

MANUEL HUMBERTO MERA LOPEZ

**POTENCIAL DE INIBIÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE FARMACÊUTICO POR
ESPÉCIES DE AMARYLLIDACEAE**

Brasília, 2018

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

MANUEL HUMBERTO MERA LOPEZ

**POTENCIAL DE INIBIÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE FARMACÊUTICO POR
ESPÉCIES DE AMARYLLIDACEAE**

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

Orientadora: Dâmaris Silveira

Brasília
2018

MANUEL HUMBERTO MERA LOPEZ

**POTENCIAL DE INIBIÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE FARMACÊUTICO POR
ESPÉCIES DE AMARYLLIDACEAE**

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

Aprovado em ____ de _____ de 2018.

BANCA EXAMINADORA

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

Dr.^a Paloma Michelle de Sales
Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal

Dr.^a Paula Monteiro de Souza
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Dr.^a Kicia Karinne Pereira Gomes
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

À professora Dâmaris Silveira pelo acolhimento no grupo de pesquisa, pela orientação, e carinho, minha gratidão pela infinita paciência e profissionalismo durante o desenvolvimento das etapas do trabalho, todos seus aportes fazem parte agora de minha vida pessoal e profissional.

À minha família, em especial aos meus pais Maria Edilma Lopez e Ivan Mera, meu irmão William Fernando Mera Lopez, minha avó Ana Lucia Agredo e minha tia Lucelly Lopez Agredo, por sempre estarem ao meu lado em todas as decisões e transmitirem todo seu apoio desde meu país.

Aos professores que fazem parte da família do Laboratório de Produtos Naturais da qual todos me fizeram parte: Pérola Magalhaes, Yris Fonseca, Maurício Homem de Mello e Luiz Alberto Simeoni por serem fundamentais com seu apoio e orientação.

Aos professores integrantes da banca examinadora, pela dedicação e tempo na avaliação deste projeto e por seus comentários contribuírem no enriquecimento da presente dissertação.

A Cristian Gasca Silva e João Vitor Dutra Gomes pela guia, apoio, conselhos, companhia e dedicação desde o dia da minha chegada ao Brasil, pelo sacrifício para a conclusão deste trabalho.

Ao imenso grupo de amigos do Laboratório de Produtos Naturais, principalmente Patrícia Marques, Júlia Müller, Diegue Enrique, Kicia Pereira, Marcela Freitas, Samuel Cardoso, Amanda Carneiro, e Yuri Yabu que com sua amizade fizeram mais fácil meu tempo no Brasil tanto dentro e fora do laboratório a melhor experiência da vida Obrigado pelo conhecimento transmitido.

A todos os amigos que me ensinaram a viver um pouco da cultura de diferentes partes do mundo, vivendo uma aventura diferente em cada saída: Rodrigo, Gilmar Dominici, Nicole Salleski, Laís Jovita, Fernanda Coutinho e Zita Lopes da Silva, e em especial a Geisa Brabalho quem desde a conheci sempre me inspirou com seu carinho por mim e sua filosofia de vida.

Aos estagiários que durante a minha permanência acompanharam e contribuíram de maneira significativa ao meu trabalho. Marcilhia Oliveira, Gabriela Gusmão e Johnatan Abreu que no caminho se tornaram meus amigos.

Aos meus compatriotas e amigos: Vanessa Bastidas, Elena Triana, Vianny Plaza, Maria Fernanda Gomez, Marco Fidel Mosquera. Pela companhia e apoio na distância que me brindaram a energia suficiente para cumprir este objetivo.

Ao Laboratório Industrial Brasileiro de Biologia e Síntese (Laboratório Libbs), que gentilmente cedeu a substância galantamina, necessária para este trabalho.

À CAPES que durante dois anos de estudo me respaldou com a bolsa de mestrado.

À FAPDF pelo suporte do projeto “Estudo de espécies de Amaryllidaceae para obtenção de bioprodutos úteis no combate a doenças crônico-degenerativas” segundo o edital FAP-DF 03/2015 - Demanda Espontânea”.

À Diretoria de Desenvolvimento Social - Assistência Estudantil, Moradia Universitária da UnB, por me permitir fazer parte dos programas, durante os quais tive a oportunidade de crescer como persona.

Ao administrador e moradores da casa do estudante da Pós-graduação, com os quais aprendi da riqueza cultural Brasileira, e por me ensinar da maneira mais fácil o português.

RESUMO

A contínua busca de novas substâncias químicas de origem natural, que sejam capazes de mediar processos biológicos específicos, se tornou uma grande preocupação científica nas últimas décadas, sobretudo no campo farmacológico destinadas ao tratamento alternativo de doenças que afetam os seres humanos. O Brasil detém 17% de toda a biodiversidade mundial e tal variedade se distribui ao longo de vários e vastos biomas, com características climáticas específicas e destacados pelas inúmeras espécies encontradas, e das quais se desconhecem as propriedades medicinais e, especificamente, seu potencial como reguladores enzimáticos.

Dessa forma, esse projeto de pesquisa teve por objetivo determinar a atividade de inibição enzimática de espécies da família Amaryllidaceae, coletadas em diferentes biomas brasileiros (Cerrado, Amazônia e Mata Atlântica), frente a enzimas de interesse farmacêutico como α -amilase, α -glicosidase, tirosinase e acetilcolinesterase.

Foram avaliados 42 extratos e frações de 8 espécies da família Amaryllidaceae: *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb., *Hippeastrum psittacinum* Herb., *Crinum* sp., *Hippeastrum* sp., *Hippeastrum goianum* (Ravenna), *Hippeastrum puniceum* (Lam.) Kuntze, *Habranthus irwinianus* (Ravenna), *Crinum erubescens* L.f. ex Aiton. Os extratos etanólicos de bulbos de *Hippeastrum psittacinum* Herb e *Crinum erubescens* L.f. ex Aiton apresentaram o maior potencial de inibição frente à enzima acetilcolinesterase com valores de IC₅₀ de 14,30 e 12,55 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A fração acetato de etila do extrato etanólico de flores da espécie *Hippeastrum goianum* Ravenna apresentou o melhor valor de IC₅₀ (36,31 $\mu\text{g/mL}$) frente à enzima tirosinase. A mesma fração também mostrou atividade relevante na inibição da enzima α -glicosidase (IC₅₀ = 42,82 $\mu\text{g/mL}$), o mesmo ocorrendo para a fração aquosa do extrato etanólico de *Habranthus irwinianus* (IC₅₀ = 31,97 $\mu\text{g/mL}$). Quanto à enzima α -amilase, o extrato etanólico de *Hippeastrum goianum* (HG-B-s) mostrou o melhor resultado (IC₅₀ = 53,6 $\mu\text{g/mL}$) dentre os extratos e frações avaliados.

Essa é primeira vez que *H. littoralis*, *H. irwinianus* e *C. erubescens* foram avaliados quanto à inibição de acetilcolinesterase. Da mesma forma esse é o primeiro relato da avaliação das espécies *C. erubescens*, *H. psittacinum*, *H. goianum*, *H. puniceum*, *H. littoralis*, *H. irwinianus* quanto à inibição de α -glicosidase, α -amilase e tirosinase.

Palavras-chave: Amaryllidaceae; α -amilase; α -glicosidase; tirosinase; acetilcolinesterase

ABSTRACT

The continuous search for new naturally occurring chemical substances, which are capable of mediating in specific biological processes has become a major scientific concern in the last decades, especially in the pharmacological area and is intended for the alternative treatment of diseases that affect humans. Brazil has 17% of all world biodiversity, and this variety has spread throughout several vast biomes, with specific climatic characteristics and highlighted by the countless species found, and of which the medicinal potential is unknown, specifically, their potential as enzymatic regulators.

The objective of this research project was to determine the enzymatic activity of plant species from Amaryllidaceae family, collected in different Brazilian biomes (Cerrado, Amazon and Mata Atlântica), against enzymes of pharmaceutical interest such as α -amylase, α -glycosidase, tyrosinase and acetylcholinesterase.

Forty-four extracts and fractions from 8 species of the family Amaryllidaceae were evaluated: *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb., *Hippeastrum psittacinum* Herb., *Crinum* sp., *Hippeastrum* sp., *Hippeastrum goianum* (Ravenna), *Hippeastrum puniceum* (Lam.) Kuntze, *Habranthus irwinianus* (Ravenna), *Crinum erubescens* Lf ex Aiton. The ethanolic extracts of *Hippeastrum psittacinum* Herb (bulbs) and *Crinum erubescens* L.f. ex Aiton (bulbs) showed the highest potential for inhibition against the enzyme acetylcholinesterase with IC₅₀ values of 14.30 and 12.55 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The ethyl acetate fraction of the ethanol extract of *Hippeastrum goianum* Ravenna (flower) presented the best value of IC₅₀ (36.31 $\mu\text{g/mL}$) against tyrosinase. The same fraction also showed significant activity in the inhibition on α -glycosidase (IC₅₀ = 42.82 $\mu\text{g/mL}$), as well as the aqueous fraction of the ethanolic extract *Habranthus irwinianus* (IC₅₀ = 31.97 $\mu\text{g/mL}$). In the α -amylase inhibition assay, the ethanol extract of *Hippeastrum goianum* (HG-B-s) showed the best result (IC₅₀ = 53.6 $\mu\text{g/mL}$) among the extracts and fractions evaluated. As far we know, it is the first time that *H. littoralis*, *H. irwinianus* and *C. erubescens* have been evaluated for inhibition of acetylcholinesterase. Similarly, it is the first report about the evaluation of *C. erubescens*, *H. psittacinum*, *H. goianum*, *H. puniceum*, *H. littoralis*, *H. irwinianus* for inhibition of α -glycosidase, α -amylase and tyrosinase.

Keywords: Amaryllidaceae; α -amylase; α -glycosidase; tyrosinase; acetylcholinesterase

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|-----------|
| Quadro 1. Algumas espécies de Amaryllidaceae, usos e princípios isolados..... | 23 |
| Quadro 2. Classificação estrutural dos alcaloides de Amaryllidaceae, de acordo com o tipo de arranjo heterocíclico, classificação adaptada de Ghosal et al., (1985) | 27 |
| Quadro 3. Espécies de Amaryllidaceae, objeto desse estudo..... | 52 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Alguns princípios ativos isolados de espécies de Amaryllidaceae | 24 |
| Figura 2. Alcaloides de Amaryllidaceae. | 26 |
| Figura 3. Alcaloides isolados de <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb..... | 29 |
| Figura 4. Diferentes compostos presentes em <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb | 31 |
| Figura 5. Compostos presentes em <i>Hippeastrum psittacinum</i> Herb | 36 |
| Figura 6. Diferentes compostos presentes em <i>Hippeastrum goianum</i> (Ravenna) ... | 38 |
| Figura 7. Compostos alcaloídicos identificados em <i>Hippeastrum puniceum</i> (Lam.) Kuntze | 39 |
| Figura 8. Compostos alcaloídicos identificados em <i>Crinum erubescens</i> L.f. ex Aiton | 41 |
| Figura 9. Estruturas químicas de inibidores das enzimas α -amilase e α -glicosidase | 45 |
| Figura 10. Estrutura ácido kójico inibidor da enzima tirosinase | 46 |
| Figura 11. Estrutura química de alguns inibidores da enzima acetilcolinesterase . | 48 |
| Figura 12. Esquema de obtenção de extratos e frações do material botânico | 54 |
| Figura 13. Representação da reação de oxidação por ácido 3,5-dinitrosalicílico ... | 57 |
| Figura 14. Representação da hidrólise enzimática de p -nitrofenil- α -D- glicopiranosídeo (p -NFPG) por ação de α -glicosidase (α -GLC) liberando as unidades de p -nitrofenolato e α -D-glicose..... | 59 |
| Figura 15. Possíveis estruturas de ressonância do íon p -nitrofenolato em meio básico | 59 |
| Figura 16. Via Biosintética da melanina, diferentes intermediários e produto de interesse: Dopacromo..... | 62 |
| Figura 17. Reações envolvidas na determinação da atividade da acetilcolinesterase in vitro | 64 |
| Figura 18. Cromatografia em camada delgada dos extratos etanólicos de Amaryllidaceae observada sob luz uv 365 | 69 |
| Figura 19. CCD de extratos etanólicos de Amaryllidaceae observada sob luz uv 365 nm após revelada com solução NP-PEG | 70 |
| Figura 20. CCD da amostra 8, rutina (R) e rutina com amostra (R+8)..... | 71 |

| | |
|--|----|
| Figura 21. Cromatografia em camada delgada dos extratos etanólicos de Amaryllidaceae..... | 71 |
| Figura 22. Resultado de avaliação identificação de triterpenos e esteroides em extratos etanólicos de Amaryllidaceae | 72 |
| Figura 23. Curva dose-resposta da acarbose no ensaio de inibição da α -amilase .. | 76 |
| Figura 24. Curva dose-resposta de inibição de α -amilase promovida por extratos etanólicos obtidos de bulbos de <i>Hymenocallis litorallis</i> , <i>Hippeastrum psittacinum</i> e <i>Habranthus irwinianus</i> | 77 |
| Figura 25. Curva dose-resposta de inibição de α -amilase promovida por extratos etanólicos obtidos de <i>Crinum</i> sp (bulbo), <i>Hippeastrum</i> sp (bulbo) e <i>Hippeastrum puniceum</i> (folha)..... | 77 |
| Figura 26. Curva dose-resposta de inibição de α -amilase promovida por fração aquosa obtida de <i>Crinum</i> sp (bulbo)..... | 77 |
| Figura 27. Curva dose-resposta de inibição de α -amilase promovida por fração acetato de etila obtida de bulbos de <i>Hymenocallis litorallis</i> , <i>Hippeastrum psittacinum</i> , <i>Habranthus irwinianus</i> , <i>Crinum</i> sp. e <i>Hippeastrum</i> sp. | 78 |
| Figura 28. Curva dose-resposta de inibição de α -amilase promovida por extratos etanólicos de <i>Hippeastrum goianum</i> | 78 |
| Figura 29. Curva dose-resposta de inibição de α -amilase promovida por frações em acetato de etila de <i>Hippeastrum goianum</i> ensaio α -amilase | 78 |
| Figura 30. Curva dose-resposta da desoxinojirimicina no ensaio de inibição da α -glicosidase..... | 82 |
| Figura 31. Curva dose-resposta para o ensaio de inibição da α -glicosidase dos extratos etanólicos de bulbos de <i>Habranthus irwinianus</i> , <i>Crinum</i> sp., e <i>Hippeastrum</i> sp..... | 82 |
| Figura 32. Curva dose-resposta para o ensaio de inibição da α -glicosidase da fração aquosa de bulbos de <i>Crinum</i> sp. | 83 |
| Figura 33. Curva dose-resposta para o ensaio de inibição da α -glicosidase das frações acetato de etila obtidas de bulbos de <i>Habranthus irwinianus</i> , talos (HGT) e flores (HGFI) de <i>Hippeastrum goianum</i> | 83 |
| Figura 34. Curva dose-resposta da inibição da atividade da tirosinase pelo ácido kójico | 86 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 35. Curva dose-resposta para o ensaio de inibição da tirosinase dos extratos etanólicos de bulbos de <i>Habranthus irwinianus</i>, <i>Crinum</i> sp., <i>Hippeastrum</i> sp., e <i>Hippeastrum goianum</i> (HGB-s)..... | 86 |
| Figura 36. Curva dose-resposta para o ensaio de inibição da tirosinase da fração acetato de etila de flores de <i>Hippeastrum goianum</i> (HGFI) | 87 |
| Figura 37. Curva dose-resposta da inibição da atividade da acetilcolinesterase por galantamina e fisostigmina. | 91 |
| Figura 38. Curva dose-resposta para o ensaio de inibição da acetilcolinesterase dos extratos etanólicos de <i>Crinum</i> sp. (bulbos), <i>Crinum erubescens</i> (bulbo e folha) <i>Hippeastrum</i> sp. (bulbo), e <i>Hippeastrum goianum</i> (HGB-s, bulbo)..... | 91 |
| Figura 39. Curva dose-resposta para o ensaio de inibição da acetilcolinesterase dos extratos etanólicos de <i>Hippeastrum goianum</i> (bulbos, talos flores e frutos) e <i>Hippeastrum puniceum</i> (bulbos) no ensaio acetilcolinesterase..... | 91 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----------|
| Tabela 1. Resultados das análises de umidade e rendimento de extração para cada espécie vegetal. | 67 |
| Tabela 2. Capacidade de inibição da α-amilase por extratos e frações de espécies de Amaryllidaceae | 74 |
| Tabela 3. Concentração de extratos e frações de espécies de Amaryllidaceae capazes de inibir 50% da atividade de α-amilase | 76 |
| Tabela 4. Capacidade inibição da α-glicosidase por extratos e frações de espécies de Amaryllidaceae | 79 |
| Tabela 5. Concentração de extratos e frações de espécies de Amaryllidaceae capaz de inibir 50% da atividade da α-glicosidase..... | 81 |
| Tabela 6. Capacidade inibição da tirosinase por extratos e frações de espécies de Amaryllidaceae | 84 |
| Tabela 7. Concentração de extratos e frações de espécies de Amaryllidaceae capaz de inibir 50% da atividade da tirosinase..... | 86 |
| Tabela 8. Capacidade inibição da acetilcolinesterase por extratos e frações de espécies de Amaryllidaceae..... | 89 |
| Tabela 9. Concentração de extratos etanólicos de espécies de Amaryllidaceae capaz de inibir 50% da atividade da acetilcolinesterase..... | 90 |
| Tabela 10. Resumo da atividade inibitória de extratos de espécies de Amaryllidaceae frente a enzimas de interesse farmacêutico..... | 92 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|---|
| AcOEt | Acetato de etila |
| ACh | Acetilcolina |
| AChE | Acetilcolinesterase |
| APA | Área de proteção ambiental |
| Aq | Aquoso |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| AMP ciclico | Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico |
| CCD | Cromatografia em camada delgada |
| CENARGEN | Centro de Recursos Genéticos e Biotecnologia |
| DA | Doença de Alzheimer |
| DMF | Dimetilformoamida |
| DPPH | Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNJ | Desoxinojirrimicina |
| DNS | Ácido dinitrosalicílico |
| DTNB | Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico |
| EMBRAPA | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária |
| EHex | Extrato hexânico |
| EEtOH | Extrato Etanólico |
| FAcOEt | Fração acetato de etila |
| FAq | Fração aquosa |
| FDA | Food and Drug Administration |
| HCl | Ácido Clorídrico |
| HIV | Vírus da imunodeficiência humana |
| FM | Fase móvel |
| I-ChE | Inibidores de Colinesterases |
| IC ₅₀ | Concentração capaz de inibir 50% a atividade máxima |
| L-Dopa | L-3,4-diidroxifenilalanina |
| MBC | Concentração bactericida mínima |
| MDA | Malondialdeído |
| MIC | Concentração mínima inibitória |
| OMS | Organização mundial da saúde |

| | |
|------------|---|
| SOD | Superóxido dismutase |
| Rf | Fator de retenção |
| U | Unidade enzimática |
| UB | Herbário da Universidade de Brasília |
| UV | Ultravioleta |
| PBS | phosphate buffered saline (Tampão fosfato-salino) |
| ρ NP | ρ -nitrofenol |
| ρ NPG | ρ -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 21 |
| 2.1 | PLANTAS DA FAMÍLIA AMARYLLIDACEAE..... | 21 |
| 2.2 | ESPÉCIES VEGETAIS SOB ESTUDO..... | 27 |
| 2.2.1 | <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. | 27 |
| 2.2.2 | <i>Hippeastrum psittacinum</i> Herb..... | 35 |
| 2.2.3 | <i>Hippeastrum goianum</i> (Ravenna)..... | 37 |
| 2.2.4 | <i>Hippeastrum puniceum</i> (Lam.) Kuntze..... | 38 |
| 2.2.5 | <i>Habranthus irwinianus</i> Ravenna..... | 39 |
| 2.2.6 | <i>Crinum erubescens</i> L.f. ex Aiton..... | 40 |
| 2.3 | Descrição geral das enzimas envolvidas | 42 |
| 2.3.1 | α -Amilase | 43 |
| 2.3.2 | α -Glicosidase | 44 |
| 2.3.3 | Tirosinase | 45 |
| 2.3.4 | Acetilcolinesterase..... | 47 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 49 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL | 49 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 49 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 50 |
| 4.1 | material botânico | 50 |
| 4.1.1 | Material botânico obtido na EMBRAPA CENARGEN (bulbos) | 50 |
| 4.1.2 | Material botânico coletado na área de Cerrado em Brasília e entorno | 51 |
| 4.2 | Determinação do teor de umidade do material botânico..... | 52 |
| 4.3 | Obtenção dos extratos | 52 |
| 4.4 | CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)..... | 53 |
| 4.4.1 | Fase estacionária..... | 53 |
| 4.4.2 | Preparo e aplicação da amostra | 53 |
| 4.4.3 | Sistemas de Eluição | 55 |
| 4.4.4 | Reveladores (WAGNER; BLADT, 1996) | 55 |
| 4.5 | DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA..... | 56 |
| 4.5.1 | Determinação da atividade de inibição sobre α -amilase..... | 56 |
| 4.5.2 | Determinação da atividade de inibição sobre α -glicosidase | 59 |
| 4.5.3 | Determinação da atividade de inibição sobre a tirosinase | 61 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.5.4 | Determinação da atividade de inibição sobre acetilcolinesterase..... | 63 |
| 4.5.5 | Determinação da porcentagem de inibição enzimática..... | 65 |
| 4.5.6 | Determinação dos valores de IC ₅₀ dos extratos vegetais e análise estatística | 66 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 67 |
| 5.1 | Rendimento da extração e teor de umidade | 67 |
| 5.2 | OBTENÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE EXTRATOS E FRAÇÕES UTILIZANDO CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) | 69 |
| 5.2.1 | Análise qualitativa de compostos fenólicos | 69 |
| 5.2.2 | Análise qualitativa de alcaloides | 71 |
| 5.2.3 | Análise qualitativa de metabólitos secundários por cromatografia em camada delgada..... | 72 |
| 5.3 | Verificação da atividade de inibição enzimática pelos extratos e frações das espécies de Amaryllidaceae. | 73 |
| 5.4 | Determinação da atividade de inibição sobre α -amilase..... | 73 |
| 5.5 | Determinação da atividade de inibição sobre α -glicosidase | 79 |
| 5.6 | Determinação da atividade de inibição sobre a enzima tirosinase | 84 |
| 5.7 | Determinação da atividade de inibição sobre acetilcolinesterase..... | 87 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 93 |

1 INTRODUÇÃO

No que concerne os aspectos biológico e ambiental, o Brasil é um país que reúne importantes e únicas características, tanto quanto ao número de espécies - muitas delas endêmicas - quanto seus biomas complexos e dinâmicos, com uma distribuição nas diferentes áreas do território, equivalente a 8,5 milhões de km². Os seis principais biomas a saber, Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal, abrangem diferentes Estados e regiões (COUTINHO, 2006). Destes, a Mata Atlântica, a Caatinga e o Cerrado possuem características específicas que não se repetem em outro lugar (LAW et al., 2016), correspondendo a cerca de 17 % da biota mundial (LEWINSOHN; PRADO, 2005).

A flora constitui uma reserva de diversidade biológica, na qual é possível destacar as inúmeras espécies botânicas. É uma riqueza que pode fazer do Brasil uma potência econômica, na qual o setor da indústria farmacêutica pode ser favorecido, pois há espécies vegetais endêmicas de grande interesse e com diferentes aplicações (RICARDO et al., 2017).

No Brasil, ainda existem espécies botânicas consideradas como medicinais, para as quais não existem relatos de estudos químicos e/ou farmacológicos que confirmem as propriedades associadas ao uso popular.

Assim, muitos estudos, nos últimos 200 anos, tiveram como base o conhecimento etnobotânico e etnomedicinal (SOBRAL STEHMANN, 1998). A reunião de estudos sobre a química, atividades biológicas e farmacológicas possibilitou a identificação de mecanismos de ação dos princípios ativos presentes em algumas espécies vegetais. Contudo, para a grande maioria das espécies encontradas no Brasil, pouco se sabe quanto ao potencial farmacológico (BREITBACH et al., 2013).

As plantas produzem uma série de metabólitos conhecidos como metabólitos primários e secundários. Os primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia, e são necessários para a manutenção da vida, enquanto que para os secundários, existem vias de síntese metabólica específicas para cada tipo de metabólito. Há estudos mostrando o papel desses metabólitos secundários em processos necessários para proteger e reagir aos estímulos externos à planta, tais como predadores, microrganismos, etc. (TOLEDO et al., 2011).

A identificação das características biológicas, assim como a composição química dos extratos das plantas, contribuem para a compreensão das vias metabólicas por meio das quais são sintetizados esse tipo de metabólitos (ARANTES; FERREIRA; COE, 2016).

Nas últimas quatro décadas, o interesse por produtos naturais tem aumentado, devido a diferentes agravos de saúde tais como o câncer, doenças neurodegenerativas, diabetes, entre outras (FERREIRA PIRES; PROTTI BUENO, 2015), considerados de alto impacto na saúde da população mundial e foco de preocupação das organizações de saúde em razão da sua prevalência. Fatores como as mudanças socioeconômicas e urbanísticas, a globalização e, mais importante, o envelhecimento da população as tornam ainda mais prevalentes. Assim, esforços científicos estão centrados na obtenção sustentável e racional de fármacos de origem natural (FERREIRA PIRES; PROTTI BUENO, 2015) capazes de agir de maneira seletiva na inibição de algumas enzimas associadas a doenças como diabetes, obesidade, hiperpigmentação da pele, Parkinson e Alzheimer.

A Diabetes é uma doença metabólica grave e crônica que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente (hormônio que regula a liberação de glicose), ou quando o corpo não é capaz de utilizar a insulina que é produzida (WHO, 2010). Em 2014, foi estimado que, ao nível mundial, 422 milhões de adultos viviam com diabetes. A mesma estimativa, em 1980, contabilizou 108 milhões de indivíduos. A prevalência global de diabetes quase dobrou desde 1980, passando de 4,7% para 8,5% na população adulta. Isso reflete um aumento nos fatores de risco associados, como excesso de peso ou obesidade. Diabetes causou 1,5 milhão de mortes em 2012 e quarenta e três por cento desses óbitos ocorreram antes dos 70 anos de idade (WHO, 2016).

A obesidade atingiu proporções epidêmicas globais com mais de 1 bilhão de adultos com excesso de peso. Destes, 300 milhões são considerados clinicamente obesos e este diagnóstico favorece a evolução de demais doenças, como doenças cardiovasculares e metabólicas. Muitas vezes, em países em desenvolvimento, a obesidade é uma condição complexa, com dimensões sociais e psicológicas graves, afetando praticamente todas as idades e grupos socioeconômicos. O aumento do consumo de alimentos mais pobres em nutrientes e com altos níveis de açúcar e gorduras saturadas, associado com a atividade física reduzida, aumentou a taxa de obesidade em três vezes desde 1980 (HAMANN, 2017)

A doença de Parkinson é uma desordem neurodegenerativa progressiva e crônica, associada à predisposição genética e caracterizada pela degradação das funções motoras

corporais, impedindo o desenvolvimento normal de atividades tais como caminhar, se comunicar e até respirar (WHO, 2006). Fisiologicamente, está associada a uma diversidade de fatores como o estresse oxidativo e aumento na concentração de dopamina, em tecidos do sistema nervoso central que apresentam um núcleo compacto formado por neurônios que contém melanina, além de outras regiões nervosas, provocando finalmente a degradação neuronal. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que a cada ano, se apresentam dentre 9,7 e 13,8 casos novos por cada 100.000 habitantes (ASANUMA; MIYAZAKI; OGAWA, 2003).

Outra doença que atinge a população idosa de maneira mais comum do que a população mais jovem é a Doença de Alzheimer (DA). A DA é a forma mais comum de demência (60-70% dos casos) e afeta cerca de 30 milhões de pessoas em todo o mundo. (ALZHEIMER'S ASSOCIATION REPORT:, 2017). É uma patologia cujas manifestações resultam na deterioração progressiva das funções cognitivas como a memória, orientação, atenção e linguagem, levando a estados de absoluta incapacidade e morte (DRACZKOWSKI et al., 2016). A neuropatologia da DA envolve o depósito progressivo de proteína β -amiloide no exterior dos neurônios e o acúmulo de proteína Tau no seu interior, com posterior formação e depósito de emaranhados neurofibrilares. Essas mudanças são eventualmente acompanhadas pelo dano e morte neuronal (ATANASOVA et al., 2015; DRACZKOWSKI et al., 2016).

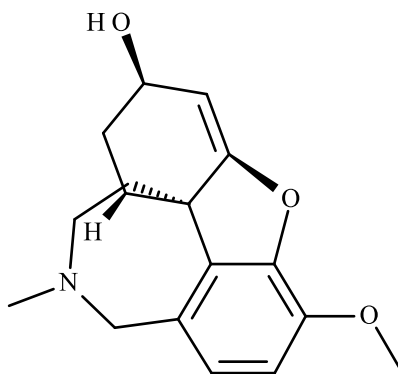
A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor dos sistemas nervosos central e periférico que desempenha um papel importante no que concerne a memória e cognição (GOMATHI; MANIAN, 2015; LI et al., 2016). De acordo com a hipótese colinérgica, a morte neuronal está relacionada com a diminuição nos níveis de ACh durante a neurotransmissão. Nesse processo, a enzima acetilcolinesterase (AChE) hidrolisa ACh em colina e acetato. Assim, a inibição da AChE é uma opção para melhorar as funções cognitivas em pacientes com DA (ATANASOVA et al., 2015; LI et al., 2016).

Os tratamentos farmacológicos para a DA dividem-se em dois tipos, a saber, aqueles que atuam aumentando os níveis de acetilcolina no cérebro; e aqueles direcionados à proteção dos neurônios, cujo objetivo é atrasar o curso da doença, por meio de substâncias que possam reduzir o estresse oxidativo, tais como vitamina E, selegilina, estrogênios, anti-inflamatórios não esteroidais, estatinas, entre outros (REYES ARAGÓN et al., 2012).

Os inibidores das colinesterases (I-ChE) são os principais fármacos para o tratamento específico da DA. Seu uso baseia-se no pressuposto déficit colinérgico que

ocorre na doença, e visa o aumento da disponibilidade sináptica de acetilcolina, por meio da inibição das suas principais enzimas catalíticas, a acetil- e a butirilcolinesterase. Os I-ChE têm efeito sintomático discreto sobre a cognição, melhorando a qualidade de vida destes pacientes (ORESTES V, 2005).

Dentre os fármacos inibidores da acetilcolinesterase disponíveis na terapêutica atual, pode ser citada a galantamina (*I*), que tem a capacidade de melhorar a cognição e a qualidade de vida do paciente (RODRÍGUEZ et al., 2012).



galantamina (*I*)

Galantamina (*I*) é um fármaco de origem natural, extraído de várias espécies da família Amaryllidaceae, tais como *Galanthus woronowii*, *Lycoris radiata* Grey, e diversas espécies dos gêneros *Narcissus*, *Hippeastrum*, *Urgenia*, *Hymenocallis*, *Lycoris*, *Galanthus*, *Zephyranthes*, *Amaryllis*, dentre outros (BERKOV et al., 2009). Esse alcaloide atua como inibidor da acetilcolinesterase (AChE). Apresenta ação longa, é seletiva, reversível e competitiva; e os efeitos terapêuticos permanecem mesmo após o término do tratamento (NEILL, 2012). A galantamina (*I*) atua ligando-se ao sítio ativo da AChE cerebral e estimula os receptores nicotínicos pré- e pós-sinápticos os quais podem, então, aumentar a liberação de neurotransmissores como ACh e glutamato, favorecendo diretamente a função neuronal (VIEGAS JUNIOR et al., 2004) e retardando a deposição da placa β -amiloide no cérebro (BHATTACHARYA; MAELICKE; MONTAG, 2015).

Além da galantamina (*I*), outros diversos alcaloides de esqueleto característico são encontrados em espécies da família Amaryllidaceae, das quais várias podem ser encontradas no Cerrado e, muitas delas, no Distrito Federal e Entorno. O banco de dados Flora do Brasil (AMARYLLIDACEAE IN FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO, 2017) apresenta 18 espécies nativas encontradas no Cerrado do Centro-

Oeste, das quais 9 são endêmicas. Um levantamento de Amaryllidaceae ocorrentes no Distrito Federal mostrou a presença de 4 espécies do gênero *Hippeastrum*: *H. glaucens*, *H. goianum*, *H. puniceum* e *H. psittacinum* (AMARAL, 2007). *Hippeastrum psittacinum* tem como habitat a Mata Atlântica (AMARYLLIDACEAE IN FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO, 2017). Contudo, parece ter sido introduzida no Cerrado do Centro-Oeste, o que pode explicar a presença dessa espécie no Distrito Federal e entorno.

Assim, considerando a importância da família Amaryllidaceae para a terapêutica, a busca de espécies brasileiras que possam, potencialmente, ser úteis como fonte de fármacos já conhecidos ou para a obtenção de novos fármacos, deve ser estimulada,

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PLANTAS DA FAMÍLIA AMARYLLIDACEAE

A família Amaryllidaceae é subdividida em quatro subfamílias: Amaryllidoideae, Agavoideae, Hypoxidoideae e Campynematoideae e compreende 50 gêneros e 850 espécies (AMARAL-LOPES; CAVALCANTI, 2015). São consideradas plantas cosmopolitas e capazes de sobreviver e colonizar diferentes biomas (ERNST et al., 2016). A distribuição é muito ampla, ocorrendo em regiões tropicais e subtropicais, tais como América, sul da África e mediterrâneo da Europa. Contudo, alguns casos isolados podem ser localizados em climas variáveis como o norte da Espanha, da qual o *Narcissus longispathus* Pugsley é uma espécie representativa (BAÑARES et al., 2010).

No continente americano, estas plantas estão distribuídas nas regiões compreendidas entre o México e os países da região andina, além da Argentina e do Brasil (HURRELL, 2007; MUÑOZ et al., 2011; ROITMAN et al., 2007; RØNSTED et al., 2012) apresentando, aproximadamente, 30 gêneros (SEBBEN, 2005), com uma marcada diversidade biológica, adaptada a diversas características ambientais desde chuvas abundantes a temporadas extremamente secas (SEBBEN, 2005).

No Brasil, são encontrados 15 gêneros e 150 espécies, cujas características taxonômicas foram estabelecidas, em sua grande maioria, pelo naturalista Subert, entre 1842 a 1847 (ALVES ARAÚJO; ASSIS RIBEIRO SANTOS; MARCCUS, 2007), e descritas na Flora Brasiliensis, compêndio botânico publicado em 1847 (PHILIPP VON MARTIUS; EICHLER; URBAN, 1847). Dentre os gêneros mais conhecidos estão

Worsleya (W. Watson ex Traub) Traub, *Griffinia* Kergawler, *Tocantinia* Rav, e *Cearanthes* Rav., todos endêmicos do Brasil (ALVES ARAÚJO; ASSIS RIBEIRO SANTOS; MARCCUS, 2007; GIORDANI et al., 2012; HOFMANN JR et al., 2004; MAZA, 2008; RAYMÚNDEZ et al., 2008).

Espécies de Amaryllidaceae geralmente apresentam característica bulbosa e raramente possuem rizoma. Os frutos são cápsulas que guardam um número irregular de sementes, que morfológicamente se apresentam como pequenos globos irregulares e aplanados com cores variando de marrom a preto. Têm folhas alongadas, laminadas e tipicamente lanceoladas; quase sempre a inflorescência é dupla, com flores de seis pétalas chamativas pelas cores que apresentam, o que torna as espécies de Amaryllidaceae úteis para fins ornamentais (AMARAL-LOPES; CAVALCANTI, 2015).

Algumas espécies podem exalar diversos odores, por exemplo *Crinum procerum* Carey (BRAGA; GARÓFALO, 2003), conferindo um valor econômico importante às plantas dessa espécie, devido ao potencial uso em perfumaria (ALVES ARAÚJO, 2007). Além disso, algumas partes das plantas têm sido utilizadas ao longo do tempo por diferentes culturas para fins medicinais, desde a cura da febre (CHHABRA; UISO, 1990), como laxante, purgante, expectorante e relaxante muscular (ALI et al., 1987), até em tratamentos para regular a fertilidade (KERHARO, 1971), despertando o interesse da comunidade científica (SEBBEN, 2005) (Quadro 1).

Estudos ocorridos a partir da segunda metade do século XX mostraram que, em alguns casos, algumas plantas realmente possuíam estas atividades. Adicionalmente, foi possível estabelecer cientificamente as bases químicas responsáveis pelas atividades observadas, conhecidas como metabólitos secundários característicos desta família (GIORDANI et al., 2012). As estruturas químicas de alguns dos alcaloides isolados de espécies de Amaryllidaceae estão descritas no Quadro 1 e as estruturas químicas são representadas na Figura 1.

Quadro 1. Algumas espécies de Amaryllidaceae, usos e princípios isolados.

| Espécie | Usos | Princípios isolados |
|-------------------------------------|--|---|
| <i>Clivia miniata</i> Regel. | Tratamento de mordeduras de serpente ou na diminuição da febre (ALI et al., 1983) | clonidina (2) |
| <i>Crinum pratense</i> Herb | Na medicina tradicional indiana, extratos dos bulbos são utilizados como tônicos amargos, laxantes e dor na área do peito (GHOSAL et al., 1981) | 1,2-diacetillicorina (3), licorina (4), ambelina (5), anidrolicorin-7-ona (6), hippadina (7), pratorinina (8), narcissidina (9) |
| <i>Haemanthus kalbreyeri</i> Baker. | Extratos de raiz, bulbo e flor são usados na medicina popular no tratamento de resfriado comum, tosse, asma e cicatrização de feridas (GHOSAL et al., 1985) | fenantridina (10), kalbretorina (11), kalbreclasina (12) |
| <i>Zephyranthes rosea</i> | Na região dos Himalaias, extratos de folhas e bulbos são reconhecidos em termos médicos modernos como imuno- moduladores (GHOSAL; ASHUTOSH; RAZDAN, 1985) | (+)-epimaritidina (13), maritidina (14), crinamina (15), hemantamina (16) |
| <i>Crinum zeylanicum</i> L. | Na medicina tradicional do Sri Lanka, os bulbos são usados como rubifacente no reumatismo. O suco obtido das folhas é aplicado para diminuir a dor de ouvido (TSUDA; KASHIWABA; KUMAR, 1984) | licorina (4), hamayna (17), 3-acetilhamayna (18), 6-hidroxicrinamina (19), 6-metoxicrinamina (20) |

(*número*) Numeração continua dos metabolitos encontrados em plantas das espécies de Amaryllidaceae

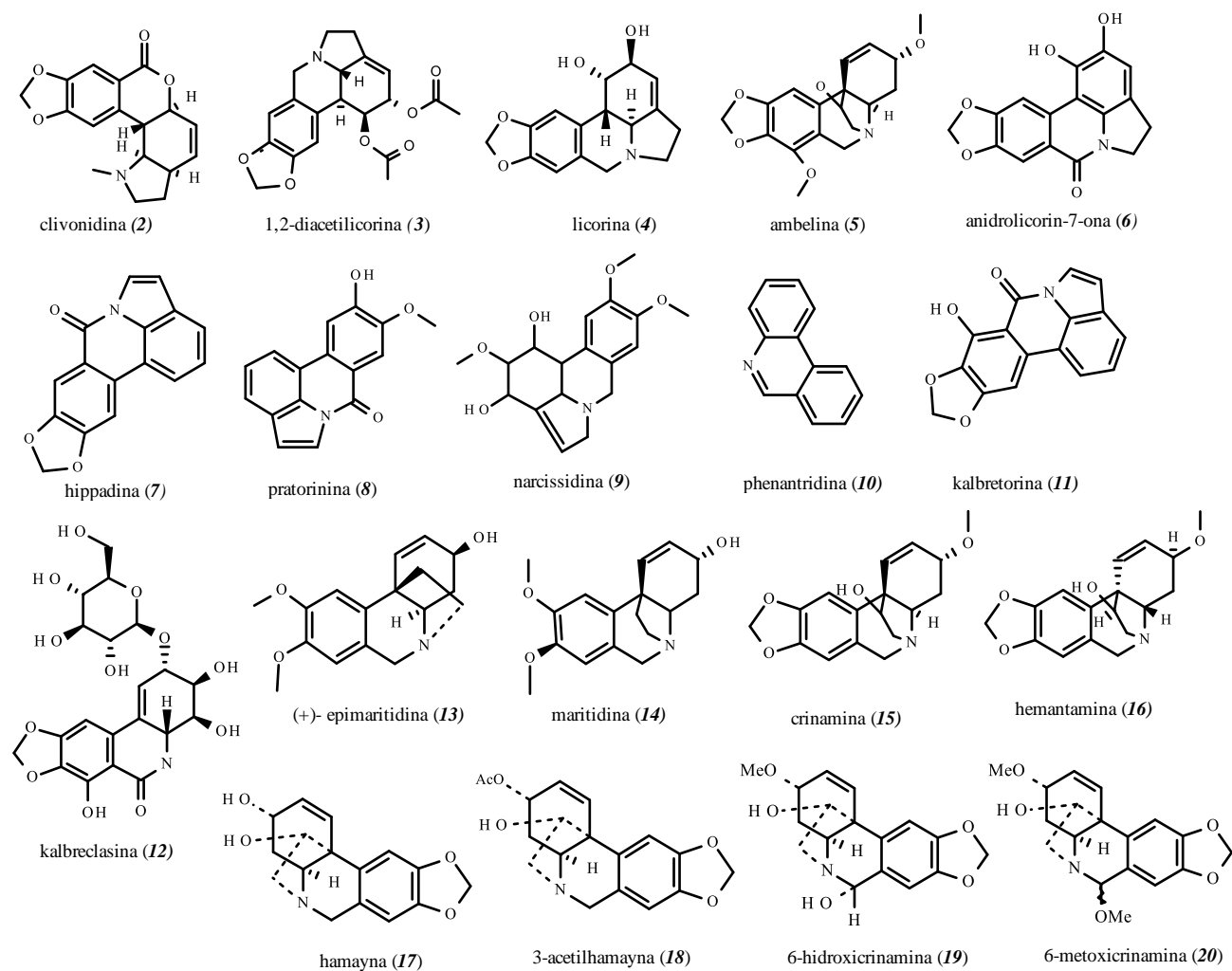


Figura 1. Alguns princípios ativos isolados de espécies de Amaryllidaceae

Conhecidos como “Alcaloides de Amaryllidaceae”, essas substâncias apresentam características estruturais únicas em um padrão C6-C1-N-C2-C6. O nitrogênio pode ser secundário, terciário ou quaternário; o número de átomos de carbono varia de 16 a 20, dependendo dos substituintes no sistema aromático (BOIT; MEHLIS, 1961; CODINA et al., 1990). Os alcaloides de Amaryllidaceae são considerados bases moderadamente fracas, com pKa 6-9.

Esses alcaloides foram considerados inicialmente como os compostos marcadores para plantas desta família. Ainda, a esses compostos, foram atribuídas as atividades biológicas dessas plantas. Contudo, embora a grande maioria dos estudos afirmem que estes alcaloides são restritos a espécies de Amaryllidaceae, foram encontrados metabólitos deste tipo em outras famílias, por exemplo, crinamina (**15**) foi isolada de *Dioscorea dregeana* (Kunth) Dur. & Schinz (KAYA et al., 2004; MULHOLLAND et al., 2002), uma espécie da família Dioscoreaceae.

Esse grupo de alcaloides tem sua base biossintética em dois aminoácidos: tirosina e fenilalanina. Classicamente, foram agrupados de acordo com o tipo de rota metabólica, e especificamente, ao acoplamento fenol-oxidativo (Quadro 2), sendo a norbeladina (**21**) o precursor em comum desses alcaloides (FUSTER, 1994). Nove tipos de núcleos estruturais básicos foram estabelecidos para estes compostos a saber: norbeladina (**21**), galantamina (**1**), licorina (**4**), hemantamina (**16**), homolicorina (**22**), crinina (**23**), tazetina (**24**), narciclasina (**25**) e montanina (**26**) (Figura 2). Outros compostos alcaloídicos, com estruturas químicas que diferem dos já descritos, foram agrupados separadamente e alguns autores os reconhecem como “pequenos grupos” ou “estruturas minoritárias” (DING et al., 2017).

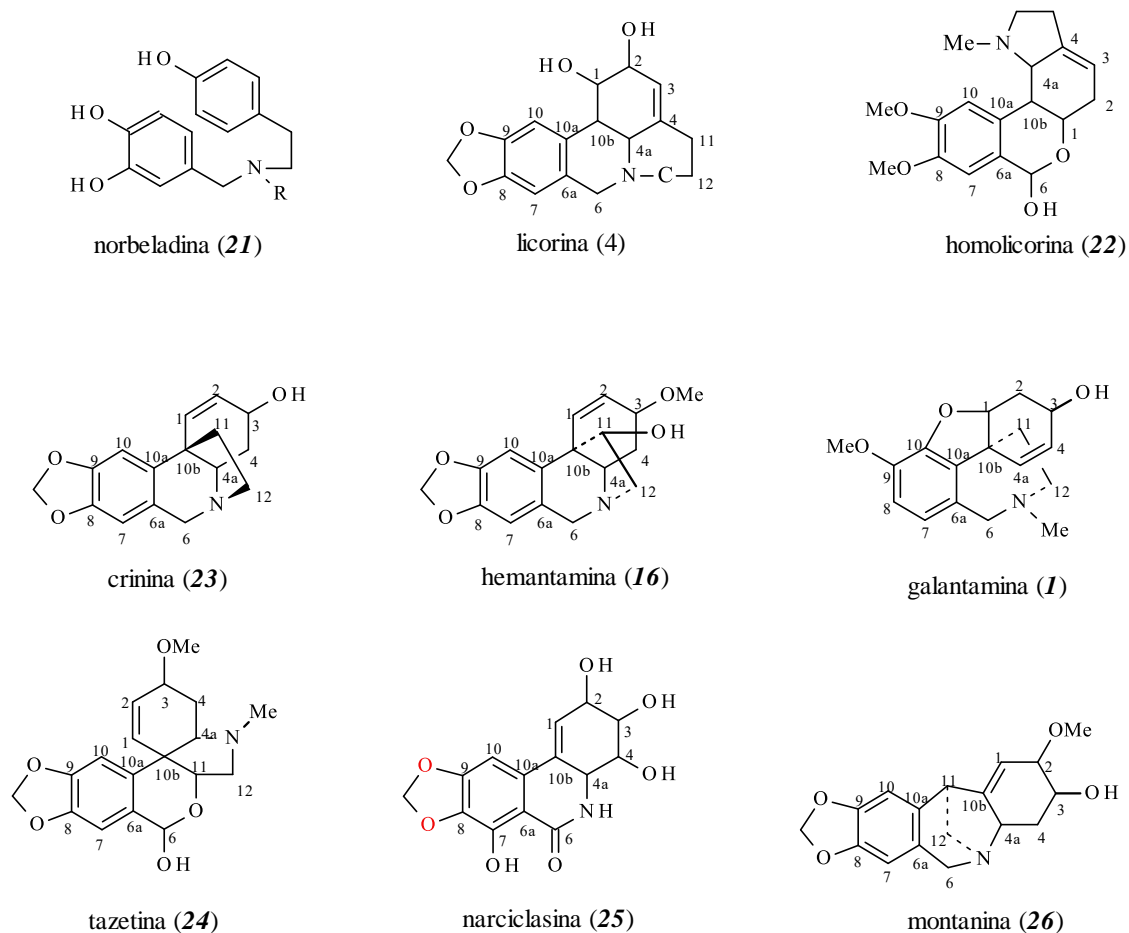


Figura 2. Alcaloides de Amaryllidaceae.

As estruturas *1,3,21-28* apresentam o sistema de numeração proposto por Ghosal et al (1985) (GHOSAL; KULWANT S; SUSHMA, 1985)

A numeração do sistema cíclico foi proposta por Ghosal et al (1985) (Figura 2) em função da rota biossintética de origem (GHOSAL; UNNIKRISHNAN; SINGH, 1989). Outra forma de classificação tem como base a numeração do sistema heterocíclico (GHOSAL; KULWANT S; SUSHMA, 1985), conforme apresentado no Quadro 2.

Desde 1877, com o isolamento da licorina (*4*) de *Narcissus pseudonarcissus* L (CAO; YANG; ZHOU, 2013), até o momento, foram caracterizados quimicamente aproximadamente 357 alcaloides associados à família Amaryllidaceae (DING et al., 2017).

Quadro 2. Classificação estrutural dos alcaloides de Amaryllidaceae, de acordo com o tipo de arranjo heterocíclico, classificação adaptada de Ghosal et al., (1985)

| Grupo estrutural | Tipo | Acoplamento |
|----------------------------|-------------------|-----------------|
| N-benzil-N-fenetilamina | norbeladina (21) | Sem acoplamento |
| pirrolofenantridina | licorina (4) | orto-para' |
| 2-benzopirano[3,4-g] indol | homolicorina (22) | orto-para' |
| 5,10b-etanofenantridina | crinina (23) | para-para' |
| | hemantamina (16) | |
| dibenzofurano | galantamina (1) | para-orto' |
| 2-benzopirano[3,4-c] indol | tazetina (24) | para-para' |
| fenantridina | narciclasina (25) | para-para' |
| 5,11-metanomorfantridina | montanina (26) | para-para' |

2.2 ESPÉCIES VEGETAIS SOB ESTUDO

A ampla distribuição de Amaryllidaceae nos diferentes biomas do Brasil, e os diversos relatos dos usos medicinais para plantas dessa família, geraram um grande interesse científico quanto ao seu potencial para obtenção de novos fármacos (NAIR; VAN STADEN, 2013). Nesse sentido, para esse trabalho foram escolhidas as espécies descritas a seguir.

2.2.1 *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb.

Pertencente ao gênero *Hymenocallis*, conhecida comumente como o lírio aranha, é uma espécie que possui 37 sinônimos reconhecidos, dos quais os mais importantes são *Hymenocallis panamensis* Lindl., *Pancratium americanum* Mill., *Pancratium littorale* Jacq (ROSLI et al., 2014). É uma espécie não endêmica no Brasil (ALVES ARAÚJO, 2007).

É uma planta herbácea, podendo ser aquática ou terrestre. Ocorre em solos associados aos domínios fitogeográficos Amazônia, Caatinga e Mata Atlântica, e floresce entre os meses de novembro e dezembro (DUTILH et al., 2017). Uma das características dessa espécie são as flores, que apresentam pétalas de cor branca, com uma base esverdeada. Apresenta paraperigônio (falsa corola) reduzido a apêndices setiformes eretos, pareados e flanqueando os filetes na base da porção livre pelas folhas filiformes.

Bulbo subterrâneo (ALVES-ARAÚJO, 2007). É utilizada popularmente como antitumoral (CAAMAL-FUENTES et al., 2011), emético (capaz de induzir vômito) e cicatrizante (ZHONG, 2009). As flores são utilizadas para clareamento de sardas e manchas cutâneas (RAMADOSS et al., 2016). Na América Central, as folhas e raízes são utilizadas em casos de mordedura de cobras como *Bothrops* spp. A vítima mastiga a raiz como parte dos primeiros socorros, devido a seus efeitos imunoestimulante, anti-inflamatório e sedativo (GIOVANNINI; HOWES, 2017).

O teor de compostos fenólicos totais em extratos metanólicos de *H. littoralis* mostrou variação em ordem ascendente: raiz <folhas <haste <bulbo <flor <antera, enquanto o teor de flavonoides totais nos mesmos extratos apresentou um ordem crescente na concentração: bulbo <raiz <folhas <flor <haste <antera (SUNDARASEKAR et al., 2013). Em diferentes análises fitoquímicas, foi possível identificar uma série de alcaloides com os quais foi estabelecido o perfil característico de *H. littoralis*. Da fração alcaloídica do extrato etanólico de bulbos *H. littoralis* cultivados no Egito foram isolados 13 alcaloides, a saber: licorina (**4**), hemantamina (**16**), homolicorina (**22**), tazetina (**24**), pretazetina (**27**), macronina (**28**), licorenina (**29**), O-metillicorenina (**30**), hippeastrina (**31**), licoramina (**32**), desmetilmaritidina (**33**), vittatina (**34**), 5,6-diidrobicolorina (**35**), littoralina (**36**) (LIN et al., 1995). Também foram isolados 11-hidroxivittatina (**37**), e (+)-8-O-desmetilmaritidina (**38**) (ABOU-DONIA et al., 2008) . Esses compostos são apresentados na Figura 3.

A partir de extratos em clorofórmio de partes epígeas de *H. littoralis* foram isolados os alcaloides galantamina (**1**), licorina (**4**), tazetina (**24**), hippeastrina (**31**), trisphaeridina (**39**), pancratina (**40**), hemantidina (**41**). Galantamina (**1**), licorina (**4**), tazetina (**24**), hippeastrina (**31**), trisphaeridina (**39**) e pancratina (**40**) também foram isolados dos bulbos e raízes (DABIRE; MURAV, 1982).

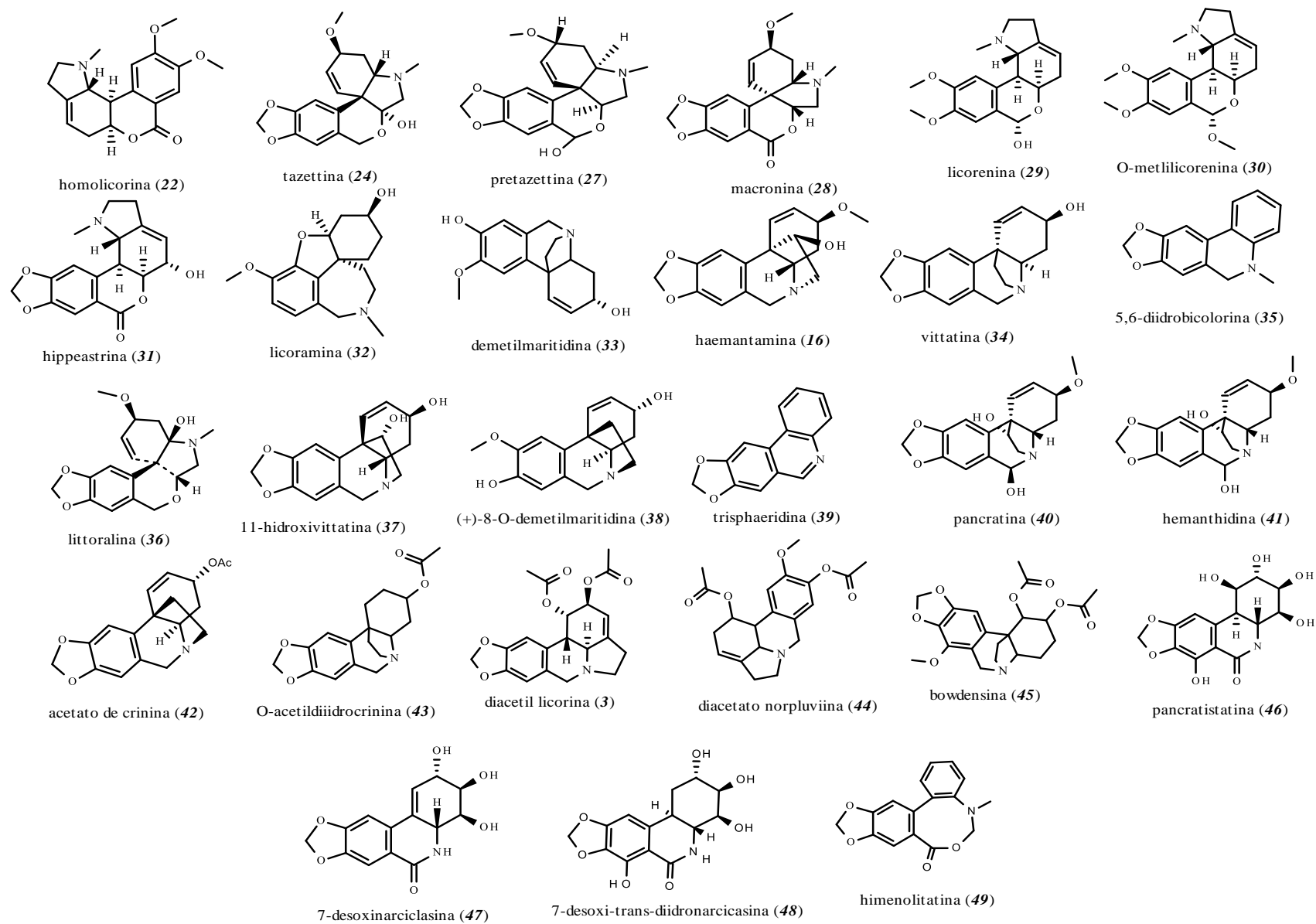


Figura 3. Alcaloides aislados de *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb.

De bulbos de *H. littoralis* cultivados em Nanning, China, cinco alcaloides foram isolados e identificados: diacetillicorina (**3**), acetato de crinina (**42**), O-acetildiidrocrinina (**43**), diacetato de norpluviina (**44**) e bowdensina (**45**). O conteúdo de licorina encontrado foi superior a 2,3 % (LUO et al., 2004). Do extrato diclorometanólico foram extraídos tazetina (**24**), pancratistatina (**46**), além de traços de narciclasina (**25**), 7-desoxinarciclasina (**47**) e 7-desoxi-trans-diidronarciclasina (**48**) (PETTIT et al., 1995), além de trisphaeridina (**39**) e himenolitatina (**49**) (CHEN et al., 2016). De bulbos extraídos com uma mistura CH₂Cl₂ e MeOH (1:1) e fracionados com n-butanol, foi possível identificar licorina (**4**), 5,6-diidrobicolorina (**35**) e 7-desoxi-trans-diidronarciclasina (**48**) (JI et al., 2013).

De *H. littoralis* coletada no Vietnam, foram isolados os seguintes compostos 5,7-diidroxi-6,8-dimetoxi-2-metil-4H-cromen-4-ona (**50**), 5,7-diidroxi-6-metoxi-2-metil-4H-cromen-4-ona (pisonina B) (**51**), 5,7-diidroxi-2-metil-4H-cromen-4-ona (noreugenina) (**52**), 5-hidroxi-7-metoxi-2-metil-4H-cromen-4-ona (eugenina) (**53**), (2S)-7,4'-diidroxiflavana (**54**), 3',7-diidroxi-4'-metoxi-8-metilflavana (**55**), 3',7-diidroxi-4'-metoxiflavana (**56**) e 6,8-dimetil-5,7,4'-triidroxiflavanona (farrerol) (**57**) (ANH; DUONG; HOANG, 2014). Esses compostos são apresentados na Figura 4.

Das flores dessa espécie foram isolados os flavonoides quercetina 3'-O-glicosídeo (**58**) e rutina (**59**), além de um óleo obtido do extrato éter de petróleo, no qual foram identificados como componentes citronelal (**60**), linoleato de metila (**61**), ácido palmítico (**62**), tricosano (**63**) e pentacosano (**64**) (ABOU-DONIA et al., 2008). Ainda, uma lignana, secoisolariciresinol (**65**), foi isolada de bulbos dessa espécie (LIN et al., 1995) (Figura 4)

Extratos, frações e substâncias isoladas de *H. littoralis* foram avaliados quanto a possíveis atividades biológicas, tais como:

Atividade citotóxica e antitumoral. Camal-Fuentes et al. (2011) avaliaram extratos metanólicos de 21 espécies vegetais, dentre as quais *H. littoralis* (bulbos), quanto à citotoxicidade frente a linhagens celulares de câncer de pulmão (A549, ATCC-CCL-185), câncer de útero (HeLa, ATCC-CCL-2), câncer de laringe (Hep-2, ATCC-CCL-23), câncer de nasofaringe (KB, ATCC-CCL-17), câncer de mama (MCF-7, ATCC-HTB-22), câncer de próstata (PC-3, ATCC-CRL-1435), câncer de colo do útero (SiHa, ATCC-HTB-35) e uma linha celular de rim embrionário de células humanas (HEK-293, ATCC-CRL-1573). *Hymenocallis littoralis* mostrou atividade citotóxica frente as cepas HEK-293 (103 µg/mL), KB (34,4 µg/mL) e SiHa (33,1 µg/mL) (CAAMAL-FUENTES et al., 2011). Contudo, o extrato dos bulbos de *H. littoralis*, neste ensaio, apresentou baixa atividade citotóxica e baixa seletividade (SI ≈ 3) para as linhagens celulares SiHa e KB.

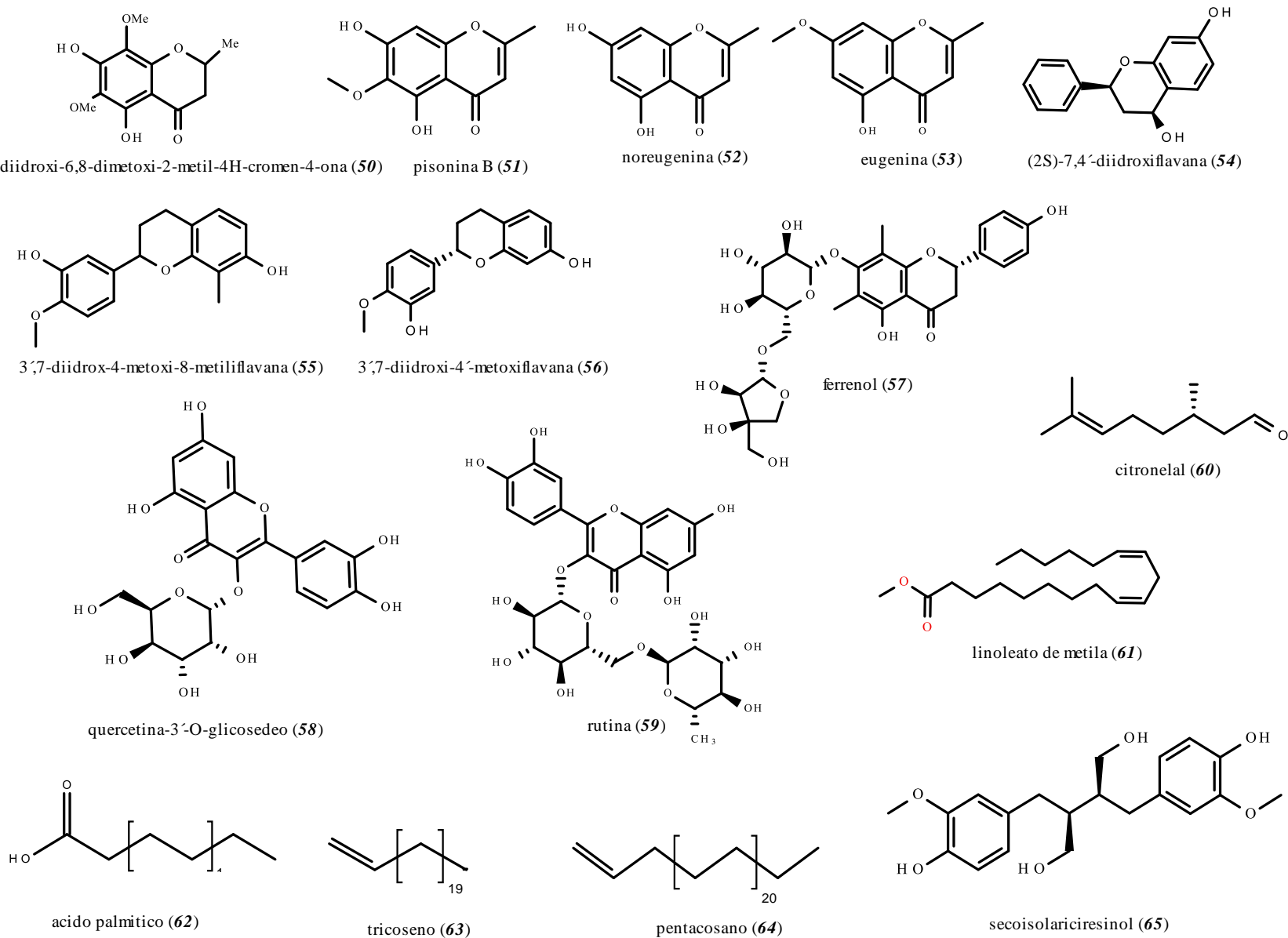


Figura 4. Diferentes compostos presentes em *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb

A fração alcaloídica do extrato n-butanólico de bulbos foi avaliada quanto à atividade citotóxica, utilizando uma série de linhagens celulares de câncer de fígado humano (HepG2), câncer gástrico humano (SGC-7901), câncer de mama humana (MCF-7) e linhagem celular endotelial de veia umbilical humana (EVC-304). A linhagem HepG-2 foi mais sensível à fração alcaloídica, na concentração de 0,8 µg/mL, que inibiu significativamente a proliferação. A célula EVC-304, no entanto, não foi aparentemente afetada (JI et al., 2014).

Para determinar se o efeito indutor de apoptose da pancratistatina (**46**) era seletivo para células tumorais, as células mononucleares do sangue periférico (PBMC), isoladas a partir de amostras de sangue de voluntários saudáveis (n = 8), foram tratadas com pancratistatina 1 µM. Os resultados mostraram que esse composto é seletivamente tóxico para células, independentemente do tipo de leucemia, com um efeito insignificante nas PBMC não tumorais. Pancratistatina (**46**) também mostrou uma forte atividade antiviral, anticancerígena *ex vivo* em células de pacientes com leucemia. Também mostrou atividade protetora para células normais, promovendo a circulação do sangue, com atividade antioxidante (GRIFFIN et al., 2010).

Os alcaloides licorina (**4**) e hemantamina (**16**), isolados de bulbo de *H. littoralis*, mostraram atividade citotóxica *in vitro* expressa como (ED₅₀, g/mL), frente as linhagens celulares câncer de mama humano [BCA-1 ED₅₀ **4** (0,4), **16** (0,7)]; fibrosarcoma humano [HT-1080 ED₅₀ **4** (0,5) -0,3]; câncer de pulmão humano [LUC-1 ED₅₀ **4** (1,6), **16** (3,6)]; câncer de colon humano [COL-2 ED₅₀ **4** (0,4), **16** (0,6)]; carcinoma epidérmico oral humano [KB ED₅₀ **4** (0,4), **16** (0,7)]; KB resistente a vinblastina [KB-V ED₅₀ **4** (0,7), **16** (1,3)]; neoplasia murina linfóide [P-388 ED₅₀ **4**(0,3), **16** (5,0)]; carcinoma epidérmico humano [A-431 ED₅₀ **4** (0,4), **16** (1,3)]; câncer de próstata humano dependente de hormônios [LNCaP ED₅₀ **4** (0,7), **16** (0,6)]; câncer de mama humano dependente de hormônio [ZR-75-1 ED₅₀ **4** (0,2), **16** (0,5)]; e glioblastoma humano [U-373 ED₅₀ **4** (>20), **16** (3,5)] (LIN et al., 1995). Também foram avaliadas a capacidade de inibição da transcriptase reversa HIV-1 e antimalárica sem resultados promissores (LIN et al., 1995).

Himenolitatina (**49**), isolado do extrato diclorometanólico de bulbos, mostrou atividade citotóxica nas linhagens celulares HepG-2, linhagem de células de colo humano (LoVo), câncer cervical (Hela) e câncer pulmonar de humano (A549), com CI₅₀ igual a 75,19; 69,81; 96,37 e 102,53 µM, respectivamente (CHEN et al., 2016).

Pancratistatina (**47**), isolado de bulbos de *H. littoralis*, foi avaliado em linhagens celulares diferentes: mostrou ser muito eficaz frente as células da linhagem P-388

(leucemia linfocítica murina) (ED_{50} 0,01 $\mu\text{g} / \text{ml}$), Pancratistatina (47) também inibiu o crescimento da linhagem celular (M-5076) sarcoma de ovário murino *in vivo* entre 53-84% nas concentrações de 0.38- 3.0 mg/kg (PETTIT et al., 1993).

Atividade antimicrobiana. Os extratos metanólicos de dezenove espécies encontradas na Malásia, dentre as quais, *H. littoralis*, foram avaliados quanto à atividade contra *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. Os extratos metanólicos de flores, bulbos, caule e raízes de *H. littoralis*, na concentração de 5 mg/disco, não foram capazes de inibir o crescimento dos microrganismos (ABDULLAH; RAUS; JAMAL, 2012) . Contudo, em outro estudo, o extrato de folhas, obtido com uma mistura MeOH: CHCl_3 (3:1), mostrou atividade antibacteriana, com uma concentração inibitória mínima (MIC) de 6,25 mg/mL (ROSLI et al., 2014).

Bulbos, caules, folhas e flores de *H. littoralis* foram extraídos utilizando diferentes solventes (etanol, metanol, clorofórmio, diclorometano, e acetato de etila). Os extratos foram avaliados pelo método de difusão em disco contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Candida albicans*. Tanto os extratos de talo de *H. littoralis* quanto os extratos de raízes, folhas e bulbos foram ativos contra *Escherichia coli* seguido de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans* com halos de 24 mm, 21 mm, 18 mm, 17 mm e 17 mm, respectivamente. (SINGH; SAXENA; SINGH, 2016).

O extrato preparado em éter de petróleo de *H. littoralis* mostrou atividade contra *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo) e *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativo), mas nenhuma atividade contra *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Os valores correspondentes do MIC e da concentração bactericida mínima (MBC) foram 15,6 e 62,5 mg/mL (*S. aureus*) e 250 e 500 mg/mL (*P. aeruginosa*). Dimetilformamida (DMF) e ampicilina em discos comerciais (1 $\mu\text{g}/\text{disco}$) foram utilizados no ensaio como controle negativo e positivo, respectivamente (ABOU-DONIA et al., 2008).

Em outro estudo, extratos preparados em metanol a partir de folhas, caule, bulbo, antera, flor e raiz de *H. littoralis* mostraram atividade contra *Candida*. Os extratos da planta causaram inibição em todas as amostras testadas. Os extratos de flor e de antera foram efetivos a concentrações de 6,3 mg/mL (SUNDARASEKAR; SAHGAL; SUBRAMANIAM, 2012).

Atividade antioxidante. Quatro extratos hidroalcoólicos de flores de *H. littoralis* foram avaliados *in vitro*, pelo método que envolve o sequestro do radical hidroxila em solução de p-nitrosodimetilanilina (p-NDA). Os extratos mostraram uma potente atividade

antioxidante nas concentrações de 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL e 80 µg/mL, com atividade equivalente àquela apresentada por ácido ascórbico nas mesmas concentrações (ANUSHA et al., 2016).

A atividade antioxidante de extratos metanólicos dos bulbos, antera, flor, caule, folhas e raiz de *H. littoralis* foi avaliada pelos métodos poder de redução do ferro (FRAP) e 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH). Os extratos de flor e de antera mostraram valores IC₅₀ pelo método FRAP de 555,12 µmol/g Fe²⁺ e 568,09 µmol/g Fe²⁺, respectivamente. Pelo método DPPH foram obtidos os seguintes valores de IC₅₀: flor, 1,29 mg/mL; caule, 1,33 mg/mL; e antera, 0,31 mg/mL (SUNDARASEKAR et al., 2013).

Outras atividades. O extrato etanólico de flores de *H. littoralis* foi avaliado quanto à atividade anti-inflamatória por dois métodos: método de estabilização de membrana, utilizando hemácias humanas (HRBC), e pelo ensaio anti-inflamatório Phagoburst, método colorimétrico baseado na ativação das citoquinas por estresse oxidativo; neste caso, avaliado em células macrófagos Raw 264.7, e comparado com diclofenaco de sódio.

O extrato etanólico de folhas mostrou atividade de estabilização de membrana de 83,46 % e 84,72 % nas concentrações de 100 e 500 µg/mL, respectivamente, enquanto o diclofenaco, nas mesmas concentrações, estabilizou a membrana celular na ordem de 86,54 % e 95,67 %, respectivamente. Quanto à lise celular, o extrato etanólico das flores, nas mesmas concentrações (100 e 500 µg/mL), promoveu 45 % e 68 % de lise celular, respectivamente, enquanto o diclofenaco, nas mesmas concentrações, promoveu a lise em 61 % e 87 % das células tratadas (RAMADOSS et al., 2016).

A atividade inseticida de: raízes, bulbos, folhas, flores e frutos de *H. littoralis*, sob a forma de pó, foi avaliada frente a uma espécie de gafanhoto *Schistocerca gregaria* (Forsk.), com alto impacto na agricultura. As folhas de uma espécie de repolho foram tratadas com o pó. Em seguida, as folhas submetidas ao tratamento foram utilizadas para alimentar esses gafanhotos na fase juvenil, sexualmente imaturos. Todas as partes da planta atuaram como inibidores da alimentação do gafanhoto em 100%; exceto as folhas, que mostraram 95% de proteção. A parte da planta mais efetiva foi a flor, que inibiu completamente o gafanhoto indicando uma maior concentração de compostos ativos. A propriedade inibidora da planta foi associada ao seu teor de alcaloides (SINGH; PANT, 1980).

Diidrolisorina (67) apresentou efeito protetor contra isquemia do miocárdio, induzida por isoproterenol, em camundongos. Esse alcaloide foi capaz de prolongar a taxa de sobrevivência dos indivíduos no teste de hipóxia em câmara normobárica. Foi

monitorado o aumento da superóxido dismutase (SOD) total e redução dos níveis de malondialdeído (MDA) no miocárdio. Também foi possível identificar a redução na atividade da lactatodesidrogenase e da creatinoquinase séricas (JIANG; YU; GONG, 2006).

Pancratistatina (**46**), apresentou atividade antiviral, aumentando em 100% a sobrevivência, quando foi usado para tratar camundongos infectados com encefalite japonesa. Além disso, mostrou atividade contra os flavivírus febre amarela e dengue; e contra os bunyavírus Punta Toro e febre do Vale do Rift (JIANG; YU; GONG, 2006). Litoralina (**36**), isolada de extratos de *H. litorallis* apresentou atividade inibitória da transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (LIN et al., 1995).

2.2.2 *Hippeastrum psittacinum* Herb.

Pertencente ao gênero *Hippeastrum*, possui 5 sinônimos conhecidos: *Aschamia psittacina* (Ker Gawl.) Salisb., *Hippeastrum decoratum* Lem., *Amaryllis psittacina* Ker Gawl., *Trisacarpis psittacina* (Ker Gawl.) Raf., *Amaryllis psittacina* var. *decorata* (Lem.) Traub & Uphof (ALVES ARAÚJO, 2007). É uma planta herbácea, podendo ser rupícola ou terrestre. Ocorre em solos associados ao domínio fitogeográfico da Mata Atlântica (frequente nas regiões de Minas Gerais, São Paulo e Paraná) (ALVES ARAÚJO, 2007), florescendo principalmente entre os meses de junho e julho (HENRIETTE; DUTILH, 2005).

As folhas são senescentes, de forma alongada, com bordas paralelas afiadas no ápice. As flores apresentam-se alaranjadas a rosadas, creme-esverdeadas no centro. O bulbo pode se encontrar parcialmente exposto ou subterrâneo (HENRIETTE; DUTILH, 2005).

Hippeastrum psittacinum é uma espécie nativa do Brasil (SCARANO et al., 2001), conhecida como cebola branca, alho bravo, alho do mato e açucena do campo e utilizada como remédio para tosse e como afrodisíaco (ALBUQUERQUE et al., 2007; PENG, 2016; YAZBEK et al., 2016). Apesar de ser citada como medicinal, poucos são os estudos referentes à composição química ou sobre atividade biológica dessa espécie.

Andrade et al (2016) analisaram extratos etanólicos de espécies do gênero *Hippeastrum psittacinum* por CG-EM e identificaram, nos bulbos, os alcaloides galantamina (**1**), uma mistura de tazetina (**24**) e pretazetina (**27**), pretazetina (**27**), trisphaeridina (**39**), hippeastrina (**31**), 3-epimacronina (**68**), tazetamida (**69**), ismina (**70**) e galantindol (**71**), conforme mostrado na Figura 5. No extrato de folhas foi possível

identificar os mesmos alcaloides, além de 8-O-desmetilhomolicorina (**72**) (ANDRADE et al., 2016).

O extrato etanólico de bulbos de *H. psittacinum* mostrou a presença dos alcaloides montanina (**26**), pretazetina (**27**) e hippeastrina (**31**) (PAGLIOSA et al., 2010).

Quanto aos testes de atividade biológica, os extratos dessa espécie somente foram avaliados como a seguir:

Inibição enzimática. O extrato etanólico de bulbos de *H. psittacinum* apresentou atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), pelo método de autobiografia, avaliação qualitativa em cromatografia em camada delgada (CCD) (GIORDANI et al., 2008)

Os alcaloides montanina (**26**), pretazetina (**27**) e hippeastrina (**31**), isolados de bulbos de *H. psittacinum* foram testados *ex vivo* quanto à capacidade de inibição de acetilcolinesterase, utilizando tecido do hipocampo de ratos. Montanina (**26**) mostrou capacidade de inibição enzimática dose-dependente. Apresentou inibição acima de 50% na concentração de 1 mM e 30-45% na faixa de concentração entre 500 μ M e 100 μ M (PAGLIOSA et al., 2010).

Atividade antioxidante. O extrato etanólico de bulbos de *H. psittacinum* na concentração de 10 mg/mL, mostrou atividade antioxidante pelo método antioxidante do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), a qual resultou equivalente uma concentração de rutina de 1 mg/mL (GIORDANI et al., 2008).

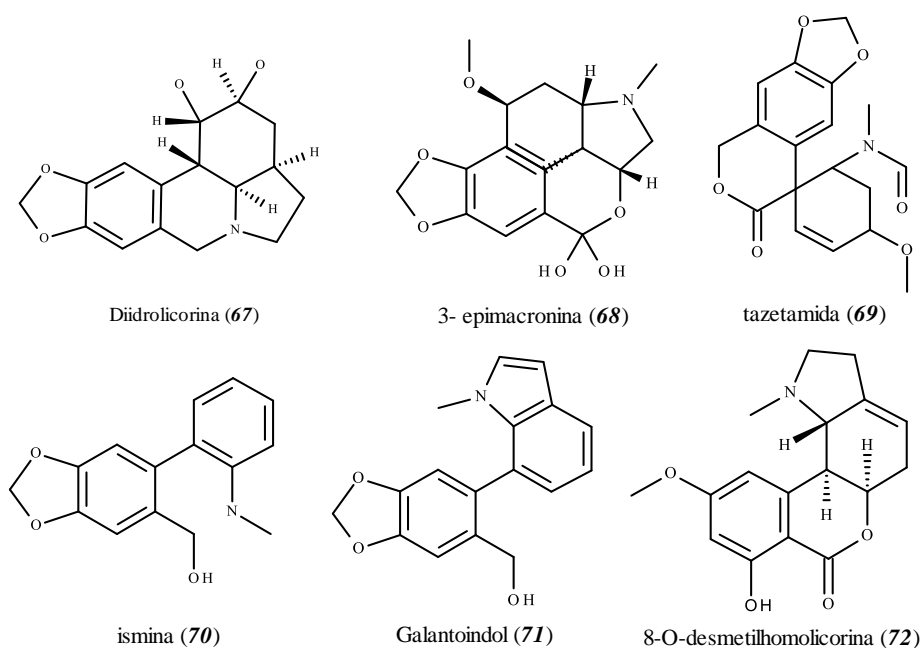


Figura 5. Compostos presentes em *Hippeastrum psittacinum* Herb

2.2.3 *Hippeastrum goianum* (Ravenna).

Essa espécie é endêmica do Brasil, e sua distribuição geográfica está associada ao Centro-Oeste ocorrendo especificamente no Estado de Goiás e no Distrito Federal (FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. AMARYLLIDACEAE., 2017). Possui 2 sinônimos reconhecidos: *Amaryllis goiana* Ravenna e *Crinum stapfianum* Kraenzl (FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. AMARYLLIDACEAE., 2017; H. A DUTILH, 2005). É uma planta herbácea, terrestre, ocorrente em solos associados ao domínio fitogeográfico do Cerrado, que floresce entre os meses de julho e dezembro (H. A DUTILH, 2005).

O bulbo é subterrâneo (H. A DUTILH, 2005). Produz escalpos florais com duas grandes flores com cores que variam de laranja a vermelho e uma banda central de cor creme ou verde na base (OLIVEIRA, 2012).

Do extrato metanólico de bulbos de *H goianum* foram obtidos 5 alcaloides: licorina (4), 7-desoxi-trans-diidronarciclasina (48), pseudolicorina (73), 8-desmetoxi-10-O-metillhostasina (74) e 9-O-desmetil-licoramina (75) (Figura 6) (VERDAN et al., 2017).

Os estudos químicos e de atividades biológicas são escassos para essa espécie. Contudo, sugerem que *H. goianum* pode ser uma espécie interessante para estudos farmacológicos.

Atividade antiparasitária. A fração alcaloídica do extrato metanólico de bulbos de *H goianum* foi testada quanto à atividade frente a *Acanthamoeba castellanii* (MARESSA, 2017), espécie responsável por encefalites, ceratites e sepse (TURNER et al., 2000). *Hippeastrum goianum* foi capaz de inibir 56% a viabilidade dos organismo no estágio adulto de *A. castellanii*, *in vitro*, enquanto clorexidina, utilizada como controle positivo, foi capaz de inibir 86% (MARESSA, 2017).

Atividade citotóxica. O alcaloide 7-desoxi-trans-diidronarciclasina (48) foi avaliado quanto à citotoxicidade sobre as linhagens celulares HCT-116 (carcinoma colo retal), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), MM-200 (melanoma) e RPE (pigmento epitelial da retina) e apresentou IC₅₀ igual a 0,15 mM sobre HCT-116 e 0,54 mM sobre MM200 (VERDAN et al., 2017).

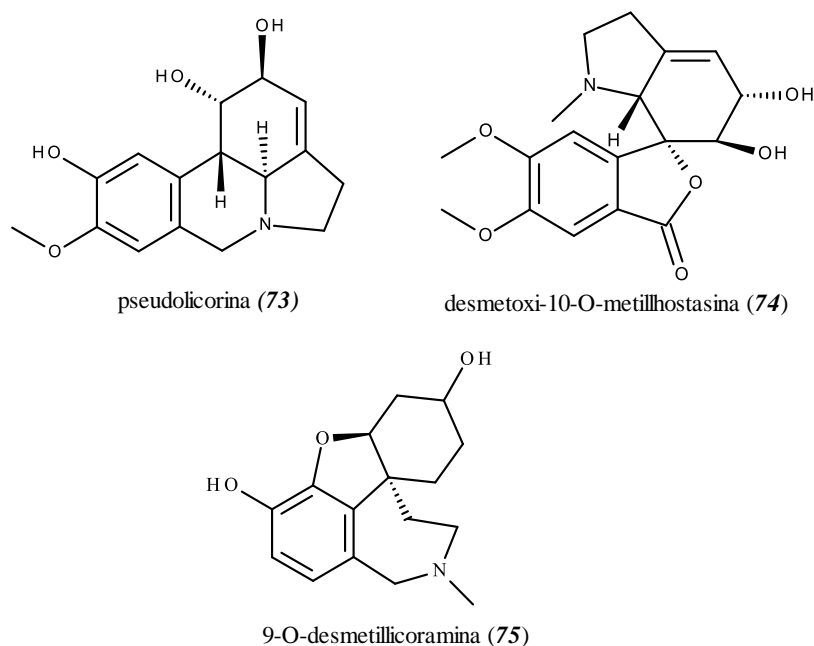


Figura 6. Diferentes compostos presentes em *Hippeastrum goianum* (Ravenna)

2.2.4 *Hippeastrum puniceum* (Lam.) Kuntze

Essa espécie é nativa no Brasil e possui 52 sinônimos conhecidos, sendo mais conhecido como *Amaryllis punicea* Lam. (AMARYLLIDACEAE IN FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO, 2017). É uma planta herbácea, podendo ser rupícola ou terrestre. Ocorre em solos associados aos domínios fitogeográficos Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal, e floresce entre os meses de novembro e dezembro (AMARYLLIDACEAE IN FLORA DO BRASIL 2020, EM CONSTRUÇÃO, 2017).

As flores apresentam pétalas de cor laranja com base de cor verde, paraperigônio (falsa corola) com forma de campana, reduzido a apêndices em forma de cerdas eretos, pareados e flanqueando os filetes na base da porção livre pelas folhas filiformes. O bulbo é subterrâneo (ALVES ARAÚJO, 2007). No Brasil, as raízes são utilizadas, pelas índias Kayapó, para promover a fertilidade (YAZBEK et al., 2016).

No extrato metanólico de bulbos de *H. puniceum* foram identificados 11 alcaloides: galantamina (1), licorina (4), tazetina (24), licoramina (32), 8-desmetilmaritidina (33), pseudolicorina (73), 9-O-desmetillicoramina (75), assoanina (76), kirkina (77), pancratinina (78), 11-hidroxivitatina (79), e 2 α -hidroxihomolicorina (80) (Figura 7) (CARLESSO SOPRANI, 2011).

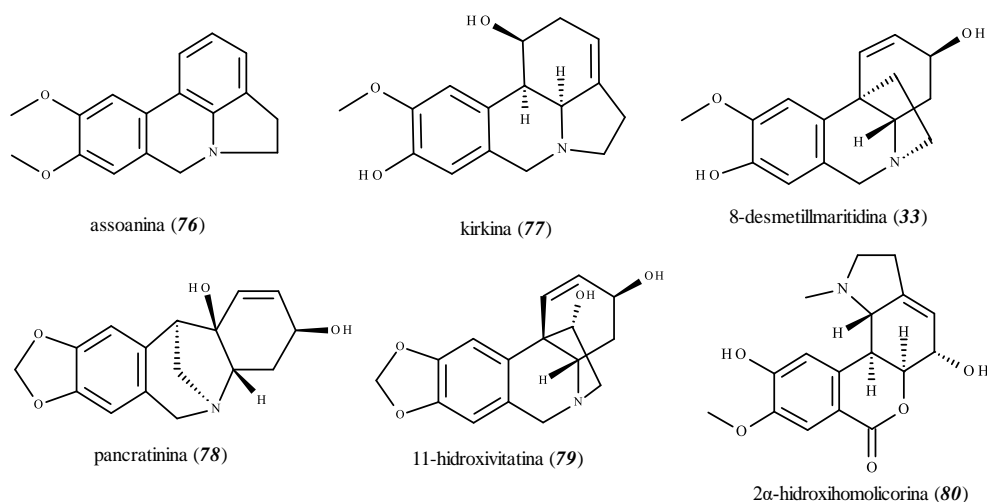


Figura 7. Compostos alcalóidicos identificados em *Hippeastrum puniceum* (Lam.) Kuntze

Atividade antiparasitária e citotóxica. A fração alcaloídica do extrato metanólico de bulbos de *H. puniceum* foi testada quanto à atividade antiparasitária utilizando *Acanthamoeba castellanii* (MARESSA, 2017), responsável por encefalites, ceratites e sepsis (TURNER et al., 2000). Os resultados mostraram que o extrato de *H. puniceum* foi capaz de inibir 31% a viabilidade dos organismos na etapa adulta de *A. castellanii*, *in vitro*, enquanto clorexidina, antisséptico utilizado como controle positivo, foi capaz de inibir 86% (MARESSA, 2017). A mesma amostra de extrato foi avaliada quanto à citotoxicidade, utilizando a linhagem celular MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney* - células de rim canino), que, após 48 horas, apresentou viabilidade celular acima de 50% (MARESSA, 2017).

Inibição enzimática. Em um estudo, desenvolvido por Cortes et al (2015), foi determinado o potencial inibitório frente a enzima acetilcolinesterase. O extrato metanólico de bulbos de *H. puniceum* mostrou $IC_{50} = 25,73 \mu\text{g/mL}$ (CORTES et al., 2015a).

Outras atividades. Foi analisada a ação neuroprotetora do extrato metanólico de bulbos em neurônios das linhagens celulares DIV6 e DIV7. Contudo os extratos de *H. puniceum*, testados na concentração de $2,9 \mu\text{g/mL}$, se mostraram citotóxicos nos dois tipos de células (CORTES et al., 2015b).

2.2.5 *Habranthus irwinianus* Ravenna

Pertencente ao gênero *Habranthus*, é sinônimo de *Habranthus duarteanus* Ravenna. É uma espécie endêmica do Brasil, com distribuição marcada na região Sudeste

e ocorrência característica no Estado de Minas Gerais, nas regiões na Serra da Canastra e Serra de Ibitipoca (FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. AMARYLLIDACEAE., 2017). É uma planta herbácea, terrestre, e ocorre em campos rupestres com areia branca associados ao domínio fitogeográfico Cerrado. Floresce entre os meses de agosto e outubro (AMARAL, 2011).

Apresenta flores com pétalas de cor rosa ou lilás, paraperigônio reduzido a apêndices alongados eretos, pareados e flanqueando os filetes na base da porção livre pelas folhas filiformes (AMARAL-LOPES; CAVALCANTI, 2015b; MARQUES, 2015).

Não foram encontrados relatos científicos ou informações relacionadas a química ou atividade biológica dessa espécie durante a execução desse trabalho.

2.2.6 *Crinum erubescens* L.f. ex Aiton

Pertencente ao gênero *Crinum*, popularmente conhecido como açucena-da-água, *C. erubescens* possui larga distribuição no território brasileiro.

É uma planta herbácea, terrestre, encontrado especialmente nas regiões litorâneas, locais brejosos, beira de rios e no Pantanal. Os meses de floração da espécie são fevereiro, junho, julho e dezembro (HENRIETTE; DUTILH, 2005) Para tal espécie há 30 sinonímias reconhecidas e três são consideradas não legítimas.

Apresenta flores brancas a levemente rosadas, paraperigônio reduzido a apêndices setiformes eretos, pareados e flanqueando os filetes vermelhos na base da porção livre pelas folhas filiformes reconhecidas pelo perfume que liberam (BRAGA; GARÓFALO, 2003).

Do extrato etanólico de frutos e bulbos de *C. erubescens* foram isolados os alcaloides hemantamina (**16**), macronina (**28**), bowdensina (**45**), bufanidrina (**81**), 3 α -tazetina (**82**), (+) *N*-desmetilcarboetoxi-macronina (**83**), e *N*-desmetil-macronina (**84**) (Figura 8) (THI NGOC TRAM et al., 2002).

A partir do extrato metanólico de folhas frescas foram isolados e caracterizados os seguintes alcaloides: crinamina (**15**), macronina (**28**), trisphaeridina (**39**), bowdensina (**45**), ismina (**70**), 1-epidesmetil-bowdensina (**85**) e desidroanidrolícorina (**86**) (Figura 8) (BRAGA; GARÓFALO, 2003).

Outros compostos isolados a partir de extratos etanólicos e hexânicos foram cripowelina A e C (**87** e **88**), cripowelina B e D (**89** e **90**) e hippadina (**91**) (PRESLEY et al., 2016).

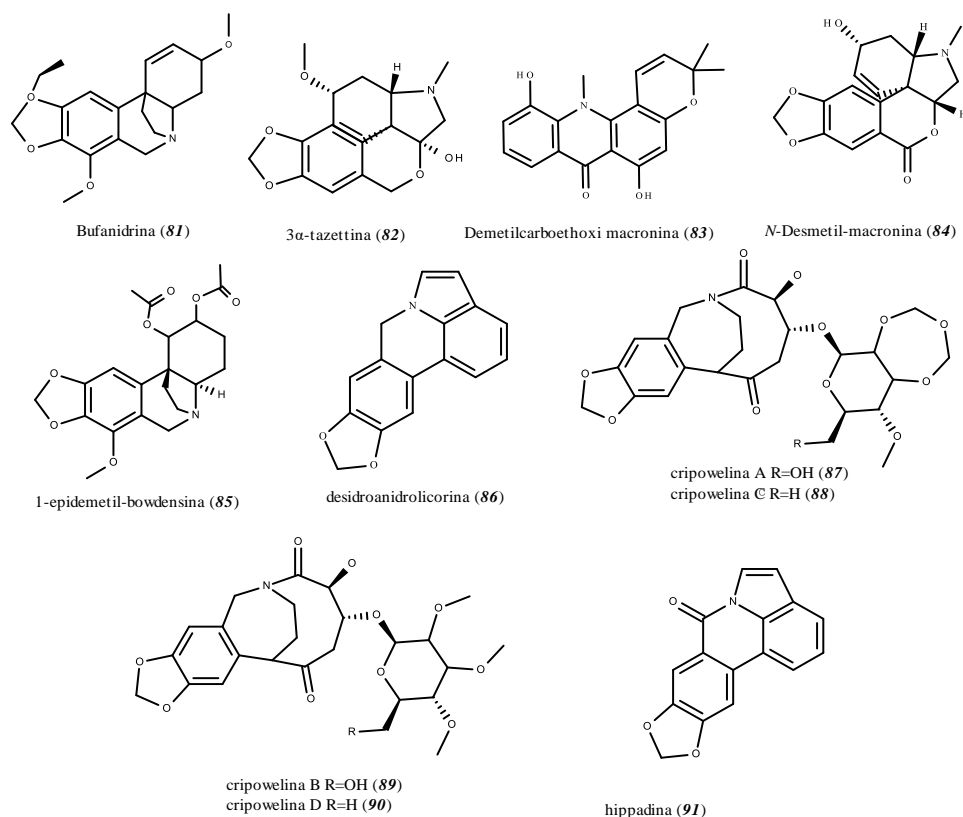


Figura 8. Compostos alcalóidicos identificados em *Crinum erubescens* L.f. ex Aiton

Inibição enzimática. O extrato etanólico de bulbos de *C. erubescens* apresentou atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), com detecção pelo método de autobiografia (avaliação qualitativa em CCD) (CALDERÓN et al., 2010).

Atividade citotóxica. A capacidade citotóxica dos compostos **87-90** foi determinada frente à linhagem celular de câncer de ovário humano A2780. Os valores de IC₅₀ para as substâncias isoladas foram 11,1 nM, 16,4 nM, 25 nM e 28 nM, respectivamente (PRESLEY et al., 2016).

Atividade antimalárica. A atividade antimalárica dos compostos isolados **87-90** foi avaliada frente ao organismo *Plasmodium falciparum*. Os valores de IC₅₀ dos compostos foram de 30 nM, 180 nM, 26 nM, e 260 nM, respectivamente (PRESLEY et al., 2016).

As outras duas espécies envolvidas no estudo, *Crinum* sp e *Hippeastrum* sp, até o momento da finalização do trabalho não contavam com caracterização taxonômica (espécie verdadeira), motivo pelo qual não foram incluídas neste item.

2.3 DESCRIÇÃO GERAL DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS

Todos os organismos vivos desenvolvem processos biológicos que são regulados por agentes chamados "enzimas". Enzimas são biomoléculas que desempenham um papel importante na síntese de macromoléculas, bem como suas reações de degradação, regulação da sinalização e controle do ciclo celulares (SINGHANIA et al., 2015). São proteínas que possuem elevado peso molecular ($\geq 15,000$ Daltons) (MATÉS; PÉREZ-GÓMEZ; DE CASTRO, 1999), responsáveis por catalisar reações do metabolismo.

As enzimas estão distribuídas em todas as células do corpo, produzindo alterações químicas (ou reações enzimáticas) necessárias as funções vitais do organismo. Agem especificamente sobre moléculas alvo, que são chamados substratos, que sofrem processos de transformação enzimática, obtendo novas moléculas chamadas produtos. Por outro lado, as enzimas se mantêm ao longo desse processo, não são destruídas, e em casos específicos sua ação é acompanhada de outras moléculas (LIU, 2017).

As enzimas, por outro lado, são classificadas com base na natureza da reação catalisada, com a palavra que termina no sufixo "-ase", como, por exemplo, lactase, que cujo nome vem do substrato de lactose. De acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, existem seis classes principais de enzimas: hidrolases, isomerases, ligases, oxidoreductases, transferases e ligases (LIU, 2017).

São capazes de catalisar mais de quatro mil processos bioquímicos diferentes. Entre eles pode ser mencionado, por exemplo, o processo de hidratação do CO_2 , dando origem a bicarbonato, pela metaloenzima anidrase carbônica, para manter o equilíbrio ácido-base no sangue e outros tecidos, e para auxiliar no transporte de dióxido de carbono para fora dos tecidos (LIU, 2017); ou a superóxido dismutase, essencial para o sistema antioxidante endógeno, que catalisa a conversão do íon superóxido, altamente reativo, em oxigênio e peróxido de hidrogênio (MATÉS; PÉREZ-GÓMEZ; DE CASTRO, 1999).

A versatilidade das enzimas e sua importância nos inúmeros processos bioquímicos e metabólicos no corpo humano, fez com que as mesmas se tornarem alvo de diferentes fármacos. Existem moléculas que podem regular o funcionamento enzimático de maneira específica, limitando suas funções e em alguns casos atuando como inibidores (MITCHELL, 2017). Quando a inibição enzimática acontece de forma controlada, os resultados podem ser considerados terapeuticamente favoráveis. (KENAKIN, 2017)

Existem vários mecanismos baseados na afinidade do inibidor pela enzima podendo interagir de forma que (MUSCHOLL; SPIRA, 1982):

- A inibição seja competitiva, ou seja, a afinidade do inibidor é exclusiva pela enzima e há competência quanto a ligação ao substrato.
- Ocorra a inibição mista, isto é, o inibidor se liga à enzima e ao complexo enzima-substrato com afinidade diferente
- Ocorra inibição não competitiva, na qual o inibidor apenas se liga ao complexo enzima-substrato.
- Ocorra inibição irreversível, onde o inibidor se liga fortemente ao sítio ativo da enzima formando um complexo no qual o inibidor permanecerá por muito tempo (KENAKIN, 2017).

2.3.1 α -Amilase

A enzima α -amilase (E.C. 3.2.1.1), (α -1-4glicano-4-glicanohidrolase) faz parte da família das endoamilases, é produzida por uma grande variedade de organismos e está presente em mamíferos, plantas e microrganismos (TIBONI, 2011). A cadeia de aminoácidos que compõe esta enzima é de aproximadamente 512 unidades, com um peso molecular de 57,6 kDa, e sua atividade depende da concentração de cálcio no meio (JANEČEK; SVENSSON; MACGREGOR, 2014). Essa enzima possui múltiplas ações, podendo hidrolisar amido a partir de reações de hidrólise aleatória sobre as ligações glicosídicas (α -1,4). Além do amido, as amilases podem hidrolisar o glicogênio, frações de amilose, amilopectina, bem como dextrinas (SALES et al., 2012).

Os inibidores da α -amilase podem desacelerar a digestão e a absorção dos carboidratos no intestino, reduzindo a glicemia pós-prandial e auxiliando no controle da diabetes mellitus, um grupo de agravos metabólicos caracterizado por hiperglicemia, dislipidemia e alterações no metabolismo de proteínas. Ainda, os inibidores podem auxiliar no controle do peso do indivíduo (ADISAKWATTANA et al., 2009).

Um dos inibidores de α -amilase mais estudados é a acarbose (92), um tetrassacarídeo, obtido do fungo *Actinoplanes* sp. Acarbose (92), Figura 9, atua como um inibidor competitivo da α -amilase, e é utilizada na terapêutica no controle clínico da diabetes mellitus (NARITA; INOUE, 2014).

Na busca de formas alternativas para o controle da diabetes, estima-se que existam mais de 800 espécies vegetais com atividade hipoglicêmica Tanto extratos brutos, frações ou vários metabólitos do tipo alcaloides, glicosídeos, esteroides, terpenoides, flavonoides,

polissacarídeos, taninos, dentre outros, apresentam um efeito hipoglicêmico (KARTHIC et al., 2008)(SALES et al., 2012).

2.3.2 α -Glicosidase

As glicosidases (E.C3.2.1.20, α -D-glicosídeo glicohidrolases, estão presentes em uma ampla gama de seres vivos, como microrganismos, fungos, plantas e animais. As glicosidases catalisam a reação de clivagem de ligações glicosídicas (α -1,4) de dissacarídeos, oligossacarídeos ou glicoconjugados, dando origem a unidades de glicose (BORGES DE MELO; DA SILVEIRA GOMES; CARVALHO, 2006).

As glicosidases estão envolvidas em processos bioquímicos, tais como degradação de polissacarídeos da dieta, catabolismo de glicoconjugados lisossomais e processamento de glicoproteínas, transformação de unidades de oligossacarídeos em glicoproteínas ou glicolípidos (BORGES DE MELO; DA SILVEIRA GOMES; CARVALHO, 2006), além de intervir nos processos de reconhecimento célula-célula ou célula-vírus, resposta imune, proliferação e morte celular (PISTIA-BRUEGGEMAN; HOLLINGSWORTH, 2001;GUO et al., 2015)

Os inibidores dessa enzima têm sido amplamente estudados quanto a suas propriedades químicas e biológicas. Algumas moléculas foram isoladas de fontes naturais, enquanto outras foram obtidas por processos orgânicos de síntese e semissíntese (HAN et al., 2017). Entre os inibidores de α -glicosidase disponíveis podem ser destacados: acarbose (**92**), voglibose (**93**) e miglitol (**94**) (Figura 9), usados no tratamento da diabetes, além da desoxinojirimicina (**95**) , usada no tratamento doença de Guacher (BORGES DE MELO; DA SILVEIRA GOMES; CARVALHO, 2006).

Contudo, a busca por novas moléculas que atuem como inibidores de α -glicosidase não deve ser descartada, aumentando o arsenal terapêutico no tratamento ou controle de diversos agravos da saúde, tais com o diabetes, obesidade, AIDS, tumores e infecções.

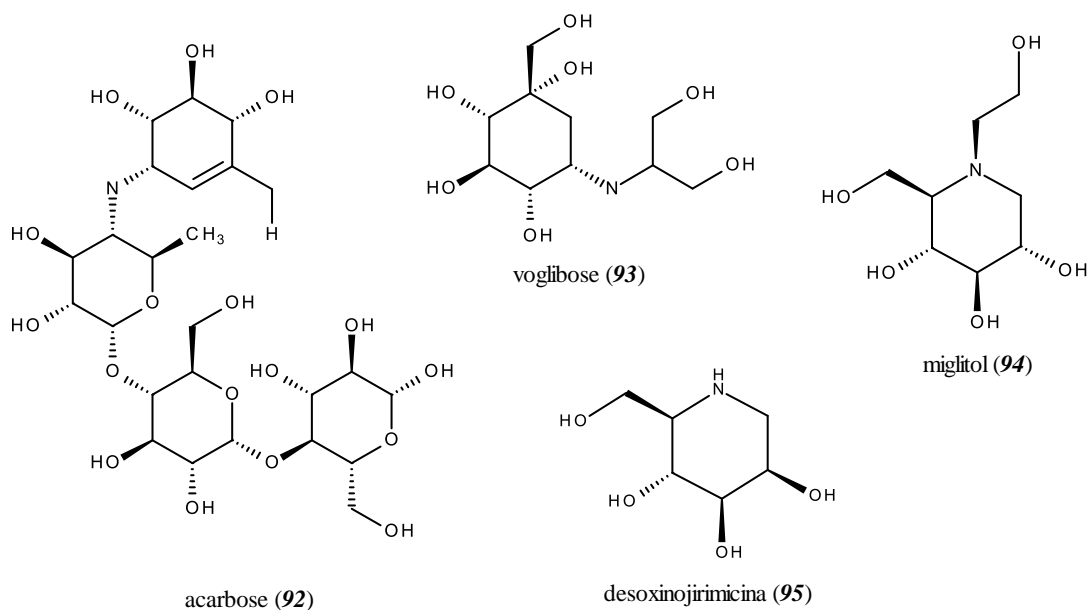


Figura 9. Estruturas químicas de inibidores das enzimas α -amilase e α -glicosidase

2.3.3 Tirosinase

As tirosinases (EC 1.14.18.1 catecolase, polifenol oxidase; difenoloxidase) são amplamente distribuídas em seres vivos (plantas, fungos, bactérias e animais). Catalisam as reações de oxidação de monofenóis, funcionando como cresolase ou monofenolase (em primeira instância) e liberando difenóis e O-difenóis (catecolase e difenolase), originando O-quinonas reativas. O substrato típico dessa enzima é a tirosina (CHANG, 2009). O peso molecular aproximado das tirosinases é de 120 kDa, possui dois átomos de cobre nos sítios ativos e quatro cadeias polipeptídicas (tetramérica) (FREITAS et al., 2016).

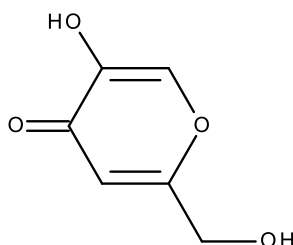
A importância das enzimas tirosinase se fundamenta na sua versatilidade, pois possuem aplicações tanto a nível industrial como ambiental em processos de biorremediação, sendo consideradas alvo de investigação e inovação.

Uma das funções mais importantes da tirosinase é a melanogênese, isto é, a biossíntese de melanina, produto de diversas reações poliméricas químicas e enzimáticas que sofre o aminoácido tirosina quando é oxidado a L-DOPA. O primeiro passo da melanogênese é a etapa-chave da biossíntese, e refere-se à oxidação da tirosina, catalisada pela tirosinase, originando dopaquinona, que é convertida a DOPA e DOPAcromo, via auto-oxidação. DOPA, por sua vez, também é substrato da tirosinase (CHANG, 2009), seguindo então a síntese, até a formação da melanina.

A melanina determina a cor dos olhos, cabelo e a pele em seres humanos, e é liberada de forma controlada pelos melanócitos, células que se encontram na camada mais externa da pele. A concentração de melanina nos humanos pode variar dependendo de causas tanto externas como naturais, entre elas a exposição a luz ultravioleta, envelhecimento, além os processos de cicatrização, que atualmente é considerado um dos focos mais importantes ao nível farmacológico e cosmético (WANG et al., 2016). No reino vegetal, é responsável pela mudança na coloração que sofrem os frutos após serem coletados (CHANG, 2009).

A hiperexpressão ou hiperatividade da tirosinase tem sido associada a hiperpigmentação da pele, tais como melasma, sardas, hiperpigmentação originada em processos inflamatórios, dentre outros. Além disso, tirosinase tem sido relacionada a doença de Parkinson e outras doenças neurodegenerativas (BURLANDO; CLERICUZIO; CORNARA, 2017).

Dentre as várias estratégias para combater a hiperpigmentação da pele, destaca-se a inibição da tirosinase, devido ao seu importante papel na biossíntese da melanina. A busca de compostos que fossem capazes de inibir esta enzima, muitos extratos, frações e compostos de origem natural foram considerados potencialmente interessantes. Dentre eles o ácido kójico (**96**) (Figura 10), um metabólito fúngico (CHANG, 2009), merece destaque por sua ampla utilização.



ácido kójico (**96**)

Figura 10. Estrutura ácido kójico inibidor da enzima tirosinase

Apesar do grande número de inibidores da tirosinase conhecidos, poucos foram clinicamente testados ou fazem parte do arsenal terapêutico ou dermocosmético (BURLANDO; CLERICUZIO; CORNARA, 2017). Assim, considerando o crescente interesse em formulações dermocosméticas, bem como agentes pós-colheita contra o escurecimento de alimentos, a busca por inibidores de tirosinase que sejam seguros e potentes tem merecido grande atenção.

2.3.4 Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (acetilcolina hidrolase, EC 3.1.1.7), (AChE), pertencente à família das colinesterases, é responsável pela transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas, processo mediado pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) o substrato específico da enzima (PETRONILHOA; PINTO; VILLARA, 2011).

No sistema nervoso central, a AChE está envolvida nas respostas motoras, cognitivas e no armazenamento da informação (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016). Como o último passo na transmissão do sinal elétrico, a acetilcolina (ACh) é produzida na região terminal dos neurônios, sítio onde acontecem a sinapse neuronal. Após ser liberada na fenda sináptica, é atraída pelos receptores específicos nicotínicos e muscarínicos localizado no próximo neurônio, num ciclo que se repete conseguindo manter assim a continuidade no impulso nervoso (TOUGU, 2001). Uma vez que a transmissão finaliza, o mecanismo de liberação de AChE é ativado, via a conversão da ACh em colina (Ch), molécula que é reabsorvida e reconvertida a ACh no neurônio, ficando, assim, disponível para que um novo impulso nervoso seja transmitido. (ATUKEREN et al., 2017)

O sistema colinérgico tem um papel importante nos processos de aprendizado e de memória. Também está relacionado a outros processos, tais como bloqueio neuromuscular (perca do tônus muscular), falha na transmissão do impulso nervoso ao músculo, deficiência nas contrações musculares, controle de lesões nervosas oculares, e Doença de Alzheimer, caracterizada por deficiência no sistema colinérgico (WIEMANN et al., 2017). Assim, o sistema colinérgico tem sido alvo para o desenvolvimento de fármacos, principalmente aqueles utilizados no controle da evolução da Doença de Alzheimer, retardando o processo de degradação enzimática que provoca a deficiência de neurotransmissores, incluindo a ACh. Uma das estratégias farmacológicas mais utilizadas refere-se à inibição da acetilcolinesterase, impedindo a degradação da ACh (SOUSA et al., 2017).

Inibidores de colinesterases são considerados fármacos que aumentam a transmissão colinérgica e vários [por exemplo galantamina (*1*), donezepila (*97*), rivastigmina (*98*)] fazem, ou fizeram, parte do arsenal terapêutico (WIEMANN et al., 2017). Desde 1980 até a data atual, cerca de 50% dos medicamentos para o controle de doenças envolvendo a enzima AChE, são baseados em compostos de origem natural (WIEMANN; LOESCHE; CSUK, 2017).

A galantamina (**1**), alcaloide de origem natural aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e Anvisa para o tratamento da Doença de Alzheimer (DA), tem comprovada atividade anticolinesterásica (LISTON et al., 2004; SOUSA et al., 2017). Donepezila (**97**) e rivastigmina (**98**) também foram isolados de fontes naturais. Por outro lado, fisostigmina (**99**) (Figura 11), um composto alcaloídico isolado de *Physostigma venenosum* L., foi retirado do arsenal terapêutico devido à toxicidade e aos efeitos secundários observados em pacientes tratados.

No intuito de buscar novos fármacos úteis na DA, compostos sintéticos e de origem natural têm sido avaliados quanto sua capacidade de inibir AChE. Nessa busca, têm destaque os metabólitos secundários encontrados em plantas da família Amaryllidaceae, principalmente aqueles análogos à galantamina.

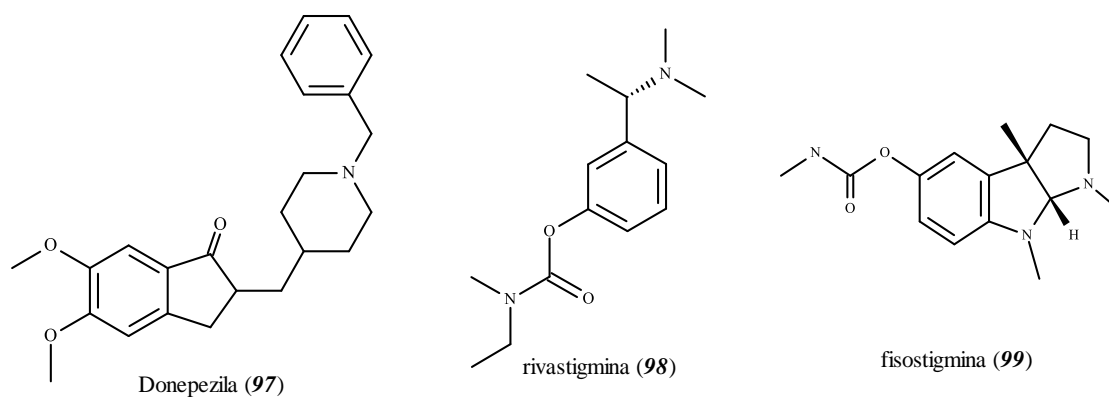


Figura 11. Estrutura química de alguns inibidores da enzima acetilcolinesterase

3 OBJETIVOS

Considerando que:

- com o envelhecimento da população mundial, o número de indivíduos diagnosticados com doenças crônicas tem crescido e a estimativa é que cresça ainda mais em poucas décadas;
- espécies de Amaryllidaceae são reconhecidamente fonte de princípios ativos úteis, principalmente no que se refere à doença de Alzheimer;
- plantas dessa família, encontradas no Cerrado, não têm sido avaliadas quanto à sua composição química e/ou atividade biológica;
- muitas dessas espécies, endêmicas no Brasil correm o risco de serem extintas sem que se conheça seu potencial;
- há a necessidade de valoração dessas espécies, e, conseqüentemente, a busca de processos eficientes de preservação e manejo.

Os objetivos desse projeto são:

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de inibição enzimática de espécies da família Amaryllidaceae ocorrentes no Brasil, quanto à atividade de inibição de enzimas de interesse farmacêutico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- avaliar a capacidade de inibição das enzimas α -amilase, α -glicosidase, tirosinase e acetilcolinesterase por extratos de diferentes órgãos de plantas da família Amaryllidaceae
- obter o perfil químico dos extratos brutos e frações mais promissoras.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

O material botânico analisado foi obtido por meio de coleta em campo ou foram gentilmente cedidos pela EMBRAPA-CENARGEN. A identificação botânica foi realizada pelo Prof. Dr. Christopher William Fagg e Prof.^a Dr.^a Sueli Maria Gomes, como parte do projeto interdisciplinar “Estudo de espécies de Amaryllidaceae para obtenção de bioprodutos úteis no combate a doenças crônico-degenerativas” conforme o edital FAP-DF 03/2015 -Demanda Espontânea”.

4.1.1 Material botânico obtido na EMBRAPA CENARGEN (bulbos)

Bulbos de sete espécies de Amaryllidaceae oriundos de diferentes regiões brasileiras foram obtidos na sede da EMBRAPA-CENARGEN. Parte do material botânico obtido foi utilizado para obtenção de extratos e parte foi destinada a cultivo em casa de vegetação.

Hymenocallis litorallis (Jacq.) Salisb.

- Bulbos cultivados da coleção da EMBRAPA-CENARGEN
- Origem: canteiro de obras Jirau, margem esquerda do rio Madeira.
- Localização e exsicata: Porto Velho, RO, Brasil (Marcelo Fragomeni Simon 1712, herbário da EMBRAPA-CENARGEN)

Hippeastrum psittacinum Herb

- Bulbos cultivados da coleção EMBRAPA-CENARGEN
- Origem: primeiro tributário de margem direita a montante da ponte do Passo do Socorro
- Localização e exsicata no herbário: Capão Alto, Santa Catarina, Brasil (Glocimar Pereira-Silva 10874 herbário da EMBRAPA-CENARGEN)

Habranthus irwinianus Ravenna

- Bulbos cultivados de coleção da EMBRAPA-CENARGEN
- Exsicata e identificação: Christopher Fagg 2409 herbário UB (Universidade de Brasília), especialista Andrielle Câmara Amaral-Lopes, Data: 20/03/2017

Hippeastrum sp.

- Bulbos cultivados de coleção da EMBRAPA-CENARGEN

- Origem: margem da BR-116, sentido Itaiópolis, Mafra, Lages, Santa Catarina, Brasil
- Exsicata: Ernestinho de S. Gomes Guarino 1190, herbário da EMBRAPA-CENARGEN

4.1.2 Material botânico coletado na área de Cerrado em Brasília e entorno

Crinum erubescens L.f. ex Aiton

- Bulbos coletados pelo Prof. Dr. Christopher William Fagg
- Origem: Coletado na área do Park Way, região administrativa do Distrito Federal
- Exsicata: CW Fagg 2474 herbário UB 23/08/2017

Hippeastrum goianum (Ravenna) Meerow

Amostra 1: HGB-c

- Bulbos, folhas e frutos coletados pelo Prof. Dr. Christopher William Fagg
- Origem: campo sujo, Campus UnB-Ceilândia
- Exsicata: Christopher Fagg 2387 herbário UB, data: 17/08/2016

Amostra 2: HGB-s

- Bulbos coletados pela Prof.^a Dr.^a Sueli Maria Gomes
- Origem: área sul do Parque Nacional de Brasília, Brasília Distrito Federal, Taguatinga
- Exsicata: S.M. Gomes & D.A.S. Sousa 927 herbário UB, data: 13/09/2016

Hippeastrum puniceum (Lam.) Kuntze

- Bulbo, folha e flor coletados Prof. Dr. Christopher William Fagg
- Origem: área de preservação ambiental (APA) Gama Cabeça de Veado, Parkway Q17, cerrado sensu estricto perturbado.
- Coletas: 09/10/2016 e 05/11/2016.

As informações sobre o material botânico estão resumidas na Quadro 3.

Quadro 3. Espécies de Amaryllidaceae, objeto desse estudo.

| Espécie | órgão | Local de coleta | Herbário | Voucher |
|---|----------------|------------------|----------|--------------|
| <i>Hymenocallis litorallis</i> (Jacq.) Salisb. | Bulbo | Porto Velho, RO. | CENARGEN | MFS 1712 |
| <i>Hippeastrum psittacinum</i> Herb. | Bulbo | Capão Alto, SC. | CENARGEN | GPS 10874 |
| <i>Crinum</i> sp. | Bulbo | Alexânia, GO. | CENARGEN | AAS 2712 |
| <i>Hippeastrum</i> sp. | Bulbo | Lages, SC. | CENARGEN | EG 1190 |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (Ravenna) | Bulbo Folha | Brasília, DF. | UB | * |
| <i>Hippeastrum puniceum</i> (Lam.) Kuntze | Bulbo Folha | Brasília, DF. | UB | 2387 |
| <i>Habranthus irwinianus</i> (Ravenna) | Bulbo | Brasília, DF. | UB | ACA 62 |
| <i>Crinum erubescens</i> L.f. ex Aiton | Bulbo Folha | Brasília, DF. | UB | Fagg 2474 |

*dados das exicatas para as coletas da espécie *Hippeastrum goianum* (Ravenna) são descritos no item 4.1.2

4.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE DO MATERIAL BOTÂNICO

Logo após a coleta do material botânico, os bulbos e folhas foram submetidos a limpeza para remoção de terra e outros materiais estranhos. Em seguida, o material foi rasurado. Deste material, foram separadas três amostras de 2 g para determinar a umidade de campo em balança de determinação de umidade por infravermelho (Modelo IV2000 versão: 4.2,1- Gehaka), segundo a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 5ª Ed., (BRASIL, 2011).

4.3 Obtenção dos extratos

O material vegetal fresco foi rasurado e submetido a extração, utilizando percoladores de aço inox. A proporção entre o material botânico e os solventes utilizados foi 1:10.

O material vegetal foi inicialmente extraído por hexano, por 72 h. Após esse período, a solução extrativa foi percolada. O processo foi repetido por três vezes. O material botânico remanescente foi então submetido ao mesmo procedimento, utilizando etanol P.A. como solvente. As soluções extrativas foram submetidas à evaporação sob temperatura inferior a 40 °C e vácuo, para eliminação dos solventes, utilizando rotaevaporador Hei-VAP Advantage, ML, G1, 115v – Heidolph.

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

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

Os processos de extração estão resumidos na Figura 12.

4.4 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

4.4.1 Fase estacionária

Neste estudo foram utilizadas cromatoplasas analíticas de sílica gel 60 com 0,2 mm de espessura (Kieselgel 60 Alugram Sil G, MACHEREY-NAGEL) em suporte de alumínio.

4.4.2 Preparo e aplicação da amostra

Para cada extrato e fração, foi separada uma alíquota de cerca de 10 μL na concentração de 1 mg/mL e aplicada na placa. As amostras foram aplicadas com ajuda de um capilar a uma distância de 1 cm da base inferior da placa e cerca de 1 cm de separação entre uma amostra e outra (APARECIDA; PHILIPPINI FERREIRA BORGES, 2012). Após a eluição, as placas cromatográficas foram visualizadas sob luz ultravioleta, no

comprimento de onda de 365 nm. Posteriormente, foram utilizadas soluções para detecção específica.

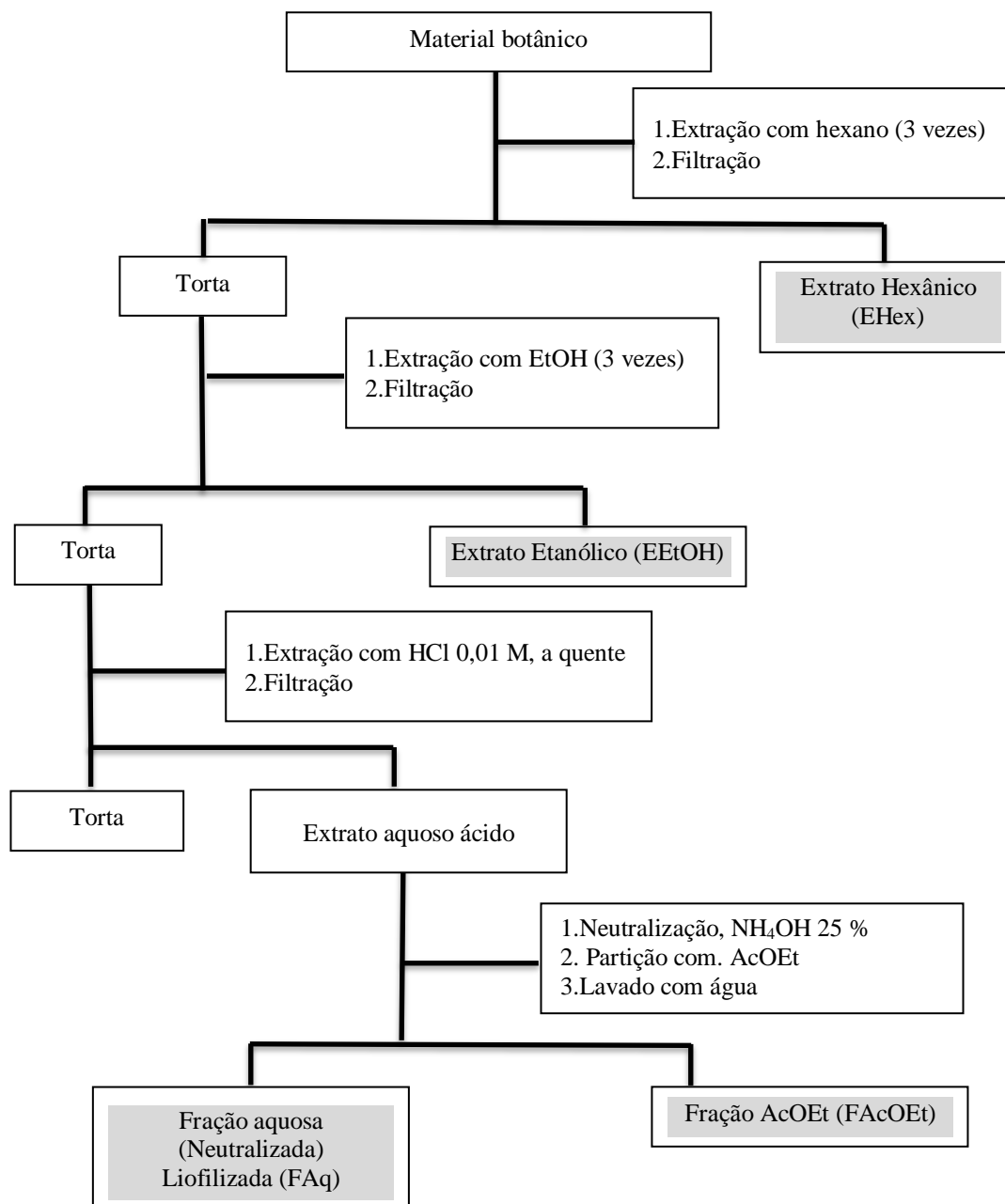


Figura 12. Esquema de obtenção de extratos e frações do material botânico

4.4.3 Sistemas de Eluição

Foram escolhidos diferentes eluentes, de acordo com as características da amostra analisada. Para a detecção de compostos fenólicos, foi escolhida a fase móvel FM1 composta por acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água destilada (100:11:11:26) (WAGNER; BLADT, 1996). A FM2 hexano: acetato de etila (8:2) foi usada para a detecção de triterpenos e outros terpenoides. Para a detecção de alcaloides, foi usada a FM3 [clorofórmio:acetato de etila:metanol (45:40:15)].

4.4.4 Reveladores (WAGNER; BLADT, 1996)

4.4.4.1 Solução reveladora NP/PEG - R1

Reagente usado para a detecção de compostos fenólicos, especialmente flavonoides. Após a eluição, a placa cromatográfica foi borrifada com solução metanólica de difenilboriloxietilamina 1%, seguida de solução 5% de polietilenglicol-4000 (PEG 4000), em metanol. Uma fluorescência intensa é observada quando a placa é submetida à luz ultravioleta a 365 nm, indicando a presença destes compostos. A fluorescência, usualmente é de cor laranja, amarela, azul ou verde.

4.4.4.2 Reagente anisaldeído-ácido sulfúrico - R2

É um reagente geral para produtos naturais. É constituído de duas soluções: Solução A, composta por anisaldeído em ácido acético 2%; e solução B, composta por solução etanólica de ácido sulfúrico 20%. A placa cromatográfica foi borrifada com as soluções A e B e em seguida aquecida, com auxílio de secador serigráfico, até o surgimento das bandas.

O reagente é estável por um período de várias semanas quando armazenado sob refrigeração e apresenta resposta positiva com manchas de cor róseas ou roxas quando há presença de sapogeninas, terpenos, esteroides, glicosídeos, fenóis, prostaglandinas e micotoxinas (WAGNER; BLADT, 1996).

4.4.4.3 Reagente Dragendorff – R3

É um reagente específico para alcaloides, que podem ser identificados pelo aparecimento de coloração alaranjada característica. É constituído de duas soluções: solução A, composta por subnitrito de bismuto em ácido acético: água (1:4); e solução

B, composta por uma solução de iodeto de potássio 40%. A placa cromatográfica é borrifada com uma mistura em partes iguais das soluções A e B.

As soluções são estáveis por um período de seis meses quando armazenadas sob refrigeração. Apresenta resposta positiva com manchas de cor alaranjada na presença de alcaloides.

4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

4.5.1 Determinação da atividade de inibição sobre α -amilase

O ensaio utilizado baseou-se em Bernfeld (1955), com adaptações (BERNFELD, 1955) e envolve a produção e determinação de açúcares redutores como produto da quebra nas ligações específicas do amido (hidrólise amilolítica) (MARQUES RODRIGUES, 2015). O método fundamenta-se na determinação da diferença de absorvância, gerada pela mudança na cor do produto da reação de oxidação dos grupos aldeído dos monossacarídeos, liberados na reação enzimática entre a α -amilase e seu substrato, para o ácido correspondente. O agente oxidante utilizado é o ácido 3,5-dinitrosalicílico, que é reduzido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (Figura 13), e apresenta máximo de absorção em 540 nm. Para calcular a atividade de inibição da enzima, foi utilizada a equação:

$$\% \text{ de inibição} = \left[\frac{(C - A)}{C} \right] \times 100$$

Onde C corresponde à absorvância do controle negativo subtraída da absorvância do branco do substrato e A corresponde à absorvância da amostra subtraída da absorvância do branco da amostra

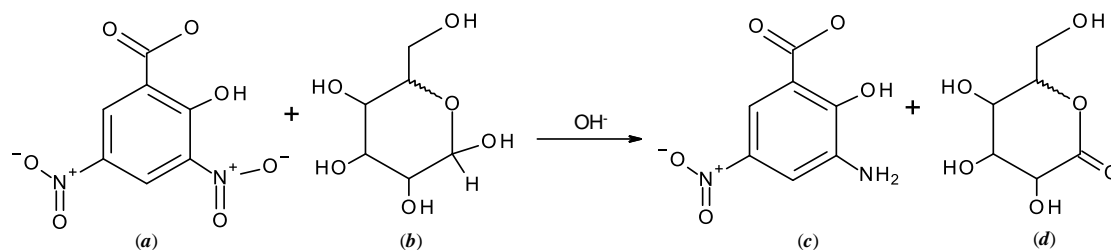


Figura 13. Representação da reação de oxidação por ácido 3,5-dinitrosalicílico (cor amarela) (a) de um açúcar redutor genérico (b); produto colorido 3-amino-5-nitrosalicílico (cor laranja-avermelhada) (c) e açúcar oxidado (d)

Reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Em água destilada, q.s.p 1 L, e sob condições de agitação constante, foram dissolvidos 19,8 g de hidróxido de sódio (Vetec), 306,0 g de tartarato de sódio e potássio (Vetec), 8,3 g de bissulfito de sódio (Vetec) e 10,6 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (Sigma). A solução obtida foi acondicionada em frasco âmbar, sendo mantida a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Solução tampão PBS (20 Mm) (pH 6,9). Uma solução de fosfato de sódio 0,02 M e cloreto de sódio 6,7 μ M foi preparada pela mistura de 1,84 g de fosfato de sódio monobásico (Vetec), 0,68 g de fosfato de sódio dibásico (Vetec) e 0,38 g de cloreto de sódio (Vetec) dissolvidos em de água destilada q.s.p. 1 L. O pH foi ajustado com solução de ácido clorídrico 1 M.

Solução de α -amilase. A solução estoque foi preparada com 1 mg de enzima α -amilase pancreática suína EC 3.2.1.1 (Sigma) 500 KU/mg, que foi dissolvida em 10 mL de solução tampão. A solução foi armazenada em freezer a uma temperatura de -20°C . Para o ensaio, uma alíquota da solução estoque foi diluída até a concentração de 40 UI/mL (solução de trabalho).

Solução de amido 1 % (substrato). Foram dissolvidos 0,25 g de amido (Sigma) em 25 mL de solução tampão. Para facilitar a solubilização e utilização no ensaio, a solução de amido foi mantida em banho-maria com água em ebulição por 15 minutos com agitação constante, em recipiente aberto, com reposição da água perdida por evaporação.

Preparo das amostras. As amostras (extratos etanólicos e as frações aquosas e de acetato de etila) foram preparadas de modo que a concentrações finais no meio de reação fossem 500, 250 e 125 $\mu\text{g/mL}$, e o volume final na etapa de pré-incubação foi 1 mL. O solvente utilizado foi água destilada, para as frações aquosas; para os extratos em etanol e frações em acetato de etila foi utilizada uma solução com 5% de DMSO e 10% metanol. A amostra diluída foi agitada mecanicamente durante 5 minutos e mantida em repouso por 20 minutos antes do início da etapa de pré-incubação.

Solução de acarbose (controle positivo). Acarbose (92) (Sigma) foi preparada numa concentração de 1 mg/mL em água destilada. A partir dessa solução foram feitas as diluições necessárias para construção de uma curva dose-resposta com concentrações finais de 1 a 70 µg/mL.

Controle negativo. Foi preparado da mesma forma que a solução das amostras, substituindo a amostra por solução tampão na etapa de pré-incubação. Possíveis interferentes, tais como a coloração do substrato e do extrato, foram descartados com:

Branco do substrato. Constituído de 500 µL de solução tampão e 500 µL de solução de amido a 1%.

Branco do extrato. Preparado com 5 µL da solução de extrato, 545 µL tampão e 500 µL da solução de amido 1%.

Branco do aparelho. Referente a 1000 µL de solução tampão.

Avaliação da inibição enzimática. Em um tubo de ensaio, uma mistura contendo 20 µL de solução da amostra, 50 µL da solução da enzima e 930 µL de solução PBS pH 6,9 foi mantida a 25 °C por 30 minutos (etapa de pré-incubação). Em seguida, 250 µL da mistura preparada na etapa de pré-incubação foram adicionados a tubo contendo 250 µL de solução tampão e 500 µL de solução de amido. A nova mistura foi incubada a 40 °C em banho-maria (Nova Ética ultra termostático-521 2DF) por 20 minutos (etapa de incubação). Ao término do tempo de incubação, foram adicionados 500 µL do reagente DNS a todos os tubos. Em seguida, os tubos foram aquecidos em água fervente por 5 minutos e arrefecidos até aproximadamente 25°C (temperatura ambiente do laboratório).

Todas as diferentes diluições das amostras e soluções que passaram pela etapa de incubação foram preparadas em triplicata, com exceção da solução de calibração (branco do aparelho) e do branco do extrato.

Após o arrefecimento, as soluções foram diluídas com água destilada q.s.p. 4,5 mL. Após homogeneização, cerca de 2,0 mL foram transferidos para uma cubeta de poliestireno com caminho óptico de 1 cm. A leitura, em espectrofotômetro (UV Genesis, - 60s) previamente ajustado com a solução denominada branco do aparelho, foi realizada em comprimento de onda de 540 nm.

Para verificar uma possível interferência dos solventes na inibição enzimática, os mesmos foram avaliados (na maior concentração utilizada) nas mesmas condições experimentais que as amostras e os controles (positivo e negativo).

4.5.2 Determinação da atividade de inibição sobre α -glicosidase

A avaliação da atividade da enzima α -glicosidase foi determinada com base no método descrito por Shinde et al (2008), e adaptado por Souza (2011), no qual a absorbância está determinada pelo íon *p*-nitrofenolato (pNP), liberado a partir do substrato de origem sintética *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (pNPG) (SHINDE et al., 2008; SOUZA, 2011). O fundamento do ensaio baseia-se na determinação do produto da hidrólise do pNPG, fornecendo pNP (Figura 14), estabilizado por ressonância (Figura 15). A formação do íon pNP produz uma coloração amarela que é estabilizada e intensificada pela adição do Na_2CO_3 . O máximo de absorbância foi determinado em leitora de microplacas a 400 nm (EnSpire Multimode Plate Reader-Perkin Elmer). O pNPG é utilizado como substrato para uma maior especificidade do método de determinação da atividade da α -glicosidase (SOUZA, 2011).

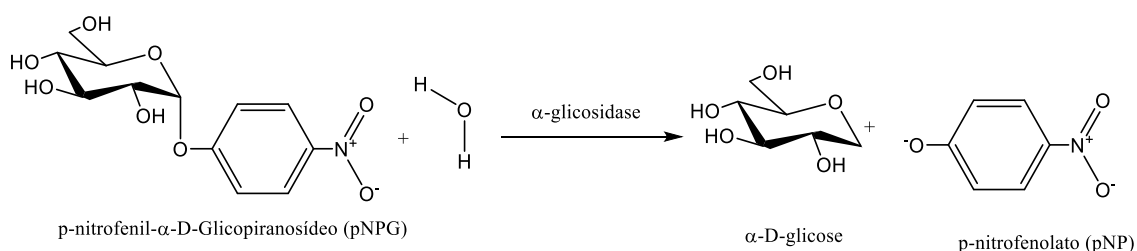


Figura 14. Representação da hidrólise enzimática de *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (p-NFPG) por ação de α -glicosidase (α -GLC) liberando as unidades de *p*-nitrofenolato e α -D-glicose

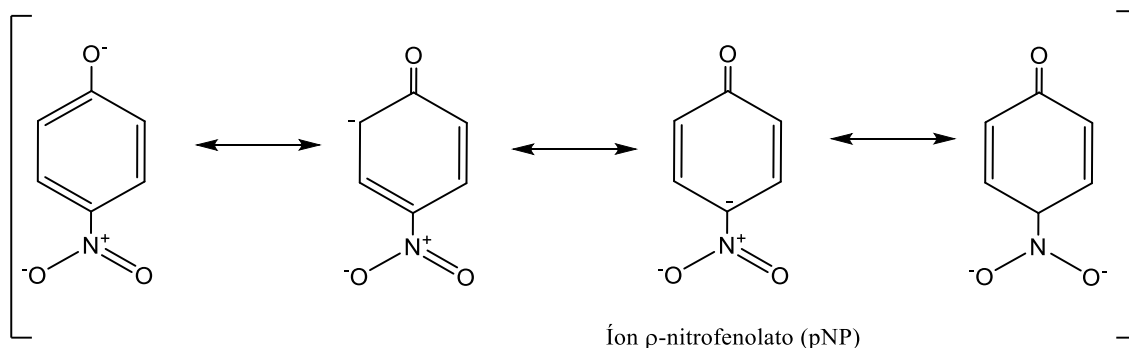


Figura 15. Possíveis estruturas de ressonância do íon *p*-nitrofenolato em meio básico

Solução de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,8. Em 1 L água destilada, foram dissolvidos 4,21 g de fosfato de sódio monobásico e 2,19 g de fosfato de sódio dibásico.

Solução de α -glicosidase (1 U/mL). Foi utilizada α -glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (3.2.1.20, Sigma Aldrich). A solução estoque foi preparada com 1 mg de α -glicosidase (100 U/mL) dissolvido em 1 mL de PBS. A solução foi armazenada em freezer a uma temperatura de (-20°C).

Solução de ρ -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (ρ NPG), 1 mM. Foram pesados 3,0 mg de ρ -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (Sigma Aldrich) e dissolvidos em 10 mL de tampão fosfato de sódio

Solução de bicarbonato de sódio 10 %. Bicarbonato de sódio (Vetec, 2,5 g) foi dissolvido em 25 mL de água destilada.

Solução de desoxinojirimicina (95) 5 mg/mL (controle positivo). Desoxinojirimicina Figura 9, foi utilizada como o inibidor da α -glicosidase. Foi pesado 1,0 mg de cloridrato de 1-desoxinojirimicina (Sigma Aldrich) e solubilizado em 1 mL de água destilada. A curva dose-resposta foi construída utilizando diluição seriada a partir de uma solução de 1 mg/mL, com concentrações finais por poço variando entre 2 e 100 μ g/mL.

Preparo das amostras. As amostras (extratos etanólicos e frações aquosas e de acetato de etila) foram preparadas de modo que a concentrações finais no meio de reação fossem entre 500 e 7,8 μ g/mL, com um fator de diluição de 1:3. O solvente utilizado foi água destilada, para as frações aquosas; para os extratos etanólicos e frações em acetato de etila foi utilizada uma solução com 5% de DMSO e 5% metanol, para um volume final na etapa de pré-incubação de 1 mL. A amostra foi agitada mecanicamente durante 5 minutos e mantida em repouso durante 30 minutos antes do início da etapa de pré-incubação. Para a construção da curva dose-resposta, foram preparadas soluções com concentrações variando entre 300 μ g/mL - 50 μ g/mL.

Solução branco do controle. Foi preparada da mesma forma que o controle positivo, substituindo a enzima pela solução tampão.

Solução branco das amostras. Soluções preparadas da mesma forma que a solução da amostra, sem enzima.

Avaliação da inibição enzimática. Em microplacas de 96 poços de fundo plano, 20 μ L de amostra foram pré-incubado com 10 μ L da solução da enzima α -glicosidase, durante 5 min, a 25 °C. Em seguida, foram adicionados 40 μ L de solução de ρ NPG. A mistura foi incubada a 37 °C, em banho-maria, por 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 100 μ L de solução de bicarbonato de sódio. O máximo de absorbância foi determinado,

no comprimento de onda 400 nm, em leitora de microplacas Multimode Plate Reader, Perkin Elmer, EnSpire.

Para verificar uma possível interferência dos solventes na inibição enzimática, os mesmos foram avaliados (na maior concentração utilizada) nas mesmas condições experimentais que as amostras e os controles (positivo e negativo).

4.5.3 Determinação da atividade de inibição sobre a tirosinase

A avaliação da atividade enzimática da tirosinase foi realizada segundo o método descrito por Kathib et al. (2005). O método fundamenta-se na determinação quantitativa do dopacromo (KHATIB et al., 2005), como produto das reações envolvidas na via metabólica da melanina (KHATIB et al., 2005)(CHEN et al., 2015) (Figura 16), e foi padronizado com algumas modificações, para leitura em microplacas de 96 poços (FREITAS et al., 2016). A absorbância foi medida a 450 nm num leitor de microplacas (Multimode Plate Reader-Perkin Elmer EnSpire). As porcentagens de inibição foram calculadas de acordo com a equação:

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

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

Tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5. A solução foi preparada a partir da mistura de 2,38 g de fosfato de sódio monobásico (Vetec, 98%) e 2,11 g de fosfato de sódio dibásico (Synth, 99%), dissolvidos em 1000 mL de água destilada.

Solução de tirosinase 250 U/mL. (2500,0 U/mg sólido, Sigma Aldrich). A solução estoque foi preparada com 1 mg de tirosinase (2500 U/mL) dissolvido em 1 mL de PBS. A solução foi armazenada em freezer a temperatura de -20 °C. Para o ensaio, uma alíquota foi diluída para preparar a solução de trabalho uma solução equivalente a 250 U/mL em PBS

Solução de L-tirosina 2 mM (substrato). L-tirosina (Sigma Aldrich) foi dissolvida no mesmo tampão utilizado no ensaio, para o volume de solução suficiente para um ensaio

com 8 microplacas de 96 poços. A solução foi mantida refrigerada durante todo o experimento.

Solução de ácido kójico (96) (controle positivo). Como controle positivo de inibição da tirosinase foi utilizado o inibidor ácido kójico (Sigma Aldrich) (1,0 mg/mL de ácido kójico em água destilada). A curva dose-resposta foi estabelecida variando as concentrações entre 0,24 e 250 µg/mL.

Solução branco do controle. Foi preparada substituindo o volume da enzima por tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5), em cada poço, e L- tirosina.

Preparo do branco da amostra. Num poço foram misturados a amostra e L-tirosina, eliminando interferências relacionadas tanto com a coloração das amostras como absorvância da de L-tirosina.

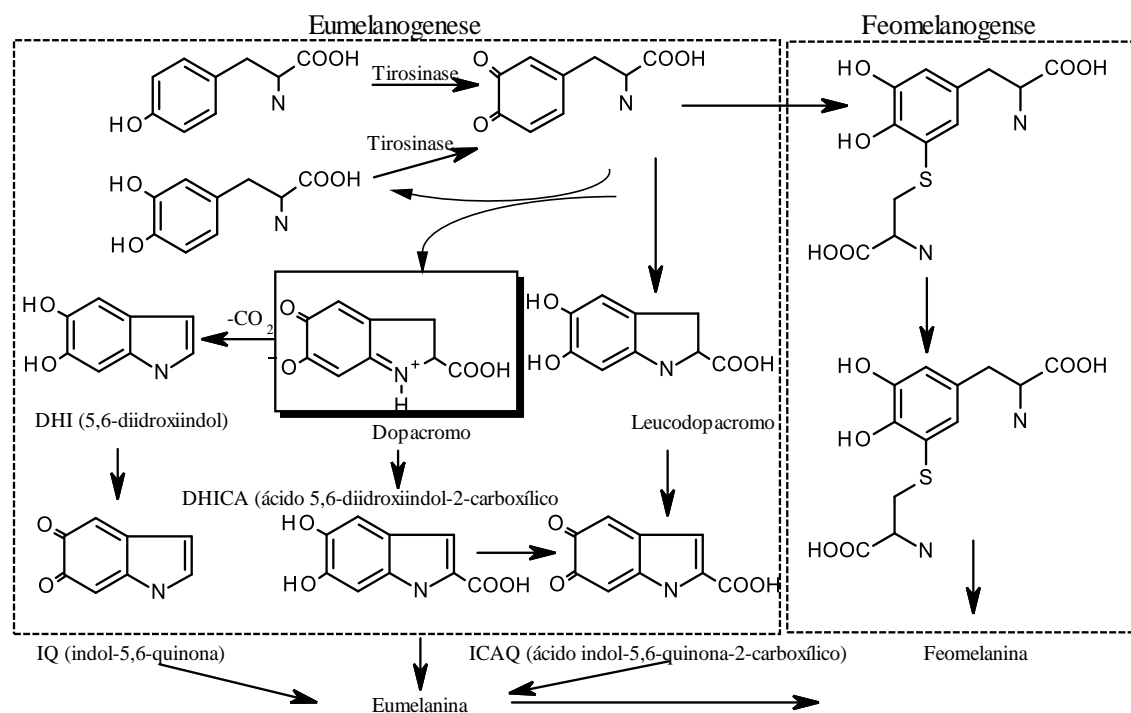


Figura 16. Via Biosintética da melanina, diferentes intermediários e produto de interesse: Dopacromo. (CHANG, 2009)

Preparo das amostras. As amostras (extratos etanólicos e as frações aquosas e de acetato de etila) foram preparadas de modo que a concentrações finais no meio de razão fossem entre 500-7,8 µg/mL, em diluição seriada. O volume final na etapa de pré-incubação foi 140 µL. O solvente utilizado foi água destilada, para as frações aquosas; para os extratos em etanol e frações em acetato de etila foi utilizada uma solução com 5% de DMSO e 5%

metanol. A amostra diluída foi agitada mecanicamente durante 5 minutos e mantida em repouso durante 30 minutos antes do início da etapa de pré-incubação.

Avaliação da inibição enzimática. Em microplacas de 96 poços, foram adicionados 30 µL de solução de tirosinase, 60 µL de solução tampão fosfato de sódio e 10 µL da solução de extrato. Essa mistura foi incubada por 5 min a 25 °C. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de solução de L-tirosina. Após 20 min, a absorbância foi monitorada a 475 nm (leitor de microplacas – BioTeK Synergy HT) (FREITAS et al., 2016).

Para verificar uma possível interferência dos solventes na inibição enzimática, os mesmos foram avaliados (na maior concentração utilizada) nas mesmas condições experimentais que as amostras e os controles (positivo e negativo).

4.5.4 Determinação da atividade de inibição sobre acetilcolinesterase

A avaliação da atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase foi realizada com base na metodologia proposta por Ellman et al (1961), com algumas modificações (ELLMAN et al., 1961).

De acordo com essa técnica, a concentração de um dos produtos da hidrólise da acetilcolina pela enzima acetilcolinesterase a colina é determinada. A colina, produto da reação, reage diretamente com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB)(Figura 17) e produz 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina e ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (MOREIRA ANDRADE, 2015), composto de cor amarela (Figura 17), o qual apresenta um máximo de absorção no comprimento de onda 405 nm.

Inicialmente foi verificada a atividade da enzima. Foram estabelecidos os valores máximos da atividade, que ocorreu em 10 minutos, período de tempo no qual a reação manteve um comportamento estável, exibindo variações de absorbância menores que 2% e, como resultado, a geração de um composto derivado de colina e do composto colorido ácido 5-tio-2-nitro-benzoico (Figura 17). As porcentagens de inibição foram calculadas de acordo com a equação:

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

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

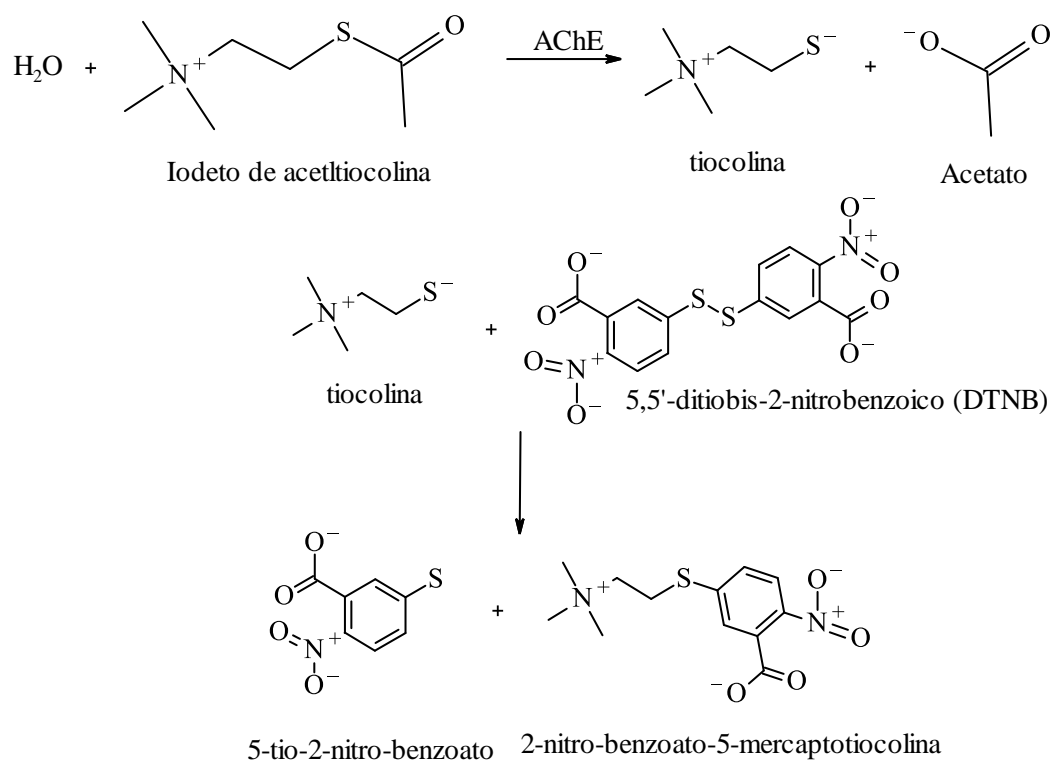


Figura 17. Reações envolvidas na determinação da atividade da acetilcolinesterase *in vitro* (Ellman et al., 1961)

As quantidades descritas, tanto de enzima como de substrato são aquelas necessárias para um ensaio utilizando duas placas de 96 poços.

Solução de acetilcolinesterase. Foi utilizada acetilcolinesterase (AChE) de *Electrophorus electricus* (137,0 U/mg sólido – 217 U/mg proteína-14,6 mg, Sigma Aldrich). A solução estoque foi preparada com 1 mg de AChE (137 U/mL) dissolvido em 1 mL de PBS. A solução foi armazenada em freezer a uma temperatura de -20°C . Para o ensaio, foi preparada uma solução a 0,25 U/mL em PBS.

Tampão fosfato (PBS) pH 7,5: A solução foi preparada a partir da dissolução, em água destilada suficiente para 1000 mL, de 0,28 g de fosfato de sódio monobásico (Vetec, 98%), 1,42 g do fosfato de sódio dibásico (Sinth, 99%) e 8,86 g de cloreto de sódio (Vetec, 99%).

Solução de acetiltiocolina (substrato). Imediatamente antes de começar o ensaio, foram dissolvidos em água destilada q.s.p para 20 mL, 1,4 mg de iodeto de acetiltiocolina (Sigma-Aldrich 98%), 114 mg de Na_2HPO_4 (Merck, 99%) e 1,6 mg de DTNB (Sigma–Aldrich 99%).

Solução de galantamina (I) (controle positivo). Galantamina, gentilmente cedida pela Libbs Farmacêutica, 1,0 mg, foi dissolvida em água destilada q.s.p. 1,0 mL.

Solução de fisostigmina (99) (controle positivo). Fisostigmina (Eserina >99%, Sigma-Aldrich), 1,0 mg, foi dissolvida em água destilada q.s.p. 1,0 mL.

Preparo de amostras. As amostras (extratos etanólicos e frações aquosas e em acetato de etila) foram preparadas de modo que a concentrações finais no meio de reação fossem 500, 250 e 5,0 µg/mL. O volume final na etapa de pré-incubação foi 150 µL. O solvente utilizado foi uma mistura de etanol 5%/ DMSO 0,1%.

Avaliação da inibição enzimática. Uma mistura constituída de 50,0 µL de tampão, 50,0 µL de amostra e 50,0 µL da solução de AChE foi distribuída em uma microplaca de 96 poços, posteriormente incubada por 30 minutos, ao abrigo da luz. Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução do substrato em cada poço. Após 10 minutos, a concentração do produto da reação foi medida por espectrofotometria, utilizando leitora de microplacas Multimode Plate Reader Perkin Elmer EnSpire, em comprimento de onda de 405 nm.

Para verificar uma possível interferência dos solventes na inibição enzimática, os mesmos foram avaliados (na maior concentração utilizada) nas mesmas condições experimentais que as amostras e os controles (positivo e negativo).

4.5.5 Determinação da porcentagem de inibição enzimática

Para verificar a capacidade inibitória e calcular o valor da porcentagem de inibição para cada ensaio, os extratos e frações foram avaliados utilizando a concentração de 500 µg/mL. A atividade foi estimada como o máximo valor de rendimento de reação, equivalendo a 100%, para cada ensaio, e teve como referência a equação utilizada para determinar a porcentagem de inibição.

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

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

4.5.6 Determinação dos valores de IC₅₀ dos extratos vegetais e análise estatística

Para as amostras que apresentaram uma capacidade inibitória superior a 70 %, foram construídas as curvas dose-resposta, determinando a concentração representando 50% da inibição máxima (IC₅₀) (SEBAUGH, 2011). As soluções utilizadas no ensaio foram preparadas nos solventes adequados, descartando qualquer efeito destes na reação enzimática. Todas as concentrações foram avaliadas em triplicata.

As curvas de inibição foram obtidas estabelecendo um gráfico com a porcentagem de inibição *versus* o logaritmo das concentrações das amostras ou do controle positivo. Foram utilizados e delimitados os parâmetros correspondentes à regressão não-linear, de acordo com o comportamento de cada curva, e os valores de IC₅₀ foram obtidos utilizando o software GraphPad Prism 7.0 XML Project.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO E TEOR DE UMIDADE

A avaliação do teor de umidade do material vegetal teve como objetivo identificar a massa real do material (seco), considerando que as extrações foram realizadas a partir do material fresco. Os valores obtidos para teor de umidade e o rendimento no processo de extração a partir do material vegetal são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados das análises de umidade e rendimento de extração para cada espécie vegetal.

| Espécie | Código | Parte usada | Material vegetal fresco (g) | Teor de umidade (%) | Extrato/fração | massa (g) | %R |
|--|--------------|-------------|-----------------------------|---------------------|----------------|-----------|-------|
| <i>Hymenocallis litorallis</i> . Jacq. Salisb. | MFS17 12 | Bulbo | 93,7 | 71,7 | EHex | 0,14 | 0,53 |
| | | | | | EEtOH | 4,20 | 15,83 |
| | | | | | FAcOEt | 0,16 | 0,60 |
| | | | | | FAq | 1,51 | 5,69 |
| <i>Hippeastrum psittacinum</i> . Herb. | GPS 10874 | Bulbo | 386,22 | 79,5 | EHex | 0,59 | 0,75 |
| | | | | | EEtOH | 4,04 | 5,10 |
| | | | | | FAcOEt | 0,13 | 0,16 |
| | | | | | FAq | 5,28 | 5,71 |
| <i>Habranthus irwinianus</i> Ravenna | ACA 62 | Bulbo | 62,14 | 73,05 | EHex | 0,25 | 1,49 |
| | | | | | EEtOH | 3,24 | 19,35 |
| | | | | | FAcOEt | 0,08 | 0,48 |
| | | | | | FAq | 0,87 | 5,20 |
| <i>Crinum</i> sp. | AAS 2712 | Bulbo | 341,61 | 68,85 | EHex | 0,56 | 0,53 |
| | | | | | EEtOH | 9,15 | 8,60 |
| | | | | | FAcOEt | 2,21 | 2,08 |
| | | | | | FAq | 7,00 | 6,58 |
| <i>Hippeastrum</i> sp. | EG 1190 | Bulbo | 83,75 | 71,3 | EHex | 0,15 | 0,62 |
| | | | | | EEtOH | 3,60 | 14,98 |
| | | | | | FAcOEt | 0,35 | 1,46 |
| | | | | | FAq | 1,62 | 6,74 |
| <i>Hippeastrum goianum</i> . Ravenna | HGB-c | Bulbo | 422,73 | 76,67 | EHex | 0,033 | 0,03 |
| | | | | | EEtOH | 9,20 | 9,33 |
| | | | | | FAcOEt | 0,02 | 0,02 |
| | | | | | FAq | 0,60 | 0,61 |
| <i>Crinum erubescens</i> L.f. ex Aiton | CEB | Bulbo | 1066,35 | 79,53% | EHex | 1,05 | 0,01 |
| | | | | | EEtOH | 6,20 | 0,60 |
| | | | | | FAcOEt | 0,21 | 0,02 |
| | | | | | FAq | 8,63 | 0,82 |
| <i>Crinum erubescens</i> L.f. ex Aiton | CEF | Folha | 1744,28 | 87,33% | EHex | 3,60 | 0,21 |
| | | | | | EEtOH | 8,87 | 0,51 |
| | | | | | FAcOEt | 0,28 | 0,02 |
| | | | | | FAq | 10,77 | 0,62 |

%R: Porcentagem de rendimento expressada em termos do material vegetal seco. EHex (extrato hexânico); EEtOH (extrato aquoso); FAcOEt (fração acetato de etila); FAq (fração aquosa)

Tabela 1. Resultados das análises de umidade e rendimento de extração para cada espécie vegetal (continuação).

| Espécie | Código | Parte usada | Material vegetal fresco (g) | umidade (%) | Extrato | massa (g) | %R |
|--|--------|-------------|-----------------------------|-------------|---------|-----------|-------|
| <i>Hippeastrum goianum</i> Ravenna | HGT | Talo | 547,93 | 90,19 | EHex | 0,36 | 0,67 |
| | | | | | EEtOH | 6,11 | 11,37 |
| | | | | | FACOEt | 0,30 | 0,56 |
| | | | | | FAq | 3,14 | 5,84 |
| <i>Hippeastrum goianum</i> Ravenna | HGF1 | Flor | 135,63 | 89,44 | EHex | 0,08 | 0,56 |
| | | | | | EEtOH | 1,07 | 7,47 |
| | | | | | FACOEt | 0,05 | 0,35 |
| | | | | | FAq | 0,71 | 4,96 |
| <i>Hippeastrum goianum</i> Ravenna | HGFr | Fruta | 8,28 | 87,32 | EHex | 0,08 | 7,43 |
| | | | | | EEtOH | 0,04 | 12,38 |
| | | | | | FACOEt | 0,13 | 3,52 |
| | | | | | FAq | 0,12 | 11,43 |
| <i>Hippeastrum puniceum</i> Lam. Kuntze | HPB | Bulbo | 786,89 | 76,25 | EHex | 1,54 | 0,82 |
| | | | | | EEtOH | 0,04 | 0,02 |
| | | | | | FACOEt | 2,78 | 1,49 |
| | | | | | FAq | 0,14 | 0,07 |
| <i>Hippeastrum puniceum</i> Lam. Kuntze | HPF | Folha | 271,89 | 84,05 | EHex | 0,14 | 0,32 |
| | | | | | EEtOH | 0,03 | 0,06 |
| | | | | | FACOEt | 2,56 | 5,90 |
| | | | | | FAq | 0,35 | 0,81 |
| <i>Hippeastrum goianum</i> Lam. Kuntze | HGB-s | Bulbo | 888,97 | 68,23 | EHex | 3,04 | 1,08 |
| | | | | | EEtOH | 0,04 | 0,01 |
| | | | | | FACOEt | 0,03 | 0,01 |
| | | | | | FAq | 0,27 | 0,10 |

%R: Porcentagem de rendimento expressada em termos do material vegetal seco. EHex (extrato hexânico); EEtOH (extrato aquoso); FACOEt (fração acetato de etila); FAq (fração aquosa)

Conforme observado na Tabela 1, as maiores porcentagens de rendimento foram dos extratos etanólicos e aquosos. A extração com hexano favoreceu a obtenção de extratos contendo compostos com características apolares, enquanto que a extração em etanol facilitou que os compostos de polaridade maior fossem extraídos. A extração ácido/base da torta, processo posterior às extrações em percolador com hexano e etanol, teve por objetivo extrair alcaloides remanescentes.

5.2 OBTENÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE EXTRATOS E FRAÇÕES UTILIZANDO CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Extratos etanólicos, aquosos e as frações acetato de etila foram testados a fim de identificar seus principais metabolitos. Para cada tipo de metabólito foi utilizada uma substância de referência como controle positivo para realizar uma comparação.

5.2.1 Análise qualitativa de compostos fenólicos

A observação da cromatoplaça sob luz ultravioleta, no comprimento de onda de 365 nm, mostrou manchas fluorescentes de cor esverdeada, alaranjada, azul ou amarela. Na Figura 18, se observa um componente laranja claro, ressaltado com linha tracejada.

A amostra 2 (*Hippeastrum psittacinum*) e a amostra 4 (*Crinum* sp.) apresentaram uma série de manchas fluorescentes azuladas, características de derivados de ácido cafeico. Uma mancha fluorescente na cor amarela, com Rf aproximado de 3,5, parece ser comum às amostras 1 (*Hymenocallis littoralis*), 2 (*Hippeastrum psittacinum*), 3 (*Habranthus irwinianus*). Uma mancha de fluorescência de cor amarela mais intensa, em Rf aproximado de 3,7 aparece nas amostras 5 (*Hippeastrum* sp.), 6 (*Hippeastrum goianum* Bulbo, HGB-s) e 7 (*Hippeastrum goianum* Bulbo, HGB-c).

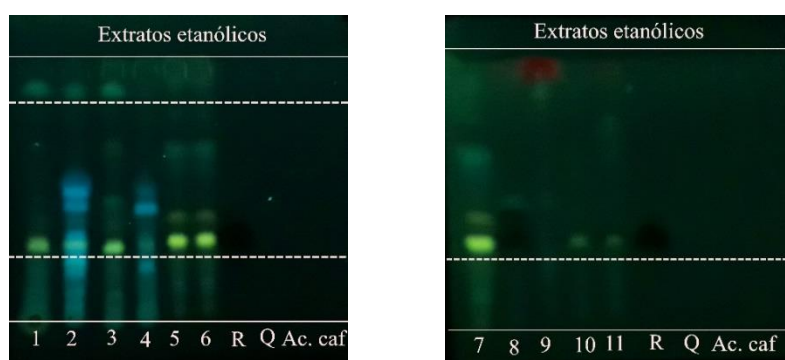


Figura 18. Cromatografia em camada delgada dos extratos etanólicos de Amaryllidaceae observada sob luz uv 365

Lado esquerdo: Extratos etanólicos, linha tracejada: fileira de compostos em comum. **1.** *Hymenocallis littoralis*, bulbo; **2.** *Hippeastrum psittacinum* bulbo; **3.** *Habranthus irwinianus*, bulbo; **4.** *Crinum* sp., bulbo; **5.** *Hippeastrum* sp, bulbo; **6.** *Hippeastrum goianum* Bulbo, HGB-s; **R.** Rutina; **Q.** quercetina; **Ac.caf.** ácido cafeico; **lado direito** **7.** *Hippeastrum goianum* Bulbo, HGB-c; **8.** *Hippeastrum goianum*, talo; **9.** *Hippeastrum goianum* Flor; **10.** *Hippeastrum goianum* Fruto **11.** *Hippeastrum puniceum* Bulbo; **R.** Rutina; **Q.** quercetina; **Ac.caf.** ácido cafeico. Eluente AcOEt/CH₂O₂/AcOH/H₂O (100:11:11:26) Observado: UV, λ 365 nm.

A Figura 19 mostra a CCD dos extratos etanólicos ao serem revelados com NP/PEG (Natural Products / Polietilenoglicol 4000). Os resultados indicam possivelmente a presença de compostos fenólicos de tipo flavonoide, para as manchas de cor amarelo e verde, marcadas de forma tracejada na Figura 19. No entanto, foi possível observar um segundo componente em comum nos extratos *I* a *7* (Figura 19). Esses compostos podem ter um núcleo estrutural do tipo flavona/flavonol ou fenólico, respectivamente (WAGNER; BLADT, 1996), adicionalmente se observou uma mancha de cor laranja nos extratos *8* e *II*, ressaltada com a segunda linha tracejada imagem lado direito, mostrando uma possível semelhança com a mancha observada para rutina na mesma placa (Figura 19).

A Figura 19, mostra a mesma cromatoplaça revelada com NP/PEG (R1), que intensifica a fluorescência de compostos fenólicos, quando observados sob luz ultravioleta.

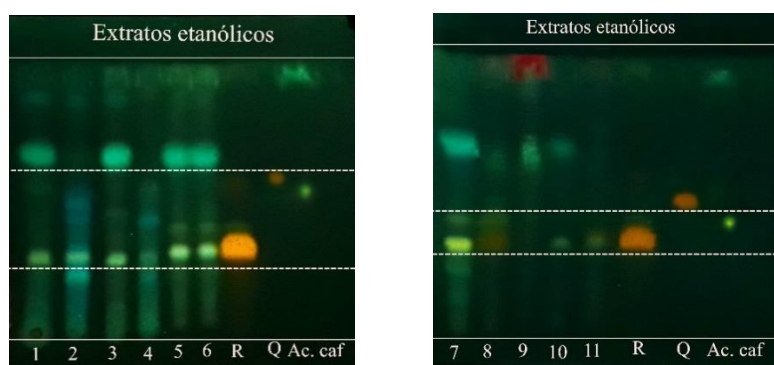


Figura 19. CCD de extratos etanólicos de Amaryllidaceae observada sob luz uv 365 nm após revelada com solução NP-PEG

Lado esquerdo: Extratos etanólicos; linha tracejada: fileira de compostos em comum. 1. *Hymenocallis litorallis*, bulbo; **2.** *Hippeastrum psittacinum* bulbo; **3.** *Habranthus irwinianus*, bulbo; **4.** *Crinum* sp., bulbo; **5.** *Hippeastrum* sp, bulbo; **6.** *Hippeastrum goianum* Bulbo, HGB-s; **R.** Rutina; **Q.** quercetina; **Ac.caf.** ácido cafeico; **Lado direito; 7.** *Hippeastrum goianum* Bulbo, HGB-c; **8.** *Hippeastrum goianum*, talo; **9.** *Hippeastrum goianum* Flor; **10.** *Hippeastrum goianum* Fruto **11.** *Hippeastrum puniceum* Bulbo. **R.** Rutina; **Q.** quercetina; **Ac.caf.** ácido cafeico. Eluente AcOEt/CH₂O₂/AcOH/H₂O (100:11:11:26)

Na Figura 20, foram eluídas três amostras: extrato etanólico de *H. goianum*, talo (amostra 8), rutina e um ponto misto contendo amostra 8 e rutina (R+8). Foi observado um aumento leve na intensidade da banda (R+8), com o qual se infere a possível presença de rutina no extrato.



Figura 20. CCD da amostra 8, rutina (R) e rutina com amostra (R+8). Eluente AcOEt/CH₂O₂/AcOH/H₂O (100:11:11:26)

5.2.2 Análise qualitativa de alcaloides

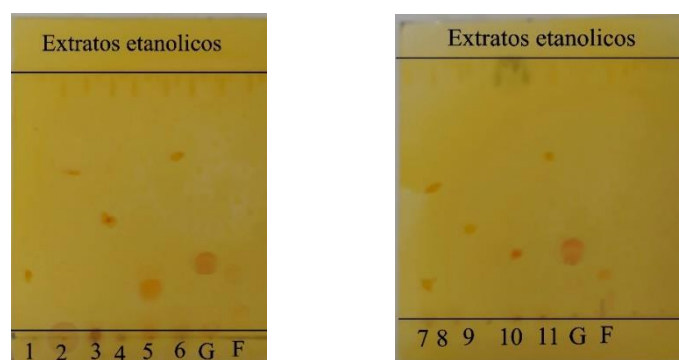


Figura 21. Cromatografia em camada delgada dos extratos etanólicos de Amaryllidaceae. Lado esquerdo: Extratos etanólicos. 1. *Hymenocallis litorallis* Bulbo; 2. *Hippeastrum psittacinum* Bulbo; 3. *Habranthus irwinianus* Bulbo; 4. *Crinum* sp. Bulbo; 5. *Hippeastrum* sp. Bulbo; 6. *Hippeastrum goianum* Bulbo, HGB-s; substâncias de referência G. Galantamina; F. Fisostigmina. Lado direito: Extratos etanólicos. 7. *Hippeastrum goianum* Bulbo, HGB-c; 8. *Hippeastrum goianum* Talo; 9. *Hippeastrum goianum* Flor; 10. *Hippeastrum goianum* Fruto 11. *Hippeastrum puniceum* Bulbo; substâncias de referência G. Galantamina; F. Fisostigmina. Eluente: CHCl₃/AcOEt/MeOH (45:40:15) Solução reveladora: Reagente de Dragendorff.

A partir do teste de Dragendorff, foi possível identificar manchas relacionadas a presença do grupo de metabolitos conhecidos como alcaloides de Amaryllidaceae (Figura 21). O teste foi considerado positivo ao serem visualizadas manchas com cor laranja como produto da reação entre os compostos alcaloídicos e o reagente de Dragendorff.

As cromatoplasmas dos extratos etanólicos (Figura 21) mostraram manchas de cor laranja, com Rf: 1 (0,2), 3 (0,26), 5 (0,1), 6 (0,48), 8 (0,4), 9 (0,26), 10 (0,18) e 11 (0,86) (Figura 21).

Na análise das frações aquosas (FAq) e em acetato de etila (FAcOEt) não foram identificadas manchas características de alcaloides, sendo considerada a prova como

negativa (CCD não mostrada). Como substâncias de referência foram utilizadas galantamina (**1**) e fisostigmina (**99**), mostrando valores R_f de 0.36 e 0.15 respectivamente.

5.2.3 Análise qualitativa de metabólitos secundários por cromatografia em camada delgada

A solução de vanilina-ácido sulfúrico é também conhecida como um revelador universal (WAGNER; BLADT, 1996). Após o aquecimento da cromatoplaça, se considera uma resposta positiva para manchas de cor roxo, marrom ou verde escuro para metabólitos do tipo catequinas, triterpenos e esteroides

A análise por CCD dos extratos etanólicos, para a identificação de compostos com núcleos tipo esteroidal ou triterpeno, mostrou alguns pontos semelhantes na composição química dos extratos etanólicos (Figura 22). Os extratos identificados com os números 1-7, 8 e 11 (Figura 22) apresentaram manchas em comum no R_f 0,36, enquanto o extrato EEtOH de *Hippeastrum* sp apresentou duas manchas com R_f 0,46 e 0,7. Na cromatoplaça do lado direito o EEtOH de *H. puniceum* apresentou duas manchas R_f 0,36 e 0,4, enquanto nos demais extratos não foi possível identificar manchas características de núcleos esteroidal ou , triterpênico. O EEtOH de *H. goianum* (talo) apresentou três manchas nos R_f 0,36 0,76 e 0,8. A comparação com os padrões, β -sitosterol, mistura de α e β -amirina e lupeol permitiu observar que nas amostras 8 e 11 parece haver β -sitosterol.

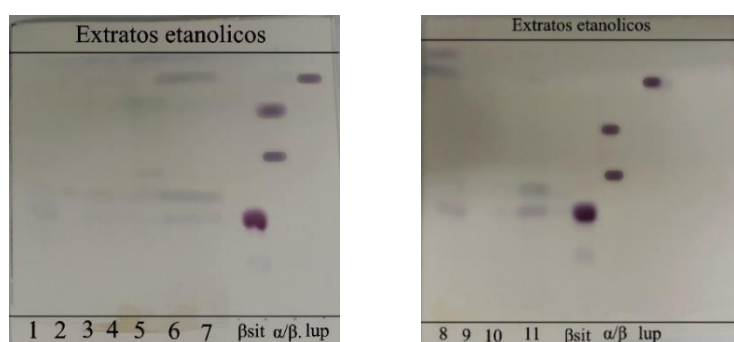


Figura 22. Resultado de avaliação identificação de triterpenos e esteroides em extratos etanólicos de Amaryllidaceae Lado esquerdo: **1.** *Hymenocallis litorallis* Bulbo; **2.** *Hippeastrum psittacinum* Bulbo; **3.** *Habranthus irwinianus* Bulbo; **4.** *Crinum* sp. Bulbo; **5.** *Hippeastrum* sp. Bulbo; **6.** *Hippeastrum goianum* Bulbo, HGB-s; **βsit.** β -sitoesterol; **α/β.** mistura α e β amirina; **lup.** Lupeol; **7.** *Hippeastrum goianum* Bulbo, HGB-c; **lado direito:** **8.** *Hippeastrum goianum* Talo; **9.** *Hippeastrum goianum* Flor; **10.** *Hippeastrum goianum* Fruto **11.** *Hippeastrum puniceum* Bulbo; **βsit.** β -sitoesterol; **α/β.** mistura α e β amirina; **lup.** Lupeol. **solução reveladora:** Vanilina/ H_2SO_4 Eluente: Hex /AcOEt (8:2)

As frações aquosas e em acetato de etila não apresentaram manchas, indicando a ausência dos metabolitos pertencentes a esses grupos (cromatoplaca não mostrada).

5.3 VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA PELOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS ESPÉCIES DE AMARYLLIDACEAE.

Visando identificar a atividade dos extratos frente a cada uma das enzimas de interesse, foi realizada uma triagem com o intuito de identificar a porcentagem de inibição dos extratos e frações. Para aqueles extratos e frações que apresentaram inibição $\geq 70\%$, foram construídas curvas dose-resposta. Finalmente foram calculados os valores de concentração inibitória 50% ou IC₅₀.

5.4 Determinação da atividade de inibição sobre α -amilase

A atividade inibitória frente a enzima α -amilase de extratos e frações de plantas da família Amaryllidaceae é apresentada na Tabela 2. Os resultados mostraram que 19 das 42 amostras testadas apresentaram capacidade inibitória, com valores superiores a 70% quando testados a 500 $\mu\text{g/mL}$. Os extratos etanólicos e as frações acetato de etila apresentaram os melhores valores de inibição sobre α -amilase, enquanto as frações aquosas, em geral, foram as menos ativas. A fração aquosa dos bulbos de *Crinum* sp se destacou das demais frações aquosas, ao inibir acima de 85%. Como controle positivo foi utilizado o inibidor acarbose (80 $\mu\text{g/mL}$, 99,7 % de inibição) e os resultados são apresentados na Tabela 2.

A espécie *H. litorallis* apresentou o maior valor de inibição dentre os extratos etanólicos (99,38%), e pode ser o resultado da presença de compostos com características fenólicas, observados na análise em CCD (Figura 19), capazes de inibir a enzima α -amilase (GIOVANNINI; HOWES, 2017). Em contrapartida, os extratos de *H. goianum* (fruto) (31,47%) e *H. puniceum* (bulbo) (34,18%) não conseguiram atingir o 70% de inibição nessa concentração. Ainda, nenhuma das amostras de *Crinum erubescens* apresentou atividade.

Tabela 2. Capacidade de inibição da α -amilase por extratos e frações de espécies de Amaryllidaceae

| material botânico | amostra | inibição (%) |
|--|-----------------------|---------------------|
| <i>Hymenocallis litorallis</i> (bulbo) | EEtOH | 99,38±0,56 |
| | FAcOEt | 94,93±0,56 |
| | FAq | 54,37±1,21 |
| <i>Hippeastrum psittacinum</i> (bulbo) | EEtOH | 99,14±0,56 |
| | FAcOEt | 70,87±1,32 |
| | FAq | 50,03±0,58 |
| <i>Habranthus irwinianus</i> (bulbo) | EEtOH | 85,39±0,40 |
| | FAcOEt | 77,72±0,60 |
| | FAq | 15,05±0,40 |
| <i>Crinum sp.</i> (bulbo) | EEtOH | 74,48±0,53 |
| | FAcOEt | 97,56±0,57 |
| | FAq | 88,63±0,83 |
| <i>Hippeastrum sp.</i> (bulbo) | EEtOH | 87,60±0,76 |
| | FAcOEt | 93,57±0,53 |
| | FAq | 53,71±0,91 |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (bulbo) (HGB-s) | EEtOH | 92,13±0,50 |
| | FAcOEt | 64,00±0,80 |
| | FAq | ND |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (talo) (HGT) | EEtOH | 90,92±0,82 |
| | FAcOEt | 41,40±1,65 |
| | FAq | ND |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (flor) (HGFl) | EEtOH | 72,33±0,42 |
| | FAcOEt | 82,74±2,47 |
| | FAq | ND |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (fruto) (HGFr) | EEtOH | 30,97±0,58 |
| | FAcOEt | 97,39±1,95 |
| | FAq | ND |
| <i>Hippeastrum puniceum</i> (bulbo)(HPB) | EEtOH | 34,18±3,31 |
| | FAcOEt | 94,38±0,87 |
| | FAq | ND |
| <i>Hippeastrum puniceum</i> (folha) (HPF) | EtOH | 90,76±0,59 |
| | AcOEt | 91,99±0,47 |
| | Aq | ND |
| | acarbose ¹ | 99,70±1,21 |

Concentração máxima testada para os extratos: 500 $\mu\text{g/mL}$; ND Não determinado; ¹ Controle positivo concentração máxima testada 80 $\mu\text{g/mL}$; os resultados da inibição foram expressos em porcentagem de inibição \pm SD (desvio padrão); EEtOH (extrato etanólico); FAcOEt (fração acetato de etila.); FAq (fração aquosa)

Tabela 2. Capacidade de inibição da α -amilase por extratos e frações de espécies de Amaryllidaceae (continuação)

| material botânico | amostra | inibição (%) |
|--|-----------------------|--------------|
| <i>Hippeastrum goianum</i> (bulbo) (HGB-c) | EtOH | 93,82±0,59 |
| | AcOEt | 94,27±0,61 |
| | Aq | ND |
| <i>Crinum erubescens</i> (bulbo) (CEB) | EtOH | 57,80±1,07 |
| | AcOEt | 51,00±1,46 |
| | Aq | 33,05±1,67 |
| <i>Crinum erubescens</i> (folha) (CEF) | EtOH | 62,61±0,02 |
| | AcOEt | 58,43±0,02 |
| | Aq | 44,65±0,03 |
| | acarbose ¹ | 99,70±1,21 |

Concentração máxima testada para os extratos: 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ND Não determinado; ¹ Controle positivo concentração máxima testada 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$; os resultados da inibição foram expressos em porcentagem de inibição \pm SD (desvio padrão); EEtOH (extrato etanólico); FAcOEt (fração acetato de etila).; FAq (fração aquosa)

Vale ressaltar os resultados encontrados para os extratos etanólico de talo, a fração acetato de etila de flor e de fruto de *H. goianum*, que alcançaram atividade inibitória de 90,92%, 82,74% e 97,39%, respectivamente. Estes órgãos vegetais, por apresentarem localização aérea, são estimulados a produzir compostos fenólicos, o que pode justificar a atividade encontrada (ALU'DATT et al., 2017)

A fração acetato de etila (AcOEt) de bulbos de *Crinum* sp. mostrou inibição de 97,52%, o maior valor entre as amostras estudadas. A fração AcOEt obtida dos bulbos de *H. litorallis* apresentou um valor de inibição de 94,93%.

Para os extratos e frações que mostraram uma capacidade inibitória superior a 70% sobre a enzima α -amilase, foram construídas curvas com concentrações entre 7,8 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a fim de determinar o IC₅₀ frente a enzima α -amilase. Os resultados são apresentados na Tabela 3.

Para a acarbose, utilizada como controle positivo, a curva dose-resposta foi construída com concentrações entre 1 e 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Foi obtida a inibição máxima de 99,7% e IC₅₀ de 4,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 23).

Tabela 3. Concentração de extratos e frações de espécies de Amaryllidaceae capazes de inibir 50% da atividade de α -amilase

| material botânico | amostra | IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) |
|--|-----------------------|---------------------------------------|
| <i>Hymenocallis litorallis</i> (bulbo) | EEtOH | 105,0 \pm 0,94 |
| | FAcOEt | 155,2 \pm 0,94 |
| <i>Hippeastrum psittacinum</i> (bulbo) | EEtOH | 141,3 \pm 0,90 |
| | FAcOEt | 117,2 \pm 0,93 |
| <i>Habranthus irwinianus</i> (bulbo) | EEtOH | 144,0 \pm 0,92 |
| | FAcOEt | 122,4 \pm 0,93 |
| <i>Crinum sp.</i> (bulbo) | EEtOH | 114,9 \pm 0,92 |
| | FAcOEt | 69,7 \pm 0,91 |
| | FAq | 117,2 \pm 0,92 |
| <i>Hippeastrum sp.</i> (bulbo) | EEtOH | 136,6 \pm 0,90 |
| | FAcOEt | 132,4 \pm 0,92 |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (bulbo) (HGB-s) | EEtOH | 53,6 \pm 0,86 |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (talo) (HGT) | EEtOH | 71,7 \pm 0,92 |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (flor) (HGFl) | EEtOH | 72,3 \pm 0,91 |
| | FAcOEt | 82,7 \pm 0,92 |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (fruto) (HGFr) | FAcOEt | 113,6 \pm 0,91 |
| <i>Hippeastrum puniceum</i> (folha) (HPF) | EEtOH | 89,78 \pm 0,88 |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (bulbo) (HGB-c) | EEtOH | 80,0 \pm 0,90 |
| | FAcOEt | 68,8 \pm 0,90 |
| | acarbose ¹ | 4,2 \pm 0,95 |

¹Controle positivo; os resultados do IC₅₀ foram expressos em $\mu\text{g/mL} \pm \text{SD}$ (desvio padrão); EEtOH (extrato etanólico); FAcOEt (fração acetato de etila); FAq (fração aquosa)

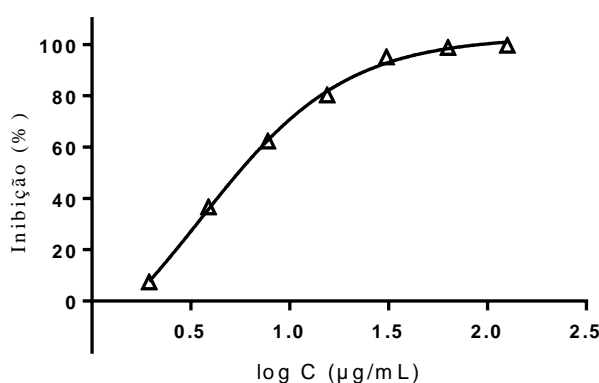


Figura 23. Curva dose-resposta da acarbose no ensaio de inibição da α -amilase

As Figuras 23 a 29 mostram as curvas dose-resposta construídas com extratos e frações que apresentaram inibição da α -amilase maior que 70 %.

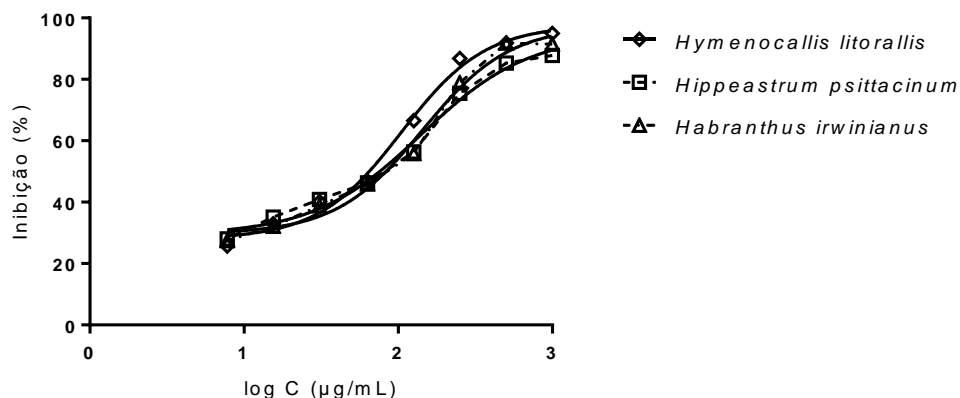


Figura 24. Curva dose-resposta de inibição de α -amilase promovida por extratos etanólicos obtidos de bulbos de *Hymenocallis litorallis*, *Hippeastrum psittacinum* e *Habranthus irwinianus*

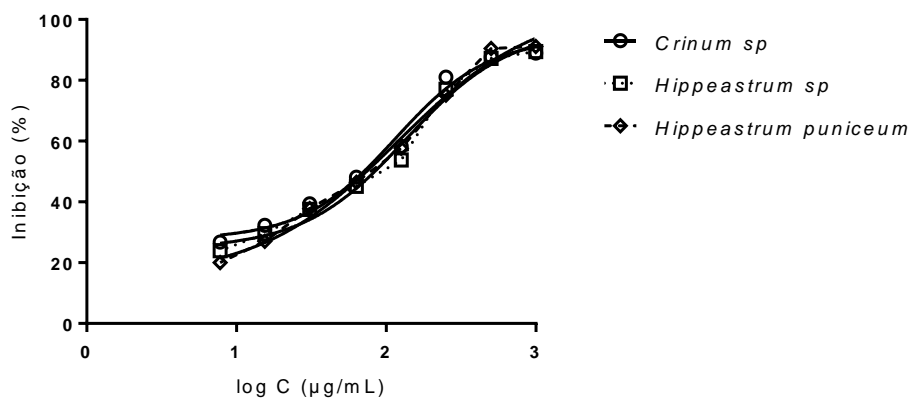


Figura 25. Curva dose-resposta de inibição de α -amilase promovida por extratos etanólicos obtidos de *Crinum sp* (bulbo), *Hippeastrum sp* (bulbo) e *Hippeastrum puniceum* (folha)

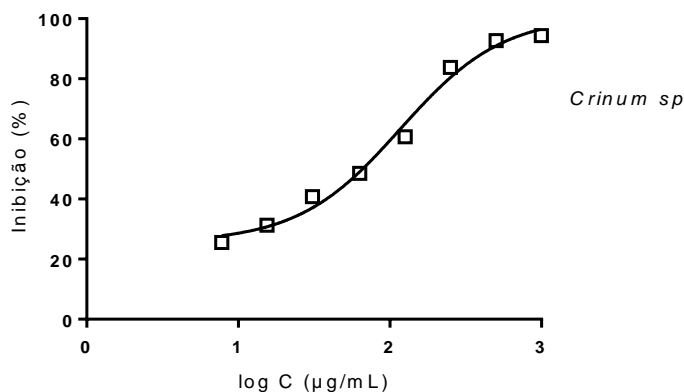


Figura 26. Curva dose-resposta de inibição de α -amilase promovida por fração aquosa obtida de *Crinum sp* (bulbo).

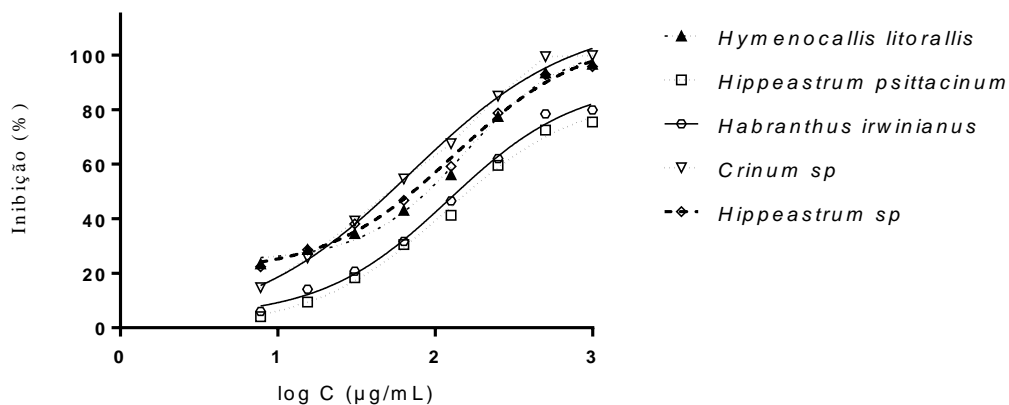


Figura 27. Curva dose-resposta de inibição de α -amilase promovida por fração acetato de etila obtida de bulbos de *Hymenocallis litorallis*, *Hippeastrum psittacinum*, *Habranthus irwinianus*, *Crinum sp.* e *Hippeastrum sp.*

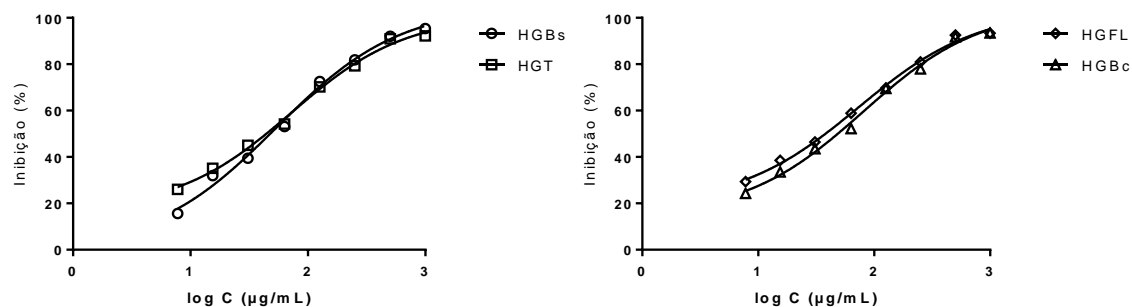


Figura 28. Curva dose-resposta de inibição de α -amilase promovida por extratos etanólicos de *Hippeastrum goianum*. Lado direito: HGB-s: Bulbo, HGT: Talo Lado esquerdo: HGFL: Flor, HGB-c: Bulbo

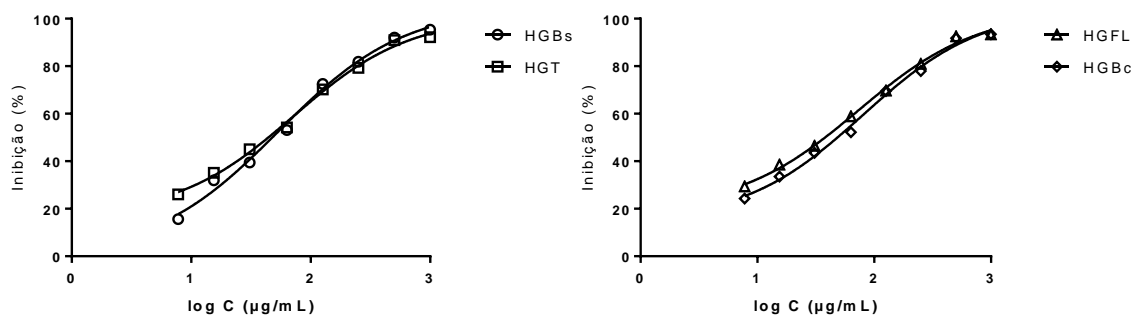


Figura 29. Curva dose-resposta de inibição de α -amilase promovida por frações em acetato de etila de *Hippeastrum goianum* ensaio α -amilase. HGB-s, HGT (talo), HGFL: Flor, HGB-c: Bulbo

Para as curvas dose-resposta de todas as amostras avaliadas frente à enzima α -amilase, foi possível observar uma tendência sigmoideal de inibição, nas qual a atividade enzimática tornou-se constante, independente da variação na concentração de inibidor.

Os menores valores de concentração inibitória (IC_{50}) foram observados para as frações acetato de etila de *Crinum* sp ($IC_{50} = 69,7$ mg/mL), *H. goianum* (amostras: HGB-c, $IC_{50} = 68,8$ mg/mL; HGB-s, $IC_{50} = 53,6$ mg/mL). É importante observar que amostras de *H. goianum* obtidas em uma mesma época do ano, apresentaram resultados de atividade biológica diferentes. Tais diferenças corroboram a interferência das características da área de coleta na composição micromolecular da amostra analisada e a necessidade de monitoramento da área de obtenção de qualquer material vegetal para utilização como insumo para fitoterápicos ou matéria-prima para obtenção de fitofármacos.

5.5 Determinação da atividade de inibição sobre α -glicosidase

A atividade de inibição da enzima α -glicosidase por 42 extratos e frações de espécies de Amaryllidaceae é apresentada na Tabela 4. Os resultados mostraram que, sete das amostras avaliadas apresentaram capacidade inibitória superior a 70% quando testadas a 500 μ g/mL. Como controle positivo foi utilizado o inibidor desoxinojirimicina (99).

Tabela 4. Capacidade inibição da α -glicosidase por extratos e frações de espécies de Amaryllidaceae

| material botânico | amostra | inibição (%) |
|--|---------------------------------|-------------------|
| <i>Hymenocallis litorallis</i> (bulbo) | EEtOH | 61,02 \pm 0,63 |
| | FACOEt | 56,48 \pm 0,81 |
| | FAq | 39,05 \pm 0,59 |
| <i>Hippeastrum psittacinum</i> (bulbo) | EEtOH | 60,70 \pm 0,62 |
| | FACOEt | 66,92 \pm 1,00 |
| | FAq | 52,53 \pm 0,41 |
| <i>Habranthus irwinianus</i> (bulbo) | EEtOH | 84,39 \pm 0,21 |
| | FACOEt | 85,25 \pm 0,67 |
| | FAq | 24,38 \pm 0,31 |
| | desoxinojirimicina ¹ | 92,48 \pm 0,012 |

Concentração máxima testada para os extratos: 500 μ g/mL; ND Não determinado; ¹ Controle positivo concentração máxima testada 500 μ g/mL; os resultados da inibição foram expressos em porcentagem de inibição \pm SD (desvio padrão); EEtOH (extrato etanólico); FACOEt (fração acetato de etila); FAq (fração aquosa)

Tabela 4. Capacidade inibição da α -glicosidase por extratos e frações de espécies de Amaryllidaceae (continuação)

| material botânico | amostra | inibição (%) |
|--|---------------------------------|---------------------|
| <i>Crinum</i> sp. (bulbo) | EEtOH | 78,01±0,56 |
| | FAcOEt | 61,32±0,62 |
| | FAq | 82,62±0,27 |
| <i>Hippeastrum</i> sp. (bulbo) | EEtOH | 75,67±0,76 |
| | FAcOEt | 56,83±0,63 |
| | FAq | 44,63±2,00 |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (bulbo) (HGB-s) | EEtOH | 55,61±0,33 |
| | FAcOEt | 60,38±0,84 |
| | FAq | ND |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (talo) (HGT) | EEtOH | 62,05±0,66 |
| | FAcOEt | 81,85±0,36 |
| | FAq | ND |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (flor) (HGFl) | EEtOH | 41,20±0,67 |
| | FAcOEt | 81,14±0,64 |
| | FAq | ND |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (fruto) (HGFr) | EEtOH | 43,34±0,53 |
| | FAcOEt | 61,68±0,67 |
| | FAq | ND |
| <i>Hippeastrum puniceum</i> (bulbo) (HPB) | EEtOH | 47,52±0,50 |
| | FAcOEt | 57,15±0,34 |
| | FAq | ND |
| <i>Hippeastrum puniceum</i> (folha) (HPF) | EEtOH | 48,13±0,50 |
| | FAcOEt | 47,03±1,07 |
| | FAq | ND |
| <i>Crinum erubescens</i> (bulbo) (CEB) | EEtOH | 58,26 ±0,36 |
| | FAcOEt | 52,83 ±0,69 |
| | FAq | 50,01 ±0,60 |
| <i>Crinum erubescens</i> (folha) (CEF) | EEtOH | 44,94 ±0,75 |
| | FAcOEt | 50,89± 0,43 |
| | FAq | 48,94± 0,26 |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (bulbo) (HGB-c) | EEtOH | 47,50±0,68 |
| | FAcOEt | 60,43±0,70 |
| | FAq | ND |
| | desoxinojirimicina ¹ | 92,48±0,012 |

Concentração máxima testada para os extratos: 500 µg/mL; ND Não determinado; ¹Controle positivo concentração máxima testada 500µg/mL; os resultados da inibição foram expressos em porcentagem de inibição ± SD (desvio padrão); EEtOH (extrato etanólico); FAcOEt (fração acetato de etila); FAq (fração aquosa)

O extrato etanólico e a fração acetato de etila de bulbos de *H. irwinianus* apresentaram o maior potencial de inibição dentre as amostras testadas. Para *Crinum* sp, o extrato etanólico e a fração aquosa foram os que apresentaram maior capacidade inibitória enzimática (78,01% e 82,62% respectivamente). Para *Hippeastrum* sp. (bulbo), somente o extrato etanólico apresentou atividade inibitória de α -glicosidase (75,67%).

Quanto às amostras de *Hippeastrum goianum* HGB-s (bulbo), HGT (talo), HGFl (flor), HGFr (fruto) e HGB-c (bulbo), somente as frações acetato de etila de HGFl (flor) e HGT (talo) puderam ser destacadas com inibições de 81,14% e 81,85%, respectivamente.

Da mesma forma que foi feito para os ensaios de inibição da α -amilase, para as amostras que apresentaram uma capacidade inibitória superior a 70%, frente à enzima α -glicosidase, foram construídas curvas dose-resposta com concentrações entre 7,8 $\mu\text{g/mL}$ a 1000 $\mu\text{g/mL}$, a fim de determinar os valores de IC_{50} (Tabela 5).

Tabela 5. Concentração de extratos e frações de espécies de Amaryllidaceae capaz de inibir 50% da atividade da α -glicosidase

| material botânico | amostra | IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) |
|---|---------------------------------|---------------------------------------|
| <i>Habranthus irwinianus</i> (bulbo) | EEtOH | 90,22 \pm 0,90 |
| | FAcOEt | 31,97 \pm 0,80 |
| <i>Crinum</i> sp. (bulbo) | EEtOH | 69,53 \pm 0,87 |
| | FAq | 44,49 \pm 0,87 |
| <i>Hippeastrum</i> sp. (bulbo) | EEtOH | 71,01 \pm 0,91 |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (talo) (HGT) | FAcOEt | 52,77 \pm 0,96 |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (flor)(HGFl) | FAcOEt | 42,82 \pm 0,93 |
| | desoxinojirimicina ¹ | 40,44 \pm 0,92 |

¹ Controle positivo; os resultados do IC_{50} foram expressos em $\mu\text{g/mL} \pm \text{SD}$ (desvio padrão); EEtOH (extrato etanólico); FAcOEt (fração acetato de etila); FAq (fração aquosa)

Para o controle positivo, desoxinojirimicina, foi construída uma curva dose-resposta numa faixa de concentrações entre 1,95 e 500 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 30), dando resultando numa atividade máxima de inibição de 92,48% e um valor de IC_{50} igual a 40,44 $\mu\text{g/mL}$.

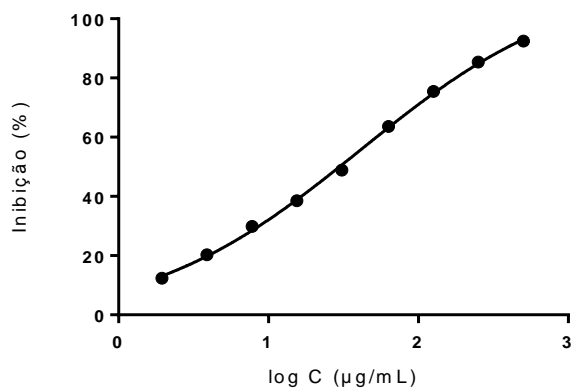


Figura 30. Curva dose-resposta da desoxinojirimicina no ensaio de inibição da α -glicosidase.

Diferente dos valores obtidos nos testes de inibição da α -amilase [onde a comparação da acarbose com aqueles apresentados pelos extratos e frações mostrou que a substância de referência apresentou um IC_{50} mais de 10 vezes menor (4,2 $\mu\text{g/mL}$) que a amostra que apresentou o menor valor de IC_{50} (53,2 $\mu\text{g/mL}$)], no teste de inibição da α -glicosidase, das sete amostras para as quais foi determinado o IC_{50} , deve ser destacada a fração acetato de etila da *H. irwinianus* ($IC_{50} = 31,65 \mu\text{g/mL}$), com valor menor que o apresentado pela substância de referência, desoxinojirimicina ($IC_{50} = 40,44 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 5).

Tanto a fração acetato de etila de flor de *Hippeastrum goianum* (HGFl, $IC_{50} = 42,82 \mu\text{g/mL}$), quanto a fração aquosa de bulbos de *Crinum* sp ($IC_{50} = 44,49 \mu\text{g/mL}$) mostraram-se muito similares ao valor da substância de referência.

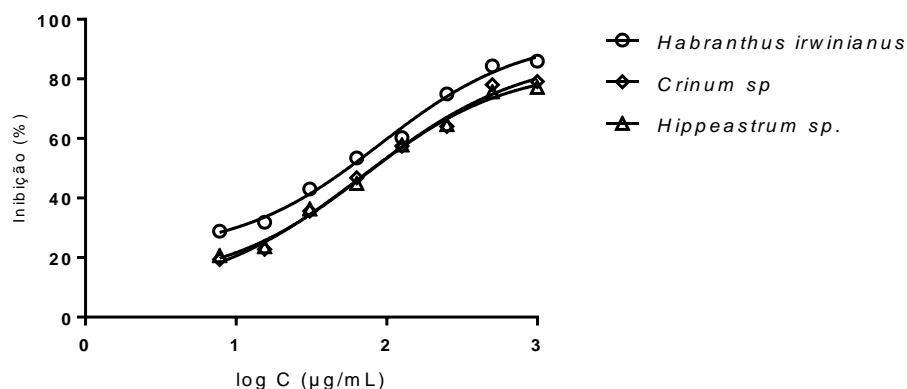


Figura 31. Curva dose-resposta para o ensaio de inibição da α -glicosidase dos extratos etanólicos de bulbos de *Habranthus irwinianus*, *Crinum* sp., e *Hippeastrum* sp.

As curvas-dose resposta construídas para as sete amostras com capacidade de inibição significativa estão representadas nas Figuras 31 a 33.

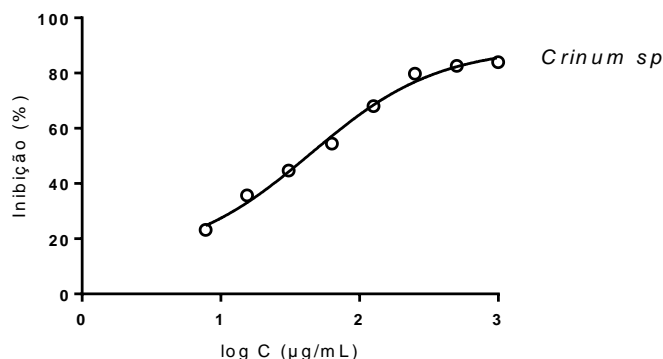


Figura 32. Curva dose-resposta para o ensaio de inibição da α -glicosidase da fração aquosa de bulbos de *Crinum* sp.

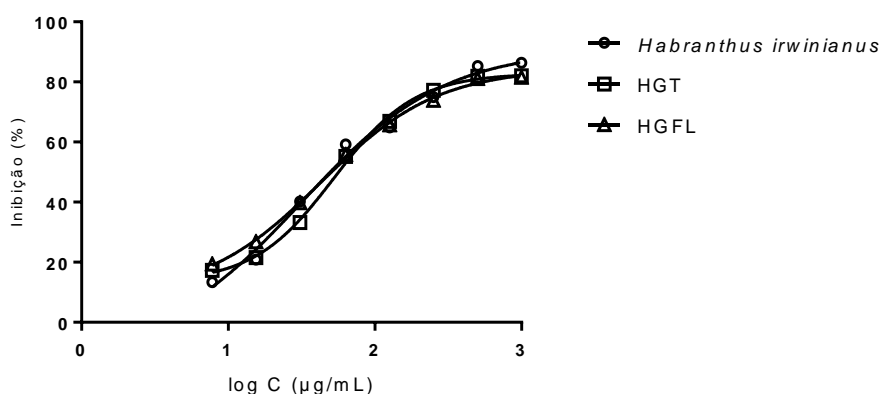


Figura 33. Curva dose-resposta para o ensaio de inibição da α -glicosidase das frações acetato de etila obtidas de bulbos de *Habranthus irwinianus*, talos (HGT) e flores (HGFL) de *Hippeastrum goianum*.

Para espécies da família Amaryllidaceae, poucos estudos podem ser encontrados sobre a capacidade de inibição enzimática, exceto no que se refere às enzimas acetil- e butirilcolinesterase. Até onde vai nosso conhecimento, somente espécies do gênero *Allium* (*A. sativum*, *A. cepa*, *A. stipitatum*, *A. victorialis*) e *Curculigo orchoides* foram avaliadas quanto à inibição de α -amilase (AUGUSTI, 1974; EZURUIKE F; PRIETO, 2014; GULATI; HARDING; PALOMBO, 2012; LI et al., 2011; NICKAVAR; YOUSEFIAN, 2009; OYEDEMI et al., 2009). *Curculigo orchoides* e *Allium victorialis* também foram avaliados quanto à inibição de α -glicosidase (GULATI; HARDING; PALOMBO, 2012; LI et al., 2011).

5.6 Determinação da atividade de inibição sobre a enzima tirosinase

Da mesma forma que os ensaios anteriores (itens 5.3.1 e 5.3.2), 42 amostras referentes a extratos brutos e frações de espécies de Amaryllidaceae foram testados a fim de verificar uma potencial inibição da atividade da enzima tirosinase. Os resultados mostraram que cinco das amostras testadas apresentaram uma capacidade inibitória superior a 70% quando testados a 500 µg/mL (Tabela 6). Como controle positivo foi utilizado o inibidor ácido kójico, na máxima concentração de 1000 µg/mL.

Tabela 6. Capacidade inibição da tirosinase por extratos e frações de espécies de Amaryllidaceae

| material botânico | amostra | % inibição |
|--|---------------------------|------------|
| <i>Hymenocallis litorallis</i> (bulbo) | EEtOH | 55,02±0,88 |
| | FAcOEt | 15,42±5,22 |
| | FAq | 64,39±1,54 |
| <i>Hippeastrum psittacinum</i> (bulbo) | EEtOH | 55,62±2,41 |
| | FAcOEt | 52,88±1,67 |
| | FAq | 63,79±1,91 |
| <i>Habranthus irwinianus</i> (bulbo) | EEtOH | 86,21±2,40 |
| | FAcOEt | 62,58±2,33 |
| | FAq | 32,06±3,73 |
| <i>Crinum</i> sp. (bulbo) | EEtOH | 71,75±0,91 |
| | FAcOEt | 53,35±1,52 |
| | FAq | 46,85±2,21 |
| <i>Hippeastrum</i> sp. (bulbo) | EEtOH | 73,29±0,60 |
| | FAcOEt | 42,77±3,34 |
| | FAq | 26,22±2,71 |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (bulbo) (HGB-s) | EEtOH | 70,75±1,45 |
| | FAcOEt | 36,21±1,03 |
| | FAq | ND |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (talo) (HGT) | EEtOH | 33,94±0,04 |
| | FAcOEt | 45,25±0,01 |
| | FAq | ND |
| | ácido kójico ¹ | 97,1±0,013 |

Concentração máxima testada para os extratos: 500 µg/mL; ND Não determinado; ¹ Controle positivo concentração máxima testada 1000 µg/mL; os resultados da inibição foram expressos em porcentagem de inibição ± SD (desvio padrão); EEtOH (extrato etanólico); FAcOEt (fração acetato de etila); FAq (fração aquosa)

Tabela 6. Capacidade inibição da tirosinase por extratos e frações de espécies de Amaryllidaceae (continuação)

| material botânico | amostra | % Inibição |
|---|---------------------------|-------------------|
| <i>Hippeastrum goianum</i> (flor) (HGFl) | EEtOH | 25,37±6,83 |
| | FAcOEt | 74,70±1,20 |
| | FAq | ND |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (fruto) (HGFr) | EEtOH | 49,46±0,23 |
| | FAcOEt | 52,61±1,06 |
| | FAq | ND |
| <i>Hippeastrum puniceum</i> (bulbo) (HPB) | EEtOH | 51,20±0,04 |
| | FAcOEt | 42,70±0,19 |
| | FAq | ND |
| <i>Hippeastrum puniceum</i> (folha) (HPF) | EEtOH | 55,15±2,11 |
| | FAcOEt | 53,88±4,68 |
| | FAq | ND |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (bulbo)- (HGB-c) | EEtOH | 50,94±0,44 |
| | FAcOEt | 42,90±0,81 |
| | FAq | ND |
| <i>Crinum erubescens</i> (bulbo) (CEB) | EEtOH | 33,26±2,74 |
| | FAcOEt | 21,15±4,21 |
| | FAq | ND |
| <i>Crinum erubescens</i> (folha) (CEF) | EEtOH | 65,127 ±0,76 |
| | FAcOEt | 40,63 ± 2,31 |
| | FAq | ND |
| | ácido kójico ¹ | 97,1±0,013 |

Concentração máxima testada para os extratos: 500 µg/mL; ND Não determinado; ¹ Controle positivo concentração máxima testada 1000 µg/mL; os resultados da inibição foram expressos em porcentagem de inibição ± SD (desvio padrão); EEtOH (extrato etanólico); FAcOEt (fração acetato de etila).; FAq (fração aquosa)

O ácido kójico, substância de origem natural, é usado em cosméticos para clareamento da pele devido à sua ação despigmentante, agindo como composto quelante do íon cobre no sítio ativo da tirosinase (KHATIB et al., 2005).

Dentre as cinco amostras que apresentaram capacidade de inibição da tirosinase superior a 70 %, pode ser destacado o extrato etanólico de bulbos de *H. irwinianus*, que apresentou capacidade inibitória de 86,21%.

A construção de curvas dose-resposta, para as amostras que apresentaram inibição superior a 70%, permitiu obter o valor de IC₅₀ sobre a enzima tirosinase. Para isso, foram utilizadas concentrações de amostra entre 7,8 e 500 µg/mL. Os resultados são mostrados

na Tabela 7, em comparação com o ácido kójico, cuja curva dose-resposta é apresentada na Figura 34.

Tabela 7. Concentração de extratos e frações de espécies de Amaryllidaceae capaz de inibir 50% da atividade da tirosinase

| material botânico | amostra | IC ₅₀ (µg/mL) |
|--|---------------------------|--------------------------|
| <i>Habranthus irwinianus</i> (bulbo) | EEtOH | 90,34±0,93 |
| <i>Crinum sp.</i> (bulbo) | EEtOH | 85,41±0,89 |
| <i>Hippeastrum sp.</i> (bulbo) | EEtOH | 59,59±0,94 |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (bulbo) (HGB-s) | EEtOH | 85,70±0,88 |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (flor) (HGFl) | FACOEt | 36,31±0,90 |
| | ácido kójico ¹ | 3,4±0,41 |

¹ Controle positivo; os resultados do IC₅₀ foram expressos em porcentagem de inibição ± SD (desvio padrão); EEtOH (extrato etanólico); FACOEt (fração acetato de etila.); FAq (fração aquosa)

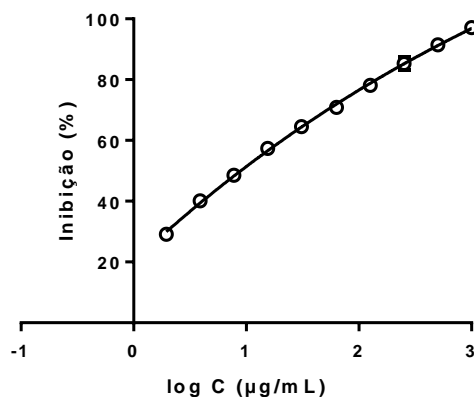


Figura 34. Curva dose-resposta da inibição da atividade da tirosinase pelo ácido kójico.

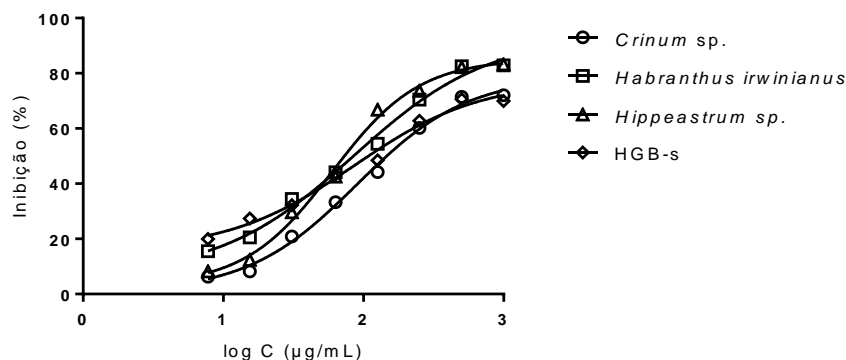


Figura 35. Curva dose-resposta para o ensaio de inibição da tirosinase dos extratos etanólicos de bulbos de *Habranthus irwinianus*, *Crinum sp.*, *Hippeastrum sp.*, e *Hippeastrum goianum* (HGB-s)

Entre as cinco amostras testadas, o menor valor de IC_{50} foi igual a $36,52 \mu\text{g/mL}$ e correspondeu à fração acetato de etila de flores de *H. goianum*. Contudo, quando comparado com o valor encontrado para o controle positivo ($IC_{50} = 3,4 \mu\text{g/mL}$), a dose mostra ser cerca de 11 vezes maior.

As Figuras 35 e 36 mostram as curvas dose-resposta das amostras que apresentaram inibição da tirosinase acima de 70%.

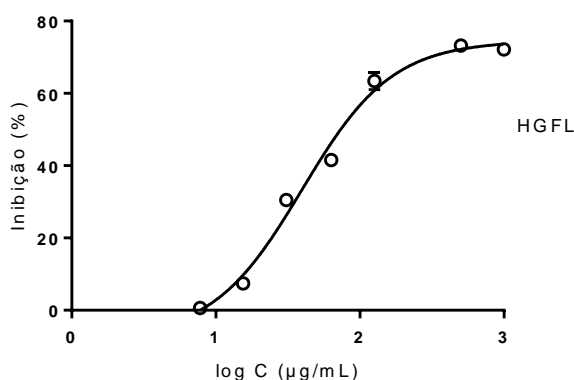


Figura 36. Curva dose-resposta para o ensaio de inibição da tirosinase da fração acetato de etila de flores de *Hippeastrum goianum* (HGFL)

Poucos são os relatos, na literatura, de avaliação do potencial de inibição da enzima tirosinase por espécies de Amaryllidaceae. Desses, pode ser destacada a avaliação de extratos hidroalcoólicos de bulbos de *Allium ascalonicum* L (CHAROENCHAI et al., 2017). Dos bulbos de *Crinum yemense* foi isolado um composto (6-hidroxi-2H-piran-3-carbaldeído) que mostrou uma potente atividade de inibição da tirosinase (ABDEL-HALIM et al., 2008). Por outro lado, os alcaloides galantamina (**1**) e licorina (**4**) foram avaliados quanto à inibição da atividade de tirosinase e não apresentaram atividade (MATER et al., 2014).

5.7 Determinação da atividade de inibição sobre acetilcolinesterase

A avaliação da atividade de inibição, de extratos e frações de espécies da família Amaryllidaceae, frente à enzima AChE, foi realizada pelo método colorimétrico de (Ellman et al., 1961) com algumas modificações (LOPEZ., 2002). As substâncias utilizadas como controle foram galantamina (**1**) e fisostigmina (**99**). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 8.

Dentre as amostras avaliadas, na concentração de 500 µg/mL, somente extratos etanólicos apresentaram inibição da atividade da acetilcolinesterase maior que 70%, com exceção dos extratos etanólicos de *Hippeastrum goianum* (flor) e *Hippeastrum puniceum* (folha), que apresentaram inibição de 44,78% e 37,48%, respectivamente. Os extratos etanólicos de *Crinum erubescens* apresentaram inibição de 100%, superior àquela apresentada pelos controles positivos galantamina (**1**, 94 %) e fisostigmina (**99**, 95,6 %).

Os resultados apresentados pela maior parte dos extratos etanólicos pode ser explicado, ao menos em parte, pela natureza das amostras: extratos etanólicos brutos apresentam uma característica menos polar que frações acetato de etila e aquosa. Para as amostras que apresentaram capacidade de inibição maior que 70 % foram construídas curvas dose-resposta para o cálculo da IC₅₀ (Tabela 8)

Dentre as amostras avaliadas, pode ser destacado o extrato etanólico de *Hippeastrum psittacinum* (bulbo), que apresentou o menor IC₅₀ (14,3 µg/mL). O potencial inibitório mostrado pelo extrato etanólico de folhas de *C. erubescens* (CEF), pode estar relacionado à presença dos compostos crinamina (**15**), macronina (**28**), trisphaeridina (**39**), bowdensina (**45**), ismina (**70**), 1-epidesmetil-bowdensina (**85**) e desidroanidrolicorina (**86**), descritos previamente para essa espécie, e para os quais a atividade frente à enzima acetilcolinesterase foi estabelecida (BRAGA; GARÓFALO, 2003).

Tabela 8. Capacidade inibição da acetilcolinesterase por extratos e frações de espécies de Amaryllidaceae

| material botânico | amostra | % inibição |
|--|---------------------------|-------------------|
| <i>Hymenocallis litorallis</i> (bulbo) | EEtOH | 78,79±1,16 |
| | FAcOEt | 34,8±1,77 |
| | FAq | 49,01±0,44 |
| <i>Hippeastrum psittacinum</i> (bulbo) | EEtOH | 100,00±1,05 |
| | FAcOEt | 21,34±1,26 |
| | FAq | 57,76±1,90 |
| <i>Habranthus irwinianus</i> (bulbo) | EEtOH | 79,77±1,11 |
| | FAcOEt | 38,49±2,29 |
| | FAq | 67,37±2,21 |
| <i>Crinum</i> sp. (bulbo) | EEtOH | 86,10±4,21 |
| | FAcOEt | 47,85±0,84 |
| | FAq | 64,36±2,16 |
| <i>Hippeastrum</i> sp. (bulbo) | EEtOH | 82,17±3,43 |
| | FAcOEt | 31,69±1,59 |
| | FAq | 62,96±1,06 |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (bulbo) (HGB-s) | EEtOH | 88,44±0,49 |
| | FAcOEt | 27,83±1,83 |
| | FAq | ND |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (talo) (HGT) | EEtOH | 72,31±3,32 |
| | FAcOEt | 49,74±1,97 |
| | FAq | ND |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (flor) (HGFl) | EEtOH | 44,78±2,83 |
| | FAcOEt | 41,62±1,30 |
| | FAq | ND |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (fruto) (HGFr) | EEtOH | 85,03±2,76 |
| | FAcOEt | 49,86±2,55 |
| | FAq | ND |
| <i>Hippeastrum puniceum</i> (bulbo) (HPB) | EEtOH | 86,95±1,59 |
| | FAcOEt | 22,91±1,06 |
| | FAq | ND |
| <i>Hippeastrum puniceum</i> (folha) (HPF) | EEtOH | 37,48±2,53 |
| | FAcOEt | 21,23±1,01 |
| | FAq | ND |
| | galantamina ¹ | 93,99±0,32 |
| | fisostigmina ¹ | 95,65±0,41 |

Concentração máxima testada: 500 µg/mL; ND Não determinado; ¹ Controle positivo 2µg/mL; os resultados da inibição foram expressos em porcentagem de inibição ± SD (desvio padrão). EEtOH (extrato etanólico); FAcOEt (fração acetato de etila.); FAq (fração aquosa)

Tabela 8. Capacidade inibição da acetilcolinesterase por extratos e frações de espécies de Amaryllidaceae (continuação)

| material botânico | amostra | % inibição |
|--|---------------------------|---------------|
| <i>Hippeastrum goianum</i> (bulbo) (HGB-c) | EEtOH | 80,12±1,55 |
| | FACOEt | ND |
| | FAq | ND |
| <i>Crinum erubescens</i> (bulbo) (CEB) | EEtOH | 100,00±1,17 |
| | FACOEt | 51,00±1,46 |
| | FAq | 33,05±1,67 |
| <i>Crinum erubescens</i> (folha) (CEF) | EEtOH | 100,00 ± 3,78 |
| | FACOEt | 58,43±0,02 |
| | FAq | 44,65±0,03 |
| | galantamina ¹ | 93,99±0,32 |
| | fisostigmina ¹ | 95,65±0,41 |

Concentração máxima testada: 500 µg/mL; ND Não determinado; ¹ Controle positivo 2µg/mL; os resultados da inibição foram expressos em porcentagem de inibição ± SD (desvio padrão). EEtOH (extrato etanólico); FACOEt (fração acetato de etila.); FAq (fração aquosa)

Tabela 9. Concentração de extratos etanólicos de espécies de Amaryllidaceae capaz de inibir 50% da atividade da acetilcolinesterase

| material botânico | amostra | IC ₅₀ (µg/mL) |
|--|--------------|---------------------------|
| <i>Hymenocallis litorallis</i> (bulbo) | EEtOH | 132,3±0,4 |
| <i>Hippeastrum psittacinum</i> (bulbo) | EEtOH | 14,3±0,7 |
| <i>Habranthus irwinianus</i> (bulbo) | EEtOH | 121,0±3,4 |
| <i>Crinum sp.</i> (bulbo) | EEtOH | 27,4±1,1 |
| <i>Hippeastrum sp.</i> (bulbo) | EEtOH | 85,8±1,9 |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (bulbo) (HGB-s) | EEtOH | 45,6±0,9 |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (bulbo) (HGB-c) | EEtOH | 74,5±2,1 |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (talo) (HGT) | EEtOH | 190,5±3,72 |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (flor) (HGFl) | EEtOH | 276,0±1,14 |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (fruto) (HGFr) | EEtOH | 58,14±2,25 |
| <i>Hippeastrum puniceum</i> (bulbo) (HPB) | EEtOH | 70,4±1,3 |
| <i>Hippeastrum puniceum</i> (folha) (HPF) | EEtOH | 236,07±6,70 |
| <i>Crinum erubescens</i> (CEB) | EEtOH | 12,55 ±1,52 ^{JD} |
| <i>Crinum erubescens</i> (CEF) | EEtOH | 40,77 ±4,58 ^{JD} |
| | galantamina | 0,167±0,58 |
| | fisostigmina | 0,017±0,21 |

¹ Controle positivo; os resultados do IC₅₀ foram expressos em porcentagem de inibição ± SD (desvio padrão); ^{JD}

A Figura 37 mostra a curva dose-resposta das substâncias de referência fisostigmina e galantamina, quando a concentração das mesmas foi variada frente a uma concentração fixa da enzima. A galantamina é reconhecida como um potente inibidor de acetilcolinesterase (CORTES et al., 2015), e usada como princípio ativo do medicamento

Reminyl®, medicamento indicado no controle da doença de Alzheimer, e as Figuras 38 a 40 mostram as curvas dose-resposta para as amostras avaliadas

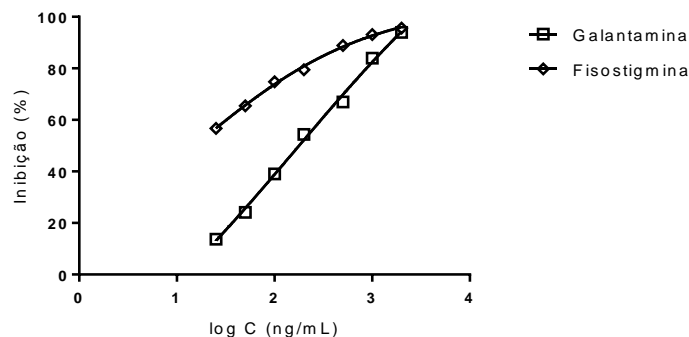


Figura 37. Curva dose-resposta da inibição da atividade da acetilcolinesterase por galantamina e fisostigmina.

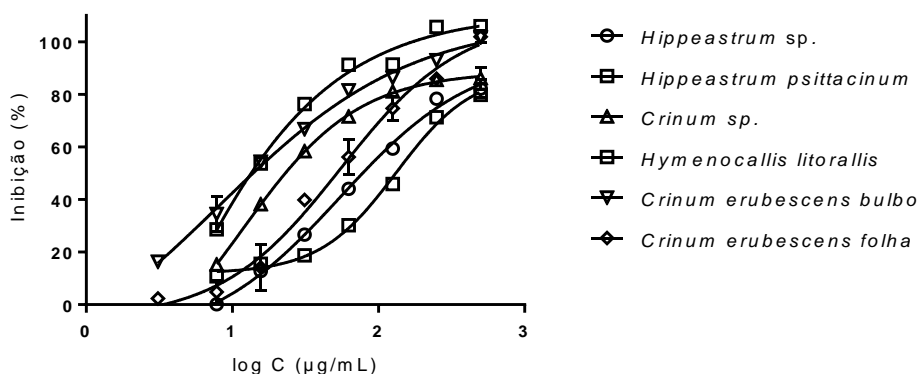


Figura 38. Curva dose-resposta para o ensaio de inibição da acetilcolinesterase dos extratos etanólicos de *Crinum* sp. (bulbos), *Crinum erubescens* (bulbo e folha) *Hippeastrum* sp. (bulbo), e *Hippeastrum goianum* (HGB-s, bulbo)

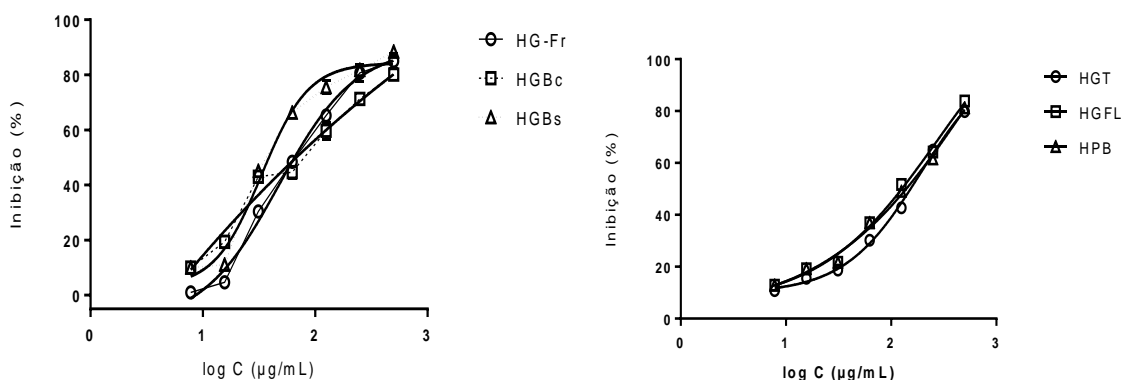


Figura 39. Curva dose-resposta para o ensaio de inibição da acetilcolinesterase dos extratos etanólicos de *Hippeastrum goianum* (bulbos, talos flores e frutos) e *Hippeastrum puniceum* (bulbos) no ensaio acetilcolinesterase. Lado esquerdo: HGFR: Fruto, HGB-c: Bulbo, HGB-s: Bulbo; lado direito: HGT: Talo, HGFL: Flor, HPB: *Hippeastrum puniceum* (bulbo)

A Tabela 10, mostra um resumo das atividades das amostras avaliadas, com IC₅₀ menores a 100 µg/mL, quando avaliadas frente às enzimas α -amilase, α -glicosidase, tirosinase e acetilcolinesterase. É possível observar que os extratos etanólicos das espécies *H. psittacinum*, *H. puniceum* e *C. erubescens* (folha e bulbo) foram ativos unicamente frente à enzima acetilcolinesterase.

Quanto à capacidade inibitória dos extratos frente à enzima tirosinase, a fração acetato de etila da espécie *H. goianum* (HGFl) mostrou a maior atividade biológica em comparação com os extratos etanólicos de *Hippeastrum* sp e *H. irwinianus* que também se destacaram pela atividade inibitória enzimática.

A fração acetato de etila de *H. irwinianus*, apresentou a maior atividade inibitória frente à enzima α -glicosidase, mas o extrato etanólico de *Crinum* sp. foi capaz de inibir seletivamente esta enzima. Ainda, destaca-se o extrato etanólico de *Hippeastrum goianum* (HGB-s), que foi o mais ativo frente a enzima α -amilase.

Nas condições experimentais, nenhuma das amostras de *Hymenocallis litorallis* (extrato etanólico, fração acetato de etila e fração aquosa de bulbos) apresentou atividade significativa nas condições experimentais.

Tabela 10. Resumo da atividade inibitória de extratos de espécies de Amaryllidaceae frente a enzimas de interesse farmacêutico.

| espécie | α -amilase | α -glicosidase | tirosinase | acetilcolinesterase |
|--|---|-----------------------|-------------------|---|
| <i>Hymenocallis litorallis</i> (Jacq.) Salisb. | - | - | - | - |
| <i>Hippeastrum psittacinum</i> Herb. | - | - | - | EEtOH |
| <i>Crinum</i> sp. | FAcOEt | EEtOH FAcOEt | - | EEtOH |
| <i>Hippeastrum</i> sp. | | EEtOH | EEtOH | EEtOH |
| <i>Hippeastrum goianum</i> (Ravenna) | (HGT) FAcOEt (HGB-s) EEtOH (HGFl) FAcOEt (HGB-c) EEtOH | (HG-Fl) FAcOEt | (HG-Fl) FAcOEt | (HGT) EEtOH (HGB-s) EEtOH (HGFr) EEtOH (HGB-c) EEtOH |
| <i>Hippeastrum puniceum</i> (Lam.) Kuntze | - | - | - | EEtOH |
| <i>Habranthus irwinianus</i> (Ravenna) | - | EEtOH FAcOEt | EEtOH | EEtOH |
| <i>Crinum erubescens</i> L.f. ex Aiton (CEB- CEF) | - | - | - | EEtOH |

- = sem atividade significativa; EEtOH: Extrato etanólico; FAcOEt: fração acetato de etila

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitiram identificar que extratos das espécies *H. litorallis* e *H. psittacinum* foram ativos frente às enzimas acetilcolinesterase e α -amilase. Os extratos etanólicos de *Habranthus irwinianus*, *Crinum* sp, *Hippeastrum* sp, *Hippeastrum goianum* (flor), foram ativos para as quatro enzimas testadas. Os extratos de *Crinum erubescens*, foram seletivos na inibição enzimática da acetilcolinesterase

Foi possível identificar que extratos etanólicos pertencentes às espécies *Hippeastrum psittacinum* e *Crinum erubescens* apresentaram o melhor potencial inibitório frente a enzima acetilcolinesterase ($IC_{50} = 14,30 \mu\text{g/mL}$ e $12,55 \mu\text{g/mL}$, respectivamente). A fração acetato de etila das flores de *Hippeastrum goianum* apresentou o melhor valor de IC_{50} ($36,31 \mu\text{g/mL}$), frente à enzima tirosinase, extrato que também se mostrou promissor quanto à inibição da enzima α -glicosidase, com $IC_{50} = 42,82 \mu\text{g/mL}$, junto com a fração em acetato de etila de *Habranthus irwinianus* ($IC_{50} = 31,97 \mu\text{g/mL}$). Quanto à enzima α -amilase, o extrato etanólico de *Hippeastrum goianum* (HG-B-s) mostrou o melhor resultado ($IC_{50} = 53,6 \mu\text{g/mL}$) dentre os extratos e frações avaliados.

Este estudo revela pela primeira vez a capacidade de inibição frente a enzimas de espécies de Amaryllidace coletadas no Brasil. *Hymenocallis litorallis* Salisb, *Habranthus irwinianus* e *Crinum erubescens* L.f. ex Aiton foram avaliados quanto à inibição de acetilcolinesterase. Da mesma forma *Crinum erubescens*, *Hippeastrum psittacinum*, *Hippeastrum goianum*, *Hippeastrum puniceum*, *H. littoralis*, *H. irwinianus*, quanto à inibição de α -glicosidase, α -amilase e tirosinase.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam a importância farmacológica da família Amaryllidaceae como fonte de metabolitos de interesse e diversifica as aplicações biológicas até o momento descritas desta família. Espera-se que tais resultados possam contribuir com o conhecimento acerca das espécies de Amaryllidaceae brasileiras e estimular sua preservação e valorização como fonte de compostos interessantes para a terapêutica.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HALIM, O. B. et al. A new tyrosinase inhibitor from *Crinum yemense* as potential treatment for hyperpigmentation. **Pharmazie**, v. 63, n. 5, p. 405–407, 2008.
- ABDULLAH, E.; RAUS, R. A.; JAMAL, P. Extraction and Evaluation of Antibacterial Activity from Extraction and evaluation of antibacterial activity from selected flowering plants. **American Medical Journal**, v. 3, n. 1, p. 27–32, 2012.
- ABOU-DONIA, A. H. et al. Phytochemical and biological investigation of *Hymenocallis littoralis* Salisb. **Chemistry and Biodiversity**, v. 5, n. 2, p. 332–340, 2008.
- ADISAKWATTANA, S. et al. A series of cinnamic acid derivatives and their inhibitory activity on intestinal alpha-glucosidase. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 24, n. 5, p. 1194–1200, 2009.
- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325–354, 2007.
- ALI, A. A. et al. Clivonidine, a New Alkaloid from *Clivia miniata*. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 3, p. 350–352, 1983.
- ALI, A. A. et al. Alkaloids from *Haemanthus multyflorus* Martyn. **Bulletin of pharmaceutical Sciences**, v. 10, p. 157, 1987.
- ALU'DATT, M. H. et al. A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 218, p. 99–106, 2017.
- ALVES ARAÚJO, A. **Morfologia de Amaryllidaceae S.S. nativas do nordeste brasileiro**. 2007. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.
- ALVES ARAÚJO, A.; ASSIS RIBEIRO SANTOS, F.; MARCCUS, A. Palynological characterization of Amaryllidaceae sensu stricto species occurring in northeastern Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 4, p. 967–976, 2007.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION REPORT: 2017 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 13, n. 4, p. 325–373, 2017.
- AMARAL-LOPES, A. C.; CAVALCANTI, T. B. Habranthus (Amaryllidaceae) of Brasil. **Rodriguesia**, v. 66, n. 1, p. 203–220, 2015.
- AMARAL, A. C. **Amaryllidaceae Jaume St.-Hil.: levantamento das espécies do Distrito Federal, Brasil, e estudos de multiplicação in vitro**. 2007. 130 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília, 2007.
- AMARAL, A. C. **Habranthus Herb. (Amaryllidaceae) no Brasil: estudo taxonômico, caracterização morfológica e relações filogenéticas**. 2011. 167 f. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

- ANDRADE, J. P. **Análise química e biológica em alcaloides do gênero *Hippeastrum* (Amaryllidaceae)**. 2007. 121f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.
- ANDRADE, J. P. et al. The Brazilian Amaryllidaceae as a source of acetylcholinesterase inhibitory alkaloids. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 1, p. 147–160, 2016.
- ANH, D. T. P.; DUONG, T. B.; HOANG, V. D. A new chromone from *Hymenocallis littoralis* Salisb. (Amaryllidaceae). **Natural Product Research**, v. 28, n. 21, p. 1869–1872, 2014.
- ANUSHA, H. et al. Anti-oxidant activity of ethanolic extract of flowers *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. by scavenging of hydroxyl radical in p-NDA method. **Der Pharmacia Lettre**, v. 8, n. 5, p. 345–348, 2016.
- ARANTES, A. E.; FERREIRA, L. G.; COE, M. T. The seasonal carbon and water balances of the Cerrado environment of Brazil: Past, present, and future influences of land cover and land use. **ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing**, v. 117, p. 66–78, 2016.
- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818–1834, 2016.
- ASANUMA, M.; MIYAZAKI, I.; OGAWA, N. Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: The role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. **Neurotoxicity Research**, v. 5, n. 3, p. 165–176, 2003.
- ATANASOVA, M. et al. Galantamine derivatives with indole moiety: Docking, design, synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 17, p. 5382–5389, 2015.
- AUGUSTI, K.T. Effect on alloxan diabetes of allyl propyl disulfide obtained from onion. **Naturwissenschaften**, v. 61, n. 4, p. 172–173., 1974.
- ATUKEREN, P. et al. The efficacy of donepezil administration on acetylcholinesterase activity and altered redox homeostasis in Alzheimer's disease. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 90, p. 786–795, 2017.
- BAÑARES BAUDET, Á. Amaryllidaceae *Narcissus longispathus* Pugsley. In: BAÑARES BAUDET, Á. et al.(Org.). **Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España**. Madrid: Dirección General de Conservación de la Naturaleza, 2004. cap.7.
- BERGOÑON FUSTER, S. **Isolation and chemical characterization of alkaloids of the Amaryllidaceae type “in vitro” of *Narcissus confusus***. Unit of Plant Physiology Department of Natural Products, 1994. 292 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). University of Barcelona. 1994
- BERKOV, S. et al. Plant sources of galanthamine: Phytochemical and biotechnological aspects. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 23, n. 2, p. 1170–1176, 2009.
- BERNFELD, P. Amylases, α and β . **Methods Enzymology**, v. 1, n. 40, p. 149–158, 1955.

- BHATTACHARYA, S.; MAELICKE, A.; MONTAG, D. Nasal Application of the Galantamine Pro-drug Memogain Slows Down Plaque Deposition and Ameliorates Behavior in 5X Familial Alzheimer's Disease Mice. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 46, n. 1, p. 1–6, 2015.
- BOIT, H. G.; MEHLIS, B. Two New Alkaloids from *Clivia miniata*. **Naturwissenschaften**, v. 48, p. 603, 1961.
- BORGES DE MELO, E.; DA SILVEIRA GOMES, A.; CARVALHO, I. α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. **Tetrahedron**, v. 62, n. 44, p. 10277–10302, 2006.
- BRAGA, A K.; GARÓFALO, C. A. Coleta de fragrâncias por machos de *Euglossa townsendi* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) em flores de *Crinum procerum* Carey (Amaryllidaceae). *Apoidea Neotropica*, p. 201–207, 2003.
- BREITBACH, U. B. et al. Amazonian Brazilian medicinal plants described by C.F.P. von Martius in the 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 1, p. 180–189, 2013.
- BURLANDO, B.; CLERICUZIO, M.; CORNARA, L. Moraceae Plants with Tyrosinase Inhibitory Activity: A Review. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 17, n. 2, p. 108–121, 2017.
- CAAMAL-FUENTES, E. et al. Screening of plants used in Mayan traditional medicine to treat cancer-like symptoms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 3, p. 719–724, 2011.
- CABEZAS, F. et al. Alkaloids from *Eucharis amazonica* (Amaryllidaceae). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 3, p. 315–7, 2003.
- CABEZAS, F. et al. Analisis del contenido alcaloídico de *Caliphruria subdentata* baker (amaryllidaceae) por el metodo CG-EM. **Revista Latinoamericana de Quimica**, v. 41, n. 1, p. 68–73, 2013.
- CALDERÓN, A. I. et al. Screening of plants of Amaryllidaceae and related families from Panama as sources of acetylcholinesterase inhibitors. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 9, p. 988–993, 2010.
- CANDIDO, R. S. et al. *Hippeastrum* species in areas of restinga in the state of Rio de Janeiro, Brazil: pollen characters. **Acta Botanica Brasílica**, v. 27, n. 4, p. 661–668, 2013.
- CAO, Z.; YANG, P.; ZHOU, Q. Multiple biological functions and pharmacological effects of lycorine. **Science China Chemistry**, v. 56, n. 10, p. 1382–1391, 2013.
- CARLESSO SOPRANI, L. **Estudo Químico e Biológico de *Hippeastrum puniceum* (Lam.) Kuntze (Amaryllidaceae)**, Dissertação (Mestrado). Ciências Farmacêuticas. 2011. 77f. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2011.
- CHANG, T. S. An updated review of tyrosinase inhibitors. International. **Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 6, p. 2440–2475, 2009.
- CHAROENCHAI, L. et al. Antioxidant, antimicrobial, tyrosinase enzyme inhibition and chemical compositions of shallot extracts. **Science and Technology**, v. 15, n. 1, p. 17–27, 2017.
- CHEN, C.-Y. et al. An Updated Organic Classification of Tyrosinase Inhibitors on Melanin Biosynthesis. **Current Organic Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 4–18, 2015.

- CHEN, N. et al. Chemical Constituents from *Hymenocallis littoralis*. **Letters in Organic Chemistry**, v. 13, n. 7, p. 536–539, 2016.
- CHHABRA, S. C.; UIISO, F. C. A survey of the medicinal plants of Eastern Tanzania for alkaloids, flavonoids, saponins and tannins. **Fitoterapia**, v. 61, n. 4, p. 307, 1990.
- CODINA, C. et al. 9-O-Demethyl-2 α -hydroxyhomolycorine, an alkaloid from *Narcissus tortifolius*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 2685, 1990.
- CORTES, N. et al. Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five Amaryllidaceae plants. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 102, p. 222–228, 2015a.
- CORTES, N. et al. Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five Amaryllidaceae species: A comparative study. **Life Sciences**, v. 122, p. 42–50, 2015b.
- COUTINHO, L. M. O conceito de bioma. **Acta Botanica Brasílica**, v. 20, n. 1, p. 13–23, 2006.
- DABIRE, M. F.; MURAV, D. A. Alkaloids from *Hymenocallis littoralis* family Amaryllidaceae. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 18, n. 2, p. 248, 1982.
- DING, Y. et al. Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 19, n. 1, p. 53–100, 2017.
- DRACZKOWSKI, P. et al. Determination of affinity and efficacy of acetylcholinesterase inhibitors using isothermal titration calorimetry. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1860, n. 5, p. 967–974, 2016.
- DUTILH, J. H. A. et al. Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB33517>>. Acesso em: 24 jul. 2017.
- ELGORASHI, E. E. et al. Quantitative structure-activity relationship studies on acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. **South African Journal of Botany**, v. 72, n. 2, p. 224–231, 2006.
- ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.
- ERNST, M. et al. Evolutionary prediction of medicinal properties in the genus *Euphorbia* L. **Scientific Reports**, v. 6, n. July, p. 1–10, 2016.
- EZURUIKE F, U.; PRIETO, J. M. The use of plants in the traditional management of diabetes in Nigeria: Pharmacological and toxicological considerations. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 2, p. 857–924, 2014.
- FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Amaryllidaceae. Jardim Botânico do Rio de Janeiro em construção. Disponível: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB33469>>. Acesso em: 26 jul. 2017
- FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Amaryllidaceae. Jardim Botânico do Rio de Janeiro em construção. Disponível: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB33469>>. Acesso em: 26 jul. 2017

- FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Amaryllidaceae. Jardim Botânico do Rio de Janeiro em construção. Disponível: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB43>>. Acesso em: 26 jul. 2017.
- FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Amaryllidaceae. Jardim Botânico do Rio de Janeiro em construção. Disponível: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB33469>>. Acesso em: 26 jul. 2017,
- FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Amaryllidaceae. Jardim Botânico do Rio de Janeiro em construção. Disponível: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB4365>>. Acesso em: 19 Mar. 2018
- FERREIRA PIRES, G.; PROTTI BUENO, F. Unidades de conservação brasileiras: desafios da gestão. Biodiversidade e Unidades de Conservação, **XI Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 11, n. 1, p. 146–151, 2015.
- FREITAS, M. M. et al. Extracts of *Morus nigra* L Leaves Standardized in chlorogenic acid, rutin and isoquercitrin: Tyrosinase inhibition and cytotoxicity. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1–24, 2016.
- GEORGIEV, V. et al. Alkaloids biosynthesis by *Pancreatium maritimum* L. shoots in liquid culture. **Acta Physiologiae Plantarum**, p. 927–933, 2011.
- GHOSAL, S. et al. Alkaloids of *Crinum Pratense*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 8, p. 2003–2007, 1981.
- GHOSAL, S. et al. Alkaloids of *Haemanthus kalbreyeri*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1825–1828, 1985.
- GHOSAL, S.; ASHUTOSH, S.; RAZDAN, S. (+) - Epimaritidine, an alkaloid from *Zephyranthes rosea*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 3, p. 635–637, 1985.
- GHOSAL, S.; KULWANT S, S.; SUSHMA, R. Crinum alkaloids: their chemistry and biology. **Phytochemistry**, v. 24, n. 10, p. 2141–2156, 1985.
- GHOSAL, S.; UNNIKRISHNAN, S.; SINGH, S. K. Occurrence of two epimeric alkaloids and metabolism compared with lycorine in *Crinum latifolium*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 9, p. 2535–2537, 1989.
- GIORDANI, R. B. et al. Investigation of the antioxidant and anticholinesterase potential of *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2042–2046, 2008.
- GIORDANI, R. B. **Atividade anti-Trichomonas vaginalis de alcaloides de Amaryllidaceae e análogos de poliaminas: análise química, hemi-síntese e investigação do mecanismo de ação**. 2010. 226 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2010.
- GIORDANI, R. B. et al. Lycorine Derivatives Against *Trichomonas vaginalis*. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 80, n. 1, p. 129–133, 2012.
- GIOVANNINI, P.; HOWES, M.-J. R. Medicinal plants used to treat snakebite in Central America: Review and assessment of scientific evidence. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 199, p. 240–256, 2017.

- GOMATHI, R.; MANIAN, S. Analgesic and acetylcholinesterase inhibition potential of polyphenols from *Scolopia crenata* (Flacourtiaceae): An endemic medicinal plant of India. **Industrial Crops and Products**, v. 73, p. 134–143, 2015.
- GRIFFIN, C. et al. Pancreatistatin induces apoptosis in clinical leukemia samples with minimal effect on non-cancerous peripheral blood mononuclear cells. **Cancer Cell International**, v. 10, p. 1–7, 2010.
- GULATI, V.; HARDING, I. H.; PALOMBO, E. A. Enzyme inhibitory and antioxidant activities of traditional medicinal plants: Potential application in the management of hyperglycemia. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 77, p. 2–9, 2012.
- GUO, Z. et al. Chemical profile and inhibition of α -glycosidase and protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) activities by flavonoids from licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). **Journal of Functional Foods**, v. 14, n. 103, p. 324–336, 2015.
- H A DUTILH, J. Ornamental bulbous plants of Brazil. **Acta Horticulturae**, v. 683, p. 37–42, 2005.
- HAMANN, A. Obesity Update 2017. **Diabetologe**, v. 13, n. 5, p. 331–341, 2017.
- HAN, L. et al. Inhibitory effect of phloretin on α -glucosidase: Kinetics, interaction mechanism and molecular docking. International. **Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 520–527, 2017.
- HENRIETTE, J.; DUTILH, A. Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo, v. 4, p. 244–256, 2005.
- HOFMANN JR, A. E. et al. Avaliação da atividade antiviral e determinação do perfil cromatográfico de *Hippeastrum glaucescens* (Martius) Herbert (Amaryllidaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 14, p. 7–14, 2004.
- HURRELL, J. A. Amaryllidaceae adventicias en la Argentina Introducción Resultados. **Bulletin of the botanical society of Argentina**, v. 42, n. 3, p. 313–319, 2007.
- JANEČEK, Š.; SVENSSON, B.; MACGREGOR, E. A. α -Amylase: An enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 7, p. 1149–1170, 2014.
- JI, Y. BIN et al. Study on the Extraction of Components from *Hymenocallis littoralis*. **Applied Mechanics and Materials**, v. 411–414, p. 3269–3272, 2013.
- JI, Y. BIN et al. Alkaloids from beach spider lily (*Hymenocallis littoralis*) induce apoptosis of HepG-2 cells by the Fas-signaling pathway. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 21, p. 9319–9325, 2014.
- JIANG, S.; YU, G.; GONG, P. Protective effects of dihydrolycorine on myocardial ischemia induced by isoproterenol in mice. **Journal of Yonyang Medical College**, v. 1, n. 2, p. 81–83, 2006.
- KARTHIC, K. et al. Identification of α -amylase inhibitors from *Syzygium cumini* Linn seeds. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 46, n. 9, p. 677–680, 2008.

- KAYA, G. I. et al. (-)-Capnoidine and (+)-bulbocapnine from an Amaryllidaceae species, *Galanthus nivalis* subsp. *cilicicus*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 11, p. 1059–1062, 2004.
- KENAKIN, T. P. Enzymes as Drug Targets. **Pharmacology in Drug Discovery and Development**, p. 131–156, 2017.
- KERHARO, J. **Ethnopharmacological research on the medicinal and toxic plants of the traditional Senegalese Pharmacopoeia**. 1971. 285 f. Tese (Doctorat d'Etat en Pharmacie). Université de Dakar, 1971.
- KHATIB, S. et al. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: The importance of a 2,4-substituted resorcinol moiety. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 433–441, 2005.
- KOBAYASHI, S. et al. Isolation of clivacetine from *Clivia minata* Regel (Amaryllidaceae). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 28, n. 6, p. 1827–1831, 1980.
- LAW, P. et al. A critical analysis of the Native Vegetation Protection Law of Brazil (2012): updates and ongoing initiatives. **Brazilian Journal of Nature Conservation**, n. 2012, p. 1–15, 2016.
- LEWINSOHN, T.; PRADO, P. Quantas espécies há no Brasil? **Megadiversidade**, v. 1, p. 36–42, 2005.
- LI, C. et al. Biological Activities of Water and Ethanolic Extracts from *Allium victorialis* L. Mature Leaves. **Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 16, n. 3, p. 236–241, 2011.
- LI, Z. et al. Colorimetric assay for acetylcholinesterase and inhibitor screening based on the Ag [I] ion-3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 226, p. 104–109, 2016.
- LIN, L.-Z. et al. Lycorine alkaloids from *Hymenocallis littoralis*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 4, p. 1295–1298, 1995.
- LISTON, D. R. et al. Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: Implications for use in Alzheimer's disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 486, n. 1, p. 9–17, 2004.
- LIU, S. Enzymes. In: _____. **Bioprocess Engineering**. 2. ed. Amsterdam: Elsevier. 2017. cap7.
- LUO, X. et al. **Study of chemical compositions *Hymenocallis littoralis***. Nanning: World Scientific Publishing.Co. Pte. Ltd, 2004. 1064 p.
- MARESSA, D. R. **Avaliação da atividade anti-*Acanthamoeba castellanii* de frações alcaloídicas de diferentes espécies da família Amaryllidaceae e da licorina**, 2017. Dissertação (Mestrado). Ciências Farmacêuticas. 75f. Universidade Federal do Espírito Santo, 2017.
- MARQUES, G. G. L. **Anatomia do escapo floral e da folha de espécies de *Hippeastrum* Herb. e *Habranthus* Herb. (Amaryllidaceae J. St.-Hil.) ocorrentes no Distrito Federal**. 2015. 68 f. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade de Brasília. 2015.
- MARQUES, A., BORGES, J. F. P. Práticas de Química Orgânica. 2. ed., editor: Átomo. Campinas, 2007.
- MARQUES RODRIGUES, P. **Estudo químico de folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. (Sapotaceae): biomonitoramento por inibição da α -amilase**, 2015. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

- MATER, A. **Research doctorate in pharmacological sciences and pharmacological screening and biotechnological production of alkaloids from tissues and cells cultured by plants of the Amaryllidaceae Family**, 2014. 81 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacológicas e toxicológicas) – Universidade de Bologna, Bologna, 2014.
- MATÉS, J. M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; DE CASTRO, I. N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 8, p. 595–603, 1999.
- MAZA, I. *Habranthus neumannii*. **Darwiniana**, v. 46, n. 1, p. 66–68, 2008.
- MITCHELL, J. B. Enzyme function and its evolution. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 47, p. 151–156, 2017.
- MOHAMED SHAM SHIHABUDEEN, H.; HANSI PRISCILLA, D.; THIRUMURUGAN, K. Cinnamon extract inhibits α -glucosidase activity and dampens postprandial glucose excursion in diabetic rats. **Nutrition & metabolism**, v. 8, n. 1, p. 46, 2011.
- MOREIRA ANDRADE, L. **Preparação de derivados triptamínicos e dímeros inibidores da acetilcolinesterase a partir da bufotenina isolada de Anadenanthera (Fabaceae: Mimosideae) Preparação de derivados triptamínicos e dímeros inibidores da acetilcolinesterase**. 2015. 196 f. Tese (Doutorado em Química). - Universidade de Brasília, Brasília, 2015.
- MULHOLLAND, D. A. et al. The isolation of the amaryllidaceae alkaloid crinamine from *Dioscorea dregeana* (Dioscoreaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 2, p. 183–185, 2002.
- MUÑOZ, M. et al. Relaciones filogenéticas de *Rhodolirium montanum* Phil. y especies afines, basadas en secuencias nucleotídicas de la región ITS y análisis cariotípico. **Gayana. Botánica**, v. 68, n. 1, p. 40–48, 2011.
- MUSCHOLL, E.; SPIRA, F. J. Kinetic analysis of stimulation-evoked overflow of noradrenaline and dopamine β -hydroxylase from the isolated rabbit heart. The effect of dopa decarboxylase inhibition. **Neuroscience**, v. 7, n. 12, p. 3201–3211, 1982.
- NAIR, J. J.; VAN STADEN, J. Pharmacological and toxicological insights to the South African Amaryllidaceae. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, n. September, p. 262–275, 2013.
- NARITA, Y.; INOUE, K. Inhibition of Porcine Pancreas α -Amylase by Chlorogenic Acids from Green Coffee Beans and Cinnamic Acid Derivatives: A Focus on Kinetic. In: Preeedy, V. R. (Org.) **Coffee in Health and Disease Prevention**. Londres: Elsevier Inc., 2014. cap. 84.
- NEILL, D. Should Alzheimer's disease be equated with human brain ageing? A maladaptive interaction between brain evolution and senescence. **Ageing Research Reviews**, v. 11, n. 1, p. 104–122, 2012.
- OLIVEIRA, R. S. D. E. **O gênero *Hippeastrum* Herb. (Amaryllidaceae) no Brasil: Evidência de Evolução Reticulada e Análise de Caracteres Florais. Dissertação**. 2012. 240 f. Tese (Doutorado Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.
- ORESTES V, F. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 32, n. 3, p. 137–148, 2005.

- OYEDEMI, S. O. et al. Alpha-Amylase Inhibition and Antioxidative Capacity of Some Antidiabetic Plants Used by the Traditional Healers in Southeastern Nigeria. **Scientific World Journal**, v. 8, n. 1, p. 53–57, 2009.
- PAGLIOSA, L. B. et al. Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on in vitro acetylcholinesterase activity. **Phytomedicine**, v. 17, n. 8–9, p. 698–701, 2010.
- PANT, G. et al. In vitro α -amylase and α -Glucosidase inhibitor activity of *Abutilon indicum* leaves. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 6, n. 5, p. 22–24, 2013.
- SILVA, C. V., BORGES, F. M., VELOZO, E. S. Phytochemistry of some Brazilian Plants with Aphrodisiac Activity. In: PENG, D. (Org.). **Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**. Salvador da Bahia: INTECH, 2016. cap. 15.
- PETRONILHOA, E. D. C.; PINTO, A. C.; VILLARA, J. D. F. Acetilcolinesterase: Alzheimer e guerra química. **Ciência e Tecnologia**, p. 3–14, 2011.
- PETTIT, G. R. et al. Antineoplastic Agents, 256. Cell Growth Inhibitory Isocarbostryrils from *Hymenocallis*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 10, p. 1682–1687, 1993.
- PETTIT, G. R. et al. Antineoplastic agents, 301. An investigation of the amaryllidaceae genus *Hymenocallis*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 5, p. 756–759, 1995.
- PHILIPP VON MARTIUS, C. F.; EICHLER, A. W.; URBAN, I. Amaryllidaceae, In: _____ **Flora Brasilensis**. [S. I.: s. n.], 1847, Vol. III, Part I, Fasc. 8, Coluna 141, p. 141–164. Disponível em: <http://florabrasiliensis.cria.org.br/fviewer>. Acesso em: 24 jan 2018.
- PIOZZI, F. et al. Occurrence of non-basic metabolites in Amaryllidaceae. **Phytochemistry**, v. 8, n. 1968, p. 1745–1748, 1969.
- PISTIA-BRUEGGEMAN, G.; HOLLINGSWORTH, R. I. A preparation and screening strategy for glycosidase inhibitors. **Tetrahedron**, v. 57, n. 42, p. 8773–8778, 2001.
- PRESLEY, C. C. et al. New potentially bioactive alkaloids from *Crinum erubescens*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 21, p. 5418–5422, 2016.
- QUIDEAU, S.; POUYSÉGU, L. Synthetic uses of orthoquinone monoketals and their orthoquinol variants. A review. **Organic Preparations and Procedures International**, v. 31, n. 6, p. 617–680, 1999.
- RAMADOSS, K. et al. Anti-Inflammatory Activity of Ethanolic Extract of Flowers *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. By HRBC Membrane Stabilization Method. **Translational Biomedicine**, v. 7, n. 2, p. 1–5, 2016.
- RAYMÚNDEZ, U. et al. Microsporogénesis en *Hymenocallis caribaea* (L.) Herb. (Amaryllidaceae). **Acta Botánica Venezuela**, v. 31, n. 2, p. 409–424, 2008.
- REYES ARAGÓN, C. J. et al. Rehabilitación Cognitiva en pacientes con Enfermedad de Alzheimer. **Psicología desde el Caribe**, v. 29, n. 2, p. 421–455, 2012.

- RICARDO, M. L. et al. Plants from the Brazilian Traditional Medicine: species from the books of the Polish physician Piotr Czerniewicz (Pedro Luiz Napoleão Chernoviz, 1812–1881). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, p. 1–13, 2017.
- RODRÍGUEZ, D. et al. Tratamiento farmacológico de la demencia: cuándo, cómo y hasta cuándo. Recomendaciones del Grupo de Trabajo de Demencias de la Sociedad Catalana de Geriatria y Gerontología. Spanish. **Journal of Geriatrics and Gerontology**, v. 47, n. 5, p. 228–233, 2012.
- ROITMAN, G. et al. Presence of *Habranthus cardenasianus* (Amaryllidaceae) in Argentina, **Bulletin of the Argentinian Botanical Society**, v. 17, n. 3, p. 393–394, 2007.
- RØNSTED, N. et al. Can phylogeny predict chemical diversity and potential medicinal activity of plants? A case study of amaryllidaceae. **BMC Evolutionary Biology**, v. 12, n. 1, p. 182, 2012.
- ROSLI, N. et al. Growth profile and SEM analyses of *Candida albicans* and *Escherichia coli* with *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb leaf extract. **Tropical Biomedicine**, v. 31, n. 4, p. 871–879, 2014.
- SALES, P. M. et al. α -amylase inhibitors: A review of raw material and isolated compounds from plant source. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 1, p. 141–183, 2012.
- SCARANO, F. R. et al. Four sites with contrasting environmental stress in southeastern Brazil: relations of species, life form diversity, and geographic distribution to ecophysiological parameters. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 136, p. 345–364, 2001.
- SCHÜRMAN DA SILVA, A. F. *Hippeastrum vittatum* (L'Hér.) Herbert e *Hippeastrum striatum* (Lam.) Moore: Análise química e avaliação biológica dos alcalóides isolados. 2008. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- SEBAUGH, J. L. Guidelines for accurate EC_{50}/IC_{50} estimation. **Pharmaceutical Statistics**, v. 10, n. 2, p. 128–134, 2011.
- SEBBEN, C. **Investigação Química e Biológica em *Hippeastrum breviflorum* Herb. (Amaryllidaceae)**. 2005. 118. f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal Do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- SHINDE, J. et al. α -Glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels seed kernel in vitro and in Goto-Kakizaki (GK) rats. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 7, p. 1278–1281, 2008.
- SINGH, G.; SAXENA, R. K.; SINGH, N. K. Screening of Potential Antimicrobial Activity of Indian Medicinal Plant of Different Solvent Extract: *Tinospora cordifolia* and *Hymenocallis littoralis*. **International Research Journal of Engineering and Technology**, v. 3, n. 3, p. 928–932, 2016.
- SINGH, R.; PANT, N. *Hymenocallis littoralis* Salisb. as antifeedant to desert locust *Schistocerca gregaria* Forsk. **Indian Journal of Entomology**, v. 42, n. 3, p. 460–468, 1980.
- SINGHANIA, R. R. et al. Industrial Enzymes. In: _____ (Org.). **Industrial Biorefineries & White Biotechnology**. [s.l.]: Elsevier, 2015.
- SOBRAL STEHMANN, M. J. R. Biodiversidade no Brasil, Biodiversidade e o desenvolvimento de fármacos e medicamentos. **Farmacognosia**, p. 1–10, 1998.

- SOUSA, G. F. D. et al. Flavonol triglycosides of leaves from *Maytenus robusta* with acetylcholinesterase inhibition. **Phytochemistry Letters**, v. 19, p. 34–38, 2017.
- SOUZA, P. **Atividade de inibição enzimática por espécies vegetais do bioma cerrado**. 2011. 90. f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2011.
- SUNDARASEKAR, J. et al. Potential antioxidant activities of methanolic extracts of spider lily (*Hymenocallis littoralis*). **Australian Journal of Crop Science**, v. 7, n. 5, p. 625–631, 2013.
- SUNDARASEKAR, J.; SAHGAL, G.; SUBRAMANIAM, S. Anti-Candida activity by *Hymenocallis littoralis* extracts for opportunistic oral and genital infection *Candida albicans*. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 7, n. 3, p. 211–216, 2012.
- THI NGOC TRAM, N. et al. *Crinum* L. (Amaryllidaceae). **Fitoterapia**, v. 73, n. 3, p. 183–208, 2002.
- TIBONI, M. **Monitoramento da atividade de enzimas do complexo celulolítico utilizando celulose bacteriana covalentemente tingida com azul brilhante de Remazol R**. 2011. 99. f. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- TOLEDO, C. E. M. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaa as extractor liquid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 420–425, 2011.
- TOUGU, V. Acetylcholinesterase: Mechanism of Catalysis and Inhibition. **Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents**, v. 1, n. 2, p. 155–170, 2001.
- TSUDA, Y.; KASHIWABA, N.; KUMAR, V. The Alkaloidal Constituents of Goda-Manel (*Crinum zeylanicum* L.), a Sri Lankan Folk Medicine. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 8, n. 32, p. 3023–3027, 1984.
- TURNER, N. A. et al. Emergence of resistance to biocides during differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 27–34, 2000.
- VERDAN, M. et al. Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares, 32º, 2017, Vitória. Alkaloids from *Hippeastrum goianum* (Amarillidaceae). Proceedings of 6º Brazilian **Conference on Natural Products**, Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, 2017.
- VIEGAS JUNIOR, C. et al. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 655–660, 2004.
- VISVANATHAN, R.; JAYATHILAKE, C.; LIYANAGE, R. A Simple Microplate-Based Method for the Determination of α -amylase Activity Using the Glucose Assay Kit (GOD method). **Food Chemistry**, v. 15, p. 853–859, 2016.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2 ed. Munich: Springer, 1996. 384 p.
- WANG, G. H. et al. Tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of three *Bifidobacterium bifidum*-fermented herb extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 376–382, 2016.
- WIEMANN, J. et al. Piperlongumine B and analogs are promising and selective inhibitors for acetylcholinesterase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 139, p. 222–231, 2017.

- WIEMANN, J.; LOESCHE, A.; CSUK, R. Novel dehydroabietylamine derivatives as potent inhibitors of acetylcholinesterase. **Bioorganic Chemistry**, v. 74, p. 145–157, 2017.
- WHO. **Neurological disorders: a public health approach Neurological disorders: public health challenges**, Geneva: World Health Organization, 2006.
- WHO. **Diabetes the Problem.** Disponível em: http://www.who.int/nmh/publications/fact_sheet_diabetes_en.pdf, Acesso em: mar 9 de 2018.
- WHO. **Diabetes Facts.** Disponível em: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00152193-198704000-00001>, Acesso em: mar 9 de 2018.
- YAZBEK, P. B. et al. Plants used during maternity, menstrual cycle and other women's health conditions among Brazilian cultures. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 179, p. 310–331, 2016.
- YILMAZER-MUSA, M. et al. Grape seed and tea extracts and catechin 3-gallates are potent inhibitors of α -amylase and α -glucosidase activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 36, p. 8924–8929, 2012.
- ZHONG, J. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 6, p. 849, 2009.