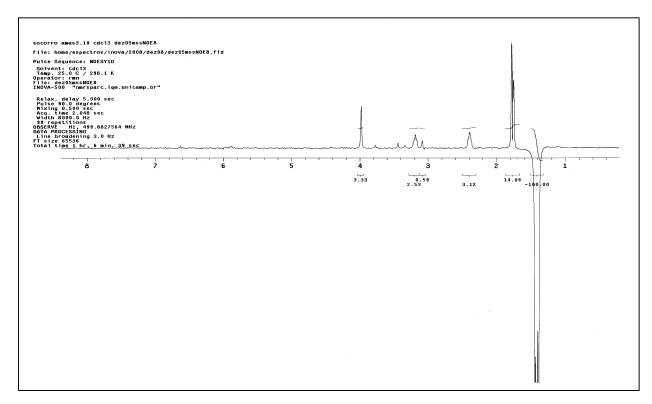
**Esp. 58**: Espectro gCOSY  $^{1}H^{-1}H$  (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **7**.



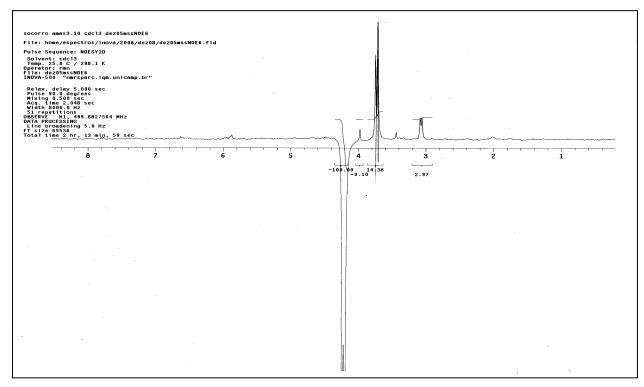
**Esp. 59**: Espectro gCOSY  $^{1}$ H- $^{1}$ H (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCI<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **7** –  $\delta$  4,5 a 1,0 ppm e  $\delta$  4,5 a 1,0 ppm.



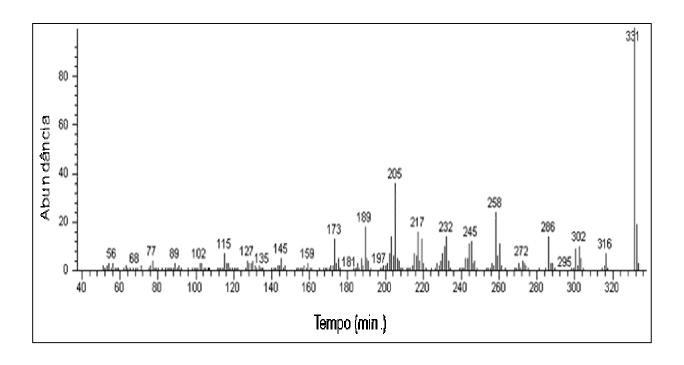
**Esp. 60**: Espectro NOESY 1D (499,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm), irradiação do hidrogênio em  $\delta$  3,06 ppm de **7**.



**Esp. 61**: Espectro de NOESY 1D (499,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm), irradiação do hidrogênio em  $\delta$  1,40 ppm de **7**.



**Esp. 62**: Espectro NOESY 1D (499,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm), irradiação do hidrogênio em  $\delta$  4,20 ppm de **7**.



Esp. 63: Espectro de Massas (IE, 70 eV) de 7.

## 5.2.1.1.4. Ambelina (8)

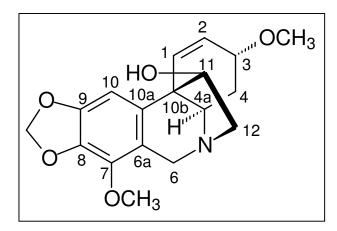


Figura 38: Estrutura do alcalóide ambelina (8).

O espectro de IV (**Esp. 64**) apresentou as seguintes bandas: deformação axial de O-H em 3.433 cm<sup>-1</sup>, deformação axial de C-H em 3.084- 2968 cm<sup>-1</sup>, deformação axial de C=C de anel aromático e olefina em 1.618 e 1.482 cm<sup>-1</sup> e deformação angular de C-H do grupo metilenodioxila em 929 cm<sup>-1 58</sup>.

No espectro de RMN  $^1$ H (**Esp. 65**) observou-se a presença de: um simpleto em  $\delta$  6,60, um dupleto em  $\delta$  6,58 (J = 10 Hz), um duplo dupleto em  $\delta$  6,02 (J = 10 e 5 Hz), um multipleto em  $\delta$  3,86, um duplo dupleto em  $\delta$  3,37 (J = 14 e 4), dois dupletos em  $\delta$  5,89 e 5,88 (J = 1,5 Hz) atribuídos aos hidrogênios do grupo metilenodioxila, e dois simpletos em  $\delta$  3,36 e 4,00, característicos de hidrogênios em grupo metoxila.

Nos espectros de RMN  $^{13}$ C e DEPT (**Esp. 68** e **69**) de **8** observou-se a presença de 18 sinais referentes a 2 CH<sub>3</sub>, 4 CH<sub>2</sub>, 6 CH e 6 C quaternários. Os sinais em  $\delta$  148,8, 140,3, 133,78, 132,6, 131,5, 125,3, 116,3 e 96,8 indicam a presença de um anel aromático e uma ligação olefínica, o sinal em  $\delta$  100,4 (CH<sub>2</sub>) é característico de grupo metilenodioxila e os sinais em  $\delta$  58,6 (CH<sub>3</sub>) e 55,9 (CH<sub>3</sub>) indicam grupos metoxilas.

O espectro de gHSQC (**Esp. 70**) permitiu atribuir os sinais de hidrogênio aos seus respectivos sinais de carbono, como apresentado na **Tabela 16**.

A atribuição dos sinais foi confirmada pelas correlações observadas nos espectros de gCOSY  $^{1}$ H- $^{1}$ H (**Esp. 72**). O sinal em  $\delta$  6,02 (H-2) correlaciona-se com  $\delta$  6,58 (H-1) e 3,86 (H-3); o sinal em  $\delta$  1,70 (H-4) apresenta correlação com  $\delta$  2,10 (H-4),

3,37 (H-4a) e 3,86 (H-3); o sinal em  $\delta$  3,37 (H-4a) correlaciona-se com  $\delta$  2,55 (H-12), 1,70 e 2,10 (ambos H-4); e o sinal em  $\delta$  2,55 (H-12) correlaciona-se com  $\delta$  3,37 (H-4a), 3,64 (H-12) e 4,41 (H-11).

O espectro de gHMCB (**Esp. 74**), também, confirmou as atribuições apresentadas na **Tabela 17**. O sinal de hidrogênio em  $\delta$  6,58 (H-1) correlaciona-se com os sinais de carbono em  $\delta$  132,6 (10a), 71,5 (C-3), 62,6 (C-4a) e 47,7 (C-10b); o sinal em  $\delta$  3,86 (H-3) correlaciona-se com os sinais em  $\delta$  131,6 (C-1), 125,3 (C-2) e 55,9 (3-OCH<sub>3</sub>); o sinal em  $\delta$  3,37 (H-4a) apresenta correlação com  $\delta$  132,6 (C-10a), 84,9 (C-11), 60,6 (C-12), 47,7 (C-10b) e 27,7 (C-4); o sinal em  $\delta$  6,60 (H-10) apresenta correlação com  $\delta$  147,8(C-9), 140,3 (C-7), 133,7(8), 132,6 (C-10a) e 116,3 (C-6a); o sinal em  $\delta$  2,55 (H-12) apresenta correlação com  $\delta$  84,9 (C-11), 62,6 (C-4a) e 53,5 (C-6); o sinal em  $\delta$  4,00 (7-OCH<sub>3</sub>) correlaciona-se com  $\delta$  140,3 (C-7) e o sinal em  $\delta$  3,36 (3-OCH<sub>3</sub>) correlaciona-se com  $\delta$  71,3 (C-3).

A curva de DC (**Figura 8**) forneceu a configuração absoluta de **8**, revelando que a ponte 5,10b-etano está na face  $\beta^{41,42,59}$  da molécula que o hidrogênio H-4a ( $\delta$  2,10) está na face  $\alpha$ .

As constantes de acoplamento, apresentadas na **Tabela 17**, podem ser utilizadas para determinar a relação espacial entre o hidrogênio. H-4a e os hidrogênios H-4. O sinal de H-4a ( $\delta$  3,37) apresenta-se como um duplo dupleto com J = 14 e 4 Hz. A primeira constante decorrente de uma relação *trans*-diaxial com H-4 $\beta$  ( $\delta$  1,70) e a segunda relativa a uma interação axial-equatorial *cis* com o H-4 $\alpha$  ( $\delta$  2,10)<sup>47</sup>.

As correlações entre  $\delta$  4,41 (H-11) e os hidrogênios  $\delta$  3,64 e 2,55 (H-12) podem ser observadas nas constantes de acoplamentos; o valor de J = 8,3 pode ser atribuído a correlação com o hidrogênio de H-12 em posição cis ( $\delta$  3,64) a H-11 e o valor de J = 4,6 relativo à correlação trans ( $\delta$  2,55).

O valor da rotação óptica da literatura  $([\alpha]_D = +43^\circ)^{20}$  foi compatível com o determinado para o alcalóide **8**,  $[\alpha]_D = +36^\circ$ , sugerindo, também, a estrutura da ambelina.

Alcalóides tipo-crinina que apresentam grupo hidroxila como substituinte em C-11 como a ambelina (**Figura 38**) apresentam fragmentações dirigidas por este substituinte<sup>65</sup>. O espectro de massas do alcalóide **8** (**Esp. 74**) possui como pico base o íon molecular m/z 331 [ $C_{18}H_{21}NO_5$ ]<sup>+</sup>. A perda do radical hidroxila de C-3, localizado em posição gama ao nitrogênio, gera o íon m/z 300 [ $C_{17}H_{18}NO_4$ ]<sup>+</sup> e a perda do radical metila gera o íon m/z 316 [ $C_{17}H_{18}NO_5$ ]<sup>+ 65</sup>.

O íon radical m/z 331 [C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>]<sup>-+</sup> pode sofrer um rearranjo para depois perder uma molécula de metanol produzindo o íon radical m/z 299 [C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>]<sup>-+</sup> este por perder hidrogênio radicalar gerando o íon m/z 298 [C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>4</sub>]<sup>-+</sup> ou perder o radical CHO produzindo o íon m/z 270 [C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>3</sub>]<sup>-+</sup> este por sua vez pode perder a molécula CH<sub>2</sub>=NH e produzir o íon benzílico m/z 241 [C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> que poder perder a molécula CH<sub>2</sub>O e gerar o íon m/z 211 [C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (**Figura 39**)<sup>65</sup>.

Figura 39: Proposta de formação dos íons *m/z* 299, 298, 270, 241 e 211 a partir de 8.

131

<sup>&</sup>lt;sup>65</sup> Longevialle, P.; Burlingame, A. L. *Organic Mass Spectrometry*, **1973**, 7, 417-430.

No espectro de massas de **8** observa-se um pico em m/z 287 de grande intensidade. A **Figura 40** apresenta-se uma proposta para a formação deste pico, que consiste na perda da ponte etano do íon molecular originando o íon radical m/z 287  $[C_{16}H_{17}NO_4]^{-+}$ .

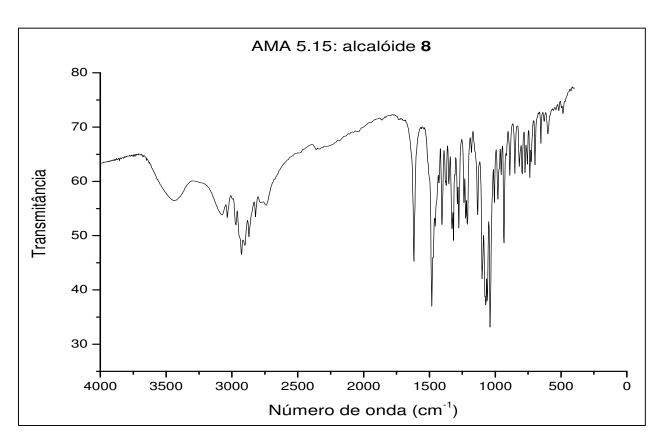
**Figura 40**: Proposta de formação do íon m/z 287 a partir de **8**.

A análise dos dados espectroscópicos de RMN, EM, DC e  $[\alpha]_D$  resultou na sugestão da estrutura da ambelina para o alcalóide **8**, esta foi confirmada após comparação dos dados obtidos para o alcalóide **8** com os relatado na literatura<sup>20,41,47</sup>.

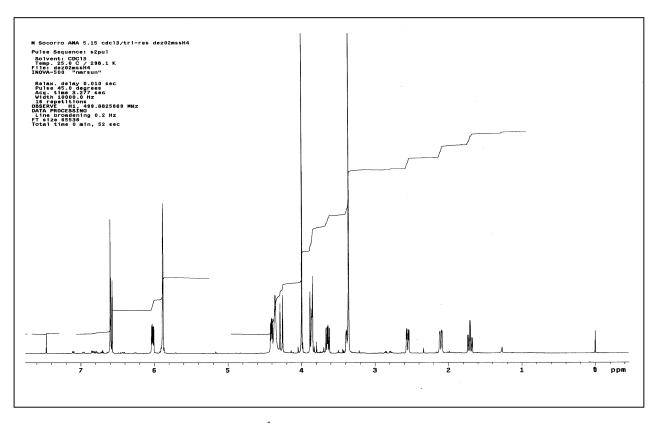
Este alcalóide foi isolado anteriormente dos bulbos de: *Nerine bowdenii* W. Wats<sup>44</sup>, *Ammocharis tinneana*<sup>46</sup>, *Brunsvigia josephinae*<sup>47</sup>, *Crinum macowanii*<sup>16</sup>.

**Tabela 16**: Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para o alcalóide ambelina (**8**).

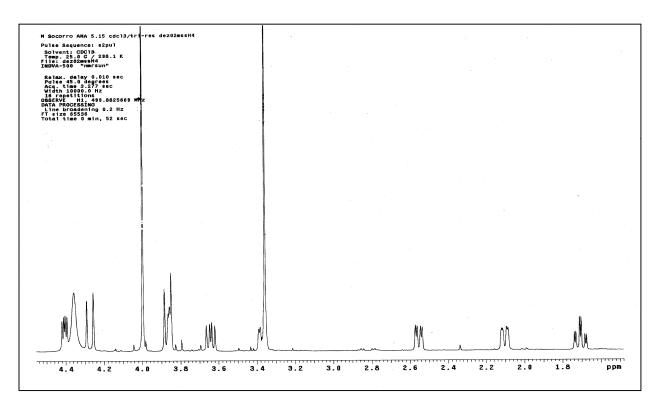
Carbono	$\delta$ (ppm) de $^{13}{ m C}$	Tipo de Carbono	Hidrogênio	$\delta$ (ppm) de $^1$ H	J (Hz)
1	131,6	СН	1	6,58 ( <i>d</i> )	10
2	125,3	СН	2	6,02 ( <i>dd</i> )	10 e 5
3	71,9	СН	3	3,86 ( <i>m</i> )	-
4	27,7	CH <sub>2</sub>	4α	2,10 ( <i>dl</i> )	14
			4β	1,70 ( <i>ddd</i> )	14, 14 e 4
4a	62,6	СН	4a	3,37 ( <i>dd</i> )	14 e 4
6	58,5	CH <sub>2</sub>	6α	4,27 ( <i>d</i> )	17
			6β	3,87 ( <i>d</i> )	17
6a	116,3	С	-	-	-
7	140,3	С	-	-	-
8	133,8	С	-	-	-
9	147,8	С	-	-	-
10	96,8	СН	10	6,60 ( <i>s</i> )	-
10a	132,6	С	-	-	-
10b	47,7	С	-	-	-
11	84,9	СН	11 <i>exo</i>	4,41 ( <i>dd</i> )	8,3 e 4,6
12	60,6	CH <sub>2</sub>	12 <i>exo</i>	3,64 ( <i>dd</i> )	13,5 e 8,3
			12 <i>endo</i>	2,55 ( <i>dd</i> )	13,5 e 4,6
-OCH <sub>2</sub> O-	100,4	CH <sub>2</sub>	-OCH <sub>2</sub> O-	5,89 e 5,88 ( <i>d</i> )	1,53
3-OCH <sub>3</sub>	55,9	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	3,36 ( <i>s</i> )	-
7-OCH <sub>3</sub>	58,6	CH <sub>3</sub>	7-OCH₃	4,00 (s)	-



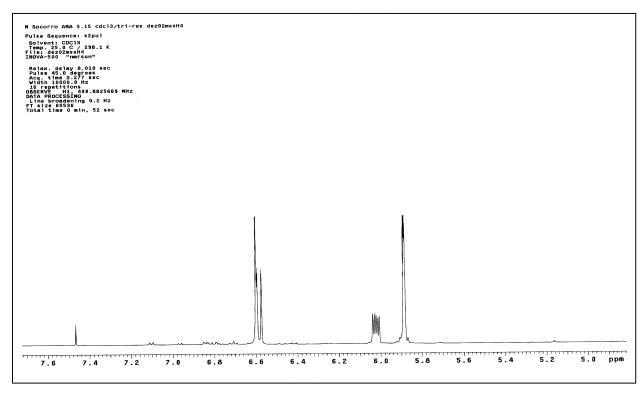
Esp. 64: Espectro de IV (pastilha de KBr) de 8.



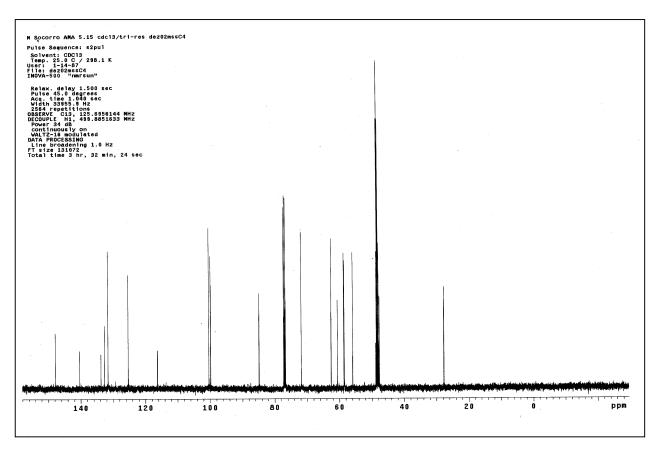
Esp. 65: Espectro de RMN  $^1H$  (300,07 MHz; CDCl3;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de 8.



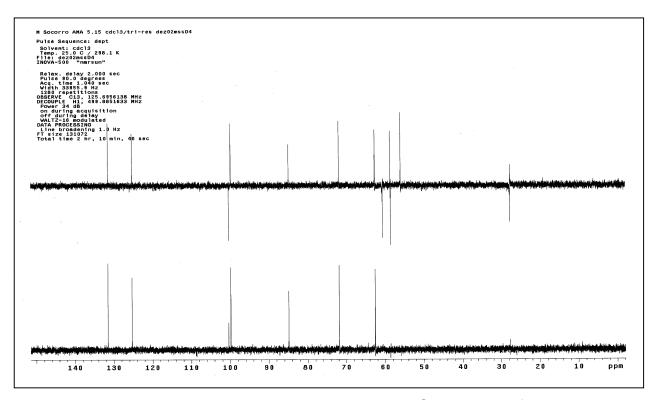
**Esp. 66**: Espectro de RMN  $^1$ H (300,07 MHz; CDCl $_3$ ;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **8** – Expansão da região  $\delta$  1,9 a 4,5 ppm.



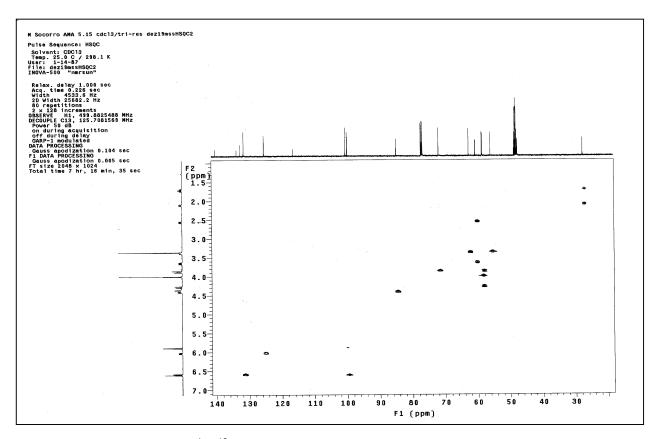
**Esp. 67**: Espectro de RMN  $^1$ H (300,07 MHz; CDCl $_3$ ;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **8** – Expansão da região  $\delta$  4,9 a 5,6 ppm.



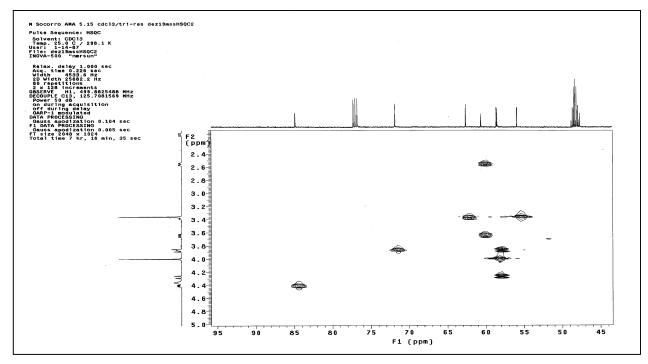
Esp. 68: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125,69 MHz; CDCl $_{\!3};\,\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de 8.



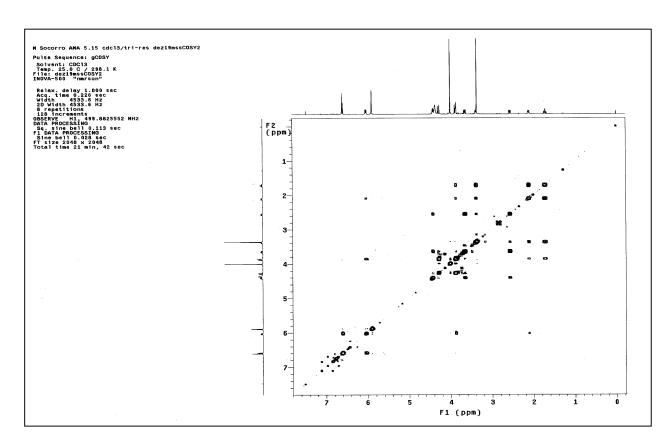
**Esp. 69**: Espectro de DEPT (125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **8**.



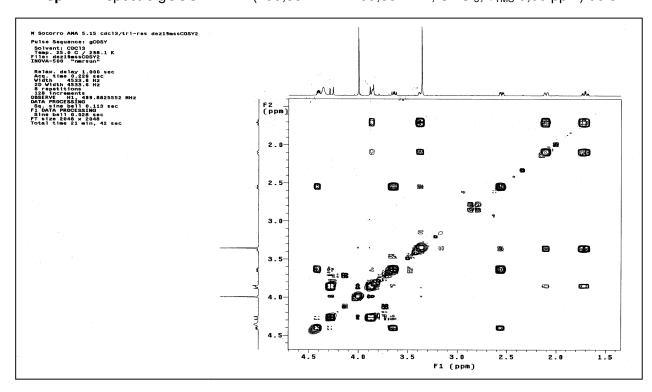
**Esp. 70**: Espectro gCOSY  $^{1}\text{H-}^{13}\text{C}$  - gHSQC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de **8**.



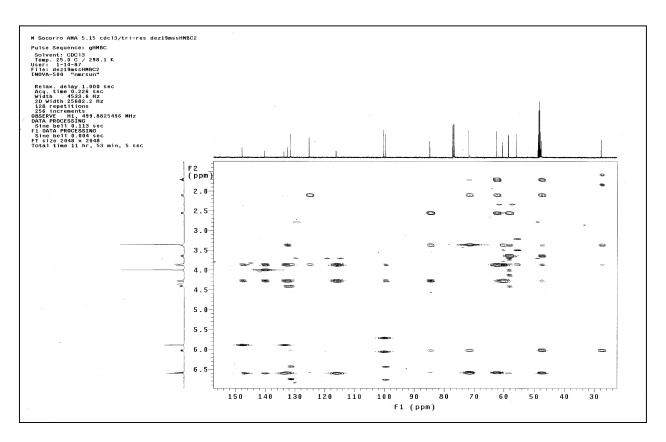
**Esp. 71**: Espectro gCOSY  $^{1}$ H- $^{13}$ C - gHSQC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $δ_{TMS}$  0,00 ppm) de **8** - Expansão da região δ 2,3 a 5,0 ppm e δ 45 a 95 ppm.



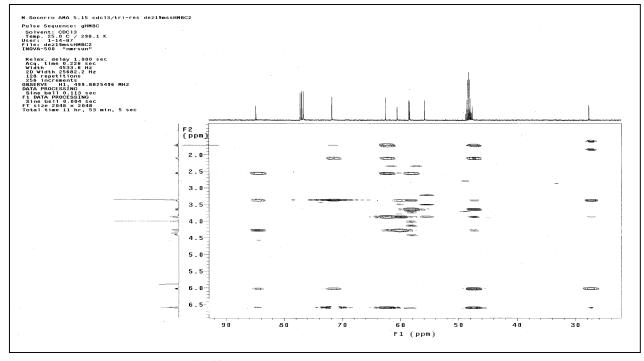
**Esp. 72**: Espectro gCOSY  $^{1}$ H- $^{1}$ H (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **8**.



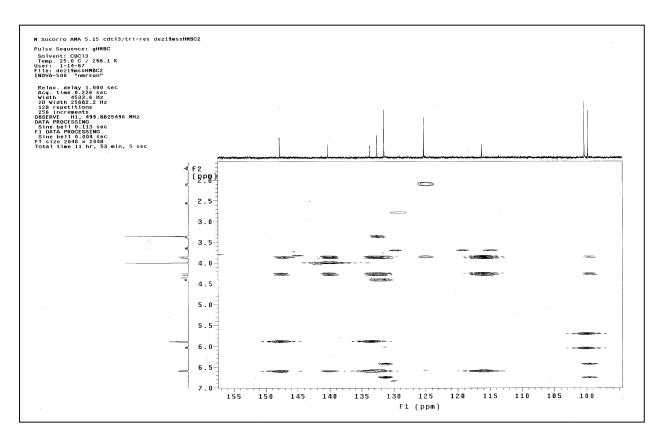
**Esp. 73**: Espectro gCOSY  $^1$ H- $^1$ H (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **8** – Expansão da  $\delta$  1,5 a 4,6 ppm e  $\delta$  1,5 a 4,6 ppm.



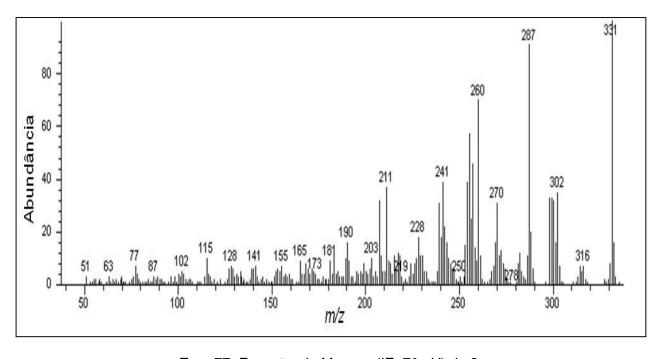
**Esp. 74**: Espectro gCOSY  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  - gHMBC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de **8**.



**Esp. 75**: Espectro gCOSY  $^{1}$ H- $^{13}$ C - gHMBC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **8** – Expansão da δ 1,2 a 6,7 ppm e δ 26 a 92 ppm.



**Esp. 76**: Espectro gCOSY  $^{1}$ H- $^{13}$ C - gHMBC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **8** – Expansão da δ 1,6 a 7,0 ppm e δ 95 a 157 ppm.



Esp. 77: Espectro de Massas (IE; 70 eV) de 8.

## 5.2.1.1.5. 11-*O*-acetil-ambelina (6)

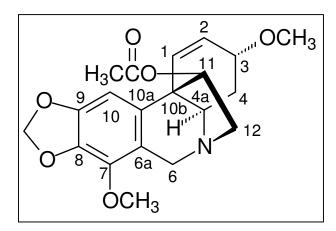


Figura 41: Estrutura do alcalóide 11-O-acetil-ambelina (6).

Os espectros de RMN  $^1$ H e  $^{13}$ C (**Esp. 78 e 82**) do alcalóide **6** possuem aspectos semelhantes aos do alcalóide **8**. As diferenças significativas foram devidas a substituição do hidrogênio da hidroxila de C-11 do alcalóide **8** pelo grupo acila (-COCH<sub>3</sub>) de **6**. O sinal do carbono C-11 ( $\delta$  87,3) apresentou-se desprotegido em  $\Delta\delta$  = + 3,6 e o sinal do hidrogênio H-11<sub>exo</sub> ( $\delta$  5,12), também, apresentou-se desprotegido em  $\Delta\delta$  = + 0,71, em relação aos correspondentes sinais do alcalóide ambelina (**8**). Os demais sinais apresentaram apenas pequenas variações nos seus deslocamentos.

No espectro de RMN  $^1$ H de **6** (**Esp. 78**) observou-se os mesmos sinais que **8**, junto com o sinal da metila do grupo acila em  $\delta$  1,83. No espectro de RMN  $^{13}$ C (**Esp. 82**) observou-se dois novos sinais em  $\delta$  170,9 e 20,9, atribuídos, respectivamente a carbonila e a metila do grupo acila.

O espectro de gHSQC (**Esp. 84**) permitiu atribuir os sinais de hidrogênio aos seus respectivos sinais de carbono, como apresentado na **Tabela 17**.

O espectro gCOSY  $^1$ H- $^1$ H (**Esp. 86**) confirmou as correlações observadas. O sinal em  $\delta$  6,54 (H-1) correlaciona-se com os sinais em  $\delta$  6,03 (H-2) e 3,85 (H-3); o sinal em  $\delta$  1,71 H (H-4) apresenta correlação com  $\delta$  3,42 (H-4a) e 2,12 (H-4); o sinal em  $\delta$  3,75 (H-12) correlaciona-se com  $\delta$  5,12 (H-11) e 2,73 (H-12).

A atribuição dos sinais foi confirmada, também, pelas correlações observadas no espectro de gHMBC (**Esp. 88**). O sinal em  $\delta$  6,54 (H-1) correlaciona-se com 133,6 (C-

10a), 72,2 (C-3), 63,5 (C-4a) e 47,5 (C-10b); o sinal em  $\delta$  2,12 (H-4) correlaciona-se com os sinais em 72,2 (C-3), 63,5 (C-4a) e 47,5 (C10b); o sinal em  $\delta$  4,32 (H-6) apresenta correlação com os sinais em  $\delta$  133,6 (C-10a), 117,3 (C-6a) e 59,4 (C-12); o sinal em  $\delta$  6,45 (H-10) correlaciona-se com os sinais em 147,9 (C-9), 133,6 (C-C-10a), 117,3 (C-6a) e 47,5 (C-10b); o sinal em  $\delta$  2,73 (H-12) correlaciona-se com os sinais em  $\delta$  87,3 (C-11) e 63,5 (C-4a); o sinal em  $\delta$  5,84 (-OCH<sub>2</sub>O-) correlaciona-se com os carbonos em  $\delta$  147,8 (C-9) e 133,6 (C-8); os hidrogênios das metilas em  $\delta$  3,34 e 3,98 correlaciona-se com os sinais em  $\delta$  72,2 (C-3) e 140,5 (C-7), respectivamente; e o sinal em  $\delta$  1,83 correlaciona-se com a carbonila em  $\delta$  170,9.

As constantes de acoplamentos observadas entre os hidrogênios do alcalóide 6 (**Tabela 17**) são semelhantes às observadas para o alcalóide 8, portanto os alcalóides apresentam as mesmas correlações.

A partir da curva de DC deste alcalóide (**Figura 58**) determinou-se a configuração absoluta do carbono C-10b e constatou-se que a ponte 5,10b-etano está em na face  $\beta^{41,42,59}$  da molécula e que H-4a está na face  $\alpha$ .

O sinal da rotação óptica para o alcalóide **6**,  $[\alpha]_D = -15^\circ$ , foi compatível com o da literatura ( $[\alpha]_D = -23,5^\circ$ )<sup>47</sup> indicando, também, a estrutura da 11-*O*-acetil-ambelina.

O íon molecular m/z 373  $[C_{20}H_{23}NO_6]^{-1}$  pode perder um radical metoxila produzindo o íon m/z 342  $[C_{19}H_{20}NO_5]^{+}$ ; este pode perder uma molécula de acetaldeído gerando o íon m/z 298  $[C_{17}H_{16}NO_4]^{+}$ . O íon molecular também pode perder o radical metila produzindo o íon m/z 358  $[C_{19}H_{20}NO_6]^{+}$ , que pode perder uma molécula de  $CO_2$  produzindo o radicalar m/z 314  $[C_{18}H_{20}NO_4]^{-1}$  (**Figura 42**)<sup>65</sup>.

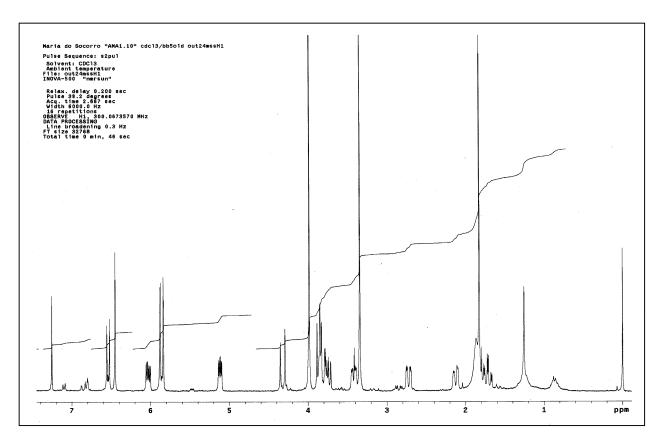
**Figura 42**: Proposta de formação dos íons *m/z* 342, 298, 358 e 314 a partir de **6**.

A análise dos dados espectroscópicos de RMN, EM, DC e  $[\alpha]_D$  resultou na sugestão da estrutura da 11-*O*-acetil-ambelina para o alcalóide **6**, esta foi confirmada após comparação dos dados obtidos com os relatado na literatura<sup>20,41,47</sup>.

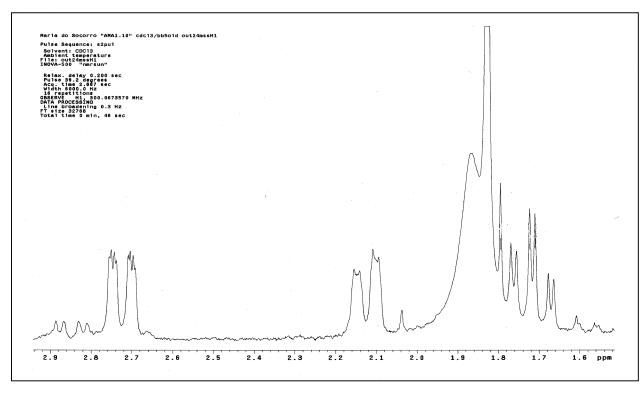
11-O-acetil-ambelina (6)

**Tabela 17**: Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para o alcalóide 11-*O*-acetil-ambelina (**6**).

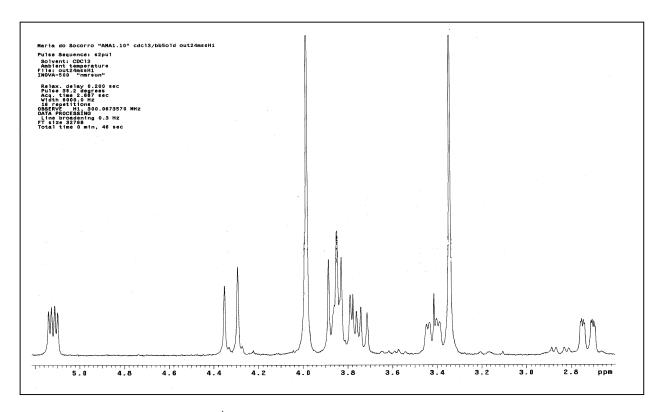
Carbono	$\delta$ (ppm) de $^{13}$ C	Tipo de Carbono	Hidrogênio	δ (ppm) de <sup>1</sup> H	J (Hz)
1	131,8	CH	1	6,54 ( <i>d</i> )	10
2	126,2	СН	2	6,03 ( <i>dd</i> )	10 e 5
3	72,2	СН	3	3,85 ( <i>sl</i> )	-
4	28,7	CH <sub>2</sub>	4α	2,12 ( <i>dd</i> )	13,5 e 4
			4β	1,71 ( <i>ddd</i> )	13,5, 13,5 e 4
4a	63,5	СН	4a	3,42 ( <i>dd</i> )	13,5 e 4
6	58,7	CH <sub>2</sub>	6α	4,32 ( <i>d</i> )	17,4
			6β	3,86 ( <i>d</i> )	17,4
6a	117,3	С	-	-	-
7	140,5	С	-	-	-
8	133,6	С	-	-	-
9	147,8	С	-	-	-
10	99,2	СН	10	6,45 ( <i>s</i> )	-
10a	133,6	С	-	-	-
10b	47,5	С	-	-	-
11	87,3	СН	11 <i>exo</i>	5,12 ( <i>dd</i> )	8 e 4
12	59,4	CH <sub>2</sub>	12 <i>exo</i>	3,75 ( <i>dd</i> )	14 e 8
			12 <i>endo</i>	2,73 ( <i>dd</i> )	14 e 4
-OCH <sub>2</sub> O-	100,5	CH <sub>2</sub>	-OCH <sub>2</sub> O-	5, 84 e 5,88 ( <i>d</i> )	1,5
3-OCH <sub>3</sub>	56,5	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	3,34 ( <i>s</i> )	-
7-OCH <sub>3</sub>	59,1	CH <sub>3</sub>	7-OCH₃	3,98 ( <i>s</i> )	-
C=O	170,9	С	-	-	-
CH <sub>3</sub>	20,9	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	1,83 ( <i>s</i> )	-



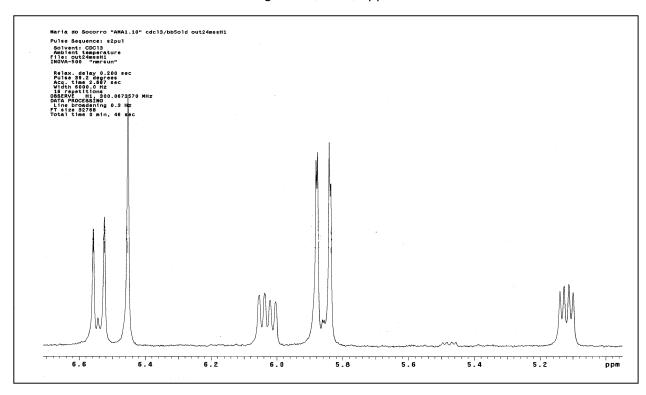
Esp. 78: Espectro de RMN  $^1H$  (300,07 MHz; CDCl $_3$ ;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de 6.



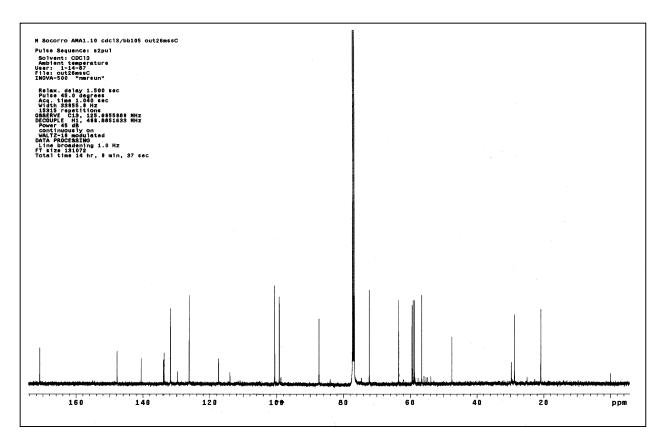
**Esp. 79**: Espectro de RMN  $^1$ H (300,07 MHz; CDCl $_3$ ;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **6** – Expansão da região  $\delta$  1,6 a 2,9 ppm.



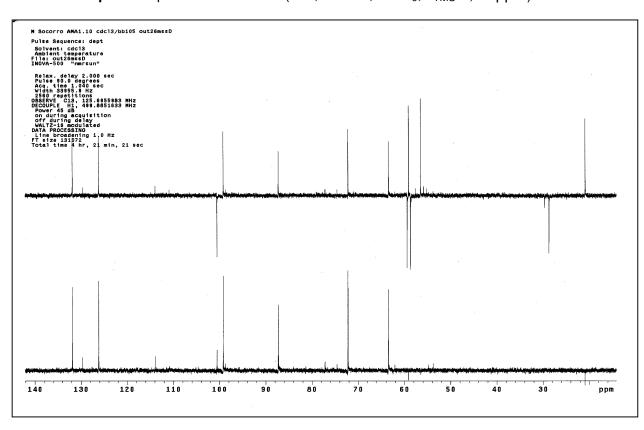
**Esp. 80**: Espectro de RMN  $^1$ H (300,07 MHz; CDCl $_3$ ;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **6** – Expansão da região  $\delta$  2,6 a 6,7 ppm.



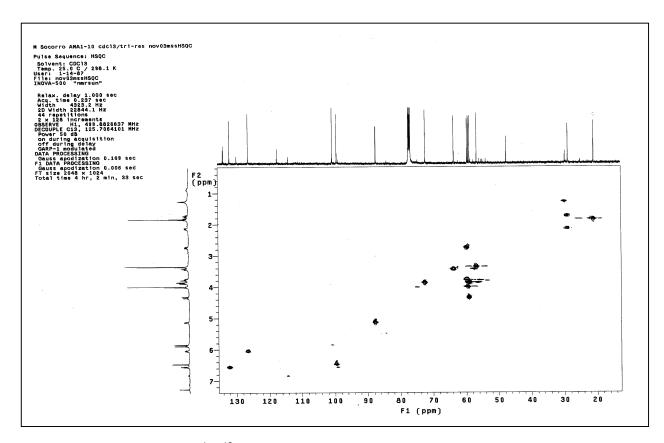
**Esp. 81**: Espectro de RMN  $^1$ H (300,07 MHz; CDCl $_3$ ;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **6** – Expansão da região  $\delta$  5,1 a 6,7 ppm.



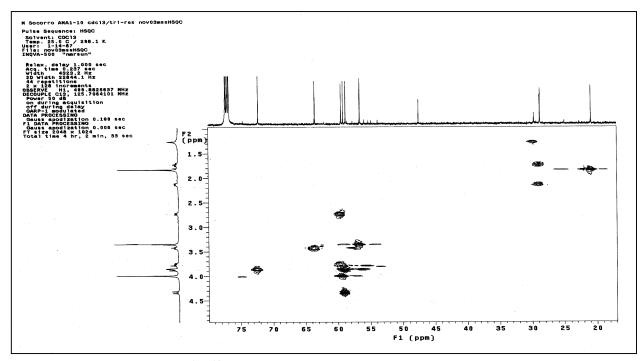
Esp. 82: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125,70 MHz; CDCl $_{\!3};$   $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de 6.



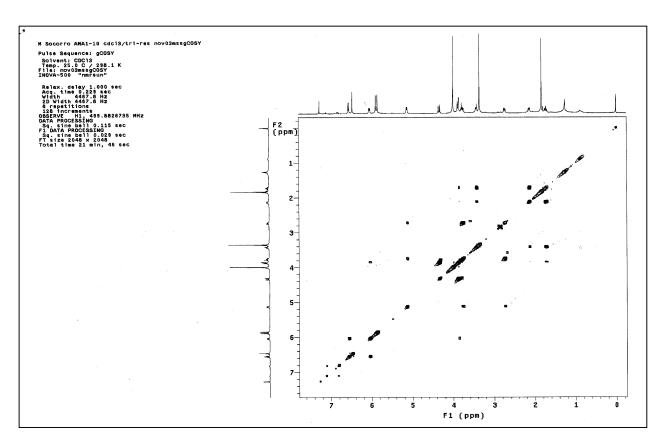
**Esp. 83**: Espectro de DEPT (125,70 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **6**.



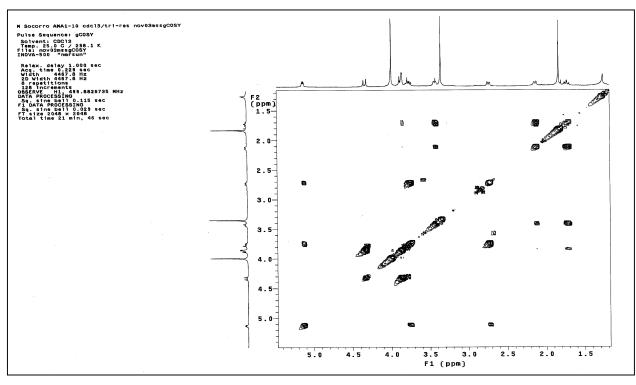
**Esp. 84**: Espectro gCOSY  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  - gHSQC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de **6**.



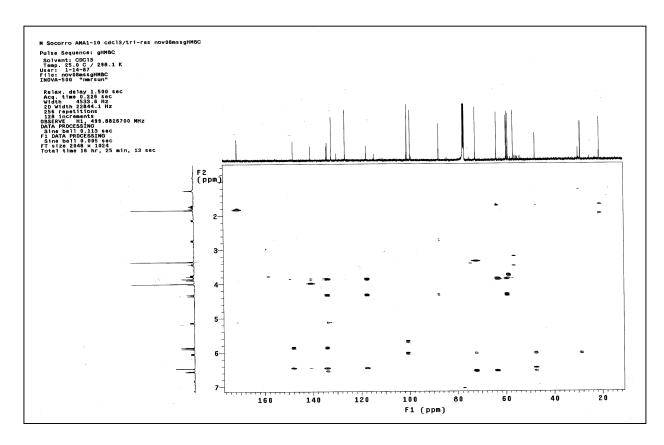
**Esp. 85**: Espectro gCOSY  $^{1}$ H- $^{13}$ C - gHSQC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $δ_{TMS}$  0,00 ppm) de **6** – Expansão da região δ 1,0 a 4,9 ppm e δ 17 a 80 ppm.



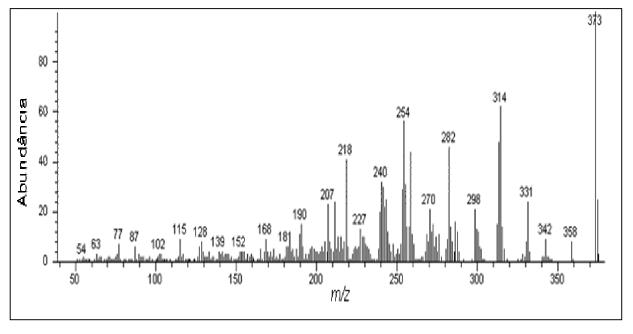
**Esp. 86**: Espectro gCOSY  $^{1}$ H- $^{1}$ H (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **6**.



**Esp. 87**: Espectro gCOSY  $^1$ H- $^1$ H (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCI<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **6** – Expansão da região  $\delta$  1,0 a 5,5 ppm e  $\delta$  1,0 a 5,5 ppm.



**Esp. 88**: Espectro gCOSY  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  - gHMBC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de **6**.



Esp. 89: Espectro de Massas (IE; 70 eV) de 6.

## 5.2.1.1.6. Bufanisina (9)

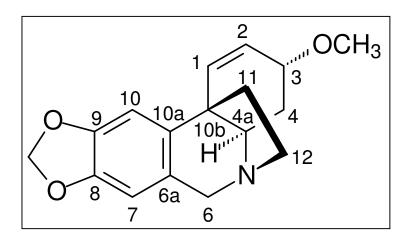


Figura 43: Estrutura do alcalóide de bufanisina (9).

O espectro de IV (**Esp. 905**) apresentou as seguintes bandas: deformação axial de C-H em 2.955-2897 cm<sup>-1</sup>, deformação axial de C=C de anel aromático e olefina em 1.508 e 1.480 cm<sup>-1</sup> e deformação angular de C-H do grupo metilenodioxila (-OCH<sub>2</sub>O-) em 929 cm<sup>-1 58</sup>.

No seu espectro de RMN  $^1$ H (**Esp. 91**) observou-se a presença de: um dupleto em  $\delta$  6,57 (J = 10 Hz), um duplo duplo dupleto em  $\delta$  5,93 (J = 10, 5 e 1 Hz), um multipleto em  $\delta$  3,79, dois simpletos em  $\delta$  6,80 e 6,43, um multipleto em  $\delta$  3,31, dois dupletos em  $\delta$  5,84 e 5,83 (J = 1,5 Hz) atribuídos aos hidrogênios do grupo metilenodioxila e um simpleto em  $\delta$  3,32, característico de hidrogênios em grupo metoxila.

Nos espectros de RMN  $^{13}$ C e DEPT (**Esp. 95** e **96**) de **9** observou-se a presença de 17 sinais referentes a 1 CH<sub>3</sub>, 5 CH<sub>2</sub>, 6 CH e 5 C quaternários. Os sinais em  $\delta$  145,9, 145,5, 138,3, 132,8, 126,1, 125,2, 106,7 e 102,6 indicam a presença de um anel aromático e uma ligação olefínica, o sinal em  $\delta$  100,6 (CH<sub>2</sub>) indica um grupo metilenodioxila e o sinal em  $\delta$  56,3 (CH<sub>3</sub>) indica grupo metoxila.

A atribuição dos sinais de hidrogênio aos seus respectivos sinais de carbono foi realizada após análise do espectro de gHSQC (**Esp. 97**), e está apresentada na **Tabela 18**.

A atribuição dos sinais foi confirmada pelas correlações observadas no espectro de gCOSY  $^1$ H- $^1$ H (**Esp. 98**). O sinal em  $\delta$  5,93 (H-2) correlaciona-se com os sinais em  $\delta$  6,57 (H-1), 3,79 (H-3) e 2,06 (H-4); o sinal em  $\delta$  3,31 (H-4a) apresenta correlação com os sinais em  $\delta$  1,57 (H-4), 2,06 (H-4), 1,89 (H-11), 2,13 (H-11), 2,86 (H-12); o sinal em  $\delta$  2,86 (H-12) correlaciona-se com  $\delta$  1,89 (H-11), 2,13 (H-11), 2,86 (H-12), 3,31 (H-4a), 3,36 (H-12); o sinal em  $\delta$  4,37 (H-6) correlaciona-se com os sinais em  $\delta$  3,75 (H-6) e 6,43 (H-7).

As correlações do espectro gHMBC (**Esp. 99**), também, confirmaram as atribuições. O sinal em  $\delta$  6,57 (H-1) correlaciona-se com os carbonos em  $\delta$  138,3 (C-10a), 72,5 (C-3), 62,9 (C-4a), 44,2 (C-11) e 44,1 (C-10b); o sinal em  $\delta$  3,79 (H-3) correlaciona-se com  $\delta$  132,8 (C-1), 125,2 (C-2), 62,9 (C-4a), 56,3 (3-OCH<sub>3</sub>); o sinal em  $\delta$  2,86 (H-12) apresenta correlação com  $\delta$  62,9 (C-4a), 62,2 (C-6), 44,2 (C-10b) e 44,1 (C-11); o sinal em  $\delta$  6,43 (H-7) correlaciona-se com os sinais em  $\delta$  145,5 (C-9), 138,3 (C-10b) e 102,8 (C-10); o sinal em  $\delta$  6,80 (H-10) correlaciona-se com os sinais em  $\delta$  145,9 (C-9), 145,5 (C-8), 126,1 (C-6a), 106,7 (C-7), 44,2 (C-10A) e 44,1 (C-11); e o sinal em  $\delta$  5,84 (-OCH<sub>2</sub>O-) correlaciona-se com os carbonos em  $\delta$ 145,5 (C-8) e 145,9 (C-9).

A curva de DC de **9** (**Figura 54**) forneceu a configuração absoluta do alcalóide, demonstrando que a ponte 5,10b-etano está na face  $\beta^{41,42,59}$  da molécula, assim como o hidrogênio H-4a ( $\delta$  3,31) está na face  $\alpha$ .

O valor da rotação óptica  $[\alpha]_D = -27^\circ$  foi compatível com o relatado na literatura para o alcalóide bufanisina  $([\alpha]_D = -28^\circ)^{47}$ .

O espectro de massas do alcalóide **9** (**Esp. 104**) possui como pico base o íon molecular m/z 285 [C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>]<sup>-+</sup>, comportamento característico destes compostos. A perda do radical metoxila de C-3, localizado em posição gama ao nitrogênio, gera o íon m/z 254 [C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e a perda do radical metila gera o íon m/z 270 [C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, que pode sofrer a perda de C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>N gerando o íon m/z 215 [C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (**Figura 44**)<sup>60</sup>.

Figura 44: Proposta de formação dos íons m/z 254, 270 e 215 para o alcalóide 9.

A perda da ponte (C-11/C-12) resulta no pico m/z 257 [C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>].<sup>+</sup> e este íon radical perde um hidrogênio radicalar ou uma molécula de H<sub>2</sub>, aparentemente para ganhar estabilidade, gerando os íons m/z 256 [C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 255 [C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>].<sup>+</sup> e 254 [C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>3</sub>]. (**Figura 45**)<sup>60</sup>.

**Figura 45**: Proposta de formação dos íons m/z 257, 256, 255 e 254 para o alcalóide **9**.

O íon radical m/z 257, também, pode gerar o íon radical m/z 225 [C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>-+</sup>, por perda de CH<sub>3</sub>OH, que pode sofrer perda de radical hidrogênio gerando o íon m/z 224 [C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (**Figura 46**)<sup>60</sup>.

Figura 46: Proposta de formação dos íons m/z 225 e 224 para o alcalóide 9.

Um comportamento característico da fragmentação desta molécula é a perda da molécula  $C_3H_5N$ , como apresentado na **Figura 47**. O mecanismo apresentado na literatura para a formação do pico [M-55] é decorrente da quebra das ligações 11,12-, 10b,4a- e 3,4- seguido da perda de  $C_3H_5N$  produzindo o íon radicalar benzílico m/z 230  $[C_{14}H_{14}O_3]^{-+}$ , este pode perder hidrogênio radicalar produzindo o íon m/z 215  $[C_{13}H_{11}O_3]^{+60}$ .

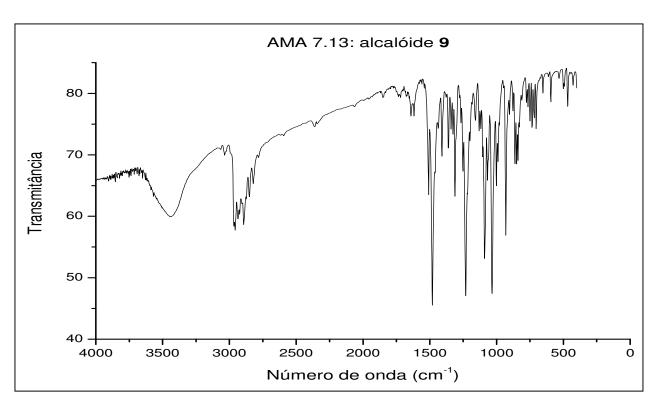
Figura 47: Proposta de formação dos íons m/z 230 e 215 para o alcalóide 9.

A análise dos dados espectroscópicos de RMN, EM, DC e  $[\alpha]_D$  resultou na sugestão da estrutura da bufanisina para o alcalóide **9**, esta foi confirmada após comparação os dados obtidos para este alcalóide com os relatados na literatura<sup>20,41,47</sup>.

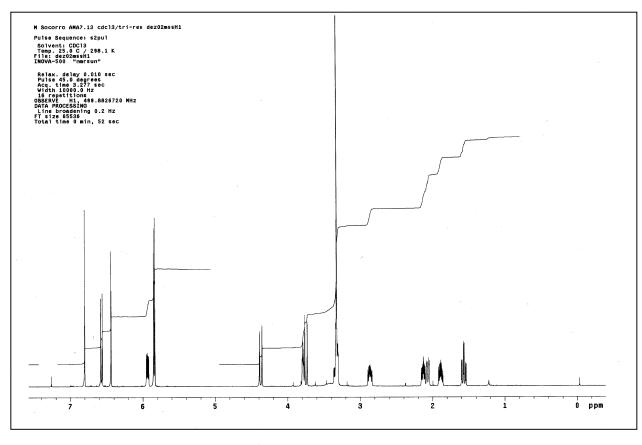
bufanisina (9)

**Tabela 18**: Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para o alcalóide bufanisina (**9**).

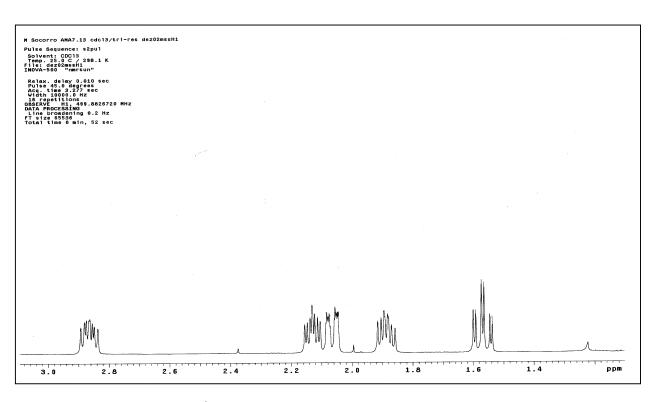
Carbono	δ (ppm) de	Tipo de Carbono	Hidrogênio	$\delta$ (ppm) de $^1$ H	J (Hz)
1	132,8	СН	1	6,57 ( <i>d</i> )	10
2	125,2	СН	2	5,93 ( <i>ddd</i> )	10, 5 e 1
3	72,5	СН	3	3,79 ( <i>m</i> )	-
4	28,7	CH <sub>2</sub>	4α	2,06 ( <i>dl</i> )	13,5
			4β	1,57 ( <i>ddd</i> )	13,5, 13,5 e 4
4a	62,9	СН	4a	3,31 ( <i>m</i> )	
6	62,2	CH <sub>2</sub>	6α	4,37 ( <i>d</i> )	16,8
			6β	3,75 ( <i>d</i> )	16,8
6a	126,1	С	-	-	-
7	106,7	С	H-7	6,43 ( <i>s</i> )	-
8	145,5	С	-	-	-
9	145,9	С	-	-	-
10	102,6	СН	10	6,80 ( <i>s</i> )	-
10a	138,3	С	-	-	-
10b	44,2	С	-	-	-
11	44,1	СН	11 <i>exo</i>	1,89 ( <i>ddd</i> )	12,5, 10,5 e 6
			11 <i>endo</i>	2,13 ( <i>ddd</i> )	12,5, 9 e 4
12	56,3	CH <sub>2</sub>	12 <i>exo</i>	3,36 ( <i>m</i> )	-
			12 <i>endo</i>	2,86 ( <i>ddd</i> )	12,8, 9 e 6
-OCH <sub>2</sub> O-	100,6	CH <sub>2</sub>	-OCH <sub>2</sub> O-	5,84 e 5,83 ( <i>d</i> )	1,5
3-OCH <sub>3</sub>	56,3	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	3,32 ( <i>s</i> )	-



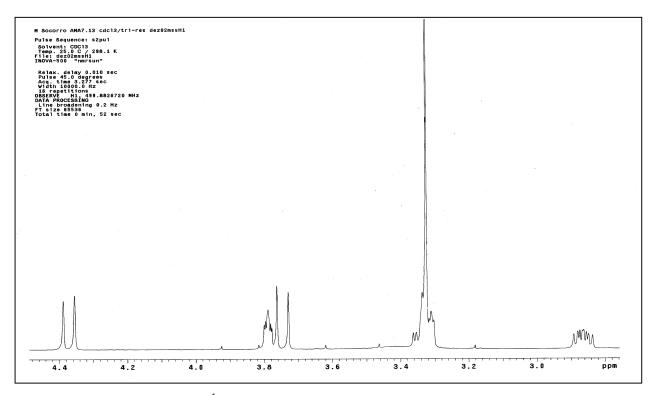
Esp. 90: Espectro de IV (pastilha de KBr) de 9.



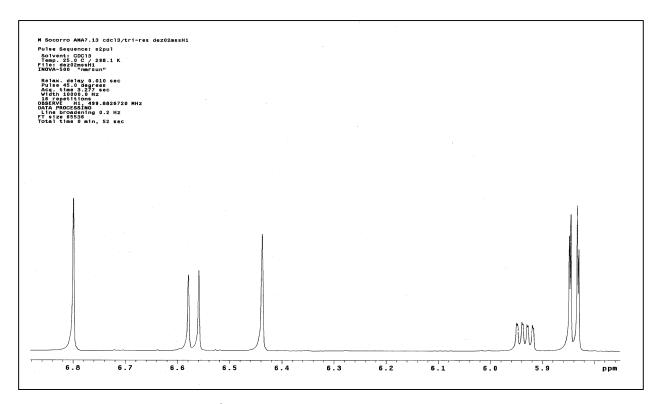
**Esp. 91**: Espectro de RMN <sup>1</sup>H (498,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS} = 00,00$  ppm) de **9**.



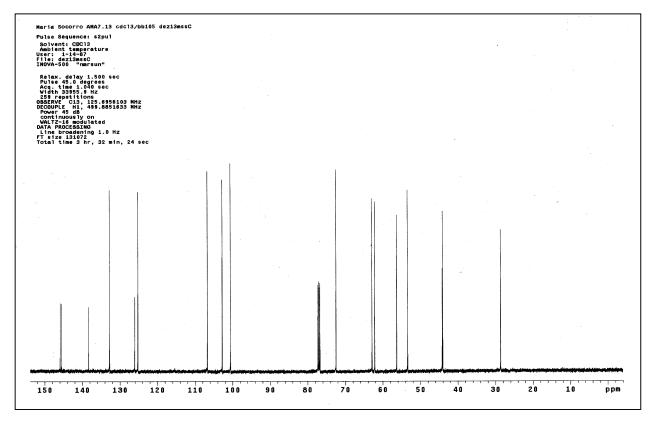
**Esp. 92**: Espectro de RMN  $^1$ H (498,88 MHz; CDCl $_3$ ;  $\delta_{TMS} = 0$  ppm) de **9** – Expansão da região de  $\delta$  1,3 a 3,0 ppm.



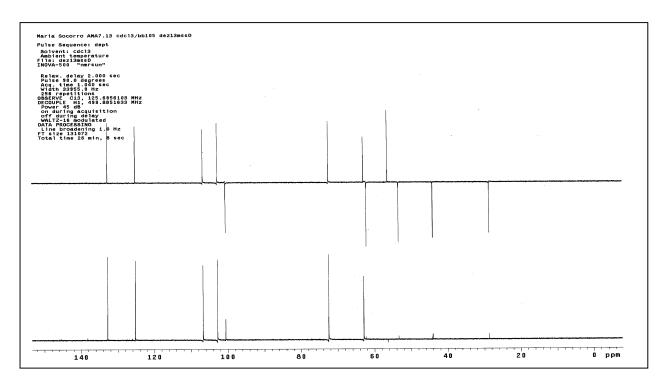
**Esp. 93**: Espectro de RMN  $^1$ H (498,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  = 0,000 ppm) de **9** – Expansão da região de  $\delta$  2,6 a 4,3 ppm.



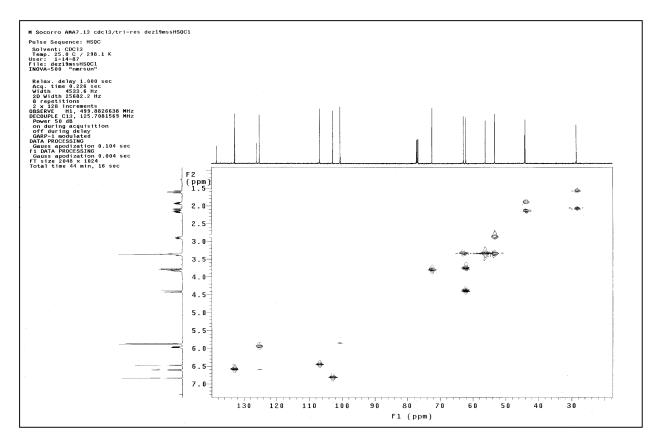
**Esp. 94**: Espectro de RMN  $^1$ H (498,88 MHz; CDCl $_3$ ;  $\delta_{TMS} = 0,00$  ppm) de **9** – Expansão da região de  $\delta$  5,8 a 6,9 ppm.



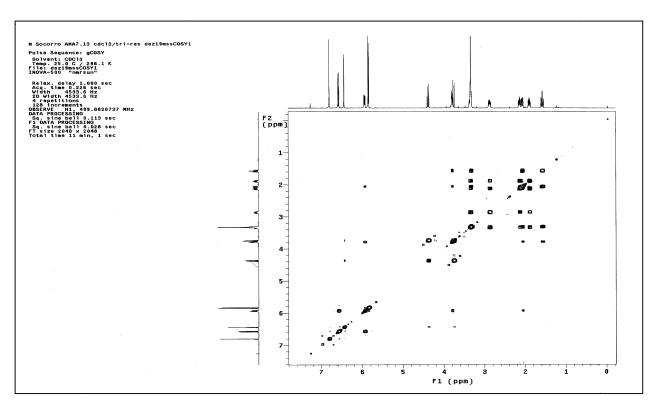
**Esp. 95**: Espectro de RMN  $^{13}$ C (125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS} = 0,00$  ppm) de **9**.



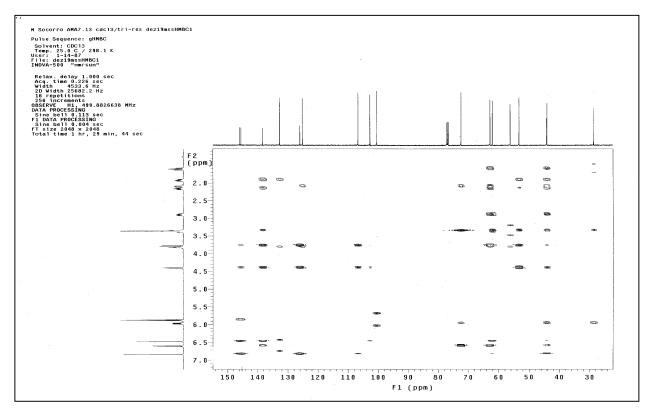
**Esp. 96**: Espectro de DEPT (125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  = 0,00 ppm) de **9**.



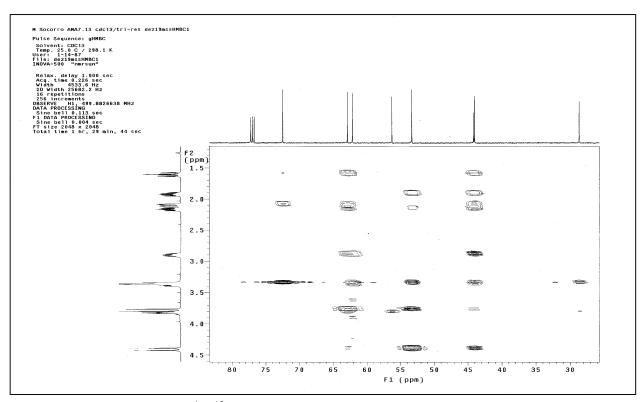
**Esp. 97**: Espectro gCOSY  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  - gHSQC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de **9**.



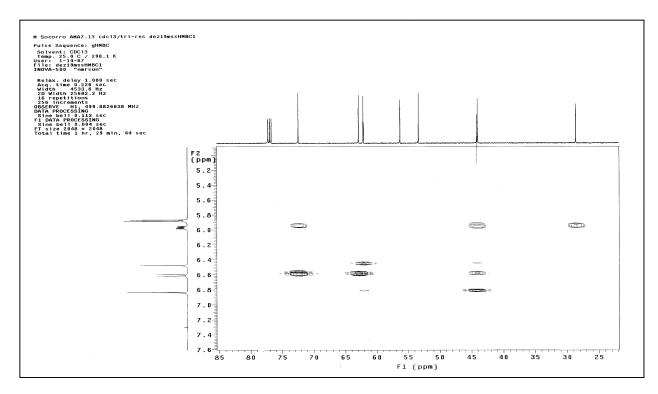
**Esp. 98**: Espectro gCOSY  $^{1}H^{-1}H$  (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **9**.



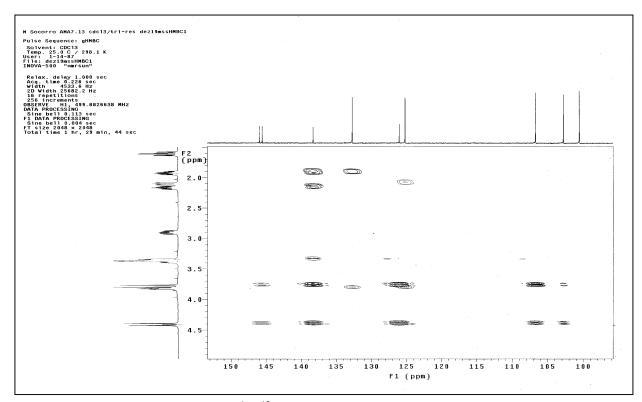
**Esp. 99**: Espectro gCOSY  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  - gHMBC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de **9**.



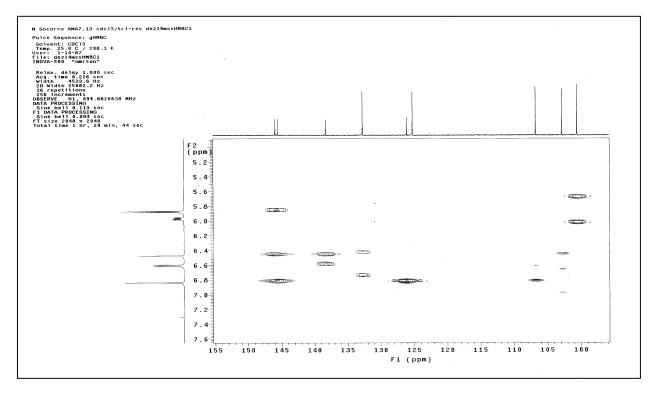
**Esp. 100**: Espectro gCOSY  $^{1}$ H- $^{13}$ C - gHMBC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **9** – Expansão da região δ 1,2 a 4,6 ppm e δ 26 a 83 ppm.



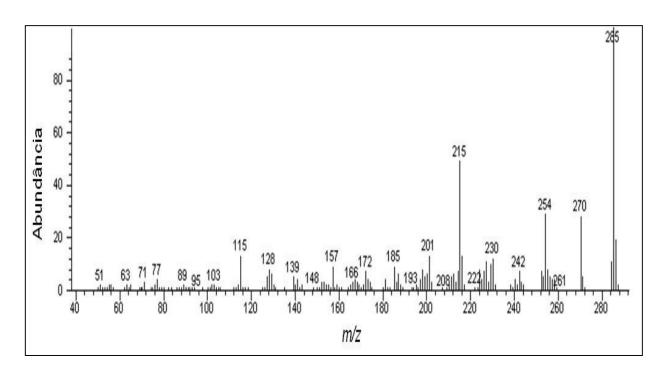
**Esp. 101**: Espectro gCOSY  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  - gHMBC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de **9** – Expansão da região  $\delta$  4,9 a 7,6 ppm e  $\delta$  25 a 85 ppm.



**Esp. 102**. Espectro gCOSY  $^1$ H- $^{13}$ C - gHMBC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **9** – Expansão da região  $\delta$  1,5 a 5,0 ppm e  $\delta$  96 a153 ppm.



**Esp. 103**: Espectro gCOSY  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  - gHMBC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de **9** – Expansão da região  $\delta$  5,0 a 7,6 ppm e  $\delta$  96 a 155 ppm.



Esp. 104: Espectro de Massas (IE; 70 eV) de 9.

#### 5.2.1.2. Alcalóides tipo-licorina

# 5.2.1.2.1. 1-*O*-acetil-licorina (5)

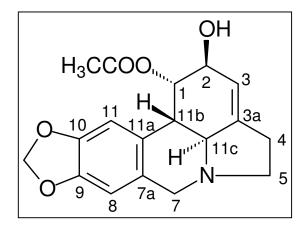


Figura 48: Estrutura do alcalóide 1-O-acetil-licorina (5).

O espectro de IV (**Esp. 105**) apresentou as seguintes bandas: deformação axial de O-H em 3.444 cm<sup>-1</sup>, deformação axial de C-H em 2.977-2825 cm<sup>-1</sup>, deformação axial de C=O em 1.731 cm<sup>-1</sup>, deformação axial de C=C de anel aromático e olefina em 1.504 e 1.487 cm<sup>-1</sup> e deformação angular de C-H do grupo metilenodioxila em 943 cm<sup>-1</sup> 58.

O espectro de RMN  $^1$ H (**Esp. 106**) apresenta: a) dois simpletos na região dos sinais de hidrogênios aromáticos em  $\delta$  6,58 e 6,62, dois simpletos em  $\delta$  5,54 e 5,58, um simpleto largo em 4,16, característico de hidrogênio geminal a uma hidroxila, dois dupletos em  $\delta$  2,85 e 2,79 (J = 10,5 Hz), um valor alto da constante de acoplamento caracteriza uma configuração trans diaxial, um simpleto largo em  $\delta$  2,62 e um simpleto em  $\delta$  5,92 atribuído a grupo metilenodioxila.

Nos espectros de RMN  $^{13}$ C e DEPT (**Esp. 109 e 110**) observou-se que **5** possui 1 CH<sub>3</sub>, 4 CH<sub>2</sub>, 7 CH e 6 C quaternários. O sinal em  $\delta$  170,8 (C) caracteriza uma carbonila de éster, os sinais em  $\delta$  146,5, 146,2, 143,7, 129,2, 127,0, 117,4, 107,3 e 104,8 indicam a presença de um anel aromático e uma ligação olefínica, os sinais em  $\delta$  70,7 (CH) e 69,4 (CH) são característicos de carbono ligado a oxigênio e o sinal em  $\delta$  100,9 (CH<sub>2</sub>) indica o grupo metilenodioxila.

A atribuição dos sinais de hidrogênios aos seus respectivos sinais de carbono foi realizada utilizando o espectro de gHSQC (**Esp. 111**), como mostrado na **Tabela 19**.

A atribuição dos sinais foi confirmada utilizando o espectro gCOSY  $^1$ H- $^1$ H (**Esp. 112**), neste observou-se: correlações entre o sinal em  $\delta$  5,58 (H-1) com os sinais em  $\delta$  4,16 (H-2) e 2,85 (H-11b); o sinal em  $\delta$  5,54 (H-3) correlaciona-se com 2,76 (H-11c), 2,62 (H-4) e 4,16 (H-2); correlações do sinal em  $\delta$  2,62 (H-4) com os sinais em  $\delta$  2,39 (H-5), 3,36 (H-5) e 45,54 (H-3); o sinal em 3,36 (H-5) correlaciona-se com os sinais em 2,39 (H-5) e 2,62 (H-4).

As correlações observadas no gHMBC (**Esp. 114**), também, confirmaram a atribuição dos sinais de hidrogênio aos sinais de carbono. As principais correlações observadas foram: o sinal em  $\delta$  4,16 (H-2) correlaciona-se com os sinais de carbono em  $\delta$  70,7 (C-1), 117,4 (C-3) e 143,7 (C-3a); o sinal em  $\delta$  2,62 (H-4) correlaciona-se com  $\delta$  53,7 (H-5), 143,7 (C-3a), 61,6 (C-11c); o sinal em  $\delta$  4,16 (H-7) correlaciona-se com os sinais em  $\delta$  129,2 (C-7a), 127,0 (C-11a) e 107,3 (C-8); o sinal em  $\delta$  6,62 (H-11) correlaciona-se com os carbonos em  $\delta$  146,5 (C-10), 146,2 (C-9), 129,2 (C-7a) e 39,2 (C11b); o sinal em dos hidrogênios do grupo metilenodioxila ( $\delta$  5,92) correlaciona-se com os carbonos em  $\delta$  146,5 (C-10) e 146,2 (C-9); e o sinal dos hidrogênios da metila ( $\delta$  1,94) correlaciona-se com o sinal da carbonila ( $\delta$  170,8).

A configuração absoluta de **5** foi deduzida pela curva de DC (**Figura 60**), esta possui formato compatível com o observado para os alcalóides do tipo licorina<sup>41,42,59,66</sup>, que apresentam H-11b ( $\delta$  2,85) e H-11c ( $\delta$  2,76) em configuração trans, sendo o primeiro na face  $\beta$  e o segundo na face  $\alpha$  da molécula.

O espectro NOESY 1D (**Esp. 115**) resultado da irradiação do sinal em  $\delta$  2,85 (H-11b) apresentou incremento, principalmente, nos sinais em  $\delta$  5,58 (H-1) e 4,16 (H-7), a os hidrogênios relativos a estes sinais estão na face  $\beta$  da molécula. No espectro NOESY 1D (**Esp. 116**) observou-se que a irradiação em  $\delta$  2,76 (H-11c) causou incremento em alguns sinais, sendo os principais em  $\delta$  4,16 (H-2), 3,51 (H-7) e 2,39 (H-5); devido a estas interações convencionou-se que estes hidrogênios estão na face  $\alpha$  da molécula.

<sup>&</sup>lt;sup>66</sup> Katera, K.; Hamada, Y.; Tori, K.; Aono, K.; Kuriyama, K. *Tetrahedron Letters*, **1966**, 18, 2009-2020.

Os dados espectroscópicos do alcalóide **5** sugeriram a estrutura da 1-O-acetillicorina (**Figura 46**), estes foram comparados com dados da literatura para este alcalóides<sup>50a</sup>, mas eles não foram totalmente compatíveis pois o valor literário dos deslocamentos de C-3a ( $\delta$  136,1) e C-10 ( $\delta$  143,7) apresentaram-se diferentes dos obtidos para o alcalóide **5** (C-3a  $\delta$  143,7 e C-10  $\delta$ 146,5).

Sabendo que as correlações indicavam que a estrutura do alcalóide **5** é a atribuída para 1-*O*-acetil-licorina, e este é um derivado da licorina (**IV**), resolveu-se verificar os deslocamentos de RMN <sup>13</sup>C de **IV**<sup>18,67</sup>. Encontrou-se que os deslocamentos de C-3a e C-10, são 141,7 e 145,6, respectivamente. Estes dados apresentaram-se compatíveis com os encontrados para **5** e mais coerentes com a estrutura da 1-*O*-acetil-licorina.

O sinal da rotação óptica  $[\alpha]_D$  = - 116°, também, foi compatível com o relatado na literatura para este alcalóide 1-*O*-acetil-licorina  $([\alpha]_D$  = -96°)<sup>44</sup>.

O espectro de massas do alcalóide **5** apresenta o íon molecular m/z 329  $[C_{18}H_{18}NO_5]^{-+}$  este pode sofrer rearranjo de hidrogênio seguido da quebra das ligações alfa aos substituintes da molécula ocasionando a formação do íon radical m/z 227  $[C_{14}H_{13}NO_2]^{-+}$  que pode sofrer a perda de hidrogênio radicalar gerando o íon m/z 226  $[C_{14}H_{12}NO_2]^{+}$  (**Figura 49**)<sup>68</sup>.

Figura 49: Proposta de fragmentação para a formação dos íons m/z 227 e 226 a partir de 5.

\_

<sup>&</sup>lt;sup>67</sup> Evidente, A. Journal of the Natural Products **1986**, 49. 90-94.

<sup>&</sup>lt;sup>68</sup> a) Ibuka, T.; Irie, H.; Kato, A.; Uyeo, S.; Kotera, K.; Nakagawa, Y. *Tetrahedron Letters*, **1966**, 39, 4745-4748. b) Kinstle, T. H.; Wildman, W. C.; Brown, C. L.; Iowa, A. *Tetrahedron Letters*, **1966**, 39, 4659-4666.

O íon molecular m/z 329  $[C_{18}H_{18}NO_5]^{-1}$  do alcalóide **5**, pode sofrer perda de hidrogênio que conduz a perda de radicais hidroxila e acila gerando o íon m/z 252  $[C_{16}H_{14}NO_2]^{+}$ , que pode perder  $H_2$  originando o íon m/z 250  $[C_{16}H_{12}NO_2]^{+68}$ , (**Figura 50**).

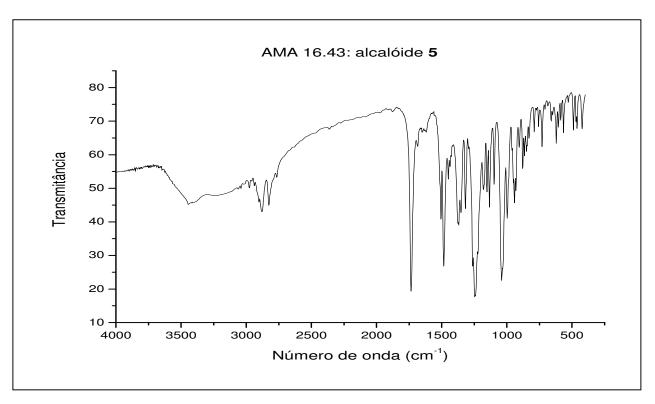
Figura 50: Proposta de fragmentação para a formação dos íons m/z 252 e 250 a partir de 5.

A análise dos dados espectroscópicos de RMN, EM, DC e  $[\alpha]_D$  resultou na sugestão da estrutura da 1-*O*-acetil-licorina para o alcalóide **5**, esta foi confirmada após comparação dos dados obtidos com os relatado na literatura <sup>18,41,44,50a,67,68</sup>.

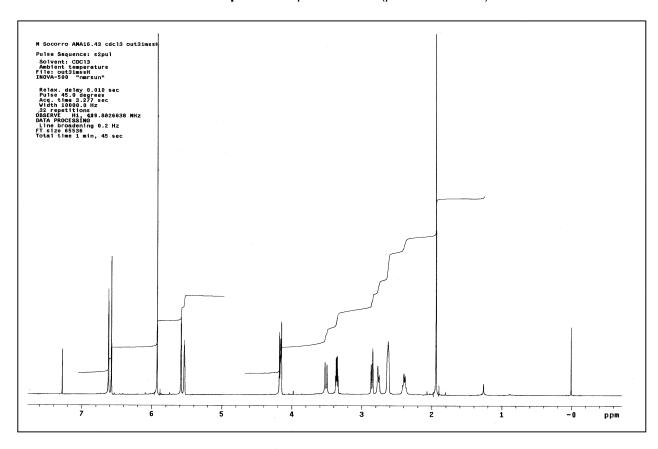
11-O-acetil-licorina (5)

**Tabela 19**: Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para o alcalóide 1-*O*-acetil-licorina (**3**).

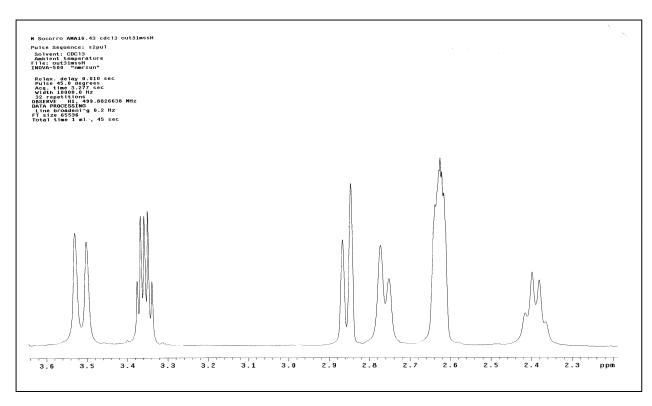
Carbono	$\delta$ (ppm) de $^{13}{ m C}$	Tipo de Carbono	Hidrogênio	$\delta$ (ppm) de $^{1}$ H	J (Hz)
1	72,7	СН	1	5,58 ( <i>s</i> )	-
2	69,4	СН	2	4,16 ( <i>s</i> )	-
3	117,4	СН	3	5,54 ( <i>s</i> )	-
3a	143,7	С	-	-	-
4	28,5	CH <sub>2</sub>	4	2,62 ( <i>sl</i> )	-
5	53,7	CH <sub>2</sub>	5α	2,39 ( <i>m</i> )	-
			5β	3,36 ( <i>dt</i> )	9, 9 e 5
7	56,8	CH <sub>2</sub>	7α	3,51 ( <i>d</i> )	14
			7β	4,16 (d)	14
7a	129,2	С	-	-	-
8	107,3	СН	7	6,58( <i>s</i> )	-
9	146,2	С	-	-	-
10	146,5	С	-	-	-
11	104,8	СН	11	6,62 ( <i>s</i> )	-
11a	127,0	С	11a	-	-
11b	39,2	СН	11b	2,85 ( <i>d</i> )	10,5
11c	61,6	СН	11c	2,76 ( <i>d</i> )	10,5
CH <sub>3</sub>	21,1	CH <sub>3</sub>	CH3	1,94 ( <i>s</i> )	-
COO	170,8	С	-	-	-
-OCH <sub>2</sub> O-	100,9	CH <sub>2</sub>	-OCH <sub>2</sub> O-	5,92 ( <i>s</i> )	-



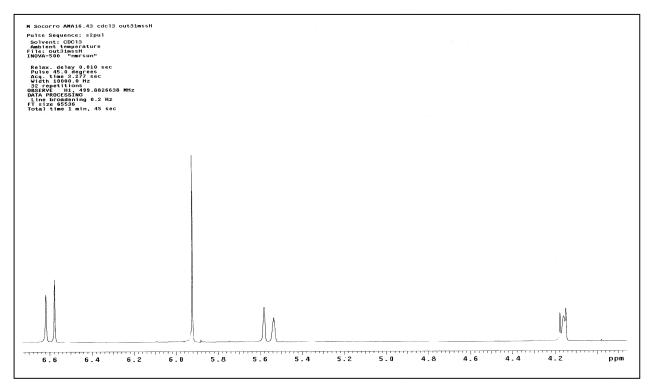
Esp. 105: Espectro de IV (pastilha de KBr) de 5.



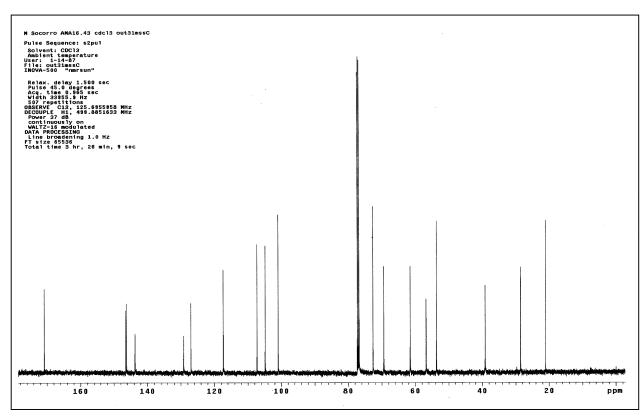
**Esp. 106**: Espectro de RMN  $^{1}$ H (498,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS} = 0,00$  ppm) de **5**.



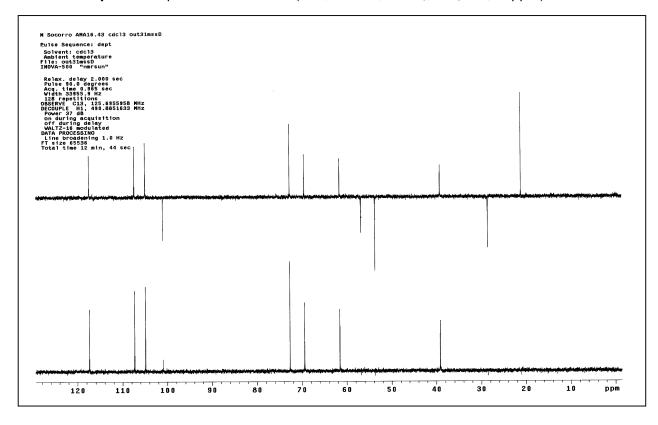
**Esp. 107**: Espectro de RMN  $^1$ H (498,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS} = 0,00$  ppm) de **5** – Expansão de  $\delta$  2,2 a 3,6 ppm.



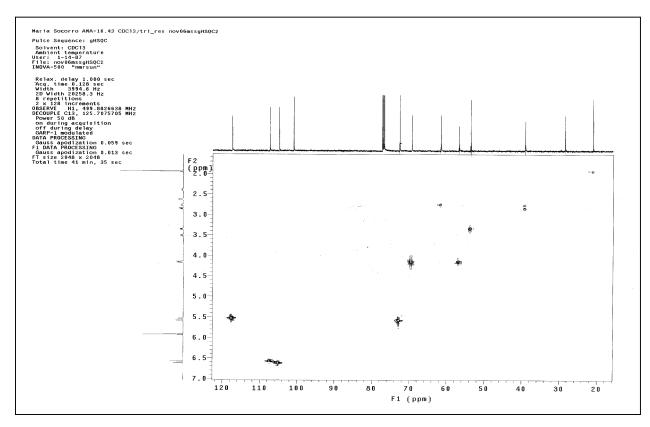
**Esp. 108**: Espectro de RMN  $^1$ H (498,88 MHz; CDCl $_3$ ;  $\delta_{TMS}$  = 0,00 ppm) de **5** – Expansão de  $\delta$  4,3 a 6,6 ppm.



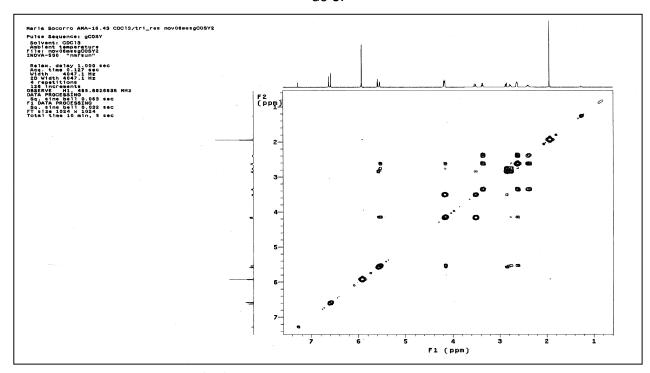
**Esp. 109**: Espectro de RMN  $^{13}$ C (125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS} = 0,00$  ppm) de **5**.



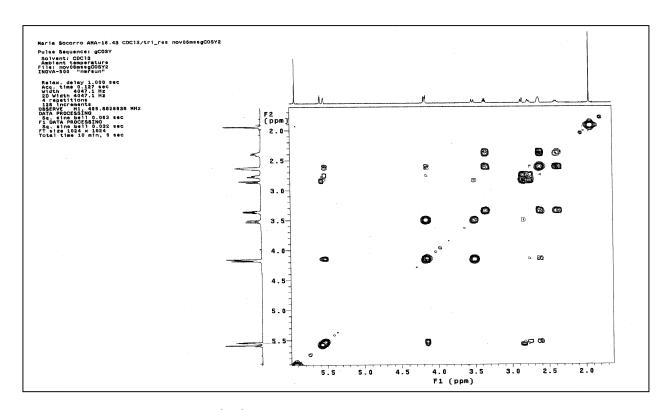
**Esp. 110**: Espectro de DEPT (125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{\text{TMS}}$  = 0,00 ppm) de **5**.



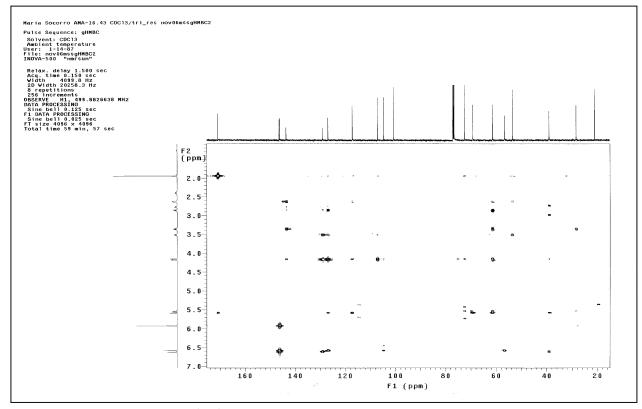
**Esp. 111**: Espectro gCOSY  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  - gHSQC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de **5**.



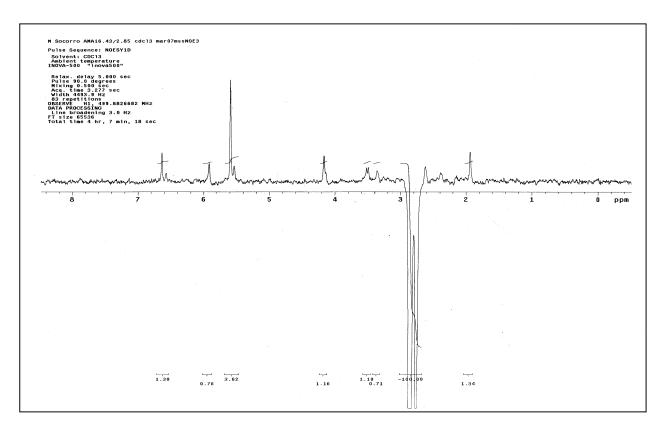
**Esp. 112**: Espectro gCOSY  $^1$ H- $^1$ H - gHSQC (499,88 MHz x 498,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **5**.



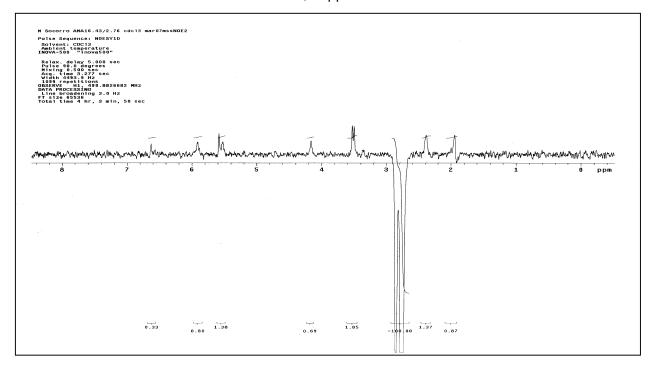
**Esp. 113**: Espectro gCOSY  $^1$ H- $^1$ H (499,88 MHz x 498,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **5** – Expansão de  $\delta$  1,7 a 5,9 ppm e  $\delta$  1,7 a 5,9 ppm.



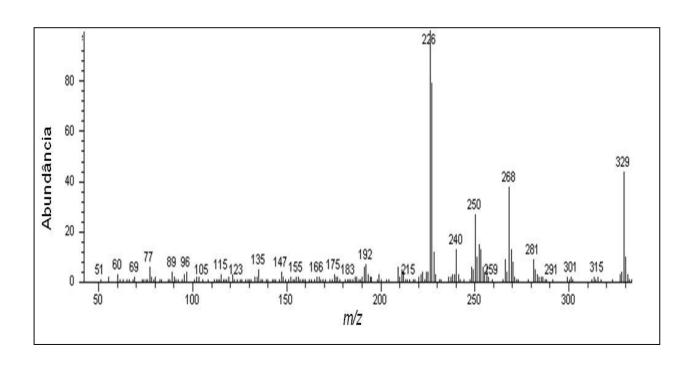
**Esp. 114**: Espectro gCOSY  $^1$ H- $^1$ H – gHMBC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **5**.



**Esp. 115**: Espectro NOESY 1D (499,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de **5** – irradiação em  $\delta$  2,85 ppm.



**Esp. 116**: Espectro NOESY 1D (499,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de **5** – irradiação em  $\delta$  2,76 ppm.



Esp. 117: Espectro de Massas (IE; 70 eV) de 5.

#### 5.3. Ismene festalis

O estudo fitoquímico do extrato CHCl<sub>3</sub> dos bulbos da espécie *Ismene festalis* (*Hymenocallis festalis*) codificado como **ifb**, resultou no isolamento de dois alcalóides conhecidos (**Tabela 20**). As estruturas químicas foram deduzidas a partir dos dados espectroscópicos dos alcalóides purificados, que foram analisados e comparados com dados existentes na literatura.

Alcalóide	Tipo de estrutura	Quantidade (mg)
tazetina ( <b>10</b> )	tipo-tazetina	106,2
haemantidina ( <b>11</b> )	tipo-crinina	20,2

**Tabela 20**: Alcalóides isolados do extrato de CHCl<sub>3</sub> de *Ismene festalis*.

# 5.3.1. Análise Espectroscópica dos Alcalóides de Ismene festalis

# 5.3.1.1. Alcalóide tipo- tazetina

### 5.3.1.1.1. Tazetina (10)

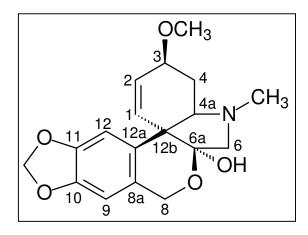


Figura 51: Estrutura do alcalóide (10).

O espectro de IV (**Esp. 118**) apresentou as seguintes bandas: deformação axial de O-H em 3.349 cm<sup>-1</sup>, deformação axial de C-H em 3033-2802 cm<sup>-1</sup>, deformação axial

de C=C de anel aromático e olefina em 1.502 e 1.483 cm<sup>-1</sup> e deformação angular do grupo metilenodioxila (-OCH<sub>2</sub>O-) em 937 cm<sup>-1 58</sup>.

Entre os sinais observados no espectro de RMN  $^1$ H (**Esp. 119**) destacam-se: dois dupletos largos em  $\delta$  5,63 (J = 10 Hz) e 6,15 (J = 10 Hz), um multipleto em  $\delta$  4,16; um simpleto largo em  $\delta$  2,89, dois simpletos em  $\delta$  6,51 e 6,86, um simpleto em  $\delta$  5,91 atribuído a grupo metilenodioxila, um simpleto em  $\delta$  3,47, de grupo metoxila e um simpleto em  $\delta$  2,40, característico de hidrogênio em grupo metila ligado a nitrogênio.

Nos espectros de RMN  $^{13}$ C e DEPT (**Esp. 122** e **123**) de **10** observou-se a presença de 18 sinais referentes a 2 CH<sub>3</sub>, 4 CH<sub>2</sub>, 6 CH e 6 C quaternários. Os sinais em  $\delta$  146,6, 146,4, 130,6, 128,6, 127,9, 125,5, 109,3 e 103,9 indicam a presença de um anel aromático e uma ligação olefínica, o sinal em  $\delta$  102,0 (C) é compatível com um carbono ligada a dois oxigênios, o sinal em  $\delta$  100,4 (CH<sub>2</sub>) indica um grupo metilenodioxila, o sinal em  $\delta$  56,1 (CH<sub>3</sub>) indica grupo metoxila e o sinal em  $\delta$  42,0 (CH<sub>3</sub>) indica grupo metila ligada a nitrogênio.

A atribuição dos sinais de hidrogênio aos seus respectivos sinais de carbono foi realizada utilizando o espectro gHSQC (**Esp. 124**) e estão apresentadas na **Tabela 21**.

A atribuição dos sinais foi confirmada pelas correlações observadas nos espectros de gCOSY  $^1$ H- $^1$ H (**Esp. 126**). O sinal em  $\delta$  6,15 (H-2) correlaciona-se com os sinais em  $\delta$  5,63 (H-1) e 4,16 (H-3); o sinal em  $\delta$  1,64 (H-4) correlaciona-se com os sinais em  $\delta$  2,24 (H-4), 2,89 (H-4a) e 4,16 (H-3).

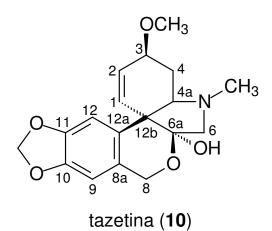
O espectro gHBMC (**Esp. 127**) apresentou as seguintes correlações: o sinal em  $\delta$  6,15 (H-2) com 49,9 (C-10b) e 26,7 (C-4); sinal em  $\delta$  2,24 (H-4) com  $\delta$  130,6 (C-2), 72,8 (C-3), 70,1 (c-4a) e 49,9 (C-12b); o sinal em  $\delta$  2,70 (H-6) com os sinais em  $\delta$  102,0 (C-6a), 70,1 (C-4a), 49,9 (C-12b) e 42,0 (C-12b); o sinal em  $\delta$  6,51 (H-9) com os sinais em  $\delta$  146,6 (C-10), 127,9 (C-11), 109,3 (C-12), 62,0 (C-8) e 49,9 (C-12b) e o sinal em  $\delta$  6,86 (H-12) com os sinais em  $\delta$  146,6 (C-11), 125,5 (C-8a) e 49,9 (C-12b).

A curva de DC deste alcalóide (**Figura 62**) revelou que a os anéis B e D apresentam junção anelar  $cis^{41,42,59,66}$  e o hidrogênio H-4a está na face  $\beta$  da molécula.

No espectro NOESY 1D (**Esp. 128**), observou-se que irradiando o sinal em  $\delta$  2,89 (H-4a), ocorre um acréscimo no sinal em  $\delta$  2,70, ao qual foi atribuído o hidrogênio H-6 $\beta$ .

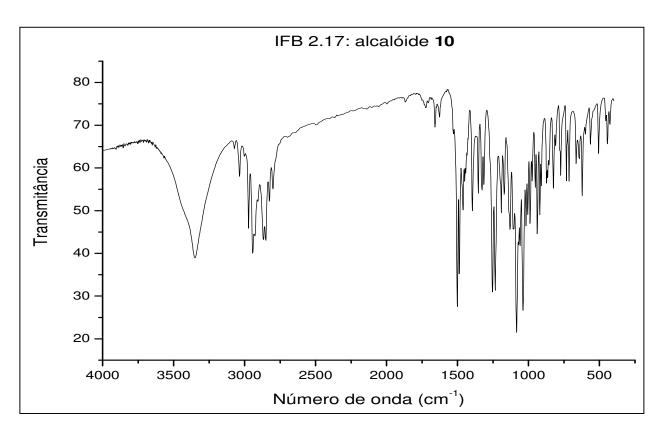
O valor da rotação óptica  $[\alpha]_D = +135^\circ$  foi compatível com o relatado na literatura para o alcalóide tazetina  $([\alpha]_D = +145^\circ)^{30}$ .

A estrutura da tazetina foi atribuída ao alcalóide  ${f 10}$  usando dados espectroscópicos de RMN, EM, IV,  $\alpha_D$  e DC. A comparação com os dados da literatura  $^{67,30}$  permitiu confirmar a estrutura do alcalóide.

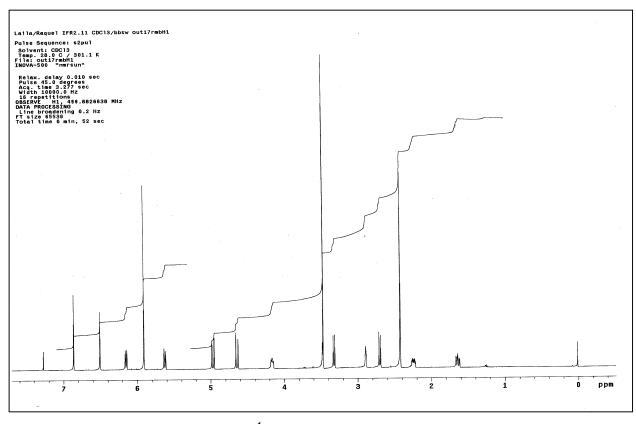


**Tabela 21**: Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para o alcalóide tazetina (**10**).

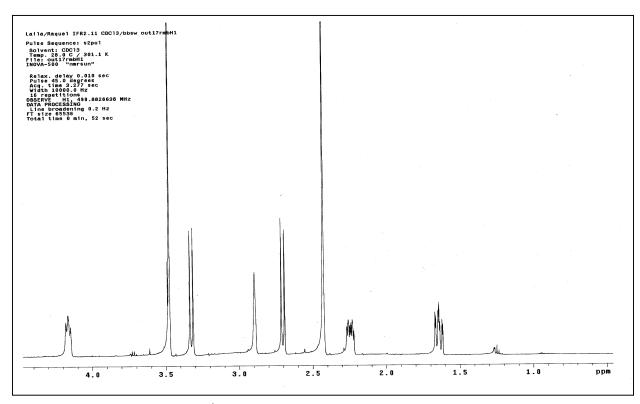
Carbono	$\delta$ (ppm) de $^{13}{\rm C}$	Tipo de Carbono	Hidrogênio	$\delta$ (ppm) de $$^{^{1}}\textrm{H}$$	J (Hz)
1	128,6	CH	1	5,83 ( <i>dl</i> )	10,4
2	130,6	СН	2	6,15 ( <i>dl</i> )	10,4
3	72,8	СН	3	4,16 ( <i>m</i> )	-
4	26,6	CH <sub>2</sub>	4α	2,24 ( <i>m</i> )	-
			4β	1,64 ( <i>ddd</i> )	13,4, 10 e 2,4
4a	70,1	СН	4a	2,89 ( <i>sl</i> )	
	-			,	
6	65,4	CH <sub>2</sub>	6α	3,32 ( <i>d</i> )	10,4
			6β	2,70 ( <i>d</i> )	10,4
6a	102,0	С	-	-	-
8	62,0	CH <sub>2</sub>	8α	4,97 ( <i>d</i> )	15
			8β	4,64 ( <i>d</i> )	15
8a	125,5	С	-	-	-
9	103,9	СН	9	6,51( <i>s</i> )	-
10	146,4	С	-	-	-
11	146,6	С	-	-	-
12	109,3	СН	12	6,86 ( <i>s</i> )	-
12a	127,9	С	-	-	-
12b	49,9	С	-	-	-
-OCH₃	56,1	CH₃	CH <sub>3</sub>	3,47 ( <i>s</i> )	-
-NCH <sub>3</sub>	42,0	CH <sub>3</sub>	NCH <sub>3</sub>	2,42 ( <i>s</i> )	-
-OCH <sub>2</sub> O-	100,9	CH <sub>2</sub>	-OCH <sub>2</sub> O-	5,91 ( <i>s</i> )	-



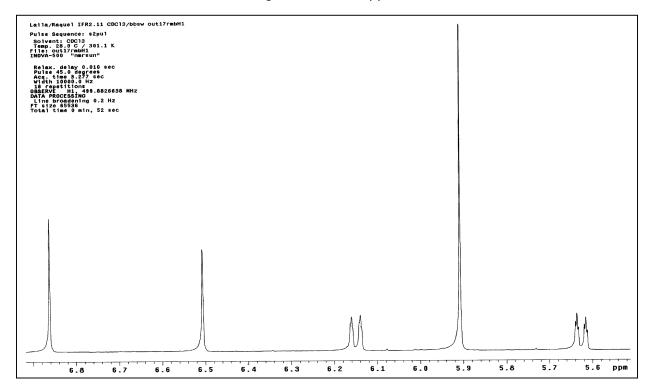
Esp. 118: Espectro de IV (pastilha de KBR) de 10.



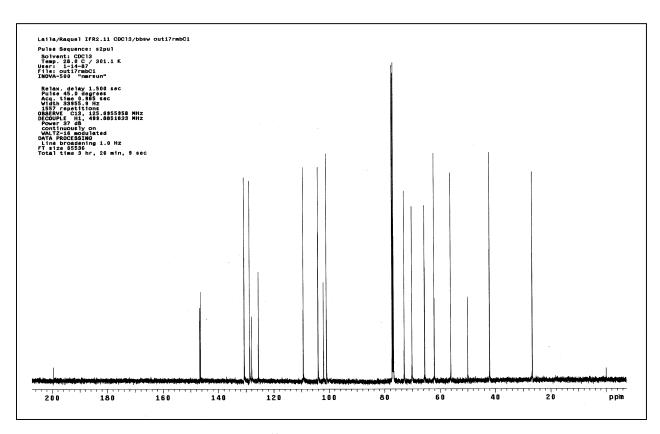
**Esp. 119**: Espectro de RMN  $^{1}$ H (498,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS} = 0.00$  ppm) de **10**.



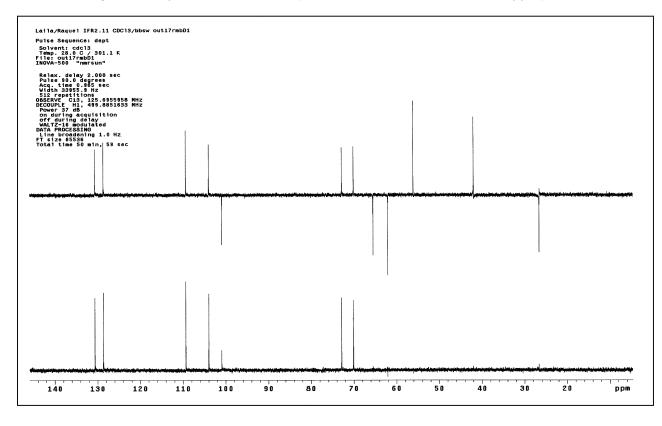
**Esp. 120**: Espectro de RMN  $^1$ H (498,88 MHz; CDCl $_3$ ;  $\delta_{TMS}$  = 0,00 ppm) de **10** – Expansão da região  $\delta$  0,5 a 4,4 ppm.



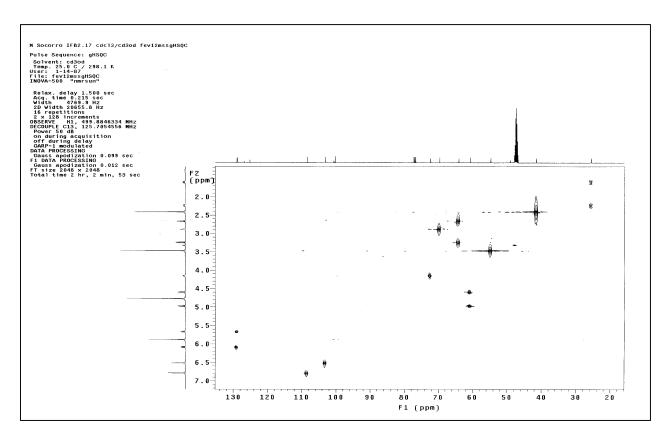
**Esp. 121**: Espectro de RMN  $^1$ H (498,88 MHz; CDCl $_3$ ;  $\delta_{TMS}$  = 0,00 ppm) de **10** – Expansão da região  $\delta$  5,6 a 6,9 ppm.



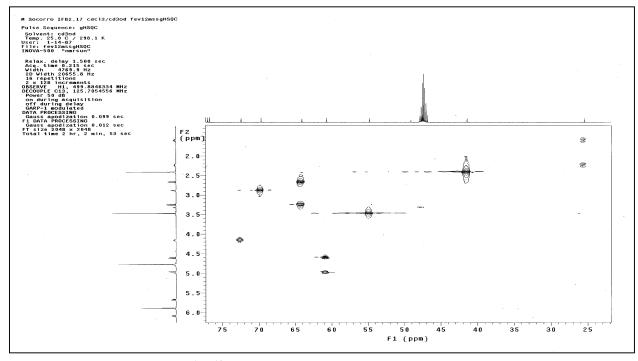
**Esp. 122**: Espectro de RMN  $^{13}$ C (125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS} = 0,00$  ppm) de **10**.



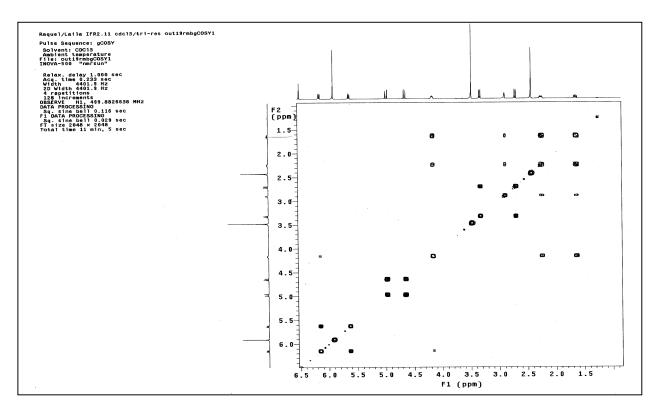
**Esp. 123**: Espectro de DEPT (125,69 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  = 0,00 ppm) de **10**.



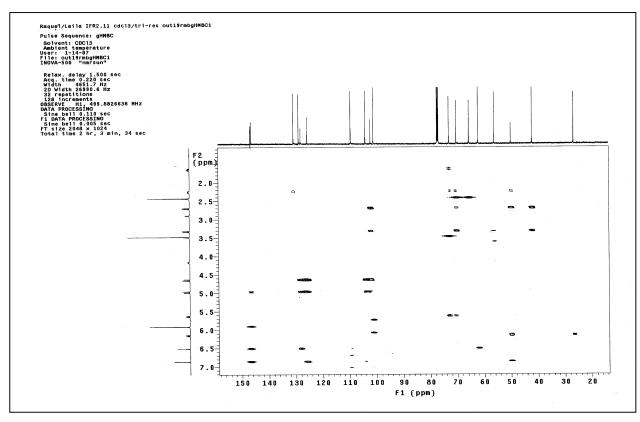
**Esp. 124**: Espectro gCOSY  $^{1}$ H- $^{13}$ C - gHSQC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **10**.



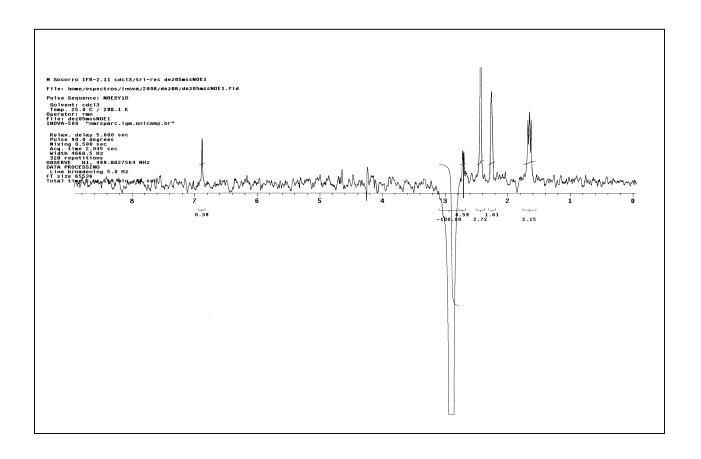
**Esp. 125**: Espectro gCOSY  $^{1}$ H- $^{13}$ C - gHSQC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **10** – Expansão da região  $\delta$  1,2 a 7,2 ppm e  $\delta$  22 a 77 ppm.



**Esp. 126**: Espectro gCOSY  $^{1}$ H- $^{1}$ H (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **10**.



**Esp. 127**: Espectro gCOSY  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  - gHMBC (499,88 MHz x 125,71 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de **10**.



**Esp. 128**: Espectro NOESY 1D (499,88 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **10**, irradiação em  $\delta$  2,86 ppm.

### 5.3.1.2. Alcalóide tipo-crinina

# 5.3.1.2.1. Haemantidina (11)

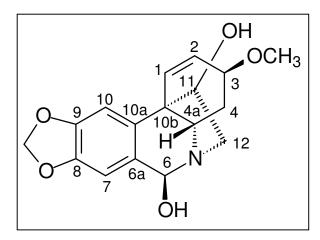


Figura 52: Estrutura do alcalóide (11).

O espectro de IV (**Esp. 129**) apresentou as seguintes bandas: deformação axial de O-H em 3.419 cm<sup>-1</sup>, deformação axial de C-H em 3031-2819 cm<sup>-1</sup>, deformação axial de C=C de anel aromático e olefina em 1.502 e 1.485 cm<sup>-1</sup> e deformação angular do grupo metilenodioxila (-OCH<sub>2</sub>O-) em 929 cm<sup>-1 58</sup>.

Alguns dos sinais observados no espectro de RMN  $^1$ H (**Esp. 130**) foram: um dupleto em  $\delta$  6,43 (J= 10 Hz), um duplo dupleto em  $\delta$  6,24 (J = 10 e 5 Hz), dois multipletos em  $\delta$  3,89, quatro simpletos em  $\delta$  6,77, 6,85, 5,90 e 3,36.

Nos espectros de RMN  $^{13}$ C e DEPT (**Esp. 133 e 134**) de **11** observou-se a presença de 17 sinais referentes a 1 CH<sub>3</sub>, 3 CH<sub>2</sub>, 8 CH e 5 C quaternários. Os sinais em  $\delta$  147,3, 145,7, 136,1, 129,1, 127,3, 127,0, 108,6 e 102,1 indicam a presença de um anel aromático e uma ligação olefínica, o sinal em  $\delta$  100,4 (CH<sub>2</sub>) indica um grupo metilenodioxila e o sinal em 55,4 (CH<sub>3</sub>) caracteriza grupo metoxila.

Uma atribuição completa dos sinais dos hidrogênios aos seus respectivos carbonos foi realizada usando as correlações dos espectros gHSQC (**Esp. 135**) e está apresentada na **Tabela 22**.

As correlações observadas no espectro gCOSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (**Esp. 137**) confirmaram as atribuições dos sinais de hidrogênio aos seus respectivos carbonos e indicaram um

esqueleto tipo crinina. O sinal em  $\delta$  6,24 (H-2) correlaciona-se com os sinais em  $\delta$  6,43 (H-1) e 3,89 (H-3); o sinal em  $\delta$  2,14 (H-4) correlaciona-se com os sinais em  $\delta$  3,89 (H-3), 3,64 (H-4a) e 1,94 (H-4); o sinal em  $\delta$  3,11 (H-12) correlaciona-se com os sinais em  $\delta$  3,33 (H-12) e 3,89 (H-11).

O espectro de gHMBC (**Esp. 139**) confirmou as correlações atribuídas. O sinal em  $\delta$  6,24 (H-2) correlaciona-se com os sinais de carbono em  $\delta$  127,3 (C-1), 72,4 (C-3), 49,5 (C-10b) e 26,6 (C-4). O sinal em  $\delta$  1,95 (H-4) correlaciona-se com os sinais em  $\delta$  129,1 (C-2), 72,4 (C-3), 56,0 (C-4a) e 49,5 (C-10b). O sinal em  $\delta$  6,77 (H-10) correlaciona-se com os sinais em  $\delta$  147,8 (C-8), 136,1 (C-10a) e 87,3 (C-6); o sinal em  $\delta$  3,33 (H-12) correlaciona-se com os carbonos em  $\delta$  87,3 (C-6), 56,0 (C-4a) e 49,5 (C-10b).

A curva de DC do alcalóide **11**, **Figura 54**, apresenta formato compatível com o observado para os alcalóides do tipo 5,10b-etanofenatridina (crinina) que apresentam a ponte 5,10b-etano na face  $\alpha^{41,42,59}$  da molécula e o hidrogênio H-4a na face  $\beta$ .

No espectro NOESY 1D (**Esp. 142**) como resultado da irradiação em  $\delta$  3,64 (H-4a $\beta$ ) observou-se incrementos mais fortes nos sinais em  $\delta$  1,95 (H-4) e 3,36 (OCH<sub>3</sub>), a interação observada permitiu convencionar que estes sinais estão na face  $\beta$ . No espectro NOE (**Esp. 143**) a irradiação no sinal em  $\delta$  2,14 (H-4 $\alpha$ ) causou incremento nos sinais em 1,95 (H-4 $\beta$ ), 3,11 (H-12) e 3,89 (H-3), a interação permite atribuir a H-3 ( $\delta$  3,89) apresenta-se na face  $\alpha$  e ao hidrogênio H-12 ( $\delta$  3,11) *exo* ao centro da molécula. O espectro NOE (**Esp. 144**), resultado da irradiação do sinal em  $\delta$  4,92 (H-6), resultou no acréscimo dos sinais em  $\delta$  3,33 (H-12<sub>endo</sub>) e 6,77 (H-10), a interação com o sinal de H-12<sub>endo</sub> confirma que este H-6 está na face  $\alpha$  da molécula.

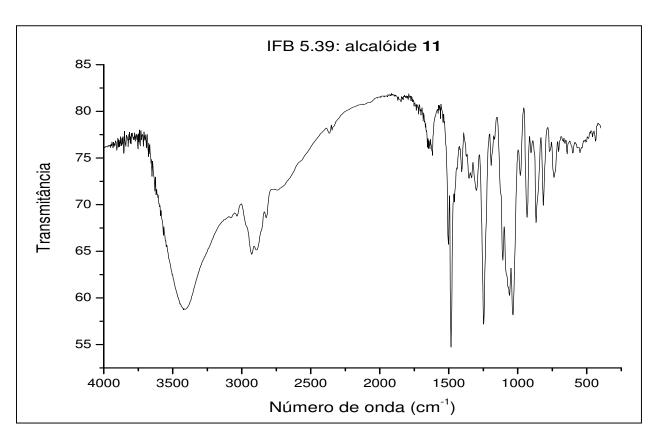
O sinal da rotação óptica  $[\alpha]_D = -8^\circ$  foi compatível com o relatado na literatura para o alcalóide haemantidina  $([\alpha]_D = -25,4^\circ)^{54}$ .

A estrutura haemantidina foi atribuída ao alcalóide **11** usando dados espectroscópicos de RMN, IV,  $\alpha_D$  e DC. A comparação com os dados da literatura <sup>54,69</sup> permitiu confirmar a estrutura do alcalóide.

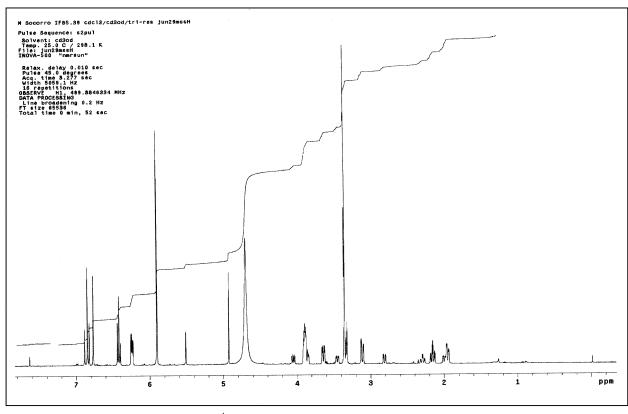
haemantidina (11)

**Tabela 22**: Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para o alcalóide haemantidina (**11**).

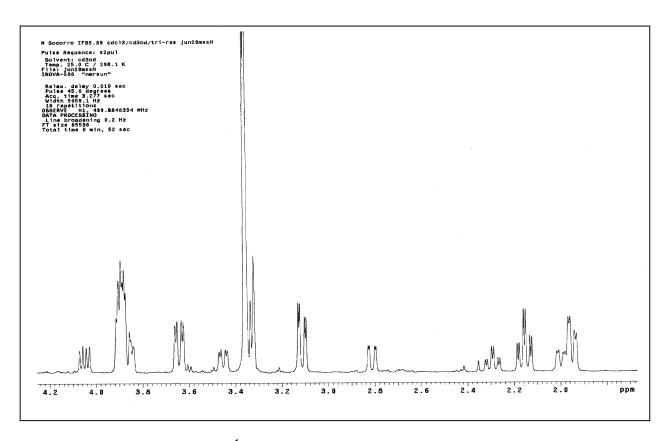
Carbono	δ (ppm) de	Tipo de Carbono	Hidrogênio	$\delta$ (ppm) de $^{1}\text{H}$	J (Hz)
1	127,3	СН	1	6,43 ( <i>d</i> )	10
2	129,1	СН	2	6,24 ( <i>dd</i> )	10 e 5
3	72,4	СН	3	3,89 ( <i>m</i> )	-
4	26,6	CH <sub>2</sub>	4α	2,14 ( <i>ddd</i> )	13,6, 13,6 e 4
			4β	1,95 ( <i>dd</i> )	13,6 e 4
4a	56,0	СН	4a	3,64 ( <i>dd</i> )	13,6 e 4
6	87,3	СН	6α	4,92 (s)	-
6a	127,0	С	-	-	-
7	102,1	СН	7	6,85 ( <i>s</i> )	-
8	145,7	С	-		14
9	147,3	С	-	-	-
10	108,6	СН	10	6,77( <i>s</i> )	-
10a	136,1	С	-	-	-
10b	49,5	С	-	-	-
11	77,5	СН	11	3,89 ( <i>m</i> )	-
12	57,5	CH <sub>2</sub>	12 <sub>exo</sub>	3,11( <i>dd</i> )	14 e 3
			12 <sub>endo</sub>	3,33 ( <i>d</i> )	6,6
-OCH <sub>3</sub>	100,4	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3,36 ( <i>s</i> )	-
-OCH <sub>2</sub> O-	55,4	CH <sub>2</sub>	-OCH <sub>2</sub> O-	5,90 ( <i>s</i> )	-



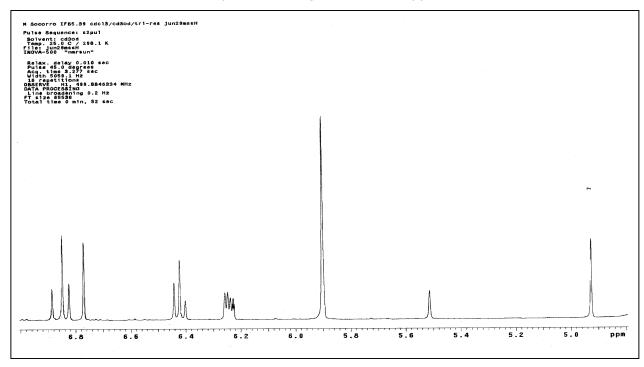
Esp. 129: Espectro de IV (pastilha de KBr) de 11.



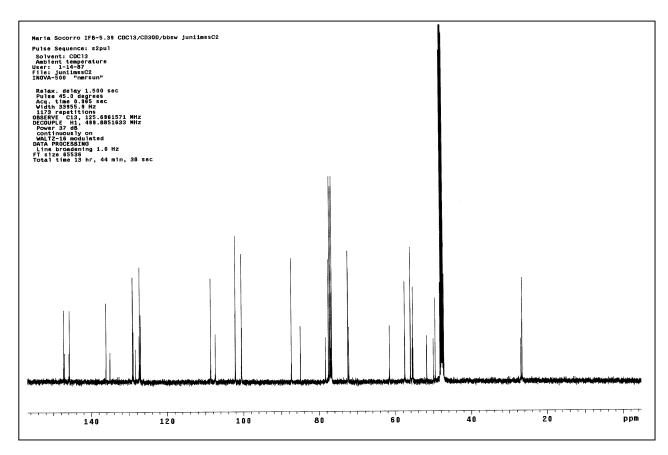
**Esp. 130**: Espectro de RMN  $^{1}$ H (498,88 MHz; CDCl $_{3}$  + CD $_{3}$ OD;  $\delta_{TMS}$  = 0,00 ppm) de **11**.



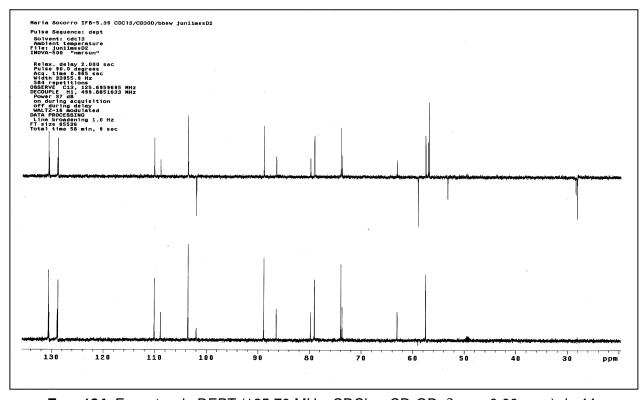
**Esp. 131**: Espectro de RMN  $^1$ H (498,88 MHz; CDCl $_3$  + CD $_3$ OD;  $\delta_{TMS}$  = 0,00 ppm) de **11** – Expansão da região  $\delta$  1,8 a 4,2 ppm.



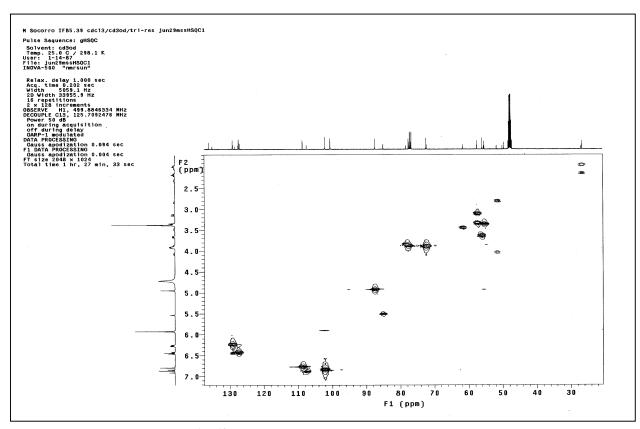
**Esp. 132**: Espectro de RMN  $^1$ H (498,88 MHz; CDCl $_3$  + CD $_3$ OD;  $\delta_{TMS}$  = 0,00 ppm) de **11** – Expansão da região  $\delta$  4,9 a 7,0 ppm.



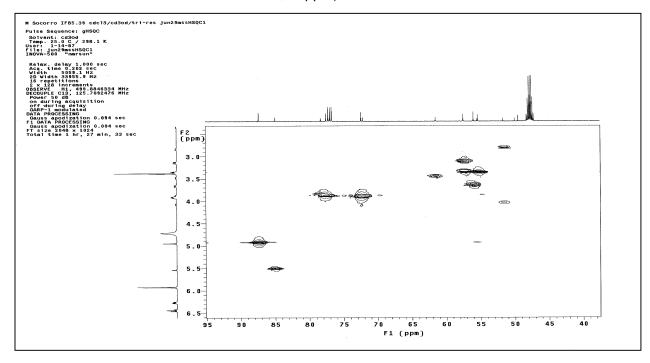
**Esp. 133**: Espectro de RMN  $^{13}$ C (125,70 MHz; CDCl<sub>3</sub> + CD<sub>3</sub>OD;  $\delta_{TMS}$  = 0,00 ppm) de **11**.



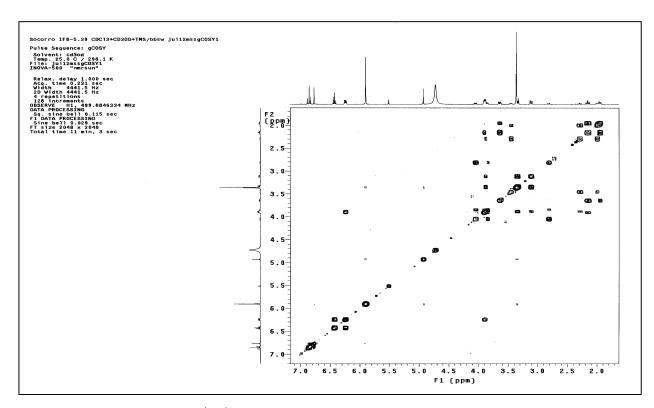
**Esp. 134**: Espectro de DEPT (125,70 MHz; CDCl<sub>3</sub> + CD<sub>3</sub>OD;  $\delta_{TMS}$  = 0,00 ppm) de **11**.



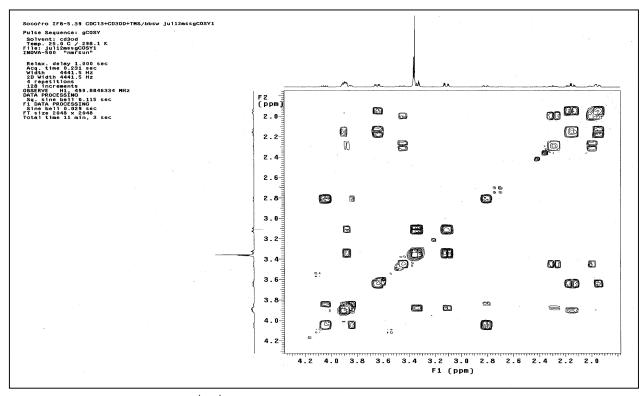
**Esp. 135**: Espectro gCOSY  $^{1}$ H- $^{13}$ C - gHSQC (499,88 MHz x 125,70 MHz; CDCl<sub>3</sub> + CD<sub>3</sub>OD;  $δ_{TMS}$  0,00 ppm) de **11**.



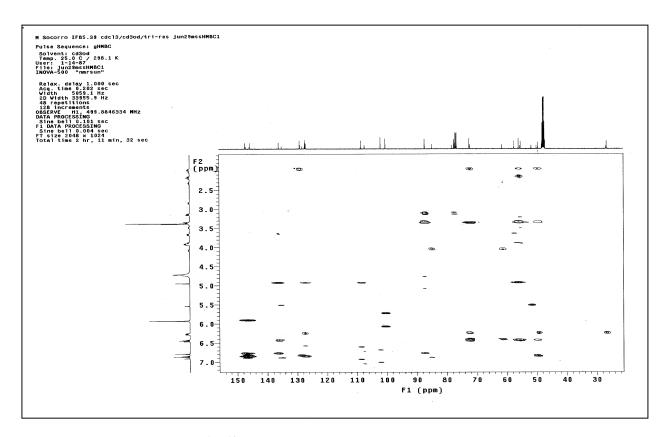
**Esp. 136**: Espectro gCOSY  $^{1}$ H- $^{13}$ C - gHSQC (499,88 MHz x 125,70 MHz; CDCl<sub>3</sub> + CD<sub>3</sub>OD;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **11** – Expansão da região δ 2,5 a 6,5 ppm e δ 38 a 95 ppm.



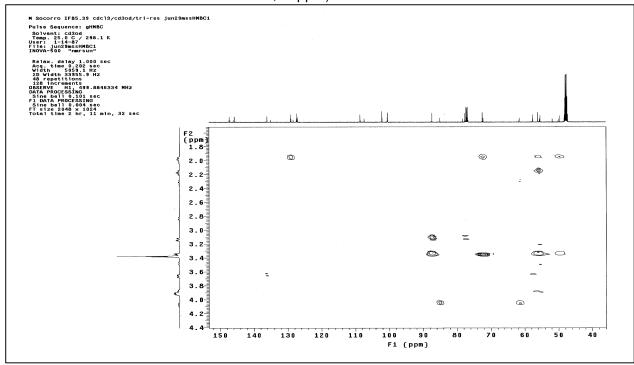
**Esp. 137**: Espectro gCOSY  $^{1}$ H- $^{1}$ H (499,88 MHz x 499,88 MHz; CDCl<sub>3</sub> + CD<sub>3</sub>OD;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **11**.



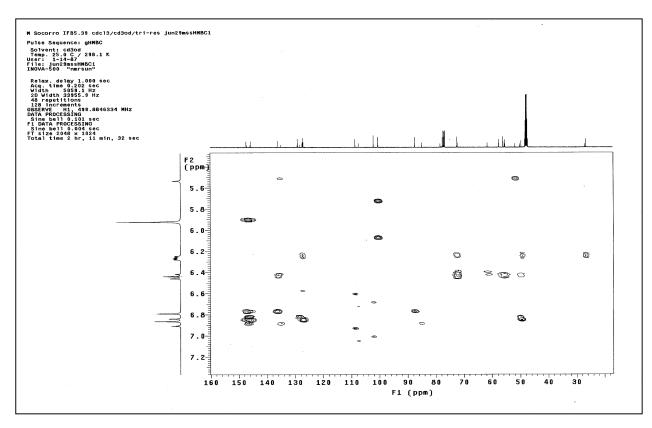
**Esp. 138**: Espectro gCOSY  $^{1}$ H- $^{1}$ H (499,88 MHz x 125,70 MHz; CDCl<sub>3</sub> + CD<sub>3</sub>OD;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **11** Expansão da região δ 1,8 a 4,3 ppm e δ 1,8 a 4,3 ppm.



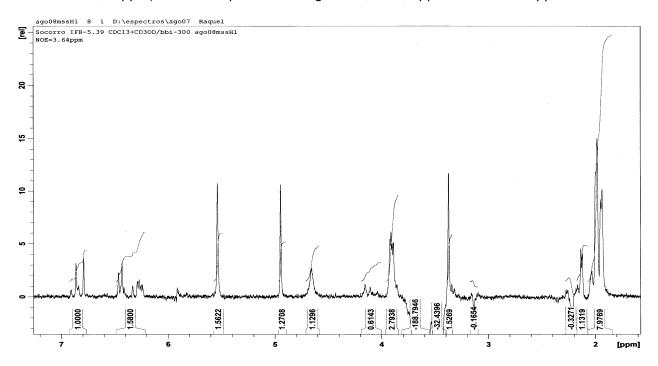
**Esp. 139**: Espectro gCOSY  $^{1}$ H- $^{13}$ C – gHMBC (499,88 MHz x 125,70 MHz; CDCl<sub>3</sub> + CD<sub>3</sub>OD;  $δ_{TMS}$  0,00 ppm) de **11**.



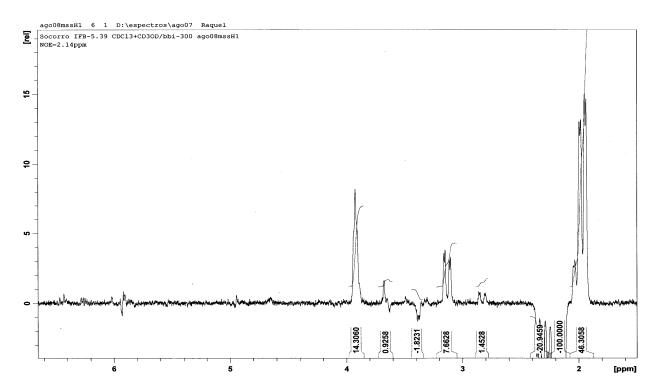
**Esp. 140**: Espectro gCOSY  $^{1}$ H- $^{13}$ C – gHMBC (499,88 MHz x 125,70 MHz; CDCl<sub>3</sub> + CD<sub>3</sub>OD;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **11** – Expansão da região δ 1,6 a 4,4 ppm e δ 38 a 151 ppm.



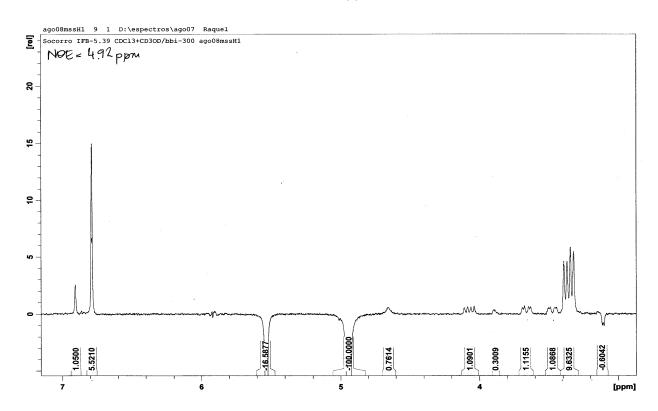
**Esp. 141**: Espectro gCOSY  $^{1}$ H- $^{13}$ C – gHMBC (499,88 MHz x 125,70 MHz; CDCl<sub>3</sub> + CD<sub>3</sub>OD;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **11** – Expansão da região δ 5,3 a 7,3 ppm e δ 20 a 160 ppm.



**Esp. 142**: Espectro NOESY 1D (499,88 MHz; CDCl<sub>3</sub> + CD<sub>3</sub>OD;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de **11**, irradiação em  $\delta$  3,64 ppm.



**Esp. 143**: Espectro NOESY 1D (499,88 MHz; CDCl $_3$  + CD $_3$ OD;  $\delta_{TMS}$  0,00 ppm) de **11**, irradiação em  $\delta$  2,14 ppm.



**Esp. 144**: Espectro NOESY 1D (499,88 MHz; CDCl<sub>3</sub> + CD<sub>3</sub>OD;  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00 ppm) de **11**, irradiação em  $\delta$  4,92 ppm.

# 5.4. Caracterização de alcalóides de Amaryllidaceae por Dicroísmo Circular (DC).

Os espectros de DC são úteis para a caracterização dos alcalóides de Amaryllidaceae; de acordo com DeAngelis e colaboradores<sup>42</sup> o formato dos espectros de DC destes depende da estereoquímica do carbono benzílico opticamente ativo em sistemas policíclicos rígidos, por exemplo, C-10b da crinina (**Figura 53**). A grande vantagem deste método é a possibilidade de deduzir a configuração absoluta do carbono benzílico de alcalóides desconhecidos por comparação dos seus espectros com os de alcalóides de configuração conhecida. A configuração dos outros centros assimétricos do alcalóide é determinada em relação ao carbono benzílico através de técnicas de RMN.

#### 5.4.1. Crinina (3), bufanisina (9) e haemantidina (11)

Os alcalóides **3**, **9** e **11** (**Figura 53**) apresentam espectros de DC com perfis característicos ao cromóforo metilenodioxifenila, ou seja, apresentam duas bandas antipodais em aproximadamente 294 e 245 nm que são correspondentes aos máximos observados no Ultravioleta (UV)<sup>41</sup>, como mostra a **Figura 54**.

No alcalóide **11**, as bandas estão centradas em 292 e 244 nm, sendo características de séries enantioméricas que possuem uma junção anelar (B:C) *trans*-2, conforme mostrado por Wagner *et al.*<sup>41</sup>.

Os alcalóides **3** e **9** seguem o padrão característico de séries enantioméricas que possuem uma junção anelar (B:C) *trans*-1<sup>41,42</sup>, possuindo suas bandas antipodais centradas em 293 e 244 nm, com perfis inversos ao observado em **11**.

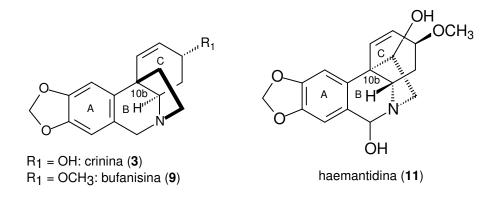


Figura 53: Estruturas dos alcalóides 3, 9 e 11.

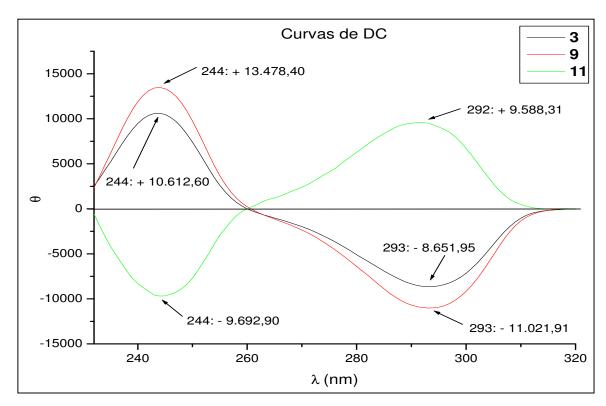


Figura 54: Curvas de DC dos alcalóides 3, 9 e 11.

A diferença de magnitude entre os espectros de DC dos alcalóides **3** e **9** parece ser decorrente da substituição da hidroxila ligada ao C-3 do alcalóide **3** pelo grupo metoxila em **9**, que deve causar uma diminuição da magnitude do dicroísmo.

# 5.4.2. Alcalóides bufanidrina (4) e undulatina (7)

Os alcalóides 4 e 7 (Figura 55), também, apresentam espectros de DC com perfis semelhantes aos anteriores, caracterizados por uma banda positiva e outra negativa.

As curvas de DC destes alcalóides (**Figura 56**) apresentam o centro das bandas em 286 e 250 nm para **4**, e 285 e 250 nm para **7**, também, decorrentes do cromóforo metilenodioxifenila e seguem o padrão característico de séries enantioméricas que possuem junção anelar (B:C) *trans*-1<sup>41</sup>.

Figura 55: Estruturas dos alcalóides 4 e 7.

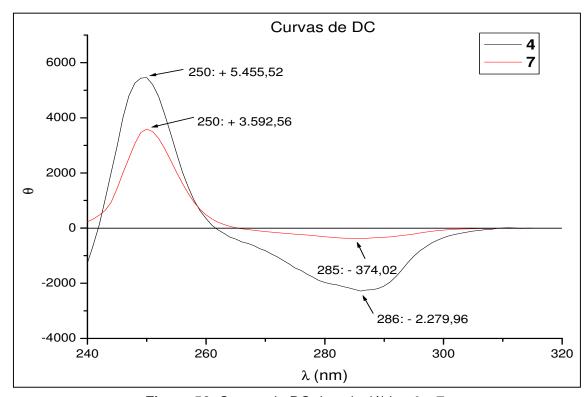


Figura 56: Curvas de DC dos alcalóides 4 e 7.

Nos espectros de DC da **Figura 56** observou-se que a banda localizada na região de elipcidade molar ( $\theta$ ) negativa apresenta menor intensidade que a localizada na região positiva; isto deve ser decorrente da presença de grupos metoxila em C-3 e C-7, em ambos os alcalóides. No alcalóide **7** observou-se, também, uma diminuição muito forte da magnitude de  $\theta$  que deve ser decorrente do anel epóxido localizado em C-1/C-2.

#### 5.4.3. Alcalóides ambelina (8) e 11-*O*-acetil-ambelina (6)

Os espectros de DC (**Figura 58**) dos alcalóides **6** e **8** (**Figura 57**) apresentaram perfis característicos ao observado para o alcalóide crinina (**Figura 54**), com bandas antipodais centradas em 252 e 282 nm para **6**, e 253 e 279 nm para **8**, confirmando a junção anelar B:C *trans*-1<sup>41</sup>.

Figura 57: Estruturas dos alcalóides 6 e 8.

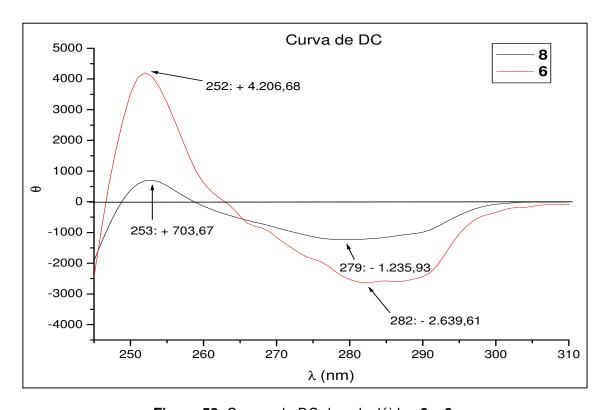


Figura 58: Curvas de DC dos alcalóides 6 e 8.

A diferença de magnitude entre o espectro de DC da **Figura 58** em relação ao do alcalóide **3** deve ser decorrente dos grupos metoxila, ligados em C-3 e C-7, bem como da presença de substituinte em C-11.

#### 5.4.4. Alcalóide 1-*O*-acetil-licorina (5)

O espectro de DC do alcalóide **5** (**Figura 60**) apresentou perfil característico ao observado para os alcalóides que apresenta junção anelar B:C *trans*-1, tais como a crinina (**Figura 54**). As bandas antipodais centradas em 244 nm e 291 nm confirmam que a 1-*O*-acetil-licorina apresenta junção anelar B:C *trans*-1, como já observado por Wagner *et al.*<sup>41</sup>.

Figura 59: Estrutura do alcalóide 5.

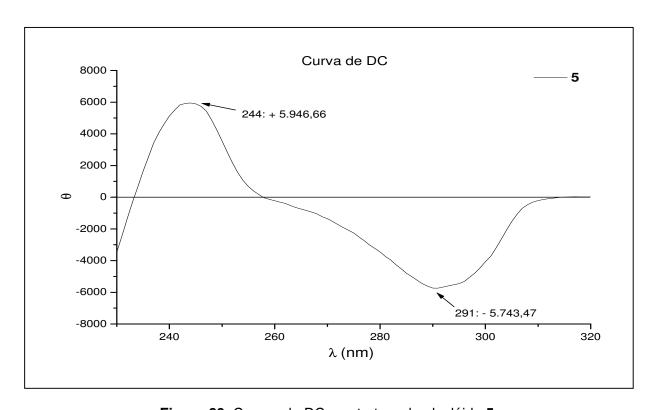


Figura 60: Curvas de DC e estrutura do alcalóide 5.

#### 5.4.5. Alcalóide tazetina (10)

O espectro de DC do alcalóide **10** (**Figura 62**) apresentou duas bandas antipodais centradas em 290 e 240 nm, estas são compatíveis com as apresentadas por Wagner, *et al.*<sup>41</sup> e Pham *et al.*<sup>53</sup> O primeiro supõe que elas são relacionadas ao grupo metilenodioxifenila da molécula e que apresentam padrão característico de séries enantioméricas que possuem uma junção anelar (B:D) *cis*-3.

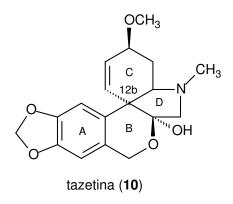


Figura 61: Estrutura do alcalóide 10.

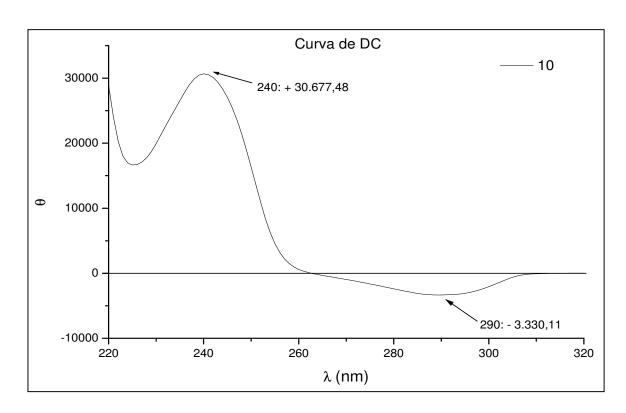


Figura 62: Espectro de DC e estrutura do alcalóide 10.

# 5.5. Estudos por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

Os extratos e alcalóides obtidos em neste estudo foram avaliados por CG-EM para a obtenção de perfis cromatográficos e, também, para auxiliar na identificação estrutural dos alcalóides isolados. Os espectros de massas obtidos por CG-EM foram comparados com os espectros presentes no software do equipamento de CG-EM, a biblioteca Wiley 275, os espectros da base de dados NIST e aos dados da literatura para fragmentações características destes alcalóides.

O extrato CHCl<sub>3</sub> II de *Amacrinum* foi analisado por CG-EM em diversas programações de temperatura para a obtenção de um programa que apresentasse a melhor resolução dos picos cromatográficos em um menor tempo e que pudesse ser utilizado para estudo de outros extratos de Amaryllidaceae.

A melhor resposta foi obtida com coluna cromatográfica HP5 (50 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m), com grade de temperatura apresentada na **Figura 63**; injetor a 250 °C; detector a 280°C e fluxo de hélio a 1,0 mL/minuto.

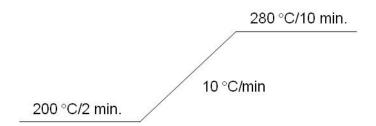


Figura 63. Programa de aquecimento usado no CG.

Os extratos obtidos para as espécies de *Amaryllis* ("sidney", "desire" e "belladonna"), também, foram avaliados usando esse método e pode-se identificar alguns de seus alcalóides.

### 5.5.1. Extrato de CHCl<sub>3</sub> II de Amacrinum

O Cromatograma de Íons Totais (TIC) do extrato CHCl<sub>3</sub> II de *Amacrinum* está apresentado na **Figura 64**. Neste cromatograma visualizaram-se todos os alcalóides isolados e caracterizados, no estudo fitoquímico do híbrido *Amacrinum*, que estão listados na **Tabela 23**.

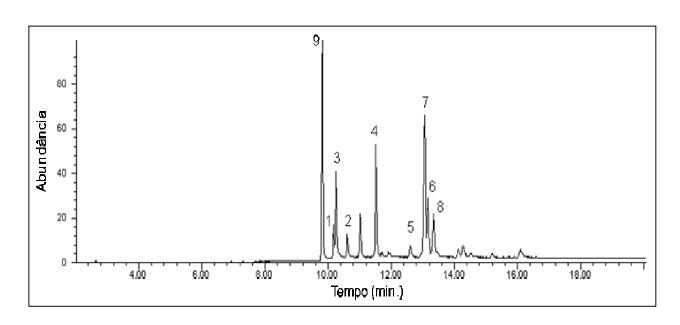


Figura 64. TIC do extrato CHCl<sub>3</sub> II de *Amacrinum*.

Tabela 23: Dados da análise por CG-EM do extrato CHCl<sub>3</sub> II de *Amacrinum*.

Nome do alcalóide	TR (min.)	% relativa no ext. CHCl <sub>3</sub> II
bufanisina (9)	9.81	25
beladina (1)	10.16	4
crinina (3)	10.24	13
N-desmetilbeladina (2)	10.61	5
bufanidrina ( <b>4</b> )	11.51	11
1-O-acetil-licorina (5)	12.59	2
undulatina (7)	13.03	21
11-O-acetil-ambelina (6)	13.14	6
ambelina (8)	13.33	5

# 5.5.2. Estudo de extratos de Amaryllis

Extratos de *Amaryllis* foram analisados por CG-EM utilizando as condições que apresentaram os melhores resultados para *Amacrinum*. A análise dos TIC destes extratos revelou a presença de outros compostos, tais como ácidos graxos, junto aos alcalóides. Sendo os alcalóides a classe de interesse na família Amaryllidaceae, os extratos de *Amaryllis* foram filtrados em CC de sílica gel para a obtenção de frações

ricas em alcalóides e também para evitar possíveis danos à coluna cromatográfica.

A fração 2 (F2) dos extratos CHCl<sub>3</sub> II de *Amaryllis* "sidney", "desire" e "belladonna", obtidas após filtração dos respectivos extratos CHCl<sub>3</sub> II, foram analisadas por CG-EM e os seus TIC mostram que estas realmente ficaram mais ricas em alcalóides que os extratos iniciais.

Os TIC das F2 dos extratos CHCl<sub>3</sub> II de *Amaryllis* estão apresentados a seguir: **Figura 65** (*Amaryllis* "sidney"), **Figura 66** (*Amaryllis* "desire") e **Figura 67** (*Amaryllis* "belladonna"), indicando os alcalóides detectados nos extratos.

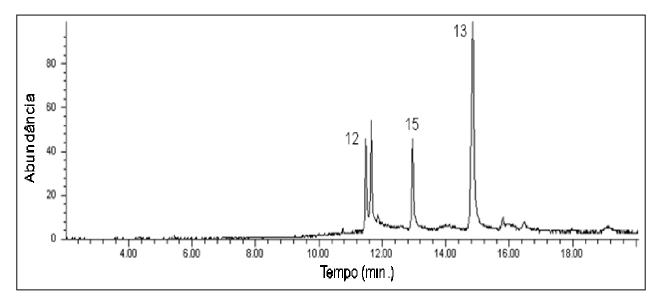


Figura 65. TIC da F2 do extrato CHCl<sub>3</sub> II de Amaryllis "sidney".

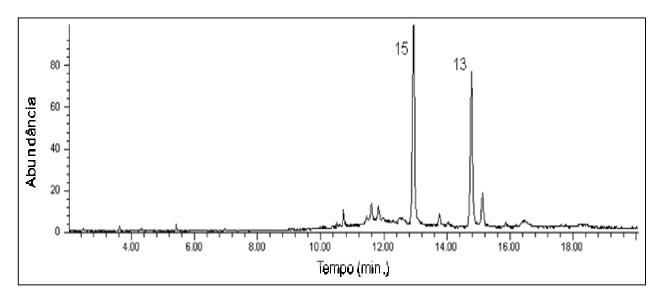


Figura 66. TIC da F2 do extrato CHCl<sub>3</sub> II de Amaryllis "desire".

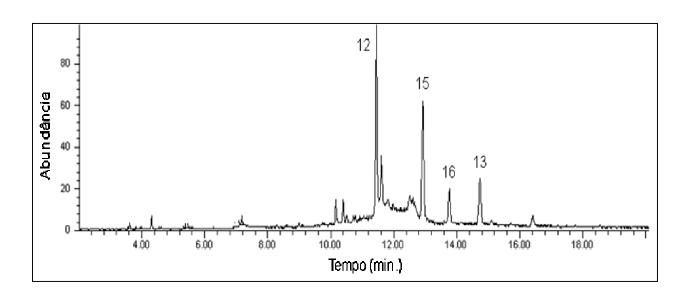


Figura 67. TIC da F2 do extrato CHCl<sub>3</sub> II de Amaryllis "belladonna".

Dentre os seis extratos de *Amaryllis* analisados por CG-EM o que apresentou a menor quantidade de alcalóides foi o extrato AcOEt II da variedade "sidney", que está apresentado na **Figura 68** e possui em sua constituição apenas dois alcalóides.

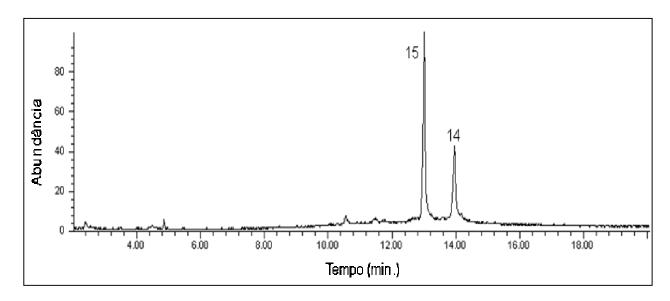


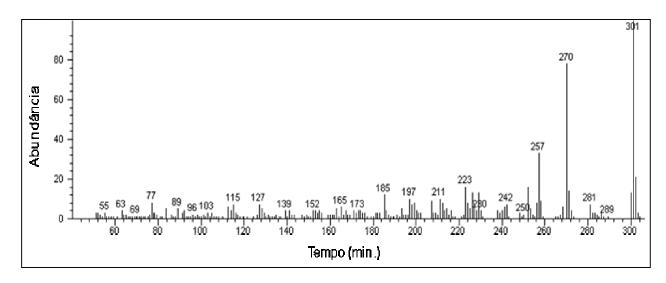
Figura 68. TIC do extrato AcOEt II de Amaryllis "sidney".

A análise dos extratos de *Amaryllis* por CG-EM possibilitou a detecção dos alcalóides presentes nas três espécies estudadas, suas estruturas estão apresentadas na **Quadro 2**.

Quadro 2: Alcalóides detectados por CG-EM nos extratos de *Amaryllis*.

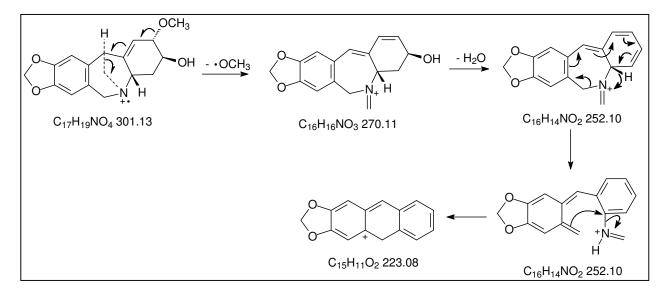
	Extratos de <i>Amaryllis</i>			
Alcalóide	CHCl <sub>3</sub> II de <i>A.</i> "belladonna"	CHCl <sub>3</sub> II de A. "desire"	CHCl <sub>3</sub> II de A. "sidney"	AcOEt II de  A. "sidney"
OCH <sub>3</sub> OH Montanina (12)	Х		X	
H <sub>3</sub> C-N-OH Ohipeastrina (13)	X	X	X	
HO N CH <sub>3</sub> 1,2-dihidro-clidantina (14)				Х
OH HO,,,, N licorina (15)	X	X	X	Х
H <sub>3</sub> CO H <sub>3</sub> CO OCH <sub>3</sub> OH nerinina (16)	X			

#### 5.5.2.1. Montanina (12)



Esp. 145: Espectro de massas (IE, 70 eV) do alcalóide 12.

O espectro de massas do alcalóide **12** (**Esp. 145**) apresenta como pico base o correspondente ao íon molecular m/z 301 [C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>]<sup>-+</sup>, este pode perder o radical metoxila produzindo o íon m/z 270 [C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, que pode perder uma molécula de água formando o íon m/z 252 [C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, que pode sofrer decomposição e eliminar a molécula CH<sub>2</sub>NH produzindo o íon m/z 223 [C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+ 69</sup>, **Figura 69**.



**Figura 69**: Proposta de fragmentação para formação dos íons m/z 270, 252 e 223 a partir de **12**.

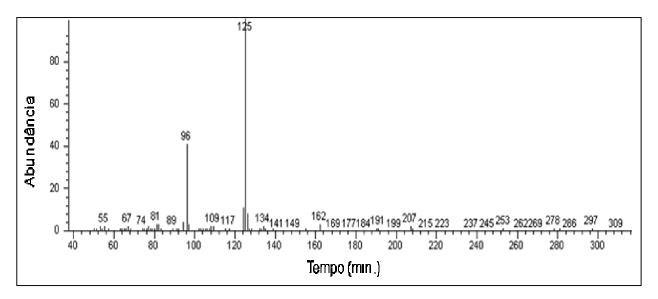
208

<sup>&</sup>lt;sup>69</sup> Duffiel, A. M.; Aplin, R. T.; Budzikiewicz, H.; Djerassi, C.; Murphy, C. F.; Wildman, W. C. *Journal of the American Chemical Society*, **1965**, 87, 4902-49-12.

O espectro de massas do alcalóide **12** (**Esp. 145**), também, apresenta um pico correspondente ao íon radical m/z 257 [ $C_{15}H_{15}NO_3$ ].<sup>+</sup>, decorrente de uma fragmentação retro Diels-Alder do anel C, com eliminação de uma molécula de acetaldeído ( $CH_3CHO$ )<sup>70</sup>, **Figura 70**.

**Figura 70**: Proposta de fragmentação para formação dos íons *m/z* 257 a partir de **12**.

# 5.5.2.2. Hipeastrina (13)

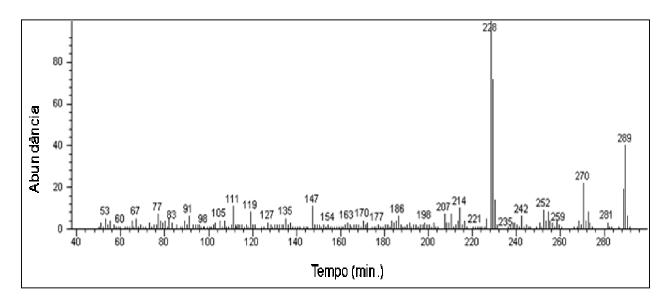


Esp. 146: Espectro de massas (IE, 70 eV) do alcalóide 13.

O espectro de massas do alcalóide **13** (**Esp. 146**) não apresenta o pico do íon molecular m/z 315 [C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub>]<sup>-+</sup>, este pode gerar o íon m/z 125 [C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>NO]<sup>-+</sup>, que pode eliminar radical formila produzindo o íon m/z 96 [C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>N]<sup>+ 68a</sup>, **Figura 71**.

**Figura 71**: Proposta de fragmentação para formação dos íons m/z 125 e 96 a partir de **13**.

# 5.5.2.3. 1,2-diidro-clidantina (14)



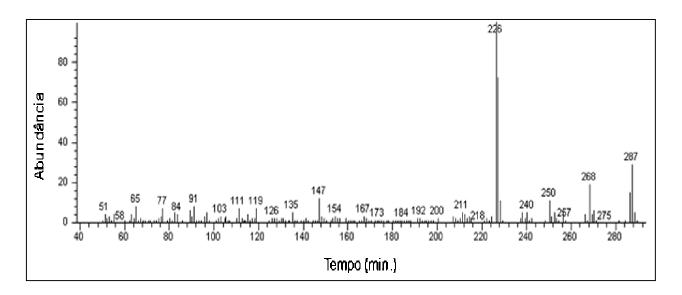
Esp. 147: Espectro de massas (IE, 70 eV) do alcalóide 14.

A biblioteca Wiley 275 do software do equipamento de GC-EM sugeriu para o alcalóide **14** a estrutura do 1,2-diidro-clidantina com uma similaridade de 99%. O perfil de fragmentação, também foi compatível com o observado para o mesmo composto na base de dados NIST.

1,2-diidro-clidantina (14)

Figura 72: Estrutura do alcalóide 1,2-diidro-clidantina (14).

# 5.5.2.4. Licorina (15)



Esp. 148: Espectro de massas (IE, 70 eV) do alcalóide 15.

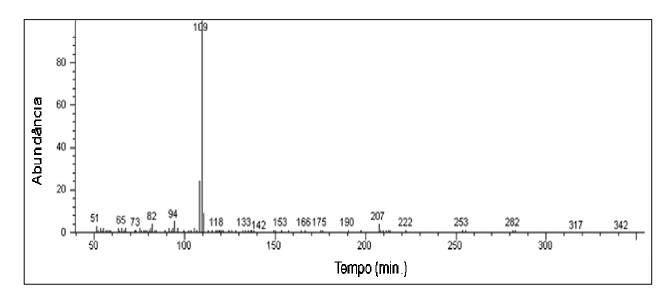
O espectro de massas do alcalóide **15** apresenta o íon molecular m/z 287  $[C_{18}H_{18}NO_5]^{,+}$  este pode perder hidrogênio radicalar seguido da perda dos substituintes hidroxila da molécula ocasionando a formação do íon radical m/z 252  $[C_{16}H_{14}NO_2]^+$  que poder  $H_2$  gerando o íon m/z 226  $[C_{14}H_{12}NO_2]^{+68a}$ , (**Figura 73**).

**Figura 73**: Proposta de fragmentação para formação dos íons m/z 286, 268, 252 e 250 a partir de **15**.

O íon molecular m/z 287 [C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>]<sup>-+</sup> pode sofrer rearranjo de hidrogênio seguido da perda de etilenodiol produzindo o íon radicalar m/z 227 [C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>-+</sup> que pode sofrer a perda de hidrogênio radicalar gerando o íon m/z 226 [C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+ 68a</sup> (**Figura 74**).

**Figura 74**: Proposta de fragmentação para formação dos íons m/z 287, 227 e 226 a partir de **15**.

# 5.5.2.5. Nerinina (16)



Esp. 149: Espectro de massas (IE, 70 eV) do alcalóide 16.

O espectro de massas do alcalóide **16** não apresenta o íon molecular m/z 331  $[C_{19}H_{25}NO_4]^{-+}$  este fragmenta produzindo o íon radical m/z 109  $[C_7H_{11}N]^{-+}$  que pode sofrer a perda de hidrogênio radicalar gerando o íon m/z 108  $[C_7H_{10}N]^{+68a}$ , (**Figura 75**).

$$H_3CO$$
 $H_3CO$ 
 $H_3CO$ 
 $OCH_3$ 
 $C_{19}H_{25}NO_4$  331.18

 $H_3CO$ 
 $H$ 

Figura 75: Proposta de fragmentação para formação dos íons *m/z* 109 e 108 a partir de 16.

# 5.5.3. Comparações entre alcalóides de *Amacrinum*, *Amaryllis, Crinum* e *Hippeastrum*

A espécie *Amacrinum* é um híbrido (*Amaryllis* x *Crinum*), portanto seus alcalóides podem apresentar as mesmas características estruturais que os alcalóides destes dois gêneros ou dos demais gêneros da família Amaryllidaceae.

Os alcalóides identificados e isolados no extrato CHCl<sub>3</sub> II de *Amacrinum* foram comparados aos alcalóides detectados, por CG-EM, nas três espécies de *Amaryllis* ("sidney", "desire" e "belladonna"), bem como com os alcalóides relatados em espécies dos gêneros: *Amaryllis*, *Crinum* e *Hippeastrum*. Os alcalóides de *Hippeastrum* foram, também, incluídos nas investigações devido aos problemas taxonômicos citados anteriormente.

### 5.5.3.1. Amacrinum e o gênero Amaryllis

Os nove alcalóides isolados e identificados no híbrido *Amacrinum* dividem-se em 3 tipos de esqueletos: tipo-beladina (1 e 2), tipo-licorina (5) e tipo-crinina (3, 4, 6, 7, 8 9) e suas estruturas estão apresentadas na **Figura 76**.

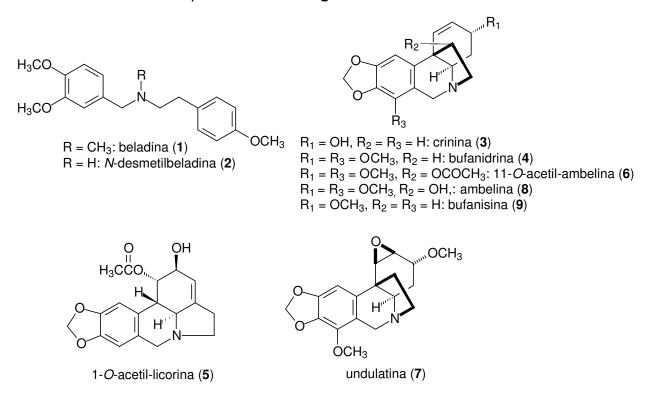


Figura 76: Alcalóides isolados e identificados no híbrido Amacrinum.

#### 5.5.3.2. Amaryllis ("sidney", "desire" e "belladonna")

Os cinco alcalóides detectados nas espécies de *Amaryllis*, neste estudo, dividem-se em 4 tipos de esqueletos: tipo-pancracina (12), tipo-licorina (15), tipo-galantamina (14) e tipo-homolicorina (13 e 16) e suas estruturas estão apresentadas na **Figura 77**.

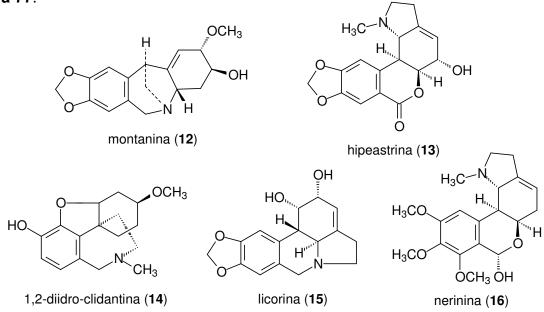


Figura 77: Alcalóides isolados e detectados nas três variedades de *Amaryllis*.

A comparação entre os alcalóides de *Amacrinum* e os das três variedades de *Amaryllis* revelou que estes alcalóides apresentam em sua maioria diferenças estruturais e, portanto pertencem a esqueletos diferentes. A única semelhança é a presença de 1-O-acetil-licorina (5) em *Amacrinum* e licorina (15) em *Amaryllis*, que pertencem ao tipo-licorina, um grupo de alcalóides muito comum em vários gêneros da família Amaryllidaceae.

### 5.5.3.3. Espécies de *Amaryllis* relatadas na literatura

Conforme relatado na introdução estudos com espécies do gênero *Amaryllis* resultaram no isolamento do alcalóide licorina (**IV**) em um exemplar de *Amaryllis* belladonna, de origem australiana<sup>20</sup>. Um exemplar de *A. belladonna*, americana, apresentou acetilcaranina (**XIX**), ambelina (**XX**), undulatina (**XXXV**) e cloridrato de anidrolicorina (**XXXIX**)<sup>20</sup>. O estudo de um exemplar de *A. belladonna* egípcia resultou no isolamento de seis alcalóides: licorina (**IV**), pancracina (**VI**), vitatina (**XL**) e 11-

hidroxivitatina (XLI) e hipeastrina (XLII) 25.

O estudo do fluído do talo da flor da espécie *A. vittata* resultou na identificação do alcalóide rilistina (**XLIII**)<sup>26</sup>. As estruturas dos alcalóides isolados em espécies *Amaryllis* estão apresentadas na **Figura 78**.

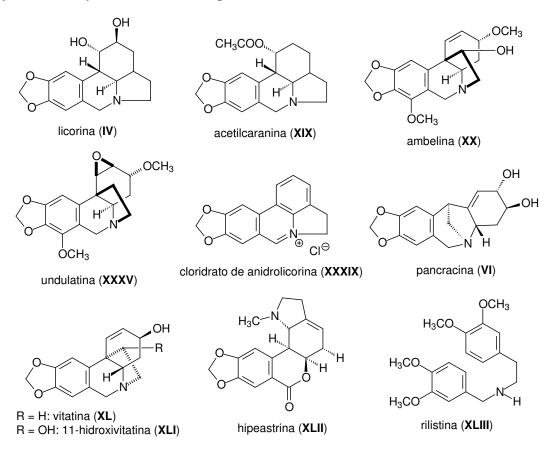


Figura 78: Alcalóides relatados em espécies do gênero Amaryllis.

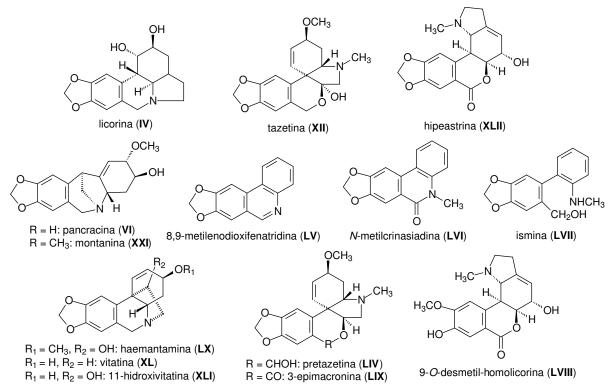
Observou-se que os alcalóides relatados em espécies de *Amaryllis* apresentam os esqueletos: tipo-beladina (**XLIII**), tipo-crinina (**XX**, **XXXV**, **XL** e **XLI**), tipo-licorina (**IV**, **XIX** e **XXXIX**), tipo-homolicorina (**XLII**) e tipo-pancracina (**VI**). Os três primeiros tipos foram observados no híbrido *Amacrinum*, ressaltando que as estruturas dos alcalóides ambelina (**XXX**) e undulatina (**XXXV**) foram atribuídas aos alcalóides **8** e **7**, respectivamente, isolados neste estudo sobre do híbrido.

#### 5.5.3.4. Espécies de *Hippeastrum* relatadas na literatura

Na espécie *Hippeastrum vittatum*, coletada no sul do Brasil, foram isolados e identificados os alcalóides licorina (**IV**), pancracina (**VI**), montanina (**XXI**) e vitatina (**XL**)<sup>21</sup>. A espécie *Hippeastrum glaucescens*, coletada no nordeste do Rio Grande do Sul, apresentou licorina (**IV**), tazetina (**XII**) e pretazetina (**LV**)<sup>31,32</sup>.

Estudos com a espécie *H. equestre* Herb, coletada em Bornova (Turkia) e Hanói (Vietnã), possibilitaram a identificação dos alcalóides: licorina (**IV**), tazetina (**XII**), hipeastrina (**XLII**), 8,9-metilenodioxifenantridina (**LV**), *N*-metilcrinasiadina (**LVI**)<sup>32</sup>, ismina (**LVII**), 11-hidroxivitatina (**XLI**), 9-*O*-desmetil-homolicorina (**LVIII**), pretazetina (**LIV**) e 3-epimacronina (**LIX**)<sup>34</sup>.

Uma espécie híbrida de *Hippeastrum*, cultivada em Berlin, apresentou os alcalóides licorina (**IV**), tazetina (**XII**), hipeastrina (**XLII**), haemantamina (**LX**), vitatina (**XLI**), 11-hidroxivitatina (**XLI**), montanina (**XXI**) e pancracina (**VI**)<sup>30</sup>.



**Figura 79**: Alcalóides relatados em espécies do gênero *Hippeastrum*.

Os alcalóides relatados em espécies de *Hippeastrum* agrupam-se em cinco tipos de esqueletos: tipo-crinina, tipo-licorina, tipo-homolicorina, tipo-tazetina e tipo-pancracina. Observou-se que o híbrido *Amacrinum* e o gênero *Hippeastrum* não

apresentam alcalóides em comum, apenas a presença de alcalóides que pertencem ao mesmo grupo de alcalóide (tipo-crinina e tipo-licorina).

#### 5.5.3.5. Espécies de *Crinum* relatadas na literatura

O gênero *Crinum* apresenta um grande número de estudos, quando comparados aos existentes sobre os gêneros *Amaryllis* e *Hippeastrum*, resultando em um grande número de alcalóides isolados, o que impossibilita a apresentação, nesta discussão, de todos os alcalóides relatados neste gênero.

Sabendo que o tipo-crinina é o principal grupo de alcalóides do gênero *Crinum*, e que a maioria dos alcalóides isolados de *Amacrinum* também é deste grupo, será apresentado apenas uma relação das espécies de *Crinum* que apresentaram em sua composição química os alcalóides isolados neste estudo sobre o híbrido *Amacrinum*.

Quadro 3: Alcalóides isolados em *Amacrinum* e outras espécies de *Crinum*.

Alcalóide de Amacrinum	Demais espécies Crinum onde foi isolado
H <sub>3</sub> CO CH <sub>3</sub> N beladina (1)	Crinum latifolium <sup>45</sup>
crinina (3)	Crinum kirkii <sup>19</sup> , Crinum moorei <sup>44,48</sup> e Crinum bulbispermum <sup>51</sup>
OCH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub> bufanidrina (4)	Crinum macowanii <sup>16</sup>

1-O-acetil-licorina (5)

H <sub>3</sub> CCO <sub>II</sub> H <sub>N</sub> 1- <i>O</i> -acetil-licorina ( <b>5</b> )	Crinum moorei <sup>44</sup> e Crinum kirkii <sup>19</sup>
OCH <sub>3</sub> OCOCH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub> 11- <i>O</i> -acetil-ambelina ( <b>6</b> )	Crinum latifolium <sup>9</sup>
OCH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub> undulatina (7)	Crinum macowanni <sup>16</sup> e Crinum moorei <sup>48</sup>
OCH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub> ambelina (8)	Crinum amabile <sup>50</sup> , Crinum bulbispermum <sup>15</sup>
bufanisina (9)	Crinum moorei <sup>10</sup> , Crinum amabile <sup>50</sup> , Crinum bulbispermum <sup>51</sup>

A comparação dos alcalóides isolados de *Amacrinum* e os alcalóides detectados por CG-EM nas três variedades de *Amaryllis*, bem como com os dados literários sobre os alcalóides de *Amaryllis*, *Hippeastrum* e *Crinum* mostrou que os alcalóides do gênero *Crinum* prevaleceram no híbrido.

#### 5.6. Testes de Inibição de AChE por CCD

A avaliação qualitativa da inibição da acetilcolinesterase (AChE) por CCD foi realizada por dois métodos.

O primeiro segue o procedimento adotado por Rhee<sup>39</sup>, baseado no método de Ellman. Este método é baseado na hidrólise do ATCI pela AChE, produzindo tiocolina que reage com DTNB originando o composto 5-tio-2-nitro-benzoato, que apresenta corolação amarela. As reações químicas envolvidas neste teste estão apresentadas na **Figura 80**.

Figura 80. Reações envolvidas no método de Rhee.

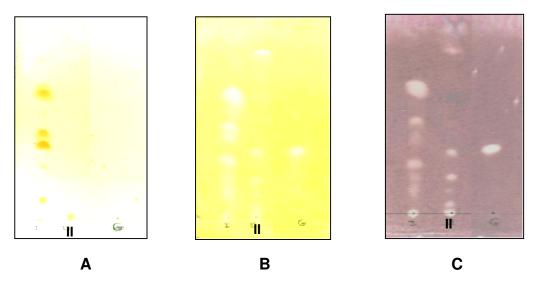
O segundo método segue o procedimento descrito por Masrton<sup>40</sup>, baseado na hidrólise do acetato de 1-naftila pela AChE, produzindo 1-naftol que reage com sal fast blue B produzindo um corante azo de coloração púrpura. As reações envolvidas na metodologia estão apresentadas na **Figura 81**.

Figura 81. Reações envolvidas no método de Marston.

Na presença de um inibidor da ação da AChE, em ambos os testes, a primeira reação poderá não acontecer ou então ocorrer de forma muito lenta impedindo a formação das cores características das reações.

#### 5.6.1. Testes com extratos CHCl<sub>3</sub> II de *Amacrinum* e *Ismene festalis*

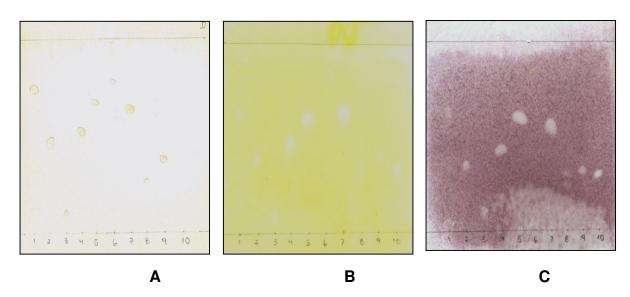
A **Figura 82** apresenta o resultado para os testes de inibição com os extratos CHCl<sub>3</sub> II de *Amacrinum* e *Ismene festalis*, I e II respectivamente, e o inibidor galantamina.



**Figura 82.** Inibição da AChE em CCD. (Extratos CHCl<sub>3</sub> II de *Amacrinum*, I, e *Ismene festalis*, II, e o inibidor Galantamina, G). (placa A – Dragendorff, placa B – Rhee, placa C – Marston).

#### 5.6.2. Testes com alcalóides de *Amacrinum*

Os alcalóides: beladina (1), *N*-desmetil-beladina (2), crinina (3), bufanidrina (4), 1-*O*-acetil-licorina (5), 11-*O*-acetil-ambelina (6), undulatina (7), ambelina (8), bufanisina (9) e o controle galantamina (G) foram testados em aproximadamente 5 mM. Os resultados estão apresentados na **Figura 83**.



**Figura 83.** Inibição da AChE em CCD. (Alcalóides isolados de Extratos CHCl<sub>3</sub> II de *Amacrinum*, e o inibidor Galantamina, G). (placa A – Dragendorff, placa B – Rhee, placa C – Marston).

Os dois métodos aplicados em análises qualitativas de inibição da enzima AChE mostraram-se simples e com possibilidade de testar vários extratos ou alcalóides ao mesmo tempo, mas apresentam problemas relativos ao desenvolvimento das cores que os caracterizam, ocasionando problemas de reprodutibilidade dos halos de inibição.

Entre os dois métodos o de Marston apresentou a melhor visualização dos pontos de inibição, pois a coloração púrpura desenvolve-se com mais facilidade, apresenta uma melhor reprodutibilidade e facilita a visualização dos halos de inibição.

Nos dois extratos avaliados observou-se a presença de substâncias que causam inibição da enzima AChE, sendo que o extrato de *Amacrinum* apresenta o maior número de alcalóides e as melhores visualizações das manchas de inibições de AChE.

Quanto aos alcalóides testados observou-se que os alcalóides bufanidrina (4), 1-O-acetil-licorina (5) e undulatina (7) foram os que apresentaram as melhores visualizações das manchas de inibição.

#### 5.7. Testes de Inibição da AChE em Microplaca

O teste de inibição da AChE em CCD, descrito no tópico 4.6, apresenta apenas caráter qualitativo. Para quantificar o valor da inibição da AChE apresentado pelos alcalóides isolados em neste estudo, utilizou-se uma metodologia baseada no método de Rhee<sup>39</sup>, este método apresenta como vantagens a utilização de pequenas quantidades de amostras e reagentes e a possibilidade de testar várias concentrações, ao mesmo tempo.

#### 5.7.1. Modificações na metodologia de Rhee

A metodologia descrita por Rhee não apresenta detalhes sobre alguns procedimentos importantes, tais como: temperatura, agitação, tempo de leitura após adição dos reagentes na microplaca. Para adequar esta metodologia ao leitor de microplaca FLASHScan 530, pertencente ao grupo da professora Dra. Anita Marsaioli, foi necessário avaliar a influência destes e de outros procedimentos nos resultados experimentais; bem como estabelecer a melhor programação para o aparelho realizar as análises.

# 5.7.2. Padronização da metodologia para análise da inibição de AChE no FLASHScan 530

Na metodologia que foi padronizada neste trabalho utilizamos as concentrações e volumes das soluções são iguais as da metodologia de Rhee<sup>39</sup> e o alcalóide fisostigmina (Fluka), **Figura 84**, foi utilizado como inibidor AChE. Este foi isolado pela primeira vez no século XIX de *Physostigma venenosum* (Fabaceae) e usado durante muito tempo como um inibidor AChE, apresentando bons resultados, mas a utilização clínica foi limitada pelos efeitos colaterais e tempo de meia-vida curto<sup>16</sup>.

Figura 84. Estrutura do inibidor de AChE: Fisostigmina.

A primeira modificação inserida no método foi medir a hidrólise espontânea simultaneamente com a medida da hidrólise enzimática. Para a hidrólise enzimática a solução contém (ATCI, DTNB, inibidor e enzima), para a hidrólise espontânea (ATCI, DTNB, inibidor e solução tampão, em lugar da enzima).

O FLASHScan pode realizar leituras utilizando diversos recursos (agitação, variação de temperatura, leituras em 1 ou 4 pontos por poço, número de ciclos, entre outros). Após realizar leituras em diversas programações, observou-se que as medidas de absorbância, para um mesmo experimento, apresentavam diferentes resultados de acordo com a programação utilizada no aparelho. Depois de vários testes adotou-se a programação que apresentou a melhor reprodutibilidade das medidas de absorbância. Nesta as análises são realizadas sem agitação da microplaca, durante 10 ciclos (cada ciclo dura 25 segundos entre o início e fim) e a leitura da absorbância realizada a 405 nm em um ponto do poço por quatro vezes.

Após a escolha da programação do aparelho resolveu-se avaliar a influência do tempo de espera, após a adição dos reagentes, para iniciar a leitura e da temperatura na inibição enzimática. Para a avaliação do tempo foram realizadas leituras das absorbâncias em diferentes tempos, depois da adição dos reagentes nos poços (0, 5, 10, 15 e 20, 30 min.). A partir da análise dos dados obtidos, observou-se que a inibição da reação enzimática aumenta diretamente com o tempo; este comportamento que pode ser observado na **Figura 85**.

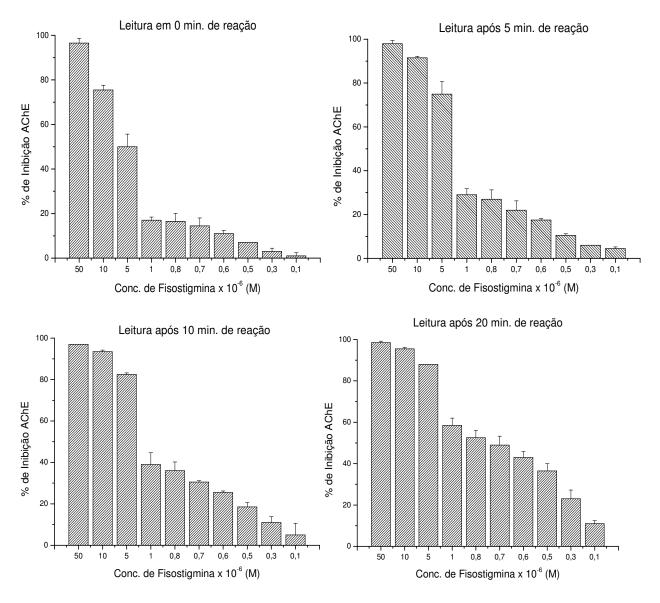
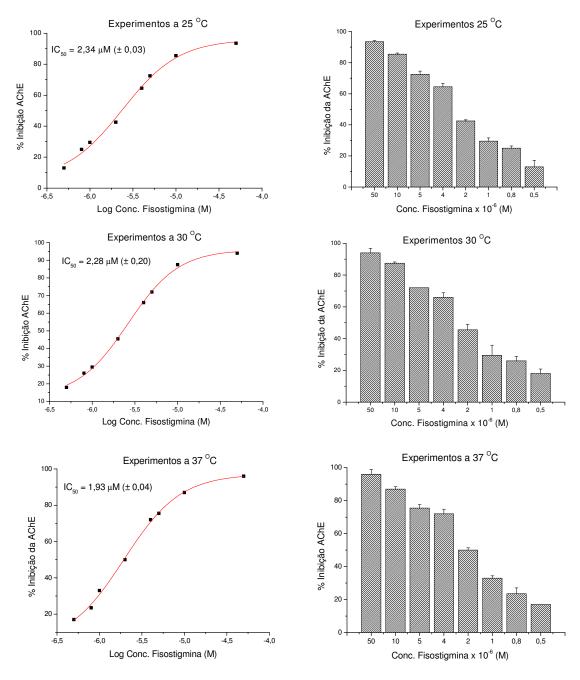


Figura 85. Gráficos de inibição de AChE pela fisostigmina em diferentes tempos.

Com base nos resultados experimentais e nas interações entre enzima/acetiltiocolina e enzima/inibidor conclui-se que nos minutos iniciais de reação as maiores interações são entre enzima e acetiltiocolina e com o decorrer do tempo ocorre um aumento da interação entre enzima e inibidor, ocasionando um aumento da inibição da reação enzimática.

Para avaliar a influência da temperatura na inibição enzimática realizaram-se experimentos, usando fisostigmina como inibidor, em três temperaturas 25, 30 e 37 °C. O aquecimento, da microplaca com os reagentes, foi realizado pelo FLASHScan por 5 minutos. O resultado destes experimentos pode ser observado **na Figura 86**.



**Figura 86**. Gráficos de IC<sub>50</sub> e % de inibição de AChE pela fisostigmina em diferentes temperaturas, experimento realizado 5 minutos após adição dos reagentes.

Os resultados obtidos, neste último experimento, permitiram calcular o IC $_{50}$ , ou seja, a concentração necessária para inibir 50% da reação enzimática, observou-se que esta diminui com o aumento da temperatura, como pode ser observados para os IC $_{50}$  da fisostigmina 2,34 (± 0,03); 2,28 (± 0,20) e 1,93 (± 0,04)  $\mu$ M, a 25 30 e 37  $^{0}$ C, respectivamente.

O estudo das variáveis que podem modificar os resultados dos potenciais inibitórios dos alcalóides de Amaryllidaceae frente a AChE surgiu em decorrência da observação dos diversos valores de IC $_{50}$  atribuídos a galantamina relatados na literatura. Ingkaninam e colaboradores relatam que a galantamina possui IC $_{50}$  igual a 0,98  $\mu$ M $^{70}$ , López e colaboradores relatam que esta possui IC $_{50}$  igual a 1,07  $\mu$ M $^{71}$ , Markmee e colaboradores relatam IC $_{50}$  igual a 0,59  $\mu$ M $^{72}$ , Ahamad e colaboradores encontraram IC $_{50}$  igual a 32,2  $\mu$ M $^{73}$ . Necessitando-se de uma uniformidade das metodologias para a obtenção de valores que possam ser comparados.

# 5.8. Testes de inibição de AChE em microplaca – Extratos de Amacrinum, Ismene festalis e Amaryllis.

Após os testes de padronização da metodologia de determinação da inibição da AChE no aparelho FLASHScan 53, avaliou-se o potencial inibitório dos extratos e alcalóides obtidos neste trabalho. As análises foram realizadas imediatamente após a adição dos reagentes na microplaca e a temperatura de 25 °C, usando a programação do aparelho e a metodologia descritas no item **4.10**.

**Quadro 4**: Extratos de Amaryllidaceae\* avaliados, por teste em microplaca, quanto ao seu poder inibitório contra AChE.

<sup>&</sup>lt;sup>70</sup> Ingkaninan, K.; Best, C. M.; van der Heiden, R.; Hofte, A. J. P.; Karabatak, B.; Irth, H.; Tjaden, U. R.; van der Greef, J.; Verpoorte, R. *Journal of Chromatography A*, **2000**, 872, 61-73.

<sup>&</sup>lt;sup>71</sup> López, S.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C. *Life Sciences*, **2002**, 71, 2521-2529.

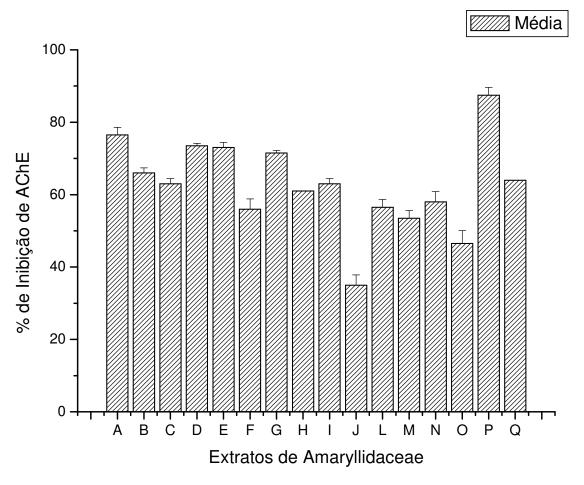
<sup>&</sup>lt;sup>72</sup> Markmee, S.; Ruchirawat, S.; Prachyawarakorn, V.; Ingkaninan, K.; Khorana, N. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2006**, 16, 2170–2172.

<sup>&</sup>lt;sup>73</sup> Ahamad, I.; Anis, I.; Malik, A.; Nawaz, S. A.; Choudhary, M. I. Chemical Pharmaceutical Bulletin, 2003, 51, 412-414.

Extratos de Amaryllidaceae	Representação do extrato
AcOEt II de Amacrinum	A
CHCl₃ II de Amacrinum	В
AcOEt II Ismene festalis	С
CHCl <sub>3</sub> II de <i>I. festalis</i>	D
AcOEt I de Amaryllis "sidney"	Е
CHCl₃ I de A. "sidney"	F
AcOEt II de A. "sidney"	G
CHCl <sub>3</sub> II de A. "sidney"	Н
AcOEt I de A. "desire"	1
CHCl <sub>3</sub> I de <i>A.</i> "desire"	J
AcOEt II de A. "desire"	L
CHCl₃ II de A. "desire"	M
AcOEt I de A. "belladonna"	N
CHCl <sub>3</sub> I de <i>A.</i> "belladonna"	0
AcOEt II de A. "belladonna"	Р
CHCl₃ II de A. "belladonna"	Q

<sup>\*</sup> concentração de 0,1mg/mL

A fisostigmina em concentração final 0,05 mM foi usada como controle, apresentando 98% inibição de AChE. Foram realizados no mínimo 2 experimentos para cada extrato, em duplicata, e o resultado é média de dois valores obtidos. Os resultados das avaliações do potencial inibitório dos extratos de Amaryllidaceae estão apresentados na forma de gráfico na **Figura 87**.



**Figura 87**. Gráficos de % de inibição de AChE pelos extratos de Amaryllidaceae em concentração de 0,1 mg/mL

Todos os extratos de Amaryllidaceae apresentaram valores de porcentagem acima de 50%, exceto os extratos CHCl<sub>3</sub> I de *A.* "desire" e *A.* "belladonna", 35 e 46% respectivamente. Os extratos CHCl<sub>3</sub> II de *Amacrinum* e *I. festalis*, que foram submetidos a purificações para o isolamento dos seus alcalóides, apresentaram 66 e 73% de inibição da reação enzimática. Os resultados dos extratos de *Amaryllis* que apresentaram os melhores resultados foram: AcOEt II de *A.* "sidney" (71%) e AcOEt II de *A.* "belladonna" (87%).

# 5.9. Teste de inibição de AChE em microplaca - Alcalóides de Amacrinum e Ismene festalis

Os alcalóides de Amacrinum 3, 5, 7, 8 e 9 e os alcalóides de I. festalis 10 e 11

foram submetidos ao teste de inibição de AChE em microplaca, usando a programação do aparelho e a metodologia descritas no item **3.10**, em concentrações que resultassem em inibição da reação enzimática entre 10 e 80%. Foram realizados no mínimo dois experimentos para cada alcalóide, em duplicata, e o resultado é média dos valores obtidos.

**Tabela 24**: IC<sub>50</sub> dos Alcalóides de *Amacrinum* avaliados, quanto ao seu poder inibitório contra AChE.

Alcalóides	IC <sub>50</sub> (mM) ± sd
3	$0,588 \pm 0,030$
5	0,168 ± 0,001
7	0,275 ± 0,019
8	3,04 ± 0,10
9	0,634 ± 0,001
10	1,23 ± 0,01
11	2,29 ± 0,15
fisostigmina	0,0038 ± 0,0003
galantamina	0,0054 ± 0,0004

A metodologia para determinação da inibição da AChE, baseada no método colorimétrico usando o reagente de Ellman, apresentou-se eficiente. Os resultados encontrados demonstraram que a fisostigmina apresenta-se ligeiramente mais potente que a galantamina, estes resultados são compatíveis com os encontrados por Ingkaninan e colaboradores<sup>71</sup>. Não será feito comparações entre os valores de IC<sub>50</sub> encontrados neste trabalho com os valores da literatura, que devem ser decorrentes das diferentes condições na qual foram realizados os experimentos.

A fisostigmina e a galantamina, clássicos inibidores da AChE, apresentaram IC<sub>50</sub> com valores bem baixos quando comparados aos alcalóides isolados do híbrido *Amacrinum* e de *I. festalis*, o que indica que os alcalóides isolados em neste trabalho e submetidos ao teste de inibição em microplaca apresentam baixo poder inibitório da AChE.

# 5.10. Estudo de interações alcalóides/AChE por RMN <sup>1</sup>H

Foi desenvolvido um trabalho em colaboração com o aluno de mestrado Lucas Gelain Martins orientado pela professora Doutora Anita J. Marsaioli do Instituto de Química da UNICAMP, no qual foram avaliadas as interações dos alcalóides fisostigmina, crinina (3) e ambelina (8) com a acetilcolinesterase utilizando técnicas de RMN, determinando  $K_{int}$  (constante de associação aparente) e epítopo de ligação dos mesmos com a proteína, utilizando para tanto RMN  $^1$ H – STD e medidas de T<sub>1sel</sub> (tempo de relaxação longitudinal seletivo).

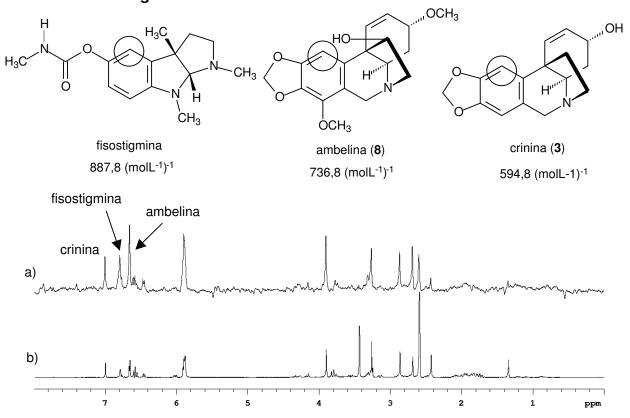
Figura 88. Estruturas dos alcalóides avaliados quanto as suas interações com AChE.

Utilizando-se a técnica de STD foram determinadas as interações entre os hidrogênios da fisostigmina com a acetilcolinesterase, sendo que o hidrogênio de maior interação é chamado de epítopo de ligação da fisostigmina com a proteína. Na **Figura 89** estão apresentados os valores observados de NOE e o epítopo normalizado de ligação do alcalóide com a acetilcolinesterase.

Figura 89. Epítopo de ligação da fisostigmina com AChE.

Os valores de  $K_{int}$  dos três alcalóides em relação à AChE também foram determinados. Inicialmente foi determinado o valor de  $K_{int}$  para a fisostigmina usando STD e em seguida determinou-se o  $K_{int}$  relativo da ambelina e crinina em relação ao

valor encontrado para a fisostigmina, em um experimento no qual os três alcalóides competiam pelo sítio ativo da AChE. Os valores de  $K_{int}$ , de cada um dos alcalóides encontram-se na **Figura 90**.



**Figura 90**. Espectro de RMN  $^1$ H – STD (499,88 MHz, tampão fosfato pH = 8,0, 1 mmolL $^1$ , D $_2$ O/DMSO, 25  $^{\circ}$ C e tempo de saturação = 2,05 s) para uma solução de AChE com crinina (3), ambelina (8) e fisostigmina. a) diferença entre os espectros "em ressonância" e "fora de ressonância"; b) experimento "fora de ressonância". Acima estão demonstradas as estruturas dos alcalóides, o hidrogênio utilizado para comparação e seus respectivos valores de  $K_{int}$  com AChE.

Os valores de  $K_{int}$  dos 3 alcalóides demonstram que a fisostigmina apresenta maior interação com o sítio ativo da AChE que os alcalóides  $\bf 3$  e  $\bf 8$ , como já era esperado devido ao seu alto poder inibitório contra a AChE, observado nos testes em microplaca.

### 6. CONCLUSÕES

Neste estudo realizou-se um estudo fitoquímico mais detalhado de duas espécies de Amaryllidaceae: *Amacrinum* e *Ismene festalis*, a primeira um híbrido *Amaryllis* x *Crinum* e a segunda pertencente ao gênero *Hymenocallis* e a análise por CG-EM de três variedades de *Amaryllis*: "sidney", "desire" e "belladonna".

O estudo fitoquímico de *Amacrinum* permitiu o isolamento de 9 alcalóides: beladina (1), *N*-desmetil-beladina (2), crinina (3), bufanidrina (4),1-*O*-acetil-licorina (5), 11-*O*-acetilambelina (6), undulatina (7), ambelina (8), bufanisina (9). A espécie *Ismene festalis* forneceu dois alcalóides tazetina (10) e haemantidina (11).

As análises por CG-EM do extrato CHCl<sub>3</sub> II de *Amacrinum* permitiu a obtenção de uma metodologia que apresentou uma boa separação dos alcalóides presentes no extrato, em um intervalo de tempo pequeno (20 min.). O uso desta metodologia para análise de extratos de Amaryllidaceae possibilitará um conhecimento prévio da composição química das espécies; direcionando o estudo para extratos que possuam alcalóides de interesse e/ou inéditos. Esta metodologia foi utilizada para o estudo de extratos das três variedades do gênero *Amaryllis*, ("sidney", "desire" e "belladonna") que também apresentaram uma boa resposta ao método. Nestas variedades de *Amaryllis* observou-se a presença de 5 alcalóides: montanina (12), hipeastrina (13), 1,2-diidroclidantina (14), licorina (15), e nerinina (16).

Nos testes qualitativos de inibição da enzima acetilcolinesterase, o extrato de CHCl<sub>3</sub> II de *Amacrinum* apresentou melhor visualização das manchas de inibição que o extrato de *Ismene festalis* e para os alcalóides puros as melhores visualizações foram observadas para bufanidrina (4), 1-*O*-acetil-licorina (5) e undulatina (7).

A padronização dos testes quantitativos para inibição da AChE no FLASHScan 530, utilizando o inibidor fisostigmina, permitiu montar um método que apresentasse os melhores resultados. Este foi utilizado para a análise dos extratos e dos alcalóides isolados, sendo que eles apresentaram altos valores de IC<sub>50</sub> quando comparados a fisostigmina e galantamina, portanto baixo poder inibitório.

Esta metodologia apresenta como principal vantagem a possibilidade de realizar análise de vários extratos, utilizando pequenas quantidades de amostras em tempo relativamente curto, possibilitando um conhecimento prévio das espécies que apresentem bons potenciais inibitórios de AChE.

O estudo das interações dos alcalóides fisostigmina, crinina (3) e ambelina (8) com acetilcolinesterase utilizando técnicas de RMN demonstrou que as principais interações ocorrem entre a enzima e os hidrogênios aromáticos dos alcalóides. Observou-se também que dos três alcalóides avaliados a fisostigmina apresenta o maior valor de  $K_{int}$ , justificando assim o seu maior poder inibitório.