

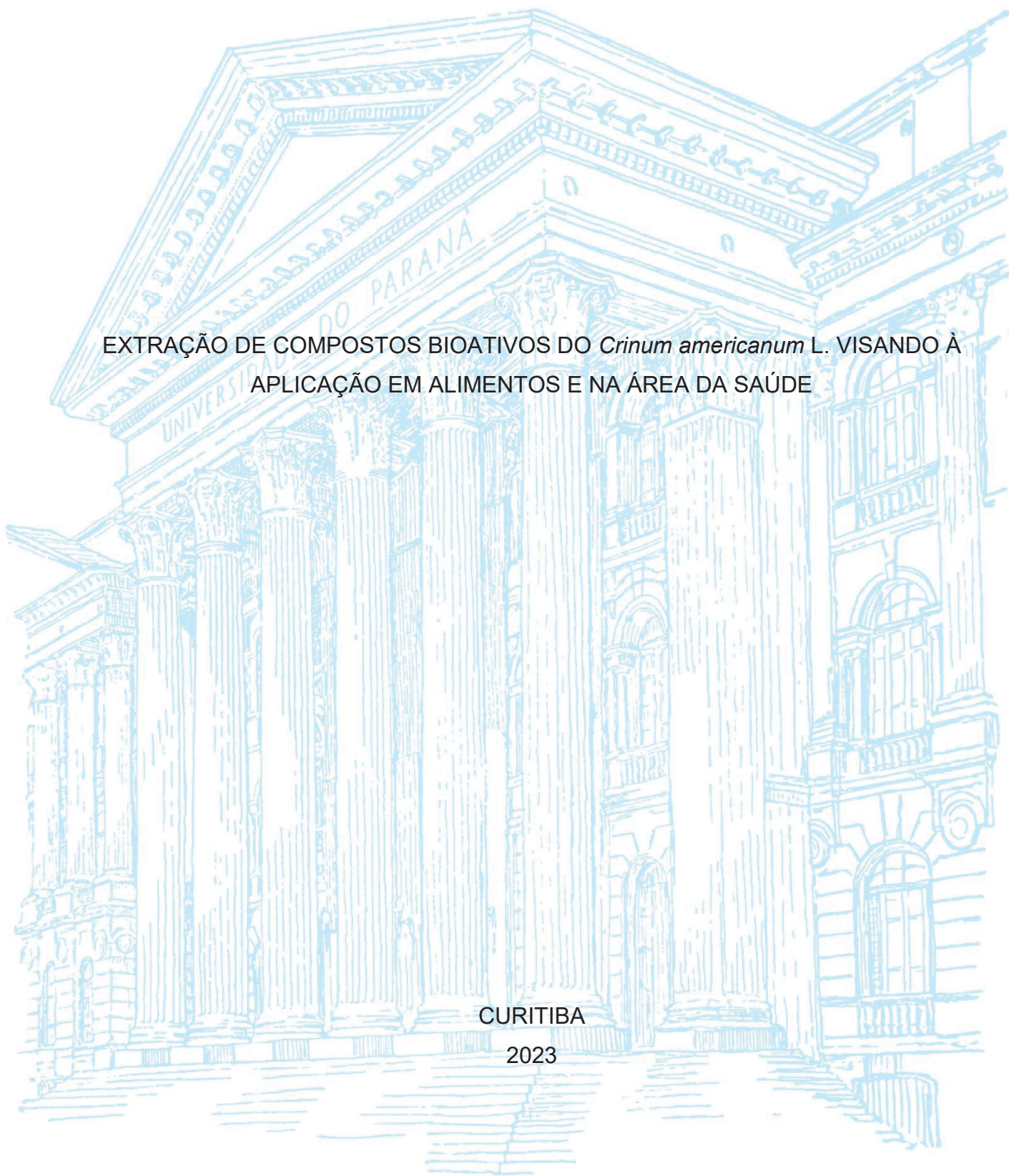
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RENATA LÁZARA DE ARAÚJO

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO *Crinum americanum* L. VISANDO À
APLICAÇÃO EM ALIMENTOS E NA ÁREA DA SAÚDE

CURITIBA

2023



RENATA LÁZARA DE ARAÚJO

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO *Crinum americanum* L. VISANDO À
APLICAÇÃO EM ALIMENTOS E NA ÁREA DA SAÚDE

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutora em Engenharia de
Alimentos, no curso de Pós- Graduação em
Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcos R. Mafra

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Araújo, Renata Lázara de

Extração de compostos bioativos do *Crinum Americanum* L. visando à aplicação em alimentos e na área da saúde / Renata Lázara de Araújo. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Marcos Rogério Mafra

1. *Crinum Americanum* L. 2 . Amaryllidaceae. 3. Diabetes - Tratamento. 4. Compostos Bioativos . I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. III. Mafra, Marcos Rogério. IV. Título.

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
ALIMENTOS - 40001016019P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **RENATA LAZARA DE ARAUJO** intitulada: **Extração de Compostos Bioativos do *Crinum americanum* L. Visando à Aplicação em Alimentos e na Área da Saúde.**, sob orientação do Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO MAFRA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 10 de Julho de 2023.

Assinatura Eletrônica

12/07/2023 10:13:47.0

MARCOS ROGÉRIO MAFRA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

12/07/2023 15:50:29.0

MARIA LUCIA MASSON

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

12/07/2023 10:22:04.0

MÁRCIA CRISTINA TEIXEIRA RIBEIRO VIDIGAL

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA)

Assinatura Eletrônica

12/07/2023 19:45:28.0

SUELEN ÁVILA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ -
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO)

Assinatura Eletrônica

12/07/2023

10:54:52.0

PAULA BECKER PERTUZATTI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO)

Francisco Heráclito dos Santos, 100 - Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná – Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-3232 - E-mail: posalim@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 298506

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 298506

*À minha mãe e ao meu marido: essa e todas as
conquistas da minha vida*

AGRADECIMENTOS

A Universidade Pública é transformadora. Através dela conheci um mundo, até então, inimaginável para uma adolescente de 17 anos. Ao longo de toda minha trajetória universitária, contei com os melhores professores, pesquisadores e fonte de apoio financeiro para minha permanência e finalização dos meus estudos. Para mim, este quesito foi, muitas vezes, mais importante do que aqueles. Dessa forma, gostaria de estender meus agradecimentos ao povo Brasileiro, que através de seus impostos financia a educação e pesquisa no Brasil. Além disso, pela conclusão dessa etapa tão importante em minha vida, deixo meus sinceros agradecimentos à Universidade Federal do Paraná (UFPR) e ao Laboratório de Termodinâmica e Operações de Separação (LATOS), pela estrutura, oportunidades e todo conhecimento. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida e ao Professor Dr. Marcos Mafra, pela orientação e ensinamentos ao longo desses anos.

Hoje, alcanço um objetivo muito importante em minha vida, que foi conquistado com lutas, renúncias e principalmente apoio. O apoio mais importante, que se faz exemplo presente em minha vida, é o da minha Mãe! O meu maior porto seguro, fonte de inspiração, amor e dedicação.

Agradeço ao meu marido, Paulo Eduardo, por segurar minhas mãos, mesmo estando longe, me apoiar em todas as minhas escolhas e decisões e por acreditar em mim, mais do que eu mesma. Você é meu lugar de refúgio, meu lar! Agradeço aos meus irmãos, Kelby e Marcella, por estarem sempre presentes em minha vida e por serem exemplo de força e dedicação. Amo muito vocês! Agradeço aos meus tios, Leênny, Cristina e Luciomar. Vocês fizeram por mim mais do que fariam por vocês.

O mundo da pesquisa nos fornece além de conhecimento, maturidade, propósitos profissionais, pessoais e amizades infindáveis. Não poderia deixar de agradecer a minha amiga/irmã, Carolina Lilibeth, meu maior presente do doutorado. Minha companheira de pesquisa, de erros e acertos. Dividimos não só uma casa, como experiências incríveis e únicas, que fizeram com que os laços criados durante esse período sejam inquebrantáveis. Sentirei saudades da casa da Dona Terezinha, do nosso trabalho no laboratório, das caminhadas e comilanças. Muito obrigada por ser do jeito que você é e por tornar tudo mais agradável.

Durante esses anos, estive longe de casa, mas fui sempre muito bem amparada por pessoas abençoadas. A Dona Terezinha é exemplo disso. Ela sempre foi muito mais do que uma locadora de imóvel. Sempre muito atenciosa e preocupada com nosso conforto e bem-estar. Muito obrigada por me acolher tão bem, por suas sábias palavras, carinho e cuidado.

Sei que muitas pessoas, além das que já foram citadas, torceram por mim ao longo de toda a minha trajetória acadêmica. O doutorado pode significar o fim de um ciclo e por isso agradeço a todas as pessoas que torceram, oraram e contribuíram para que eu chegasse nesse ponto da minha vida.

Por fim, agradeço a Deus por me carregar no colo em todos os períodos da minha vida. Por me mostrar sempre o caminho e me dar forças para permanecer até o fim. Obrigada Senhor!

*Ninguém anda mais depressa do que as pernas
que tem. Se onde quero estar é longe, não estou
lá num momento.*

(Alberto Caeiro)

RESUMO

O *Crinum americanum* L. é uma planta aquática, não endêmica do Brasil e pertencente à família das Amaryllidaceae. As plantas dessa família são bem conhecidas por seus alcaloides isoquinolínicos com atividades biológicas e estruturas químicas variáveis e responsáveis pelo seu potencial citotóxico, antibacteriano, antifúngico, antidiabético e, principalmente, como inibidor da acetilcolinesterase. Apesar da composição química e propriedades biológicas de muitas espécies dessa família ser bem conceituada na literatura, o *C. americanum* L. ainda é pouco explorado. Dessa forma, diante da escassez de dados sobre a composição química e biológica dessa planta e o potencial terapêutico apresentado pela família Amaryllidaceae, objetivou-se avaliar o perfil nutricional, químico, biológico e citotóxico das folhas, bulbos e raízes de *C. americanum* L. Os resultados obtidos foram organizados em três seções. Na seção I a composição nutricional e a digestibilidade *in vitro* de todas as partes de *C. americanum* L. foram avaliadas para verificar a utilização dessa espécie vegetal como matéria-prima não convencional e com potencial nutricional. Após, foi realizado o processo de otimização de um sistema de solventes (etanol, água e acetato de etila), para extração simultânea de alcaloides, compostos fenólicos e outras biomoléculas de interesse. Os extratos otimizados foram caracterizados por ESI-FT-MS e sua toxicidade *ex vivo* foi avaliada frente a células mononucleares do sangue periférico humano (MN). No total, 89 compostos foram identificados, incluindo alcaloides, compostos fenólicos, ácidos graxos insaturados, aminoácidos e outros nunca identificados anteriormente para essa planta. Além disso, os extratos não apresentaram toxicidade para células MN. Com base na composição química, nutricional e viabilidade celular, apenas as folhas foram selecionadas para a continuidade do trabalho. Na seção II foi realizada uma comparação entre rendimento de extração, composição química e potencial biológico das frações lipídicas (FL) obtidas por Soxhlet (SX) e pela extração assistida por ultrassom (UAE), utilizando hexano como solvente de extração. Foi possível observar que os dois métodos de extração foram eficientes para a obtenção de ácidos graxos insaturados e para a preservação das propriedades funcionais das FL's. A seção III foi realizada para avaliar o potencial biológico, citotóxico e digestibilidade *in vitro* do extrato hidrometanólico (EHM) e das folhas secas de *C. americanum* L. O ensaio de digestibilidade *in vitro* demonstrou que o EHM pode ser considerado uma fonte potencial de compostos naturais devido à sua biodisponibilidade. Além disso, o EHM inibiu 99,35% a atividade da enzima α -glicosidase e apresentou atividade antiglicante superior a 90%. Somado a isso, o EHM mostrou-se uma alternativa promissora contra linhagens tumorais (H460), sem apresentar toxicidade a linhagens celulares normais (HEK293). Os resultados observados ao longo desse trabalho indicam que compostos com alto potencial biológico podem ser obtidos dessa planta e posteriormente utilizados em modelos medicinais, cosméticos e alimentares.

Palavras-chave: Atividade Antidiabética. Citotoxicidade. Compostos Bioativos. Espécies Subutilizadas.

ABSTRACT

Crinum americanum L. is an aquatic plant, not endemic to Brazil and belonging to the Amaryllidaceae family. The plants of this family are well known for their isoquinoline alkaloids with variable biological activities and chemical structures and responsible for their cytotoxic, antibacterial, antifungal, antidiabetic potential and, mainly, as an acetylcholinesterase inhibitor. Despite the chemical composition and biological properties of many species of this family being well regarded in the literature, *C. americanum* L. is still little explored. Thus, given the scarcity of data on the chemical and biological composition of this plant and the therapeutic potential presented by the Amaryllidaceae family, the objective was to evaluate the nutritional, chemical, biological and cytotoxic profile of the leaves, bulbs and roots of *C. americanum* L. The results obtained were organized into three sections. In section I, the nutritional composition and *in vitro* digestibility of all parts of *C. americanum* L. were evaluated to verify the use of this plant species as an unconventional raw material with nutritional potential. Afterwards, the process of optimizing a solvent system (ethanol, water and ethyl acetate) was carried out for the simultaneous extraction of alkaloids, phenolic compounds and other biomolecules of interest. The optimized extracts were characterized by ESI-FT-MS and their *ex vivo* toxicity was evaluated against human peripheral blood (MN) mononuclear cells. In total, 89 compounds were identified, including alkaloids, phenolic compounds, unsaturated fatty acids, amino acids and others never previously identified for this plant. Furthermore, the extracts did not show toxicity to MN cells. Based on the chemical composition, nutritional and cell viability, only the leaves were selected for further work. In section II, a comparison was made between extraction yield, chemical composition and biological potential of lipid fractions (LF) obtained by Soxhlet (SX) and ultrasound-assisted extraction (UAE), using hexane as extraction solvent. It was possible to observe that the two extraction methods were significant for obtaining unsaturated fatty acids and for preserving the functional properties of LF's. Section III was carried out to evaluate the biological, cytotoxic and *in vitro* digestibility potential of the hydromethanolic extract (EHM) of the leaves of *C. americanum* L. The *in vitro* digestibility assay demonstrated that the EHM can be considered a potential source of natural compounds due to its bioavailability. In addition, EHM inhibited 99.35% of the activity of the α -glucosidase enzyme and showed antiglycant activity greater than 90%. Added to this, EHM proved to be a promising alternative against tumor cell lines (H460), without showing toxicity to normal cell lines (HEK293). The results observed throughout this work indicate that compounds with high biological potential can be obtained from this plant and subsequently used in medicinal, cosmetic and food models.

Key-words: Antidiabetic Activity. Cytotoxicity. Bioactive compounds. Underused Species.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ALGUMAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA AMARYLLIDACEAE: A. <i>Amarylliss belladonna</i> ; B. <i>Crinum x powellii</i> ; C. <i>Crinum americanum</i> L.; D. <i>Narcissus x cyclamineus</i> ; E. <i>Narcissus tazetta</i> ; F. <i>Zephyranthes rósea</i>	23
FIGURA 2 -	PARTES DE <i>Crinum</i> L.: 2A. BULBOS E RAÍZES; 2B: FLORES SUSPENSAS EM UM SCAPE EM FORMATO DE UMBELA	24
FIGURA 3 -	ESTRUTURA DE ALGUNS ALCALOIDES DA FAMÍLIA Amaryllidaceae.	26
FIGURA 4 -	ESTRUTURA DO ALCALOIDE CRININA	26
FIGURA 5 -	ESTRUTURA DO ALCALOIDE LICORINA	27
FIGURA 6 -	ESTRUTURA DO ALCALOIDE FENANTRIDINA	28
FIGURA 7 -	<i>Crinum americanum</i> L. NO LITORAL DO PARANÁ.....	34
FIGURA 8 -	FOLHAS, BULBO E RAIZ DE <i>Crinum americanum</i> L. SECAS E TRITURADAS	45
FIGURA 9 -	VISÃO GERAL DO MÉTODO DE DIGESTÃO <i>IN VITRO</i> SIMULADO.....	48
FIGURA 10 -	PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO POR AGITAÇÃO MAGNÉTICA (A, B e C) E EXTRATO LIOFILIZADO DAS FOLHAS (D), BULBO (E) E RAIZ (F) DE <i>Crinum americanum</i> L.	50
FIGURA 11 -	FORMAÇÃO DE MISTURA BINÁRIA (ÁGUA E ACETATO DE ETILA) NO EXTRATO DAS FOLHAS de <i>C. americanum</i> L.	51
FIGURA 12 -	EXTRATOR SOXHLET E FRAÇÃO LIPÍDICA OBTIDA APÓS EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE.....	52
FIGURA 13 -	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH E FRAP) E COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (TPC), DAS FOLHAS, BULBO E RAÍZ DE <i>C. americanum</i> L. ANTES E APÓS A DIGESTÃO <i>In vitro</i>	71
FIGURA 14 -	EFEITOS DO TIPO DE SOLVENTE NO TEOR DE DPPH (A; E e I mg TE.100 g ⁻¹), FRAP (B e F mg FE (III).100 g ⁻¹), TPC (C ; G e J mg GAE.100 g ⁻¹) E TAK (D; H e K mg ATR.100 g ⁻¹) DE EXTRATOS DE FOLHAS, BULBOS E RAÍZES DE <i>C. americanum</i> L.	80
FIGURA 15 -	PERFIL DE DESEJABILIDADE DA OTIMIZAÇÃO SIMULTÂNEA DO EXTRATO DE FOLHA (A), BULBO (B) E RAIZ (C) DE <i>C. americanum</i> L. COM BASE NA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH E FRAP), FENÓLICOS TOTAIS E ALCALOIDES TOTAIS.....	82
FIGURA 16 -	EFEITO DE EXTRATOS OTIMIZADOS DE FOLHAS, BULBOS E RAÍZES DE <i>C. americanum</i> L. NA VIABILIDADE DE CÉLULAS MN DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO.	91
FIGURA 17 -	ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DAS ENZIMAS α -AMILASE E α -GLICOSIDASE.....	100
FIGURA 18 -	CURVAS IG50 DE VIABILIDADE	104
FIGURA 19 -	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH, ABTS E FRAP), TPC E TFC. ANTES E APÓS A DIGESTÃO <i>In vitro</i>	110
FIGURA 20 -	ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA TIPO II.....	112
FIGURA 21 -	ATIVIDADE ANTIGLICANTE.....	113
FIGURA 22 -	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR REALIZADO PELO MÉTODO MTT.....	115

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - MÉTODO DE PREPARAÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ESPÉCIES DE <i>Crinum</i> L.....	28
TABELA 2 - ALCALOIDES PRESENTES EM <i>C. americanum</i> L.....	35
TABELA 3 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL SIMPLEX CENTROIDE PARA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE <i>C. americanum</i> L.....	49
TABELA 4 - CRITÉRIOS PARA ATRIBUIÇÃO DE FÓRMULAS MOLECULARES AOS ÍONS DETECTADOS.	55
TABELA 5 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL (%; g/100 g) DE FOLHAS, BULBO E RAIZ DE <i>C. americanum</i> L.....	65
TABELA 6 - DETERMINAÇÕES DA COMPOSIÇÃO MINERAL (mg g ⁻¹) DE FOLHAS, BULBO E RAIZ DE <i>C. americanum</i> L.	67
TABELA 7 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE, COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ALCALOIDES TOTAIS DE EXTRATOS DE FOLHAS, BULBOS E RAÍZES DE <i>Crinum americanum</i> L.	74
TABELA 8 - COEFICIENTES DE REGRESSÃO OBTIDOS POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA AVALIAR OS EFEITOS DA COMBINAÇÃO DE SOLVENTES NA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS, NA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E TAK DE EXTRATOS DE FOLHAS, BULBOS E RAÍZES DE <i>C. americanum</i> L.	76
TABELA 9 - VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE OTIMIZAÇÃO: VALORES PREVISTOS E EXPERIMENTAIS PARA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE, TPC E TAK DO EXTRATO OTIMIZADO DE FOLHAS (EOF), BULBO (EOB) E RAIZ (EOR) DE <i>C. americanum</i> L.....	83
TABELA 10 - MEDIÇÃO DE MASSA PRECISA PARA ÍONS MOLECULARES DE COMPOSTOS ORIGINAIS EM EXTRATOS OTIMIZADOS DE <i>C. americanum</i> L.	85
TABELA 11 - COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DAS FOLHAS DE <i>C. americanum</i> L.	95
TABELA 12- CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DAS FRAÇÕES LIPÍDICAS PELOS MÉTODOS DPPH E ABTS	98
TABELA 13 - ATIVIDADE ANTIGLICANTE DAS FRAÇÕES LIPÍDICAS DAS FOLHAS DE <i>C. americanum</i> L.	102
TABELA 14 - IG 50 DAS FRAÇÕES LIPÍDICAS	103
TABELA 15 - COMPOSTO FENÓLICO IDENTIFICADO NO EXTRATO HIDROMETANÓLICO DAS FOLHAS DE <i>C. americanum</i> L.	107

LISTA DE SIGLAS

ABTS	RADICAL ORGÂNICO ÁCIDO 2,2-AZINO-BIS 3-ETILBENZOTHAZOLINA-6-SULFÔNICO
ATR	ATROPINA
COS	SOLVENTES ORGÂNICOS CONVENCIONAIS
DPPH	RADICAL 2,2 DIFENIL-1-PICRILHIDRAZILA
EDTA	ÁCIDO ETILENODIAMINO TETRA-ACÉTICO
EHM	EXTRATO HIDROMETANÓLICO
EOB	EXTRATO OTIMIZADO DO BULBO
EOF	EXTRATO OTIMIZADO DAS FOLHAS
EOR	EXTRATO OTIMIZADO DA RAIZ
ESI-FT-MS	IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY E ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM TRANSFORMADA DE FOURIER NOS MODOS DE ÍONS POSITIVO E NEGATIVO
ESL	EXTRAÇÃO SÓLIDO LÍQUIDO
FL	FRAÇÃO LIPÍDICA
FRAP	MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO
GAE	ÁCIDO GÁLICO
GC/MS	CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS
H460	CÂNCER DE PULMÃO
HEK293	FIBROBLASTO
HPLC-DAD	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS
MCF-7	ADENOCARCINOMA DO CÂNCER DE MAMA
MN	CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO
MTT	BROMETO DE 3-4,5-DIMETIL-TIAZOL-2-IL-2,5-DIFENILTETRAZÓLIO
SX	SOXHLET
TAK	ALCALOIDES TOTAIS
TE	TROLOX
TFC	FLAVONOIDES TOTAIS
TPC	COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS
UAE	EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM
UEP	PLANTA ALIMENTÍCIA NÃO CONVENCIONAL

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	16
1.1 INTRODUÇÃO	17
1.2 OBJETIVOS	20
1.2.1 Objetivo Geral	20
1.2.2 Objetivos Específicos	20
CAPÍTULO II - REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 VISÃO GERAL SOBRE O GÊNERO <i>CRINUM</i> L. (AMARYLLIDACEAE)	23
2.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL BIOLÓGICO	25
2.3 <i>Crinum americanum</i> L.	33
2.4 ROTAS TECNOLÓGICAS PARA A OBTENÇÃO DE ALCALOIDES: MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO	35
2.4.1 Métodos de Extração	35
2.4.2 Métodos de Separação	38
2.5 TENDÊNCIAS DE APLICAÇÃO	40
2.6 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE	41
CAPÍTULO III – MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 COLETA E PREPARO DA AMOSTRA	45
3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DIGESTÃO <i>IN VITRO</i>	46
3.2.1 Composição Centesimal	46
3.2.2 Composição Mineral	46
3.2.3 Digestão <i>in vitro</i>	47
3.3 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO	48
3.3.1 Design Experimental	49
3.3.2 Otimização	51
3.3.3 Obtenção da Fração Lipídica	52
3.3.3.1 Extração em Soxhlet (SX)	52
3.3.3.2 Extração Lipídica Ultrassônica (UAE)	53
3.3.4 Extração Hidrometanólica	53
3.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS	53
3.4.1 Composição dos Extratos Otimizados por ESI–FT-MS	53
3.4.2 Composição de Ácidos Graxos dos extratos obtidos por Soxhlet e UAE	55

3.4.3 Identificação e Quantificação de Compostos Fenólicos do Extrato Hidrometanólico	56
3.5 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS.....	56
3.5.1 Conteúdo Fenólico Total (TPC).....	56
3.5.2 Flavonoides Totais (TFC).....	57
3.5.3 Teor de Alcaloides Totais (TAK).....	57
3.6 CAPACIDADE ANTIOXDANTE <i>IN VITRO</i>	58
3.6.1 Método de Redução do Ferro (FRAP).....	58
3.6.2 Capacidade de Remoção de Radical Orgânico ácido 2,2-azino-bis 3-etilbenzothiazolina-6-sulfônico (ABTS).....	58
3.6.3 Captura do radical livre DPPH (2,2-Difenil-1-picril-hidrazil).....	59
3.7 ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA <i>IN VITRO</i>	59
3.7.1 Atividade de Inibição da α -glicosidase	59
3.7.2 Atividade de Inibição de α -amilase.....	60
3.8 ENSAIO ANTIGLICANTE.....	61
3.8.1 Via oxidativa	61
3.8.2 Via não oxidativa	61
3.9 CITOTOXICIDADE	61
3.9.1 Separação de células mononucleares do sangue periférico humano (MN)	62
3.9.2 Linhagens Celulares e Culturas	62
3.9.3 Ensaio MTT	62
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	63
CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
SEÇÃO I.....	65
4.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL.....	65
4.2 COMPOSIÇÃO MINERAL.....	67
4.3 DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DAS FOLHAS, BULBO E RAIZ	70
4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO OTIMIZADO	73
4.5 FENÓLICOS TOTAIS (TPC), CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH E FRAP) E ALCALOIDES TOTAIS (TAK).....	73
4.6 MODELAGEM DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E OTIMIZAÇÃO ESTATÍSTICA DO SISTEMA DE SOLVENTES.....	76
4.7 ANÁLISE EM ESI-FT-MS	83

4.8 CITOTOXICIDADE <i>EX VIVO</i>	91
4.9 CONCLUSÃO.....	94
SEÇÃO II.....	95
4.10 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS.....	95
4.11 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	98
4.12 ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA <i>IN VITRO</i>	99
4.12.1 Inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase	99
4.13 ATIVIDADE ANTIGLICANTE	101
4.14 CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	103
4.15 CONCLUSÃO.....	106
SEÇÃO III.....	107
4.16 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	107
4.17 DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i>	108
4.18 ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA <i>IN VITRO</i>	111
4.18.1 Inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase	111
4.19 ATIVIDADE ANTIGLICANTE	113
4.20 CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	115
4.21 CONCLUSÃO.....	117
CAPÍTULO V – CONSIDERAÇÕES FINAIS	118
5.1 CONCLUSÃO DA TESE	119
REFERÊNCIAS.....	120
ANEXOS	136

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

Em função da crescente demanda por questões relacionadas à saúde, bem-estar e nutrição, as indústrias farmacêuticas, químicas e de alimentos demonstram grande interesse na obtenção de compostos bioativos de origem vegetal, a fim de aplicá-los em produtos de alto valor agregado como agentes importantes para a manutenção da saúde humana. Cerca de 40% dos produtos farmacêuticos aprovados e em uso no mundo derivam de compostos naturais. Além disso, aproximadamente 80% da população mundial depende de plantas para suas necessidades médicas primárias (CRUZ et al., 2022). Apesar do amplo conhecimento científico e cultural sobre gêneros e espécies vegetais consumidos em todo o mundo, a atenção da comunidade científica tem se voltado para o potencial de plantas pouco exploradas.

O *Crinum americanum* L. (Amaryllidaceae), é uma planta não endêmica do Brasil, de vegetação aquática e pouco explorada no mundo, sendo relatado apenas 5 artigos científicos na base de dados SCOPUS® sobre essa espécie vegetal (ALI et al., 1986; ARAÚJO et al., 2022; BARRA et al., 2021; GOMES et al., 2022; SILVA et al., 2022). O interesse pelo estudo dessa espécie pode ser justificado por dois motivos principais: O primeiro está relacionado ao potencial farmacológico apresentado por plantas da família Amaryllidaceae. Essas plantas são conhecidas por produzirem uma variedade de metabólitos secundários como os compostos fenólicos, lecitinas, peptídeos e, em especial, os alcaloides, que possuem atividade biológica significativa, se destacando, principalmente, no tratamento da doença de Alzheimer, devido a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) (CORTES et al., 2018). Além dessa importante atividade farmacológica, essas plantas foram citadas na literatura por apresentarem atividade antitumoral, antiviral, imunoestimulantes, antimalárica (JIN; YAO, 2019), antidiabética (PATEL et al., 2016), antidepressiva (FELIPE et al., 2007), antioxidante (ZHANG et al., 2013) e antimicrobiana (NAIR; VAN STADEN, 2019a).

O segundo motivo pelo qual o estudo de *C. americanum* L. é justificado está voltado para o seu uso na forma de chá, na medicina tradicional de comunidades litorâneas do interior do Paraná, Brasil, para o tratamento de câncer (SILVA et al., 2020). Além disso, o estudo de sua composição química e propriedades biológicas levaria à valorização dessa espécie e de seus produtos, bem como ao desenvolvimento econômico e sustentável para uma determinada região.

Dessa forma, por se tratar de uma espécie pouco explorada, é necessário verificar informações adicionais sobre a obtenção de processos compatíveis para a extração de seus compostos bioativos, de forma simples, pouco tóxica e com características vantajosas, como sustentabilidade, biodegradabilidade e perfis de toxicidade aceitáveis, a partir de um meio de extração de alta eficiência.

A eficiência da extração de um determinado composto pode ser determinada por vários fatores. Dentre esses, a escolha do solvente e a técnica de extração são determinantes para a obtenção de um extrato rico em biomoléculas com propriedades funcionais desejáveis. O solvente é um parâmetro de grande relevância nos processos de extração e solubilização de compostos alvo, sendo importante conhecer as características das moléculas de interesse, bem como compreender a afinidade do soluto pelo solvente. Por outro lado, a técnica de extração determina aspectos como o tempo e temperatura de extração, bem como a utilização de tecnologias (extração assistida por micro-ondas, por ultrassom, extração magnética entre outras) que influenciam na obtenção desses compostos.

Além do processo de extração, quando se trata de novos produtos obtidos a partir de biomoléculas vegetais, a segurança toxicológica deve ser continuamente avaliada para verificar o cumprimento das diretrizes internacionais. O estudo da toxicidade de um extrato vegetal pode ser feito usando diferentes ensaios *in vitro* de base química e celular (GRANATO et al., 2022). A viabilidade apresentada em ensaios de toxicidade pode ser crucial para o desenvolvimento de nutracêuticos ou medicamentos utilizados no tratamento ou prevenção de diversas doenças, uma vez que o extrato de uma mesma espécie vegetal pode apresentar baixa toxicidade para células normais e efeito antitumoral/citotóxico ao mesmo tempo.

Essa atividade farmacológica apresentada por extratos vegetais é importante, visto que as terapias atuais contra algumas doenças, especialmente o câncer, apresentam efeitos colaterais severos que podem diminuir a qualidade de vida dos pacientes. Dessa forma, a implementação de produtos naturais como alternativa terapêutica para diversas doenças, seria uma opção para minimizar esses efeitos colaterais e maximizar a qualidade de vida das pessoas (ALMEIDA et al., 2020). Considerando todos os efeitos benéficos da utilização de plantas medicinais e, em especial, das propriedades farmacológicas da família Amaryllidaceae, este estudo buscou determinar a composição química, nutricional e propriedades biológicas do *C.*

americanum L., a fim de obter compostos bioativos para aplicação industrial de alto valor econômico, potencialmente benéficos à saúde e para contribuir com o desenvolvimento científico dessa espécie e de seus produtos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Extrair os compostos bioativos presentes em *C. americanum* L., caracterizá-los e avaliar sua toxicidade, presença de compostos bioativos e compatibilidade para aplicações nas áreas de alimentos, cosméticos e fármacos.

1.2.2 Objetivos Específicos

- a) **Seção I** - O objetivo dessa seção é o de avaliar o *C. americanum* L. como uma matéria-prima não convencional com potencial nutricional, químico e farmacêutico.
 - i) Caracterizar as folhas, bulbos e raízes de *C. americanum* L. de acordo com sua composição química e sua bioacessibilidade após digestão *in vitro*;
 - ii) Obter um extrato otimizado a partir da mistura de um sistema de solventes (água, metanol e acetato de etila), para extração simultânea de alcaloides, compostos fenólicos e outras biomoléculas de interesse;
 - iii) Avaliar a capacidade antioxidante (DPPH, FRAP), TPC e TAK;
 - iv) Caracterizar os extratos otimizados por ionização por eletrospray e espectrometria de massas com transformada de Fourier nos modos de íons positivo e negativo (ESI-FT-MS);
 - v) Avaliar a toxicidade *ex vivo*, dos extratos otimizados, frente a células mononucleares do sangue periférico humano (MN).
- b) **Seção II** – O objetivo dessa seção é o de descrever os perfis lipídicos das folhas de *C. americanum* L., para a identificação de moléculas complexas, com interesse farmacológico e industrial.
 - i) Obter as frações lipídicas (FL) utilizando hexano e dois métodos de extração (Soxhlet e extração assistida por ultrassom);
 - ii) Comparar o rendimento de extração das FL;
 - iii) Identificar os compostos extraídos utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-FID);

- iv) Definir a capacidade antioxidante (DPPH e ABTS), potencial antidiabético II e antiglicante das FL;
 - v) Verificar a viabilidade celular *in vitro* das FL frente as células HEK293 (fibroblastos) e H460 (câncer de pulmão).
- c) **Seção III** – O objetivo dessa seção foi o de avaliar o potencial biológico, citotóxico e digestibilidade *in vitro* do extrato hidrometanólico (EHM) das folhas de *C. americanum* L.
- i) Obter o extrato hidrometanólico (20:80% m/m), utilizando extração magnética;
 - ii) Caracterizar o extrato por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (HPLC-DAD);
 - iii) Definir a capacidade antioxidante (DPPH, ABTS e FRAP), TPC e TFC dos extratos;
 - iv) Verificar a digestibilidade *in vitro* dos extratos e comparar com a digestibilidade *in vitro* das folhas secas;
 - v) Avaliar o potencial antidiabético II e antiglicante;
 - vi) Verificar a viabilidade celular *in vitro* frente as células HEK293 (fibroblastos) e H460 (câncer de pulmão).

CAPÍTULO II - REVISÃO DA LITERATURA

*Este capítulo faz parte do artigo intitulado “Crinum L. species as a potential source of alkaloids: Extraction methods and relevance for medicinal and pharmacological applications” publicado na **South African Journal of Botany**.*

Volume 151, Dezembro/2022, Páginas 720-734.

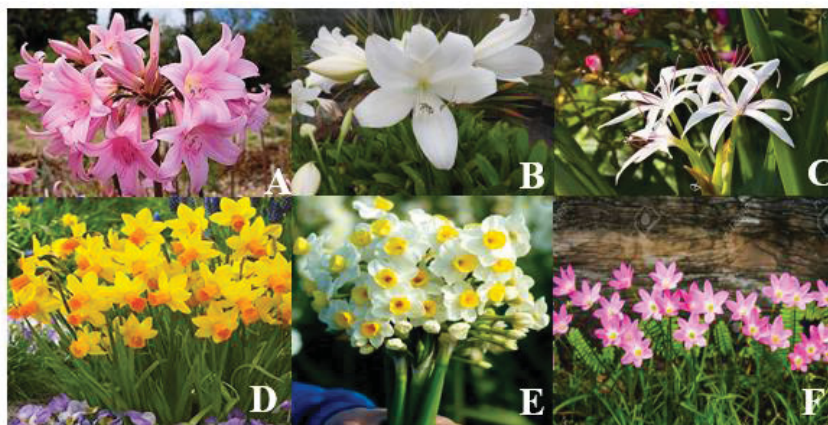
Neste capítulo é apresentada uma visão geral dos compostos presentes nas plantas da família Amaryllidaceae, métodos de extração e tendências de aplicação dessas biomoléculas no tratamento ou prevenção de doenças. Uma atenção especial foi dada para o gênero *Crinum* L. ao longo do texto, uma vez que a espécie *C. americanum* L., pertencente a esse gênero, foi utilizada como fonte para a produção desse trabalho. A composição química e propriedades funcionais do *C. americanum* L. não foram tratadas diretamente, pois, até o momento da elaboração desse texto, não existiam trabalhos suficientes para descrever essa espécie vegetal.

2.1 VISÃO GERAL SOBRE O GÊNERO CRINUM L. (AMARYLLIDACEAE)

A família Amaryllidaceae J. St.-Hil. está dividida em três subfamílias: Agapanthoideae, Allioideae e Amaryllidaceae, abrangendo aproximadamente 85 gêneros e cerca de 1100 espécies com distribuição cosmopolita (JIN, 2013). Entretanto, a sua ocorrência predomina em climas subtropical e tropical, sendo os dois principais centros de distribuição a América do Sul e a África do Sul (CHASE; REVEAL; FAY, 2009).

As plantas dessa família apresentam gêneros com potencial ornamental devido a suas flores grandes, vistosas e coloridas. Entre eles destacam-se *Amarylliss* L., *Crinum* L.; *Narcissus* L., *Zephyranthes* L., *Hippeastrum* L., entre outros (FIGURA 1) (JIN, 2013).

FIGURA 1 - ALGUMAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA AMARYLLIDACEAE: A. *Amarylliss belladonna*; B. *Crinum x powellii*; C. *Crinum americanum* L.; D. *Narcissus x cyclamineus*; E. *Narcissus tazetta*; F. *Zephyranthes rósea*.



FONTE: Adaptado de Stumpf; Barbieri; Heiden (2009)

O gênero *Crinum* L., do grego "*krinon*" que significa lírio branco, é caracterizado pela produção de vistosas flores semelhantes a lírios. Ele possui aproximadamente 160 espécies, sendo que dessas, 21 foram registradas no sul da África. É uma planta pantropical, ou seja, com espécies que se encontram na África, América, Ásia e Austrália e vista preferencialmente nas zonas costeiras e pantanosas, sobretudo em razão do formato de suas sementes bem adaptadas às dispersões oceânicas (KWEMBEYA et al., 2007).

Essas plantas possuem bulbos subterrâneos tunicados, com folhas justapostas em camadas (FIGURA 2A), que permanecem dormentes durante a temporada de inverno. A floração é observada no verão ou em estações chuvosas. Possuem flores grandes e vistosas, suspensas em um scape (talo sem folhas) em formato umbela (FIGURA 2B) que se configura como uma inflorescência em forma de guarda-chuva (GHANE et al., 2018).

FIGURA 2 - PARTES DE *Crinum* L.: 2A. BULBOS E RAÍZES; 2B: FLORES SUSPENSAS EM UM SCAPE EM FORMATO DE UMBELA



FONTE: Adaptado de Amaral-Lopes & Cavalcanti (2015)

Esse gênero foi estabelecido por Linneaus em 1753 com quatro espécies (CHASE; REVEAL; FAY, 2009) e, mais tarde, redefinido por Hebert, que reconheceu 46 espécies e o dividiu em duas seções: Patentes e Semipatentes (TRAM et al., 2002). Em 1881, Baker dividiu o gênero em três subgêneros: *Stenaster*, *Platyaster* e *CodonoCrinum*. Após 17 anos, Baker combinou o gênero *Platyaster* com o *Stenaster*

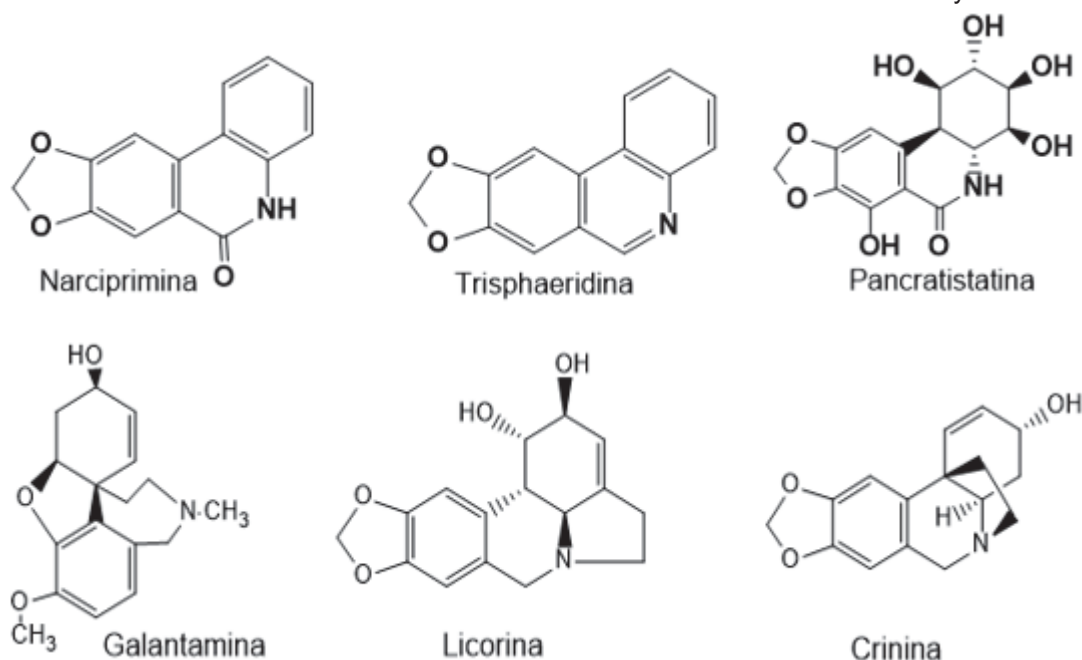
e passou a ser chamado de subgênero *Crinum*, uma vez que contém a espécie tipo *C. americanum* L. (MEEROW; LEHMILLER; CLAYTON, 2003; VERDOORN, 1973).

No Brasil, esse gênero é representado por 5 espécies, com status de nome aceito pela Word Flora Online (WFO, 2022): *C. ornatum* (Aiton) Herb., *C. americaum* L., *C. X powellii* Hort. Ex Baker, *C. jagus* (J.Thomps) Dandy., *C. erubescens* L.f. Ex Aiton. Essas espécies são amplamente distribuídas com registros em todas as regiões e em quase todos os estados do país, com exceção de Roraima e Goiás (SiBBR, 2022).

2.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL BIOLÓGICO

Além de seu potencial ornamental, plantas da família Amaryllidaceae têm sido utilizadas há anos na medicina tradicional dos povos indígenas em todo o mundo (NAIR et al., 2013). Esse efetivo uso pode estar relacionado à diversidade de alcaloides isoquinolínicos, estruturalmente diversos e biogeneticamente relacionados, presentes em sua composição química (SHAWKY et al., 2018). São reconhecidos vários tipos de alcaloides para as plantas dessa família, todos contendo um esqueleto básico de quinze átomos de carbono subdivididos em fenilmetil (C6–C1), ciclo-hexiletil ou ciclo-hexeniletil (C6-C2), sendo que a maioria desses compostos contém um anel de pirrolidina simples ou fundida. Dentre os alcaloides presentes nas Amaryllidaceae, os mais conhecidos são o licorina (SAINSBURY, 2009), o crinina (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009), galantamina e fenantridina (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009; NEWMAN; CRAGG, 2012). Algumas estruturas de alcaloides presentes nessas plantas estão dispostas na FIGURA 3.

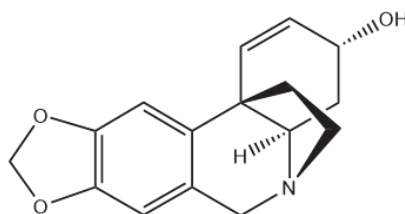
FIGURA 3 - ESTRUTURA DE ALGUNS ALCALOIDES DA FAMÍLIA Amaryllidaceae.



FONTE: Autor (2023)

O alcaloide crinina está presente em quase todos os gêneros da família Amaryllidaceae, sendo caracterizado pela ligação do anel em ponte com 5,10b-etanofenantridina (FIGURA 4). Além disso, substituintes relacionados ao oxigênio são geralmente encontrados em várias posições no anel C e no C-11 da ponte, enquanto uma ligação dupla C-1/C-2 é comum para muitos análogos de ambos os subgrupos. São encontrados na natureza 54 tipos de alcaloides crinina, que possuem uma porção de ponte 5,10β-etano orientada para β em suas estruturas (DING et al., 2017) e uma proximidade estrutural com agentes antimutagenogênicos e citotóxicos do alcaloide licorina (NAIR et al., 2012).

FIGURA 4 - ESTRUTURA DO ALCALOIDE CRININA



FONTE: Autor (2023)

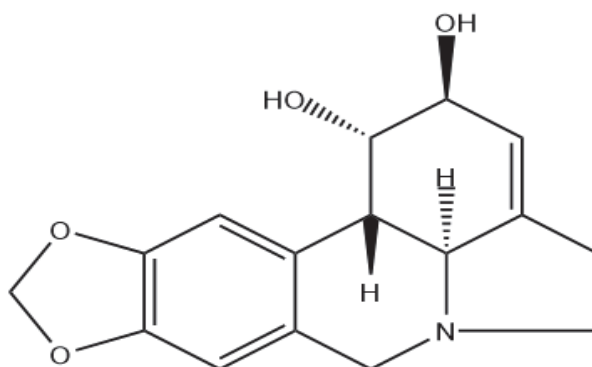
Outro grupo de alcaloides com grande importância é o licorina. Esse composto foi o primeiro a ser descrito na família Amaryllidaceae e é caracterizado como o

metabólito secundário com maior predominância na maioria dos gêneros dessa família.

Estruturalmente esses alcaloides são constituídos por um núcleo básico de fenantridina que formam anéis A, B e C com diferentes graus de oxigenação (DING et al., 2017). Além disso, apresentam-se na forma de um cristal incolor com ponto de fusão variando entre 260 °C a 262 °C, imiscíveis em água e insolúveis em éter e álcool. Por fim, compreendem análogos que possuem o acoplamento orto-para de uma ligação dupla no anel C (FIGURA 5) (ELGORASHI; STAFFORD; VAN STADEN, 2004).

A atividade biológica do licorina está fortemente associada à sua estrutura e pequenas modificações em certos grupos tornam esse composto menos ativo ou inativo. Os parâmetros estruturais que fornecem uma contribuição significativa à sua atividade incluem a presença de planaridade da molécula, anel de olefina ou dioxol, a função de grupos hidroxila e a presença de uma carga positiva no nitrogênio e no grupo amina (NAIR; VAN STADEN, 2014)

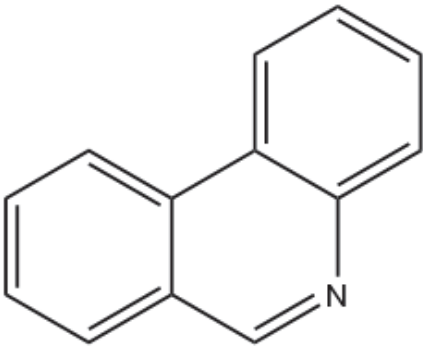
FIGURA 5 - ESTRUTURA DO ALCALOIDE LICORINA



FONTE: Autor (2023)

O alcaloide fenantridina apresenta um sistema completo de anéis aromáticos com um átomo de nitrogênio de metilação quaternária (FIGURA 6) (WANG et al., 2009) e com funções de unidades estruturais essenciais de compostos terapeuticamente ativos (BROWN; HILL; HOLLAND, 1961; FRANCESC VILADOMAT, JAUME BASTIDA, GEMMA TRIBO, 1990).

FIGURA 6 - ESTRUTURA DO ALCALOIDE FENANTRIDINA



FONTE: Autor (2023)

Os primeiros registros da atividade biológica para as plantas dessa família, principalmente para o gênero *Crinum* L., foi para a sua utilização como uma substância capaz de provocar vômitos (LE MAOUT; DECAISNE, 1876). Ao longo dos anos, vários estudos foram realizados para comprovar a atividade biológica dessas plantas. A TABELA 1 retrata o método de preparação e a atividade biológica de algumas espécies de *Crinum* L. Em alguns casos, essas plantas foram e são usadas em diferentes países para os mesmos fins medicinais.

TABELA 1 - MÉTODO DE PREPARAÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ESPÉCIES DE *Crinum* L

Espécie	Método de Preparação	Atividade Biológica	Referência
<i>C. ornatum</i> (Aiton) Herb	Os bulbos foram secos e triturados. As amostras em pó foram submetidas hidrodestilação - Clevenger- para extrair o óleo essencial.	Atividade antioxidante e propriedades antitumorais, imunoestimulantes, analgésicas, antivirais, antibacterianas e antifúngicas	(OLOYEDE; OLADOSU; SHODIA, 2010)
<i>C. X powellii</i> Hort. Ex Baker	Bulbos frescos foram utilizados para extração com uma mistura de etanol e água. Os extratos foram fracionados em butanol. Todas as frações foram submetidas ao teste de CCD. Os compostos bioativos foram extraídos dos bulbos frescos, utilizando metanol como solvente de extração.	Inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) Exibiu atividade inibitória moderada da topoisomerase I	(KISSLING et al., 2005) (NIÑO et al., 2007)

(Continuação)

<i>C. jagus</i> (J. Thomps.) Dandy	Os solventes Genapol X-80, DES (cloreto de colina: frutose 5:2) e água destilada purificada foram usados para extração dos compostos bioativos dos bulbos secos.	Citotoxicidade contra linhagens de células tumorais (HepG2 e HCT-116)	(SHAWKY et al., 2018)
	Extratos foram preparados com bulbos frescos. As extrações foram realizadas com água, etanol (70%), metanol (70%) e hexano	Propriedades antipiréticas e anti-inflamatórias	(MINKAH; DANQUAH, 2021)
	As folhas secas foram moídas em pó fino e submetidas a extração sequencial com methanol e metanol:água.(70%)	Potencial antioxidante e antidiabético	(GHANE et al., 2018)
	Em geral, bulbo seco (30g) foi macerado com metanol ou etanol a 85% para extração. O extrato metanólico do bulbo fresco foi dissolvido em H ₂ O ₂ basificado a pH 10 com NH ₄ OH e extraído sucessivamente com hexano, clorometileno e acetato de etila	Inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE)	(CALDERÓN et al., 2010)
		Atividade antibacteriana	(ADESANYA et al., 1992)
	A extração dos compostos bioativos das folhas, bulbo e raiz foi realizada com água, etanol, éter petróleo e acetato de etila	Atividade anticonvulsivante	(AZIKIWE et al., 2012)
	Folhas, bulbos e raízes secas foram maceradas com água ou etanol/água (1:4), por 48 h em temperatura ambiente	Atividade antidiabética e antioxidante	(MVONGO et al., 2014)
	Folhas, bulbos e raízes secas foram maceradas com etanol/água (1:4), por 48 h em temperatura ambiente	Tratamento de diarreia	(NOUBISSI et al., 2019)

	Bulbos <i>in natura</i> foram submetidas a maceração com metanol (80%) por 72 h.	Fonte potencial de agentes hepatoprotetores	(NWAHEHJOR; NWINYI; ODE, 2012)
	Folhas e bulbos secos foram submetidos a extração com metanol à temperatura ambiente por 5 dias.	Atividade de inibição da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE)	(ROJAS-VERA et al., 2021)
<i>C. erubescen</i> <i>L.f. Ex Aiton</i>	As folhas secas foram submetidas a extração com methanol	Atividade antiproliferativa contra linhagem de câncer de ovário humano A2780, melanoma humano (A375), cólon (SW620) e (HeLa).	(PRESLEY et al., 2016)

Na Nigéria, o *C. ornatum* é conhecido na medicina popular devido a sua atividade antioxidante e propriedades antitumorais, imunoestimulantes, analgésica, antiviral, antibacteriana e antifúngica. Além disso, os bulbos dessa planta são geralmente cultivados por povos Nigerianos com o propósito de demarcação de terras nas áreas rurais (OLOYEDE; OLADOSU; SHODIA, 2010).

Os bulbos de *C. x powellii* apresentaram atividade inseticida contra pragas de plantas (VELTEN et al., 1998), inibição acentuada da enzima acetilcolinesterase (AChE) (KISSLING et al., 2005), atividade inibitória contra a topoizomerase (NIÑO et al., 2007) e atividade anticâncer (SHAWKY et al., 2018).

O extrato de bulbos de *Crinum jagus* (J. Thoms.) Dandy são comumente utilizados para tratar doenças como asma, febre, feridas e várias infecções (GHANE et al., 2018; KA et al., 2020; LAWAL et al., 2020; MINKAH; DANQUAH, 2021; NOUBISSI et al., 2019; SEGUN; OGBOLE; AJAIYEBOBA, 2018). Além das atividades biológicas, essa espécie foi citada na literatura por apresentar atividade antiofídica, protegendo contra hemorragia, mionecrose e morte associada ao envenenamento por cobras comuns (ODE; ASUZU, 2006; UDEGBUNAM et al., 2015; YIRGU; CHIPPAUX, 2019).

A atividade biológica apresentada na TABELA 1, para algumas espécies do gênero *Crinum* L., pode estar relacionada aos alcaloides presentes na composição química das Amaryllidaceae, uma vez que, as plantas dessa família, contém vinte

dos mais importantes alcaloides encontrados em famílias botânicas (JIN, 2013). Entre esses alcaloides, o galantamina se destacou nos últimos anos como uma classe de compostos utilizadas em medicamentos para o tratamento da doença de Alzheimer, por inibir a acetilcolinesterase (AChE) (POTASIEWICZ et al., 2020). Esse composto chegou a movimentar cerca de 150 milhões de dólares na indústria farmacêutica no ano de 2013 (NAIR et al., 2013).

O alcaloide crinina já foi citado na literatura por apresentar propriedades citotóxicas e indutoras de apoptose potencialmente úteis para o tratamento de câncer como o glioblastoma (LUCHETTI et al., 2012), câncer de cólon HCT-116 (SHAWKY et al., 2018), neuroblastoma SH-SY5Y (ADEWUSI; FOUCHE; STEENKAMP, 2012) e leucemia MOLT-4 (HAJIZ et al., 1991).

Alcaloides do tipo crinina como a vittatine e bufanamina possuem efeitos farmacológicos interessantes. A vittatina é capaz de potencializar o efeito analgésico da morfina e exibe atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* Gram-positiva e *E. coli* Gram-negativa. A bufanamina demonstrou afinidade como transportador de serotonina e apresentou importantes efeitos antiproliferativos (LAMORAL-THEYS et al., 2010; NAIR; VAN STADEN, 2014).

O alcaloide licorina apresentou atividade antiviral como inibidor da síntese de proteínas em células de HeLa infectadas com poliovírus (VRIJSEN et al., 1986), ao vírus da herpes simplex (RENARD-NOZAKI et al., 1989), ao retrovírus HIV-1 (SZLÁVIK et al., 2004), ao coronavírus associado à síndrome respiratória aguda grave (LI et al., 2005), vírus do Nilo Ocidental (WNV), vírus da dengue e febre amarela (ZOU et al., 2009), enterovírus (LIU et al., 2011), vírus da influenza H1N1 (HE et al., 2013) e H5N1 (YANG et al., 2019), vírus da hepatite C (CHEN et al., 2015), ao vírus *Aedes aegypti* (MASI et al., 2016, 2017), enterovírus 71 (EV71) e coxsackievírus A16 (CVA16) (WANG et al., 2019). Além dos efeitos antivirais, o licorina apresenta efeitos antitumorais, antibacterianos, diuréticos e cardiovasculares (XIN et al., 2020). Mais recentemente, esse alcaloide inibiu a replicação do SARS-CoV-2 em células Huh-7.5 (NARAYANAN et al., 2022) e apresentou atividade antifúngica contra várias espécies de *Candida* (SILVA et al., 2022).

Extratos de *C. erubescens* foram particionados entre metanol e hexano, sendo a fase com metanol removida, seca e ressuspensa em água. O perfil fitoquímico dessa fase revelou que as estruturas dos alcaloides cripowellin A e cripowellin B são os

compostos antiplasmódicos mais ativos presentes nessa planta com valores de IC 50 de 0,016 e 0,014 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (PRESLEY et al., 2016). O alcaloide cripowellin foi originalmente isolado de *Crinum powellii* em 1998. A princípio, nesse alcaloide era conhecida apenas a atividade inseticida (VELTEN et al., 1998). Atualmente, sabe-se que além dessas propriedades, esse alcaloide também demonstrou uma potente citotoxicidade contra sete linhagens de células de câncer do pulmão (A549, ATCC, H446, H460, H292, 95-D, e SPCA-1), atividade antimicrobiana e capacidade antioxidante em ensaios de ABTS e DPPH (CHEN et al., 2018).

Apesar dos alcaloides receberem atenção especial, esses fitoquímicos não são os únicos responsáveis pela atividade biológica dessas plantas. Outros metabólitos secundários como os compostos fenólicos, taninos, saponinas e fitol são de grande importância para a indústria farmacêutica, devido às suas propriedades antimicrobianas e hepatoprotetoras, antioxidante e também por atuarem como agente neuroprotetor em doenças neurodegenerativas progressivas, como as doenças de Parkinson e Alzheimer (KUMAR; PANDEY, 2013).

Ghane et al. (2018) analisaram o perfil de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) de 12 espécies de *Crinum* L. Sete compostos fenólicos foram identificados, entre eles: ácido gálico (GA), ácido hidroxibenzóico (HBA), ácido vanílico (VA), ácido clorogênico (CLA), catequina (CA), ácido salicílico (SA) e ácido cumárico (COA). GA, CAT, SA e COA foram detectados na maioria das amostras testadas. CAT foi o fenólico dominante encontrado em todos os extratos. A dominância dos fenólicos identificados seguiu o padrão $\text{CAT} < \text{SA} < \text{GA} < \text{COA} < \text{HBA} < \text{CLA} < \text{VA}$. Os autores concluíram que todos os polifenóis identificados podem ser considerados importantes metabólitos bioativos, podendo ser responsáveis por uma gama de propriedades biológicas de espécies do *Crinum* L.

Cinco compostos fenólicos, GA, CA, VA, CLA e COA foram identificados e quantificados a partir dos extratos de raízes de espécies de *Crinum* L. no trabalho de Lekhak et al. (2021). Dentre esses, GA e COA foram os mais comuns, encontrados em quase todas as amostras. O composto fenólico mais dominante foi CA seguido por VA e COA.

Benedec et al. (2018) investigaram quatro espécies de Amaryllidaceae e constataram que os principais compostos fenólicos identificados foram os ácidos

clorogênico e p-cumárico. Além disso, os autores concluíram que a quantidade de fenólicos detectados varia significativamente e é influenciada pelas condições de extração.

Lawal et al. (2015) analisaram, por meio de ensaios qualitativos, a composição fitoquímica do extrato metanólico de bulbos de *C. ornatum*. Os autores observaram a presença de taninos, saponinas, flavonoides, glicosídeos, glicosídeos cardíacos, glicosídeos saponínicos, óleos voláteis e esteroides (LAWAL; HUAT TAN; ALI ALSHARIF, 2015).

Análises de CG-FID foram realizadas no óleo essencial de *C. ornatum*. Os resultados revelaram a presença de 18 compostos, sendo que os principais componentes detectados foram éster metílico do ácido 14-metilpentanedecanóico (20,89%), ácido n- hexanodecanóico (13,06%) e ácido 9,12-octadecadienóico (13,06%) (OLOYEDE; OLADOSU; SHODIA, 2010).

A composição fitoquímica do extrato metanólico dos bulbos de *C. jagus* foi avaliada qualitativamente. A análise revelou a presença de alcaloides, taninos, açúcares redutores, esteróis e terpenos. Além disso, o extrato demonstrou uma atividade antioxidante significativamente alta, com um efeito pronunciado quando comparado com a vitamina C (UDEGBUNAM et al., 2015)

Estudos anteriores sobre a identificação de componentes do óleo essencial de várias espécies de *Crinum* L. também revelaram a presença de diferentes classes de compostos. Por exemplo, Tram et al. (2003) demonstraram em seus estudos de GC-MS a presença de terpenos, aldeídos, álcoois, ácidos, entre outros, no óleo essencial da folha de *C. latifolium*. Além disso, perfis metabólicos distintos foram obtidos em diferentes estágios ontogenéticos; antes e depois da floração. Enquanto 2,6,10,14-tetrametilhexadecano (13,2%) era o principal componente do óleo na fase de floração, o fitol (31,8%) estava presente na maior porcentagem após a fase de floração.

2.3 *Crinum americanum* L.

O *Crinum americanum* L. (FIGURA 7) é uma planta não endêmica, encontrada no Brasil, e pouco estudada em todo o mundo (ARAÚJO et al., 2022). É conhecida por ser uma planta aquática (macrófita), de rápido crescimento e com forte potencial

alelopático, distribuída em regiões pantaneiras e rios da costa americana (MEEROW; LEHMILLER; CLAYTON, 2003; RIBEIRO et al., 2009, 2011).

FIGURA 7 - *Crinum americanum* L. NO LITORAL DO PARANÁ



FONTE: Autor (2023)

Apesar de pouco estudada, essa espécie possui alguns metabólitos secundários (TABELA 2) com potencial biológico para aplicação na indústria química e farmacêutica (DEL BENE et al., 2009; HARE et al., 2017). Esse fato foi observado no potencial citotóxico contra cepas de neuroblastoma humano e atividade promissora na inibição da acetilcolinesterase apresentado pelo extrato etanólico de folhas e bulbos dessa espécie (GOMES et al., 2022). Além disso, esses dados científicos corroboram com o conhecimento popular, uma vez que, comunidades ribeirinhas do Litoral do Paraná, Brasil, relataram que o chá de *C. americanum* L. é utilizado na medicina tradicional para o tratamento de câncer (SILVA et al., 2020).

Em outro trabalho, extratos de *C. americanum* L. demonstraram ter atividade antifúngica contra várias espécies de *Candida*. Esses resultados são interessantes, uma vez que as espécies de *Candida* são os principais agentes fúngicos causadores de quadros infecciosos em pacientes hospitalares. Assim, desenvolver novos medicamentos com potencial antifúngico, maior eficácia e menor toxicidade é essencial para enfrentar o desafio da resistência fúngica aos tratamentos convencionais (SILVA et al., 2022).

TABELA 2 - ALCALOIDES PRESENTES EM *C. americanum* L

<i>Parte da Planta</i>	<i>Solvente</i>	<i>Alcaloide</i>	<i>País</i>	<i>Referência</i>
<i>Bulbo</i>	<i>Etanol</i>	<i>Oxocrinina</i>	<i>Egito</i>	(ALI et al., 1986)
		<i>Crinina</i>		
		<i>Flexinina</i>		
		<i>O-acetilcrinina</i>		
		<i>Licorina</i>		
		<i>Hippadina</i>		
		<i>Pratorinina</i>		
		<i>Pratorimina</i>		
		<i>Pratosina</i>		
		<i>Ungeremina</i>		
		<i>Trisferidina</i>		
<i>C. americanaum L.</i>	<i>Bulbos e Folhas</i>	<i>Crinina</i>	<i>Brasil</i>	(GOMES et al., 2022)
		<i>1,2-didedrocrinan-3-ona</i>		
		<i>Flexininas</i>		
		<i>Licorina</i>		
		<i>1-O-acetil-licorina</i>		
		<i>Caranina</i>		
		<i>Acetil-caranina</i>		
		<i>11,12-didehidro-</i>		
		<i>Anidrollicorina</i>		
		<i>Hippadina</i>		
		<i>Crinamina</i>		
		<i>6-oxo-isocrinamina</i>		
		<i>Macronina</i>		
		<i>Epipowellina</i>		
		<i>Stigmasterol</i>		
		<i>Beta-sitosterol</i>		
		<i>Cicloartenol acetato</i>		
		<i>Cicloeucaleanol acetato</i>		

Além dos alcaloides, ácidos graxos saturados (ácido arabinônico, ácido tetradecanóico, ácido hexadecanóico, ácido heptadecanóico, ácido octodecanóico), insaturados (como o ácido octadec-9-enóico) e fitoesteroides (estigmasterol e β -sitosterol) foram encontrados nas frações lipídicas das folhas de *C. americanum* L. (BARRA et al., 2021).

2.4 ROTAS TECNOLÓGICAS PARA A OBTENÇÃO DE ALCALOIDES: MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO

2.4.1 Métodos de Extração

Os métodos comumente empregados para a obtenção dos alcaloides presentes em espécies de *Crinum*, são métodos convencionais de extração utilizando

diferentes solventes orgânicos (COS's). Tradicionalmente, o primeiro passo é obter um extrato polar de bulbos ou folhas, rico em compostos bioativos de diferentes classes químicas. Em seguida, os alcaloides são extraídos desse extrato polar, principalmente em metanol, acetato de etila, ou pela mistura desses solventes em diferentes proporções (CORTES et al., 2015).

A combinação de métodos com solventes de extração são etapas importantes para a obtenção desse extrato polar a fim de iniciar o processo de separação da fração rica em alcaloide. Assim, alguns estudos na literatura demonstram diversos métodos e solventes utilizados para a obtenção de um primeiro extrato, contendo, além dos alcaloides, outros compostos bioativos presentes nessas plantas. Nesse sentido, Minka & Danquah (2021) aplicaram a maceração a frio, um método clássico de extração, para obter extratos do bulbo de *Crinum jagus* (J. Thomps). Os autores avaliaram água, metanol, etanol e hexano como solventes e concluíram que o método de extração associado aos solventes utilizados foi eficaz na extração de compostos com atividades bioativas.

Em outro trabalho, os extratos de *Crinum stuhlmannii* Baker subsp. *delagoense* foram obtidos a partir de um sistema de agitação, composto por um agitador mecânico, com velocidade de rotação de 140 rpm e utilizando etanol como solvente de extração (MOODLEY et al., 2021a). A partir desse extrato, os autores isolaram os alcaloides N-metil-hemantamida (nivanina), N-metil-ent-delagoenina, licorina, 8,9-metilenodioxofenantridina, 6-hidroxicrinamina e 6-etoxicrinamina, concluindo que o solvente e método de extração foram eficientes para a obtenção de um extrato inicial rico em alcaloides.

O extrato da folha de *C. asiaticum* L. foi extraído sucessivamente com solventes de diferentes polaridades, sendo eles: éter de petróleo, clorofórmio, acetato de etila, metanol e água destilada. A extração foi realizada em um aparelho Soxhlet, com temperatura controlada e por um período de 72 horas (GOSWAMI et al., 2020). O objetivo do estudo foi avaliar o potencial antioxidante e antimicrobiano *in vitro* dos extratos. Os autores concluíram que o extrato aquoso e o de acetato de etila, exibiram atividade antioxidante e antibacteriana relativamente maior, quando comparados com os demais e que, portanto, esses seriam selecionados em trabalhos futuros para o isolamento dos compostos bioativos de interesse.

Embora os processos baseados em COS's permitam altos rendimentos de extração, parâmetros como tempo e temperatura de extração, proporção de solvente/amostra, matriz, tamanho da molécula de interesse, solubilidade e polaridade são fatores limitantes durante a escolha do solvente (GARAVAND et al., 2019).

Assim, para superar algumas dessas preocupações, o uso combinado de COS's e técnicas não convencionais de extração têm mostrado eficiência na obtenção de alcaloides. Lekhak et al. (2021), obtiveram extratos da raiz de 16 espécies de *Crinum* por meio da técnica de extração por UAE utilizando metanol e água como solventes de extração. Esses extratos foram avaliados de acordo com seu perfil antioxidante, fitoquímico e utilizado para separação de alcaloides (licorina e galantamina). Os autores concluíram que o método de extração proposto propiciou rapidez, simplicidade e alta eficiência para a obtenção dos compostos de interesse. O mesmo foi observado por GOMES et al. (2022) ao preparem um extrato polar, utilizando ultrassom e COS's, para a separação de alcaloides das folhas e bulbos de *C. americanum* L.

Apesar desses resultados promissores observados pelos autores, outros trabalhos relacionando o uso combinado dessas técnicas não convencionais com solventes alternativos, como Líquidos iônicos (IL) e solventes eutéticos profundos (DES), demonstraram uma alta capacidade para extrair biocompostos orgânicos, inorgânicos e poliméricos, quando comparados aos COS's (BENVENUTTI; ZIELINSKI; FERREIRA, 2019).

Nesse aspecto, uma abordagem complexa, utilizando 75 tipos de DES binários ou ternários, com diferentes polaridades, viscosidade, pH e capacidades de solubilização, foi realizada para a extração de alcaloides de fontes vegetais. Os resultados demonstraram que os DES's apresentaram eficiência superior aos COS's para extração dessas biomoléculas (JIANG et al., 2019).

Alcaloides de *C. powellii* e *C. bulbispermum* foram extraídos utilizando DES (Cloreto de Colina: Frutose 5:2), surfactantes não iônicos (Genapol X-080, Triton X-100 e Triton X-114), COS's (metanol e etanol) e água. Os resultados revelaram que o DES foi significativamente mais eficiente na extração de alcaloides (crinamina, crinina e licorina) quando comparado com os métodos que exigiam o consumo de solventes orgânicos e água. Além disso, os extratos a base de DES apresentaram efeito positivo

na citotoxicidade contra as linhas de células tumorais HCT-116 e HepG-2 (SHAWKY et al., 2018).

A associação dessas técnicas não convencionais com solventes alternativos também foi utilizada para a obtenção de alcaloides de outras espécies vegetais, como a *S. flavescens* (KANG et al., 2021). Nesse trabalho, os autores avaliaram as condições de extração dos alcaloides oximatrina e matrina utilizando UAE e DES's a base de Cloreto de Colina: Ácido Malônico (1:2) e Cloreto de Colina: Etilenoglicol (1:2) (m/m). Nas condições ideais, os rendimentos de extração de oximatrina e matrina foram calculados em 21,04 e 1,53 mg g⁻¹, respectivamente, sendo maiores quando comparados com as extrações realizadas com água, metanol e etanol.

Além disso, os DES também foram utilizados como novos aditivos da cromatografia de fluido supercrítico (SFC) para a determinação de alcaloides. Foi demonstrado que a adição de 0,25% de DES a base de Cloreto de Colina: Glicerol (2:1) à fase móvel, reduziu o efeito silanol e melhorou o comportamento cromatográfico dos alcaloides de isoquinolina, resultando em formatos de pico e resolução de analitos satisfatórios (JIANG et al., 2020).

2.4.2 Métodos de Separação

Após o método utilizado para a obtenção do extrato de uma matriz vegetal, uma série de operações são incluídas para separação e purificação dos compostos de interesse. Em geral, na primeira etapa, técnicas de extração sólido-líquido (ESL), tais como infusão, Soxhlet, fracionamento, maceração, agitação e extração assistida por ultrassom (UAE) são utilizadas por serem técnicas tradicionais da indústria química, farmacêutica e de alimentos. A partir dessa etapa, os compostos de interesse são separados usando técnicas apropriadas.

Normalmente, as frações ricas em alcaloides são separadas dos demais compostos presentes no extrato por extração ácido-base. Resumidamente, os extratos, contendo alcaloides e outras substâncias bioativas, são acidificados com ácido sulfúrico e desengordurados com éter de petróleo. Esse processo é seguido pela separação da camada aquosa e basificação com amônia líquida para pH 9,5-10. Por fim, a fração rica em alcaloide é então separada dos demais compostos com clorofórmio (LEKHAK et al., 2021). Para especificar o tipo de composto a ser extraído,

geralmente, nos processos de separação, o clorofórmio é substituído por outros COS's para o isolamento das diferentes frações de alcaloides obtidos no processo de extração ácido-base. Desta forma, as soluções básicas podem ser extraídas sucessivamente com n-hexano, acetato de etila, acetato de etila:metanol entre outros (GOMES et al., 2022).

Apesar da utilização de diferentes solventes na separação desses compostos, cada fração obtida é composta por diferentes alcaloides. Nesse sentido, considerando a diversidade de compostos fitoquímicos encontrados em fontes vegetais, a escolha de métodos mais adequados para o isolamento de um composto específico surge como a chave para se obter um produto puro e de qualidade para a aplicação industrial. Entre todas as etapas de processamento, as etapas de separação e purificação são pontos críticos para a obtenção dos alcaloides da matriz vegetal.

Dessa forma, métodos de separação tradicionais foram usados anteriormente para isolar alcaloides de extratos de plantas da família Amaryllidaceae. Entre esses métodos destacam-se: a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e preparativa (SHAWKY et al., 2018; TAKLA et al., 2018), cromatografia de camada delgada (TLC) (OLOYEDE; OLADOSU; SHODIA, 2010), gel de sílica alcalina (KISSLING et al., 2005), resina de troca iônica e a resina sephadex LH-20 (QING et al., 2016; ZOU et al., 2015).

O gel de sílica alcalino é o método mais comum para a separação de alcaloides. Contudo, esse método geralmente pode adsorver irreversivelmente a amostra, fazendo com que seu nível de recuperação seja baixo. Na separação com HPLC preparativa, a fase móvel geralmente necessita de uma alta concentração de sal e elevados valores de pH, causando, em grande parte, o rompimento das ligações do grupamento C₁₈ dos compostos da fase estacionária. Além disso, o pré-tratamento da amostra deve ser minucioso para que ocorra a separação dos compostos de interesse (QING et al., 2016; ZOU et al., 2015).

Na literatura foi relatado que nanoesferas de polímeros com impressão molecular (MIP's) obtiveram êxito quando aplicadas em cartucho de extração de fase sólida (SPE) para a extração específica de licorina de extratos de *Crinum asaticum* L. var. *sinicum*. (YANG et al., 2017). Em outro trabalho, uma extração de fase sólida (SPE), porosa e funcionalizada camada por camada de sulfeto de zinco, foi combinada com cromatografia líquida acoplada à espectrometria de Massas (LC-TOF/MS) e

cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) para a identificação de alcaloides de extratos de *Crinum asaticum* L. var. *sinicum*. Nesse trabalho, foi possível observar que o protocolo SPE desenvolvido foi efetivamente capaz de melhorar a seletividade e a eficiência de extração para os alcaloides, via interação eletrostática. Dos sete alcaloides identificados diretamente a partir de seus espectros de GC-MS, dois foram inéditos para essa espécie de planta, sendo eles: 4-etoxiafetamina e 2-metil-1 H -fenantro [3,4-d) imidazol-10-ol (ZHU et al., 2016).

Outra ferramenta útil a ser aplicada em processos de separação e purificação são os Sistemas Aquosos Bifásicos (ABS). ABS é um sistema de extração e purificação líquido-líquido caracterizado por sua biocompatibilidade. Albertsson difundiu esses sistemas em 1958 como uma técnica de separação de proteínas (ALBERTSSON, 1958). Ao longo dos anos, o ABS também foi avaliado em diversos campos, como extração e purificação de alcaloides (FARIAS et al., 2018; WOJEICCHOWSKI et al., 2020), compostos fenólicos e aminoácidos (WOJEICCHOWSKI et al., 2021), proteínas, corantes (SANGLARD et al., 2018) e outros.

Esses sistemas já foram usados para extrair e purificar simultaneamente alcaloides da família Amaryllidaceae, incluindo galantamina, N-desmetil galantamina e ungimiorina (BOGDANOV; SVINYAROV, 2018).

2.5 TENDÊNCIAS DE APLICAÇÃO

Como observado e descrito nos tópicos anteriores, plantas da família Amaryllidaceae, bem como o gênero *Crinum* L., são economicamente importantes e conhecidas por suas propriedades ornamentais e medicinais. Suas atividades biológicas podem estar relacionadas à diversidade de alcaloides isoquinolínicos presentes em sua composição, como crinina, galantamina, licorina, narciclasina, tazetina, querilina, montanina, norbeladina, hemantamina, pancratistatina, etc (GOMES et al., 2022).

A galantamina, um dos alcaloides mais conhecidos da Amaryllidaceae, bem como do gênero *Crinum* L., foi aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento da doença de Alzheimer leve a moderada (NAIR et al., 2013). Essa

conquista motivou a busca por novos inibidores da colinesterase, principalmente a partir de plantas desse gênero e de outras fontes botânicas. (BOZKURT et al., 2021).

Os alcaloides são exemplos de fitoquímicos amplamente distribuídos na natureza e possuem diferentes aplicações, dependendo da matriz vegetal em que são encontrados. Além dos alcaloides, espécies do gênero *Crinum* L. possuem compostos bioativos como compostos fenólicos, taninos, saponinas e fitol (TRAM et al., 2003). Esses compostos são importantes para serem utilizados em diversas áreas industriais, como farmacêutica, química, cosmética e alimentícia (ARAÚJO et al., 2022).

Assim, o fitol, presente nas folhas de algumas espécies de *Crinum* L. (TRAM et al., 2003) pode ser incorporado como antimicrobiano na indústria química ou alimentícia, pois esse composto já foi citado na literatura por apresentar atividade antibacteriana contra *E. coli* equivalente ao cloranfenicol (ZHENG et al., 2019). Além do fitol, os compostos fenólicos da espécie *Crinum* L. podem ser utilizados como conservantes e antioxidantes, substituindo os antioxidantes sintéticos na indústria da carne (PATEIRO et al., 2021). Saponinas e taninos, encontrados nos bulbos dessas plantas, podem ser aplicados como agente espumante, emulsificante e estabilizante para melhorar a qualidade de sorvetes e bebidas (ARYAN et al., 2021).

Várias plantas deste gênero ainda não foram exploradas cientificamente, e seus compostos não foram utilizados em nenhum campo industrial. Por isso, vale ressaltar que novos estudos devem incluir o perfil bioativo de todas as porções da espécie, sua possível toxicidade, as interações desses compostos e o mecanismo de ação em matrizes farmacêuticas e nutraceuticas.

2.6 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE

As informações descritas na revisão bibliográfica tiveram como objetivo detalhar e contextualizar a matriz que será utilizada para a elaboração desse trabalho, bem como as formas de extração, utilizando solventes de diferentes polaridades, combinados com métodos de extração convencionais e não convencionais, para a obtenção dos compostos de interesse.

As plantas da família Amaryllidaceae são utilizadas na medicina tradicional de povos indígenas devido às suas ações terapêuticas já reconhecidas. Apesar dessas

plantas possuem uma composição química que lhes confere propriedades biológicas com efeitos benéficos à saúde humana, são os alcaloides os compostos biológicos com maior apreço da comunidade científica. Esses compostos têm sido reconhecidos por seus potenciais bioativos antitumorais, antimicrobianos, anti-inflamatórios e de inibição da acetilcolinesterase (AChE).

Muitas espécies dessa família já foram amplamente estudadas na literatura. Contudo, como já mencionado, até o presente momento, pouco se sabe sobre as propriedades farmacológicas, segurança toxicológica e os mecanismos de ação subjacentes de extratos e frações de *C. americanum* L. Os três relatos sobre essa espécie na literatura (ALI et al., 1986; GOMES et al., 2022; SILVA et al., 2022) estão totalmente voltados para a sua composição alcaloídica, não levando em consideração outros compostos bioativos, como fenólicos, ácidos graxos, minerais entre outros que merecem atenção para serem utilizados em diversas áreas industriais, como fitoterápicos ou fitomedicamentos.

Outro fator a ser considerado é a forma como esses compostos têm sido obtidos. No tópico sobre processos de extração e separação de alcaloides, foi apresentado que muitos estudos sobre a composição química em espécies de Amaryllidaceae começam com a preparação de um extrato polar de bulbos ou folhas (geralmente extratos etanólicos ou metanólicos) e que, em seguida, a separação dos alcaloides é realizada a partir desse extrato polar, principalmente em clorofórmio, metanol, acetato de etila e misturas desses em diferentes proporções.

Apesar dessa técnica ser muito utilizada para o estudo da composição química dessas plantas, ela parece ser inviável para a utilização em escala industrial, por ser demorada e utilizar desnecessariamente grandes quantidades de solvente. As indústrias, cada vez mais, buscam por formas alternativas, rápidas, econômicas e viáveis para a obtenção de produtos. A busca constante por produtos que não causem relevante impacto ambiental e que propiciem segurança e compatibilidade para a aplicação na indústria e no bem-estar da humanidade, gera a necessidade de desenvolvimento de métodos, técnicas e tecnologias que se coadunem com essa perspectiva. Dessa forma, esse trabalho busca a otimização de processos para a obtenção simultânea de compostos bioativos para aplicação em alimentos, nutracêuticos ou medicamentos. Além disso, estudos sobre o *C. americanum* L. acarretariam na visibilidade e valorização dessa espécie, incentivando seu cultivo e

comercialização, o que levaria ao desenvolvimento econômico, cultural e científico de regiões do interior do País.

CAPÍTULO III – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA E PREPARO DA AMOSTRA

As amostras de *Crinum americanum* L. foram coletadas na região litorânea de manguezal, localizada na Baía do Guaratuba, município de Guaratuba, Paraná, Brasil (coordenadas geográficas S 25° 53' 00" e W 48° 34' 34"), durante o mês de março de 2021. A coleta foi realizada com auxílio de barcos e da população pesqueira do local. Após, as amostras foram levadas para o Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LABTECAL) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), para higienização com água corrente e separação das partes da planta em folhas, bulbos e raiz.

Cada parte da planta foi seca em estufa de circulação e renovação de ar (FABBE) a 40 °C por 24 h e triturada em moinho de facas (Requipal, MR 320). A padronização da granulometria da amostra triturada foi realizada com auxílio de peneiras metálicas (100 mesh – 0,110 mm) (Figura 8). O material seco e triturado foi embalado a vácuo e armazenado ao abrigo da luz e temperatura controlada (25 °C) até o momento do uso. Esta pesquisa foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) sob o número A58F1B2. As exsicatas da espécie foram herborizadas, identificadas e registradas no Herbário da UFPR – UPCB sob o número UPCB 101062.

FIGURA 8 - FOLHAS, BULBO E RAIZ DE *Crinum americanum* L. SECAS E TRITURADAS



FONTE: Autor (2023)

3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DIGESTÃO *IN VITRO*

Após o preparo realizado no tópico anterior, a composição centesimal, mineral e digestão *in vitro* das folhas, bulbo e raiz de *C. americanum* L. foi realizada com o objetivo de avaliar essa espécie vegetal como uma matéria-prima não convencional de potencial nutricional, químico e farmacêutico.

3.2.1 Composição Centesimal

As análises de composição centesimal foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos, alocado no Departamento de Nutrição da UFPR e executadas em triplicata a partir dos protocolos estabelecidos pela AOAC (2012). O teor de umidade foi obtido por dessecação em estufa a 105 °C até massa constante (AOAC 926.12); proteínas totais foram realizadas pelo método de Kjeldahl, com fator de conversão de nitrogênio para proteína equivalente a 5,7 (matrizes vegetais); resíduos minerais fixos foram obtidos por incineração em mufla a 550°C (AOAC 945.46); e fibras alimentares solúveis e insolúveis, através do método enzimático-gravimétrico (AOAC 991.43). A fração lipídica foi avaliada por extração a frio, baseada no método de Bligh e Dyer (1959). O teor de carboidratos totais foi calculado pela diferença de massa, enquanto a quantificação dos açúcares totais e açúcares redutores foi obtida pelos métodos colorimétricos de Dubois et al. (1956) e Somogyi-Nelson (1944), respectivamente. Os açúcares não redutores foram obtidos pela diferença entre açúcar total e açúcar redutor.

3.2.2 Composição Mineral

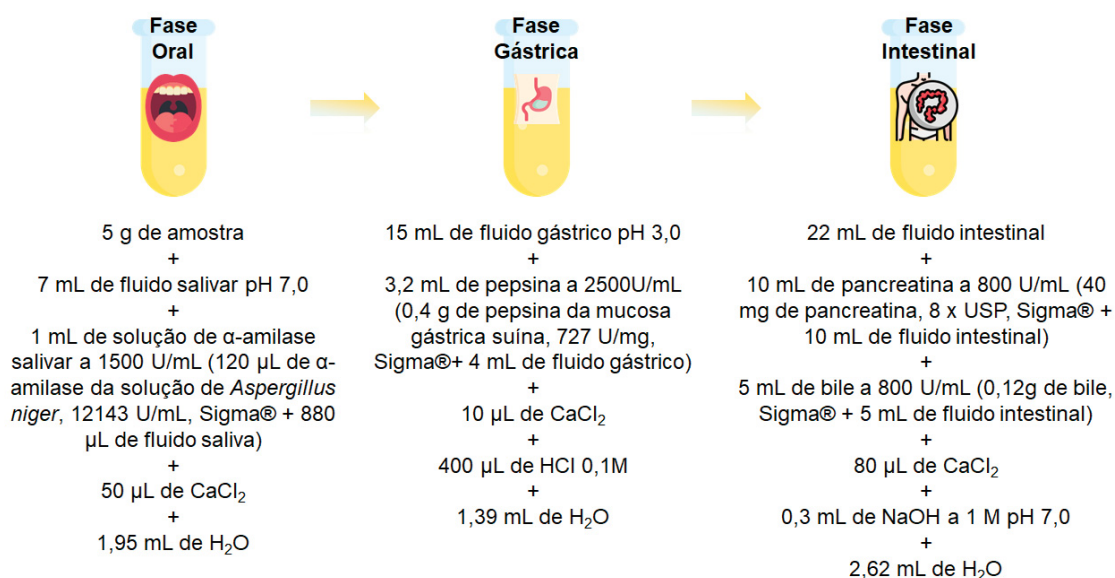
A determinação do conteúdo dos elementos minerais foi realizada no laboratório da PETROBRAS, situado no Departamento de Química da UFPR. A metodologia utilizada foi baseada nos trabalhos de Piekarski-Barchik et al. (2021), com algumas modificações. Resumidamente, 0,7 g de cada parte da planta foi pesada (em triplicata) e digerida com HNO₃, sob aquecimento a 70 °C. Posteriormente, a digestão foi interrompida com a adição de 35% (v/v) de H₂O₂. A solução obtida foi filtrada com um filtro de seringa de 0,45 µm e injetada em um espectrômetro de

emissão óptica de plasma (ICP – OES iCAP série 6000 - Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), indutivamente acoplado com o software Thermo iTeve Analyst versão 1.2.0.34.

As condições experimentais aplicadas foram: fluxo de gás de plasma – 12,0 L.min⁻¹; fluxo de gás auxiliar – 0,5 L.min⁻¹; fluxo de gás de arraste – 0,7 L.min⁻¹; potência de radiofrequência (RF) – 1,15 kW; e tempo de estabilização – 10 s. Os comprimentos de onda dos elementos analisados variaram de 182,034 nm a 766,490 nm. A calibração foi realizada com padrões de soluções aquosas e as curvas analíticas foram construídas a partir de uma solução padrão multielementar contendo Ag, Al, B, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, S e Zn, e para os demais elementos (Mo, P e Se) foram utilizadas soluções padrão de elemento único. A faixa de concentração foi de 1,0 µg.L⁻¹ a 2,0 µg.L⁻¹ em meio HNO₃ a 1% (v/v).

3.2.3 Digestão *in vitro*

A digestão das amostras secas foi composta por três fases (oral, gástrica e intestinal). Foi realizada em triplicata seguindo o protocolo do processo de digestão gastrointestinal simulada segundo Minekus et al. (2014). As três misturas digestivas (FIGURA 9) foram incubadas em banho-maria (37 °C) e agitadas a uma taxa constante (85 rpm) para via oral (2 min), gástrica (2 h) e intestinal (2 h). Ao final do processo de digestão simulada, as reações foram interrompidas colocando os tubos no banho de gelo. Os brancos do procedimento foram feitos usando água destilada e todas as enzimas digestivas nas mesmas condições do material vegetal. As amostras foram liofilizadas para análise da capacidade antioxidante.

FIGURA 9 - VISÃO GERAL DO MÉTODO DE DIGESTÃO *IN VITRO* SIMULADO

Fonte: Autor (2023)

3.3 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO

As extrações foram realizadas com diferentes solventes e métodos visando a obtenção de diferentes compostos bioativos em cada etapa desse trabalho. Na primeira extração, foi realizado o processo de otimização de um sistema de solventes (água ultrapura, etanol (EtOH) e acetato de etila (EtOAc)), para extração simultânea de alcaloides, compostos fenólicos e outras biomoléculas de interesse, presentes nas folhas, bulbo e raiz de *C. americanum* L. Esses solventes foram utilizados por apresentarem maior capacidade de extração de alcaloides pelo método TAK, após testes preliminares.

A composição química dos extratos otimizados foi analisada por ESI-FT-MS, DPPH, FRAP, TAK e TPC. Os melhores resultados para as análises realizadas foram apresentados pelas folhas, quando comparados com as demais partes da planta. Dessa forma, apenas as folhas de *C. americanum* L. foram utilizadas nas próximas extrações desse trabalho.

Após a obtenção dos extratos otimizados, o trabalho foi direcionado para a extração da fração lipídica das folhas de *C. americanum* L. Essas frações foram obtidas com o objetivo de descrever e identificar moléculas complexas, como ácidos graxos esterificados, com interesse farmacológico e industrial. Além disso, diferentemente das extrações realizadas anteriormente, foi utilizado apenas o hexano

como solvente e dois métodos de extração (Soxhlet e Ultrassom) para a obtenção dessas moléculas.

Por fim, foi realizada uma terceira extração utilizando metanol hidratado 80% (m/m), visando a obtenção de compostos fenólicos e alto rendimento do extrato final (FIDELIS et al., 2020). Como a atividade biológica das plantas do gênero *Crinum* L. é atribuída, principalmente, aos alcaloides isoquinolíquinos presentes em sua composição, a obtenção de um extrato hidrometanólico pode favorecer a extração de compostos fenólicos e a atividade biológica dessas plantas estaria associada a outra classe de metabólicos secundários.

3.3.1 Design Experimental

O planejamento experimental de mistura simplex centroide aumentado, com três pontos internos, foi utilizado para avaliar os efeitos isolados, misturas binárias e ternárias dos solventes, totalizando dez ensaios (TABELA 3). Três solventes diferentes foram testados: água ultrapura, etanol (EtOH) e acetato de etila (EtOAc).

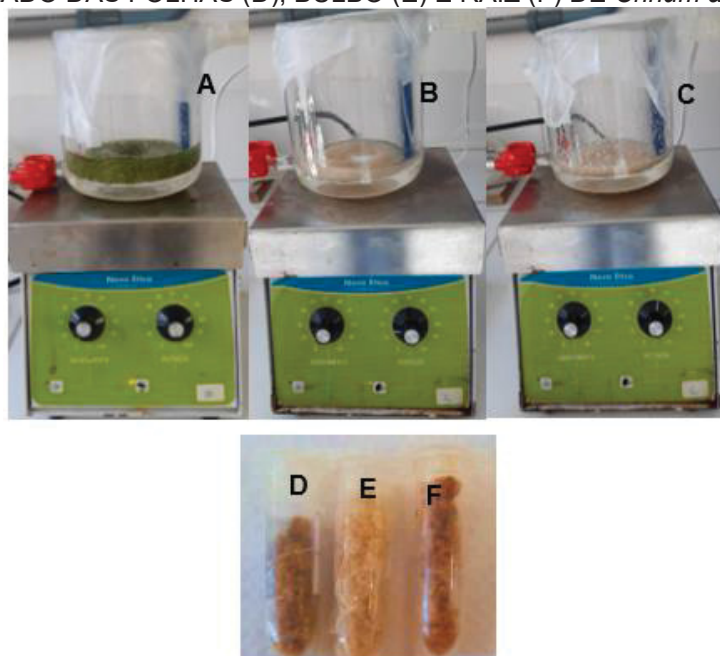
TABELA 3 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL SIMPLEX CENTROIDE PARA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE *C. americanum* L.

Ensaio	Etanol (A)	Água (B)	Acetato de Etila (C)
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	0,5	0,5	0
5	0,5	0	0,5
6	0	0,5	0,5
7	0,333	0,333	0,334
8	0,666	0,167	0,167
9	0,167	0,66	0,167
10	0,167	0,167	0,666

As extrações foram realizadas na razão 1:20 (amostra:solvente, m/v). Para isso, a mistura de solventes foi preparada na proporção determinada para cada ensaio expresso na TABELA 3. Após, foram pesados, separadamente, 10 g do pó seco obtido das folhas, bulbo ou raiz de *C. americanum* L. e adicionados em células de equilíbrio

contendo 200 mL da mistura dos solventes determinada para cada ensaio. As células contendo a amostra e solução extratora foram acopladas em banho de circulação constante de água, e mantidas a $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 45 min, sob agitação magnética e com controle de temperatura. Após esse período, o extrato bruto foi filtrado utilizando papel filtro, rotaevaporado, liofilizado (Figura 10) e mantido em freezer convencional ($-18 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) até sua utilização. No momento do uso, os extratos secos foram ressuspensos em água ultrapura em concentração determinada para cada análise. O mesmo procedimento foi realizado para a aquisição do extrato nas condições otimizadas do sistema de solventes.

FIGURA 10 - PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO POR AGITAÇÃO MAGNÉTICA (A, B e C) E EXTRATO LIOFILIZADO DAS FOLHAS (D), BULBO (E) E RAIZ (F) DE *Crinum americanum* L.



FONTE: Autor (2023)

Nas combinações em que houve a separação de fases (ensaio 6, 7 e 8) (FIGURA 11), apenas a fase de fundo, que apresentou os maiores valores de alcaloides totais e propriedades funcionais, foi considerada para o estudo.

FIGURA 11 - FORMAÇÃO DE MISTURA BINÁRIA (ÁGUA E ACETATO DE ETILA) NO EXTRATO DAS FOLHAS de *C. americanum* L.



FONTE: Autor (2023)

3.3.2 Otimização

Para avaliar os efeitos dos solventes água ultrapura, etanol (EtOH) e acetato de etila (EtOAc) na extração de compostos bioativos, foi utilizada a metodologia de superfície de resposta (MSR), seguindo as recomendações e procedimentos descritos por Granato e Araújo Calado (2013). O modelo cúbico completo, conforme descrito pela EQUAÇÃO 1, foi ajustado de acordo com os dados experimentais. Os modelos matemáticos propostos incluíram apenas os coeficientes de regressão com significância ($p \leq 0,05$). A qualidade dos modelos foi determinada pelo coeficiente de determinação (R^2), R^2 ajustado e os resíduos foram analisados pelo teste de Shapiro-Wilk.

$$y = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 \quad (1)$$

Sendo que: y representa a função resposta prevista dos dados experimentais, b_1 , b_2 e b_3 são os coeficientes de regressão para os efeitos lineares, b_{12} , b_{13} e b_{23} representam os coeficientes de interação binária (coeficientes quadráticos) e b_{123} é o coeficiente de regressão ternário. No mesmo sentido, x_1 , x_2 e x_3 representam os três solventes de extração em estudo. Utilizando a MSR foi possível obter modelos de regressão para descrever a capacidade antioxidante, TPC, TKC das folhas, bulbo e raiz de *C. americanum* L. em função do (s) solvente (s) utilizados. O intervalo de $\pm 95\%$ confiança foi calculado para cada coeficiente de regressão.

Com o objetivo de maximizar a extração dos compostos bioativos presentes em todas as partes da planta, foi utilizada a otimização simultânea proposta por (FIDELIS et al., 2020). Para esse propósito, um total de 100 iterações foram executadas usando a função de desejabilidade para obter a melhor combinação de solventes. O sistema otimizado de solvente para as folhas, bulbo e raiz de *C. americanum* L. foi utilizado para extração de compostos bioativos e os extratos foram liofilizados e congelados a -80 °C até o momento das análises. Foi realizada a validação do modelo para verificar sua predição.

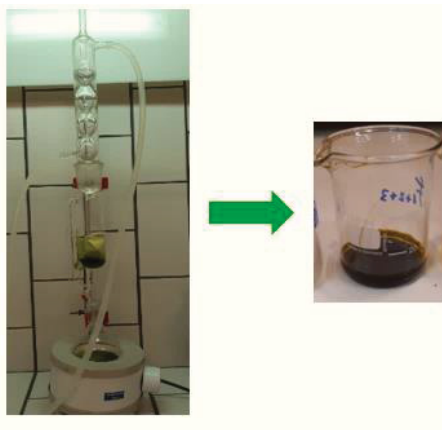
3.3.3 Obtenção da Fração Lipídica

3.3.3.1 Extração em Soxhlet (SX)

Para cada extração, 10 g das amostras foram envolvidas em um cartucho de papel filtro e inseridos no sistema de extração Soxhlet. O balão foi preenchido com 50 mL de n -hexano (PA) e o refluxo final foi obtido após 9 h de extração (FIGURA 12). Após, o solvente foi evaporado em sistema automatizado a 35 °C, e 5 psi e os lipídeos concentrados foram submetidos à transesterificação. Os rendimentos das extrações foram expressos por média ± desvio padrão, de acordo com a EQUAÇÃO 2.

$$\text{Fração lipídica (\%)} = \frac{\text{massa lipídica} \times 100}{\text{massa de folhas secas}} \quad (2)$$

FIGURA 12 – EXTRATOR SOXHLET E FRAÇÃO LIPÍDICA OBTIDA APÓS EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE



FONTE: Autor (2023)

3.3.3.2 Extração Lipídica Ultrassônica (UAE)

A extração lipídica ultrassônica foi realizada conforme descrito no trabalho de Barra et al. (2021), para obtenção de frações lipídicas de algumas espécies da Amaryllidaceae. Para isso, 10 g de amostra foram pesadas e submetida à extração com 50 mL de n -hexano (PA). A extração foi feita em equipamento ultrassônico FISHER SCIENTIFIC- FS30D e frequência de 40 kHz, mantido a 30 °C por 30 min. O procedimento de extração foi repetido por 3 vezes na mesma amostra. Após a extração dos lipídeos, o solvente foi evaporado em sistema automatizado a 35 °C, e 5 psi e os lipídeos concentrados foram submetidos à transesterificação. Os rendimentos das extrações foram expressos de acordo com a EQUAÇÃO 2.

3.3.4 Extração Hidrometanólica

O processo de extração foi baseado no trabalho de Ghane et al. (2018), com algumas modificações. Resumidamente, as extrações foram realizadas em células contendo a amostra e solução extratora (metanol:água 80:20% m/m) na proporção de 1:20 (m/m). As células foram acopladas em banho de circulação constante de água e mantidas a 40 °C $\pm$ 1 °C durante 45 min, sob agitação magnética e com controle de temperatura. Após esse período, o extrato bruto foi filtrado utilizando papel filtro, rotaevaporado, liofilizado e mantido em freezer convencional (-18 $\pm$ 2 °C) até sua utilização. No momento do uso, os extratos secos foram ressuspensos em água ultrapura/DMSO em concentração determinada para cada análise.

3.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

3.4.1 Composição dos Extratos Otimizados por ESI–FT-MS

Os extratos otimizados das folhas (EOF), bulbo (EOB) e raiz (EOR) de *C. americanum* L. foram analisados por ionização por eletrospray e espectrometria de massas com transformada de Fourier nos modos de íons positivo e negativo (ESI-FT-MS). As análises foram realizadas diluindo os extratos em metanol (grau HPLC) para produzir uma solução final de 20 ppm. Os dados do ESI-FT-MS foram coletados em

espectrômetro de massas HCD (dissociação colisional de alta energia) Exactive Plus (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) equipado com uma fonte de ionização Ion Max API com HESI (Heated Electrospray Ionization) operado em modo de infusão direta usando uma bomba de seringa modelo Fusion 101 (Chemyx, Stafford, TX) com uma seringa de 500 μL (Thermo Scientific, NJ, EUA) a uma taxa de fluxo de 15 $\mu\text{L min}^{-1}$.

As condições de análise empregadas no modo ESI(+) e ESI(-) foram, respectivamente: voltagem do spray 3,0 e 3,5 kV, aquecimento da região de vaporização 50 °C, temperatura do capilar 300 °C, sheath gas 15 e 10 ua (unidade arbitrária), gás auxiliar 0 ua e sweep gas 5 e 2 ua.

Os espectros de massas (MS) foram adquiridos na faixa de m/z 100 a 1.200 Da com o acúmulo de 100 μs scans e resolução de 140.000 FWHM (m/z 200). Os espectros de massas finais foram obtidos a partir da subtração do espectro de massas do branco do solvente em relação ao espectro de massas da amostra.

Após a aquisição dos dados, o processamento dos espectros e atribuição da fórmula molecular dos íons foi realizada utilizando o software Xcalibur (versão 3.1, Thermo Fisher Scientific). A correspondência de fórmula molecular foi considerada quando o erro de massa entre m/z experimental e m/z teórico foi menor que 3 ppm. Os critérios para atribuição de fórmula molecular são apresentados na TABELA 4. A lista de íons gerada com m/z detectados e suas respectivas intensidades, erro em ppm, RDBE (do inglês: ring double-bond equivalent) e fórmulas moleculares atribuídas foi exportada para o Excel para posterior processamento, nos quais foram considerados apenas os íons com intensidade relativa superior a 0,1%. As fórmulas estruturais atribuídas foram comparadas com informações de trabalhos anteriores envolvendo espécies da família Amaryllidaceae e do banco de dados Nist e Chemspider.

TABELA 4 - CRITÉRIOS PARA ATRIBUIÇÃO DE FÓRMULAS MOLECULARES AOS ÍONS DETECTADOS.

<i>Critérios</i>	<i>ESI (±)</i>
<i>C</i>	4 – 30
<i>H</i>	5 – 60
<i>O</i>	0 – 12
<i>N</i>	0 – 6
<i>Na</i>	(+): 0 – 1; (-): 0
<i>RDBE</i>	-0.5 – 15,0

3.4.2 Composição de Ácidos Graxos dos extratos obtidos por Soxhlet e UAE

As frações lipídicas obtidas por SX e UAE foram caracterizadas quanto ao perfil de ácidos graxos a partir da cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-FID). A análise foi conduzida no Laboratório Multiusuário do Departamento de Química da UFPR.

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram obtidos seguindo o método proposto por Ichihara e Fukubayashi (2010), com algumas modificações. Resumidamente, 100 mg da amostra foram pesados em um tubo de ensaio. Posteriormente, foram adicionados 1,5 mL de solução de NaOH em metanol (0,5 mol L⁻¹). Os tubos foram aquecidos em banho-maria a 90 °C durante 10 min. Após o resfriamento, foram adicionados 4,5 mL de uma solução esterificante (2,0 g de cloreto de amônio em 60 mL de metanol e adição de 3 mL de ácido sulfúrico concentrado). Os tubos foram novamente aquecidos em banho-maria a 90 °C por 10 min. Após resfriamento à temperatura ambiente, adicionou-se 2,5 mL de hexano padrão HPLC e 2,0 mL de água destilada, seguido por agitação vigorosa. O sobrenadante foi recolhido e filtrado em filtro de seringa de 45 µm.

Finalmente, 1 µL da fase orgânica filtrada foi injetada no cromatógrafo de gás GC – 2010 plus (Shimadzu) acoplado ao Gas Chromatograph Mass Spectrometer GCMS-TQ8040 (Shimadzu), usando um injetor automático e um sistema de detecção de ionização de chama (FID). A injeção foi realizada em modo split (1:10; 1:20; 1:50) e a separação realizada em coluna de SH-Rtx-5MS (Shimadzu) (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Durante a operação, o injetor foi mantido a 250 °C. O forno foi regulado para

50 °C durante 1 min, em seguida aquecido a 25 °C.min⁻¹ até 175 °C e depois a 4 °C.min⁻¹ até 230 °C. A temperatura final foi mantida por 20 min.

Os compostos foram identificados pelo tempo de retenção dos ácidos graxos presentes na mistura e analisados nas mesmas condições. Os dados foram tratados pelos softwares GCMS Postrun Analysis e GCMS Real Time Analysis solution, ambos da GCMS solution versão 4.20 (Shimadzu Corporation). O gráfico foi plotado a partir do software Origin versão 8.5 (OriginLab Corporation, Massachussets, EUA). Os resultados foram expressos em porcentagem.

3.4.3 Identificação e Quantificação de Compostos Fenólicos do Extrato Hidrometanólico

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos dos extratos hidrometanólicos foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodo (HPLC-DAD) (Thermo Scientific, Alemanha, modelo Dionex UltiMate 3000). As amostras foram filtradas em filtro de seringa de nylon de 0,22 µm (Millipore) e injetadas (20 µL) a 30 °C. A análise cromatográfica foi realizada usando uma coluna ACE 5 C18 (250 × 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm, porosidade de partícula de 100 Å, porosidade de volume de 1,0 mL g⁻¹ e área de superfície de 300 m² g⁻¹). A fase móvel foi formada por acetonitrila pura (%A) e solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (%B) (v/v). A taxa de fluxo foi realizada a 1,2 mL min⁻¹, a temperatura da coluna foi mantida a 35 °C e a seguinte condição de eluição foi empregada: 0 min= 100% B, 15 min= 75% B, 25 min= 30% B, 40 min= 100% B.

A construção das curvas de calibração baseou-se na área do pico vs concentração das soluções padrão, e as concentrações foram expressas em µg mL⁻¹.

3.5 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

3.5.1 Conteúdo Fenólico Total (TPC)

O conteúdo fenólico total (TPC) foi determinado por análise colorimétrica com reagente de Folin-Ciocalteu (FC), segundo Singleton, Orthofer & Lamuela-Raventos

(1999), com algumas modificações. Em tubos de ensaio, foram misturados 1,68 mL de água destilada, 20 µL de amostra e 100 µL de FC. Após 3 min, uma alíquota de 100 µL de carbonato de sódio a 20% foi adicionada a cada tubo, seguido de agitação em vórtice (Gomixer, MX-S). Em seguida, os tubos foram mantidos no escuro por 60 minutos à temperatura ambiente. A absorbância foi medida usando um espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu, UV-1800, Tóquio, Japão) a 760 nm. Os dados foram comparados com uma curva padrão de ácido gálico e os resultados expressos em mg de equivalente de ácido gálico (GAE) por 100 g de amostra.

3.5.2 Flavonoides Totais (TFC)

O teor de flavonoides totais (TFC) foi avaliado de acordo com a metodologia proposta por Prommuak; De-Eknamkul; Shotipruk, (2008). Resumidamente, 50 µL de extrato, 750 µL de etanol, 50 µL de solução de cloreto de alumínio (10% p/v), 50 µL de acetato de potássio (1 mol L⁻¹) e 1,4 mL de água foram adicionados em tubos de ensaio. Em seguida, os tubos foram agitados e mantidos no escuro por 30 minutos. A absorbância foi medida usando um espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu, UV-1800, Tóquio, Japão) a 415 nm. A curva de calibração foi obtida utilizando a quercetina como solução padrão e os resultados expressos em mg de quercetina por 100 g de amostra.

3.5.3 Teor de Alcaloides Totais (TAK)

O teor de alcaloides totais (TAK) foi determinado por análise colorimétrica de acordo com (SHAMSA et al., 2008) e modificações. A princípio, o extrato de *C. americanum* L. (500 µL) foi tratado separadamente com 500 µL de HCl 2N. Esta solução foi transferida para tubos Falcon de 50 mL. Foram adicionados 2,5 mL de solução verde de bromocresol (1x10⁻⁴ m/v) e 2,5 mL de tampão fosfato (pH 4,7). Em seguida, foram adicionados, sucessivamente, por agitação vigorosa 1, 2, 3 e 4 mL de clorofórmio em cada tubo. A cada adição, a fase de clorofórmio foi recolhida e transferida para um tubo de ensaio limpo. Ao final, o volume de todos os tubos foi ajustado para 10 mL. A absorbância para as soluções teste e padrão foi determinada contra o reagente em branco a 470 nm com um espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu,

UV-1800, Tóquio, Japão). O teor total de alcaloides foi expresso em mg de equivalente de atropina (ATP) por 100 g de amostra.

3.6 CAPACIDADE ANTIOXDANTE *IN VITRO*

3.6.1 Método de Redução do Ferro (FRAP)

O teste de FRAP foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Benzie & Strain (1996). O reagente FRAP foi preparado a partir de solução tampão de acetato de sódio (300 mmol.L⁻¹, pH 3,6), solução de TPTZ 10 mmol.L⁻¹ (40 mmol.L⁻¹ de ácido clorídrico como solvente) e solução de cloreto de ferro (III) 20 mmol.L⁻¹ numa proporção em volume de 10:1:1 (v/v), respectivamente. Após, foi transferido uma alíquota de 45 µL de extrato para tubos de ensaio acrescidos de 135 µL de água destilada e 1,35 mL do reagente FRAP. A solução foi homogeneizada em vórtice (Gomixer, MX-S) e mantida no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 530 nm e os dados comparados a uma curva padrão de sulfato férrico (Fe (III)) e os resultados expressos em mg de equivalente de sulfato férrico (Fe (III)) por 100 g de amostra.

3.6.2 Capacidade de Remoção de Radical Orgânico ácido 2,2-azino-bis 3-etilbenzothiazolina-6-sulfônico (ABTS)

O método descrito por Re et al. (1999) foi utilizado para determinar a capacidade de remoção do radical ABTS. Os cátions radicais ABTS foram produzidos reagindo a solução ABTS (7 mmol L⁻¹) com uma solução de persulfato de potássio (140 mmol L⁻¹) e deixando a mistura em repouso no escuro em temperatura ambiente por 16 h antes do uso. A solução de trabalho foi preparada diluindo a solução estoque de ABTS com etanol absoluto até atingir absorbância de $0,700 \pm 0,020$ a 734 nm. Para a análise das amostras, 100 µL de alíquotas de soluções metanólicas preparadas conforme descrito anteriormente, foram adicionados a frascos âmbar e misturados com 3,9 mL da solução de trabalho ABTS.

Em seguida, os tubos foram agitados em vórtice (Gomixer, MX-S) e mantidos no escuro por 30 minutos em temperatura ambiente. A absorbância foi medida usando

um espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu, UV-1800, Tóquio, Japão) a 734 nm. Os dados foram comparados com uma curva padrão de Trolox (TE) e os resultados expressos em μmol de equivalente de Trolox (TE) por 100 g de fração lipídica.

3.6.3 Captura do radical livre DPPH (2,2-Difenil-1-picril-hidrazil)

A capacidade de eliminação de radicais livres do DPPH foi analisada de acordo com Brand-Williams et al. (1995). Resumidamente, foram adicionados em tubos de ensaio 1,95 mL de solução DPPH, previamente preparada (3,95 mg de DPPH diluídos em 50 mL de etanol e 50 mL de tampão fosfato de sódio monobásico (50mmol L⁻¹, pH 6,0)), e 50 μL de extrato. Em seguida, os tubos foram agitados em vórtice (Gomixer, MX-S) e mantidos no escuro por 60 minutos à temperatura ambiente. A absorbância foi medida usando um espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu, UV-1800, Tóquio, Japão) a 517 nm. Os dados foram comparados com uma curva padrão de Trolox (TE) e os resultados expressos em mg de equivalente de Trolox (TE) por 100 g de amostra.

3.7 ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA *IN VITRO*

A atividade antidiabética foi avaliada para as frações lipídicas e extrato hidrometanólico das folhas de *C. americanum* L.

3.7.1 Atividade de Inibição da α -glicosidase

A inibição da enzima α -glicosidase para as amostras foi medida de acordo com o método proposto por Souza et al. (2018). Alíquotas de 2 a 10 μL dos extratos, previamente diluídos em DMSO (60 mg mL⁻¹), foram adicionados em microplaca de 96 poços e o volume de cada poço foi completado para 50 μL com tampão fosfato de potássio 0,1 mol L⁻¹ a pH 6,9. 100 μL da solução da enzima α -glicosidase (1 U mL⁻¹) (EC 3.2.1.20, Sigma Chemical Co., Saint Louis, EUA) foi adicionado a cada poço contendo as amostras em tampão fosfato. A placa foi incubada a 25 °C por 10 min e, em seguida, 50 μL da solução de substrato p-nitrofenil- α -glucopiranosídeo (p-NPG, Sigma Chemical Co., Saint Louis, EUA) foram adicionados. A absorbância das

amostras foi avaliada no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Bioquímica da UFPR. A 1ª leitura (0 min) foi realizada a 405 nm, e a placa foi novamente incubada a 25 °C por 5 min. Em seguida, foi realizada a 2ª leitura (5 min) a 405 nm. A reação e a leitura foram realizadas em leitor de microplacas (TECAN – Infinite M 200). As leituras foram comparadas com o controle contendo 50 µL de tampão fosfato no lugar dos extratos. A porcentagem de inibição enzimática para cada concentração da amostra foi calculada de acordo com a EQUAÇÃO 3, e os resultados foram expressos como a concentração da amostra (µg frações lipídicas mL⁻¹ reação) necessária para inibir 50% da atividade enzimática (IC 50).

$$\% \text{ inibição} = \frac{(Abs_{ctl \ 5 \ min} - Abs_{ctl \ 0 \ min}) - (Abs_{amostra \ 5 \ min} - Abs_{amostra \ 0 \ min})}{(Abs_{ctl \ 5 \ min} - Abs_{ctl \ 0 \ min})} \quad (3)$$

3.7.2 Atividade de Inibição de α-amilase

A inibição da α-amilase foi realizada conforme o trabalho de Ghane et al. (2018), com algumas modificações. Resumidamente, os extratos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) para obtenção das concentrações de 60; 10,5; 2,5 e 1 mg mL⁻¹ (m/v). Para o teste de inibição (TI), 25 µL do extrato diluído em cada concentração foram adicionados, separadamente, em tubos de ensaio contendo 10 µL de solução de α-amilase (74 unidades L⁻¹) e 240 µL de tampão fosfato 20 mmol.L⁻¹ e cloreto de sódio 6, 7 mmol.L⁻¹. Os tubos contendo a solução foram incubados em banho-maria a 37 °C por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 250 µL de solução de amido solúvel (1%, p/v) e os tubos foram novamente incubados conforme descrito acima. Posteriormente, a reação foi interrompida com a adição de 500 µL de solução de ácido dinitrosalicílico (1%, m/v). Os tubos foram incubados em banho-maria a 100 °C por 5 minutos e posteriormente resfriados com adição de 5 mL de água destilada. A absorbância foi medida usando um espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu, UV-1800, Tóquio, Japão) a 550 nm. Concomitantemente, foram preparados o branco de inibição (BI - sem adição de enzima), controle enzimático (CE - sem adição de extrato) e branco enzimático (BE - sem adição de enzima e extrato). A porcentagem de inibição da enzima α-amilase foi calculada de acordo com a EQUAÇÃO 4.

$$\% \text{ inibição} = 100 - \frac{(TI - BI)}{(CE - BE)} * 100 \quad (4)$$

3.8 ENSAIO ANTIGLICANTE

3.8.1 Via oxidativa

A atividade antiglicante foi determinada de acordo com Ramos et al. (2019). Inicialmente, os extratos foram diluídos em DMSO (1 mg mL⁻¹) e as soluções de glioxal (30 mmol.L⁻¹) e BSA (albumina sérica bovina) (10 mg mL⁻¹) foram preparadas em tampão fosfato (0,2 M, pH 7,4) contendo azida sódica 3 mmol.L⁻¹ como agente antimicrobiano. As reações foram realizadas com 300 µL da mistura de reação total [BSA (135 µL), glioxal (135 µL) e DMSO ou amostra (30 µL)], incubadas a 37 °C por 48 h. Após a incubação, a absorbância das amostras foi avaliada no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Bioquímica da UFPR. Foi utilizado um leitor de microplacas (TECAN – Infinite M 200) com intensidade de fluorescência (excitação em 330 nm e emissão em 420 nm). Quercetina (100 µg mL⁻¹) foi usada como padrão e DMSO como controle negativo. Os resultados foram expressos como percentagem de inibição.

3.8.2 Via não oxidativa

A atividade antiglicante por via não oxidativa foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item anterior. Contudo, frutose (0,1 mmol L⁻¹) foi utilizada no lugar de glioxal e o tempo de incubação foi de 72 h.

3.9 CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade foi avaliada para as três formas de extração. Para os extratos otimizados, a citotoxicidade *ex vivo* foi avaliada frente as células mononucleares do sangue periférico humano (MN). Para dos demais extratos, a citotoxicidade *in vitro* foi avaliada frente as linhagens celulares de HEK293 (fibroblasto) e H460 (Câncer de pulmão).

3.9.1 Separação de células mononucleares do sangue periférico humano (MN)

A separação das células mononucleares do sangue periférico humano (MN) foi realizada de acordo com Cruz et al. (2020). Para o estudo, foram coletados 10 mL de sangue de doadores voluntários que assinaram um termo de consentimento aprovado pelo comitê de ética local da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) (Protocolo nº CAAE: 1.415.375).

A seguir foi realizada a separação das populações celulares por gradiente de densidade com Ficoll-Paque (Pharmacia Upsala-Suécia), através da centrifugação durante 40 minutos a 1500 rpm em temperatura ambiente (25 °C). O anel enriquecido de células mononucleares (MN), formado durante a centrifugação, foi retirado com auxílio de pipeta de Pasteur e lavado duas vezes com 3 mL de PBS. As células foram contadas em câmara de Neubauer e as concentrações celulares ajustadas para 2×10^6 células mL^{-1} de meio de cultura.

3.9.2 Linhagens Celulares e Culturas

Células HEK293 de tipo selvagem (WT) e células H460 WT de câncer de pulmão não pequeno humano foram gentilmente cedidas pelo Dr. Attilio Di Pietro (IBCP, Lyon, França). Todas as células foram mantidas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com alto teor de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 1% de penicilina/estreptomicina a 37 °C e 5% de CO_2 sob umidade controlada. As análises envolvendo essas linhagens celulares foram realizadas no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF - UFPR).

3.9.3 Ensaio MTT

A viabilidade celular foi avaliada com um ensaio colorimétrico de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) proposto por Mosmann, (1983), com algumas modificações. O ensaio foi adaptado para cada linhagem celular. Para as células MN a viabilidade celular foi avaliada da seguinte forma: 100 μL de células MN e extratos otimizados (OEF; OEB e OER), nas concentrações de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 100 ng mL^{-1} , foram pipetados em placas de 96 poços e incubados (5% de CO_2) por

24 h a 37 °C. Posteriormente, 20 µL de MTT (5 mg mL⁻¹ (m/v)) foram adicionados em cada poço e a placa foi incubada novamente (5% de CO₂ – 37 °C) por mais 3 h. Após a incubação, adicionou-se em cada poço 50 µL de solução de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 20% e a placa foi mantida sob agitação por 15 min. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Thermo Plate TP-Reader) a 492 nm. O resultado foi expresso em % de viabilidade celular.

Por outro lado, as Células HEK293 WT e H460 WT foram semeadas em placas de cultura de 96 poços em densidade de 3 × 10⁴ e 1,6 × 10⁴ células/poço para 24 h e 72 h de tratamento, respectivamente. Após incubação durante a noite, as células foram tratadas com concentrações crescentes das frações lipídicas ou extrato hidrometanólico (3,125 a 1600 µg mL⁻¹, diluição em série de 2 vezes) por 24 e 72 h a 37 °C sob 5% de CO₂. Após o tratamento, 20 µL de uma solução de 0,5 mg mL⁻¹ de MTT foram adicionados, as células foram então incubadas por 4 h a 37 °C sob 5% de CO₂. Os cristais de formazan foram dissolvidos com uma solução de 100 µL de DMSO/etanol (1:1) e a absorbância foi medida a 595 nm usando um leitor de absorbância de microplaca iMark™ (Bio-Rad). Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis versus células de controle (0,3% DMSO (v/v) considerado como 100%).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos por médias seguidas de ± desvio padrão. A comparação das médias entre os grupos foi realizada pela análise de variâncias unifatorial (ANOVA) e as diferenças entre os tratamentos foram identificadas pelo teste de Tukey (p<0,05). A homocedasticidade do conjunto de dados foi verificada pelo teste de Levene e a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. O software Statistica®, versão 10.0 (StatSoft, Tulsa, EUA) foi utilizado na análise.

CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

SEÇÃO I - Essa seção faz parte do artigo intitulado “Multielement/proximate composition, chemical and cytotoxic profile to assess the *Crinum americanum* L. as an unconventional raw material of nutritional, chemical, and pharmaceutical potential”, publicado na **South African Journal of Botany**. Fator de impacto: 3,111. Qualis CAPES A3.

4.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Não existem dados na literatura a respeito da composição centesimal do *Crinum americanum* L. para que sejam feitas comparações diretas. Dessa forma, os dados apresentados a seguir são inéditos e vêm para consagrar essa espécie não convencional como uma alternativa nutricionalmente viável para ser utilizada para o consumo.

A TABELA 5 mostra a composição nutricional (umidade, cinzas, proteínas, lipídeos, fibra alimentar, açúcar total, açúcares redutores e não redutores e teor de carboidratos), em base seca, das folhas, bulbos e raiz de *C. americanum* L.

TABELA 5 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL (%; g/100 g) DE FOLHAS, BULBO E RAIZ DE *C. americanum* L.

Composição Centesimal (%; g/100g)			
	Folhas	Bulbo	Raiz
Umidade	7,19 ^b ± 0.10	6,87 ^c ± 0.36	8,97 ^a ± 0.30
Cinza	12,12 ^a ± 0.02	5,64 ^b ± 0.01	11,5 ^a ± 0.02
Proteínas	13,26 ^a ± 0.01	5,49 ^b ± 0.01	5,66 ^b ± 0.01
Lipídeos	2.12 ^a ± 0.07	0.80 ^c ± 0.001	1.05 ^b ± 0.01
Açúcar Total	4,65 ^b ± 0,02	7,05 ^a ± 0.02	3,98 ^c ± 0.01
Açúcar Redutor	0,83 ± 0.001	0,86 ± 0.001	0,85 ± 0.01
Açúcar Não Redutor	3,82 ± 0.001	6,19 ± 0.03	3,13 ± 0.02
Fibra Alimentar Total	37,30 ^b ± 0.13	34,88 ^c ± 0.04	42,12 ^a ± 0.21
Fibra Solúvel	1,71 ± 0.001	6,35 ± 0.03	2,32 ± 0.01
Fibra Insolúvel	35,39 ± 0,03	28,53 ± 0.09	39,8 ± 0.12
Carboidrato	23,36 ^c ± 0.001	39,27 ^a ± 0.15	26,72 ^b ± 0.14

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente e médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

Comparando a composição centesimal das três partes de *C. americanum* L., as folhas apresentaram maior teor de cinza, proteínas e lipídeos. Por outro lado, os

bulbos apresentaram maior teor de açúcares totais e carboidratos. As raízes apresentaram a maior concentração de umidade, cinzas e fibra alimentar total. Essa variabilidade na composição das partes de uma mesma planta pode estar associada a múltiplos fatores, como a forma em que cada parte é exposta ao sol, temperatura, chuva e a interação de outras plantas ou animais no ecossistema.

Os resultados obtidos mostraram maior teor de umidade para a raiz (8,97%), quando comparados ao bulbo (6,87%) e as folhas (7,19%). Esses valores foram semelhantes aos encontrados por (SILVA et al., 2021), ao compararem o teor de umidade em base seca em folhas (7,52%) e raízes (4,63%) de *Amaranthus viridis*, uma planta alimentícia não convencional (PANC). A comparação de *C. americanum* L. com as PANC's é realizada no presente trabalho para demonstrar possíveis semelhanças nutricionais entre essas plantas. As PANC's podem ser utilizadas não só como temperos, na culinária popular, como também em chás, emplastros, banhos, entre outros métodos (MILIÃO et al., 2022). Essa comparação se torna válida, devido ao uso do chá de *C. americanum* L. por comunidades litorâneas no interior do Paraná, Brasil, para o tratamento de câncer (SILVA et al., 2020).

O teor de proteína foi maior nas folhas (13,26%) do que nos bulbos (5,49%) e raízes (5,66%). A Instrução Normativa nº 75 da ANVISA (2020) determina como alimento fonte de proteínas o que possui em sua composição pelo menos 10 % do valor diário recomendável desses constituintes em sua porção. Como o documento preconiza que esse valor corresponde a 50 gramas para proteínas, e considerando que a porção das folhas, bulbo ou raiz seja equivalente a atribuída para a porção de leguminosas secas (60 g), pode-se alegar que essa espécie vegetal seja uma possível fonte desse macronutriente.

Ao agrupar as partes da planta por teor de lipídeos, os resultados mostraram que as folhas apresentaram a maior concentração (2,12%), seguidas de raízes (0,80%) e bulbos (1,05%). A concentração lipídica encontrada no presente trabalho foi inferior à determinada por (BARRA et al., 2021), para as folhas de *C. americanum* L. (8,70% m/m); *C. erubescens* (6,72% m/m) e *C. jagus* (4,88% m/m). Esse rendimento superior, observado pelos autores, pode ser explicado pela forma de preparo da amostra e pelo método de obtenção (extração lipídica ultrassônica) da fração lipídica.

As macromoléculas que se destacam na composição de *C. americanum* L. são os carboidratos, com ênfase para a subclasse de fibras alimentares (DF) que

representam aproximadamente 37,30; 34,88 e 42,12% para folhas, bulbos e raízes, respectivamente. Esses valores são superiores ao determinado para fontes de DF como o trigo (12%) e o milho (8%) e para fontes de DF alternativas e sem glúten, como as sementes de quinoa e de amaranto (10 e 12%, respectivamente) (LAMOTHE et al., 2015). Outro expressivo resultado está relacionado ao teor de fibras alimentares solúveis (SDF) que correspondem cerca de 5% do total de DF para as folhas e raízes e 18% para os bulbos.

Os dados mencionados nos últimos parágrafos para o DF e SDF de *C. americanum* L. são promissores, uma vez que o consumo de fibra tem demonstrado um papel positivo na prevenção de doenças inflamatórias intestinais, aumentando a diversidade da microbiota intestinal e modulando seus efeitos no sistema imunológico da mucosa (LIU et al., 2022) e, portanto, apontam que todas as partes de *C. americanum* L. podem ser candidatas para o desenvolvimento de novos ingredientes funcionais ou para a produção de alimentos nutricionalmente enriquecidos.

4.2 COMPOSIÇÃO MINERAL

Dos 18 minerais investigados nas folhas, bulbos e raízes de *C. americanum* L., 16 elementos foram detectados e estão apresentados na TABELA 6. Destes, 6 correspondem a macroelementos (Ca, K, Mg, Na, S e P), 7 a microelementos (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se e Zn) e 3 a elementos potencialmente tóxicos (Al, Cr e Pb). Os resultados são expressos em base seca e as amostras apresentaram concentrações minerais (mg g^{-1}) variando de 0,53 para Se (microelemento) e 81,8 para K (macroelemento).

TABELA 6 - DETERMINAÇÕES DA COMPOSIÇÃO MINERAL (mg g^{-1}) DE FOLHAS, BULBO E RAIZ DE *C. americanum* L.

	<i>Elementos (mg g^{-1})</i>		
	Folha	Bulbo	Raiz
Ca	18,8 ^a ± 0,02	11,5 ^b ± 0,04	10,3 ^b ± 0,06
K	3,06 ^c ± 0,01	81,8 ^a ± 0,76	18,3 ^b ± 0,12
Mg	33,7 ^a ± 0,13	15,4 ^b ± 0,12	28,7 ^a ± 0,38
Na	4,58 ^b ± 0,03	24,5 ^a ± 0,22	11,6 ^b ± 0,56
P	2,39 ^b ± 0,02	9,44 ^a ± 0,08	0,13 ^c ± 0,01

(Continuação)			
S	$0,40^c \pm 0,01$	$33,3^b \pm 0,29$	$76,5^a \pm 0,79$
Co	-	-	$0,35 \pm 0,01$
Cu	-	$0,36 \pm 0,02$	-
Fe	$2,02^c \pm 0,03$	$3,32^b \pm 0,02$	$51,9^a \pm 0,23$
Mn	$0,59^c \pm 0,03$	$10,9^b \pm 0,04$	$15,4^a \pm 0,09$
Mo	$0,50^b \pm 0,03$	$0,54^b \pm 0,04$	$1,01^a \pm 0,04$
Se	$0,59^a \pm 0,03$	$0,53^a \pm 0,03$	-
Zn	$0,33^b \pm 0,01$	$0,79^a \pm 0,02$	$0,31^b \pm 0,01$
Al	$0,90^b \pm 0,01$	$6,1^a \pm 0,03$	$5,74^a \pm 0,07$
Cr ($\mu\text{g/g}$)	$1,63^b \pm 0,05$	$1,74^b \pm 0,07$	$4,80^a \pm 0,03$
Pb	$7,54^b \pm 0,02$	$10,5^a \pm 0,16$	$10,1^a \pm 0,19$

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente e medias seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os macromelementos são importantes para várias funções fisiológicas em plantas e animais. No presente estudo, todas as partes da matriz vegetal apresentaram proporções relevantes desses elementos. As folhas apresentaram maiores concentrações de Ca ($18,8 \text{ mg g}^{-1}$) e Mg ($33,7 \text{ mg g}^{-1}$), quando comparadas as demais partes da planta. Os bulbos apresentaram os maiores teores de K ($81,8 \text{ mg g}^{-1}$), Na ($24,5 \text{ mg g}^{-1}$) e P ($9,44 \text{ mg g}^{-1}$). Nas raízes, Mg ($28,7 \text{ mg g}^{-1}$) e S ($76,5 \text{ mg g}^{-1}$) foram os macromelementos com maior proporção. Além disso, o bulbo e a raiz apresentaram teores equivalentes de Ca ($11,5$ e $10,3 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente) e as folhas e raízes apresentaram teores equivalentes de Mg ($33,7$ e $28,7 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente) e Na ($4,58$ e $11,6 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente).

É possível observar teores nutricionais relevantes ao comparar a composição mineral das partes de *C. americanum* L. com algumas PANC's. O trabalho de Moura et al. (2021), por exemplo, relata a composição, em base seca, dos macromelementos Ca (0,36%), K (3,47%), Mg (0,37%), P (0,31%) e S (0,26 %) da folha de batata-doce. Todos os teores determinados pelos autores foram inferiores aos obtidos para as folhas de *C. americanum* L. Outra comparação pode ser feita com as folhas e raízes de *Amaranthus viridis*. Essa PANC também apresentou menores concentrações de Ca ($25,85$ e $8,55 \text{ mg.g}^{-1}$, respectivamente) (SILVA et al., 2021) quando comparadas às folhas e raízes de *C. americanum* L.

Foram avaliados micronutrientes (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se e Zn) e elementos potencialmente tóxicos (Al, Cr e Pb). Em relação aos micronutrientes, folhas e bulbos apresentaram concentrações semelhantes de Se (0,59 e 0,53 mg g⁻¹, respectivamente) e Mo (0,50 e 0,54 mg g⁻¹, respectivamente). No entanto, as folhas não apresentaram concentrações significativas de Co e Cu. O bulbo apresentou maior teor de Zn (0,79 mg g⁻¹), quando comparado às demais partes da planta. A raiz apresentou o maior teor de Fe (51,9 mg g⁻¹), Mn (15,4 mg g⁻¹), Mo (1,01 mg g⁻¹) e Zn (0,31 mg g⁻¹) semelhante ao apresentado pelas folhas (0,33 mg g⁻¹). O conteúdo mineral nas partes da planta depende das características, disponibilidade e capacidade de absorção do solo. Assim, as raízes e os bulbos, que são as partes da planta que mais estão em contato com o solo, apresentaram maior teor de oligoelementos (Fe, Mn, Mo e Zn).

De acordo com Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o consumo diário de Fe para adultos é de 14 mg. Nesse sentido, 0,3 g da raiz seca de *C. americanum* L. seriam suficientes para suprir a necessidade diária desse microelemento. Diante desse contexto e levando em consideração que alimentos fortificados com ferro é um dos métodos mais eficazes para a prevenção da sua deficiência no organismo e que a entrega desse mineral através da dieta é uma abordagem prática, econômica e sustentável (MAN et al., 2022), pode-se considerar que o *C. americanum* L. seja uma fonte inexplorada de Fe e, dependendo de sua biodisponibilidade, essas plantas podem ser utilizadas como um ingrediente rico nesse mineral.

Em relação aos elementos potencialmente tóxicos, todas as partes da planta apresentaram Al, Cr e Pb em sua composição. As folhas apresentaram menor teor de Al (0,90 mg g⁻¹), quando comparadas ao bulbo (6,1 mg g⁻¹) e a raiz (5,74 mg g⁻¹). Bulbos e raízes apresentaram concentrações equivalentes de Pb (10,5 e 10,1 mg g⁻¹, respectivamente), porém as raízes apresentaram maior teor de Cr (4,80 µg g⁻¹). Apesar de *C. americanum* possuir esses elementos potencialmente tóxicos em sua composição e, considerando seu consumo de forma direta, os teores determinados no presente trabalho foram inferiores aos encontrados para UEP *Amaranthus viridis*, que apresentou concentrações mais elevadas de Cr (12,56 µg g⁻¹) e a presença de Ni, Li e Ba em sua composição (SILVA et al., 2021). Além disso, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda que, para adultos com peso de 70 kg, o

consumo diário desses elementos potencialmente tóxicos, em mg, seja: Al (7); Cr (0,035) e Pb (42) (Brasil., 2005). Assim, está dentro dos limites recomendados pela ANVISA o uso diário de até 5,6 g de folhas, 1,0 g de bulbos e 1,20 g de raízes de *C. americanum* L., seja na forma de chá, emplastos ou banhos. A divulgação dessas informações é importante, pois as pessoas consomem o chá dessa planta diretamente na medicina popular e poderiam evitar seu uso excessivo.

4.3 DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DAS FOLHAS, BULBO E RAIZ

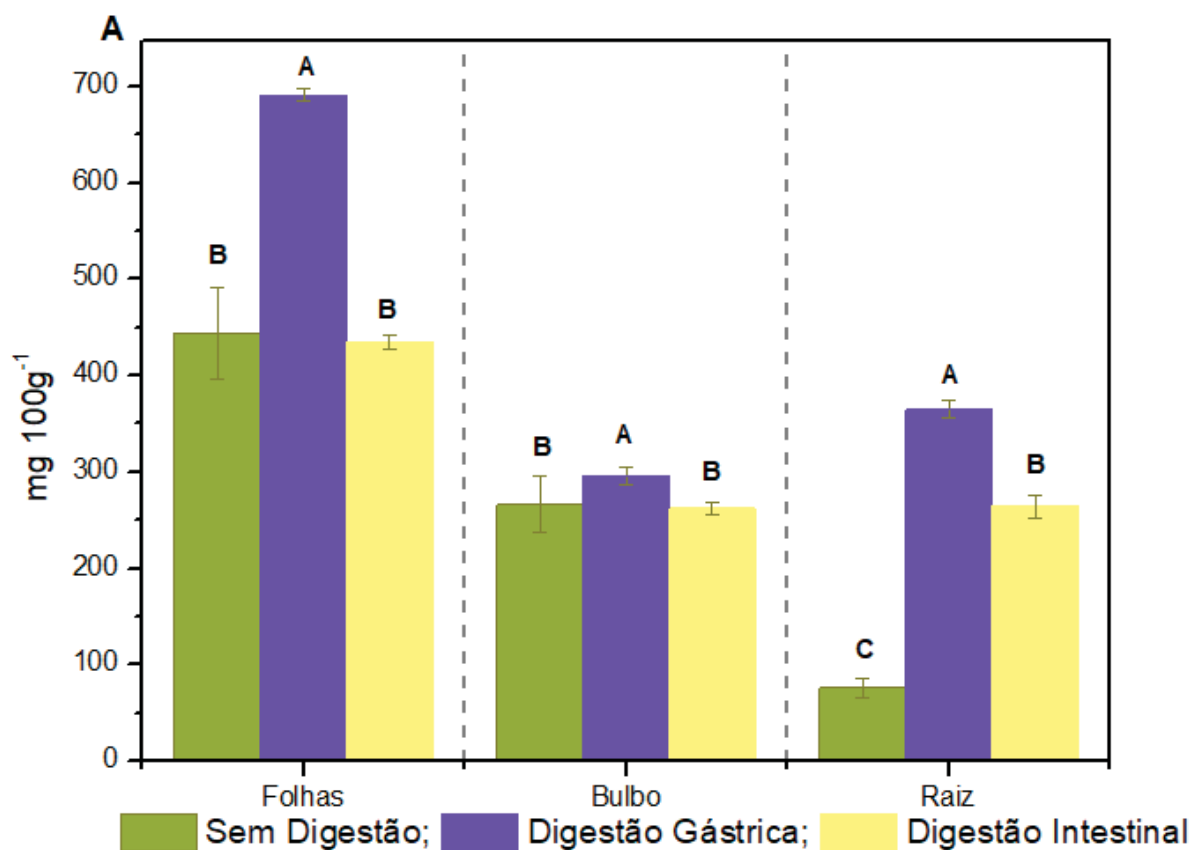
A biodisponibilidade de compostos bioativos após o processo de digestão é comumente avaliada por meio da caracterização de sua bioacessibilidade, absorção e metabolismo. Modelos de digestão *in vitro* são amplamente utilizados para estudar as mudanças estruturais, digestibilidade e liberação de biocompostos em condições gastrointestinais simuladas (SHANG et al., 2022).

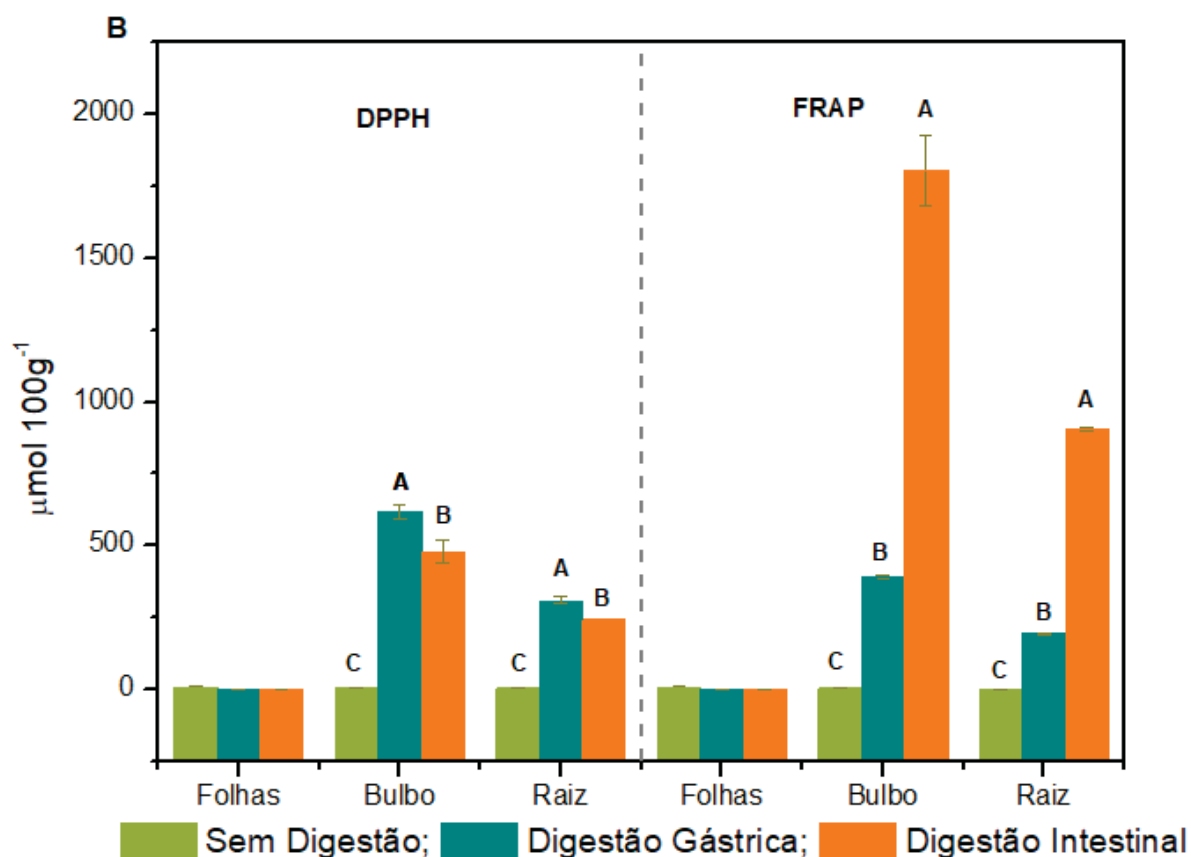
A evolução da capacidade antioxidante (DPPH e ABTS) e TPC durante as etapas de digestão gástrica e intestinal *in vitro* das folhas, bulbo e raízes secas de *C. americanum* L. foram investigadas para simular seus efeitos ao transitarem pelo trato gastrointestinal humano (FIGURA 13). A verificação dessa análise é importante, devido ao uso direto dessa planta em forma de chá na medicina popular (SILVA et al., 2020). Dessa forma, o extrato obtido com água, para as folhas, bulbo e raiz de *C. americanum* L. foi utilizado como forma de comparação com as amostras secas digeridas.

Foi possível observar que o TPC (FIGURA 13 A) dos extratos aquosos (sem digestão), foi menor do que o TPC das amostras secas digeridas, principalmente na fase de digestão gástrica ($p < 0,05$). Esses resultados sugerem que os procedimentos envolvidos na fase de simulação gástrica parecem ter um forte efeito na liberação de compostos fenólicos das matrizes. Esse fato pode ser atribuído principalmente ao pH ácido e à atividade enzimática, que pode induzir a hidrólise de alguns compostos fenólicos ligados a outros constituintes, como ferro e outros minerais ou proteínas (ADERINOLA et al., 2020). Esses dados corroboram com os observados por Djaoudene et al. (2021) para o TPC do extrato de tâmaras e de suas sementes após a fase de digestão gástrica.

Por outro lado, na etapa de digestão intestinal, houve uma diminuição do TPC ($p < 0,05$) em todas as amostras, quando comparada com a digestão gástrica. Esse fato pode ser atribuído a alteração do pH de meio ácido (digestão gástrica) para meio alcalino (digestão intestinal), uma vez que essa alteração resultará em reações químicas de oxidação e polimerização e, conseqüentemente, na formação de chalconas. Além disso, a interação com outros compostos da matriz vegetal, como carboidratos, proteínas, fibras e minerais, pode afetar negativamente os compostos bioativos no processo de simulação de digestão intestinal (LUCAS-GONZÁLEZ et al., 2018).

FIGURA 13 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH E FRAP) E COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (TPC), DAS FOLHAS, BULBO E RAÍZ DE *C. americanum* L. ANTES E APÓS A DIGESTÃO *In vitro*





Nota: FIGURA 13 A: Compostos fenólicos totais (TPC) expresso em mg de ácido gálico 100g⁻¹ de amostra; FIGURA 13 B: Capacidade antioxidante por DPPH (expresso em μmol de Trolox 100g⁻¹ de amostra) e FRAP (expresso em μmol de FE (III) 100g⁻¹ de amostra). Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n= 3) e são representativos de três experimentos independentes com resultados semelhantes. Letras diferentes, em cada método utilizado, diferem estatisticamente entre si (p< 0,05), conforme determinado pela ANOVA.

A capacidade antioxidante das amostras, com exceção das folhas, também aumentou significativamente (p< 0,05) (FIGURA 13 B). Esse fato pode ser atribuído a maior liberação de compostos fenólicos após o processo de digestão, uma vez que a capacidade antioxidante é proporcional ao teor de compostos fenólicos. No FRAP, o maior teor de capacidade antioxidante foi registrado na fase de digestão intestinal. Apesar da mudança do pH do meio entre a digestão gástrica e a digestão intestinal influenciar negativamente no teor de compostos fenólicos (FIGURA 13 A), os sais biliares e tripsina, presentes na fase de simulação intestinal, podem influenciar na decomposição de substâncias ligantes, levando ao aumento de compostos bioativos e, conseqüentemente, ao aumento da capacidade antioxidante (SHANG et al., 2022). Além disso, esses dados demonstram que os antioxidantes liberados na fase de digestão intestinal tiveram mais afinidade para redução do ferro férrico (Fe³⁺).

Apesar da capacidade antioxidante ter seguido o mesmo perfil do TPC para a maioria das amostras, principalmente para o DPPH, em que os maiores teores foram observados na fase gástrica, apenas a raiz apresentou Correlação de Pearson significativa entre DPPH e TPC ($r = 0,9893$, $p < 0,01$) e as folhas apresentaram correlação significativa e positiva entre DPPH e FRAP ($r = 0,9938$, $p < 0,01$). Esses dados podem inferir que os compostos bioativos envolvidos na capacidade antioxidante do *C. americanum* L., não são os compostos fenólicos e sim outros metabólitos, como os alcaloides (DUNG et al., 2020).

4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO OTIMIZADO

Até o momento, foi avaliada a composição centesimal e mineral das folhas, bulbos e raízes secas de *C. americanum* L. A partir desse ponto, foram obtidos os extratos de todas as partes da planta. As extrações foram realizadas de acordo com o planejamento experimental (TABELA 3). O TPC, DPPH, FRAP e TAK, foram utilizados como métodos de triagem para a elaboração de um extrato otimizado, rico em alcaloides, compostos fenólicos e outros compostos químicos. O extrato de cada parte de *C. americanum* L. foi analisado por ESI-FT-MS para determinação de seus compostos químicos. Além disso, a citotoxicidade desses extratos foi testada contra células MN. Todos os resultados para essas abordagens estão descritos nos próximos tópicos.

4.5 FENÓLICOS TOTAIS (TPC), CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH E FRAP) E ALCALOIDES TOTAIS (TAK)

No presente estudo, dois mecanismos de ação antioxidante foram testados em extratos de *C. americanum* L., atividade de eliminação de DPPH e capacidade de redução de ferro (FRAP) (TABELA 7). Os resultados mostraram que os extratos foram capazes de sequestrar o radical DPPH e a capacidade antioxidante foi maior na mistura ternária para extratos de folhas (ensaio 8: 2608 ± 9 mg TE $100g^{-1}$), bulbo (ensaio 10: 818 ± 3 mg TE $100g^{-1}$) e raiz (ensaio 7: 606 ± 8 mg TE $100g^{-1}$).

TABELA 7 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE, COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ALCALOIDES TOTAIS DE EXTRATOS DE FOLHAS, BULBOS E RAÍZES DE *Crinum americanum* L.

Folha							
Ensaio	Etanol (A)	Água (B)	Acetato de Etila (C)	DPPH (mg TE.100g ⁻¹)	FRAP (mg Fe (II).100g ⁻¹)	TPC (mg GAE/100 g)	TAK (mg ATR.100g ⁻¹)
1	1	0	0	1474 ± 3 ^c	1455 ± 6 ^g	1154 ± 6 ^f	1212 ± 18 ^d
2	0	1	0	1873 ± 4 ^{bc}	2748 ± 3 ^e	2034 ± 5 ^d	860 ± 28 ^{ef}
3	0	0	1	1037 ± 4 ^e	2069 ^f ± 3	926 ± 5 ^h	811 ± 15 ^f
4	0,5	0,5	0	1840 ± 9 ^{bc}	2619 ± 4 ^e	2229 ± 16 ^{cd}	1163 ± 32 ^d
5	0,5	0	0,5	1143 ± 4 ^d	1352 ± 2 ^h	1015 ± 5 ^g	979 ± 17 ^e
6	0	0,5	0,5	2420 ± 8 ^{ab}	3260 ± 6 ^b	3046 ± 15 ^a	1833 ± 19 ^c
7	0,333	0,333	0,334	2234 ± 5 ^b	2900 ± 3 ^d	2367 ± 16 ^c	1636 ± 18 ^{cd}
8	0,666	0,167	0,167	2608 ± 9 ^a	3368 ± 4 ^a	2865 ± 11 ^b	3081 ± 17 ^b
9	0,167	0,66	0,167	1915 ± 6 ^{bc}	2622 ± 5 ^e	2246 ± 15 ^c	5953 ± 45 ^a
10	0,167	0,167	0,666	2392 ± 8 ^{ab}	3098 ± 2 ^c	1981 ± 15 ^e	1887 ± 31 ^c
p-valor (normalidade)				0,713	0,305	0,561	0,450
p-valor (homocedasticidade)				0,013	0,567	0,743	0,149
p-valor (ANOVA one-way)				<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Bulbos							
1	1	0	0	620 ± 1 ^c	751 ± 36 ^c	792 ± 15 ^d	398 ± 11 ^d
2	0	1	0	481 ± 3 ^e	562 ± 6 ^e	743 ± 3 ^e	172 ± 12 ^{fg}
3	0	0	1	172 ± 2 ^j	566 ± 3 ^e	278 ± 2 ^j	162 ± 11 ^g
4	0,5	0,5	0	450 ± 3 ^f	76 ± 2 ⁱ	708 ± 13 ^f	389 ± 15 ^d
5	0,5	0	0,5	263 ± 1 ⁱ	671 ± 17 ^d	398 ± 12 ^j	175 ± 3 ^f
6	0	0,5	0,5	409 ± 3 ^h	383 ± 6 ^g	551 ± 21 ^h	613 ± 9 ^c
7	0,333	0,333	0,334	543 ± 3 ^d	662 ± 3 ^d	916 ± 14 ^c	249 ± 3 ^e
8	0,666	0,167	0,167	633 ± 5 ^b	833 ± 7 ^b	1094 ± 13 ^b	1236 ± 18 ^b
9	0,167	0,66	0,167	442 ± 4 ^g	327 ± 6 ^h	679 ± 19 ^g	1984 ± 16 ^a
10	0,167	0,167	0,666	818 ± 3 ^a	1890 ± 13 ^a	1306 ± 21 ^a	649 ± 10 ^c
p-valor (normalidade)				0,703	0,391	0,941	0,436
p-valor (homocedasticidade)				0,852	0,743	0,723	0,303
p-valor (ANOVA one-way)				<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Raiz							
1	1	0	0	330 ± 3 ^h	615 ± 14 ^c	339 ± 12 ^f	584 ± 10 ^{bc}
2	0	1	0	337 ± 13 ^g	2571 ± 5 ^d	490 ± 4 ^c	134 ± 3 ^g
3	0	0	1	150 ± 8 ^k	2899 ± 34 ^a	183 ± 2 ^h	147 ± 6 ^f
4	0,5	0,5	0	560 ± 12 ^b	543 ± 6 ^c	675 ± 12 ^b	496 ± 7 ^c
5	0,5	0	0,5	279 ± 4 ⁱ	513 ± 7 ^c	241 ± 8 ^{gh}	-
6	0	0,5	0,5	354 ± 14 ^f	166 ± 3 ^e	468 ± 7 ^d	239 ± 11 ^e
7	0,333	0,333	0,334	606 ± 8 ^a	758 ± 6 ^b	748 ± 14 ^a	611 ± 4 ^{bc}
8	0,666	0,167	0,167	454 ± 18 ^c	206 ± 3 ^e	538 ± 4 ^c	846 ± 10 ^b
9	0,167	0,66	0,167	358 ± 11 ^e	57 ± 0.3 ^g	367 ± 3 ^e	297 ± 6 ^d
10	0,167	0,167	0,666	448 ± 5 ^d	47 ± 0.3 ^h	482 ± 9 ^{cd}	1355 ± 11 ^a

(Continuação)

p-valor (normalidade)	0,934	0,601	0,802	0,755
p-valor (homocedasticidade)	0,303	0,352	0,909	0,342
p-valor (ANOVA one-way)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Nota: Trolox (TE); Sulfato Férrico (Fe III); Ácido Gálico (GAE); Atropina (ATR). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Comparativamente, Gomes et al. (2022) avaliaram extratos hexânicos e metanólicos de folhas, bulbos e raízes de *C. americanum* L. quanto a capacidade de eliminação de DPPH e expressaram os resultados em EC 50. Os autores relataram que o potencial antioxidante dos extratos e frações de *C. americanum* L. não foi significativo em comparação com o ascórbico ácido ($7,37 \pm 0,36 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os melhores valores encontrados pelos autores variaram de 156 ± 6 a $191 \pm 18 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o extrato das folhas.

O ensaio de capacidade de redução do ferro (FRAP) também foi mais significativo na mistura ternária para extratos de folhas (ensaio 8: $3368 \pm 4 \text{ mg Fe (III)} 100\text{g}^{-1}$) e bulbo (ensaio 10: $1890 \pm 13 \text{ mg Fe (III)} 100\text{g}^{-1}$). Para o extrato de raiz, o acetato de etila foi o solvente que mais eficiente (teste 3: $2899 \pm 34 \text{ mg Fe (III)} 100\text{g}^{-1}$). Valores expressivos de FRAP para extratos metanólicos de folhas de *C. asiaticum* ($462,81 \pm 1,98 \text{ mg Fe II g}^{-1}$ de extrato) também foram verificados no trabalho de Ghane et al. (2018). Em outro estudo, os valores de FRAP dos extratos metanólicos das raízes das espécies *Crinum* variaram de $6.751 \pm 0,06$ para *C. mnehune*, $5.677 \pm 0,14$ para *C. viviparum* e $3.380 \pm 0,08 \text{ mg Fe (II)} \text{ g}^{-1}$ para *C. asiaticum*. (LEKHAK et al., 2021).

O TPC máximo para o extrato das folhas foi apresentado na mistura dos solventes água e acetato de etila (ensaio 6: $3046 \pm 15 \text{ mg GAE } 100\text{g}^{-1}$). Por outro lado, o maior TPC para os extratos de bulbo e raiz (1306 ± 21 e $748 \pm 14 \text{ mg GAE } 100\text{g}^{-1}$, respectivamente) foi observado nos testes da mistura ternária de solventes (TABELA 6). Valores de TPC mais pronunciados de extratos de folhas de *C. jagus*, *C. latifolium* e *C. pratense* ($8177 \pm 0,75$; $77,32 \pm 0,56$; $70,61 \pm 0,62 \text{ mg TAE g}^{-1}$ de extrato, respectivamente) foram observados por Ghane et al. (2018). Mohammed et al. (2014) também observaram valores de TPC elevados em *C. ornatum* ($271,5 \text{ mg GAE g}^{-1}$).

O TAK foi maior para todos os extratos nos testes com a mistura ternária de solventes (5953 ± 45 ; 1984 ± 16 ; $1355 \pm 11 \text{ mg ATR } 100\text{g}^{-1}$, para extratos de folhas, bulbo e raiz, respectivamente) (TABELA 7). Esses valores são superiores aos

relatados no trabalho de Ghane et al. (2018) para extratos aquosos das folhas de *Crinum jagus* e *C. asiaticum* ($930 \pm 0,02$ e $860 \pm 0,03$ mg colchicina 100 g^{-1} , respectivamente) e para o extrato metanólico das raízes de *C. solapurens* e *C. asiaticum* ($1280 \pm 0,11$ e $1153 \pm 0,02$ mg Brucina 100 g^{-1} , respectivamente) Lekhak et al. (2021).

A variação encontrada nos teores de DPPH, FRAP, TPC e TAK no presente estudo em relação aos estudos citados nesse tópico pode ser explicada por diversos fatores como solvente e método de extração, estágio em que as plantas foram colhidas, variações sazonais, entre outros (MOODLEY et al., 2021b). Os valores expressivos na capacidade antioxidante podem indicar a presença de fitoquímicos como fenólicos, flavonoides, taninos, alcaloides, entre outros, que contribuem significativamente para diversas atividades biológicas.

4.6 MODELAGEM DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E OTIMIZAÇÃO ESTATÍSTICA DO SISTEMA DE SOLVENTES

Os modelos propostos, que explicam os efeitos da água, etanol e acetato de etila na composição química, capacidade antioxidante, TPC e TAK de extratos de folhas, bulbos e raízes de *C. americanum* L. são apresentados na TABELA 8. Apenas o modelo proposto para o FRAP do extrato de raiz apresentou $R^2 < 0,7$ e não foi utilizado para prever os valores das variáveis de resposta. Além disso, todos os coeficientes dos modelos foram significativos ($p < 0,001$) e os valores de R^2 explicaram mais de 70% da variabilidade dos resultados.

TABELA 8 COEFICIENTES DE REGRESSÃO OBTIDOS POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA AVALIAR OS EFEITOS DA COMBINAÇÃO DE SOLVENTES NA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS, NA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E TAK DE EXTRATOS DE FOLHAS, BULBOS E RAÍZES DE *C. americanum* L.

Componentes do modelo	Coefficiente de Regressão	Erro padrão	t-valor	p-valor	- 95% confiança	+ 95% confiança
Folhas						
DPPH						
A (Etanol)	1506	296	6,9	<0,001	1289	1709
B (Água)	1902	296	8,5	<0,001	1708	2087
C (Acetato de Etila)	1074	296	5,0	<0,001	817	1306
BC	4544	894	6,9	<0,001	3891	5158
ABC	8340	3299	3,7	<0,001	4808	11295
AB (A-B)	9723	2059	6,4	<0,001	8162	11180
AC (A-C)	-3695	2059	-2,8	<0,001	-5763	-768
R^2	0,93					

(Continuação)

<i>R</i> ² ajustado	0,91					
p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,12					
FRAP						
A (Etanol)	1486	494	4,3	<0,001	1152	1776
B (Água)	2769	494	7,7	<0,001	2556	2971
C (Acetato de Etila)	2093	494	5,9	<0,001	1835	2332
AB	2817	1301	3,2	<0,001	1648	3729
AC	-2138	1301	-2,6	<0,001	-3181	-460
BC	5314	1301	5,7	<0,001	4616	5957
ABC	10054	4089	3,6	<0,001	6790	12740
AB (A-B)	11374	2704	5,9	<0,001	9953	12690
<i>R</i> ²	0,95					
<i>R</i> ² ajustado	0,94					
p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,001					
TPC						
A (Etanol)	1163	100	13,0	<0,001	980	1345
B (Água)	2043	100	22,2	<0,001	1864	2221
C (Acetato de Etila)	935	100	10,6	<0,001	751	1119
AB	2627	461	6,8	<0,001	1752	3491
BC	6707	461	16,0	<0,001	5865	7546
ABC	8159	2829	3,9	<0,001	2596	13578
AB (A-B)	12403	1469	9,6	<0,001	9657	15128
AC (A-C)	3824	1469	3,6	0,01	918	6644
<i>R</i> ²	0,97					
<i>R</i> ² ajustado	0,96					
p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,15					
TAK						
A (Etanol)	1886	655	2,9	<0,001	536	3235
B (Água)	1986	655	3,0	<0,001	637	3336
C (Acetato de Etila)	1833	655	2,8	<0,001	483	3182
BC	1933	655	2,6	<0,001	494	2182
AB (A-B)	-37344	13265	-2,8	<0,001	-64663	-10025
AC (A-C)	34581	13265	2,6	<0,001	7262	61900
<i>R</i> ²	0,98					
<i>R</i> ² ajustado	0,97					
p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,10					
Bulbo						
DPPH						
A (Etanol)	601	22	24,7	<0,001	494	712
B (Água)	492	25	18,3	<0,001	380	611
C (Acetato de Etila)	157	22	7,6	<0,001	80	243
BC	1697	156	10,2	<0,001	1050	2403
BC (B-C)	-6631	791	-8,1	<0,001	-10093	-3532
<i>R</i> ²	0,80					
<i>R</i> ² ajustado	0,76					
p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,01					
FRAP						
A (Etanol)	781	3	286,6	<0,001	545	1078
B (Água)	598	4	173,6	<0,001	385	878

(Continuação)

<i>C (Acetato de Etila)</i>	592	3	220,1	<0,001	398	840
AB	-7602	41	-43,6	<0,001	-15448	-3012
BC					5116	21288
AC (A-C)	11335	41	59,1	<0,001	178	83347
BC (B-C)	-14757	996	-6,5	<0,001	-312454	-25750
R^2	0,90					
R^2 ajustado	0,87					
p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,11					
TPC						
A (Etanol)	705	16	34,3	<0,001	541	885
B (Água)	684	17	30,0	<0,001	509	876
<i>C (Acetato de Etila)</i>	347	17	17,3	<0,001	219	496
BC	2598	197	10,1	<0,001	1185	4380
ABC	10119	2959	3,9	<0,001	107	28990
AB (A-B)	8229	1048	6,8	<0,001	2281	16561
R^2	0,72					
R^2 ajustado	0,70					
p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,19					
TAK						
A (Etanol)	341	0,03	81,27	<0,001	207	628
B (Água)	179	0,03	72,58	<0,001	113	286
<i>C (Acetato de Etila)</i>	128	0,03	71,12	<0,001	90	207
BC	207	0,16	59,50	<0,001	561	628
AB (A-B)	224	0,56	7,46	<0,001	628	1040
AC (A-C)	561	0,56	9,26	<0,001	1040	1394
R^2	0,99					
R^2 ajustado	0,99					
p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,16					
Raiz						
DPPH						
A (Etanol)	326	3	175,0	<0,001	300	353
B (Água)	332	3	178,5	<0,001	306	359
<i>C (Acetato de Etila)</i>	147	3	80,1	<0,001	128	167
AB	664	16	33,0	<0,001	504	840
AC	69	16	5,2	0,009	12	155
BC	295	16	16,2	<0,001	180	429
ABC	5680	235	16,4	<0,001	3451	8293
AB (A-B)	3113	84	24,4	<0,001	2186	4156
AC (A-C)	-3219	84	-25,2	<0,001	-4273	-2279
R^2	0,98					
R^2 ajustado	0,97					
p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,13					
TPC						
A (Etanol)	332	2	567,1	<0,001	289	379
B (Água)	481	2	826,8	<0,001	428	538
<i>C (Acetato de Etila)</i>	178	2	299,3	<0,001	148	210
AB	404	10	27,9	<0,001	200	692
BC	182	10	14,8	<0,001	63	376
ABC	14153	312	17,0	<0,001	4823	29468
AB (A-B)	12193	77	50,5	<0,001	7249	18646
AC (A-C)	-4889	77	-24,3	<0,001	-8946	-2157

(Continuação)

R^2	0,95					
R^2 ajustado	0,93					
p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,02					
TAK						
A (Etanol)	587	9	63,9	568	606	587
B (Água)	137	9	14,9	117	156	137
C (Acetato de Etila)	149	9	16,3	130	168	149
AB	555	45	12,3	462	649	555
BC	-498	45	-11,1	-591	-404	-498
ABC	1893	45	42,0	1799	1987	1893
AB (A-B)	9744	295	33,0	9130	1035	974
AC(A-C)	-12382	150	-82,7	-1269	-1207	-1238
R^2	0,94					
R^2 ajustado	0,92					
p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,01					

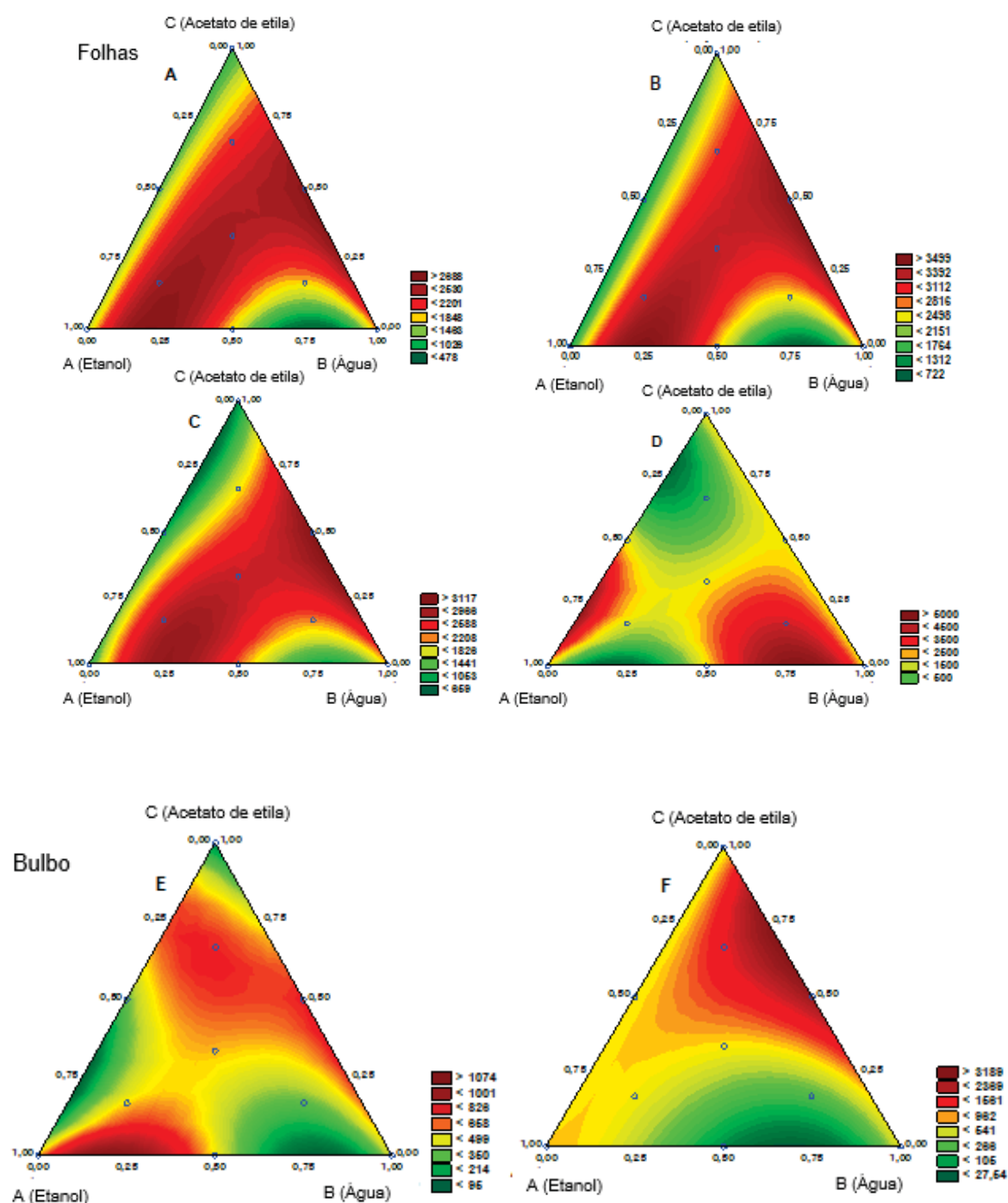
Nota: Trolox (TE); sulfato férrico (Fe III); ácido gálico (GAE); Atropina (ATR).

O efeito da interação entre água e acetato de etila foi o mais significativo ($p \leq 0,05$) para o aumento da capacidade antioxidante e alcaloides totais de extratos de folhas, bulbos e raízes de *C. americanum* L. O mesmo foi observado em misturas ternárias para extratos de raízes e folhas, com exceção do FRAP nesse último. A interação entre acetato de etila e etanol aumentou apenas o FRAP do extrato das folhas e o DPPH do extrato das raízes, conforme FIGURA 14.

Para maximizar os valores de DPPH, FRAP, TPC e TAK, a otimização simultânea sugeriu um sistema solvente contendo 56,04% de água e 43,96% de acetato de etila para o extrato das folhas (EOF) (valor d = 0,995); 56,51% de água e 43,59% de acetato de etila para o extrato do bulbo (EOB) (valor d = 0,926) e 76,97% de água e 18,51% de etanol para o extrato da raiz (EOR) (valor d = 1,00) (FIGURA 15).

Uma validação externa foi realizada com as proporções de solventes mencionadas acima para avaliar se os modelos RSM são preditivos. Os resultados previstos são apresentados na TABELA 9 e é possível observar que os dados experimentais ficaram dentro dos intervalos de previsão de $\pm 95\%$ propostos pelos modelos RSM. Assim, os modelos gerados podem ser considerados preditivos para maximizar a extração de alcaloides, TPC e capacidade antioxidante dos extratos. Em termos tecnológicos, este é o primeiro trabalho a relatar a otimização do sistema de extração por solvente de *C. americanum* L.

FIGURA 14 - EFEITOS DO TIPO DE SOLVENTE NO TEOR DE DPPH (A; E e I mg TE.100 g⁻¹), FRAP (B e F mg FE (III).100 g⁻¹), TPC (C ; G e J mg GAE.100 g⁻¹) E TAK (D; H e K mg ATR.100 g⁻¹) DE EXTRATOS DE FOLHAS, BULBOS E RAÍZES DE *C. americanum* L.



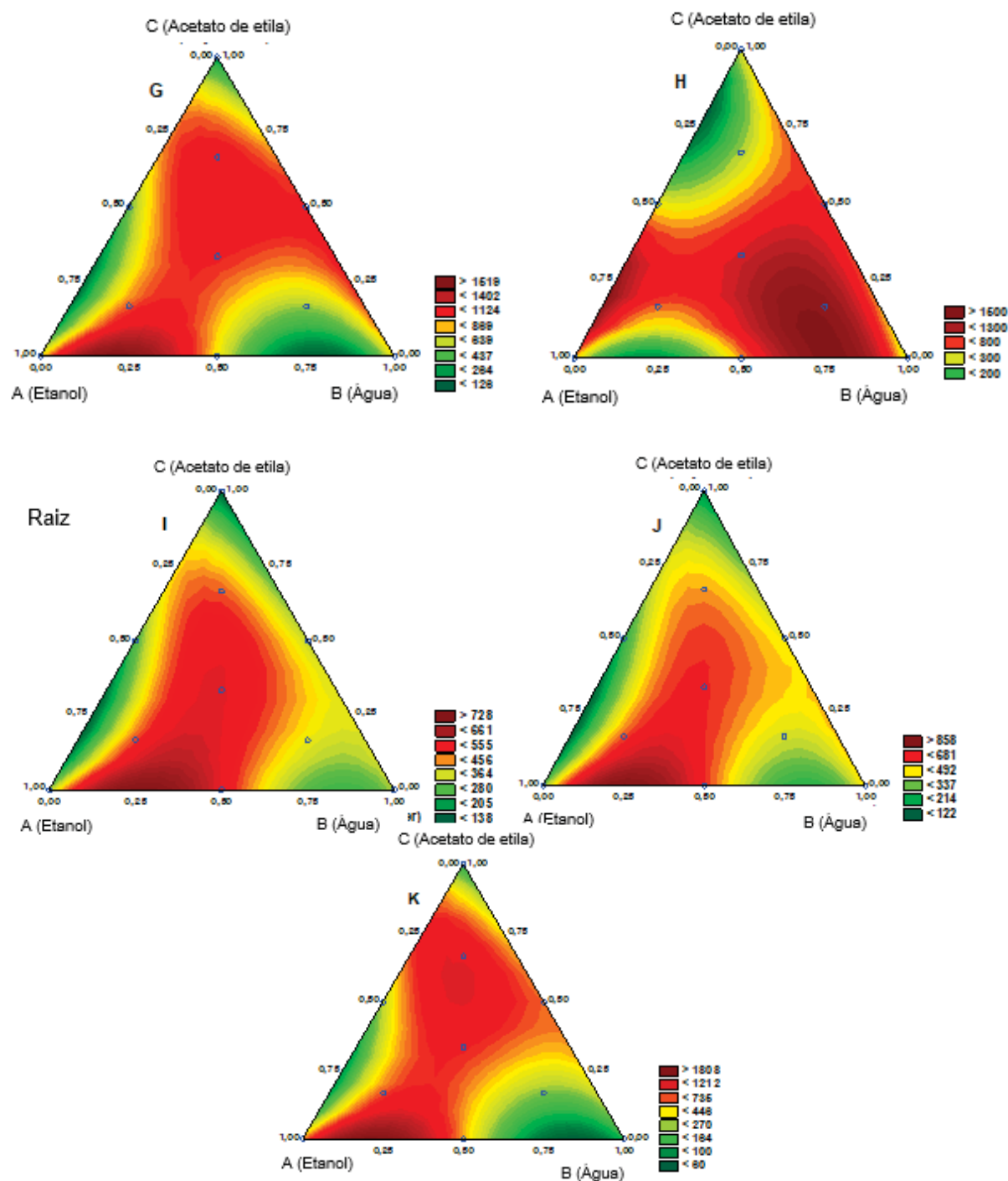


FIGURA 15 - PERFIL DE DESEJABILIDADE DA OTIMIZAÇÃO SIMULTÂNEA DO EXTRATO DE FOLHA (A), BULBO (B) E RAIZ (C) DE *C. americanum* L. COM BASE NA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH E FRAP), FENÓLICOS TOTAIS E ALCALOIDES TOTAIS.

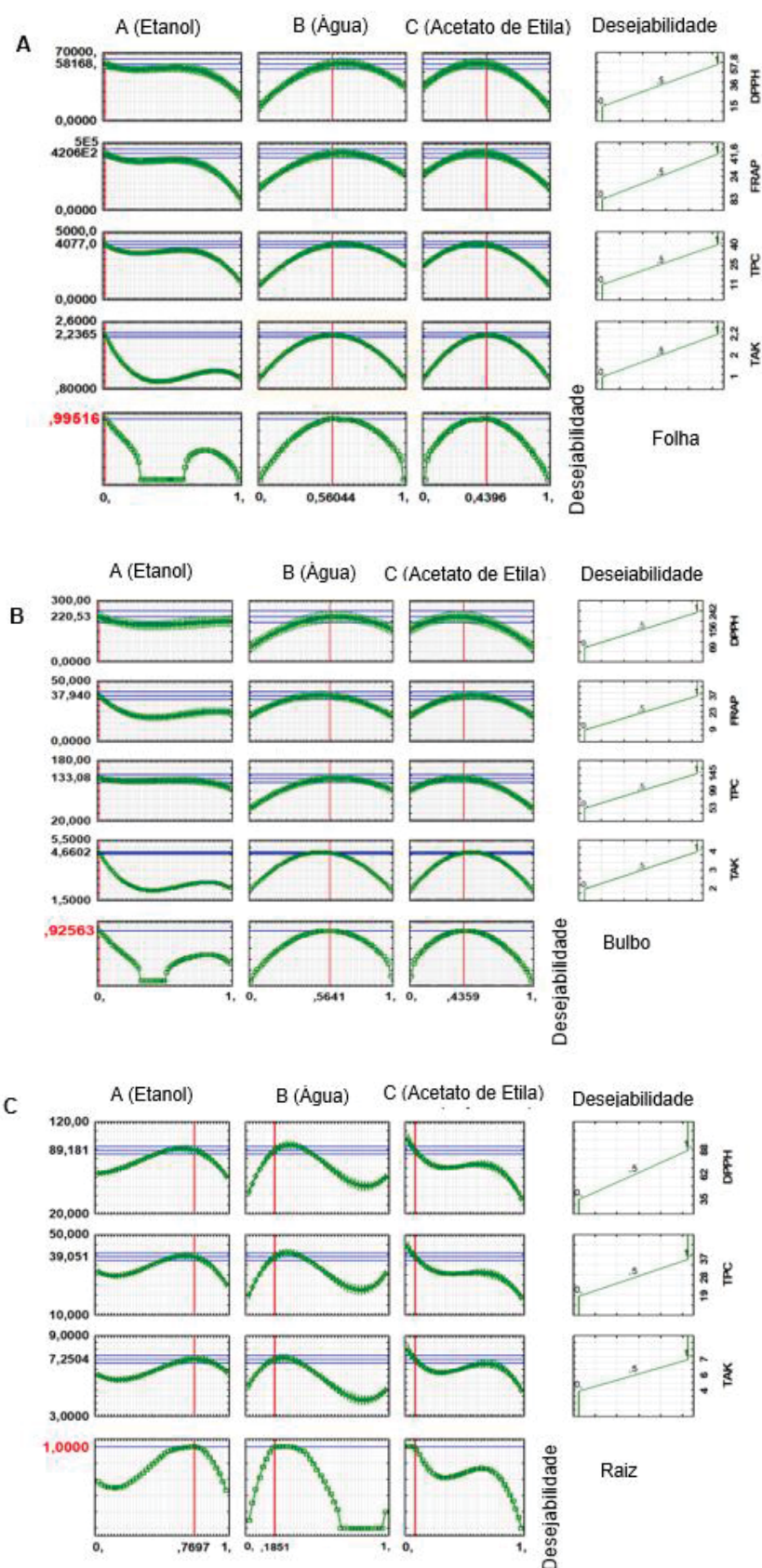


TABELA 9 - VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE OTIMIZAÇÃO: VALORES PREVISTOS E EXPERIMENTAIS PARA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE, TPC E TAK DO EXTRATO OTIMIZADO DE FOLHAS (EOF), BULBO (EOB) E RAIZ (EOR) DE *C. americanum* L.

<i>Respostas (mg equivalent*.100 g⁻¹ de amostra seca)</i>	<i>Valor médio previsto</i>	<i>-95% predição</i>	<i>+95% predição</i>	<i>Valor experimental</i>
EOF				
DPPH	2655	2492	2813	2466 ± 32,23
FRAP	3625	3451	3793	3650 ± 57,02
TPC	3215	3042	3388	3302 ± 86,85
TAK	1731	1677	1785	1727 ± 58,59
EOB				
DPPH	722	603	845	669 ± 12,17
FRAP	2774	2139	3524	3451 ± 156,9
TPC	1132	995	1275	1240 ± 60,49
TAK	584	622	619	598 ± 29,34
EOR				
DPPH	713	652	775	658 ± 5,46
TPC	1040	897	1195	990 ± 94,67
TAK	2980	1946	4562	4210 ± 97,95

*equivalente: Trolox (TE); sulfato férrico (Fe III); ácido gálico (GAE); Atropina (ATR)/ EOF, EOB e EOR: extrato otimizado de folhas, bulbo e raiz, respectivamente.

4.7 ANÁLISE EM ESI-FT-MS

Os EOF, EOB e EOR foram submetidos à análise ESI-FT-MS para identificação de seus compostos. Dentre centenas de compostos detectados, um total de 89 moléculas comuns da família Amaryllidaceae foram identificadas, tais como: ácidos graxos saturados e insaturados, aminoácidos, açúcares, compostos fenólicos e alcaloides (TABELA 10). No entanto, a maioria desses compostos foi relatada pela primeira vez para *C. americanum* L. Dos 32 alcaloides detectados nos extratos, 24 foram identificados pela primeira vez para essa espécie no presente trabalho.

Apenas dois estudos na literatura relataram a presença de alcaloides em *C. americanum* L. No primeiro foi descrita a presença de oxocrinina, crinina, hippadina e licorina em extratos do bulbo dessas plantas (ALI et al., 1986). No segundo trabalho encontrado foi descrito a presença de 13 alcaloides em extratos de folhas e bulbos de *C. americanum* L. (GOMES et al., 2022). Dos 13 alcaloides encontrados pelos autores, 7 também foram identificados no presente trabalho, dentre eles: crinina, licorina, diidrolicorina, crinamina, hemantamina, epipowellina e 1,2-dideidrocrinan-3-ona (TABELA 10).

O alcaloide galantaminona, identificado pela primeira vez no extrato da folha de *C. americanum* L., é um derivado da galantamina. Esse alcaloide tem se destacado nos últimos anos como uma classe de compostos utilizados em medicamentos para o

tratamento da doença de Alzheimer (AKRAM; VERPOORTE; POMAHAČOVÁ, 2021). Outros alcaloides como a crinina e a licorina já foram citados na literatura por possuírem propriedades citotóxicas e indutoras de apoptose potencialmente úteis para o tratamento de câncer (SHAWKY et al., 2018).

TABELA 10. MEDIÇÃO DE MASSA PRECISA PARA ÍONS MOLECULARES DE COMPOSTOS ORIGINAIS EM EXTRATOS OTIMIZADOS DE *C. americanum* L.

N°	Nome do composto ESI (+)	Fórmula	Massa teórica ⁺	EOF		EOB		EOR		Referência	
				Massa	% ⁺	Massa	% ⁺	Massa	% ⁺		
ALCALOIDES											
1	1-benzoilacta-hidro-4(1h)-quinolona	C ₁₆ H ₁₉ NO ₂	257.1416	257.1487	0.11	-	-	-	-	(MONASTYRSKYI; KYLE; MANETSCH, 2014)	
2	Norgalantamina	C ₁₆ H ₁₉ NO ₃	273.1365	273.1435	12.06	273.1434	2.28	273.1434	4.23	MANETSCH, 2014)	
3	lêmen C	C ₁₆ H ₁₇ NO ₅	303.1107	303.1177	1.33	303.1176	0.41	303.1176	0.12		
4	Licorina-1-O-glicosídeo	C ₂₂ H ₂₇ NO ₉	450.1775	-	-	450.1755	0.13	-	-	(MAHOMOODALLY et al., 2020)	
5	Pratorimina	C ₁₆ H ₁₁ NO ₃	265.0739	-	-	265.0809	0.56	265.0808	1.11	(GOMES et al., 2022)	
6	Crinina	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	271.1208	271.1279	19.69	271.1278	1.09	271.1278	3.28		
7	Licorina	C ₁₆ H ₁₇ NO ₄	287.1158	287.1228	100	287.1235	100	287.1227	82.68		
8	Crinamina	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	301.1314	301.1385	14.74	301.1383	1.06	301.1383	0.34		
8.1	Hemantamina	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	301.1314	301.1385	14.74	301.1383	1.06	301.1383	0.34		
8.2	Epipowellina	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	301.1314	301.1385	14.74	301.1383	1.06	301.1383	0.34	(SAINSBURY, 2009)	
9	1,2-didesidrocrinan-3-ona	C ₁₆ H ₁₅ NO ₃	269.1052	-	-	-	-	269.0980	0.1		
10	Dihidrollicorina	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄	289.1314	289.1382	1.73	289.1382	2.85	289.1383	6.05		
11	Galantaminona	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	285.1365	285.1435	0.32	-	-	-	-		(HARVEY, 1995)
12	1-o-acetilcaranina/krepowine	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	313.1314	313.1383	0.52	-	-	-	-		(MAROYI, 2016)
13	Hostasina	C ₁₈ H ₂₁ NO ₇	363.1318	363.1387	0.13	-	-	-	-	(DING et al., 2017)	
14	Homollicorina	C ₁₈ H ₂₁ NO ₄	315.1471	315.1541	0.13	-	-	-	-	-	
15	Nartazina	C ₂₀ H ₂₃ NO ₆	-	373.1595	0.39	-	-	-	-	(SAINSBURY, 2009)	
16	18-hidroxirianodina	C ₂₅ H ₃₅ NO ₁₀	509.2261	509.2331	0.64	-	-	-	-	-	
17	Cripowellina C	C ₂₅ H ₃₁ NO ₁₁	521.1897	521.1967	0.75	-	-	-	-	(NAIR; VAN STADEN, 2019b)	
18	Cripowellina B	C ₂₅ H ₃₃ NO ₁₁	523.2054	523.2123	2.25	523.2126	0.43	-	-	(LUBBE et al., 2013)	
19	Trigonelina	C ₇ H ₇ NO ₂	137.0477	137.0549	0.3	-	-	-	-	(MICHAEL; MICHAEL, 2007)	
20	(-)-Uniflorina A	C ₈ H ₁₅ NO ₅	205.0950	205.1022	0.15	-	-	-	-	-	
21	Virstatina	C ₁₆ H ₁₃ NO ₄	283.0845	283.0915	2.38	283.0915	1.54	283.0914	4.88	(GOMES et al., 2022)	
22	Dihidrollicorina	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄	289.1314	289.1382	1.73	289.1382	2.85	289.1383	6.05		
23	Pancratinina D	C ₁₆ H ₁₉ NO ₅	305.1263	305.1333	0.55	305.1334	0.88	305.1332	1.01		(DING et al., 2017)

(Continuação)

24	Tazettine	C ₁₈ H ₂₁ NO ₅	331.1420	331.1489	30.6	331.1491	19.34	331.1488	5.92	
24.1	Criwellina	C ₁₈ H ₂₁ NO ₅	331.1420	331.1489	30.6	331.1491	19.34	331.1488	5.92	(NAIR et al., 2013)
24.2	Ambelline	C ₁₈ H ₂₁ NO ₅	331.1420	331.1489	30.6	331.1491	19.34	331.1488	5.92	
25	Cavinina	C ₁₈ H ₂₁ NO ₆	347.1369	347.1438	10.9	347.144	5.72	347.1437	0.64	-
26	Dubinidina	C ₁₆ H ₁₇ NO ₄	275.1158	275.1229	0.14	275.1228	0.11	-	-	-
27	Isoindolo[2,1-β]isoquinolina-5,7-diona	C ₁₆ H ₉ NO ₂	247.0633	-	-	247.0705	0.35	-	-	-
28	Oxocrinina	C ₁₆ H ₁₅ NO ₃	269.1052	269.1123	0.14	-	-	-	-	(ALI et al., 1986)
AMINOÁCIDOS										
29	Valina	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.0790	117.0863	0.11	-	-	-	-	
30	Leucina	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.095	131.1018	0.15	-	-	-	-	(LUBBE et al., 2013)
31	Tiamina	C ₈ H ₁₁ NO	137.0841	137.0912	0.63	137.0912	1.67	-	-	
32	Triptofano	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204.090	204.0821	0.18	204.0820	0.17	-	-	
33	4-hidroxi-L-treonina	C ₄ H ₉ NO ₄	135.0532	135.0462	0.42	135.0462	0.25	135.0462	0.33	(AKRAM; VERPOORTE; POMAHAČOVÁ, 2021)
34	Leucilprolina	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₃	228.1474	-	-	228.1399	0.1	-	-	

PERFIL LIPÍDICO										
Ácidos Graxos Saturados										
35	Ácido glucônico	C ₆ H ₁₂ O ₇	196.0583	196.0505	0.75	-	-	-	-	
36	Ácido hexanodióico	C ₉ H ₁₈ O ₆	222.1103	222.1031	0.12	-	-	-	-	
37	Ácido pentadecanóico	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242.2246	242.2171	0.69	242.2172	17.33	242.2172	0.36	
38	Ácido dodecanóico	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200.1776	200.1698	0.55	200.1699	2.36	200.1698	0.33	
39	Ácido heptadecanóico	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270.2559	270.2489	0.55	270.2488	9.65	270.2488	0.23	
40	Ácido octadecanóico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284.27153	284.2641	3.35	284.2644	23.93	284.2644		(BARRA et al., 2021)
41	Ácido docosanóico	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	340.3341	340.3269	1.29	340.3270	1.19	228.2014		
42	Ácido tetradecanóico	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228.2089	-	-	228.2014	19.38	228.2014	0.81	
43	ácido 3-oxohexadecanóico	C ₁₆ H ₃₀ O ₃	270.2195	-	-	270.2124	0.58	-	-	
44	Ácido palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.2402	-	-	256.2330	100	-	-	
45	Ácido heneicosanóico	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	326.3185	-	-	326.3114	0.29	-	-	
46	ácido 10-oxooctadecanóico	C ₁₈ H ₃₄ O ₃	298.2508	298.2435	0.38	298.2436	0.9	284.2644	6.32	-
47	Ácido fitânico	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	312.3028	312.2957	0.94	312.2958	1.27	-	-	-

(Continuação)									
48	Ácido octadecanodioico	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	314.2457	314.2386	0.75	314.2386	0.53	-	-
49	Ácido não adecanodioico	C ₁₉ H ₃₆ O ₄	328.2614	328.2543	0.24	328.2544	0.36	-	-
50	ácido 2-oxoundecanóico	C ₁₁ H ₂₀ O ₃	200.1412	200.1334	0.35	200.1334	0.28	-	(OLOYEDE; OLADOSU; SHODIA, 2010)
Ácidos Graxos Insaturados									
51	Ácido octadec-9-enóico (9Z,12Z,15Z)-octadeca- 9,12,15-trienoato	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282.2559	282.2486	11.23	282.2487	27.67	282.2487	3.9
52	Etil linoleato	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278.2246	278.2175	31.74	278.2174	2.12	278.2174	0.1
53	Metil 9-octadecenoato	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	308.2715	308.2644	0.77	308.2645	1.01	-	(BARRA et al., 2021)
54	ácido 2-hexadecenóico	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296.2715	-	-	296.2644	0.7	-	(MAHOMOODALLY et al., 2020)
55		C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254.2246	-	-	254.2174	28.95	254.2174	0.89
FENÓLICOS									
56	Ácido Sinápico	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	224.0685	224.0609	4.18	-	-	-	-
57	ácido 4-o-beta-d-glucosil-4- cumárico	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	326.1002	326.0931	0.24	326.0932	0.26	326.0931	0.12
58	Éster fenético do ácido caféico	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	284.1049	284.0977	0.11	284.0977	0.11	-	(CHAHAL et al., 2022)
59	(2S)-3',7-dihidroxi-4'- metoxiflavano	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	272.1049	272.0979	0.22	272.0977	0.64	-	(SUN et al., 2009)
60	7-hidroxi flavanona	C ₁₅ H ₁₂ O ₃	240.0786	-	-	240.0712	0.12	-	(TAIWE et al., 2016)
61	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.0477	286.0404	0.11	-	-	-	(SIMIN et al., 2013)
62	Luteolina 7-[6"-(2- metilbutiril)glicosídeo]	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₂	532.1581	532.1511	0.13	-	-	-	(BENEDEC et al., 2018)
63	Quercitrina	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.1006	448.0935	0.42	-	-	-	(SCHRODER et al., 2004)
64	Homoeriodictiol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	302.0790	302.0720	0.12	-	-	-	(ABDUL SALAM et al., 2021)
65	3-[(2,4-dimetoxifenil)metil]- 3,4-di-hidro-2h-1-benzopiran- 4-ona	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	298.1145	298.1134	0.22	298.1134	0.79	298.1134	44.58
66	Alpinetina	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	270.0892	270.0821	1.15	270.0822	1.01	270.0823	4.97
67	Ácido caféico 3-glicosídeo	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	342.0951	342.0885	0.18	342.0882	0.13	-	(MAHOMOODALLY et al., 2020)

(Continuação)									
68	Oxipecuedanina	$C_{16}H_{14}O_5$	286.0841	286.0768	0.44	286.0769	0.32	-	(URBAIN; MARSTON; HOSTETTANN, 2005)
69	(E)-ácido ferúlico	$C_{10}H_{10}O_4$	194.0580	194.0501	4.46	194.0401	2.31	-	(GHANE et al., 2018)
70	7,4-dihidroxi flavanona	$C_{15}H_{12}O_4$	256.0736	-	-	256.0666	0.7	256.0664	(YOUSSEF; RAMADAN; KHALIFA, 1998)
71	(2s,3s)-4',7'-dihidroxi flavan-3- ol	$C_{15}H_{14}O_4$	258.0892	-	-	258.082	0.4	-	(NAM et al., 2004)
72	Decursina	$C_{19}H_{20}O_5$	328.1311	-	-	328.1240	0.15	-	-
73	7,4'-dihidroxi flavano	$C_{15}H_{14}O_3$	242.0942	-	-	242.0870	0.55	-	(COXON et al., 1980)
74	(2,5-dihidroxi-3,4,6- trimetoxifenil) etanona	$C_{11}H_{14}O_6$	242.0790	-	-	242.0721	0.15	-	-
75	7,4'-dihidroxi-8-metil flavano	$C_{16}H_{16}O_3$	256.1099	-	-	256.1028	2.12	-	(MOYO et al., 2017)
76	Naringenina	$C_{15}H_{12}O_5$	272.0685	-	-	272.0613	0.27	-	(KWON et al., 2020)
77	7-(benziloxi)-5,8- dimetoxicroman-4-ona	$C_{18}H_{18}O_5$	314.1230	-	-	-	-	314.1085	(BENEDEC et al., 2018)
78	ácido quínico	$C_7H_{12}O_6$	192.0634	-	-	192.0556	0.11	-	-
OUTROS									
79	Metil 9,12,13- trihidroxi octadecenoato	$C_{19}H_{36}O_5$	344.2563	344.2491	0.12	-	-	-	(MAHOMOODALLY et al., 2020)
80	Ácido Cítrico	$C_6H_8O_7$	192.0270	192.0192	1.06	-	-	-	(AKRAM; VERPOORTE; POMAHÁČOVÁ, 2021)
81	2,4-Dihidroxi-6-metoxi-3- metilacetofenona	$C_{10}H_{12}O_4$	196.0735	196.0657	0.15	196.0657	0.2	-	(YOUSSEF; RAMADAN; KHALIFA, 1998)
82	Epóxido de cariofileno	$C_{15}H_{24}O$	220.18272	220.1751	0.18	220.1751	0.51	-	(OLOYEDE; OLADOSU; SHODIA, 2010)
83	Embelina	$C_{17}H_{16}O_4$	294.1831	294.1759	1.84	294.1762	2.41	294.1761	(CHAHAL et al., 2022)

		(Continuação)									
											(AKRAM; VERPOORTE; POMAHAČOVÁ, 2021)
84	Maltose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.11621	342.1091	7.32	342.1090	8.42	342.1090	19.49		
85	D-Manohexptulose	$C_7H_{14}O_7$	210.0740	210.0663	1.67	210.0662	0.55	210.0663	0.24		-
86	Mansonona C	$C_{15}H_{16}O_2$	228.1150	-	-	228.1075	0.14	-	-		(GANASSI et al., 2021)
87	Ácido artemisínico	$C_{15}H_{22}O_2$	234.1619	-	-	234.1545	0.34	-	-		(NAIR; VAN STADEN, 2019b)
88	Acetato de Neril	$C_{12}H_{20}O_2$	196.14633	-	-	-	-	196.1385	0.11		-
89	Guanosina	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	283.0917	-	-	-	-	283.0845	0.11		-

* Abundância Relativa

Um total de 24 compostos fenólicos foram identificados entre os extratos otimizados. Embora a maioria desses compostos tenham sido identificados em plantas da família Amaryllidaceae (CHAHAL et al., 2022; MOYO et al., 2017), a presença de compostos fenólicos em extratos de *C. americanum* L. não foi relatada anteriormente, portanto, os dados do presente trabalho são inéditos para essa planta. Os compostos comumente identificados em espécies da Amaryllidaceae são Kaempferol (TAIWE et al., 2016), ácido (E)-ferúlico (GHANE et al., 2018), ácido cafeico 3-glicosídeo (MAHOMOODALLY et al., 2020), 7,4'-dihidroxi flavano (COXON et al., 1980) entre outros.

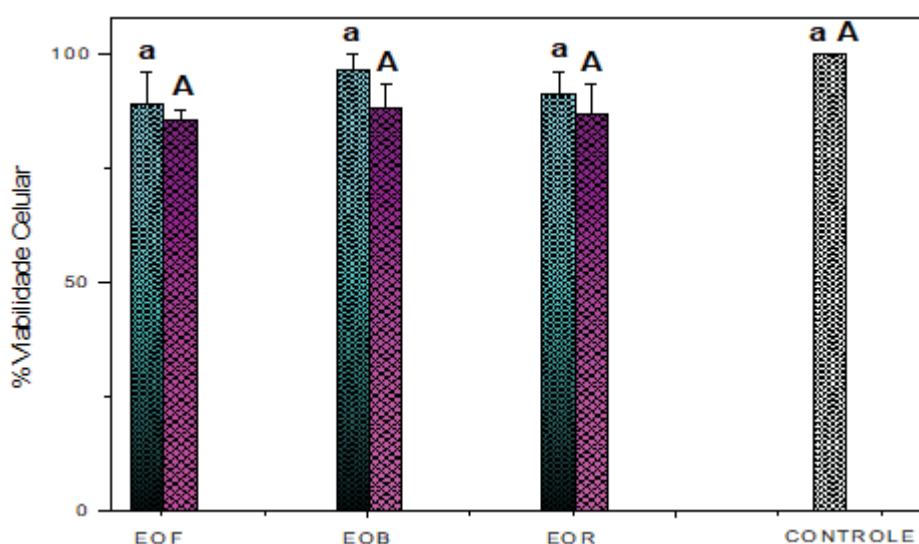
Dentre os extratos otimizados de *C. americanum* L., foram identificados 16 ácidos graxos saturados, como ácido pentadecanóico, ácido dodecanóico, ácido heptadecanóico e ácido octadecanóico e 5 ácidos graxos insaturados como ácido octadecanóico e (9Z,12Z,15Z) -octadeca-9,12,15-trienoato. Esses compostos também foram identificados no trabalho de Barra et al. (2021). Esses autores caracterizaram o perfil lipídico das folhas de *C. americanum* L. usando a técnica HRGC-MS. Os autores identificaram 11 dos 16 ácidos graxos saturados encontrados neste trabalho, incluindo: ácido dodecanóico, tetradecanóico, hexadecanóico, heptadecanóico, octodecanóico e o ácido graxo insaturado: (9Z, 12Z, 15Z)-octadeca-acid-9,12,15- trienóico.

A capacidade antioxidante observada nos extratos de *C. americanum* L. pode ser atribuída a alguns compostos identificados por ESI-FT-MS, como ácido (E)-ferúlico, kaempferol, quercitrina, entre outros. Além da capacidade antioxidante, os compostos fenólicos têm atraído cada vez mais atenção por seu potencial uso na prevenção e tratamento de muitas doenças relacionadas ao estresse oxidativo e por atuarem como agente antimutagênico (GOSWAMI et al., 2020). Da mesma forma, os alcaloides identificados no presente trabalho possuem propriedades antivirais (NARAYANAN et al., 2022) e anticancerígenas (GOMES et al., 2022), podendo atuar inibindo a enzima acetilcolinestarese (LEKHAK et al., 2021).

4.8 CITOTOXICIDADE EX VIVO

A concentração máxima que determina se um produto, natural ou sintético, é tóxico para determinada célula deve ser conhecida para definir a possibilidade de testes *ex vivo* e estabelecer uma margem de segurança do produto em relação às suas atividades biológicas. No presente trabalho, a dosagem citotóxica dos extratos otimizados foi testada em duas concentrações ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 100 ng mL^{-1}). Pode-se observar na FIGURA 16 que a porcentagem de viabilidade de células MN do sangue periférico humano não é dose-dependente e não há diferenças significativas na citotoxicidade entre as concentrações testadas.

FIGURA 16 - EFEITO DE EXTRATOS OTIMIZADOS DE FOLHAS, BULBOS E RAÍZES DE *C. americanum* L. NA VIABILIDADE DE CÉLULAS MN DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO.



NOTA: (■) $100 \mu\text{g mL}^{-1}$; (■) 100 ng mL^{-1} . O efeito de extratos otimizados na viabilidade celular foi avaliado pelo ensaio MTT. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$) e são representativos de três experimentos independentes com resultados semelhantes. Letras diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$), conforme determinado pela ANOVA.

A viabilidade celular foi superior a 80% em todas as concentrações dos extratos otimizados sem diferenças significativas em relação ao controle ($p < 0,05$). Segundo Moura et al. (2021), uma amostra é considerada citotóxica quando o percentual de viabilidade das células expostas é inferior a 70%. Portanto, isso demonstra que não houve alteração na viabilidade celular em ambas as concentrações testadas dos extratos otimizados.

Esse percentual pode estar relacionado ao mecanismo de ação desses extratos, uma vez que os extratos de plantas medicinais induzem a ativação do

sistema imunológico, sem alterar a viabilidade celular, e proporcionam benefícios efetivos para o tratamento de doenças (PESSOA et al., 2015). Além disso, estímulos como plantas medicinais podem aumentar a liberação de ânion superóxido dos fagócitos MN, causando uma alteração na função do sistema imunológico e ativando o metabolismo oxidativo (HONORIO-FRANÇA et al., 2013).

A variedade de compostos químicos é outro importante aspecto ao se tratar da toxicidade de extratos vegetais, uma vez que os mesmos extratos podem ser viáveis para determinadas células e tóxicos para outras. Nesse sentido, Granato et al. (2022) analisaram a citotoxicidade de extratos de subprodutos da indústria florestal como ingredientes alimentares funcionais e não observaram efeito tóxico para células humanas normais (IMR90). Apesar desses resultados, os autores relataram que os extratos de *Lunasia amara*, que continham alcaloides em sua composição química, apresentaram citotoxicidade (IC 50 de 71,1 a 412,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) contra células de carcinoma mamário humano (T47D) e adenocarcinoma cervical (HeLa), inferindo que os efeitos de diferentes extratos estão altamente associados à sua composição química.

Conforme evidenciado pelos resultados da análise de identificação química-ESI-FT-MS (TABELA 10), no presente trabalho foram identificados compostos químicos como alcaloides, compostos fenólicos, ácidos graxos insaturados, entre outros. Assim, analisar a citotoxicidade desses extratos com diferentes composições químicas é de fundamental importância para futuras aplicações. Isso porque compostos fenólicos, como o Kaempferol, identificado no extrato das folhas de *C. americanum L.*, já foram citados na literatura por apresentarem benefícios relacionados à redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis, sendo não-tóxicos para células normais humanas (LIN et al., 2014). A galantaminona, um alcaloide identificado no extrato da folha, é conhecida por suas propriedades como inibidor da acetilcolinesterase (AChE) (POTASIEWICZ et al., 2020). Além disso, a licorina, um alcaloide encontrado nos extratos de folhas, bulbos e raízes de *C. americanum L.*, já foi citado na literatura por inibir a replicação do SARS-CoV-2 em células Huh-7.5 (NARAYANAN et al., 2022).

Esses relatos podem explicar a viabilidade apresentada para células MN dos extratos otimizados de *C. americanum L.* no presente trabalho e a citotoxicidade de

extratos etanólicos de folhas e bulbos dessa espécie em linhagens celulares de neuroblastoma humano (SH-5YSY), apresentada no trabalho de Gomes et al. (2022).

4.9 CONCLUSÃO

Folhas, bulbos e raízes de *C. americanum* L. foram analisados quanto à composição centesimal, mineral e digestibilidade *in vitro*. As partes da planta apresentaram teores representativos de proteínas, lipídeos, carboidratos, fibras solúveis e insolúveis, umidade, cinzas e minerais, sugerindo que essa planta possa ser utilizada para o desenvolvimento de novos ingredientes funcionais ou para a produção de alimentos nutricionalmente enriquecidos.

O TPC e o DPPH foram maiores na digestão gástrica, quando comparados com o teor de fenólicos totais e DPPH para o extrato aquoso das folhas, bulbo e raiz. Por outro lado, o FRAP foi superior na fase de digestão intestinal.

O uso do RSM foi eficaz para a avaliação dos efeitos da água, álcool e acetato de etila na composição química e capacidade antioxidante de extratos de folhas, bulbos e raízes de *C. americanum* L. Os extratos otimizados apresentaram significativa capacidade antioxidante. Além disso, a análise direta e inédita do EOF, EOB e EOR por ESI (+) e ESI (-) -FT-MS, revelou 89 compostos, dos quais 24 alcaloides e 23 compostos fenólicos foram identificados pela primeira vez nessa espécie vegetal. Outros novos compostos como ácidos graxos saturados e insaturados, aminoácidos e açúcares também foram identificados por ESI-FT-MS. Os extratos otimizados não apresentaram citotoxicidade contra células MN nas concentrações testadas.

O presente estudo é o primeiro a determinar os efeitos nutricionais, químicos e antioxidantes de extratos de *C. americanum* L. Considerando a relativa segurança toxicológica dos extratos e dos diversos compostos identificados nesse trabalho, as aplicações em modelos medicinais, farmacêuticos e alimentares são formas de estimular a valorização dessa planta e de seus produtos, o que também levaria a movimentação econômica, produtiva e sustentável no interior do país.

SEÇÃO II - Essa seção, à princípio denominada como: “Anti-diabetic, antiglycant, antioxidant, and anticancer activities of *Crinum americanum* L. leaves lipid fraction”, será publicada em periódico internacional.

4.10 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

O perfil de ácidos graxos que integram a fração lipídica das folhas de *C. americanum* L., para as duas formas de extração utilizadas nesse trabalho (Soxhlet e Ultrassom) está representado na TABELA 11. Foram encontrados ácidos graxos saturados (palmítico) e insaturados nas duas formas de extração. Dentre esses últimos, se fizeram presentes os ácidos poli-insaturados: linoleico e α -linolênico para ambas as formas de extração e o ácido monoinsaturado oleico, para extração com Soxhlet. O rendimento das extrações foi superior para UEA (9,45% $\pm$ 0,54), quando comparada com Soxhlet (5,99% $\pm$ 0,21).

TABELA 11 – COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DAS FOLHAS DE *C. americanum* L.

Número de Carbonos	Ácidos Graxos	(%)
<i>Soxhlet*</i>		
C16:0	Ácido Palmítico	46.12
C18:2 n6c	Ácido Linoleico	21.23
C18:3 n3	Ácido α -linolênico	10.86
C18:1 n9c	Ácido Oleico	16.85
Saturados		46.12
Insaturados		48.94
<i>UAE</i>		
C16:0	Ácido Palmítico	26.66
C18:2 n6c	Ácido Linoleico	42.13
C18:3 n3	Ácido α -linolênico	31.21
Saturados	-	26.66
Insaturados	-	73.34

*4,94% da composição total foi referente ao Phytol (precursor da vitamina E e K1).

A predominância na fração lipídica para extração com Soxhlet foi dos ácidos graxos saturados, representando 52,54 % de área em concentração frente a 43,67 %

de insaturados. Além dos ácidos graxos, o álcool diterpeno hidrogenado acíclico, fitol (3,79%), também foi identificado nessa técnica de extração. Por outro lado, na extração com ultrassom, os ácidos graxos insaturados tiveram predominância de 73,29%, frente a 26,71% de saturados (TABELA 11).

Na extração por Soxhlet, as condições de temperatura, o ciclo e as interações solvente/soluto contribuem para a extração das matérias-primas, ou seja, temperaturas mais elevadas reduzem a tensão superficial e a viscosidade do solvente, que atinge facilmente os espaços matriciais que contêm os solutos de interesse facilitando sua solubilização e também aumentando o número de componentes solúveis na fase solvente (MARKOM et al., 2007). Esse fato pode justificar a extração do ácido oleico e do fitol, compostos presentes apenas nas frações lipídicas obtidas por esse método de extração e ausentes na extração por ultrassom.

Por outro lado, a técnica de ultrassom foi aplicada como comparação devido à sua alta reprodutibilidade, rapidez, eficiência, baixo custo e versatilidade nas diversas áreas de aplicação (BARRA et al., 2021). O banho ultrassônico foi utilizado para otimizar a extração de lipídeos, reduzir a perda, manter a eficiência da extração utilizando pequenas quantidades de amostra, além de reduzir o tempo de extração. Nesse método, a extração de ácidos graxos insaturados foi mais pronunciada quando comparada com o Soxhlet (TABELA 11). Além disso, o rendimento da fração lipídica obtida pela extração por ultrassom foi 57,76% maior quando comparado com o rendimento por Soxhlet. Dessa forma, a técnica foi utilizada para otimizar parâmetros com um pequeno número de etapas para que o procedimento se tornasse satisfatório para extração e identificação de substâncias nas folhas de *C. americanum L.*

Contudo, os ácidos graxos identificados em ambas as formas de extração são de grande importância farmacológica. O efeito positivo desses ácidos graxos tem sido amplamente investigado, com ênfase na atividade larvívora, atividade antimicrobiana, antifúngica (MELO et al., 2018), atividade cicatrizante (SKULASON et al., 2012) e atividade contra enterobactérias patogênicas (THORMAR; HILMARSSON, 2012).

Evidências sugerem que os ácidos graxos atuam como detergentes na estrutura anfipática da membrana celular bacteriana, aumentando a permeabilidade da célula e prejudicando processos essenciais como a geração de energia por fosforilação oxidativa (FAUSTINO PEREIRA et al., 2018). Além disso, esses

compostos podem ativar o metabolismo oxidativo, devido à estimulação celular, atuando como agentes imunomoduladores (PESSOA et al., 2015).

Os ácidos linoleico e α -linolênico, são ácidos graxos polinsaturados identificados em ambas as formas de extração. Contudo, na extração por UAE foram obtidos 43% a mais desse ácido graxo polinsaturado, quando comparada com a extração por SX (73% e 30%, para UAE e SX, respectivamente). Esses compostos são conhecidos na literatura por apresentarem ação bioativa contra bactérias, bacilos e fungos (AGORAMOORTHY et al., 2007) e por serem metabólitos potencialmente responsável pela atividade antiviral (MORE et al., 2022).

Esses ácidos graxos já foram identificados anteriormente para frações lipídicas de *C. americanum* L., com abundância de 2,35% e 12,54%, para o ácido linoleico e octadecatrienoico, respectivamente. Além desses compostos, o ácido oleico (12,26%) e palmítico (16%), também foram identificados para essa espécie vegetal (BARRA et al., 2021).

O fitol é outro composto que já foi identificado em concentrações moderadas para *C. americanum* L. (15,68%). O que corrobora com o presente trabalho. Além dessa espécie, essa substância já foi evidenciada no extrato metanólico de *Pancratium canariense* (TORRAS-CLAVERIA et al., 2010) e no extrato de éter de petróleo de *C. asiaticum* L., (REFAAT et al., 2011), que são espécies de Amaryllidaceae.

A partir dos resultados encontrados, pode-se mensurar que as frações lipídicas, obtidas em ambas as formas de extração, são compostas por importantes fontes de ácidos graxos de alta qualidade, representadas, principalmente, pelo elevado conteúdo de ácidos graxos insaturados.

Dessa forma, essas frações podem ser utilizadas em estudos sobre novas drogas que tenham a capacidade de mitigar doenças neoplásicas e até degenerativas, uma vez que algumas investigações na literatura estão voltadas para a produção de medicamentos à base de óleos e gorduras vegetais. Essa bioatividade pode estar associada ao aumento do tamanho da cadeia e do grau de saturação lipídica, responsáveis por atribuir características ao lipídio, tornando-o de interesse industrial e farmacológico (ELAGBAR et al., 2016).

4.11 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Os valores da capacidade antioxidante das frações lipídicas das folhas de *C. americanum* L., obtidos por Soxhlet e UAE, são apresentados na TABELA 12. Pode-se observar que a capacidade antioxidante por ABTS de Soxhlet ($87,74 \pm 4,45 \mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$) foi maior que a UAE ($74,69 \pm 7,25 \mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$). Esse resultado pode estar relacionado à presença do fitol, composto com alta capacidade antioxidante (SANTOS et al., 2013), observado apenas na fração lipídica da extração realizada por Soxhlet.

TABELA 12 – CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DAS FRAÇÕES LIPÍDICAS PELOS MÉTODOS DPPH E ABTS

Método de Extração	Capacidade Antioxidante	
	ABTS ($\mu\text{mol TE.}100 \text{ g}^{-1}$)	DPPH ($\mu\text{mol TE.}100 \text{ g}^{-1}$)
Soxhlet	$87,74 \pm 4,45^a$	$16,46 \pm 0,13^a$
UEA	$74,69 \pm 7,25^b$	$16,74 \pm 0,55^a$

NOTA: TE: Equivalente ao Trolox / Médias seguidas pela mesma letra, na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) para o DPPH entre os dois métodos de extração ($16,46 \pm 0,13$ e $16,74 \pm 0,55 \mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ para Soxhlet e UAE, respectivamente). Além disso, os níveis de capacidade antioxidante do DPPH, em ambos os métodos de extração, foram inferiores aos do ABTS. Esse fato pode ter ocorrido devido à inacessibilidade estérica apresentada pelo radical DPPH para moléculas grandes, como é o caso da maioria dos compostos lipídicos, o que pode reduzir a eficiência desse cromogênio na determinação da capacidade antioxidante desses materiais (CRUZ et al., 2019).

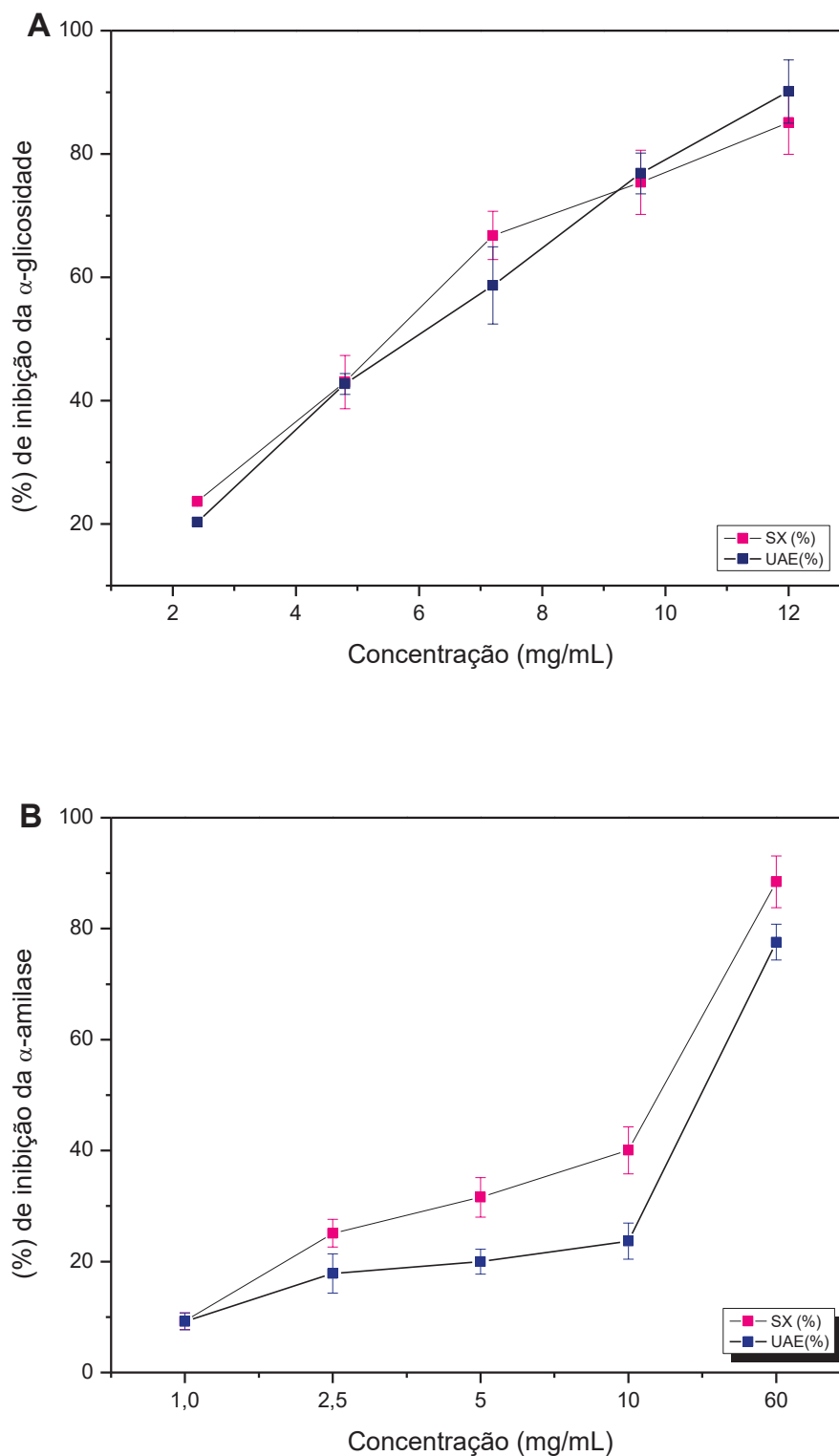
Os valores de ABTS e DPPH obtidos no presente trabalho podem ter sido prejudicados, uma vez que, o contato com o solvente em seu ponto de ebulição durante a extração em Soxhlet e a característica apolar do solvente (hexano), podem influenciar na quantidade e qualidade de compostos antioxidantes. Além disso, o curto período de tempo no UEA, combinado com um solvente apolar, também pode ter influenciado nos resultados para a capacidade antioxidante.

4.12 ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA *IN VITRO*

4.12.1 Inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase

A atividade antidiabética tipo II foi avaliada pela inibição das enzimas α -glicosidase e α -amilase e está expressa na FIGURA 17. Nas maiores concentrações testadas, para ambos os métodos de extração, o efeito inibitório da α -glicosidase foi de aproximadamente 89,05% ($p > 0,05$) e a concentração inibitória média (IC 50) foi de 5,86 e 6,17 mg mL⁻¹ para SX e UAE, respectivamente. Por outro lado, os compostos obtidos por SX (IC 50 10,97 mg mL⁻¹) potencializaram o efeito inibitório da α -amilase ($p < 0,05$) quando comparados ao UAE (IC 50 16,22 mg mL⁻¹), principalmente nas maiores concentrações, com efeito inibitório de 88,43% para SX e 77,58% para UAE.

Extratos de raízes de algumas espécies de *Crinum*, obtidos por UAE, utilizando metanol ou água como solventes de extração, apresentaram uma porcentagem de inibição de α -amilase e α -glicosidase, respectivamente, de aproximadamente: 43,51 e 47,66% para *C. viviparum*, 38,25 e 51,20% para *C. solapurense*, 19,10 e 65,55% para *C. latifolium* e 35,21 e 14,22% para *C. jagus* (LEKHAK et al., 2021). Esses valores foram inferiores aos encontrados no presente estudo para extrações realizadas com SX e, em alguns casos, para extrações realizadas com UAE.

FIGURA 17 – ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DAS ENZIMAS α -AMILASE E α -GLICOSIDASE

NOTA: Atividade de inibição das enzimas α -glicosidase e α -amilase por frações lipídicas obtidas por Soxhlet (SX) e UAE. As enzimas foram submetidas a tratamentos com concentrações crescentes dos compostos: 2 a 12 mg mL⁻¹ para inibição de α -glicosidase (A) e 1 a 60 mg mL⁻¹ para inibição de α -amilase (B). Os dados representam a média $\pm$ SD de pelo menos três experimentos independentes. As curvas de inibição foram ajustadas usando o software OriginPro 8.5.

Esse perfil pronunciado na inibição da α -glicosidase e da α -amilase pode justificar o uso tradicional de algumas espécies da Amaryllidaceae, uma vez que extratos de algumas espécies de *Crinum* são usados na medicina popular africana para o tratamento de diabetes mellitus. Essa prática popular já foi confirmada cientificamente, porquanto esse gênero foi citado na literatura por apresentar atividade antidiabética e por ocasionar uma diminuição significativa na glicemia de jejum (MVONGO et al., 2016). Alguns autores relacionam a atividade antidiabética dessas plantas com a presença de fitoquímicos que podem exibir atividades antioxidantes e de eliminação de radicais livres. Entre esses compostos encontram-se os flavonoides, taninos, saponinas, terpenos, compostos fenólicos e glicoproteínas (ELAGBAR et al., 2016; PATEL et al., 2020)

Além desses compostos, os ácidos graxos já foram citados na literatura por retardarem a absorção de glicose pela inibição de enzimas hidrolisadoras de carboidratos, como α -glicosidase e α -amilase (TENG; CHEN, 2017). Em outro trabalho, foi relatado que a ingestão de alimentos com alto teor de ácidos graxos insaturados contribuíram para a diminuição de risco da nefropatia diabética (LIN et al., 2022).

Portanto, a inibição pronunciada dessas enzimas, apresentada no presente trabalho, para ambos os métodos de extração, pode estar relacionada ao perfil de ácidos graxos insaturados (TABELA 11) presentes na composição lipídica das folhas de *C. americanum* L. Além disso, como já mencionado, plantas da Amaryllidaceae são conhecidas na literatura por apresentarem atividade antidiabética e por inibirem enzimas como a α -amilase e a α -glicosidase. Até o momento, esse é o primeiro trabalho que investiga a atividade antidiabética frente ao perfil lipídico das folhas de *C. americanum* L.

4.13 ATIVIDADE ANTIGLICANTE

A atividade antiglicante das frações lipídicas de *C. americanum* L. está representada na TABELA 13. Na via oxidativa (VO), apenas as extrações por UEA apresentaram atividade superior a 50% de inibição. Por outro lado, na via não oxidativa (VNO), todas as amostras apresentaram atividade antiglicante superior a 50% e os valores obtidos não diferiram significativamente do padrão ($p > 0,05$).

A glicação é uma reação não enzimática irreversível que forma os Produtos Finais da Glicação Avançada (AGEs) quando ocorre desequilíbrio do metabolismo da glicose em humanos. O desequilíbrio do metabolismo da glicose pode causar a formação excessiva de metilglioxal, um composto orgânico altamente citotóxico que pode reagir com várias biomoléculas para formar o precursor de produtos finais de glicação avançada (AGEs). Esses AGEs são altamente reativos e podem modificar as estruturas primárias e secundárias das proteínas alterando sua função nos animais (RAMOS et al., 2019). Assim, é possível observar que os AGEs são uma interface entre estresse oxidativo e inflamação, que são pilares para o desenvolvimento de várias doenças, especialmente em órgãos que expressam os receptores para AGEs, como cérebro, coração e rins (CHAUDHURI et al., 2018)

TABELA 13 - ATIVIDADE ANTIGLICANTE DAS FRAÇÕES LIPÍDICAS DAS FOLHAS DE *C. americanum* L.

Método de Extração/Amostra	% de Inibição	
	VO (Glioxal)	VNO (Frutose)
Soxhlet	39,09 ± 3,82 ^c	87,45 ± 8,41 ^a
UAE	50,53 ± 4,03 ^b	92,88 ± 4,46 ^a
Querc	60,82 ± 5,24 ^a	89,87 ± 5,04 ^a

NOTA: Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=8), concentração do padrão: Quercetina (Querc): 100 µg mL⁻¹. VO= atividade antiglicante por via oxidativa; VNO= atividade antiglicante por via não-oxidativa. Os valores seguidos da mesma letra, na mesma coluna, são estatisticamente iguais (p<0,05). Fração lipídica diluída em DMSO (1mg.mL⁻¹).

Alguns trabalhos sugerem que compostos como a epicatequina, resveratrol, taninos e muitos outros polifenóis são responsáveis pela inibição de AGEs (HOU et al., 2018; SHEN; XU; SHENG, 2017). Além disso, uma mistura de ésteres de ácido ferúlico e fitoesteróis (esteróis e álcoois triterpenos) recentemente ganharam a atenção como possíveis ingredientes naturais de antiglicação (SOBHY et al., 2020). O ácido ferúlico e alguns fitoesteróis foram encontrados no extrato otimizado de *C. americanum* L. (TABELA 10), demonstrando que a atividade antiglicante pode estar relacionada com a presença desses compostos.

Contudo, a atividade antiglicante para VO apresentada nesse trabalho, para ambas as formas de extração, foi superior (30,09 e 50,53%, Soxhlet e UAE, respectivamente) a apresentada para extratos metanólicos de frutos de *Eugenia punicifolia* (28,5%). Essas plantas possuem compostos naturais, como os elagitaninos, que têm sido utilizados para o tratamento de AGEs (RAMOS et al., 2019).

Esse fato pode sugerir que os ácidos graxos das frações lipídicas de *C. americanum* L., possuem potencial para serem utilizadas como inibidores de AGEs.

As frações lipídicas obtidas no presente trabalho são compostas principalmente por ácidos graxos insaturados. Evidências científicas indicam que esses compostos são capazes não só de auxiliar no tratamento, mas principalmente na prevenção de doenças cardiovasculares, asma, alergias, constipação (LIN et al., 2022), além de desempenharem papel anti-inflamatório, antioxidante e regular funções imunológicas (CRUZ et al., 2020).

O papel antioxidante desempenhado pelos ácidos graxos insaturados pode estar relacionado com a atividade antiglicante apresentada pelas frações lipídicas das folhas de *C. americanum* L. Sabe-se que no organismo humano, o sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres e pelas espécies reativas não radicais (HONORIO-FRANÇA et al., 2013). Dessa maneira, compostos antioxidantes têm a capacidade de atuar como sequestradores de radicais livres e reduzir a glicação não enzimática (FRANCO et al., 2020).

4.14 CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

O valor de IG 50 corresponde à concentração necessária para reduzir a Viabilidade celular para 50% e o ensaio de viabilidade demonstrou que, para ambas as linhagens, os compostos extraídos por SX foram mais tóxicos que os extraídos por UAE (TABELA 14).

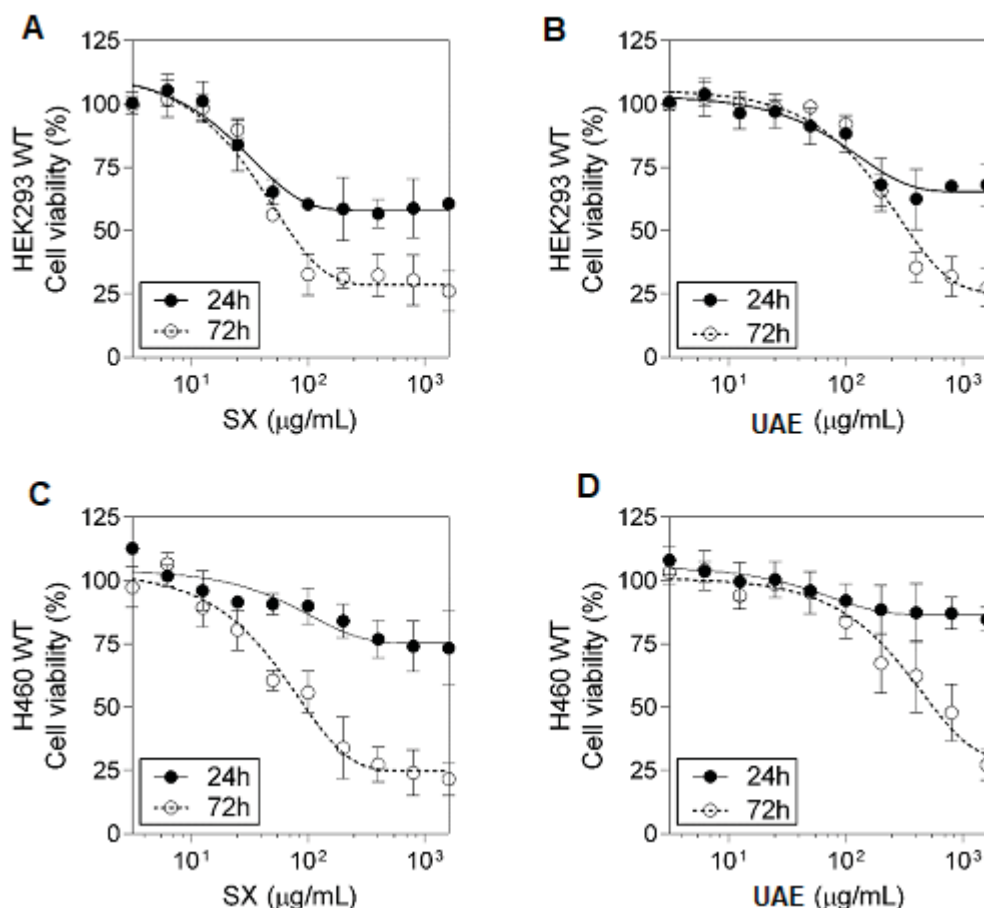
TABELA 14 - IG 50 DAS FRAÇÕES LIPÍDICAS

Linhagem Celular	Método de extração	IG ₅₀ (µg mL ⁻¹)	
		24h	72h
HEK293 WT	SX	>1600	35,02
	UAE	>1600	199,4
H460 WT	SX	>1600	57,66
	UAE	>1600	313,5

Todos os compostos exibiram efeitos citotóxicos dependentes do tempo e dependentes da concentração. Positivamente, a fração lipídica obtida por UAE não apresentou efeitos citotóxicos mesmo na concentração de 100 µg mL⁻¹ em ambas as

linhagens, mostrando-se seguro até esta concentração de tratamento e sendo a fração mais promissora contra linhagens celulares HEK293 devido a sua menor citotoxicidade. Já a fração lipídica obtida por SX destaca-se como a fração mais promissora contra linhagens de células tumorais H460 dada sua maior atividade antitumoral (FIGURA 18).

FIGURA 18 - CURVAS IG50 DE VIABILIDADE



NOTA: Perfil citotóxico dos compostos. Ensaio de viabilidade celular realizado pelo método MTT. Células HEK293 tipo selvagem (A e B) e H460 tipo selvagem (C e D) foram submetidas a tratamentos de médio e longo prazo (24 e 72 horas, respectivamente) com concentrações crescentes dos compostos (3,125 - 1600 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os dados representam a média $\pm$ SD de pelo menos três experimentos independentes. As curvas de viabilidade foram ajustadas usando o software GraphPad Prism 6

Uma amostra é considerada citotóxica quando o percentual de viabilidade das células expostas é $< 70\%$ (MOURA et al., 2021). As frações lipídicas apresentaram viabilidade inferior a 70% para a célula tumoral H460 WT, após 72 h de exposição, nas concentrações de 12,5 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para SX e UAE, respectivamente. Os valores obtidos para as extrações por Soxhlet foram inferiores aos apresentados pelo extrato etanólico das folhas de *C. americanum* L. (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) sobre a viabilidade de células

de neuroblastoma humano (SH-5YSY) (GOMES et al., 2022). Outro estudo avaliou a citotoxicidade de extratos metanólicos obtidos de várias espécies de Amaryllidaceae sobre SH-5YSY. As espécies avaliadas de *Crinum* (*C. variable* e *C. moorei*) apresentaram baixa toxicidade celular ($IC_{50} > 60 \mu g mL^{-1}$) (OMORUYI et al., 2021).

Em ambas as formas de extração, foram encontrados os mesmos ácidos graxos insaturados e saturados. No entanto, o ácido graxo oleico e fitol foram obtidos apenas na extração por SX (TABELA 11). Esses compostos, principalmente o fitol, que possui alta atividade antioxidante (SANTOS et al., 2013), podem ter influenciado na maior atividade antitumoral das frações lipídicas obtidas por SX. Além disso, em um estudo de docking molecular para determinar inibidores da proteína Mcl-1, foi demonstrado que ácidos graxos como o ácido oleico e palmítico têm boa afinidade para inibir essa proteína, confirmando o potencial anticancerígeno dos ácidos graxos (ALLAH et al., 2023).

A atividade citotóxica do gênero *Crinum* está geralmente associada aos alcaloides isoquinolínicos presentes em sua composição (ARAÚJO et al., 2022). Este é o primeiro trabalho que relaciona a atividade citotóxica desta planta com sua composição lipídica. A partir dos resultados encontrados, pode-se mensurar que as frações lipídicas, obtidas em ambas as formas de extração, são compostas por importantes fontes de ácidos graxos de alta qualidade, representadas principalmente pelo alto teor de ácidos graxos insaturados. Assim, essas frações podem ser utilizadas no desenvolvimento de novos medicamentos que serão utilizados para o tratamento de doenças neoplásicas e até mesmo degenerativas (ELAGBAR et al., 2016).

4.15 CONCLUSÃO

Os resultados dos perfis lipídicos das folhas de *C. americanum* L., obtidos por SX e UAE, foram investigados neste trabalho aplicando a técnica de CG-FID. A sensibilidade dessa técnica possibilitou detectar um considerável número de ácidos graxos em ambas as formas de extração. A composição química das frações lipídicas obtidas por UAE foi constituída basicamente pelos ácidos graxos poli-insaturados: linoleico e octadecatrienoico. O ácido palmítico, saturado, foi encontrado em ambas as formas de extração e o ácido monoinsaturado oleico e o fitol para extração com SX.

A capacidade antioxidante foi significativa, mas pode ter sido afetada pelo solvente apolar utilizado no processo de extração. As frações lipídicas apresentaram potencial antiglicante, antidiabético, antioxidante e citotóxico contra células cancerígenas em ambos os métodos de extração.

Assim, foi possível observar que os dois métodos de extração utilizados neste trabalho foram significativos para a extração de compostos bioativos e para a preservação das propriedades funcionais. No entanto, em termos tecnológicos, a extração por UAE pode ser mais eficiente e importante em relação à extração por SX, devido à redução de tempo, quantidade de solvente utilizados no processo e por apresentar maior teor de ácidos graxos insaturados.

SEÇÃO III – Essa seção, à princípio denominada: “*The In Vitro Biological Potential of C. americanum L. Leaves: Impact of simulated gastrointestinal digestion on Phenolics and Antioxidant Activity*”, será publicada em periódico internacional.

4.16 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

O extrato hidrometanólico das folhas de *C. americanum* L. foi analisado por HPLC-DAD. Apenas o ácido clorogênico, pertencente a classe dos ácidos fenólicos, foi identificado. Sua concentração corresponde a 2,50% do teor total de TPC (23,38 mg de GAE g⁻¹). Nesse estudo, não foram encontrados uma quantidade significativa de quercetina, epicatequina e catequina (TABELA 15).

A quantidade de compostos fenólicos detectados em extratos vegetais varia significativamente e pode ser influenciada pelas condições de extração (HOSSAIN et al., 2012). Além disso, diferentes condições ambientais, que influenciam no desenvolvimento da planta de forma direta, podem modular os níveis de compostos bioativos. Até mesmo a incidência de luz, pode controlar o metabolismo primário através da produção de carboidratos, que está diretamente relacionado ao processo fotossintético e ao metabolismo secundário: compostos fenólicos, óleos essenciais, alcaloides e outros compostos (KLIMEK-SZCZYKUTOWICZ et al., 2022).

TABELA 15 – COMPOSTO FENÓLICO IDENTIFICADO NO EXTRATO HIDROMETANÓLICO DAS FOLHAS DE *C. americanum* L.

Compostos Fenólicos	Flavanóis		Ácidos Fenólicos	Flavonóis	TPC mg de GAE g ⁻¹
	Epicatequina	Catequina	Ácido Clorogênico	Quercetina	
Concentração (mg g ⁻¹)	ND	ND	0,58	ND	23,38

Benedec et al. (2018) investigaram quatro espécies de Amaryllidaceae e constataram que um dos principais compostos fenólicos identificados foi o ácido clorogênico (2,98 ± 0,013 mg g⁻¹) seguido do ácido p-cumárico (0,073 ± 0,01 mg g⁻¹). O ácido clorogênico também foi identificado em extratos das folhas de *C. asiaticum* (0,38 ± 0,01 mg g⁻¹) e *C. viviparum* (3,95 ± 0,04 mg g⁻¹) (GHANE et al., 2018) e no extrato das raízes de várias espécies de *Crinum* L., com destaque para o *C. pratense* (2,97 ± 0,01 mg g⁻¹) e *C. solapureense* (0,27 ± 0,02 mg g⁻¹) (LEKHAK et al., 2021).

O ácido clorogênico, tem sido utilizado por suas propriedades terapêuticas, incluindo antioxidante, antibacteriano, hepato e cardioprotetor, hipoglicemiante, antiobesidade e anti-inflamatório (NAVEED et al., 2018). Metwally et al. (2020) examinaram a atividade neuroprotetora do ácido clorogênico em camundongos contra a toxicidade do arsenito e concluíram que esse ácido fenólico confere neuroproteção robusta, revertendo a inflamação, o estresse oxidativo e a apoptose.

4.17 DIGESTIBILIDADE *IN VITRO*

A evolução da capacidade antioxidante (DPPH, FRAP e ABTS), TPC e TFC durante as etapas de digestão gástrica e intestinal *in vitro* foi investigada para estipular a estabilidade dos compostos bioativos do EHM e das folhas secas de *C. americanum* L. ao transitarem pelo trato gastrointestinal humano (FIGURA 19). A verificação dessa análise é importante, devido ao uso da planta em forma de chá na medicina popular (SILVA et al., 2020).

Pode-se observar que o TFC corresponde a 39,58% do teor de TPC obtido no EHM sem digestão. Além disso, o teor de TPC e TFC do EHM sem digestão foi maior ($p < 0,05$) quando comparado com as fases de digestão gástrica (41,99% e 35,57%, para TPC e TFC, respectivamente) e intestinal (41,61% e 81,53%, para TPC e TFC, respectivamente). Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o TPC das fases de digestão gástrica e intestinal ($1356,52 \pm 41,29$ mg GAE $100g^{-1}$ e $1365,25 \pm 22,75$ mg GAE $100g^{-1}$, respectivamente), por outro lado, o TFC foi maior na fase de digestão gástrica ($596,21 \pm 18,85$ mg CAT $100g^{-1}$), quando comparado com a digestão intestinal ($431,97 \pm 17,59$ mg CAT $100g^{-1}$) (FIGURA 19 A).

O TPC das folhas secas após processo de digestão foi inferior (49,03% e 68,19%, para fase gástrica e intestinal, respectivamente) ao apresentado para o EHM digerido. O mesmo foi observado para o TFC das folhas secas (FIGURA 19 A). Esses resultados demonstram que os compostos fenólicos, durante o processo de digestibilidade *in vitro*, são mais estáveis para o EHM, quando comparados com as folhas secas. Nesse sentido, observa-se que a forma de consumo pode influenciar na estabilidade e absorção de compostos bioativos.

O menor TPC e TFC, após o processo de digestão, pode ser atribuído a transformação de alguns compostos fenólicos em diferentes formas estruturais com

menor reatividade. Os altos valores de pH na fase intestinal (aproximadamente 8) podem induzir a desprotonação dos grupos hidroxila dos compostos fenólicos. Além disso, compostos fenólicos também podem interagir com outros constituintes da amostra tornando-os, indisponíveis para reagir com radicais livres (KAMAL et al., 2023).

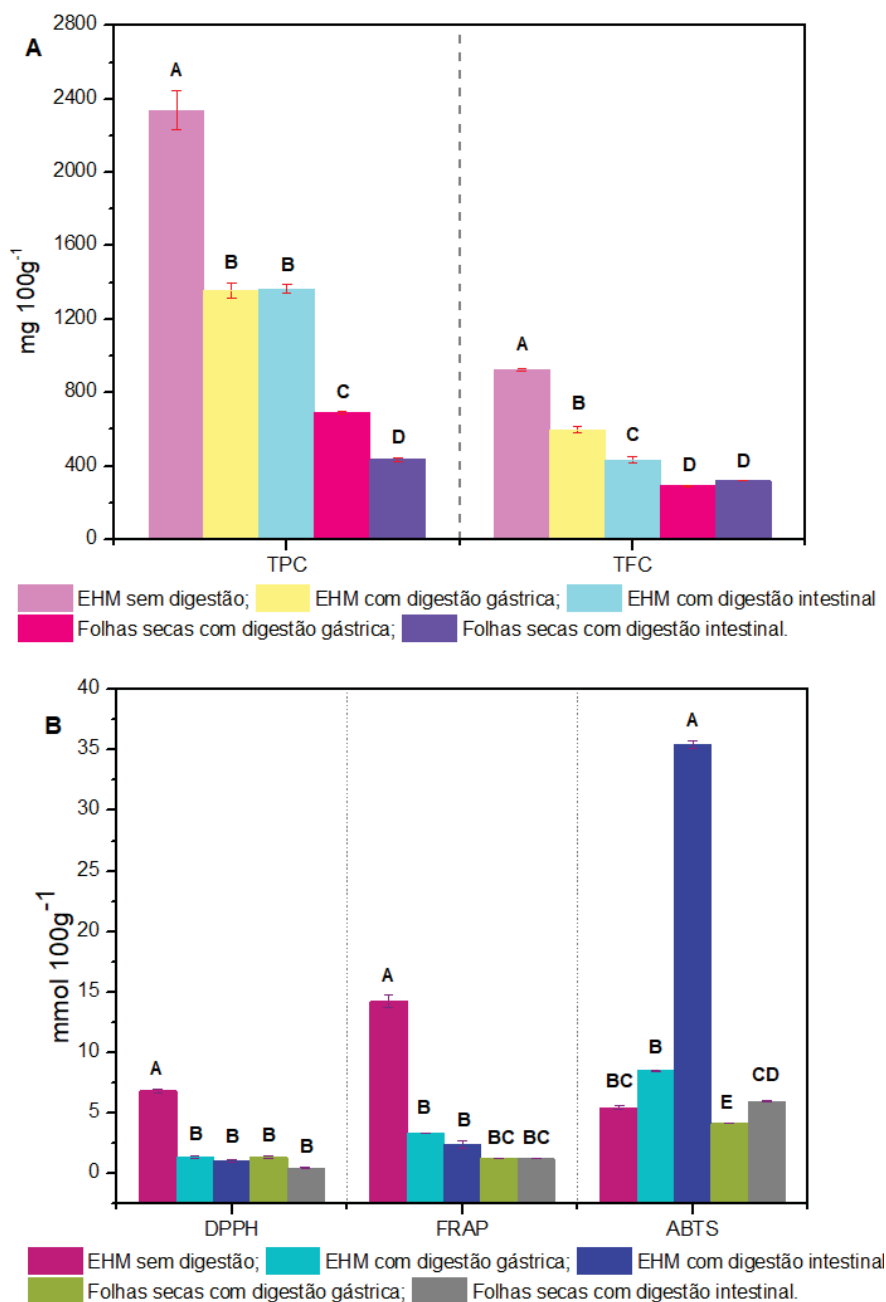
A Correlação de Pearson foi realizada para verificar se a capacidade antioxidante observada no EHM digerido e não digerido está relacionada com o teor de compostos fenólicos totais. O TPC e TFC apresentaram correlação positiva e significativa ($r = 0,9300$; $p < 0,01$) com DPPH ($r = 0,9688$ e $0,9520$ respectivamente) e FRAP ($r = 0,9694$ e $0,9539$, respectivamente). Esses resultados demonstram que a maioria dos antioxidantes apresentaram comportamento semelhante aos compostos fenólicos e corroboram com o fato de que o potencial antioxidante é diretamente proporcional ao teor de compostos fenólicos (WOJEICCHOWSKI et al., 2021).

Por outro lado, o ABTS apresentou Correlação de Pearson não significativa ($p > 0,05$) e o perfil da capacidade antioxidante foi diferente do observado pelo DPPH e FRAP, aumentando na fase intestinal em 6,54 vezes (FIGURA 19 B). O mesmo foi observado no trabalho de Djaoudene et al. (2021). Os autores relataram que apesar da capacidade antioxidante obtida pelos métodos de DPPH e FRAP de extratos de tâmaras diminuir após o processo de digestão, pelo método ABTS aumentou significativamente na fase de digestão intestinal.

A partir desses resultados, pode-se mensurar que o EHM não digerido apresenta maior capacidade antioxidante para reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} , do que para sequestrar ou capturar radicais livres e o inverso é observado após o processo de digestão, principalmente para a eliminação de radicais ABTS (FIGURA 19 B). Esses dados indicam que os componentes antioxidantes presentes em cada fase do EHM neutralizaram de maneira diferente os radicais livres presentes em cada protocolo analítico.

A capacidade antioxidante das folhas secas após o processo de digestão não apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) com o EHM sem digestão para o ABTS e nas fases gástrica e intestinal para o DPPH e o FRAP (FIGURA 19 B).

FIGURA 19 – CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH, ABTS E FRAP), TPC E TFC. ANTES E APÓS A DIGESTÃO *In vitro*



Nota: TPC é expresso em mg de ácido gálico 100g⁻¹ de amostra; TFC é expresso em mg de quercetina 100g⁻¹ de amostra (A); DPPH e ABTS são expressos em mmol de Trolox 100g⁻¹ de amostra; FRAP é expresso em mmol de FE (III) 100g⁻¹ de amostra (Figura B). Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão (n= 3) e são representativos de três experimentos independentes com resultados semelhantes. Letras diferentes, em cada método utilizado, diferem estatisticamente entre si (p< 0,05), conforme determinado pela ANOVA

O perfil fenólico e capacidade antioxidante de extratos de tâmara foi avaliado antes e depois do processo de digestão *in vitro* no trabalho de Djaoudene et al., (2021). Entre os ácidos fenólicos quantificados nos extratos, encontra-se o ácido clorogênico. A concentração desse composto diminuiu ao longo do processo de digestão, variando de 0,30 mg 100g⁻¹ na amostra sem digestão, para 0,17 mg 100g⁻¹ para a amostra digerida na fase intestinal. No presente trabalho, o único composto identificado e quantificado no EHM foi o ácido clorogênico. O baixo teor de TPC e capacidade antioxidante do EHM após o processo de digestão pode ter influência da biodisponibilidade desse composto. Dessa forma, as variações observadas na capacidade antioxidante durante a *digestão in vitro* podem estar relacionadas a mudanças na estrutura dos compostos presentes no EHM, bioacessibilidade e solubilidade, decorrentes de diferentes condições de pH e interações enzimáticas com outros constituintes, como minerais, fibras ou proteínas (SILVA et al., 2021).

4.18 ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA *IN VITRO*

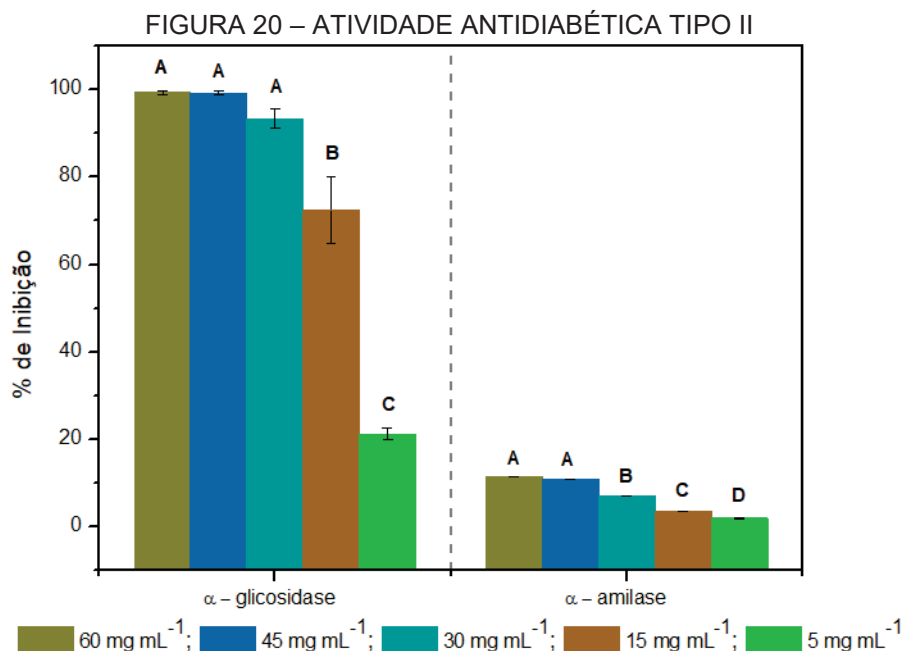
4.18.1 Inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase

A atividade antidiabética tipo II do EHM está expressa na FIGURA 20. As maiores inibições ($p < 0,05$) foram observadas para a enzima α -glicosidase (99,35%), até mesmo para a menor concentração testada (5 mg mL⁻¹; 21,16%), quando comparado com a maior concentração da enzima α -amilase (60 mg mL⁻¹; 11,35%).

O EHM inibiu quase 100% a α -glicosidase na maior concentração testada (60 mg mL⁻¹; 99,35%). Esse valor manteve-se sem diferenças significativas até a concentração de 15 mg mL⁻¹. Nessa concentração, a inibição reduziu para 72,45% (aproximadamente 27,08%), chegando a 21,16% quando a concentração do EHM foi ajustada para 5 mg mL⁻¹ (FIGURA 20). Uma porcentagem de inibição considerável da α -glicosidase (94,04%) também foi observada para o extrato metanólico das folhas de *C. jagus* no trabalho de Ghane et al. (2018).

A maior porcentagem de inibição obtida para a enzima α -amilase foi de 11,35%. Apesar desse valor ser significativamente inferior ao apresentado para a inibição da α -glicosidase, ele foi consideravelmente maior do que a porcentagem de inibição (menor que 10%) apresentada pelos extratos metanólicos das folhas de

Crinum woodrowii e *C. viviparum*, *C. solapurense*, *C. pratense*, *C. x powellii*, *C. malabaricum*, *C. braquinema* e *C. latifolium* no trabalho de Ghane et al. (2018)



Ao comparar os resultados de inibição do EHM com as frações lipídicas das folhas de *C. americanum* L, obtidas no presente trabalho, foi possível observar que os resultados para a inibição da α -glicosidase, pelo EHM, foram semelhantes aos obtidos pela fração lipídica (85,10 e 89,05, para SX e UAE, respectivamente) e inferiores aos obtidos para a α -amilase (88,43% e 77,58%, para SX e UAE, respectivamente) (FIGURA 17). Dessa forma, pode-se observar que os compostos bioativos extraídos pelo uso de solventes apolares (hexano para obtenção das frações lipídicas) e polares (metanol), podem influenciar na resposta antidiabética das folhas de *C. americanum* L.

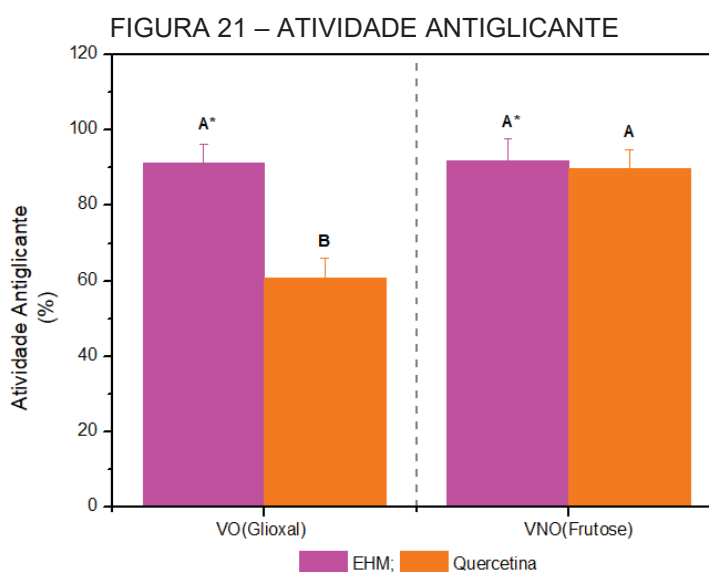
A atividade antidiabética apresentada pelo EHM pode estar relacionada ao ácido clorogênico presente em sua composição. Esse composto estimula a sensibilidade à insulina e a captação de glicose no músculo esquelético, ativando a proteína quinase, que por sua vez, é ativada por adenosina monofosfato (AMPK) (ILMIAWATI et al., 2020).

Além disso, pequenas concentrações de ácido clorogênico são suficientes para inibir 50% a atividade das enzimas α -amilase e α -glicosidase (IC 50 de 21,93 μ g mL⁻¹ e 27,14 μ g mL⁻¹, respectivamente) (Singh et al.; 2021), sugerindo que baixas

dosagens desse composto são suficientes para reduzir a hiperglicemia pós-prandial, sem causar efeitos tóxicos ao organismo (KALITA et al., 2018).

4.19 ATIVIDADE ANTIGLICANTE

A FIGURA 21 mostra a atividade antiglicante do EHM, pela VO e VNO, em comparação com a quercetina, substância antiglicante utilizada como referência. Em ambas as vias antiglicantes avaliadas ($p > 0,05$), o EHM apresentou uma atividade superior a 90%. Esses valores foram superiores aos apresentados pelo extrato de *Clarisia racemosa* (81,8%), ácido gálico (89,63%), ácido tânico (83,01%) e rutina (68,9%) (NERYS et al., 2022). No entanto, a atividade antiglicante do EHM foi superior a apresentada pela quercetina (60,82%) apenas para a VO.



Nota: VO= atividade antiglicante por via oxidativa; VNO= atividade antiglicante por via não-oxidativa. Os valores seguidos da mesma letra, na mesma via antiglicante, são estatisticamente iguais ($p < 0,05$). O asterisco indica que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre VO e VNO. EHM diluído em DMSO (1 mg mL^{-1}).

Os mecanismos de glicação ainda não são bem compreendidos; porém, sabe-se que essa reação se baseia na adição de açúcares redutores e/ou seus produtos reativos em grupos primários ou secundários de forma não enzimática. Esse processo ocorre devido à condensação entre o grupo carbonila do açúcar redutor e um grupo amino primário (presente nas proteínas), promovendo a formação de uma base de Schiff. Essa base sofre rearranjo para a formação de produtos Amadori (produtos

iniciais da glicação). Estes podem sofrer auto-oxidação e gerar diferentes radicais livres que, quando formados, podem contribuir para a formação de produtos de glicação avançada que, por sua vez, podem promover alterações nas propriedades químicas e funcionais das proteínas (DIL; RANJKESH; GOODARZI, 2019).

Evidências sugerem que o mecanismo de ação antiglicante de algumas plantas da família Amaryllidaceae está relacionado a inibição da atividade das aldoses redutases (AR) e a formação de AGE's, o que pode prevenir complicações de longo prazo induzidas por hiperglicemia crônica no diabetes (DIL; RANJKESH; GOODARZI, 2019).

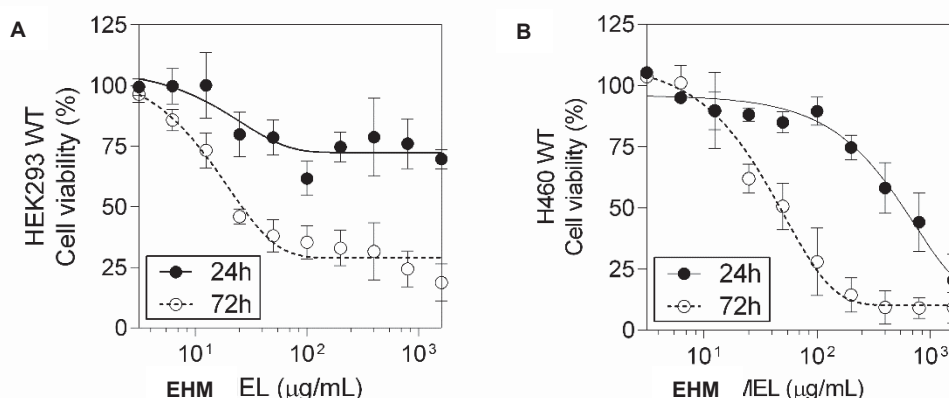
Esse efeito pode estar relacionado aos compostos fenólicos presentes na composição dessas plantas. A quercitrina, composto encontrado no presente trabalho (TABELA 10) e isolado do extrato das folhas de *Allium victorialis* (Amaryllidaceae), no trabalho de Kim et al. (2013), exibiu efeitos inibitórios pronunciados sobre a atividade de AR (valor de IC₅₀ de 0,17 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e formação de AGE's (valor de IC₅₀ de 4,20 $\mu\text{mol L}^{-1}$), interrompendo a ligação do receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) em células que superexpressam RAGE. Além disso, o ácido ferúlico, outro composto encontrado no presente trabalho (TABELA 10), reduziu significativamente a expressão e a secreção do fator de crescimento transformador beta tipo 1 (TGF- β 1), induzida por alta glicose em células mesangiais renais de camundongos. Esse resultado é promissor, uma vez que o TGF- β 1 desempenha um papel importante no desenvolvimento da nefropatia diabética (KIM et al., 2013).

O ácido clorogênico, identificado e quantificado no EHM, pode estar relacionado com a atividade antiglicante observada no presente trabalho. Seu mecanismo de ação pode estar associado ao expresso no trabalho de Kim et al. (2013), explicado no parágrafo anterior, devido ao efeito antioxidante desempenhado por esse composto (METWALLY et al., 2020; NAVEED et al., 2018; SINGH et al., 2021), uma vez que, os antioxidantes podem inibir a produção de radical superóxido, provenientes da oxidação ou auto-oxidação da glicose e, conseqüentemente, impedirem a formação de AGE's (SOBHY et al., 2020).

4.20 CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

O ensaio de viabilidade demonstrou que o EHM exibiu efeitos citotóxicos dependentes do tempo e da concentração para ambas as linhagens celulares testadas (FIGURA 22). Em cada tratamento (24 e 72 h), a resposta do EHM foi diferente. No tratamento de médio prazo (24 h) o EHM apresentou baixa toxicidade para as células normais HEK293 ($IG_{50} > 1600 \mu\text{g mL}^{-1}$) e toxicidade acentuada para as células tumorais H460 ($IG_{50} = 506,4 \mu\text{g mL}^{-1}$), demonstrando que em tempos relativamente curtos de exposição, o EHM pode ser uma alternativa promissora contra linhagens tumorais, sem apresentar toxicidade à linhagens celulares normais. Já no tempo de exposição de 72 h, o EHM apresentou toxicidade para ambas as linhagens celulares testadas, sendo mais tóxico para a linhagem celular normal ($IG_{50} = 13,72 \mu\text{g mL}^{-1}$), quando comparado com a linhagem tumoral ($35,72 \mu\text{g mL}^{-1}$).

FIGURA 22 - ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR REALIZADO PELO MÉTODO MTT



Células HEK293 wild-type (A) e H460 wild-type (B) foram submetidas a tratamentos de médio e longo prazo (24 e 72 horas, respectivamente) com concentrações crescentes dos compostos (3,125 - 1600 $\mu\text{g/mL}$). Os dados representam a média $\pm$ SD de, pelo menos, três experimentos independentes. As curvas de viabilidade foram ajustadas usando o software GraphPad Prism 6

O efeito citotóxico apresentado pelo EHM pode ser relacionado ao ácido clorogênico presente em sua composição, uma vez que esse composto pode exercer atividade anticancerígena inibindo o ciclo celular, desencadeando a apoptose e suprimindo a proliferação de células cancerígenas (GUPTA et al., 2022).

O câncer de pulmão é um câncer altamente invasivo, de metástase rápida e prevalente em homens e mulheres. No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2022), as maiores taxas de incidência de câncer de pulmão em 2023,

será no sul do País. O estado de SC será destaque em casos (19,84 casos por 100 mil habitantes), seguido do RS (18,55 casos por 100 mil habitantes) e PR (12,80 casos por 100 mil habitantes). Além disso, o câncer de pulmão será o quinto tumor maligno (4,6%) mais incidente no Brasil, perdendo apenas para o câncer de pele não melanoma (31,3%), câncer de mama feminina (10,5%), próstata (10,2%) e cólon e reto (6,5%) (INCA, 2022).

Essas estimativas demonstram que compostos naturais, com propriedades citotóxicas contra células tumorais e baixas toxicidades para células normais, como os apresentados pelo EHM, são promissores para o desenvolvimento de medicamentos que apresentem menores efeitos colaterais, quando comparados com os tratamentos atuais.

Ao comparar os resultados do EHM com os da fração lipídica das folhas de *C. americanum* L., expressos na SEÇÃO II deste capítulo, observa-se que o EHM foi mais tóxico que a fração lipídica obtida por SX, seguido da fração menos tóxica obtida por UEA. Dessa forma, a fração lipídica obtida por UEA se mostra a mais promissora contra linhagens celulares normais devido a sua menor citotoxicidade, enquanto o EHM se destaca como o composto mais promissor contra linhagens celulares tumorais devido a sua maior atividade antitumoral.

Esses resultados corroboram com o fato de que a resposta funcional e medicinal da mesma parte de uma espécie vegetal, pode ser moldada de acordo com o objetivo de aplicação (GRANATO et al., 2022). As folhas de *C. americanum* L. apresentaram toxicidade diferente de acordo com os compostos que foram obtidos, utilizando solventes polares ou apolares.

4.21 CONCLUSÃO

A composição fenólica do extrato hidrometanólico das folhas de *C. americanum* L. foi avaliada por HPLC-DAD e o ácido clorogênico foi identificado e quantificado por essa técnica. A identificação e quantificação desse composto é inédita para essa espécie vegetal. As atividades biológicas apresentadas por esse extrato podem, em sua maioria, ser atribuídas a esse composto.

A digestibilidade *in vitro* foi investigada para estipular a estabilidade dos compostos bioativos do EHM e das folhas secas de *C. americanum* L. ao transitarem pelo trato gastrointestinal humano. Apesar das amostras apresentarem redução de TPC, TFC e capacidade antioxidante após a digestão, atividades antioxidantes significativas ainda foram observadas nas amostras digeridas, demonstrando que o EHM e as folhas secas de *C. americanum* L. podem ser consideradas uma fonte potencial de compostos naturais devido a sua biodisponibilidade.

O EHM apresentou uma considerável atividade antidiabética *in vitro*, inibindo 99,35% a atividade da enzima α -glicosidase e 11,35% a atividade da α -amilase, além de apresentar atividade antiglicante superior a 90% para as vias oxidativas e não-oxidativa. Somado a isso, o EHM se mostrou uma alternativa promissora contra linhagens tumorais (H460), sem apresentar toxicidade a linhagens celulares normais (HEK293).

Esses resultados são promissores, uma vez que podem contribuir para o consumo e valorização dessa espécie na medicina popular e para o desenvolvimento de nutracêuticos ou novos fármacos para a produção de medicamentos.

CAPÍTULO V – CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 CONCLUSÃO DA TESE

O estudo do potencial biológico de compostos químicos presentes em espécies vegetais, para aplicação industrial, necessita de investigações sistemáticas a respeito das características dessas moléculas, formas de extração, toxicidade, mecanismo de ação e interação com matrizes alimentares, medicinais e farmacêuticas.

Até o momento, o *C. americanum* L. apresentou resultados promissores. Essa planta possui uma composição nutricional e mineral de grande valor para, possivelmente, ser utilizada no desenvolvimento de novos ingredientes funcionais ou para a produção de alimentos nutricionalmente enriquecidos. Os extratos de todas as partes dessa planta, obtidos por solventes polares ou apolares, são constituídos por uma variedade de compostos com valor biológico interessante. Essa expressividade biológica foi demonstrada em ensaios de digestibilidade *in vitro*, capacidade antioxidante, atividade antidiabética, antiglicante e citotóxica.

Outro fator interessante é a alta viabilidade apresentada para células normais, como as MN do sangue periférico humano e a linhagem celular de HEK293 (fibroblasto), e a alta atividade antitumoral apresentada para células do câncer de pulmão (H460), demonstrando o efeito dúbio e promissor dessa espécie vegetal.

Por fim, todos esses fatores corroboram com os dados da literatura sobre espécies do gênero *Crinum* L. e contribuem para a valorização dessa espécie pouco estudada e com potencial promissor para aplicações industriais.

REFERÊNCIAS

- ABDUL SALAM, A. A. et al. Effect of OH substitution in 3-benzylchroman-4-ones: crystallographic, CSD, DFT, FTIR, Hirshfeld surface, and energy framework analysis. **RSC Advances**, v. 11, n. 33, p. 20123–20136, 2021.
- ADERINOLA, T. A. et al. *In vitro* digestibility, structural and functional properties of Moringa oleifera seed proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 101, n. November 2019, p. 105574, abr. 2020.
- ADESANYA, S. A. et al. Antibacterial Alkaloids in Crinum jagus. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 30, n. 4, p. 303–307, 27 jan. 1992.
- ADEWUSI, A. E.; FOUCHE, G.; STEENKAMP, V. Cytotoxicity and acetylcholinesterase inhibitory activity of an isolated crinine alkaloid from Boophane disticha (Amaryllidaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 572–578, set. 2012.
- AGORAMOORTHY, G. et al. Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 739–742, dez. 2007.
- AKRAM, M. N.; VERPOORTE, R.; POMAHAČOVÁ, B. Effect of bulb age on alkaloid contents of narcissus pseudonarcissus bulbs. **South African Journal of Botany**, v. 136, p. 182–189, jan. 2021.
- ALBERTSSON, P. Å. A. Erratum. **Nature**, v. 182, n. 4640, p. 918–918, out. 1958.
- ALI, A. A. et al. Oxocrinine and other alkaloids from Crinum americanum. **Phytochemistry**, v. 25, n. 10, p. 2399–2401, jan. 1986.
- ALLAH, A. A. D. et al. Identification of phytochemicals from Tundub Capparis decidua (Forssk) Edgew seed oil as potential anticancer agents using gas chromatography-mass spectroscopy analysis, molecular docking, and molecular dynamics studies. **Scientific African**, v. 19, p. e01517, 1 mar. 2023.
- ALMEIDA, E. M. et al. Therapeutic potential of medicinal plants indicated by the Brazilian public health system in treating the collateral effects induced by chemotherapy, radiotherapy, and chemoradiotherapy: A systematic review. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 49, p. 102293, 1 mar. 2020.
- AMARAL-LOPES, A. C.; CAVALCANTI, T. B. Habranthus (Amaryllidaceae) do Brasil. **Rodriguesia**, v. 66, p. 203–220, 2015.
- ANVISA NORMATIVE INSTRUCTION-IN No. 75, OF OCTOBER 8, 2020. Establishes the technical requirements for the declaration of nutrition labeling on packaged foods. National Health Surveillance Agency (ANVISA). Ministry of Health (MS). Available at: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucaonormativa-in-n-75-de-8-de-outubro-de-2020-282071143> Accessed on May 29, 2022.

AOAC (2000). American Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of The American Association of Official Analytical Chemists. (17th ed.). USA: Gaithersburg. (2000). 2000.

ARAÚJO, R. L. et al. Crinum L. species as a potential source of alkaloids: Extraction methods and relevance on medicinal and pharmacological. **South African Journal of Botany**, v. 151, p. 720–734, 1 dez. 2022.

ARYAN, S. et al. Physicochemical properties of saponin containing Acanthophyllum laxiusculum extract: example application in foam stability and qualitative parameters for malt beverage industry. **Journal of Food Science and Technology**, p. 19932, 11 jun. 2021.

AZIKIWE, C. et al. Anticonvulsant activity of the fractionated extract of Crinum jagus bulbs in experimental animals. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, p. S446–S452, jan. 2012.

BARRA, I. M. M. et al. Systematic investigation and lipidomic profiles composition characterization in leaves of five Amaryllidaceae species by HRGC-MS technique. **South African Journal of Botany**, v. 142, p. 25–33, nov. 2021.

BENEDEC, D. et al. Sources for developing new medicinal products: biochemical investigations on alcoholic extracts obtained from aerial parts of some Romanian Amaryllidaceae species. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 226, 27 dez. 2018.

BENVENUTTI, L.; ZIELINSKI, A. A. F.; FERREIRA, S. R. S. Which is the best food emerging solvent: IL, DES or NADES? **Trends in Food Science & Technology**, v. 90, p. 133–146, ago. 2019.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, jul. 1996.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1 ago. 1959.

BOGDANOV, M. G.; SVINYAROV, I. Analysis of acetylcholinesterase inhibitors by extraction in choline saccharinate aqueous biphasic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1559, p. 62–68, jul. 2018.

BOZKURT, B. et al. Chemo-profiling of some Turkish Galanthus L. (Amaryllidaceae) species and their anticholinesterase activity. **South African Journal of Botany**, v. 136, p. 65–69, 1 jan. 2021.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25–30, 1995.

BROWN, K. N.; HILL, J.; HOLLAND, A. E. Anti-Trypanosomal Activity of Certain Phenylldiazoamino- and Phenylazoamino-Phenanthridinium Compounds. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 17, p. 396–405, 1961.

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, 23 set. 2010.

CHAHAL, S. et al. Meta-topolin-mediated regeneration and accumulation of phenolic acids in the critically endangered medicinal plant *Crinum malabaricum* (Amaryllidaceae): A potent source of galanthamine. **South African Journal of Botany**, v. 000, jan. 2022.

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

CHAUDHURI, J. et al. The Role of Advanced Glycation End Products in Aging and Metabolic Diseases: Bridging Association and Causality. **Cell Metabolism**, v. 28, n. 3, p. 337–352, 4 set. 2018.

CHEN, D. et al. Lycorine-derived phenanthridine downregulators of host Hsc70 as potential hepatitis C virus inhibitors. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 561–570, 2015.

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

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

CORTES, N. et al. Alkaloids of Amaryllidaceae as Inhibitors of Cholinesterases (AChEs and BChEs): An Integrated Bioguided Study. **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 2, p. 217–227, mar. 2018a.

CORTES, N. et al. Alkaloids of Amaryllidaceae as Inhibitors of Cholinesterases (AChEs and BChEs): An Integrated Bioguided Study. **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 2, p. 217–227, mar. 2018b.

COXON, D. T. et al. Identification of three hydroxyflavan phytoalexins from daffodil bulbs. **Phytochemistry**, v. 19, n. 5, p. 889–891, 1980.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 7, p. 3012–3043, 8 jul. 2009.

CRUZ, J. E. R. et al. A review of medicinal plants used in the Brazilian Cerrado for the treatment of fungal and bacterial infections. **Journal of Herbal Medicine**, v. 31, p. 100523, 1 fev. 2022.

CRUZ, M. B. et al. Buriti (*Mauritia Flexuosa* L.) pulp oil as an immunomodulator against enteropathogenic *Escherichia coli*. **Industrial Crops and Products**, v. 149, n. October 2019, p. 112330, jul. 2020.

CRUZ, P. N. et al. Antioxidant activity and fatty acid profile of yacon leaves extracts obtained by supercritical CO₂ + ethanol solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 146, p. 55–64, 1 abr. 2019.

DEL BENE, F. et al. A model-based approach to the in vitro evaluation of anticancer activity. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 63, p. 827–836, 2009.

DIL, A. F.; RANJKESH, Z.; GOODARZI, M. T. A systematic review of antiglycation medicinal plants. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 13, n. 2, p. 1225–1229, 1 mar. 2019.

DING, Y. et al. Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 19, p. 53–100, 2017.

DJAOUDENE, O. et al. Phenolic profile, antioxidant activity and enzyme inhibitory capacities of fruit and seed extracts from different Algerian cultivars of date (*Phoenix dactylifera* L.) were affected by in vitro simulated gastrointestinal digestion. **South African Journal of Botany**, v. 137, p. 133–148, 1 mar. 2021.

DUBOIS, MICHEL. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1 mar. 1956.

DUNG, N. T. et al. Quinolone and isoquinolone alkaloids: the structural-electronic effects and the antioxidant mechanisms. **Structural Chemistry**, v. 31, n. 6, p. 2435–2450, 5 dez. 2020.

ELAGBAR, Z. A. et al. Fatty Acids Analysis, Antioxidant and Biological Activity of Fixed Oil of *Annona muricata* L. Seeds. **Journal of Chemistry**, v. 2016, p. 1–6, 2016.

ELGORASHI, E. E.; STAFFORD, G. I.; VAN STADEN, J. Acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. **Planta Medica**, v. 70, p. 260–262, 2004.

FARIAS, F. O. et al. Designer solvent ability of alcohols in aqueous biphasic systems composed of deep eutectic solvents and potassium phosphate. **Separation and Purification Technology**, v. 200, n. February, p. 84–93, jul. 2018.

FAUSTINO PEREIRA, Y. et al. Modulation of the Antibiotic Activity by the *Mauritia flexuosa* (Buriti) Fixed Oil against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) and Other Multidrug-Resistant (MDR) Bacterial Strains. **Pathogens**, v. 7, n. 4, p. 98, 10 dez. 2018.

FELIPE, F. C. B. et al. Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. **Phytomedicine**, v. 14, p. 605–612, set. 2007.

FIDELIS, M. et al. Camu-camu seed (*Myrciaria dubia*) – From side stream to an antioxidant, antihyperglycemic, antiproliferative, antimicrobial, antihemolytic, anti-inflammatory, and antihypertensive ingredient. **Food Chemistry**, v. 310, n. May 2019, p. 125909, abr. 2020.

FRANCESC VILADOMAT, JAUME BASTIDA, GEMMA TRIBO, C. C. AND M. R. From *Narcissus Bicolor* *. **Phytochemist**, v. 29, p. 1307–1310, 1990.

FRANCO, R. R. et al. Antidiabetic effects of *Syzygium cumini* leaves: A non-hemolytic plant with potential against process of oxidation, glycation, inflammation and digestive enzymes catalysis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 261, p. 113132, 28 out. 2020.

GANASSI, S. et al. Activity of Some Plant and Fungal Metabolites towards *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae). **Toxins**, v. 13, n. 4, p. 285, 18 abr. 2021.

GARAVAND, F. et al. Different techniques for extraction and micro/nanoencapsulation of saffron bioactive ingredients. **Trends in Food Science & Technology**, v. 89, p. 26–44, jul. 2019.

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

GOMES, J. V. D. et al. Chemical profile and biological activity of *Crinum americanum* L. (Amaryllidaceae). **South African Journal of Botany**, v. 146, p. 25–35, maio 2022.

GOSWAMI, S. et al. Comparative antioxidant and antimicrobial potentials of leaf successive extract fractions of poison bulb, *Crinum asiaticum* L. **Industrial Crops and Products**, v. 154, p. 112667, out. 2020.

GRANATO, D. et al. From the forest to the plate – Hemicelluloses, galactoglucomannan, glucuronoxylan, and phenolic-rich extracts from unconventional sources as functional food ingredients. **Food Chemistry**, v. 381, n. November 2021, p. 132284, jul. 2022.

GRANATO, D.; DE ARAÚJO CALADO, V. M. The use and importance of design of experiments (DOE) in process modelling in food science and technology. Em: **Mathematical and Statistical Methods in Food Science and Technology**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 1–18.

GUPTA, A. et al. Chlorogenic acid for cancer prevention and therapy: Current status on efficacy and mechanisms of action. **Pharmacological Research**, v. 186, p. 106505, 1 dez. 2022.

HAJIZ, M. A. A. EL et al. *Crinum augustum* and *Crinum bulbispermum*. **Planta Medica**, v. 57, p. 437–439, 1991.

HARE, J. I. et al. Challenges and strategies in anti-cancer nanomedicine development: An industry perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 108, p. 25–38, jan. 2017.

HARVEY, A. L. The pharmacology of galanthamine and its analogues. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 68, p. 113–128, 1995.

HE, J. et al. Amaryllidaceae alkaloids inhibit nuclear-to-cytoplasmic export of ribonucleoprotein (RNP) complex of highly pathogenic avian influenza virus H5N1. **Influenza and other Respiratory Viruses**, v. 7, p. 922–931, 2013.

HONORIO-FRANÇA, A. C. et al. Human colostrum melatonin exhibits a day-night variation and modulates the activity of colostrum phagocytes. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 11, n. 3, p. 153–162, 31 jul. 2013.

HOSSAIN, M. B. et al. Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 3, p. 582–590, maio 2012.

HOU, Y. et al. Trapping of glyoxal by propyl, octyl and dodecyl gallates and their mono-glyoxal adducts. **Food Chemistry**, v. 269, p. 396–403, 15 dez. 2018.

ICHIHARA, K.; FUKUBAYASHI, Y. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. **Journal of Lipid Research**, v. 51, n. 3, p. 635–640, 1 mar. 2010.

ILMIAWATI, C. et al. Green coffee extract modifies body weight, serum lipids and TNF- α in high-fat diet-induced obese rats. **BMC Research Notes**, v. 13, n. 1, p. 208, 10 dez. 2020.

INCA (2023) - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>. Acesso em 03 de março de 2023.

JIANG, Z. et al. Green and efficient extraction of different types of bioactive alkaloids using deep eutectic solvents. **Microchemical Journal**, v. 145, p. 345–353, mar. 2019.

JIANG, Z. et al. Eco-friendly Deep Eutectic Solvents Contribute to Improving the Separation of Isoquinoline Alkaloids in Supercritical Fluid Chromatography. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 8, n. 36, p. 13777–13783, 14 set. 2020.

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

JIN, Z.; YAO, G. Amaryllidaceae and Scelletium alkaloids. **Natural Product Reports**, v. 33, p. 1318–1343, 2019.

KALITA, D. et al. Inhibition of α -glucosidase, α -amylase, and aldose reductase by potato polyphenolic compounds. **PLOS ONE**, v. 13, n. 1, p. e0191025, 25 jan. 2018.

KAMAL, H. et al. Nutraceutical and bioactive potential of high-quality date fruit varieties (*Phoenix dactylifera* L.) as a function of in-vitro simulated gastrointestinal digestion. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 223, p. 115113, 20 jan. 2023.

KANG, X. et al. Selective extraction of quinolizidine alkaloids from *Sophora flavescens* Aiton root using tailor-made deep eutectic solvents and magnetic molecularly imprinted polymers. **Separation and Purification Technology**, v. 261, p. 118282, abr. 2021.

KA, S. et al. Gigantelline, gigantellinine and gigancrine, cherylline- and crinine-type alkaloids isolated from *Crinum jagus* with anti-acetylcholinesterase activity. **Phytochemistry**, v. 175, p. 112390, jul. 2020.

KIM, Y. S. et al. Effects of *Allium victorialis* leaf extracts and its single compounds on aldose reductase, advanced glycation end products and TGF- β 1 expression in mesangial cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 251, 3 dez. 2013.

KISLING, J. et al. Bio-guided isolation of cholinesterase inhibitors from the bulbs of. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 11, p. 984–987, nov. 2005.

KLIMEK-SZCZYKUTOWICZ, M. et al. The influence of different wavelengths of LED light on the production of glucosinolates and phenolic compounds and the antioxidant potential in in vitro cultures of *Nasturtium officinale* (watercress). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 149, n. 1–2, p. 113–122, 27 maio 2022.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1–16, 2013.

KWEMBEYA, E. G. et al. Phylogenetic relationships in the genus *Crinum* (Amaryllidaceae) with emphasis on tropical African species: evidence from trnL-F and nuclear ITS DNA sequence data. **Taxon**, v. 56, n. August, p. 801–810, 2007.

KWON, S. et al. Total Synthesis of Naturally Occurring 5,7,8-Trioxxygenated Homoisoflavonoids. **ACS Omega**, v. 5, n. 19, p. 11043–11057, 19 maio 2020.

LAMOTHE, L. M. et al. Quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) and amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) provide dietary fibres high in pectic substances and xyloglucans. **Food Chemistry**, v. 167, p. 490–496, 15 jan. 2015.

LAWAL, A.; HUAT TAN, G.; ALI ALSHAR, A. M. Edibility and Medicinal Studies of *Crinum ornatum* in Comparison with *Allium sativum*. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 14, n. 11, p. 773–781, 15 out. 2015.

LAWAL, I. O. et al. Ethnobotanical Survey of Plants Used for Treating Cough Associated with Respiratory Conditions in Ede South Local Government Area of Osun State, Nigeria. **Plants**, v. 9, n. 5, p. 647, 20 maio 2020.

LEKHAK, M. M. et al. Bioactive potential and RP-HPLC detection of phenolics and alkaloids (lycorine and galanthamine) from ultrasonic-assisted extracts of *Crinum* roots. **South African Journal of Botany**, v. 000, ago. 2021.

LE MAOUT, E.; DECAISNE, J. **A General System of Botany: Descriptive and Analytical, in Two Parts**. Londres: [s.n.].

LIN, S. et al. Production of quercetin, kaempferol and their glycosidic derivatives from the aqueous-organic extracted residue of litchi pericarp with *Aspergillus awamori*. **Food Chemistry**, v. 145, p. 220–227, fev. 2014.

LIN, S.-P. et al. Association of Dietary Fish and n-3 Unsaturated Fatty Acid Consumption with Diabetic Nephropathy from a District Hospital in Northern Taiwan. **Nutrients**, v. 14, n. 10, p. 2148, 21 maio 2022.

LI, S. Y. et al. Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. **Antiviral Research**, v. 67, p. 18–23, 2005.

LIU, J. et al. Lycorine reduces mortality of human enterovirus 71-infected mice by inhibiting virus replication. **Virology Journal**, v. 8, p. 1–9, 2011.

LIU, J. et al. Quinoa bran soluble dietary fiber ameliorates dextran sodium sulfate induced ulcerative colitis in BALB/c mice by maintaining intestinal barrier function and modulating gut microbiota. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 216, p. 75–85, set. 2022.

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

LUCAS-GONZÁLEZ, R. et al. Changes in bioaccessibility, polyphenol profile and antioxidant potential of flours obtained from persimmon fruit (*Diospyros kaki*) co-products during in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 256, p. 252–258, 1 ago. 2018.

LUCHETTI, G. et al. Bulbispermine: A Crinine-Type Amaryllidaceae Alkaloid Exhibiting Cytostatic Activity toward Apoptosis-Resistant Glioma Cells. **ChemMedChem**, v. 7, p. 815–822, 2012.

MAHOMOODALLY, M. F. et al. Ethnomedicinal, phytochemistry, toxicity and pharmacological benefits of poison bulb – *Crinum asiaticum* L. **South African Journal of Botany**, v. 000, p. 1–14, 2020.

MAN, Y. et al. Iron supplementation and iron-fortified foods: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 16, p. 4504–4525, 8 set. 2022.

MARKOM, M. et al. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. **Separation and Purification Technology**, v. 52, n. 3, p. 487–496, jan. 2007.

MAROYI, A. Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological properties of *crinum bulbispermum* (Burm f) *milne-redh* and *schweick* (Amaryllidaceae). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 2497–2506, 2016.

MASI, M. et al. Alkaloids with activity against the zika virus vector *Aedes aegypti* (L.)-crinsarnine and sarniensinol, two new crinine and mesembrine type alkaloids isolated from the south african plant *Nerine sarniensis*. **Molecules**, v. 21, p. 1432–1443, 2016.

MASI, M. et al. Sarniensine, a mesembrine-type alkaloid isolated from *Nerine sarniensis*, an indigenous South African Amaryllidaceae, with larvicidal and adulticidal activities against *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v. 116, p. 34–38, 2017.

MEEROW, A. W.; LEHMILLER, D. J.; CLAYTON, J. R. Phylogeny and biogeography of *Crinum* L. (Amaryllidaceae) inferred from nuclear and limited plastid non-coding DNA sequences. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 349–363, 2003.

MELO, A. R. et al. Toxicity of different fatty acids and methyl esters on *Culex quinquefasciatus* larvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 154, p. 1–5, 15 jun. 2018.

METWALLY, D. M. et al. Chlorogenic acid confers robust neuroprotection against arsenite toxicity in mice by reversing oxidative stress, inflammation, and apoptosis. **Journal of Functional Foods**, v. 75, p. 104202, 1 dez. 2020.

MICHAEL, J. P.; MICHAEL, J. P. Indolizidine and Quinolizidine Alkaloids. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 191–222, 2007.

MILIÃO, G. L. et al. Unconventional food plants: Nutritional aspects and perspectives for industrial applications. **Future Foods**, v. 5, n. June 2021, p. 100124, jun. 2022.

MINEKUS, M. et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. **Food Funct.**, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014.

MINKAH, P. A. B.; DANQUAH, C. A. Anti-infective, anti-inflammatory and antipyretic activities of the bulb extracts of *Crinum jagus* (J. Thomps.) Dandy (Amaryllidaceae). **Scientific African**, v. 12, p. e00723, jul. 2021.

MOHAMMED, Z. K. et al. Acute Toxicity Study on the Bulb of *Crinum ornatum* (Ait Bury). **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences**, v. 3, p. 168–171, 2014.

MONASTYRSKYI, A.; KYLE, D.; MANETSCH, R. 4(1H)-Pyridone and 4(1H)-Quinolone Derivatives as Antimalarials with Erythrocytic, Exoerythrocytic, and Transmission Blocking Activities. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1693–1705, 8 ago. 2014.

MOODLEY, N. et al. Organ-specific production of alkaloids from bulbs and seeds of *Crinum stuhlmannii* subsp. *delagoense* (Amaryllidaceae). **South African Journal of Botany**, v. 136, p. 45–50, 2021a.

MOODLEY, N. et al. Organ-specific production of alkaloids from bulbs and seeds of *Crinum stuhlmannii* subsp. *delagoense* (Amaryllidaceae). **South African Journal of Botany**, v. 136, p. 45–50, jan. 2021b.

MORE, G. K. et al. Metabolomic profile of medicinal plants with anti-RVFP activity. **Heliyon**, v. 8, n. 2, p. e08936, 1 fev. 2022.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.

MOURA, I. O. et al. Chemical Characterization, Antioxidant Activity and Cytotoxicity of the Unconventional Food Plants: Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) Leaf, Major Gomes (*Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn.) and Caruru (*Amaranthus deflexus* L.). **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, n. 5, p. 2407–2431, 2 maio 2021.

MOYO, M. et al. Phytochemical Characterization, Antibacterial, Acetylcholinesterase Inhibitory and Cytotoxic Properties of *Cryptostephanus vansonii*, an Endemic Amaryllid. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 5, p. 713–720, maio 2017.

MVONGO, C. et al. Effect of ethanol / water extract of *Crinum jagus* on glycemia, lipids parameters and body weight gain on high-sugar diet fed rats. **Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology ISSN:**, v. 5674, p. 1439–1445, 2014.

MVONGO, C. et al. Antidiabetic and Antioxidant Activities of <i>Crinum jagus</i> Extracts on Induced Diabetes Rats MACAPOS 1. **International Journal of Pharmacology, Phytochemistry and Ethnomedicine**, v. 5, p. 86–95, out. 2016.

NAIR, J. J. et al. Cytotoxic Agents of the Crinane Series of Amaryllidaceae Alkaloids. **Natural Product Research**, v. 7, p. 1677–1688, 2012.

NAIR, J. J. et al. Alkaloids of the South African amaryllidaceae: A review. **Natural Product Communications**, v. 8, p. 1335–1350, 2013.

NAIR, J. J.; VAN STADEN, J. Cytotoxicity studies of lycorine alkaloids of the amaryllidaceae. **Natural Product Communications**, v. 9, p. 1193–1210, 2014.

NAIR, J. J.; VAN STADEN, J. Antiprotozoal alkaloid principles of the plant family Amaryllidaceae. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 29, p. 1–11, 2019a.

NAIR, J. J.; VAN STADEN, J. Antiplasmodial constituents in the minor alkaloid groups of the Amaryllidaceae. **South African Journal of Botany**, v. 126, p. 362–370, nov. 2019b.

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

NARAYANAN, A. et al. Identification of SARS-CoV-2 inhibitors targeting Mpro and PLpro using in-cell-protease assay. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, p. 169, 25 dez. 2022.

NAVEED, M. et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 67–74, 1 jan. 2018.

NELSON, N. A PHOTOMETRIC ADAPTATION OF THE SOMOGYI METHOD FOR THE DETERMINATION OF GLUCOSE. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375–380, maio 1944.

NERYS, A. L. L. DE et al. Photoprotective, biological activities and chemical composition of the non-toxic hydroalcoholic extract of *Clarisia racemosa* with cosmetic and pharmaceutical applications. **Industrial Crops and Products**, v. 180, p. 114762, 1 jun. 2022.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 23 mar. 2012.

NGOC TRAM, N. T. et al. Volatiles from *crinum latifolium*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, p. 195–197, 2003.

NIÑO, J. et al. Alkaloids of *Crinum x powellii* “Album” (Amaryllidaceae) and their Topoisomerase Inhibitory Activity. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 62, p. 223–226, 2007.

NOUBISSI, P. A. et al. Effects of *Crinum jagus* Water/Ethanol Extract on *Shigella flexneri* -Induced Diarrhea in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, p. 1–10, 12 mar. 2019.

NWAEHUIJOR, C. O.; NWINYI, F. C.; ODE, J. O. Liver Protective Activity of the Methanol Extract of *Crinum jagus* Bulb against Acetaminophen-induced Hepatic Damage in Wistar Rats. **Asian Journal of Biochemistry**, v. 7, n. 4, p. 182–193, 15 set. 2012.

ODE, O. J.; ASUZU, I. U. The anti-snake venom activities of the methanolic extract of the bulb of *Crinum jagus* (Amaryllidaceae). **Toxicon**, v. 48, p. 331–342, 2006.

OLOYEDE, G. K.; OLADOSU, I. A.; SHODIA, A. F. Chemical composition and cytotoxicity of the essential oils of *Crinum ornatum* (Ait .) Bury. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 4, p. 35–37, 2010.

OMORUYI, S. I. et al. Cytotoxic activities of selected plants of the family Amaryllidaceae on brain tumour cell lines. **South African Journal of Botany**, v. 136, p. 118–125, 2021.

PATEIRO, M. et al. Plant Extracts Obtained with Green Solvents as Natural Antioxidants in Fresh Meat Products. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 181, 27 jan. 2021.

PATEL, O. P. S. et al. Naturally Occurring Carbazole Alkaloids from *Murraya koenigii* as Potential Antidiabetic Agents. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 5, p. 1276–1284, 27 maio 2016.

PATEL, S. B. et al. Efficient extraction of cucurbitacins from *Diplocyclos palmatus* (L.) C. Jeffrey: Optimization using response surface methodology, extraction methods and study of some important bioactivities. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 2109, 7 dez. 2020.

PESSOA, R. S. et al. Microemulsion of babassu oil as a natural product to improve human immune system function. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 21–31, 2015.

PIEKARSKI-BARCHIK, P. et al. Mineral Content, Antioxidant Activity and Essential Oil of *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) Radlk. Leaves: Plant from South American Biodiversity. **Chemistry & Biodiversity**, v. 18, n. 8, 22 ago. 2021.

POTASIEWICZ, A. et al. Positive allosteric modulators of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors enhance procognitive effects of conventional anti-Alzheimer drugs in scopolamine-treated rats. **Behavioural Brain Research**, v. 385, p. 112547, maio 2020.

PRESLEY, C. C. et al. New potentially bioactive alkaloids from *Crinum erubescens*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 21, p. 5418–5422, nov. 2016.

QING, Z.-X. et al. Mass spectrometry-guided isolation of two new benzoquinoline alkaloids from *Macleaya cordata*. **Natural Product Research**, v. 30, n. 9, p. 1030–1035, 2 maio 2016.

RAMOS, A. S. et al. Pedra-ume caá fruit: An Amazon cherry rich in phenolic compounds with antiglycant and antioxidant properties. **Food Research International**, v. 123, p. 674–683, 1 set. 2019.

RENARD-NOZAKI, J. et al. Effect of alkaloids isolated from Amaryllidaceae on herpes simplex virus. **Research in Virology**, v. 140, p. 115–128, 1989.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, maio 1999.

RIBEIRO, J. P. N. et al. Efeitos alelopáticos de extratos aquosos de *Crinum americanum* L. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, p. 183–188, 2009.

RIBEIRO, J. P. N. et al. Spatial distribution of *Crinum americanum* L. in tropical blind estuary: Hydrologic, edaphic and biotic drivers. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, p. 287–291, 2011.

ROJAS-VERA, J. DEL C. et al. Alkaloid profile and cholinesterase inhibition activity of five species of Amaryllidaceae family collected from Mérida state-Venezuela. **South African Journal of Botany**, v. 136, p. 126–136, jan. 2021.

SAINSBURY, M. Five-membered Monoheterocyclic Compounds Alkaloids (continued): Amaryllidaceae Alkaloids. **Supplements to the 2nd Edition of Rodd's Chemistry of Carbon Compounds**, v. 4, p. 151–197, 2009.

SANGLARD, M. G. et al. Measurement and correlation of aqueous biphasic systems composed of alcohol (1-propanol/2-propanol/ tert -butanol) + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ at 298 K and a textile dye partition. **Fluid Phase Equilibria**, v. 466, p. 7–13, jun. 2018.

SANTOS, C. C. DE M. P. et al. Antinociceptive and Antioxidant Activities of Phytol *In vivo* and *In Vitro* Models. **Neuroscience Journal**, v. 2013, p. 1–9, 11 jun. 2013.

SCHRODER, G. et al. Flavonoid methylation: a novel 4'-O-methyltransferase from *Catharanthus roseus*, and evidence that partially methylated flavanones are substrates of four different flavonoid dioxygenases. **Phytochemistry**, v. 65, n. 8, p. 1085–1094, abr. 2004.

SEGUN, P. A.; OGBOLE, O. O.; AJAIYEGBA, E. O. Medicinal plants used in the management of cancer among the ijebus of southwestern Nigeria. **Journal of Herbal Medicine**, v. 14, p. 68–75, 2018.

SHAMSA, F. et al. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants Abstract : **Thai J. Pharm. Sci**, v. 32, p. 17–20, 2008.

SHANG, Y.-F. et al. Evaluation of digestibility differences for apple polyphenolics using in vitro elderly and adult digestion models. **Food Chemistry**, v. 390, p. 133154, 1 out. 2022.

SHAWKY, E. et al. Evaluation of the influence of green extraction solvents on the cytotoxic activities of *Crinum* (Amaryllidaceae) alkaloid extracts using in-vitro-in-silico approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 227, p. 139–149, dez. 2018.

SHEN, Y.; XU, Z.; SHENG, Z. Ability of resveratrol to inhibit advanced glycation end product formation and carbohydrate-hydrolyzing enzyme activity, and to conjugate methylglyoxal. **Food Chemistry**, v. 216, p. 153–160, 1 fev. 2017.

SILVA, A. D. et al. In vitro Bioaccessibility of Proteins, Phenolics, Flavonoids and Antioxidant Activity of *Amaranthus viridis*. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 76, n. 4, p. 478–486, 12 dez. 2021.

SILVA, L. C. et al. Lycorine Alkaloid and *Crinum americanum* L. (Amaryllidaceae) Extracts Display Antifungal Activity on Clinically Relevant *Candida* Species. **Molecules**, v. 27, n. 9, p. 2976, 6 maio 2022.

SILVA, L. E. et al. Conservation of genetic resources: a study with medicinal plants on the coast of Paraná - Brazil. **Ambiente & Sociedade**, v. 23, p. 02991, 2020.

SIMIN, N. et al. Phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of small yellow onion (*Allium flavum* L. subsp. *flavum*, Alliaceae). **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 139–146, nov. 2013.

SINGH, A. K. et al. Evaluation of antidiabetic activity of dietary phenolic compound chlorogenic acid in streptozotocin induced diabetic rats: Molecular docking, molecular dynamics, in silico toxicity, in vitro and *in vivo* studies. **Computers in Biology and Medicine**, v. 134, 1 jul. 2021.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1999.

SKULASON, S. et al. A study of the clinical activity of a gel combining monocaprin and doxycycline: a novel treatment for herpes labialis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 41, n. 1, p. 61–67, jan. 2012.

SOBHY, R. et al. The noncovalent conjugations of bovine serum albumin with three structurally different phytosterols exerted antiglycation effects: A study with AGEs-inhibition, multispectral, and docking investigations. **Bioorganic Chemistry**, v. 94, p. 103478, 1 jan. 2020.

SOUZA, V. B. et al. Functional properties and encapsulation of a proanthocyanidin-rich cinnamon extract (*Cinnamomum zeylanicum*) by complex coacervation using gelatin and different polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 297–306, 1 abr. 2018.

STUMPF, E. R. T.; BARBIERI, R. L.; HEIDEN, G. **Cores e Formas no Bioma Pampa: plantas ornamentais nativas**. Elisabeth ed. Pelotas: [s.n.].

SUN, Q. et al. Chemical Constituents of *Crinum asiaticum* L. var. *sinicum* Baker and Their Cytotoxic Activities. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, p. 1751–1757, out. 2009.

SZLÁVIK, L. et al. Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of amaryllidaceae alkaloids. **Planta Medica**, v. 70, p. 871–873, 2004.

TAIWE, G. S. et al. Anticonvulsant activity of an active fraction extracted from *Crinum jagus* L. (Amaryllidaceae), and its possible effects on fully kindled seizures, depression-like behaviour and oxidative stress in experimental rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 421–433, dez. 2016.

TAKLA, S. S. et al. Green techniques in comparison to conventional ones in the extraction of Amaryllidaceae alkaloids: Best solvents selection and parameters optimization. **Journal of Chromatography A**, v. 1567, p. 99–110, 2018.

TENG, H.; CHEN, L. α -Glucosidase and α -amylase inhibitors from seed oil: A review of liposoluble substance to treat diabetes. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 16, p. 3438–3448, 2 nov. 2017.

THORMAR, H.; HILMARSSON, H. Glycerol monocaprinate (monocaprin) reduces contamination by *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* on hard surfaces. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 505–510, jun. 2012.

TORRAS-CLAVERIA, L. et al. Metabolic profiling of bioactive *Pancratium canariense* extracts by GC-MS. **Phytochemical Analysis**, v. 21, n. 1, p. 80–88, jan. 2010.

TRAM, T. N. N. et al. *Crinum* L. (Amaryllidaceae). **Fitoterapia**, v. 73, n. 3, p. 183–208, jun. 2002.

UDEGBUNAM, S. et al. Antimicrobial and antioxidant effect of methanolic *Crinum jagus* bulb extract in wound healing. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 4, n. 3, p. 239, 2015.

URBAIN, A.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Coumarins from *Peucedanum ostruthium* as Inhibitors of Acetylcholinesterase. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, n. 8, p. 647–650, 7 jan. 2005.

VELTEN, R. et al. Cripowellin A and B, a novel type of amaryllidaceae alkaloid from *Crinum powellii*. **Tetrahedron Letters**, v. 39, n. 13, p. 1737–1740, mar. 1998.

VERDOORN, I. C. The Genus *Crinum* in Southern Africa. Em: **Bothalia**. [s.l.: s.n.]. p. 27–52.

VRIJSEN, R. et al. Lycorine: A eukaryotic termination inhibitor? **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 505–507, 1986.

WANG, H. et al. Lycorine Derivative LY-55 Inhibits EV71 and CVA16 Replication Through Downregulating Autophagy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 1–11, 2019.

WANG, L. et al. Two new amaryllidaceae alkaloids from the bulbs of *Lycoris radiata*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, p. 610–611, 2009.

'WFO (2022): World Flora Online. Published on the Internet; <http://www.worldfloraonline.org>. Accessed on: 02 may 2022'

WOJEICCHOWSKI, J. P. et al. Cholinium chloride as a weak salting-out agent to tune the biomolecules partition behavior in polymer-salt aqueous two-phase systems. **Food and Bioproducts Processing**, v. 124, p. 48–56, nov. 2020.

WOJEICCHOWSKI, J. P. et al. Extraction of phenolic compounds from rosemary using choline chloride – based Deep Eutectic Solvents. **Separation and Purification Technology**, n. October 2020, p. 117975, 2021.

XIN, G. et al. Effect of lycorine on the structure and function of hepatoma cell membrane *in vitro* and *in vivo*. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 34, p. 104–114, 2020.

YANG, L. et al. Tandem mass tag-based quantitative proteomic analysis of lycorine treatment in highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infection. **PeerJ**, v. 7, p. 1–23, 2019.

YANG, R. et al. Solid-phase extraction based on a molecularly imprinted polymer nanoshell at the surface of silica nanospheres for the specific enrichment and identification of alkaloids from *Crinum asiaticum* L. var. *sinicum*. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 5, p. 1150–1157, mar. 2017.

YIRGU, A.; CHIPPAUX, J.-P. Ethnomedicinal plants used for snakebite treatments in Ethiopia: a comprehensive overview. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 25, p. 1–15, 2019.

YOUSSEF, D. T. A.; RAMADAN, M. A.; KHALIFA, A. A. Acetophenones, a chalcone, a chromone and flavonoids from *Pancratium maritimum*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 8, p. 2579–2583, dez. 1998.

ZHANG, H. et al. Protective effects of matrine against progression of high-fructose diet-induced steatohepatitis by enhancing antioxidant and anti-inflammatory defences involving Nrf2 translocation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 70–77, maio 2013.

ZHENG, L. et al. The Phytol-rich Essential Oil from Fresh *Medicago hispidula* Exerts Significant Inhibitory Activity against *Escherichia coli*. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 270–274, 1 abr. 2019.

ZHU, D. et al. Layer-by-layer functionalized porous Zinc sulfide nanospheres-based solid-phase extraction combined with liquid chromatography time-of-flight/mass and gas chromatography-mass spectrometry for the specific enrichment and identification of alkaloids from Cr. **Analytica Chimica Acta**, v. 932, p. 60–68, ago. 2016.

ZOU, G. et al. A single-amino acid substitution in West Nile virus 2K peptide between NS4A and NS4B confers resistance to lycorine, a flavivirus inhibitor. **Virology**, v. 384, p. 242–252, 2009.

ZOU, H.-L. et al. A new cytotoxic benzophenanthridine isoquinoline alkaloid from the fruits of *Macleaya cordata*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 17, n. 8, p. 856–860, 3 ago. 2015.

ANEXOS

Anexo I – Certificados de Resumos - III Seminário de Alimentos da Sociobiodiversidade



Anexo II – Artigo publicado na South African Journal of Botany – 2022

South African Journal of Botany

Volume 151, Part A, December 2022, Pages 720-734



Review

Crinum L. species as a potential source of alkaloids: Extraction methods and relevance for medicinal and pharmacological applications

Renata Lázara de Araújo  , Carolina Lilibeth Carvalho de Pinho, Fabiane Oliveira Farias, Luciana Igarashi-Mafra, Marcos R. Mafra

[Show more](#) 

 Add to Mendeley  Share  Cite

<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.10.053> 

[Get rights and content](#) 