



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANA SHEILA DE QUEIROZ SOUZA

**PERFIL ALCALOÍDICO DE AÇUCENA (*Hippeastrum elegans*) E EFEITO ANTI-
INFLAMATÓRIO EM NEUTRÓFILO E MICRÓGLIA**

FORTALEZA

2021

ANA SHEILA DE QUEIROZ SOUZA

**PERFIL ALCALOÍDICO DE AÇUCENA (*Hippeastrum elegans*) E EFEITO ANTI-
INFLAMATÓRIO EM NEUTRÓFILO E MICRÓGLIA**

Dissertação apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.

Coorientador: Dr. Kirley Marques Canuto.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- Q42p Queiroz Souza, Ana Sheila de.
Perfil alcaloídico de açucena (*Hippeastrum elegans*) e efeito anti-inflamatório em neutrófilo e micróglia /
Ana Sheila de Queiroz Souza. – 2021.
118 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e
Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2021.
Orientação: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal .
Coorientação: Prof. Dr. Kirley Marques Canuto .
1. *Hippeastrum elegans*. 2. Amaryllidaceae. 3. CG-EM. 4. Quimiometria. 5. Anti-inflamatório. I. Título.
CDD 615
-

ANA SHEILA DE QUEIROZ SOUZA

**PERFIL ALCALOÍDICO DE AÇUCENA (*Hippeastrum elegans*) E EFEITO ANTI-
INFLAMATÓRIO EM NEUTRÓFILO E MICRÓGLIA**

Dissertação apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para Saúde.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Regina Claudia de Matos Dourado
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Profa. Dra. Flávia Almeida Santos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida M. Leal (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Kirley Marques Canuto (Coorientador)
Embrapa Agroindústria Tropical (EMBRAPA)

À minha Mãe, Maria José, luz da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus a força e o entusiasmo necessário para continuar nessa jornada.

Aos meus pais, Maria José e Luiz, o apoio essencial à continuidade dos meus estudos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal, por me receber em seu laboratório e pelo tempo dedicado à minha orientação.

Ao meu coorientador, Dr. Kirley Marques Canuto, pela oportunidade de trabalhar na Embrapa Agroindústria Tropical desde a Iniciação Científica, pela paciência e parceria.

À Dra. Rita de Cassia Alves Pereira, pelo planejamento e execução do experimento agrônômico de *Hippeastrum elegans*.

Ao pesquisador da Embrapa, Prof. Dr. Edy Sousa de Brito, por toda orientação, acolhida e generosidade.

Ao Prof. Dr. Elenilson Godoy Alves Filho, pela significativa contribuição com as análises quimiométricas, bem como toda orientação, disponibilidade e gentileza.

Aos analistas do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais (LMQPN) da Embrapa, Dra. Lorena Mara Alexandre e Silva, Dr. Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro e Dra. Tigressa Helena Rodrigues (atualmente professora da Universidade Estadual Vale do Acaraú – Sobral/CE), pela disponibilidade, ensino e apoio logístico, essenciais para meu aprendizado e êxito nas atividades no laboratório.

Aos alunos João Antônio C. de Sousa, Caroline Sampaio Pinto e Francisco Vinicius C. Serra Azul, pela inestimável contribuição na execução dos ensaios biológicos.

À aluna Monalisa Sthefani S. de Oliveira e demais voluntários doadores de sangue, matéria-prima fundamental para os ensaios biológicos com neutrófilos humanos.

À Farmacêutica Lyara Freitas, técnica do Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos (CEFAC) da UFC, pelo suporte técnico e auxílio com o Comitê de Ética em Pesquisa Humana.

Ao Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT) da UFC, em nome do Farmacêutico Glautemberg Viana, pelas inúmeras coletas de sangue humano, as quais foram sempre acompanhadas de profissionalismo e gentileza.

Ao Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa B. de Menezes da UFC, pela contribuição com as análises de citometria de fluxo, bem como toda orientação e generosidade.

Aos Professores da minha banca de qualificação, Profa. Dra. Flávia Almeida Santos da UFC e Prof. Dr. Edy Sousa de Brito, pelas valiosas contribuições.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF-UFC) e em Química (PPGQ-UFC), e aos colegas de turma, por todo conhecimento compartilhado durante as disciplinas e o acolhimento.

A Coordenação do PPGCF-UFC, por todo o suporte técnico e logístico.

À Embrapa Agroindústria Tropical e ao CEFAC, pela infraestrutura, suporte técnico, material e financeiro, essenciais para desenvolver este trabalho.

Aos colegas do LMQPN: Caroline Gondim, Cristine Vidal, Damodara Barbosa, Daniel Alcântara, Debora Pompeu, Francilene Silva, Gisele Silvestre, Gladyane Santos, Jan Gabriel Gomes, Jhonyson Guedes, Kaline Carvalho, Marcia Cavalcante, Natalia Brito, Oiram Filho, Priscila Nascimento, Régis Paiva, Robson Martins e Rodolfo Dantas, pela acolhida, aprendizado e companheirismo.

Aos colegas do CEFAC: Ana Bruna Araújo, Cirineu Chagas Neto, Emmanuel Araújo, Jessyca Norberto, Kevylane Ferreira, Ian Oliver, Marcos Rodrigues Filho, Nuno Machado, Rafaela Bezerra, Raysse Mesquita, Rolf Silva, Talita Magalhães e Talysson Almeida, pela acolhida, aprendizado e inspiração.

Aos funcionários da Embrapa Agroindústria Tropical e da UFC, em nome das funcionárias Rosilene Araújo e Elita Mendes, respectivamente, pelo convívio agradável e todo suporte.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Obrigada!

RESUMO

Hippeastrum elegans é uma Amaryllidaceae bulbosa, nativa do Brasil, que produz alcaloides com potencial anti-inflamatório, entre os quais licorina e galantamina. A inflamação, embora seja um mecanismo de defesa do organismo à estímulos nocivos; quando deflagrada de maneira inapropriada está associada a fisiopatologia de muitas doenças de alto impacto socioeconômico, tais como as doenças neurodegenerativas, câncer, e, recentemente, a Covid-19. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi determinar o perfil alcaloídico de bulbos cultivados de *H. elegans* e investigar o efeito anti-inflamatório das frações alcaloídicas em dois modelos celulares (neutrófilo humano e micróglia murina). Para tanto, as frações alcaloídicas foram extraídas por partição líquido-líquido de bulbos cultivados por 15 meses e colhidos em seis tempos de colheita (5, 7, 9, 11, 13 e 15 meses/FHE05 - FHE15). Em seguida, foram analisadas por cromatografia gasosa-espectrometria de massas (CG-EM) e, após deconvolução espectral, tendências na composição química foram determinadas por Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA). Adiante, as frações quimicamente distintas foram investigadas quanto a toxicidade e atividade anti-inflamatória em neutrófilo humano (modelo de degranulação celular) e micróglia, linhagem BV-2 (produção de óxido nítrico - NO). Além disso, os alcaloides anti-inflamatórios em neutrófilo humano foram discriminados por análise de regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS). Desse modo, 41 compostos foram detectados, comuns aos seis tempos de colheita de *H. elegans*. PCA e HCA, de forma complementar, apontaram a separação das amostras em três grupos distintos (I: FHE05, FHE07 e FHE09; II: FHE11 e III: FHE13 e FHE15). Das três frações representantes/grupo (I: FHE07; II: FHE11 e III: FHE15) investigadas, a FHE07 mostrou melhor efeito sobre a degranulação de neutrófilos mensurada pela liberação de mieloperoxidase e a produção de espécies reativas de oxigênio, com base no ensaio de quimioluminescência, após indução com PMA (acetato miristato de forbol), não associada à toxicidade (MTT teste e atividade LDH). A PLS indicou a licorina e um derivado, 11,12-dehidro-2-metoxi-assoanina, como os compostos responsáveis pela atividade anti-inflamatória da fração FHE07. Enquanto a FHE15 (2,5 µg/mL) reduziu significativamente a produção de NO em micróglia (linhagem BV-2) em concentrações não tóxicas (MTT teste e citometria de fluxo). Portanto, *H. elegans* sofre variações no perfil de alcaloides de acordo com o tempo de cultivo e as frações, FHE07 e FHE15, demonstram efeito anti-inflamatório promissor, em neutrófilo humano e micróglia murina (linhagem BV-2), respectivamente, as quais justificam pesquisas adicionais.

Palavras-chave: *Hippeastrum elegans*. Amaryllidaceae. CG-EM. Quimiometria. Anti-inflamatório. Alcaloides.

ABSTRACT

Hippeastrum elegans is a bulbous Amaryllidaceae, native to Brazil, which produces alkaloids with anti-inflammatory potential, including lycorine and galanthamine. Inflammation, although it is a defense mechanism of the organism against harmful stimuli; when triggered inappropriately, it is associated with the pathophysiology of many diseases of high socioeconomic impact, such as neurodegenerative diseases, cancer, and, recently, the condition of Covid-19. In this sense, the objective of this work was to determine the alkaloid profile of *H. elegans* cultivated bulbs and to investigate the anti-inflammatory effect of alkaloid fractions in two cell models (human neutrophil and murine microglia). Therefore, the alkaloid fractions were extracted by liquid-liquid partition of bulbs grown for 15 months and harvested in six harvest times (5, 7, 9, 11, 13 and 15 months/FHE05 - FHE15). Then, they were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and, after spectral deconvolution, trends in chemical composition were determined by Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA). Ahead, the chemically distinct fractions were investigated for toxicity and anti-inflammatory activity in human neutrophil (cell degranulation model) and microglia, line BV-2 (nitric oxide production - NO). In addition, anti-inflammatory alkaloids in human neutrophils were broken down by Partial Least Squares (PLS) regression analysis. In this way, 41 compounds were detected, common to the six harvest times of *H. elegans*. PCA and HCA, in a complementary way, pointed out the separation of the samples in three distinct groups (I: FHE05, FHE07 and FHE09; II: FHE11 and III: FHE13 and FHE15). The three representative fractions/group (I: FHE07; II: FHE11 and III: FHE15) investigated, FHE07 showed the best effect on neutrophil degranulation measured by the release of myeloperoxidase and the production of reactive oxygen species, based on the chemiluminescence, after induction with PMA (phorbol-myristate-acetate), not associated with toxicity (MTT test and LDH activity). PLS indicated lycorine and a derivative, 11,12-dehydro-2-methoxy-assoanine, as the compounds responsible for the anti-inflammatory activity of the FHE07 fraction. While FHE15 (2.5 µg/mL) significantly reduced the production of NO in microglia (line BV-2) in non-toxic concentrations (MTT test and flow cytometry). Therefore, *H. elegans* undergoes variations in the alkaloids profile according to the time of cultivation and the fractions, FHE07 and FHE15, demonstrate a promising anti-inflammatory effect, in human neutrophil and murine microglia (line BV-2), respectively, which justify additional research.

Keywords: *Hippeastrum elegans*. Amaryllidaceae. GC-MS. Chemometric. Anti-inflammatory. Alkaloids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Ocorrência de <i>Hippeastrum elegans</i> no Brasil e morfologia da flor e do bulbo	25
Figura 2	– Representações estruturais dos alcaloides descritos na literatura para <i>Hippeastrum elegans</i>	27
Figura 3	– Vias biossintéticas para a síntese dos alcaloides de Amaryllidaceae	30
Figura 4	– Ilustração esquemática dos principais componentes do instrumentos CG-EM	31
Figura 5	– Ilustração esquemática da abordagem de deconvolução espectral	33
Figura 6	– Comparação entre análise univariada e multivariada	34
Figura 7	– Células envolvidas na inflamação aguda (inata e adaptativa) e crônica	38
Figura 8	– Visão geral do desenvolvimento e função dos neutrófilos	40
Figura 9	– Formação de ácido hipocloroso por ação da mieloperoxidase	41
Figura 10	– Estados e funções da polarização microglial	43
Figura 11	– Fluxograma detalhando o planejamento do estudo	45
Figura 12	– Esquema ilustrativo com a logística do cultivo de <i>Hippeastrum elegans</i> em Fortaleza, Ceará	46
Figura 13	– Etapas do beneficiamento de <i>Hippeastrum elegans</i> após a colheita	47
Figura 14	– Esquema ilustrativo para obtenção das frações enriquecidas de alcaloides por partição líquido-líquido ácido-base	48
Figura 15	– Representação esquemática das principais etapas do isolamento de polimorfonucleares humanos	51
Figura 16	– Representação esquemática para o cultivo celular de micróglia (linhagem BV-2)	51
Figura 17	– Representação esquemática para a reação de conversão do piruvato a lactato por ação da Lactato Desidrogenase (LDH)	52
Figura 18	– Representação esquemática para o ensaio de atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH)	53
Figura 19	– Representação esquemática para a reação de conversão do sal de MTT	54

	a formazan por ação das desidrogenases mitocondriais	
Figura 20	– Representação esquemática para o ensaio colorimétrico de MTT usando neutrófilo humano	55
Figura 21	– Representação esquemática dos componentes básicos de um citômetro de fluxo convencional, com destaque para o sistema óptico	56
Figura 22	– Representação esquemática para o processo de necrose e apoptose por coloração com 7-AAD e anexina V/PE	57
Figura 23	– Representação esquemática para o ensaio de citometria de fluxo com micróglia (linhagem BV-2)	59
Figura 24	– Representação esquemática para a reação de oxidação do TMB por MPO na presença de H ₂ O ₂	60
Figura 25	– Representação esquemática para o ensaio de dosagem de mieloperoxidase (MPO) em neutrófilo humano	61
Figura 26	– Representação esquemática para a reação de oxidação do luminol	62
Figura 27	– Representação esquemática para o ensaio de quimioluminescência em neutrófilo humano	63
Figura 28	– Representação esquemática para a reação de diazotização (reação de Griess)	64
Figura 29	– Representação esquemática para a dosagem de óxido nítrico (NO) em micróglia (linhagem BV-2)	65
Figura 30	– Rendimento das frações alcalóidicas de <i>Hippeastrum elegans</i> para os seis tempos de cultivo	68
Figura 31	– Cromatogramas de íons totais das frações alcalóidicas de <i>Hippeastrum elegans</i>	73
Figura 32	– Espectro de massas e proposta de mecanismo de fragmentação para o alcaloide 11,12-dehidrogalantina	74
Figura 33	– Espectro de massas e proposta de mecanismo de fragmentação para o alcaloide anhidronarcissidina	75
Figura 34	– Espectro de massas e proposta de mecanismo de fragmentação para o alcaloide 11,12-dehidro-2-metoxi-assoanina	76
Figura 35	– Espectro de massas e proposta de mecanismo de fragmentação para o alcaloide 11,12-dehidro-2-hidroxi-assoanina	77

Figura 36	–	Representações estruturais dos alcaloides identificados por CG-EM nos bulbos de <i>Hippeastrum elegans</i>	78
Figura 37	–	Porcentagem de alcaloides por tipo de esqueleto identificado nos seis tempos de cultivo de <i>Hippeastrum elegans</i>	79
Figura 38	–	PC1 × PC2 sistema coordenado de scores e respectivos loadings de <i>Hippeastrum elegans</i> sob diferentes tempos de colheita (FHE05, FHE07, FHE09, FHE11, FHE13 e FHE15)	82
Figura 39	–	HCA associado a <i>heatmap</i> representando a relação de dissimilaridade entre os tempos de colheita de <i>Hippeastrum elegans</i> (colunas) e os alcaloides (linhas)	83
Figura 40	–	Efeito das frações alcaloídicas de <i>Hippeastrum elegans</i> (FHE07, FHE11 e FHE15) sobre a viabilidade de neutrófilo humano, determinada pelo teste de MTT e atividade da LDH	85
Figura 41	–	Efeito das frações alcaloídicas de <i>Hippeastrum elegans</i> (FHE07, FHE11 e FHE15) sobre a degranulação neutrofílica e produção de EROs em neutrófilo humano	87
Figura 42	–	Esquema ilustrativo representando o mecanismo de ativação do neutrófilo humano após estímulo com PMA e possíveis pontos de atuação da FHE07	88
Figura 43	–	Análise de PLS discriminando os alcaloides marcadores para a atividade anti-inflamatória	90
Figura 44	–	Efeito da fração FHE15 de <i>Hippeastrum elegans</i> sobre a viabilidade celular de células microgliais (linhagem BV-2), determinada pelo ensaio colorimétrico de MTT	92
Figura 45	–	Gráficos de pontos (Anexina V-PE versus 7-AAD) da FHE15 de <i>Hippeastrum elegans</i> em células microgliais (linhagem BV-2), avaliadas por citometria de fluxo	94
Figura 46	–	Perfil de morte celular induzido pela FHE15 de <i>Hippeastrum elegans</i> em células microgliais (linhagem BV-2), avaliado por citometria de fluxo	95
Figura 47	–	Efeito da fração FHE15 de <i>Hippeastrum elegans</i> sobre a produção de NO em micróglia (linhagem BV-2)	96
Figura 48	–	Esquema ilustrativo representando as vias de sinalização na micróglia (linhagem BV-2) ativada com LPS e consequente produção de mediadores inflamatórios	97

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	– Codificação para as frações alcalóidicas de <i>Hippeastrum elegans</i> nos seis tempos de colheita	48
----------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Alcaloides previamente identificados em <i>Hippeastrum elegans</i>	26
Tabela 2	– Áreas de pico de CG-EM deconvoluídas por PARADISE, para os seis tempos de colheita de <i>Hippeastrum elegans</i>	112
Tabela 3	– Alcaloides detectados nos cromatogramas de CG-EM dos bulbos de <i>Hippeastrum elegans</i> , comuns aos seis tempos de colheita	70
Tabela 4	– Parâmetros estatísticos da modelagem de regressão pelo método PLS	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD	<i>7-aminoactinomycin D</i>
AA	Alcaloides de Amaryllidaceae
AAPH	2,2-azobis (2-amidinopropana) di-hidrocloreto
a.C.	Antes de Cristo
Amu	Unidade de massa atômica
ANOVA	Análise de Variância
Ax/PE	Anexina V marcada com ficoeritrina
‘Calton’	Cultivar Calton
CG-DIC	Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CL-EM	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
Covid-19	Doença do Coronavírus 2019
COX-2	Ciclooxigenase-2
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSC	<i>Foward Scatter</i>
G-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos
GMP	Progenitor Granulócito-Monócito
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ O	Água
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HBSS	Solução balanceada de Hank’s
HCA	Análise de Agrupamento Hierárquico
HOCl	Ácido hipocloroso
IL	Interleucina
iNOS	Isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintase
i.p.	Intraperitonal
LDH	Lactato Desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo

<i>m/z</i>	Razão massa-carga
MeOH	Metanol
MPO	Mieloperoxidase
MS	Espectro de massa
MTT	Brometo 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NH ₄ Cl	Cloreto de amônia
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato salino
PCA	Análise de Componentes Principais
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PMA	Acetato miristato de forbol
PMN	Polimorfonuclear
QL	Quimioluminescência
RFC	Força centrífuga relativa
RdRp	RNA Polimerase Dependente de RNA
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPM	Rotação por minuto
SARS-CoV	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SSC	<i>Side Scatter</i>
TIC	Cromatograma de íons totais
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	OBJETIVOS	24
3	REFERENCIAL TEÓRICO	25
3.1	Hippeastrum elegans (Spreng.) H. E. Moore	25
3.2	Alcaloides	28
3.2.1	<i>Alcaloides de Amaryllidaceae</i>	28
3.3	CG-EM	30
3.4	Quimiometria	33
3.5	Atividades biológicas de alcaloides de Amaryllidaceae	35
3.6	Inflamação	36
3.6.1	<i>Papel dos neutrófilos na inflamação</i>	38
3.6.2	<i>Papel da micróglia na neuroinflamação</i>	41
4	JUSTIFICATIVA	44
5	MATERIAIS E MÉTODOS	45
5.1	Planejamento do estudo	45
5.2	Obtenção do material vegetal	46
5.3	Estudo químico	47
5.3.1	<i>Extração de alcaloides</i>	47
5.3.2	<i>Caracterização química por CG-EM</i>	48
5.3.3	<i>Processamento dos dados</i>	49
5.4	Estudo Farmacológico	49
5.4.1	<i>Comitê de Ética</i>	49
5.4.2	<i>Isolamento de células polimorfonucleares (PMNs) humanos</i>	50
5.4.3	<i>Cultura e Cultivo de células microgliais, linhagem BV-2</i>	50
5.4.4	<i>Ensaio de citotoxicidade</i>	51
5.4.4.1	<i>Atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) em neutrófilo humano</i>	53
5.4.4.2	<i>Ensaio colorimétrico de MTT em neutrófilo humano</i>	54
5.4.4.3	<i>Ensaio colorimétrico de MTT em micróglia (linhagem BV-2)</i>	55
5.4.4.4	<i>Perfil de morte celular por citometria de fluxo em micróglia (linhagem BV-2)</i>	56
5.4.5	<i>Atividade Anti-inflamatória in vitro</i>	59

5.4.5.1	<i>Degranulação de neutrófilo humano induzida por PMA</i>	59
5.4.5.2	<i>Ativação de micróglia (linhagem BV-2) induzida por LPS</i>	63
5.5	Análise estatística	65
5.5.1	Análise quimiométrica	66
5.5.1.1	<i>Análise quimiométrica não-supervisionada</i>	66
5.5.1.1.1	Análise de Componentes Principais (PCA)	66
5.5.1.1.2	Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA) com mapa de calor (<i>Heatmap</i>)	66
5.5.1.2	<i>Análise quimiométrica supervisionada</i>	67
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
6.1	Rendimento das frações alcalóidicas	68
6.2	Perfil de alcaloides determinado por CG-EM	68
6.3	Avaliação quimiométrica não-supervisionada	80
6.4	Avaliação da citotoxicidade e do efeito anti-inflamatório em neutrófilo humano e micróglia murino (linhagem BV-2)	84
6.4.1	<i>Efeito na viabilidade celular de neutrófilo humano</i>	84
6.4.2	<i>Efeito na degranulação neutrofílica e produção de EROs</i>	86
6.4.2.1	<i>Alcaloides marcadores para a redução da liberação de MPO: análise de PLS</i>	88
6.4.3	<i>Efeito anti-inflamatório em micróglia (linhagem BV-2)</i>	91
6.4.3.1	<i>Efeito da FHE15 na viabilidade celular de micróglia (linhagem BV-2)</i>	91
6.4.3.2	<i>Efeito da FHE15 sobre o aumento na concentração de NO induzida por LPS em micróglia (linhagem BV-2)</i>	96
7	CONCLUSÃO	100
	REFERÊNCIAS	101
	APÊNDICE A – ÁREAS DE PICO DE CG-EM DECONVOLUÍDAS POR PARADISE	112
	APÊNDICE B – INTERVALOS DECONVOLUÍDOS NO PARADISE	114
	APÊNDICE C – ESPECTRO DE MASSAS E PROPOSTA DE MECANISMO DE FRAGMENTAÇÃO PARA O ALCALOIDE 2α-10bα-DIHIDROXI-9-O-DEMETILHOMOLICORINA	117

ANEXO A – COMPROVANTE DE CADASTRO DE <i>HIPPEASTRUM ELEGANS</i> NO SISGEN	118
ANEXO B – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA, PLATAFORMA BRASIL	119
ANEXO C – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA <i>JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS</i>	120

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Hippeastrum*, família Amaryllidaceae, compreende cerca de 70 espécies de herbáceas bulbosas, nativas da América do Sul, das quais 32 são encontradas no Brasil, incluindo a espécie ornamental *Hippeastrum elegans* (DUTILH et al., 2020; GIORDANI et al., 2011). Carvalho et al. (2015) isolaram nove alcaloides nos bulbos de *H. elegans*, coletado em Russas-Ceará, incluindo licorina, galantamina e narciclasina, os quais apresentaram efeito anti-inflamatório e neuroprotetor, conforme descrito na literatura (LIANG et al., 2020; STARK et al., 2019; CORTES et al., 2018; LIU et al., 2010). Embora a galantamina seja o único alcaloide de Amaryllidaceae clinicamente utilizado (Razadyne®) – anticolinesterásico no tratamento da Doença de Alzheimer (TALLINI et al., 2017), outros alcaloides, por exemplo, a licorina, despontam como candidatos a fármacos anti-inflamatórios (JIN et al., 2020; LIANG et al., 2020).

Modular os mecanismos envolvidos no processo inflamatório tem sido considerado uma abordagem preventiva ou terapêutica promissora para várias doenças, quer sejam de evolução aguda ou crônica, por exemplo, a Covid-19 e as doenças neurodegenerativas, respectivamente (NÉMETH; SPERANDIO; MÓCSAI, 2020; TAY et al., 2020; BROWN; VILALTA, 2015). Na Covid-19 (doença do coronavírus 2019), doença inflamatória multissistêmica causada pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2 - *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*), os neutrófilos, principais células da resposta imune inata, têm sido destacados como células efetoras essenciais no desenvolvimento das complicações respiratórias e sistêmicas (CAVALCANTE-SILVA et al., 2021). Nas doenças neurodegenerativas, tais como na doença de Parkinson e de Alzheimer, a micróglia - célula de defesa residente no sistema nervoso central (SNC), desempenha um papel crítico na neuroinflamação e consequente progressão dessas doenças (ZHANG et al., 2015). Por isso, a modulação da função de neutrófilos e micróglia constitui um alvo terapêutico emergente (NÉMETH; SPERANDIO; MÓCSAI, 2020; HUGHES et al., 2019; MINHAS; BANSAL; BANSAL, 2019; BROWN; VILALTA, 2015).

Os produtos naturais e seus derivados continuam sendo a principal fonte para obtenção de novos fármacos. Cerca de 49% de todos os fármacos pelo FDA aprovados no período de 1981 a 2019, tiveram origem em produtos naturais. Considerando especificamente a classe dos fármacos anti-inflamatórios, a fração dos medicamentos derivados de produtos naturais corresponde a 24,5% (NEWMAN; CRAGG, 2020). Entre as várias fontes naturais de compostos bioativos anti-inflamatórios, extratos e alcaloides isolados de Amaryllidaceae têm

demonstrado grande potencial, em modelos *in vitro* e *in vivo* (GASCA et al. 2020; LIANG et al., 2020; STARK et al., 2019; KANG et al., 2012; LIU et al., 2010).

A Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM) é a técnica analítica mais utilizada para identificação de alcaloides de Amaryllidaceae, sendo baseada em informações cromatográficas (índice de retenção) e espectrométricas (padrões de fragmentação) que permitem a caracterização de compostos previamente descritos na literatura, mas também podem fornecer informações valiosas para determinação estrutural de novas moléculas (BERKOV et al., 2021; BESSA et al., 2017; GUO et al., 2014; TORRAS-CLAVERIA et al., 2014; DE ANDRADE et al., 2012).

Desse modo, sabendo que *H. elegans* é rica em alcaloides, uma classe conhecida por sua contribuição no desenvolvimento de medicamentos (por exemplo, a morfina, codeína, pilocarpina, entre outros); neste trabalho, determinou-se o perfil alcaloídico de bulbos cultivados de *H. elegans*, por CG-EM e observou-se tendências na composição alcaloídica através de análises quimiométricas. Ademais, investigou-se o efeito anti-inflamatório das frações alcaloídicas, tendo em vista que a inflamação está presente na fisiopatologia de muitas doenças, tais como a Covid-19, a doença de Alzheimer e o câncer.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Determinar o perfil alcaloídico de bulbos cultivados de *Hippeastrum elegans* e investigar o efeito anti-inflamatório das frações alcaloídicas em neutrófilo humano e células microgliais (linhagem BV-2).

2.2 Específicos

- Determinar o perfil alcaloídico das frações de *H. elegans* cultivado, por CG-EM;
- Selecionar frações alcaloídicas para testes biológicos com base em análises quimiométricas não-supervisionadas (PCA e HCA) dos dados de CG-EM;
- Avaliar a citotoxicidade das frações alcaloídicas de *H. elegans* selecionadas, e a atividade anti-inflamatória destas em neutrófilo humano, através do modelo de degranulação celular, mensurada através da enzima mieloperoxidase, bem como pela produção de EROs, determinadas por quimioluminescência;
- Determinar os possíveis alcaloides responsáveis pelo efeito anti-inflamatório em neutrófilo humano, através de análise quimiométrica supervisionada (PLS);
- Investigar a citotoxicidade e a atividade anti-inflamatória das frações alcaloídicas em micróglia (linhagem BV-2), através do modelo de neuroinflamação induzida por LPS.

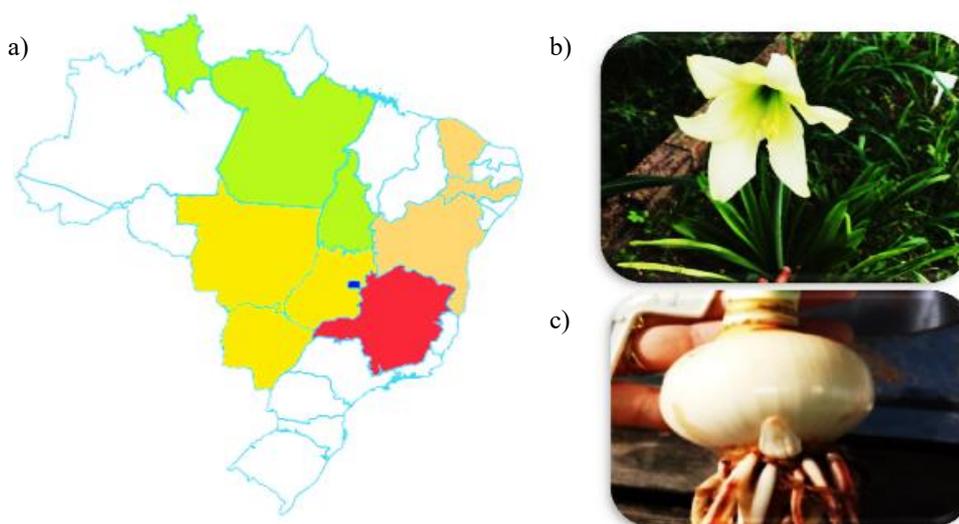
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Hippeastrum elegans* (Spreng.) H. E. Moore

Hippeastrum elegans (Spreng.) H. E. Moore (sinônimo *H. solandriflorum*), conhecida popularmente como açucena, é uma Amaryllidaceae bulbosa, nativa do Brasil, onde ocorre nos biomas Amazônia, Caatinga e Cerrado (FIGURA 1a) (DUTILH et al., 2020). O gênero *Hippeastrum* é o maior gênero de Amaryllidaceae no Brasil, com ampla distribuição geográfica pelo país, estando presente em todos os biomas nacionais (DUTILH et al., 2020). Cerca de 70 espécies ocorrem em toda a América do Sul, das quais 32 são encontradas no Brasil, com 24 espécies endêmicas (DUTILH et al., 2020; GIORDANI et al., 2011).

Quanto à morfologia, os bulbos de *H. elegans* são ovalados ou orbiculares; as folhas sésseis, verde-claras em ambas as faces, ápice agudo, margens inteiras e eretas; as flores declinadas, infundibuliformes, biflora e alvas a creme-amarelas (FIGURA 1b,c). Esta última característica distingue-a das demais, uma vez que é a única espécie do gênero com flores desse tom na região Nordeste (ALVES-ARAÚJO; PESSOA; ALVES, 2012; DUTILH et al., 2006). No Brasil, a floração acontece entre os meses de setembro a fevereiro ou abril, coincidindo com a estação chuvosa de cada região. Por exemplo, na região Centro-Oeste, a floração ocorre principalmente nos meses de outubro a dezembro, enquanto no Ceará, principal Estado de ocorrência para *H. elegans* no Nordeste, ela floresce entre os meses de dezembro e fevereiro (DUTILH et al., 2020).

Figura 1 – Ocorrência de *Hippeastrum elegans* no Brasil e morfologia da flor e do bulbo.



Fonte: Elaborado pela autora.

a) Registro de ocorrência para *H. elegans* no Brasil, segundo Dutilh et al. (2020) em Flora do Brasil 2020; Registros fotográficos de Kirley M. Canuto a) e Rita de Cassia A. Pereira c), na Embrapa Agroindústria Tropical em Fortaleza, Ceará.

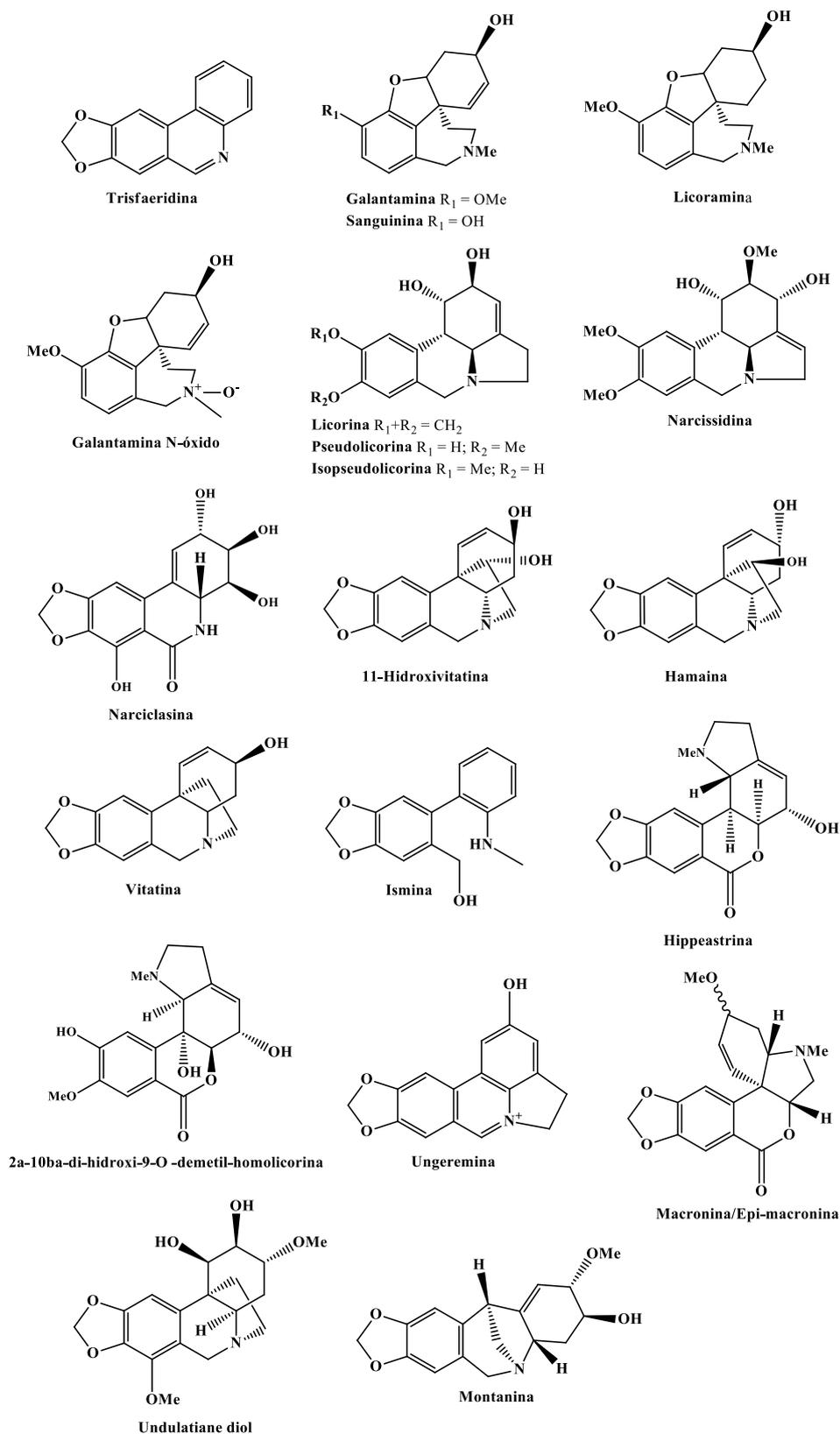
No Brasil, *H. elegans* não tem histórico de uso medicinal, mas, outras espécies do gênero são utilizadas, por exemplo, o extrato aquoso das folhas de *H. psittacinum*, Amaryllidaceae endêmica do Sul e Sudeste do país, é utilizado para o tratamento da tosse (DUTILH et al., 2020; ALBUQUERQUE et al., 2007), enquanto para os bulbos de *H. puniceum*, sob a forma de suco, são creditadas propriedades emética, purgativa, excitante, antiasmática e expectorante (LORENZI; MATOS, 2002).

Poucos estudos científicos foram realizados com *H. elegans* até o momento, mas, esses estudos descrevem o potencial químico e farmacêutico de *H. elegans* quanto à presença de alcaloides bioativos, tais como galantamina, licorina, montanina, pseudolicorina e narciclasina (PAIVA et al., 2021; PAIVA et al., 2020; CARVALHO et al., 2015), e atividade anticolinesterásica, *in vitro* e *ex vivo* (PAIVA et al., 2021; CORTES et al., 2017), e neuroprotetora em neurônios corticais de rato (CORTES et al., 2018) (TABELA 1, FIGURA 2).

Tabela 1 – Alcaloides previamente identificados em *Hippeastrum elegans*.

Alcaloide	PAIVA et al., 2021/2020 	CORTES et al., 2018/2017 	CARVALHO et al., 2015 	BASTIDA et al., 1996 
Galantamina	+	-	+	-
Galantamina N-óxido	-	-	+	-
Licoramina	-	+	-	-
Sanguinina	+	-	+	-
Licorina	+	+	+	-
Montanina	+	-	-	-
Isopseudolicorina	+	-	-	-
Macronina/Epi-macronina	+	-	-	-
Pseudolicorina	+	-	+	-
Narcissidina	+	-	+	-
Narciclasina	+	-	+	-
Undalatiene diol	+	-	-	-
Trisfaeridina	-	+	-	-
Hippeastrina	-	+	-	-
2 α -10b α -dihidroxi-9-O- demetilhomolicorina	-	-	+	-
11-Hidroxitatina	-	-	+	-
Vitatina	-	-	-	+
Hamaina	-	-	-	+
Ismina	-	-	-	+
Ungeremina	-	-	-	+
Desconhecido ([M] ⁺ 265)	-	+	-	-
Desconhecido ([M] ⁺ 295)	-	+	-	-

A espécie de *H. elegans* trabalhada por Paiva et al. (2021/2020) e Carvalho et al. (2015), foram coletadas no Brasil, nos municípios cearenses de Fortaleza e Russas, respectivamente. Enquanto a de Cortes et al. (2018/2017) e Bastida et al. (1996) foram coletadas na Colômbia e na Guatemala, respectivamente. Apenas a espécie de Paiva et al. (2021/2020) é de origem cultivada, as demais são silvestres. O sinal positivo (+) representa a presença do alcaloide, enquanto o sinal negativo (-), a ausência do alcaloide na amostra, de acordo com cada autor.

Figura 2 – Representações estruturais dos alcaloides descritos na literatura para *Hippeastrum elegans*.

Fonte: Elaborado pela autora.

Alcaloides identificados em *H. elegans* segundo os autores descritos na Tabela 1.

3.2 Alcaloides

Alcaloides são substâncias orgânicas geralmente cíclicas contendo um nitrogênio em um estado oxidativo negativo e possui uma distribuição limitada entre os organismos vivos. No geral, apresentam caráter básico, mas alguns podem ser neutros ou até mesmo ácidos (alcaloides quaternários). Podem ainda ser divididos em alcaloides verdadeiros, quando derivam de aminoácidos e possuem nitrogênio em heterociclo; protoalcaloides, quando o nitrogênio está fora do heterociclo e por fim, pseudoalcaloides, quando originam-se de outras vias (acetato, chiquimato, mevalonato ou desoxixilulose fosfato) e incorporam o nitrogênio por meio de outras reações, como transaminação (SIMÕES et al., 2017; ANISZEWSKI, 2007).

Os alcaloides são produtos do metabolismo secundário e geralmente são biossintetizados por plantas em decorrência a algum aspecto ecológico, tendo como uma de suas principais funções a proteção do espécime vegetal e a defesa contra possíveis predadores (BESSA et al., 2017).

De acordo com a origem biossintética, os alcaloides são ainda classificados em grupos, um exemplo são os alcaloides isoquinolínicos, derivados dos aminoácidos L-fenilalanina e L-tirosina. Representantes clássicos desse grupo são a morfina, codeína, papaverina, boldina, hidrastina, cefaelina e galantamina (SIMÕES et al., 2017).

3.2.1 Alcaloides de *Amaryllidaceae*

A família Amaryllidaceae figura em 4º lugar entre as 20 famílias botânicas mais ricas em alcaloides bioativos, destacando-se também por sintetizar um grupo diversificado e exclusivo de alcaloides isoquinolínicos, denominados alcaloides de Amaryllidaceae (AA) (DE ANDRADE et al., 2012). A esta classe química são atribuídos diversos usos medicinais populares, além de atividades farmacológicas cientificamente comprovadas. A galantamina, aprovada em 2001 pelo *Food and Drug Administration* (FDA), tem sido usado clinicamente como um anticolinesterásico no tratamento da Doença de Alzheimer, leve a moderada (TALLINI et al., 2017).

Os AA reúnem mais de 650 alcaloides (KA et al., 2020), que embora estruturalmente diversos, são biogeneticamente relacionados e resultantes de vias biossintéticas oriundas do metabolismo celular primário e secundário (GEORGIEV; IVAHOV; PAVLOV, 2020). Para Desgagné-Penix (2020), a via biossintética dos alcaloides de Amaryllidaceae pode ser didaticamente dividida em cinco fases:

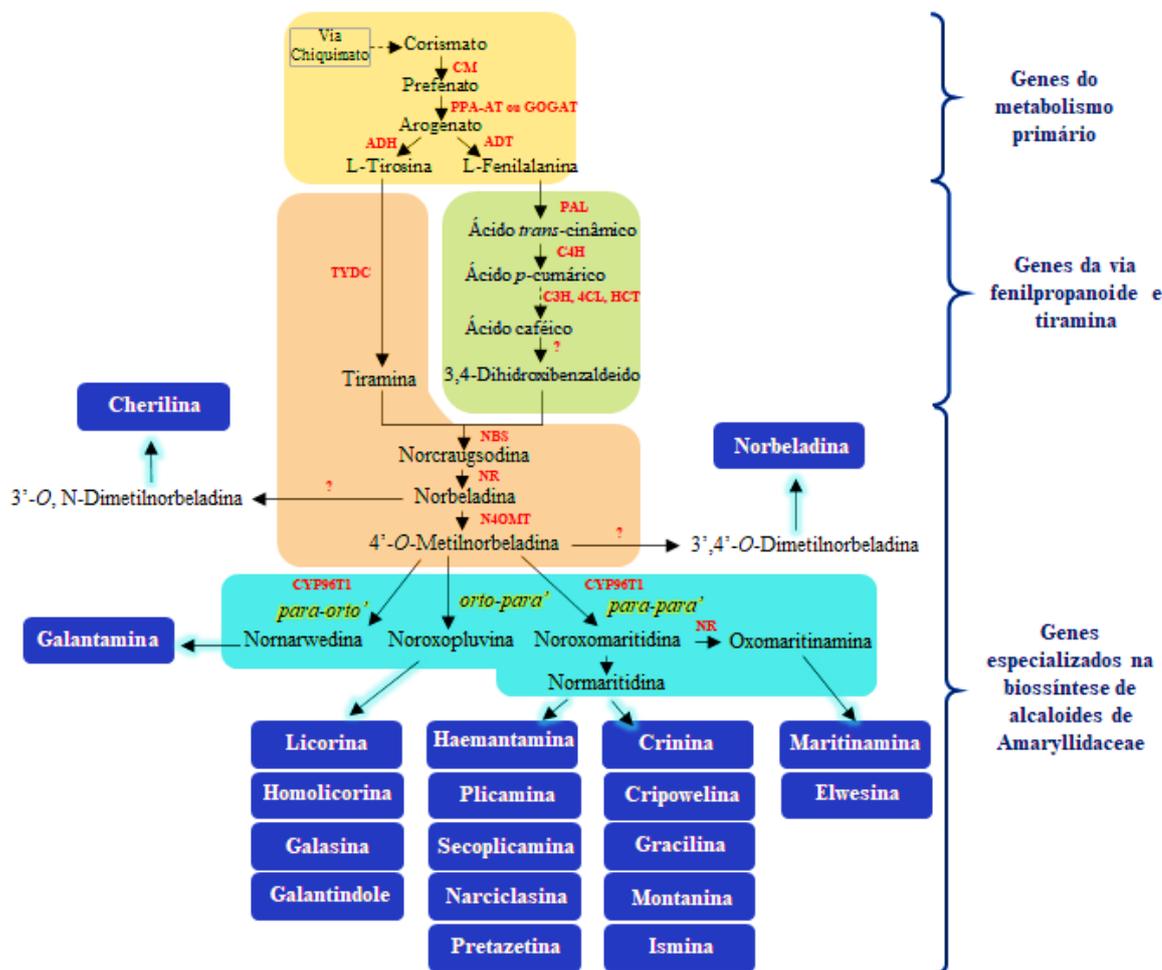
1) A via do chiquimato- fornece as subunidades de aminoácidos aromáticos L-fenilalanina e L-tirosina;

- 2) A via do fenilpropanóide- formação de 3,4-dihidroxibenzaldeído a partir da fenilalanina, correspondendo a porção aldeído do alcaloide precursor;
- 3) A via principal- envolve a biossíntese da tiramina a partir da tirosina, resultando na porção amina do alcaloide precursor, o qual sofre condensação com 3,4-dihidroxibenzaldeído para formar a norbeladina (precursor central), bem como sua subsequente *O*-metilação;
- 4) A via intermediária- acoplamento fenol específico da 4'-*O*-metilnorbeladina, seguido por uma etapa de redução, resultando em uma série de intermediários instáveis (normarwedina, noroxopluvina, noroxomaritidina, normarritidina e oxomaritinamina)
- 5) A(s) via(s) tardia(s)- biossíntese dos diversos tipos de alcaloides de Amaryllidaceae, cujas rotas permanecem em grande parte desconhecidas.

A Figura 3 ilustra de forma esquemática as vias envolvidas na biossíntese dos AA, com as respectivas enzimas, bem como os diferentes tipos de esqueleto resultantes (licorina, homolicorina, crinina, haemantamina, narciclasina, pretazetina, montanina, galantamina, plicamina, galasina, ismina, gracilina, secoplicamina, cripowelina, galantindole, maritinamina, elwesina e chereлина) (GEORGIEV; IVAHOV; PAVLOV, 2020).

Os AA estão presentes em todas as partes da planta, porém, ocorrem predominantemente nos bulbos e raízes (TRUJILLO-CHACÓN et al., 2019a). Seus papéis ecofisiológicos são pouco explorados em Amaryllidaceae, mas, acredita-se que sejam produzidos para defesa em resposta a interações entre planta-animal (como inseticidas), planta-planta (como aleloquímicos) e planta-microrganismo (como antimicrobianos) (BERKOV et al., 2020; DESGAGNÉ-PENIX, 2020). Por exemplo, a galantamina exibe ação inseticida induzindo excessiva estimulação colinérgica em insetos (HOUGHTON et al., 2006). Também foi relatado que alguns insetos regulam positivamente a síntese desses alcaloides na planta, sequestrando-os e armazenando-os em seus esqueletos com a finalidade de protegê-los de predadores (BERKOV et al., 2020).

Figura 3 – Vias biossintéticas para a síntese dos alcaloides de Amaryllidaceae.



Fonte: Adaptado de GEORGIEV; IVAHOV; PAVLOV, 2020.

Representação esquemática para as cinco vias biossintéticas envolvidas na biossíntese dos alcaloides de Amaryllidaceae, as quais estão destacadas em cores diferentes. As setas tracejadas representam várias reações, enquanto as setas com sobra azul, indicam rotas especializadas que levam à biossíntese de diferentes tipos de alcaloides de Amaryllidaceae. As enzimas conhecidas estão escritas na cor vermelha e em negrito. CM: corismato mutase; PPA-AT: prefenato aminotransferase; GOGAT: glutamina oxoglutarato aminotransferase; ADH: arogenato desidrogenase; ADT: arogenato desidratase; PAL: fenilalanina amônia-liase; C4H: cinamato-4-hidroxilase; C3H: 4-cumarato 3-hidroxilase; 4CL: 4-cumarato-CoA ligase; HCT: hidroxicinamoiltransferase; TYDC: tirosina descarboxilase; NBS: norbeladina sintase; NR: noroxomaritidina redutase; N4OMT: norbeladina 4'-O-metiltransferase; CYP96T1: citocromo P450 96T1 monooxigenase.

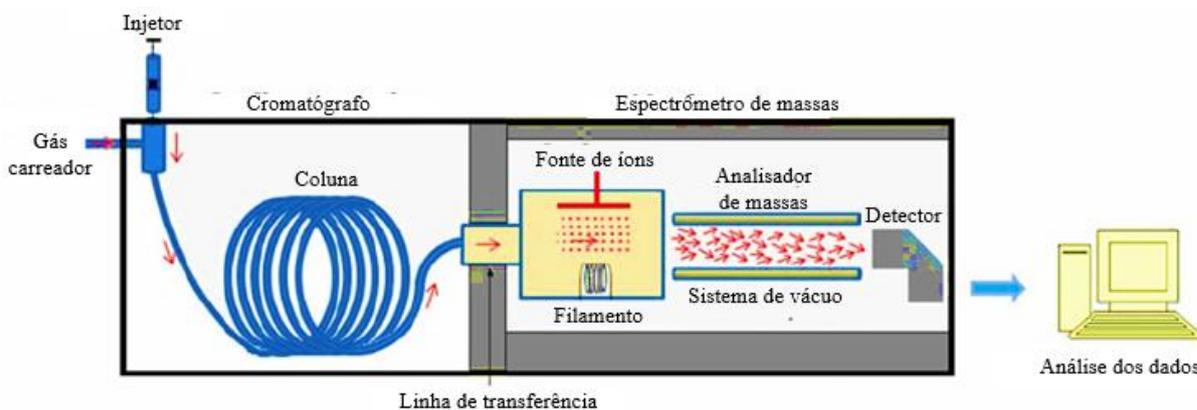
3.3 CG-EM

A CG-EM é uma técnica analítica de separação, identificação e quantificação de compostos voláteis ou volatilizáveis após processo de derivatização (BEALE et al., 2018). Os compostos são separados de acordo com a diferença de afinidade entre a fase estacionária (sólido ou líquido) e a fase móvel, um gás quimicamente inerte (hélio, hidrogênio ou nitrogênio) que irá eluir os compostos ao longo da coluna (fase estacionária) em direção ao espectrômetro

de massa, onde são ionizadas, analisadas e separadas de acordo com sua razão massa-carga (m/z) e, por fim, transferidas ao detector. O detector monitora a corrente de íons, amplifica-a, e transmite o sinal para o sistema de dados, sendo registrado na forma de espectros de massas, com os valores de m/z dos íons em função da sua intensidade (NASCIMENTO et al., 2018). Algumas vantagens da CG-EM são: robustez, alta resolução, seletividade, sensibilidade, reprodutibilidade, facilidade de operação e menor custo (BEALE et al., 2018).

Na Figura 4 são apresentados os principais componentes de um CG-EM comum (injetor, coluna cromatográfica, câmara de ionização, analisador de massa e detector) (EMWAS et al., 2015).

Figura 4 - Ilustração esquemática dos principais componentes do instrumentos CG-EM.



Fonte: Adaptado de EMWAS et al., 2015.

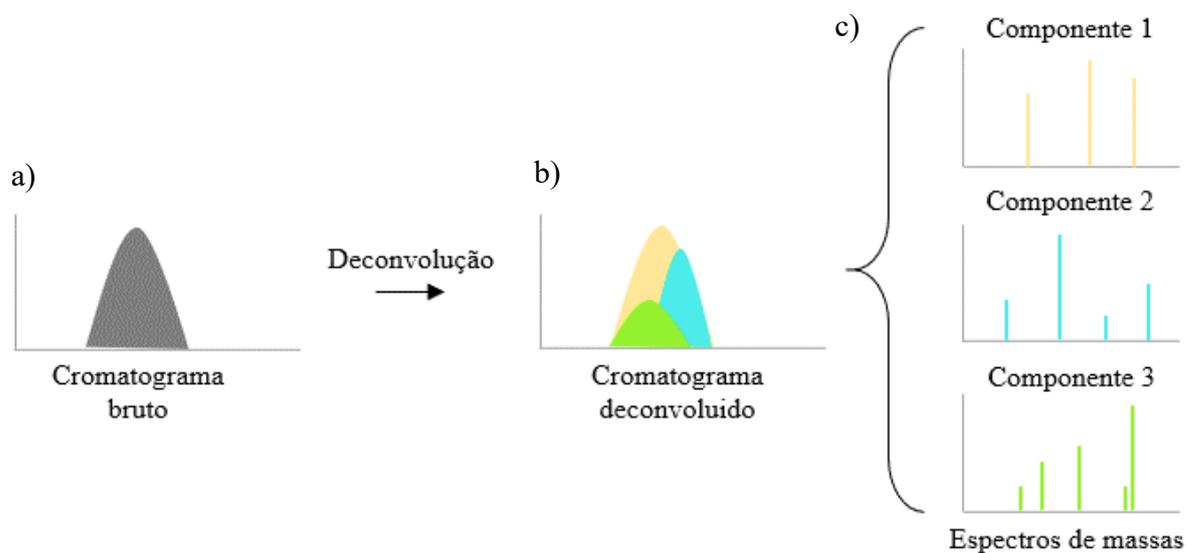
Na CG-EM as amostras são eluídas por um gás inerte ao longo da coluna cromatográfica, em seguida são direcionadas para o espectrômetro de massas. Então, na fonte de íons, vários íons são gerados a medida que os compostos eluem da coluna. O analisador de massa separa os íons com base em sua razão massa-carga (m/z), e o detector determina os valores de m/z e registra a abundância relativa de cada tipo de íon.

A CG-EM é uma das técnicas analíticas mais utilizadas em análise metabolômica (BEALE et al., 2018) e, também, a mais utilizada para análise de AA (BERKOV et al., 2021; BESSA et al., 2017; TORRAS-CLAVERIA et al., 2014; DE ANDRADE et al., 2012). A maioria dos AA são bem detectados nas condições de CG-EM, não necessitando de derivatização e apresentando espectros de massas com padrões de fragmentação característicos, permitindo a rápida e confiável identificação de compostos conhecidos ou ainda fornecem informações valiosas para a determinação estrutural de novas moléculas (BERKOV et al., 2021; BESSA et al., 2017; GUO et al., 2014). No entanto, alcaloides na forma de sais, N-óxidos, glicosilados e termicamente instáveis não são detectados corretamente nas condições de CG-EM (BERKOV et al., 2021; TORRAS-CLAVERIA, et al., 2020).

A ionização de elétrons (IE) é a forma mais frequente de ionização usada em CG-EM. As moléculas do analito são bombardeadas na fase gasosa com elétrons de alta energia (padronizada a 70 eV), removendo um elétron da molécula da amostra, formando um cátion radical, denominado de íon molecular. A energia excedente (em torno de 50 eV) promove a fragmentação do íon molecular, produzindo o espectro de massa do composto. O íon mais intenso no espectro (de maior estabilidade) é denominado de íon base. Dessa forma, a IE produz fragmentação reprodutível das moléculas, facilitando a identificação estrutural por meio da pesquisa em bibliotecas espectrais de referência, como os bancos de dados de espectrometria de massa NIST e Wiley, por exemplo (NASCIMENTO et al., 2018; BEALE et al., 2018; WU et al., 2009). Além do espectro de massa, a identificação das substâncias também conta com o auxílio do índice de retenção (IR), que permite a confirmação de compostos isobáricos, os quais muitas vezes produzem espectros de massas semelhantes, mas com tempos de retenção distintos no cromatograma. Por tanto, o IR é um indicador estrutural e físico-químico específico, que pode diferenciar efetivamente compostos com espectros de massas semelhantes (YI et al., 2016).

Embora a alta resolução seja uma das características marcantes da análise de CG-EM, é importante ressaltar que alguns picos no cromatograma podem ser misturas de metabólitos co-eluidos, dificultando a identificação correta dos compostos (BEALE et al., 2018; JOHNSEN et al., 2017; YI et al., 2016). Para mitigar essa desvantagem, os espectros dos metabólitos podem ser resolvidos aplicando métodos de deconvolução espectral (FIGURA 5), através de *softwares* disponibilizados pelo próprio fabricante do equipamento ou gratuitos, por exemplo, o PARADISE (Sistema de Identificação e Deconvolução baseado em PARAFAC2). O PARADISE, através da modelagem PARAFAC2 (PARAllel FACtor analysis2), é capaz de deconvoluir picos sobrepostos, com baixa relação sinal-ruído (S/N) e com tempo de retenção deslocado para todas as amostras, simultaneamente, em um determinado intervalo de tempo, além de subtrair as contribuições da linha de base (JOHNSEN et al., 2017).

Figura 5 - Ilustração esquemática da abordagem de deconvolução espectral.



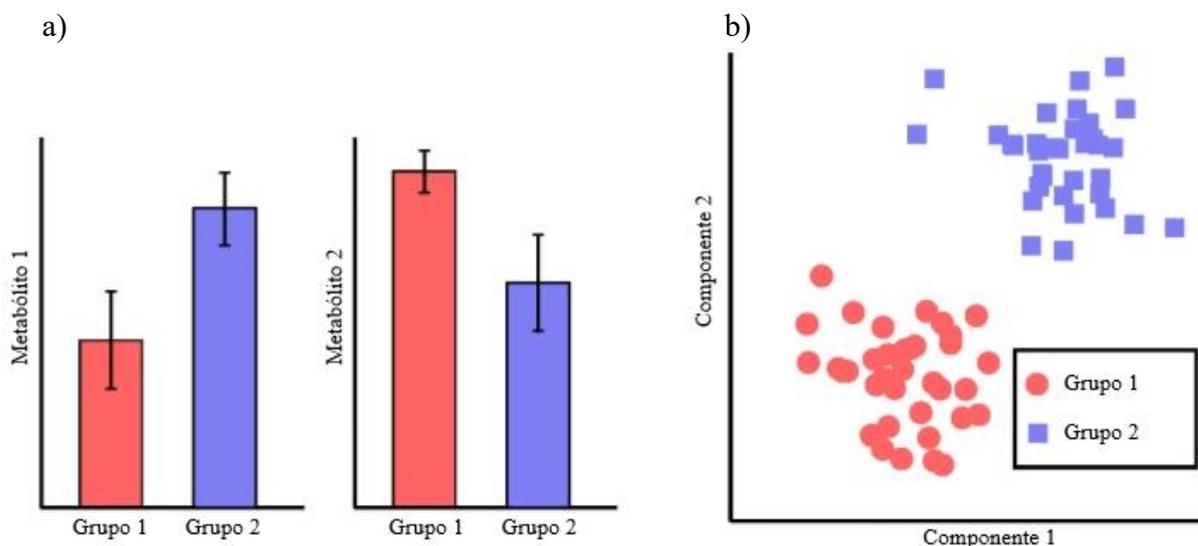
Fonte: Elaborado pela autora.

Representação simplificada da abordagem de deconvolução espectral. a) Cromatograma bruto composto aparentemente por um único pico; b) Cromatograma após a deconvolução espectral, na qual resolveu 3 picos sobrepostos; c) Espectros de massas para os componentes resolvidos com a deconvolução.

3.4 Quimiometria

Análises quimiométricas, correspondem a um grupo de ferramentas poderosas, para extrair informações úteis de grandes conjuntos de dados químicos em matrizes complexas, usando diferentes métodos matemáticos e estatísticos multivariados (GRANATO et al., 2018; NUNES et al., 2015). Os métodos de análises multivariadas buscam capturar não apenas as mudanças de metabólitos individuais entre grupos distintos, como visto comumente nas análises univariadas (por exemplo, ANOVA), mas, também, utilizam as estruturas de dependência entre as moléculas individuais (FIGURA 6) (BARTEL; KRUMSIEK; THEIS, 2013).

Figura 6 – Comparação entre análise univariada e multivariada.



Fonte: Adaptado de BARTEL; KRUMSIEK; THEIS, 2013.

a) Diferenas no nível de concentrao de um único metabólito (metabólito 1 e 2) entre dois grupos (por exemplo, ANOVA); b) Abordagens multivariadas como PCA e PLS modelam as relaes entre metabólitos e/ou amostras para detectar diferenas nos grupos. Os pontos em cada grupo representam um metabólito.

Segundo Oliveri e Simonetti (2016), a quimiometria pode ser classificada em métodos supervisionados e não-supervisionados (ou exploratórios), permitindo a interpretao multivariada de conjuntos de dados complexos por meio de gráficos bi- ou tridimensionais. Os métodos não-supervisionados são geralmente usados para explorar a estrutura geral de um conjunto de dados, localizando tendências e agrupamentos (YI et al., 2016). Nesse método a separao de classes acontece naturalmente, sem nenhuma informao prévia sobre o conjunto de dados experimentais, enquanto que para os métodos supervisionados   necessário que exista alguma informao inicial sobre a identidade das amostras, cujo objetivo é obter a máxima distino entre elas e discriminar quais variáveis são responsáveis pela separao. A análise supervisionada tem sido amplamente utilizada na descoberta de biomarcadores e metabólitos bioativos (PILON et al., 2020). Geralmente, os não-supervisionados precedem os métodos supervisionados (GRANATO et al., 2018; OLIVIERI, 2018; OLIVERI; SIMONETTI, 2016).

Comumente, os métodos não-supervisionados de Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA), assim como o método supervisionado de regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) e suas variaes são os mais utilizados para a triagem e discriminao de compostos bioativos, respectivamente (DEMARQUE et al., 2020; PILON et al., 2020; GRAZIANI et al., 2018; BARTEL; KRUMSIEK; THEIS, 2013).

A PCA é geralmente implementada como um ponto de partida para processar dados e obter uma visão geral da tendência de agrupamento, bem como inspecionar *outliers* (BARTEL; KRUMSIEK; THEIS, 2013). A PCA transforma as variáveis de alta dimensão em um pequeno número de fatores ortogonais, chamadas de componentes principais (PCs). A modelagem de PCA converte o conjunto de dados originais em duas matrizes distintas, conhecidas como matriz de *scores* e matriz de *loadings* (PILON et al., 2020). O gráfico de *scores* aponta a dispersão das amostras, as quais apresentam composições metabólicas similares quando agrupadas ou composições diferentes quando dispersas, enquanto que o gráfico de *loadings* contém informações sobre as variáveis responsáveis pela disposição dos *scores* (YI et al., 2016; OLIVERI; SIMONETTI, 2016). A HCA consiste no agrupamento de amostras de acordo com a sua similaridade, comumente disposto em dendrograma (PILON et al. 2020). Por outro lado, a PLS utiliza um modelo de predição para modelar a relação entre duas matrizes, X (dados químicos) e Y (por exemplo, resposta biológica), permitindo identificar as variáveis mais correlacionadas para a separação dos grupos (PILON et al., 2020).

Desse modo, as ferramentas quimiométricas têm contribuído significativamente para minimizar os desafios da análise metabolômica moderna, ao reduzir o grande volume de dados produzidos pelas diferentes técnicas analíticas disponíveis (ressonância magnética nuclear – RMN e espectrometria de massa acoplada a cromatografia líquida ou gasosa – CL-EM e CG-EM, respectivamente), tornando a visualização, organização e interpretação dos dados muito mais eficiente e otimizada (DEMARQUE et al., 2020; PILON et al., 2020).

3.5 Atividades biológicas de alcaloides de Amaryllidaceae

Desde o isolamento do primeiro alcaloide, licorina, de *N. pseudonarcissus* em 1877, a família Amaryllidaceae tem sido fonte de alcaloides com interessantes propriedades farmacêuticas (BASTIDA et al., 2006), tais como antibacteriana (TRAM et al., 2002), antiviral (LI et al., 2005), antioxidante (CHEN et al., 2018), citotóxica (CHEN et al., 2018; WANG et al., 2018; CARVALHO et al., 2015), anti-inflamatória (LIANG et al., 2020; CHEN et al., 2018; WANG et al., 2018; GIORDANI; DE ANDRADE; VERLI, 2011), além de atividades no SNC, destacando neuroproteção (TRUJILLO-CHACÓN et al., 2019b; CORTES et al., 2018), anticonvulsivante, ansiolítica, antidepressiva (SILVA et al., 2006) e anticolinesterase (MORAGA-NICOLÁS et al., 2018; CORTES et al., 2015). Estudos envolvendo o SNC são os principais, decorrentes do sucesso da galantamina no tratamento da Doença de Alzheimer (CORTES et al., 2018).

De fato, os alcaloides mais intensamente investigados são a galantamina e a licorina

(BERKOV et al., 2020). A licorina é o alcaloide mais frequente no gênero *Hippeastrum* (ANDRADE et al., 2012), apresentando várias propriedades biológicas, incluindo antiviral, anticâncer e anti-inflamatória (ROY et al., 2018; CAO; YANG; ZHOU, 2013). Notavelmente, a atividade antiviral da licorina recebeu destaque em 2020, em meio a infecção emergente pelo SARS-CoV-2, agente etiológico do surto pandêmico de Covid-19 (CHRISTY et al., 2020; FIELDING et al., 2020; JIN et al., 2020; ZHANG et al., 2020). Mas, já em 2005, pesquisadores da Universidade de Medicina Chinesa (Pequi, China) demonstraram que o extrato de *Lycoris radiata*, dentre 200 extratos de ervas medicinais tradicionalmente usadas para o tratamento de doenças virais na China, foi o extrato mais potente contra SARS-CoV humano. Posteriormente, um isolamento bioguiado revelou que a licorina era o composto responsável pela ação anti-SARS-CoV (LI et al., 2005). Especificamente, Jin et al. (2020) demonstraram que a licorina inibe a atividade da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), que é responsável pela replicação do SARS-CoV-2, inclusive, sendo mais eficaz do que o remdesivir, medicamento anti-SARS-CoV-2 aprovado pelo FDA para o tratamento da Covid-19 (MULLARD, 2021).

A atividade anti-inflamatória da licorina, bem como de extratos e outros alcaloides isolados de Amaryllidaceae, é igualmente interessante e também tem despertado bastante atenção da comunidade científica, para a prospecção de novos candidatos a fármacos anti-inflamatórios, quer seja de ação periférica ou central (LIANG et al., 2020; GE et al., 2020; GASCA et al., 2020; KURIAKOSE; DEEPA; SAMPAYAN, 2019; ZHAO et al., 2019; STARK et al., 2019; KANG et al., 2012; CITOGLU; TANKER; GÜMÜSEL, 1998). Por exemplo, o extrato etanólico de *H. psittacinum*, composto principalmente por trisfaeridina e albomaculina, mostrou efeito anti-inflamatório e neuroprotetor, *in vitro*, ao reduzir a liberação de nitrito em macrófago murino (RAW 264.7) estimulado com LPS e protegendo as células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) do dano oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H₂O₂), respectivamente (GASCA et al., 2020). Enquanto isso, o extrato de *L. chejuensis* e seu composto ativo, 7-desoxi-trans-di-hidronarciclasina (um derivado de narciclasina), atenuaram a expressão de fatores pró-inflamatórios, tais como NO, PGE₂ (prostaglandina E₂), iNOS, COX-2, TNF- α e IL-6, secretadas por micróglia (linhagem BV-2) (ZHAO et al., 2019). Em contraste, o extrato e o derivado de narciclasina ainda promoveram a secreção da citocina anti-inflamatória, IL-10.

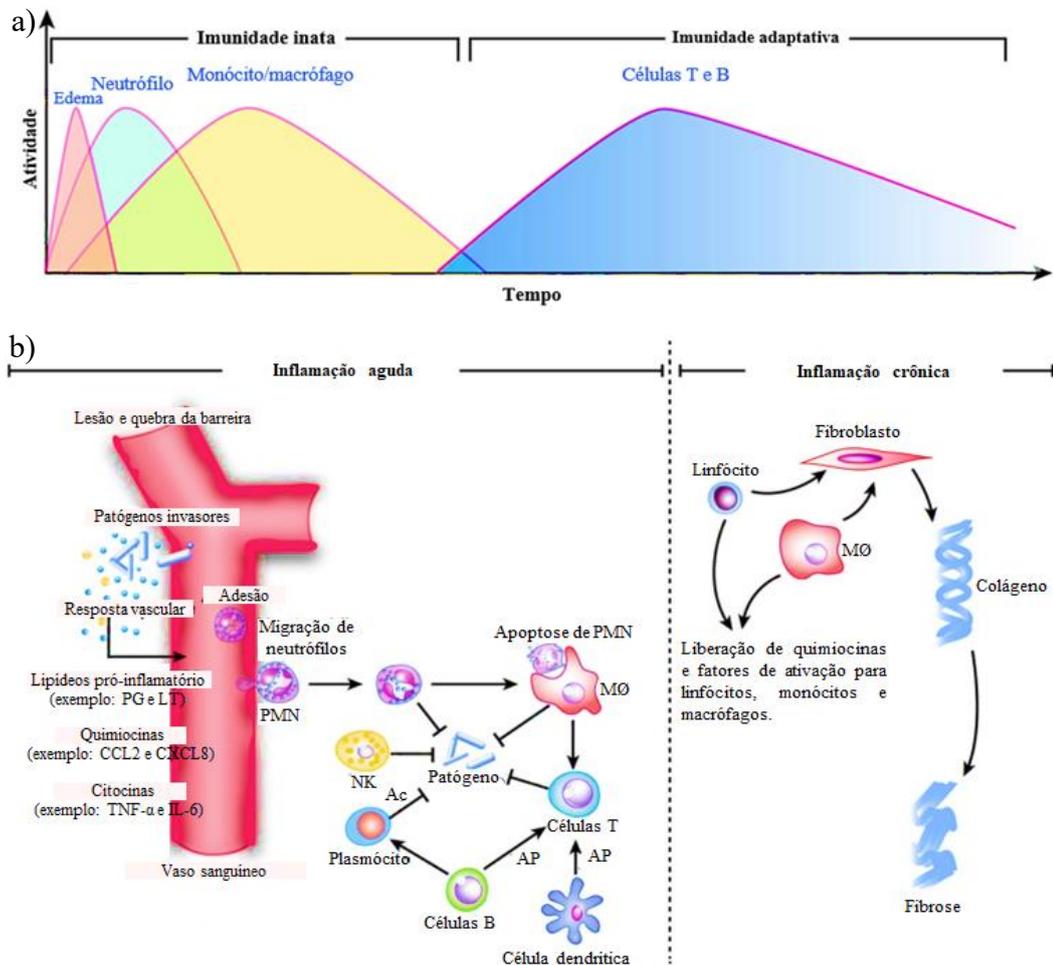
3.6 Inflamação

A inflamação é a resposta do sistema imunológico a estímulos prejudiciais, infecciosos ou não, e tem o objetivo fisiológico de restaurar a homeostase tecidual

(MEDZHITOV, 2010). Após o estímulo, é deflagrada a resposta inflamatória aguda, a qual pode ser dividida em dois componentes: resposta inata e a adaptativa. A resposta imunológica inata é a primeira linha de defesa, composta por defesas celulares e não celulares (barreiras físicas e químicas) e é responsável por iniciar a resposta inflamatória. Já a resposta imune adaptativa desenvolve uma resposta específica à medida que o organismo é exposto ao antígeno ao longo de sua vida (FIGURA 7a) (BENNET et al., 2018).

As células ativamente envolvidas na resposta imune inata incluem macrófagos (monócitos ativados), polimorfonucleares (PMNs) – principalmente neutrófilos, células *natural killer* e células dendríticas, enquanto as citocinas críticas para a eficácia dessa etapa incluem as interleucinas (IL-1 e IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon alfa (IFN- α). Em humanos, a resposta imune adaptativa leva de 10 a 14 dias para desenvolver uma resposta específica ao antígeno primário e as principais células envolvidas são os linfócitos B e T (BENNET et al., 2018; ZHANG; ZHU; LI, 2017). Tomados em conjunto, tais eventos promovem a eliminação do agente nocivo, a reparação e a cicatrização do tecido. No caso de infecção, a memória imunológica do hospedeiro desenvolve uma resposta mais rápida e específica para atuar em uma exposição futura. Contudo, a inflamação não resolvida leva à inflamação crônica, tornando-se prejudicial, pois pode causar danos adicionais, tais como fibrose, necrose, disfunção orgânica e mutação genética, além de uma enorme proporção de doenças, por exemplo, Doença de Alzheimer e câncer (FIGURA 7b) (ZHANG; ZHU; LI, 2017; FULLERTON; GILROY, 2016).

Figura 7 – Células envolvidas na inflamação aguda (inata e adaptativa) e crônica.



Fonte: Adaptado de ZHANG; ZHU; LI, 2017.

a) Imunidade inata e adaptativa na inflamação. Durante o início da inflamação, o edema tecidual é seguido por influxo de polimorfonucleares, principalmente neutrófilos e, em seguida, um retorno à linha de base, acompanhado pelo recrutamento de monócitos e macrófagos para a resolução. Sequencialmente, as células T e B efetoras se transformam em células T e B de memória, o que é essencial para a resposta imune adaptativa; b) Mecanismos da inflamação aguda e crônica. Após exposição ao estímulo (lesão, trauma, estresse ou infecção), ocorre a liberação de lipídios pró-inflamatórios (por exemplo, prostaglandina (PG), leucotrieno (LT), envolvidos na vasodilatação), quimiocinas (por exemplo, CCL2 e CXCL8, envolvidos na quimiotaxia e adesão) e citocinas (por exemplo, TNF- α , IL-6, induzem o recrutamento de neutrófilos). As células NK matam os patógenos por meio da citotoxicidade dependente do complemento. Os macrófagos fagocitam patógenos e neutrófilos apoptóticos, enquanto as células B são convertidas em plasmócitos para matar patógenos via anticorpos (Ac) secretados. Macrófagos, células B e células dendríticas ativam células T via apresentação cruzada de antígeno (AP). A homeostase será restaurada se a inflamação for resolvida completamente, enquanto a não resolução leva à inflamação crônica, que é caracterizada por infiltração persistente no tecido por células imunes (por exemplo, macrófagos, linfócitos), as quais induzem lesão tecidual. CCL2: ligante de quimiocina CC; CXCL8: ligante de quimiocina CXC; NK: *natural killer*; TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa; IL: interleucina; MØ: macrófago.

3.6.1 Papel dos neutrófilos na inflamação

Nos seres humanos, os neutrófilos são os leucócitos polimorfonucleares mais abundantes na circulação sanguínea (50% a 70%) e constituem a primeira linha de defesa contra

infecções bacterianas e fúngicas, além de desempenhar papel importante na coordenação da resposta imunológica (inata e adaptativa) (NÉMETH; SPERANDIO; MÓCSAI, 2020).

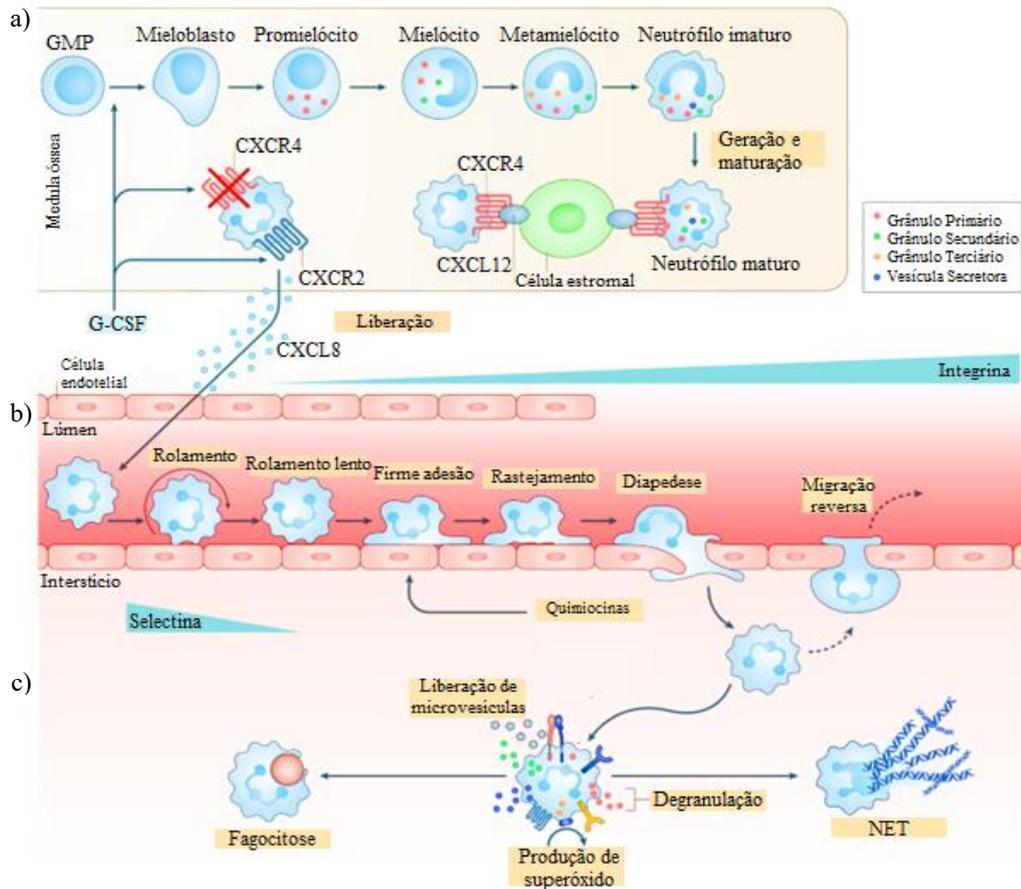
Os neutrófilos são gerados na medula óssea a uma taxa de 10^{11} /dia, a partir do progenitor granulócito-monócito (GMP), o qual passa por diferentes estágios de maturação, resultando, entre outras características, na condensação e aparência multilobular do núcleo, bem como no surgimento de grânulos intracelulares específicos (grânulos primário, secundário, terciário e vesículas secretoras), essenciais para as funções efetoras de neutrófilos (NÉMETH; SPERANDIO; MÓCSAI, 2020; MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014). Após a maturação, os neutrófilos são retidos na medula óssea por meio da interação do receptor de quimiocina CXCR4 (expresso na superfície do neutrófilo) com o CXCL12 expresso por células do estroma, enquanto a sinalização CXCR2 direciona sua liberação para a circulação, os quais sobrevivem cerca de 6 a 8 horas (DEVI et al., 2013). Em resposta a infecções microbianas e pró-inflamatórias, o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) regulam a produção, diferenciação, bem como os fatores de retenção (CXCR4) e liberação (CXCR2) dos neutrófilos na circulação (FIGURA 8a) (NÉMETH; SPERANDIO; MÓCSAI, 2020).

Em resposta a estímulos, os neutrófilos circulantes migram do sangue para o local das infecções, através de uma cascata de eventos mediados por proteínas de adesão, tais como as selectinas e integrinas, resultando em captura, rolagem, firme adesão, rastejamento e transmigração (diapedese) de neutrófilos para o tecido em direção ao local inflamado; influenciados por agentes quimiotáticos, onde desempenham funções críticas para a eliminação do patógeno e o reparo do tecido em resposta à inflamação aguda (FIGURA 8b) (FILIPPI, 2016; MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014).

No tecido, em resposta a estímulos pró-inflamatórios, os neutrófilos tornam-se completamente ativados, e realizam suas funções efetoras contra patógenos através da fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), degranulação e formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (FIGURA 8c). A produção de EROs é iniciada pelo *burst* oxidativo mediada pelo complexo enzimático de subunidade múltipla, NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) oxidase, montada e ativada na membrana do fagossomo ou plasmática. Na degranulação, liberam um conjunto de grânulos intracelulares contendo peptídeos antimicrobianos (α -defensinas e catelicidinas), mieloperoxidase (MPO), enzimas hidrolíticas (lisozima, sialidase e colagenase), proteases (catepsina G, azurocidina e elastase), fosfolipase catiônica e quelantes de metais (lactoferrina). As NETs consistem em uma rede extracelular de cromatina descondensada associada a enzimas e peptídeos antimicrobianos,

tais como a elastase neutrofílica e a MPO (NÉMETH; SPERANDIO; MÓCSAI, 2020; MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014).

Figura 8 - Visão geral do desenvolvimento e função dos neutrófilos.



Fonte: Adaptado de NÉMETH; SPERANDIO; MÓCSAI, 2020.

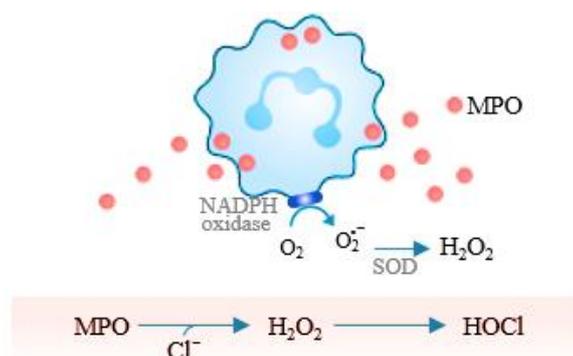
a) Formação e maturação de neutrófilos na medula óssea. b) Ao detectar estímulos microbianos ou inflamatórios, os neutrófilos migram para os tecidos. c) No local da inflamação, os neutrófilos exercem suas diferentes funções efetoras, levando à eliminação dos microrganismos invasores ou promovendo o processo inflamatório. Adiante, na fase de resolução, são fagocitados por macrófagos ou retornam à circulação (migração reversa). CXCL: ligante de quimiocina; CXCR: receptor de quimiocina CXC; GMP: progenitor granulócito-monócito; G-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos; NET: armadilha extracelular de neutrófilos.

No entanto, o descontrole dessas funções, bem como a falha nos mecanismos de resolução podem causar danos locais ou sistêmicos ao tecido/órgãos, implicando na patogênese de várias doenças, incluindo doenças cardiovasculares, pulmonares, reumáticas, neurodegenerativas, câncer e, recentemente, o quadro grave da Covid-19 (CAVALCANTE-SILVA et al., 2021; NÉMETH; SPERANDIO; MÓCSAI, 2020; MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014).

Nesse sentido, alvos terapêuticos direcionados aos neutrófilos são considerados estratégias terapêuticas emergentes, os quais podem atuar desde o processo de maturação às funções efetoras, tais como reduzir o recrutamento, a ativação ou as funções de mediadores derivados de neutrófilos. Alguns fármacos com essa proposta já estão avaliados clinicamente. O inibidor de elastase neutrofílica (AZD9668) está sendo estudado em pacientes com bronquiolite obliterante, enquanto o antagonista de CXCR2 (AZD5069) foi investigado em pacientes com asma em um estudo de fase II (NÉMETH; SPERANDIO; MÓCSAI, 2020).

Além da elastase neutrofílica, outro alvo terapêutico igualmente importante é a enzima MPO. A MPO é uma heme peroxidase encontrada principalmente em grânulos primários de neutrófilos e em menor extensão em monócitos e macrófagos, incluindo micróglia. É responsável por catalisar a formação de intermediários reativos de oxigênio, entre os quais o ácido hipocloroso (HOCl), que é um potente agente antimicrobiano formado a partir da reação de H_2O_2 (derivado do *burst* oxidativo) com íon cloreto (FIGURA 9). O HOCl é um potente oxidante, capaz de iniciar reações de modificação direcionadas a lipídeos, DNA e (lipo)proteínas, incluindo halogenação, nitração e reticulação oxidativa. Portanto, a ativação crônica da MPO pode causar danos aos tecidos, e tem sido associada a doenças inflamatórias crônicas, doenças neurodegenerativas, aterosclerose e eventos cardiovasculares agudos (DAVIES; KAWKINS, 2020; LAZAREVIC-PASTI; LESKOVAC; VASIC, 2015).

Figura 9 – Formação de ácido hipocloroso por ação da mieloperoxidase.



Fonte: Adaptado de NÉMETH; SPERANDIO; MÓCSAI, 2020.

MPO: mieloperoxidase; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; HOCl: ácido hipocloroso; Cl^- : Cloreto; $\text{O}_2^{\cdot-}$: superóxido; SOD: superóxido dismutase; NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato.

3.6.2 Papel da micróglia na neuroinflamação

No SNC humano, cerca de 90% da composição celular corresponde as células da glia, das quais micróglia, astrócitos e oligodendrócitos são as principais. Essas células são

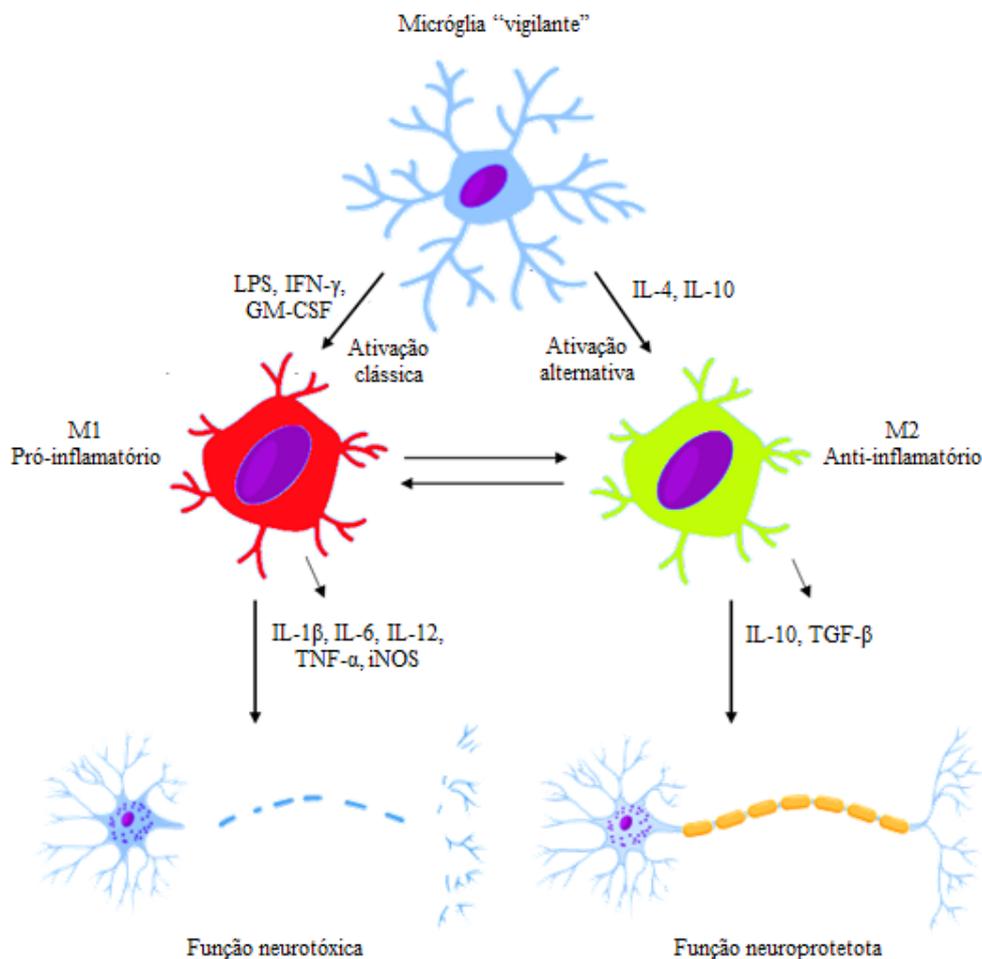
essenciais para o desenvolvimento e homeostase cerebral, através de uma rede integrada de comunicação entre células da glia-neurônios-vasos sanguíneos (GREENHALGH; DAVID; BENNETT, 2020; ALLEN; BARRES, 2009).

Os astrócitos desempenham diversas funções, interagindo diretamente com os neurônios e com os vasos sanguíneos, por exemplo: 1) fornecem aos neurônios energia e substratos para a neurotransmissão; 2) agem como barreiras físicas entre as conexões sinápticas de neurônios vizinhos; 3) controlam o fluxo sanguíneo; 4) mantêm o equilíbrio iônico no espaço extracelular e 5) recrutam células imunes da circulação. Enquanto os oligodendrócitos produzem uma membrana rica em lipídios (mielina), que envolve os axônios, acelerando a condução dos impulsos elétricos (ALLEN; BARRES, 2009).

Micróglia são células de defesa, monofagocíticas, residentes no SNC. São derivadas de células precursoras mieloides e desempenham diversas funções, incluindo a manutenção celular e imunidade inata, respondendo a patógenos ou lesões assépticas (traumas, isquemia, lesão química) (BROWN; VILALTA, 2015). Contudo, a micróglia ativada também desempenha um papel crítico na mediação de vários processos inflamatórios em doenças agudas (acidente vascular cerebral, trauma, meningite) e doenças neurodegenerativas (ZHANG et al., 2015).

Em condições fisiológicas, a micróglia adquire um fenótipo de vigilância, o qual coleta e inspeciona o ambiente local e outros tipos de células cerebrais, incluindo neurônios; então, após exposição a estímulos tornam-se ativadas. Os dois estados de ativação melhor caracterizados são os fenótipos M1 (classicamente ativado) e M2 (alternativamente ativado), os quais são responsáveis pelas respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, respectivamente (FIGURA 10) (SUBRAMANIAM; FEDEROFF, 2017). No fenótipo M1, a micróglia libera citocinas pró-inflamatórias e moléculas neurotóxicas que promovem inflamação e citotoxicidade por meio de uma série de mecanismos: 1) estimulação do fagócito NADPH oxidase para produzir superóxido e derivados oxidantes; 2) expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), produzindo óxido nítrico (NO) e outros derivados oxidantes; 3) liberação de glutamato e glutaminase; 4) liberação de TNF- α ; e 5) fagocitose de neurônios estressados (BROWN; VILALTA, 2015). Em contraste, ao adotar o fenótipo M2, a micróglia libera mediadores anti-inflamatórios, os quais promovem o reparo, a regeneração e a restauração da homeostase (SUBRAMANIAM; FEDEROFF, 2017).

Figura 10 – Estados e funções da polarização microglial.



Fonte: Adaptado de SUBRAMANIAM; FEDEROFF, 2017.

Em condições fisiológicas normais, a micróglia adquire o fenótipo de vigilância para proteger todos os tipos de células do sistema nervoso central, incluindo neurônios. Após a ativação clássica, desencadeada por LPS, IFN- γ ou GM-CSF, a micróglia adquire o fenótipo pró-inflamatório M1, o qual leva à neurotoxicidade através da liberação de vários mediadores e enzimas pró-inflamatórias (exemplo: IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , iNOS). Quando ativada alternativamente por IL-4 ou IL-10, a micróglia polariza para o fenótipo M2, estimulando a neuroproteção através de mediadores anti-inflamatórios (exemplo: IL-10, TGF- β). IL: interleucina; GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos; IFN- γ : interferon-gama; iNOS: óxido nítrico sintase induzida; LPS: lipopolissacarídeo; TGF- β : fator de crescimento de transformação beta; TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa.

A iNOS produz NO, o qual a princípio fornece citoproteção. No entanto, a superexpressão de iNOS aumenta os níveis de NO, o qual pode reagir com o superóxido (gerado pela NADPH oxidase) para produzir o neurotóxico peroxinitrito (ONOO \cdot). Desse modo, a superexpressão de NO está implicado na fisiopatologia de doenças multifatoriais e complexas, tais como a doença de Parkinson, doença de Alzheimer e esclerose múltipla (MINHAS, BANSAL; BANSAL, 2019; BROWN; VILALTA, 2015). Logo, a inibição seletiva de iNOS é um alvo eficaz para o tratamento dessas doenças (MINHAS, BANSAL; BANSAL, 2019).

4 JUSTIFICATIVA

Hippeastrum elegans, uma Amaryllidaceae nativa do Brasil, produz alcaloides com efeitos anti-inflamatório e neuroprotetor, tais como a licorina, galantamina, montanina e narciclasina (PAIVA et al., 2021; LIANG et al., 2020; STARK et al., 2019; CORTES et al., 2018; LIU et al., 2010; SILVA et al., 2006).

A inflamação tem um papel central na fisiopatologia de várias doenças, tais como a asma, a artrite reumatoide, o câncer, as doenças neurodegenerativas e a Covid-19 (CAVALCANTE-SILVA et al., 2021; PRAVALIKA et al., 2018). Estima-se que mais de 50 milhões de pessoas vivem com demência no mundo, das quais 60 - 70% correspondem a Doença de Alzheimer (*Alzheimer's Disease International*, 2019). Modular a função de células que têm um papel importante na resposta imune e inflamatória, como os neutrófilos e a micróglia, têm sido apontadas como alvos terapêuticos emergentes, justificando a pesquisa de novos fármacos (NÉMETH; SPERANDIO; MÓCSAI, 2020; HUGHES et al., 2019; BROWN; VILALTA, 2015).

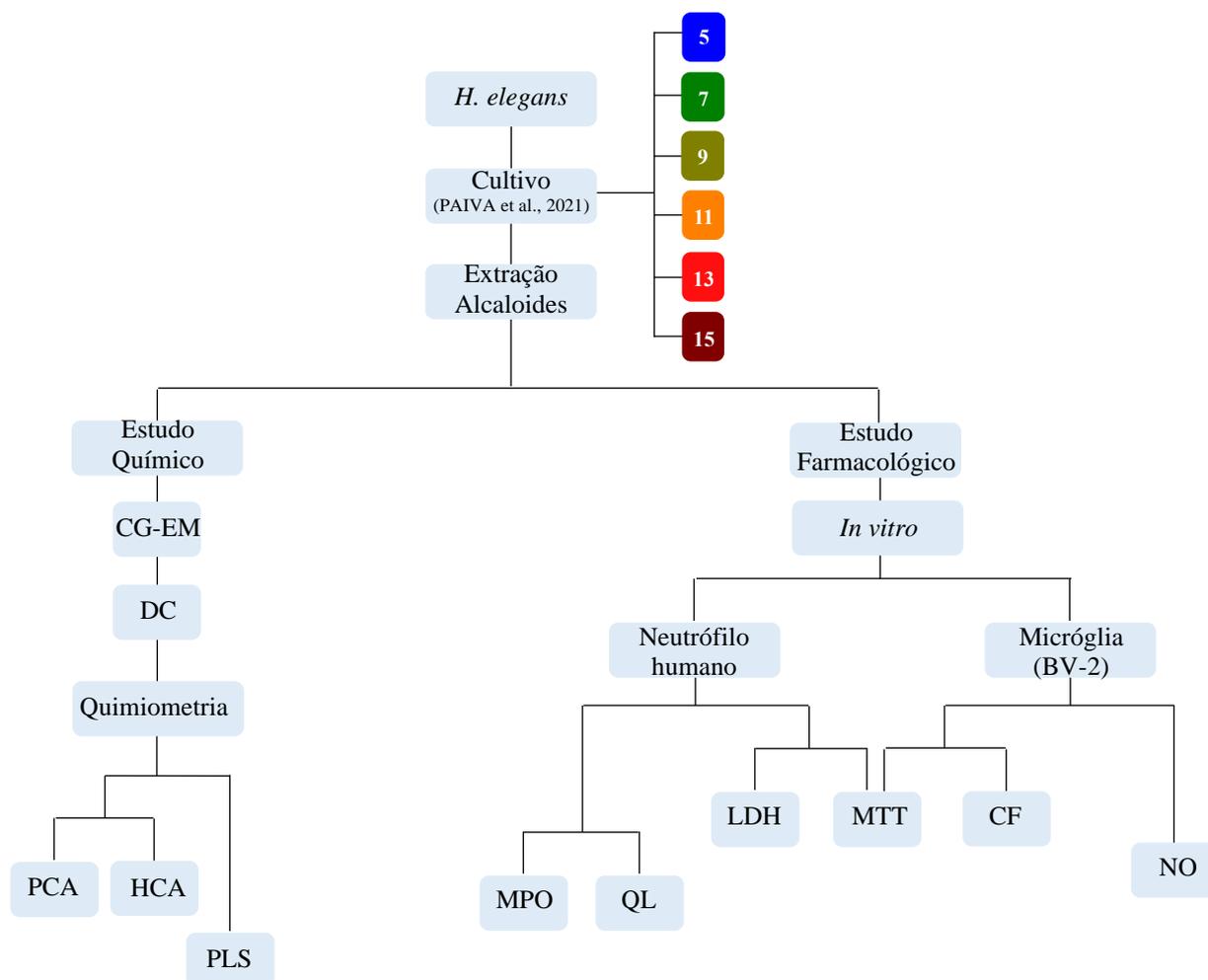
Nesse sentido, os alcaloides de Amaryllidaceae podem ser uma opção terapêutica promissora. Por isso, desenvolvemos uma abordagem baseada em CG-EM associada a análise quimiométrica para discriminar alcaloides com efeito anti-inflamatório em bulbos cultivados de *H. elegans*, em seis tempos de cultivo. Para tanto, utilizamos dois modelos experimentais de inflamação, como degranulação de neutrófilos humanos induzida por PMA e a ativação de micróglia por LPS.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Planejamento do estudo

Trata-se de um estudo experimental, no qual o perfil alcaloídico de bulbos de *H. elegans*, cultivados por 15 meses em um experimento agrônomico desenvolvido na sede da Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE) por Paiva et al. (2021), foi determinado por CG-EM, em seis tempos de colheita (5, 7, 9, 11, 13 e 15 meses). O conjunto de dados químicos foi submetido a análises quimiométricas e ensaios farmacológicos, *in vitro*, em modelo de inflamação periférica e central, utilizando neutrófilo humano e micróglia de roedores (linhagem BV-2), respectivamente. A Figura 11 ilustra na forma de fluxograma os pontos abordados neste estudo.

Figura 11 – Fluxograma detalhando o planejamento do estudo.



Fonte: Elaborado pela autora.

CG-EM: Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas; DC: Deconvolução; PCA: Análise de Componentes Principais; HCA: Análise de Agrupamento Hierárquico; PLS: Análise de regressão por Mínimos Quadrados Parciais; MPO: Mieloperoxidase; QL: Quimioluminescência; LDH: Lactato Desidrogenase; MTT: (3-

(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide); CF: Citometria de Fluxo; NO: Óxido Nítrico.

5.2 Obtenção do material vegetal

Os bulbos de *H. elegans* foram cultivados de acordo com o delineamento experimental descrito por Paiva et al. (2021). Resumidamente, bulbos silvestres de *H. elegans* foram coletados no município de Pacatuba-CE (03°59'03''S, 38°37'13''W) e cultivados por 15 meses no campo experimental da Embrapa Agroindústria Tropical (03°45'4,7''S, 38°34'38,1''W, Fortaleza-Ceará, Brasil), de março de 2016 a junho de 2017. Durante esse período, foram realizadas seis colheitas em intervalos regulares de dois meses, a partir do quinto mês de cultivo, ou seja, aos 5, 7, 9, 11, 13 e 15 meses (FIGURA 12). Após as colheitas, as plantas foram separadas em raízes, bulbos e folhas (quando presentes). Em seguida, os bulbos foram higienizados com água destilada, seccionados em partes menores, e submetidos a secagem em estufa com circulação de ar forçado (40 °C; 7 dias) (FIGURA 13). Adiante, os bulbos secos foram moídos em moinhos de facas e armazenados em sacos plásticos até o momento das extrações.

Um espécime desse material foi depositado no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, onde foi identificado como *Hippeastrum elegans* (Spreng.) H. E. Moore, sob o número 60762, e, em seguida, cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), sob o número A3A7543 (Anexo A, página 117).

Figura 12 – Esquema ilustrativo com a logística do cultivo de *Hippeastrum elegans* em Fortaleza, Ceará.

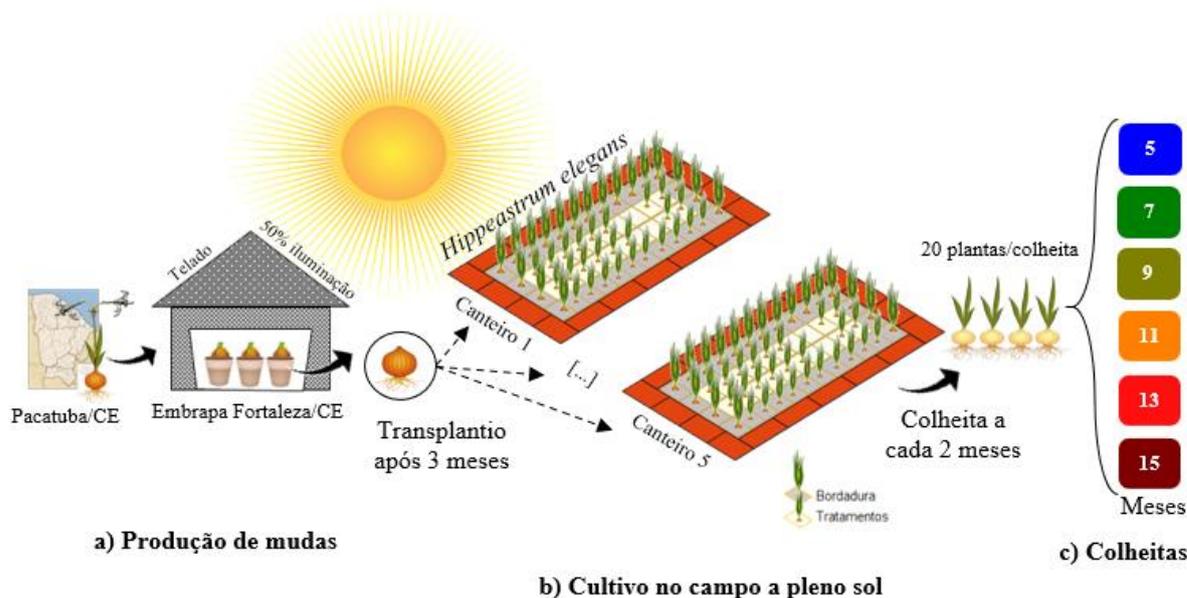


Figura 13 – Etapas do beneficiamento de *Hippeastrum elegans* após a colheita.



Fonte: Autora.

a) Planta após colheita e higienização; b) Planta separada em raízes, bulbo e folhas; c) Raízes, bulbo e folhas seccionadas em fragmentos menores; d) Após secagem em estufa.

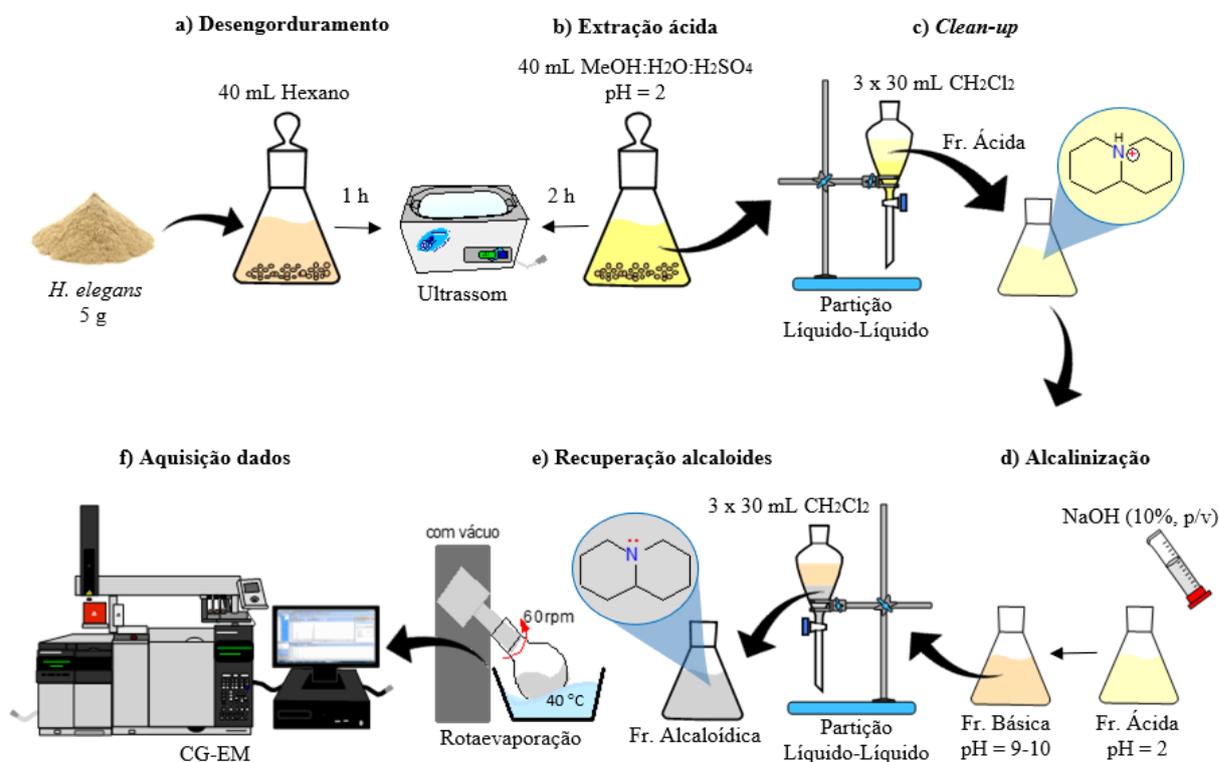
5.3 Estudo químico

5.3.1 Extração de alcaloides

A partição líquido-líquido ácido-base foi escolhida para a extração dos alcaloides, porque atende aos critérios de baixo custo, eficiência, boa seletividade e compatibilidade com a técnica analítica de CG-EM (PILON et al., 2020). Tais vantagens tornam a partição líquido-líquido ácido-base, a técnica de fracionamento (*clean-up*) mais utilizada para a obtenção de frações enriquecidas em alcaloides e livres de interferentes (SIMÕES et al., 2017).

Os alcaloides foram extraídos seguindo metodologia adaptada de Paiva et al. (2020). Primeiramente, a droga vegetal (5 g) foi desengordurada com hexano (40 mL) por 1 h em banho de ultrassom. Adiante, o material vegetal desengordurado foi recuperado por filtração a vácuo e novamente macerado em banho de ultrassom por 2 h com solução hidrometanólica ácida, composta por MeOH:H₂O:H₂SO₄ (89:10:1, v/v/v) (pH 2; 40 mL) para a extração dos alcaloides na forma de sais. Para a etapa de *clean-up*, o extrato ácido foi particionado em funil de separação com CH₂Cl₂ (3 x 30 mL) e, em seguida, a fração ácida foi alcalinizada com solução de NaOH (10%, p/v) até pH 9-10 para recuperação dos alcaloides com CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). Finalmente, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotatório à 60 RPM e 40 °C. Esse procedimento foi realizado em triplicada para cada época de cultivo. As amostras foram armazenadas a - 80 °C até o momento das análises (FIGURA 14) e codificadas conforme disposto no Quadro 1.

Figura 14 – Esquema ilustrativo para obtenção das frações enriquecidas de alcaloides por partição líquido-líquido ácido-base.



Fonte: Elaborado pela autora.

MeOH: metanol; H₂O: água; H₂SO₄: ácido sulfúrico; C₂H₂: diclorometano; NaOH: hidróxido de sódio.

Quadro 1 – Codificação para as frações alcaloídicas de *Hippeastrum elegans* nos seis tempos de colheita.

Tempo de colheita (meses)	Código ^a
05	FHE05
07	FHE07
09	FHE09
11	FHE11
13	FHE13
15	FHE15

^aFrações de *Hippeastrum elegans* de 05 meses a 15 meses

Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.2 Caracterização química por CG-EM

As análises por CG-EM foram realizadas em um instrumento Agilent modelo GC-7890B/MSD-5977A, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (5% fenilmetilpolissiloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Agilent) conectada a um detector de massas do tipo quadrupolo, operando no modo ionização por elétrons a 70 eV, com espectros de massas

registrados na faixa de 40 - 600 m/z , gás carreador hélio com fluxo de 1,00 mL/min, velocidade linear constante de 37,3 cm/s e volume de injeção de 1 μL no modo *Splitless*. Temperatura do injetor 280 °C e rampa de temperatura: 1 min a 120°C, 120-210°C a 15 °C/min, 210-260°C a 8°C/min e 260-300°C a 15 °C/min (CORTES et al., 2018).

5.3.3 *Processamento dos dados*

Os dados brutos de CG-EM foram adquiridos usando o software MassHunter (versão B.06.00, Agilent Technologies), o qual resultou em cromatogramas e espectros de massas (MS) no formato proprietário Agilent *.D. Para a deconvolução no PARADISE (versão 2.6), inicialmente, os cromatogramas foram convertidos para o formato *.CDF usando o software livre OpenChrom (versão 0.6.0, Eclipse Public License 1.0). As regiões de interesse, que são os intervalos de tempo no qual o software aplica a deconvolução, foram selecionados manualmente ao longo do cromatograma. Foram selecionados 83 intervalos, com menos de seis picos por intervalo. As opções de modelagem foram definidas para um máximo de 7 compostos e 2000 iterações máximas por intervalo. Para a validação do modelo, os componentes resolvidos foram selecionados inspecionando manualmente cada intervalo conforme parâmetros de validação descrito por Johnsen et al. (2017). Por fim, a matriz de dados validada resultou em uma tabela de picos contendo o tempo de retenção e a área dos compostos (*.xls). No Apêndice A, Tabela 2, página 111, são apresentados os valores de área dos picos, nos seis tempos de colheita, resultantes da deconvolução.

Os alcaloides foram identificados comparando-se a fragmentação espectral de massas de cada composto com espectros de referência padrão no banco de dados NIST (*NIST Mass Spectral Database, National Institute of Standardization and Technology, USA*), na literatura de Amaryllidaceae e de acordo com as regras de fragmentação, características, para esqueleto tipo licorina e homolicorina (BERKOV et al., 2021; LIANZA et al., 2020), bem como através da comparação dos seus IR com os de compostos conhecidos, obtidos por injeção de uma mistura de padrões contendo uma série homóloga de alcanos (C₇-C₃₀). Quando possível, padrões analíticos autênticos também foram utilizados para confirmar a identificação.

5.4 **Estudo Farmacológico**

5.4.1 *Comitê de Ética*

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob o número CAAE 21210219.2.0000.5054 (Anexo B, página 118).

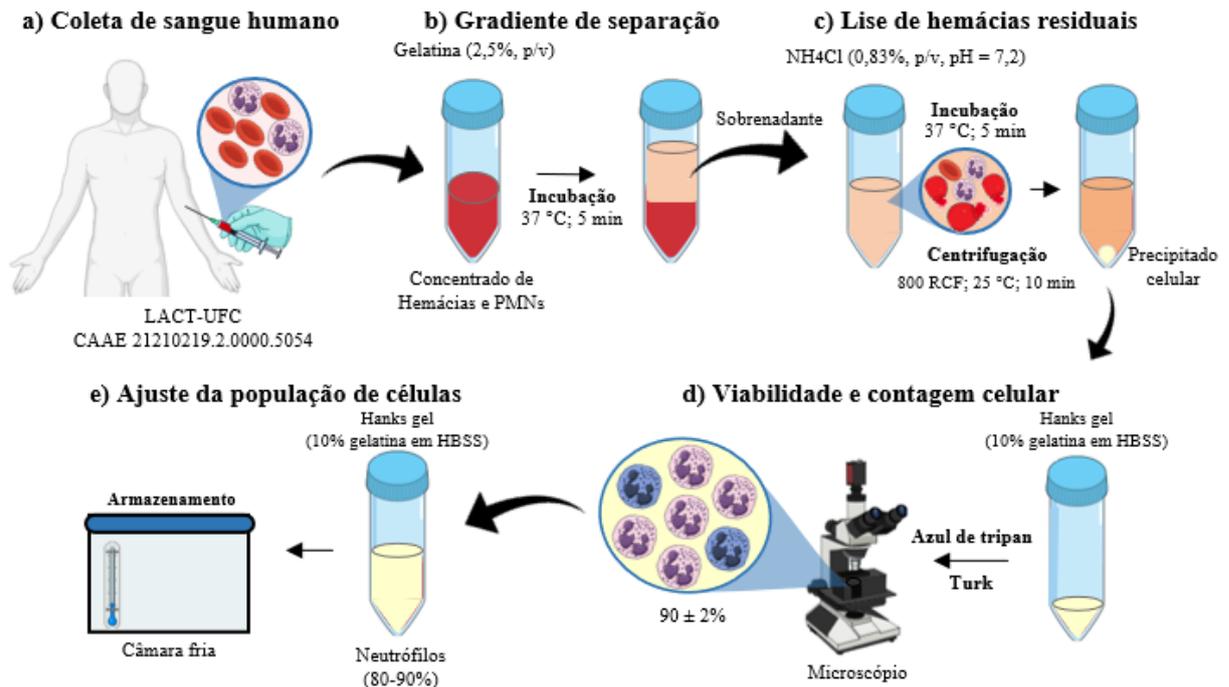
5.4.2 Isolamento de células polimorfonucleares (PMNs) humanos

Células polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos (80-90%), foram obtidos de sangue venoso periférico, coletado de doadores voluntários saudáveis, no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará (LACT - UFC) e isolados conforme método descrito por Henson (1971) e modificado por Lucisano e Mantovani (1984). Para tanto, após a coleta, o sangue foi transferido para tubo Falcon (50 mL) contendo solução salina de Alsever (anticoagulante) na proporção 1:1 e, em seguida, centrifugado por 10 min a 1250 RCF e 25 °C. Adiante, o plasma e a camada branca, composta principalmente por monócitos, foram descartados. Ao concentrado de hemácias e PMNs foi adicionado o dobro do volume de solução de gelatina (2,5%, p/v), seguido de incubação a 37 °C por 15 min, para formação de um gradiente de separação dos componentes sanguíneos. O sobrenadante foi recolhido para outro tubo Falcon (50 mL) e adicionado salina na proporção 1:1, o qual foi novamente centrifugado por 10 min a 800 RCF e 25 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, o precipitado foi ressuspensão com solução salina (0,5 mL) e as hemácias foram lisadas com 45 mL de solução de NH₄Cl levemente aquecida (0,83%, p/v, pH = 7,2) sob incubação a 37 °C por 5 min, seguido de centrifugação por 10 min a 800 RCF e 25 °C. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi ressuspensão com solução salina (10 mL) e, mais uma vez, centrifugado nas mesmas condições descritas anteriormente. Por fim, o sobrenadante foi descartado, o precipitado foi ressuspensão com 1 mL de gel de Hanks (10% de gelatina em HBSS) e a viabilidade celular foi avaliada pela exclusão do azul de tripan (90 ± 2%). Todas as análises foram realizadas em três experimentos independentes. A Figura 15 ilustra resumidamente as etapas para o isolamento de PMNs.

5.4.3 Cultura e Cultivo de células microgliais, linhagem BV-2

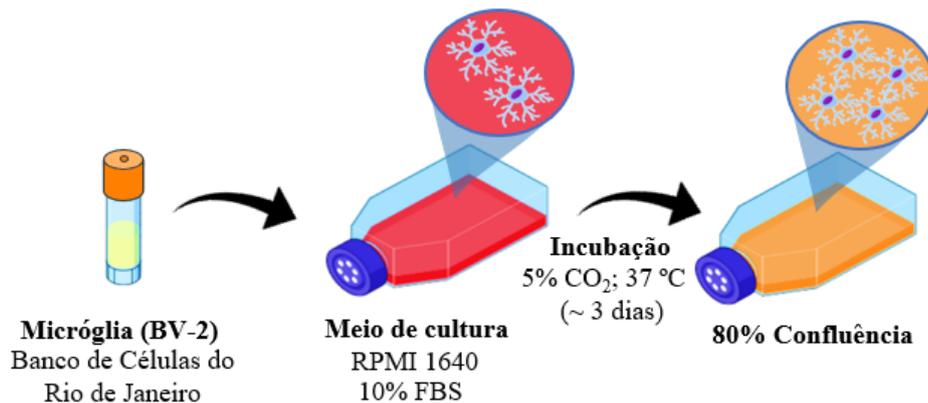
Células microgliais, linhagem BV-2 foram adquiridas comercialmente do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Essa linhagem é comumente utilizada em ensaios de neuroinflamação (WEI et al., 2017; STANSLEY, POST; HENSLEY, 2012). As células BV-2 foram mantidas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) em garrafas de cultura (25 cm²), sob atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Antes de iniciar os testes, as células foram subcultivadas até atingirem 80% de confluência (cerca de 3 dias). A Figura 16 ilustra o procedimento de cultivo das células BV-2.

Figura 15 – Representação esquemática das principais etapas do isolamento de polimorfonucleares humanos.



Fonte: Elaborado pela autora.
NH₄Cl: cloreto de amônio.

Figura 16 – Representação esquemática para o cultivo celular de micróglia (linhagem BV-2).



Fonte: Elaborado pela autora.

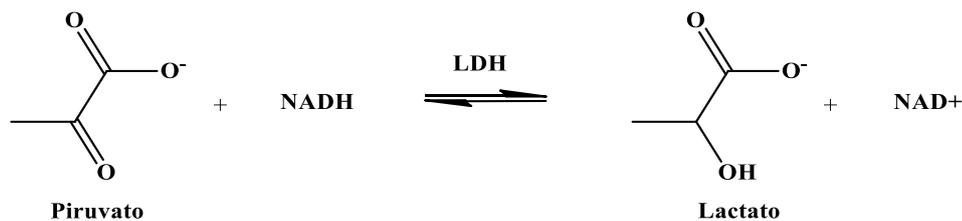
5.4.4 Ensaio de citotoxicidade

5.4.4.1 Atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) em neutrófilo humano

A LDH é uma enzima normalmente localizada no citoplasma celular, responsável por catalisar a conversão de piruvato em lactato com a regeneração de NADH em NAD⁺ (Figura 17). Essa conversão é essencial em condições de hipóxia e anaeróbia, quando a

produção de ATP por fosforilação oxidativa é interrompida (ALEGRE et al., 2015). A concentração de LDH no sobrenadante celular é comumente usada como um biomarcador de dano ou morte celular, com ruptura da membrana plasmática. Desse modo, no ensaio, o decréscimo da absorvância em 340 nm, devido a oxidação de NADH, é proporcional à atividade da LDH na amostra teste.

Figura 17 – Representação esquemática para a reação de conversão do piruvato a lactato por ação da Lactato Desidrogenase (LDH).



Fonte: Elaborado pela autora.

A suspensão de neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL, q.s.p 150 μL /poço) foi incubada por 15 min a 37 °C com 1,5 μL das frações alcaloídicas (2; 5; 10; 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, p/v), 1,5 μL de DMSO (1%, v/v - controle), 15 μL de HBSS (células não tratadas) e 15 μL de Triton x-100 (0,2%, v/v - padrão citotóxico) em placa de 96 poços. A seguir, a placa foi centrifugada por 10 min a 800 RCF e 4 °C. Transferiu-se 30 μL do sobrenadante de cada grupo para outra placa, e aos poços foram adicionados 270 μL do reagente de trabalho, composto por tampão fosfato (pH 7,5), piruvato de sódio (1,2 $\mu\text{mol}/\text{L}$), NADH (300 mmol/L) e azida sódica, o qual foi preparado conforme especificado no Kit LDH Liquiform (Labtest Diagnóstica). Logo após, realizou-se a leitura em um leitor de microplacas a 340 nm, nos tempos 1 e 3 min (FIGURA 18) (BERGMEYER; BERNT, 1963). A atividade da enzima LDH foi calculada seguindo-se as especificações do fabricante, conforme apresentado na equação 1:

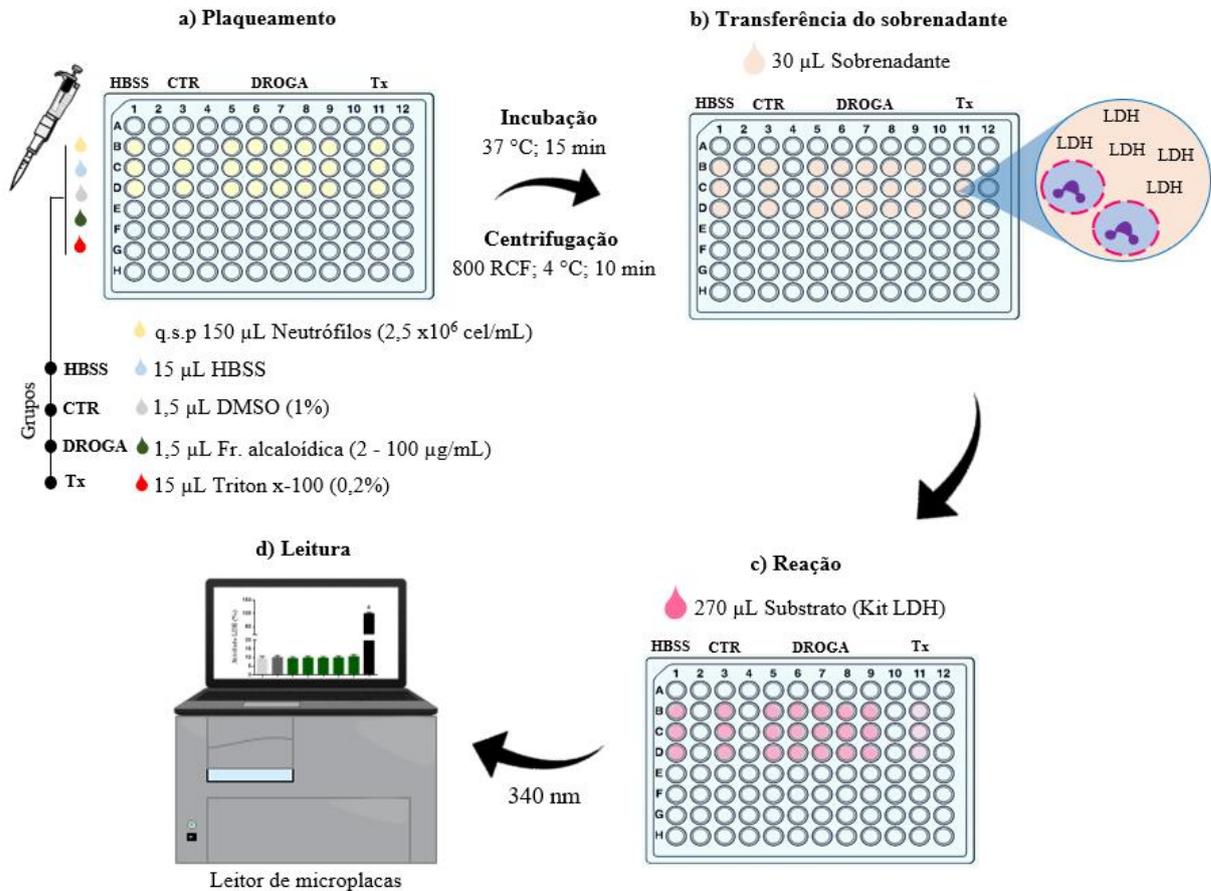
Equação 1:

$$A = \left[\frac{(A_1 - A_2)}{2} \right] \times 25601,6$$

Onde:

- A = atividade da enzima LDH na amostra em U/L;
- A₁ = absorvância inicial (1 min) em 340 nm;
- A₂ = absorvância final (3 min) em 340 nm;
- 25601,6 = fator de correção estipulado pelo fabricante.

Figura 18 – Representação esquemática para o ensaio de atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH).

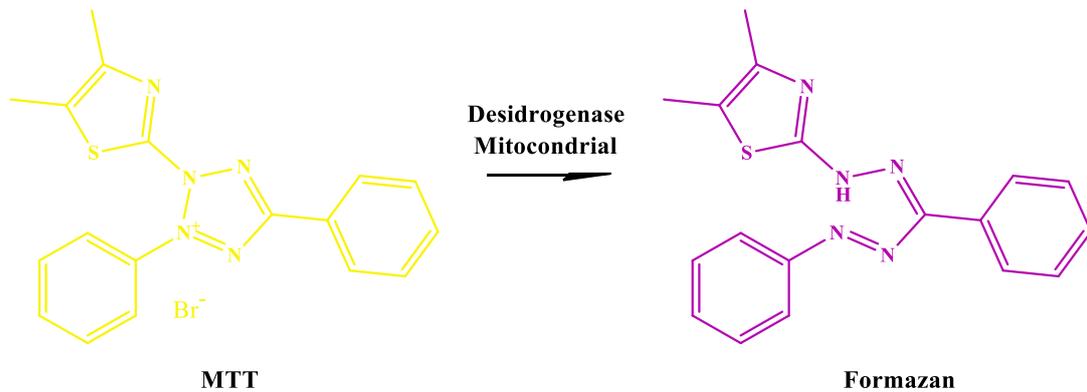


Fonte: Elaborado pela autora.

5.4.4.2 Ensaio colorimétrico de MTT em neutrófilo humano

O ensaio colorimétrico de MTT tem sido amplamente utilizado para avaliar a atividade metabólica celular (KUETE; KARAOSMANOGLU; SIVAS, 2017). No ensaio, a viabilidade celular é avaliada por meio da redução do MTT (um sal de tetrazólio de cor amarela), principalmente pelas desidrogenases mitocondriais, em cristais de formazan de coloração roxa (FIGURA 19). Desse modo, a quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis. Portanto, o ensaio de MTT é dependente da respiração mitocondrial e indiretamente serve para avaliar a capacidade de energia celular de uma célula. Células não-viáveis perdem a capacidade metabólica de internalizar e clivar o MTT (MOSMANN, 1983).

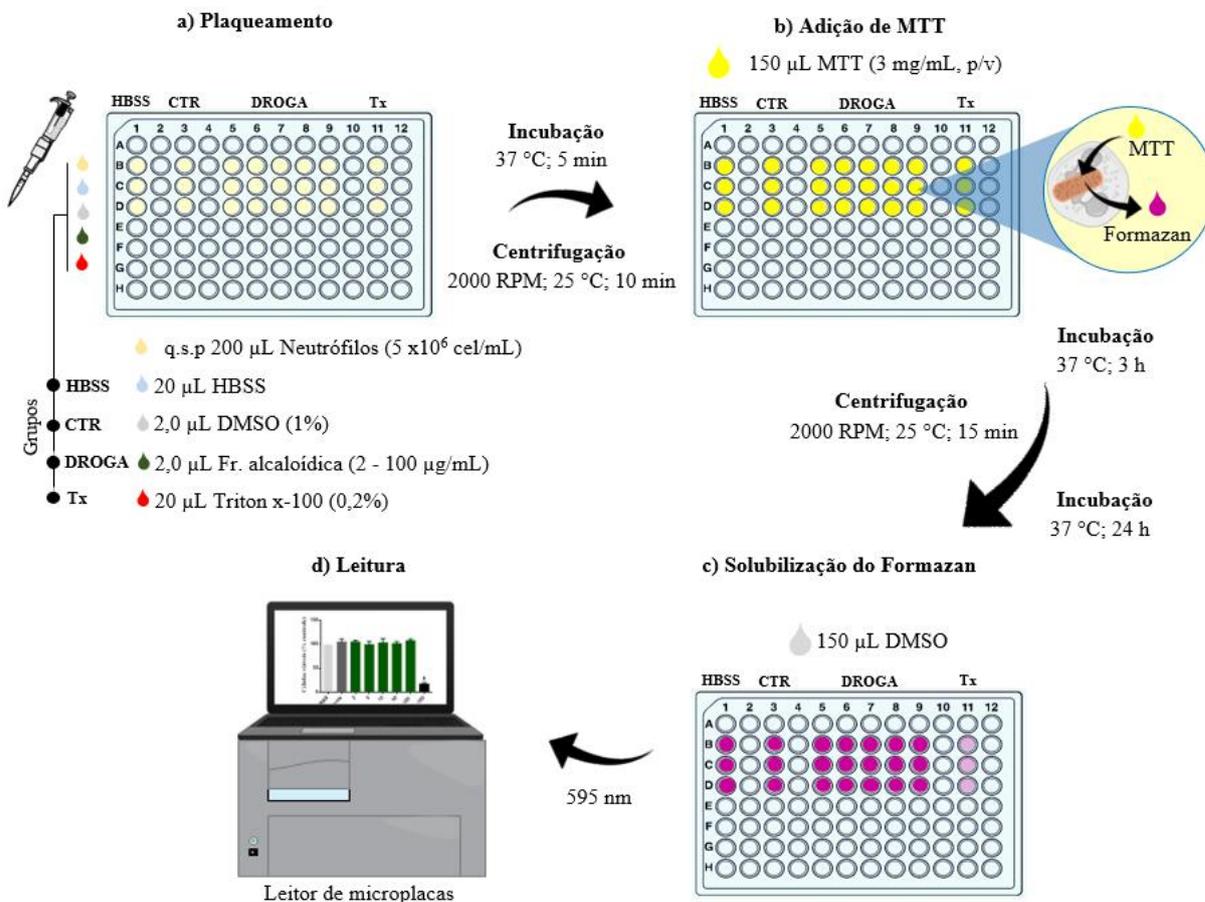
Figura 19 – Representação esquemática para a reação de conversão do sal de MTT a formazan, por ação das desidrogenases mitocondriais.



Fonte: Elaborado pela autora.

A suspensão de neutrófilos (5×10^6 células/mL, q.s.p 200 μL /poço) foi incubada por 30 min a 37 °C com 2 μL das frações alcaloídicas (2 - 100 $\mu\text{g/mL}$, p/v), 2 μL de DMSO (1%, v/v - controle), 20 μL de *HBSS* (células não tratadas) e 20 μL de Triton x-100 (0,2%, v/v - padrão citotóxico) em placa de 96 poços. A seguir, a placa foi centrifugada por 10 min a 2000 RPM e 25 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi incubado novamente com 150 μL de solução de MTT (3 mg/mL, p/v) por 3 horas. Decorrido esse tempo, a placa foi centrifugada por 15 min a 2000 RPM e 25 °C, o sobrenadante foi descartado e a placa novamente incubada (24 h a 37 °C). Por fim, foi adicionado 150 μL de DMSO para solubilização do formazan, seguido de leitura em leitor de microplacas a 595 nm (FIGURA 20). A viabilidade celular foi expressa através do valor percentual em relação ao grupo controle (MOSMANN, 1983).

Figura 20 – Representação esquemática para o ensaio colorimétrico de MTT usando neutrófilo humano.



Fonte: Elaborado pela autora.

5.4.4.3 Ensaio colorimétrico de MTT em micróglia (linhagem BV-2)

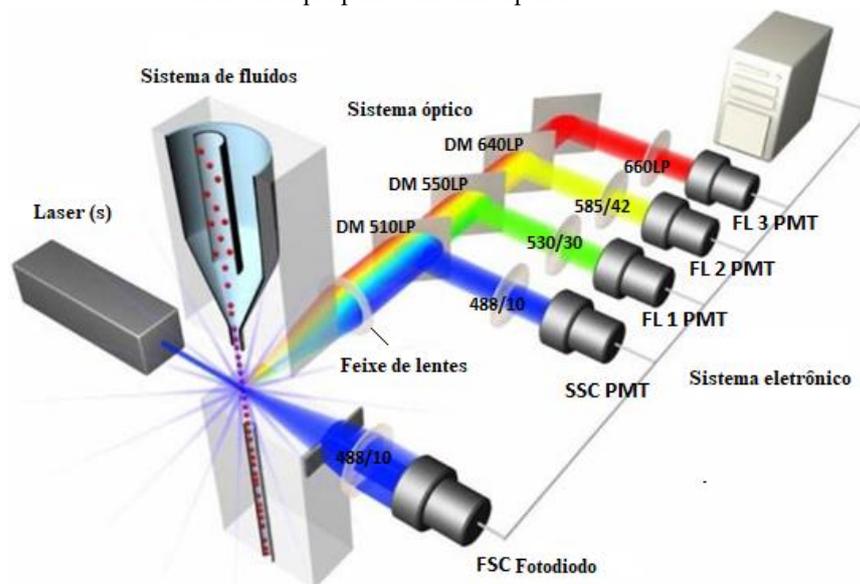
Células microgliais (1×10^5 células/mL, 170 μL) foram plaqueadas em placa de 96 poços estéril (200 μL /poço), em triplicada para cada grupo, na presença ou ausência de LPS na concentração de 0,5 mg/mL, diluído em meio de cultura (RPMI 1640 + 10% de FBS). Foram adicionados 20 μL das frações alcaloídicas nas concentrações de 0,5; 1; 2,5; 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ em cada poço, seguido de incubação em atmosfera de 5% de CO_2 a 37 °C por 60 min. Em seguida, foram adicionados 10 μL de meio de cultura aos grupos controle sem LPS e 10 μL de LPS aos grupos estimulados. Novamente, a placa foi incubada nas mesmas condições descritas acima, porém, por 24 horas. Transcorrido esse tempo, adicionou-se em cada poço 22 μL de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultura) e a placa foi novamente incubada (90 min), seguida de centrifugação (800 RCF; 25 °C; 10 min). O sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan foram ressuspensos com 150 μL de DMSO. Por fim, a placa foi agitada por 10 min e

logo em seguida realizada a leitura a 570 nm em leitor de microplacas.

5.4.4.4 Perfil de morte celular por citometria de fluxo em micróglia (linhagem BV-2)

A citometria de fluxo consiste na análise e classificação simultânea de partículas individuais com base em suas características físicas, suspendendo-as em um fluxo contínuo de fluido (solução salina), que passa por um feixe de luz (MCKINNON, 2018; BERNY-LANG et al., 2013). Cada partícula é analisada quanto à dispersão de luz visível e um ou vários parâmetros de fluorescência. A dispersão de luz visível é medida em duas direções diferentes, a direção direta (FSC, do inglês *Forward Scatter*) que pode indicar o tamanho relativo da célula, e a dispersão lateral (SSC, do inglês *Side Scatter*), que indica a complexidade interna da célula, de acordo com a presença de estruturas celulares, por exemplo, o núcleo, grânulos e organelas (MCKINNON, 2018). Além disso, quando partículas de interesse são marcadas com fluorocromos, o feixe de luz excita essas moléculas, em um determinado comprimento de onda, que, conseqüentemente, resulta na emissão de luz em um comprimento de onda maior, o qual é captado por detectores específicos e registrado. Desse modo, dependendo do tipo de fluorocromo, as células podem ser investigadas, por exemplo, quanto ao metabolismo celular, presença de marcadores citoplasmáticos e de membrana. A Figura 21, ilustra resumidamente os componentes de um citômetro de fluxo convencional, com destaque para o sistema óptico.

Figura 21 – Representação esquemática dos componentes básicos de um citômetro de fluxo convencional, com destaque para o sistema óptico.



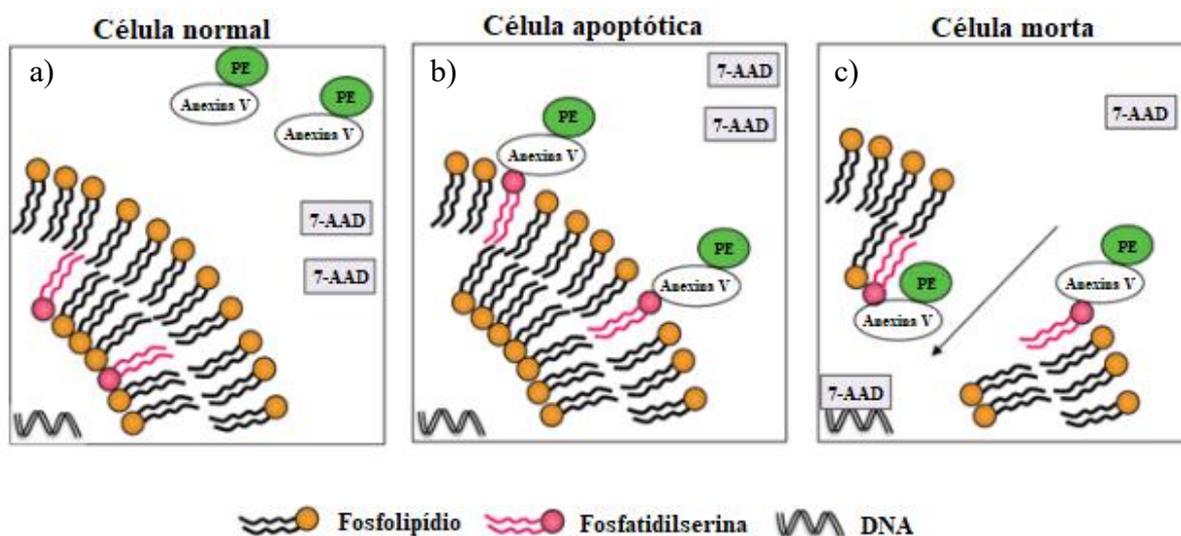
Fonte: Adaptado de MATER METHODS, 2012.

FSC: *Forward Scatter*; SSC: *Side Scatter*; PMT: Fotodetectores; FL: Fonte de laser.

No presente estudo, os marcadores fluorescentes 7-AAD (*7-aminoactinomycin D*) e Ax/PE (anexina V marcada com ficoeritrina) foram utilizados para avaliar o mecanismo de morte celular, induzida pela fração alcaloídica (FHE15) em células microgлияis (linhagem BV-2) por citometria de fluxo, seguindo metodologia adaptada de Kumar et al. (2015). A marcação com Ax/PE e 7-AAD permite discriminar células em apoptose precoce, apoptose tardia e/ou necrose (ZIMMERMANN; MEYER, 2011).

A anexina V é uma proteína que pode ser conjugada a fluorocromos, atuando como uma sonda sensível para a análise de células em apoptose, ao ligar-se a fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática. Quando uma célula sofre morte celular por apoptose, a fosfatidilserina, um componente fosfolípido interno da membrana celular, sofre externalização, permitindo o reconhecimento e subsequente fagocitose por macrófagos, antes que a integridade da membrana seja perdida. Enquanto, o 7-AAD é um intercalador de DNA, considerado um corante vital. Células com membrana íntegra não permitem a penetração e ligação do 7-AAD ao DNA, por isso, células 7-AAD positivas são consideradas necróticas (KUMAR et al., 2015; ZIMMERMANN; MEYER, 2011) (FIGURA 22).

Figura 22 – Representação esquemática para o processo de necrose e apoptose por coloração com 7-AAD e anexina V/PE.



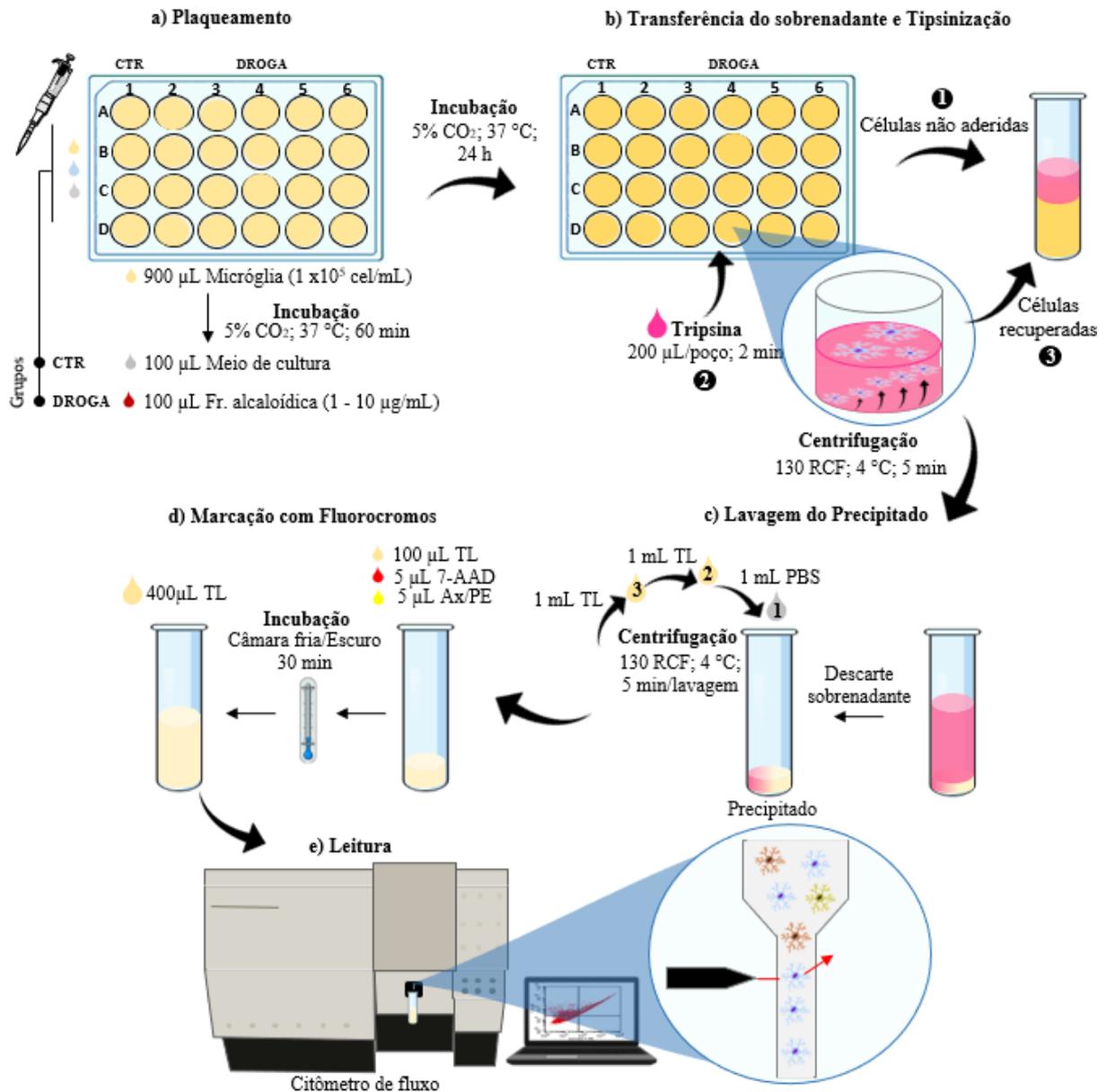
Fonte: Adaptado de ZIMMERMANN; MEYER, 2011.

a) Célula normal: marcação negativa para 7-AAD e anexinaV/PE; b) Célula apoptótica: externalização da fosfatidilserina e ligação a anexina V/PE; c) Célula morta: dupla marcação (7-AAD e anexinaV/PE) por perda da integridade da membrana plasmática e ligação à fosfatidilserina. 7-AAD: *7-aminoactinomycin D*; Anexina V/PE: anexina V marcada com ficoeritrina.

Inicialmente, as células microgлияis (1×10^5 células/mL, 900 μ L) foram plaqueadas em placa de 24 poços estéril e incubada em atmosfera de 5% de CO_2 a 37 °C por 60 min. Após esse tempo, foram adicionados aos poços 100 μ L da fração FHE15 nas concentrações de 1; 2,5; 5 e 10 μ g/mL, diluídas em DMSO (0,1%, v/v) e 100 μ L de meio de cultura contendo 0,1% de DMSO (grupo controle). A placa foi novamente incubada em atmosfera de 5% de CO_2 a 37 °C por 24 h. Transcorrido esse tempo, o meio sobrenadante de cada poço, contendo células não aderidas, foi transferido para tubos de citometria (5 mL) e as células aderidas foram então tripsinizadas (200 μ L de tripsina/poço, 2 min) e transferidas para os tubos correspondentes, seguido de centrifugação (130 RCF; 4 °C; 5 min). Antes da tripsinização, as células aderidas foram lavadas com 200 μ L de tampão PBS. Essa lavagem prévia garante que a tripsina não será inativada com resíduo de FBS presente no poço. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado submetido a três lavagens sequenciais: uma vez com PBS (1 mL) e duas vezes com tampão de ligação (1 mL), intervaladas por centrifugação (130 RCF; 4 °C; 5 min). O tampão de ligação é uma solução salina com cálcio, disponível no Kit comercial (PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences), e foi diluída 10 vezes em água Milli-Q, conforme especificado no Kit. O cálcio é necessário na solução porque permite a ligação da anexina V a fosfatidilserina (MAGRO, 2013). Prosseguindo, após a última centrifugação, o precipitado foi ressuspenso em 100 μ L de tampão de ligação, 5 μ L de 7-AAD e 5 μ L de Ax/PE. Por fim, após 30 min de incubação em câmara de gelo e na ausência de luminosidade, foi adicionado 400 μ L de tampão de ligação em cada tubo e as células foram analisadas no citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences, Nova Jersey, EUA) (FIGURA 23).

Para cada tubo, uma alíquota de 10^4 células foi analisada para quantificação do percentual de células não-marcadas e individual ou duplamente marcadas com 7-AAD e Ax/PE, os quais foram excitados com laser de argônio (488 nm). As células marcadas com Ax/PE foram lidas pelo detector FL₂ (563 - 606 nm, fluorescência de cor amarela), enquanto as células marcadas com 7-AAD foram lidas pelo detector FL₃ (615 - 645 nm, fluorescência de cor vermelha) (MENEZES et al., 2019).

Figura 23 – Representação esquemática para o ensaio de citometria de fluxo com micrógliia (linhagem BV-2).



Fonte: Elaborado pela autora.

PBS: tampão fosfato-salino; TL: tampão de ligação; 7-AAD: 7-aminoactinomicyn D; Ax/PE: anexina V marcada com ficoeritrina

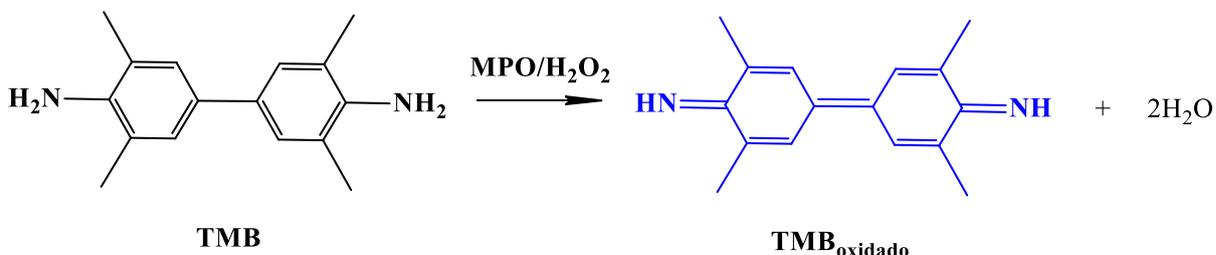
5.4.5 Atividade Anti-inflamatória in vitro

5.4.5.1 Degranulação de neutrófilo humano induzida por PMA

A degranulação neutrofilica foi avaliada através da liberação de MPO, usando tetrametilbenzidina (TMB) como substrato. O ensaio é baseado na oxidação do TMB pela MPO na presença de H₂O₂. O TMB oxidado apresenta coloração azul, cuja a intensidade da coloração é proporcional a atividade da MPO (FIGURA 24), após os neutrófilos serem ativados com acetato miristato de forbol (PMA) (PIWOWARSKI; GRANICA; KISS, 2014; ANDREWS;

KRINSKY, 1982). O PMA é um éster de forbol, análogo ao diacilglicerol (DAG), o qual estimula a degranulação neutrofílica e a produção de EROs por meio da ativação direta das diferentes isoformas da proteína quinase C (PKC) (BERTRAM; LEY, 2011; SAITO et al., 2005).

Figura 24 – Representação esquemática para a reação de oxidação do TMB por MPO na presença de H_2O_2 .

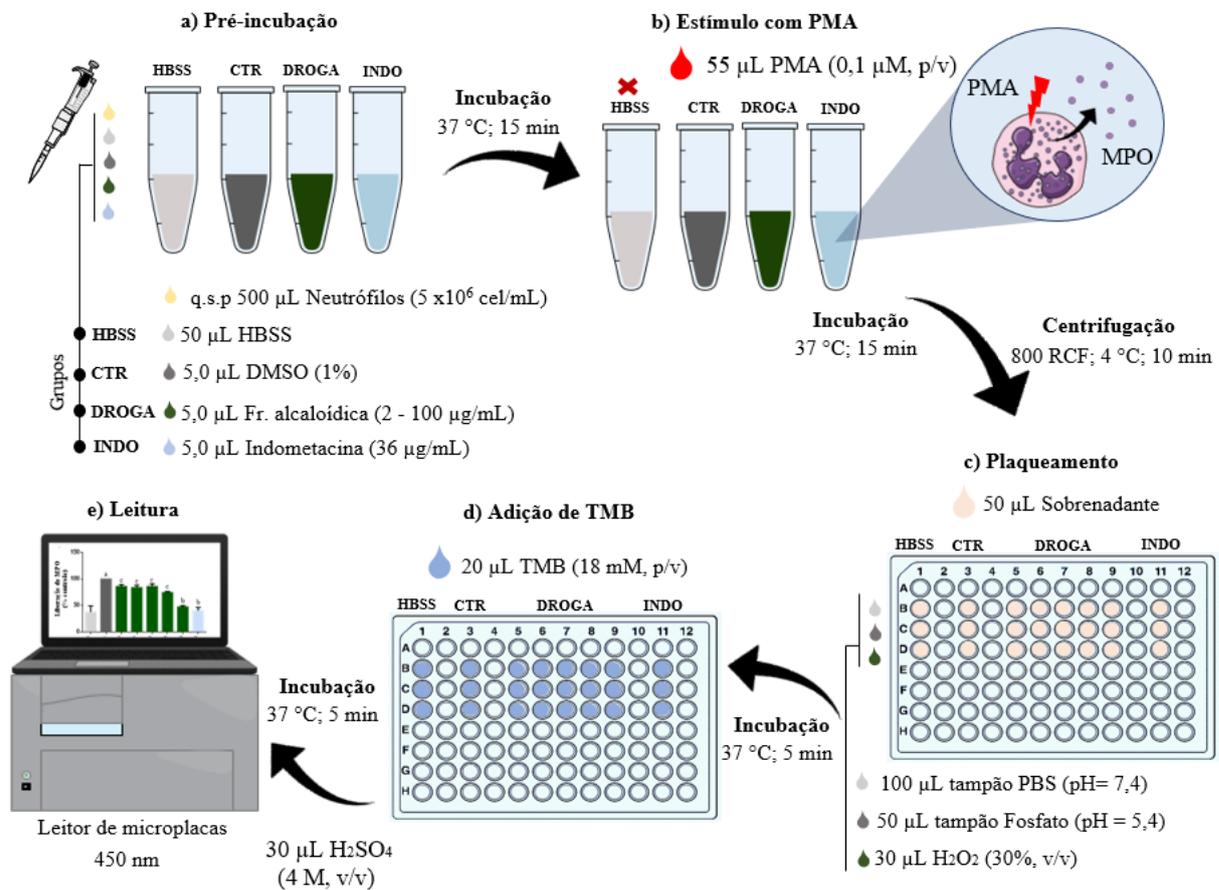


Fonte: Elaborado pela autora.

O TMB oxidado apresenta a cor azul, na qual a intensidade da coloração é proporcional a quantidade de MPO liberada pelo neutrófilo após a degranulação. TMB: Tetrametilbenzidina; MPO: Mieloperoxidase; H_2O_2 : Peróxido de hidrogênio; H_2O : Água.

A suspensão de neutrófilos (5×10^6 células/mL, q.s.p 500 μL) foi pré-incubada em tubos tipo Eppendorfs (2 mL) durante 15 min a 37 °C com 5 μL das frações alcaloídicas (2 - 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, p/v), 5 μL de DMSO (1%, v/v - controle), 5 μL de Indometacina (36 $\mu\text{g}/\text{mL}$, p/v - droga padrão anti-inflamatória) e 50 μL de HBSS (células não tratadas). A seguir, as células foram estimuladas com 55 μL de PMA (0,1 μM , p/v) em cada grupo, com exceção do grupo HBSS (células não tratadas), e novamente incubados por 15 min a 37 °C. Adiante, os tubos foram centrifugados por 10 min a 800 RCF e 4 °C, então, 50 μL do sobrenadante, rico em enzimas liberadas pela degranulação leucocitária, foram transferidos para uma placa de 96 poços contendo 100 μL de tampão PBS (pH = 7,4), 50 μL de tampão fosfato (pH = 5,4) e 30 μL de solução de H_2O_2 (30%, v/v), seguido de incubação por 5 min a 37 °C. A seguir, adicionou-se 20 μL do substrato TMB (18 mM, p/v), após 5 min de incubação, a reação foi encerrada adicionando-se 30 μL de solução de H_2SO_4 (4 M, v/v), seguido de leitura em leitor de microplacas a 450 nm (ÚBEDA; FERRÁNDIZ; HERENCIA, 2002). Os resultados foram expressos como percentual de liberação de mieloperoxidase (FIGURA 25).

Figura 25 – Representação esquemática para o ensaio de dosagem de mieloperoxidase (MPO) em neutrófilo humano.



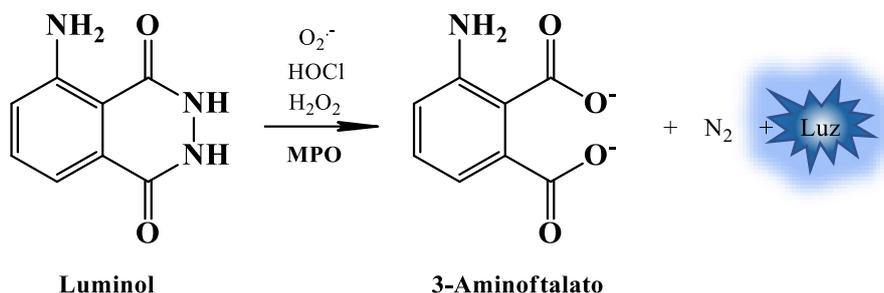
Fonte: Elaborado pela autora.

MPO: mieloperoxidase; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; H₂SO₄: ácido sulfúrico; TMB: tetrametilbenzidina; PMA: acetato miristato de forbol.

- Avaliação da produção de EROs por quimioluminescência em neutrófilo humano

O ensaio de quimiluminescência dependente de luminol (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona) é considerado um método robusto para a detecção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (BEDOUHÈNE et al., 2017). O luminol reage, principalmente, com os EROs gerados pela NADPH oxidase e MPO. Além disso, a sonda luminol possui propriedades físico-químicas que favorecem sua difusão através das membranas biológicas, possibilitando sua reação com EROs intra e extracelulares (BEDOUHÈNE et al., 2017; ALBRECHT; JUNGI, 1993). O ensaio é baseado na oxidação do luminol na presença de EROs, resultando em um intermediário de alta energia, o qual emite luz azul ao retornar para seu estado fundamental (3-aminoftalato) (ALSHETAIWI et al., 2013) (FIGURA 26).

Figura 26 – Representação esquemática para a reação de oxidação do luminol.

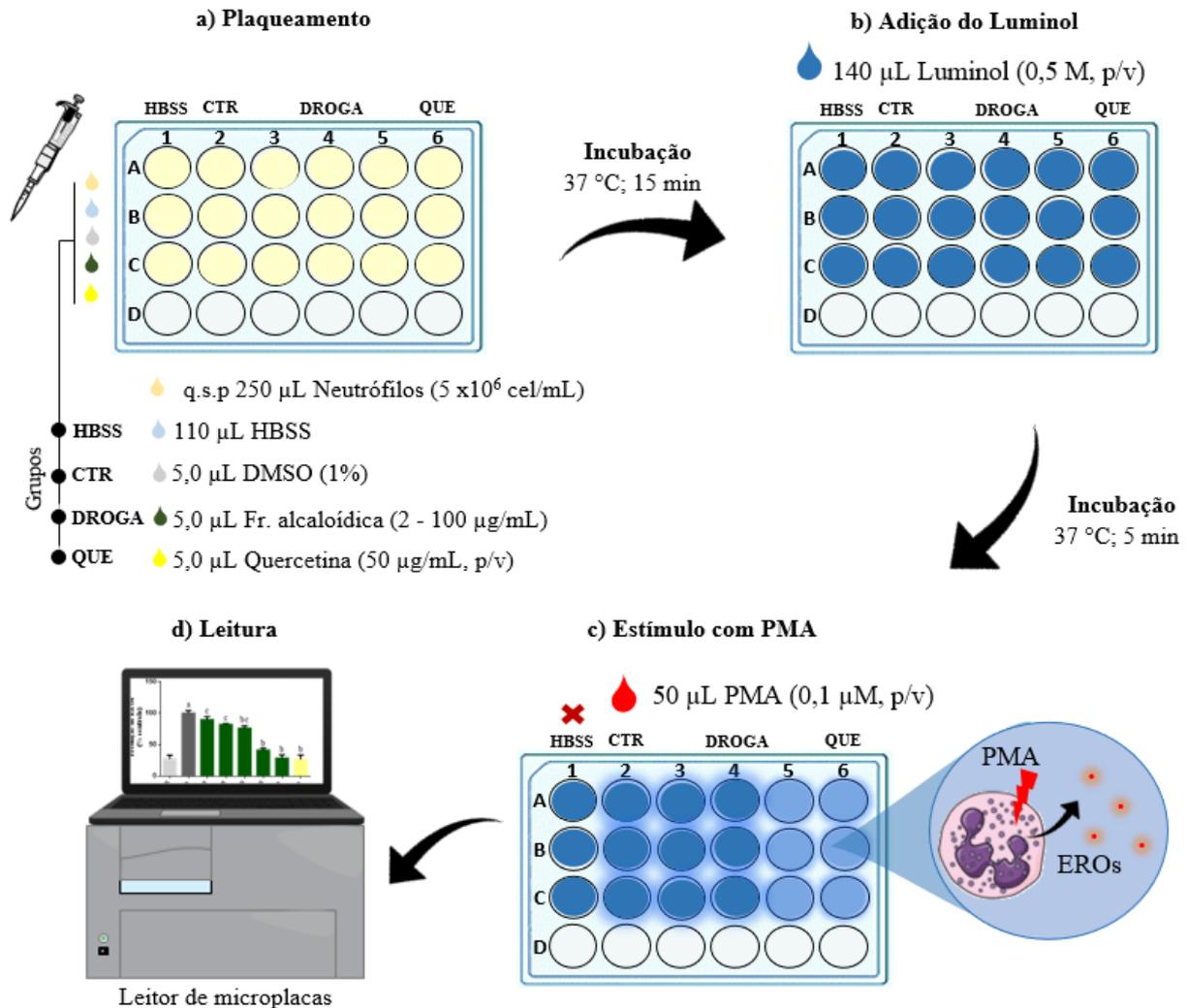


Fonte: Adaptado de ALSHETAIWI et al., 2013.

$\text{O}_2^{\cdot-}$: ânion superóxido; HOCl: ácido hipocloroso; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; MPO: mieloperoxidase.

A suspensão de neutrófilos (5×10^6 células/mL, 250 μL) foi pré-incubada durante 15 min a 37 °C com 5 μL da fração FHE07 (2 - 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, p/v), 5 μL de DMSO (1%, v/v - controle), 5 μL de quercetina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, p/v - droga padrão antioxidante) e 110 μL de HBSS (células não tratadas) em placas de 24 poços. Em seguida, 140 μL da sonda luminol (0,5 M, p/v) foi adicionada em todos os poços e a placa novamente incubada a 37 °C por 5 min. A produção de EROs foi iniciada pela adição de 50 μL de PMA (0,1 μM , p/v), com exceção do grupo basal (HBSS - células não tratadas). Alterações na quimioluminescência foram medidas imediatamente por 20 min em um leitor de microplacas a 37 °C. Os resultados foram expressos através do percentual de emissão de quimioluminescência correspondente a produção de EROs (PIWOWARSKI; GRANICA; KISS, 2014) (FIGURA 27).

Figura 27 – Representação esquemática para o ensaio de quimioluminescência em neutrófilo humano.



Fonte: Elaborado pela autora.

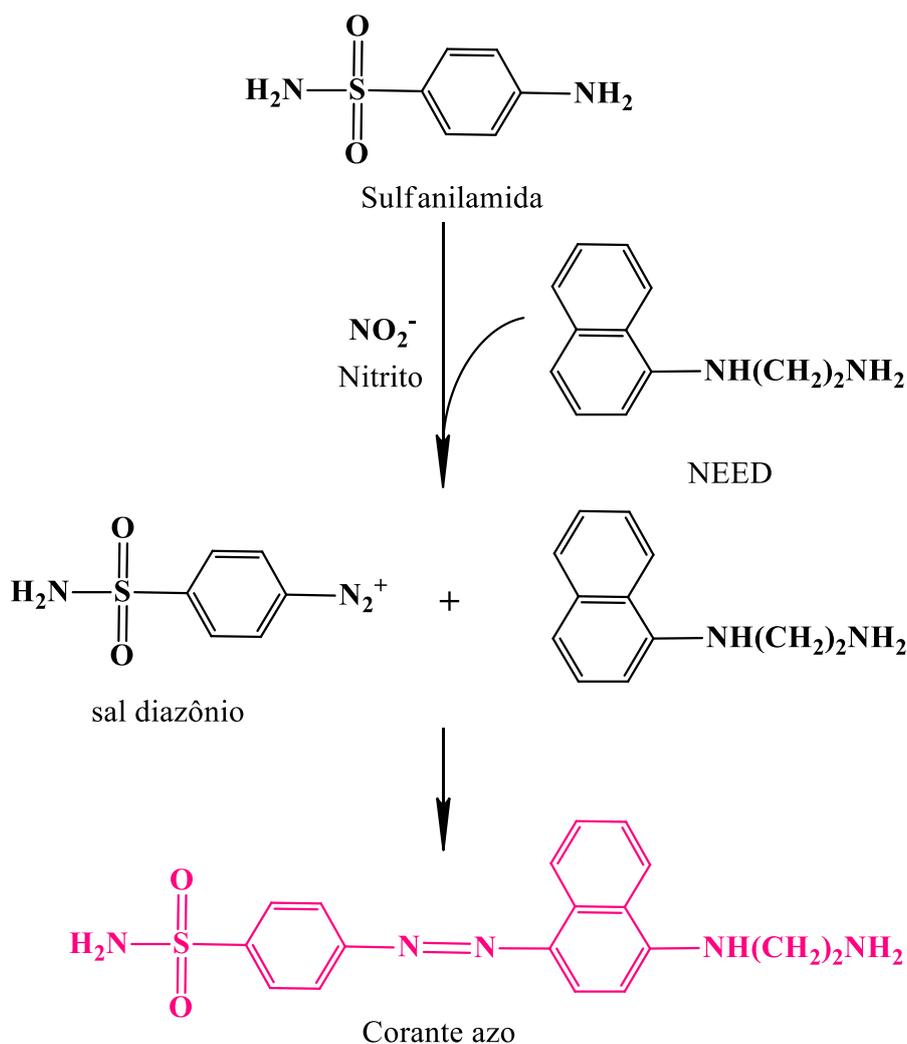
EROS: espécies reativas de oxigênio; PMA: acetato miristato de forbol.

5.4.5.2 Ativação de micróglia (linhagem BV-2) induzida por LPS

A ativação das células microgliais foi mensurada pela determinação da concentração de NO. Dentre os diversos métodos para determinação de NO (espectroscópicos e eletroquímicos), o ensaio colorimétrico de Griess é o mais frequentemente utilizado, devido ao baixo custo e execução simples (HETRICK, SCHOENFISCH, 2009). O ensaio de Griess mede o NO indiretamente como nitrito (NO_2^-), um produto predominante da oxidação espontânea de NO. A reação ocorre em duas etapas, utilizando solução de sulfanilamida com 5% de ácido fosfórico (H_2PO_4) e N-1-naftiletilediamina (NEED); solução denominada como reagente de Griess. Primeiro o NO_2^- reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar o sal de diazônio intermediário, o qual posteriormente reage com NEED para formar o produto

azo estável, de cor rosa, fortemente absorvido a 540 nm (FIGURA 28). A intensidade da coloração é proporcional a quantidade de nitrito na amostra (HETRICK; SCHOENFISCH, 2009; BRYAN; GRISHAM, 2007).

Figura 28 – Representação esquemática para a reação de diazotização (reação de Griess).



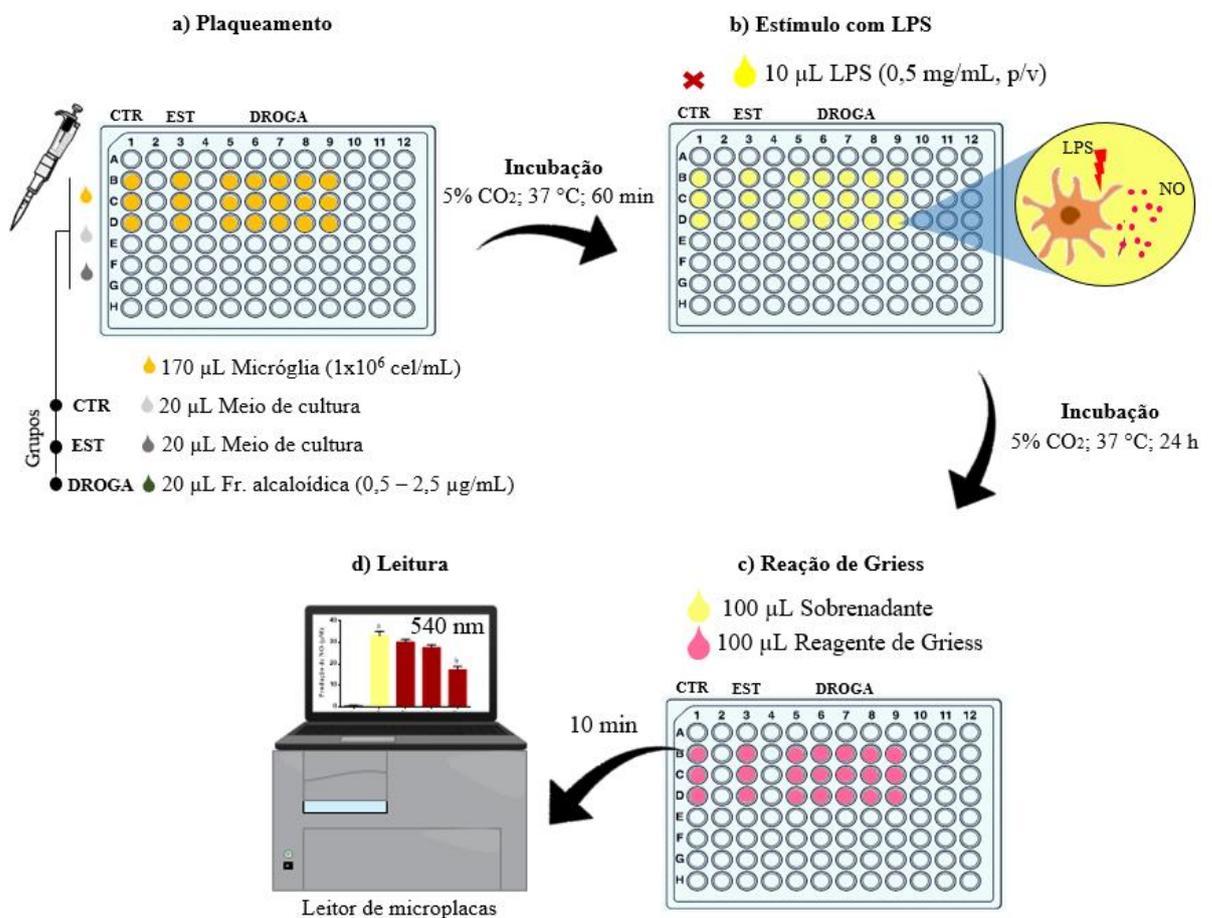
Fonte: Elaborado pela autora.

O produto da reação é um corante azo de cor rosa, na qual a intensidade da coloração é proporcional a quantidade de nitrito na amostra. NEED: N-1-naftiletelenodiamina.

Para essa atividade apenas a fração de 15 meses (FHE15) foi considerada, conforme metodologia adaptada de Park et al. (2018). Desse modo, células microgлияis (1×10^6 células/mL) foram plaqueadas (170 μL) em placa de 96 poços estéril e aos grupos foram adicionados 20 μL da fração FHE15, nas concentrações isentas de citotoxicidade (0,5; 1; 2,5 $\mu\text{g/mL}$) e 20 μL de meio de cultura ao grupo controle/estimulado. A placa foi incubada por 60 min em atmosfera

de 5% de CO₂ a 37 °C. Adiante, adicionou-se 10 µL de LPS (0,5 mg/mL em meio de cultura) em todos os grupos, com exceção do grupo controle. Novamente, a placa foi incubada por 24 h. Transcorrido esse tempo, 100 µL do sobrenadante de cada poço foi transferido para outra placa, na qual foram adicionados 100 µL do reagente de Griess em cada poço. A reação ocorreu por 10 min na ausência de luminosidade e, logo em seguida, foi realizada a leitura em leitor de microplacas a 540 nm (FIGURA 29). Os resultados foram expressos como percentual de produção de NO.

Figura 29 – Representação esquemática para a dosagem de óxido nítrico (NO) em micrógliia (linhagem BV-2).



Fonte: Elaborado pela autora.

CTR: controle; EST: estimulado; LPS: lipopolissacarídeo; NO: óxido nítrico.

5.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média de três experimentos independentes, utilizando o *Software GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA.). A análise da normalidade dos dados foi realizada pelo teste de

Shapiro-Wilk. Os dados que apresentaram uma distribuição normal foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido de pós-teste de Tukey com valores de $p < 0,05$ considerados significativos. Enquanto as análises quimiométricas foram geradas utilizando os softwares *PLS-Toolbox*TM (versão 8.6.2, *Eigenvector Research Incorporated*, Manson, WA, EUA) e *GENE-E* (versão *online*), conforme detalhado na seção 5.5.1.

5.5.1 Análise quimiométrica

5.5.1.1 Análise quimiométrica não-supervisionada

A fim de reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados e observar tendências na composição química entre os seis tempos de cultivo (5, 7, 9, 11, 13 e 15 meses) de *H. elegans*, duas abordagens quimiométricas não-supervisionadas, do tipo PCA e HCA com mapa de calor (*Heatmap*), foram desenvolvidas utilizando os dados cromatográficos decompostos pelo software PARADISE, em triplicatas biológicas (GRANATO et al., 2018; JOHNSEN et al., 2017).

5.5.1.1.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

A PCA foi desenvolvida utilizando os tempos de retenção entre 12 e 18 min. Inicialmente, os cromatogramas foram convertidos em arquivos ASCII (*American Standard Code for Information Interchange*) para construção de matriz numérica com dimensionalidade de 19.836 pontos de dados (1.102 variáveis \times 18 amostras). Após a decomposição dos dados brutos de CG-EM no PARADISE, a matriz foi reduzida para 738 pontos de dados (41 variáveis \times 18 amostras). Em seguida, os dados dessa matriz numérica foram importados para o programa *PLS-Toolbox*TM (versão 8.6.2, *Eigenvector Research Incorporated*, Manson, WA, EUA), os quais foram autoescalados. Após esse pré-tratamento, o algoritmo SVD (*Singular Value Decomposition*) foi aplicado para decompor a matriz para modelagem de PCA. Informações relevantes do conjunto de dados químicos foram obtidas nos dois primeiros componentes principais (PC), com nível de confiança de 95% (LUZ et al., 2018).

5.5.1.1.2 Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA) com mapa de calor (*Heatmap*)

As áreas dos picos dos 41 alcaloides deconvoluídos no PARADISE foram importadas para o software online *GENE-E* (<https://software.broadinstitute.org/GENE-E/index.html>) para reconhecimento de padrões e classificação através da HCA-*heatmap*. Para tanto, foi utilizado matriz de distância Euclidiana como índice de dissimilaridade e método de ligação completo para aglomerar os alcaloides (linhas) e medir a distância entre os tempos de

colheita (colunas) (GRAZIANI et al., 2018). O resultado foi apresentado na forma de dendrograma com mapa de calor, o qual ilustra a relação de dissimilaridade entre os tempos de colheita aliado a concentração relativa de cada alcaloide representado nas linhas, através das cores vermelho (alta intensidade), branco (intensidade intermediária) e azul (baixa intensidade) (LUZ et al., 2018).

5.5.1.2 *Análise quimiométrica supervisionada*

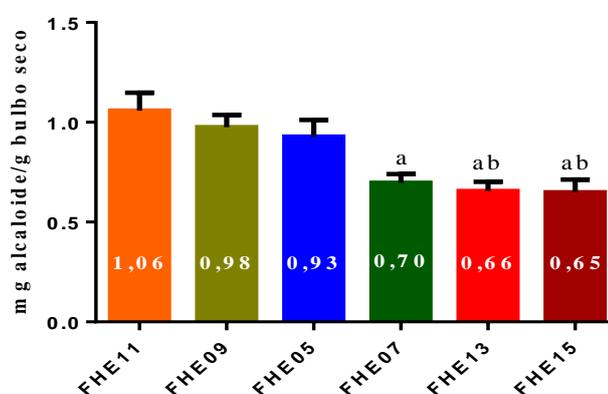
A fim de destacar os alcaloides correlacionados (marcadores) com a atividade anti-inflamatória, uma modelagem de regressão multivariada por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) foi desenvolvida usando o software *PLS-Toolbox*TM. Para tanto, a matriz de dados brutos de CG-EM, ou seja, sem a deconvolução, foi utilizada como matriz X, a qual foi correlacionada com a atividade anti-inflamatória como matriz Y. O algoritmo SIMPLS (*PLS* simplificado) foi aplicado para modelagem; o método *venetian blinds* foi utilizado para validação cruzada; e o número de variáveis latentes (VL) foi selecionado de acordo com os seguintes parâmetros estatísticos: erros de calibração e validação cruzada, respectivos coeficientes de correlação e valores de viés.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Rendimento das frações alcalóidicas

As frações FHE11, FHE09 e FHE05 apresentaram rendimentos estatisticamente semelhantes (1,06; 0,98 e 0,93 mg alcaloide/g bulbo seco, respectivamente) e maiores em comparação as frações de FHE07, FHE13 e FHE15. Contudo, apenas a FHE11 difere significativamente das frações FHE07, FHE13 e FHE15 (0,70; 0,66 e 0,65 mg alcaloide/g bulbo seco, respectivamente), enquanto a FHE09 difere estatisticamente das frações FHE13 e FHE15 (FIGURA 30).

Figura 30 - Rendimento das frações alcalóidicas de *Hippeastrum elegans* para os seis tempos de cultivo.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Os valores foram expressos em mg alcaloide/g de bulbo seco. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. ^a vs FHE11; ^b vs FHE09 ($p < 0,05$ - ANOVA e teste de Tukey).

Diversos fatores podem influenciar o rendimento e a composição qualitativa e quantitativa desses alcaloides na planta, tais como as condições ambientais, região de cultivo, o ciclo fenológico, entre espécies, além de fatores inerentes ao próprio processo extrativo (CORTES et al., 2017; SIMÕES et al., 2017). Cortes et al. (2017) obtiveram diferentes rendimentos no teor de alcaloides totais de acordo com a espécie, parte da planta (raiz, bulbo ou folha) e o local de coleta. Particularmente, para folhas e bulbos de *H. elegans* colhidos em Casanare, Colômbia, os rendimentos foram de 0,15% e 0,20%, respectivamente, praticamente o dobro do rendimento obtido neste estudo para a fração FHE11 (0,11%), por exemplo.

6.2 Perfil de alcaloides determinado por CG-EM

A deconvolução do conjunto de dados de CG-EM utilizando o PARADISE, resolveu 41 espectros de massas compatíveis com alcaloides, comuns aos seis tempos de

colheita de *H. elegans* investigados (TABELA 3). Essa ferramenta computacional, permitiu resolver compostos sobrepostos e de baixa relação sinal-ruído (S/N), contribuindo para a identificação de um maior número de compostos. No Apêndice B, página 116, são apresentados os 3 intervalos com picos sobrepostos no cromatograma de íons totais (TIC), os quais após a modelagem e validação no PARADISE, resultaram na deconvolução de três componentes para cada intervalo, incluindo a linha de base. A linha de base, geralmente, é uma mistura de várias contribuições, por exemplo, sangramento da coluna, reagente de derivatização, fase móvel ou ruído eletrônico, os quais interferem fortemente na identificação e quantificação dos compostos (JOHNSEN et al., 2017). A Figura 31 apresenta uma comparação entre os cromatogramas, na mesma escala, para as frações de *H. elegans* (FHE05, FHE07, FHE09, FHE11, FHE13 e FHE15).

Entre os quarenta e um compostos detectados, vinte e sete (**1, 2, 4-6, 8, 9, 11-14, 16, 18, 19, 21-23, 25, 26, 28-31, 33, 34, 37 e 41**) foram tentativamente identificados de acordo com seu padrão de fragmentação no espectro de massa, IR e ocorrência em Amaryllidaceae, juntamente com quatro compostos não relatados anteriormente (**32, 38, 39 e 40**), correspondendo a $88,8 \pm 2,8\%$, em relação à soma de suas áreas de pico relativos.

O composto **32** (IR = 2805) exibiu um íon molecular $[M^+]$ de m/z 315 e íons gêmeos de m/z 241/240 (íon base) semelhantes aos da galantina; no entanto, mostrando picos de íons deslocados em 2 amu, indicando dois prótons a menos devido a uma insaturação adicional (FIGURA 32). Essas características são consistentes com derivados de licorina com ligação dupla $\Delta^{3,4}$ (anel C) e grupos metoxilas em C8 e C9, como na galantina (BERKOV et al., 2021). Inclusive, o composto **32** foi descrito anteriormente em *Phaedranassa tunguraguae* (MORENO et al., 2020) e *Narcissus* spp. (HAVLASOVÁ et al., 2014). Portanto, o composto **32** foi tentativamente caracterizado como 11,12-dehidrogalantina.

Tabela 3 - Alcaloides detectados nos cromatogramas de CG-EM dos bulbos de *Hippeastrum elegans*, comuns aos seis tempos de colheita (Continua).

Alcaloide	Tr ^a (min)	IR ^b _{exp.}	IR ^b _{lit.}	M ^{+c}	MS (intensidade %) ^d	Área (%) ^{±EPM}						Ref.
						FHE05	FHE07	FHE09	FHE11	FHE13	FHE15	
Tipo-Narciclasina												
Trisfaeridina (1)	12.127	2304	2282	223(100)	222(37), 164(20), 138(23), 137(11), 111(15)	0,50 ^{±0,02}	0,96 ^{±0,04}	1,18 ^{±0,04}	1,43 ^{±0,04}	2,47 ^{±0,04}	2,27 ^{±0,03}	[1]
Tipo-Galantamina												
Galantamina (4) ^f	13.209	2424	2423	287(83)	286(100), 270(13), 244(25), 230(13), 216(35), 174(31), 115(15)	0,96 ^{±0,04}	1,53 ^{±0,01}	1,82 ^{±0,02}	0,54 ^{±0,01}	2,54 ^{±0,04}	5,77 ^{±0,02}	[2]
Sanguinina (5) ^f	13.381	2444	2431	273(100)	272(81), 256(20), 216(15), 202(40), 160(43)	1,76 ^{±0,03}	0,58 ^{±0,02}	2,72 ^{±0,18}	2,14 ^{±0,09}	0,56 ^{±0,02}	0,83 ^{±0,02}	[3,4]
Licoramina (6)	13.387	2444	2441	289(60)	288(100), 232(08), 202(11), 187(09), 159(07), 115(10)	5,99 ^{±0,04}	7,88 ^{±0,10}	4,41 ^{±0,17}	1,43 ^{±0,02}	7,39 ^{±0,03}	15,8 ^{±0,12}	[2,4]
<i>O</i> -Demetil-licoramina (8)	13.591	2467	2463	275(65)	274(100), 173(12), 131(07), 115(09), 44(13)	7,33 ^{±0,28}	2,44 ^{±0,09}	3,84 ^{±0,12}	4,98 ^{±0,08}	0,48 ^{±0,02}	0,67 ^{±0,01}	[4]
Norlicoramina (9)	13.711	2481	2472	275(77)	274(100), 244(16), 202(11), 188(18), 115(12)	1,61 ^{±0,04}	0,89 ^{±0,05}	0,39 ^{±0,01}	0,56 ^{±0,01}	2,95 ^{±0,03}	2,44 ^{±0,04}	[5,6]
Acetil-licoramina (18)	14.411	2568	2568	331(75)	330(100), 288(8), 270(33), 244(16), 228(22), 214(34), 202(28)	0,37 ^{±0,06}	0,14 ^{±0,01}	0,43 ^{±0,06}	0,26 ^{±0,02}	0,08 ^{±0,00}	0,06 ^{±0,00}	[2]
Tipo-Haemantamina/crinina												
Vitatina (11a)/Crinina (11b) ^e	13.807	2492	2472	271(100)	228(23), 199(70), 187(63), 173(21), 115(26)	1,18 ^{±0,04}	1,00 ^{±0,00}	0,84 ^{±0,01}	2,85 ^{±0,03}	6,44 ^{±0,03}	4,83 ^{±0,05}	[1]
8- <i>O</i> -Demetilmaritidina (13)	14.080	2526	2522	273(100)	230(25), 201(90), 189(57), 115(21)	0,94 ^{±0,02}	0,36 ^{±0,02}	0,85 ^{±0,03}	2,12 ^{±0,01}	1,49 ^{±0,02}	0,95 ^{±0,03}	[7]
Undulatiane diol (25)	15.137	2668	-	349(66)	334(46), 318(100), 291(52), 258(22), 232(40)	1,32 ^{±0,11}	1,31 ^{±0,11}	0,75 ^{±0,03}	1,28 ^{±0,10}	0,77 ^{±0,03}	1,44 ^{±0,03}	[8]
11-Hidroxivitatina (30)	15.563	2729	2728	287(7)	258(100), 211(14), 186(13), 181(15), 153(9), 128(1), 115(11)	1,44 ^{±0,04}	2,94 ^{±0,08}	3,47 ^{±0,01}	5,54 ^{±0,03}	15,0 ^{±0,11}	10,5 ^{±0,14}	[1]
Tipo-Homolicorina												
Hippapilina-isômero (2)	12.814	2380	2301	317(-)	110(10), 108(18), 109(100), 94(04), 81(06), 77(05), 42(04)	0,35 ^{±0,05}	0,39 ^{±0,01}	0,25 ^{±0,02}	0,26 ^{±0,01}	0,09 ^{±0,01}	0,16 ^{±0,01}	[9]
Nerinina (12)	13.858	2498	2509	347(-)	207(03), 110(09), 109(100), 108(16), 94(01)	0,77 ^{±0,02}	0,41 ^{±0,02}	1,37 ^{±0,02}	2,56 ^{±0,02}	0,10 ^{±0,01}	0,13 ^{±0,01}	[1]
7-metoxi- <i>O</i> -metil-licorenina (16)	14.220	2544	2538	361(-)	221(01), 110(08), 109(100), 108(16), 94(02)	0,81 ^{±0,03}	0,72 ^{±0,01}	0,84 ^{±0,02}	0,67 ^{±0,02}	0,45 ^{±0,00}	0,34 ^{±0,00}	[1]
2 α -10 β -dihidroxi-9- <i>O</i> -demetilhomolicorina (26) ^h	15.188	2676	-	333(-)	207(06), 191(10), 125(100), 124(05), 96(18)	3,64 ^{±0,16}	0,43 ^{±0,03}	1,40 ^{±0,21}	2,39 ^{±0,14}	0,33 ^{±0,03}	0,25 ^{±0,02}	[4,10]
Tipo-Galasina												
7-demetoxi-9- <i>O</i> -metilhostasina-isômero (41)	17.459	3018	3057	347(-)	125(100), 124(03), 96(26), 81(01), 77(01), 67(01), 53(01)	1,13 ^{±0,01}	1,96 ^{±0,12}	1,32 ^{±0,05}	1,21 ^{±0,01}	0,91 ^{±0,03}	0,80 ^{±0,03}	[4]

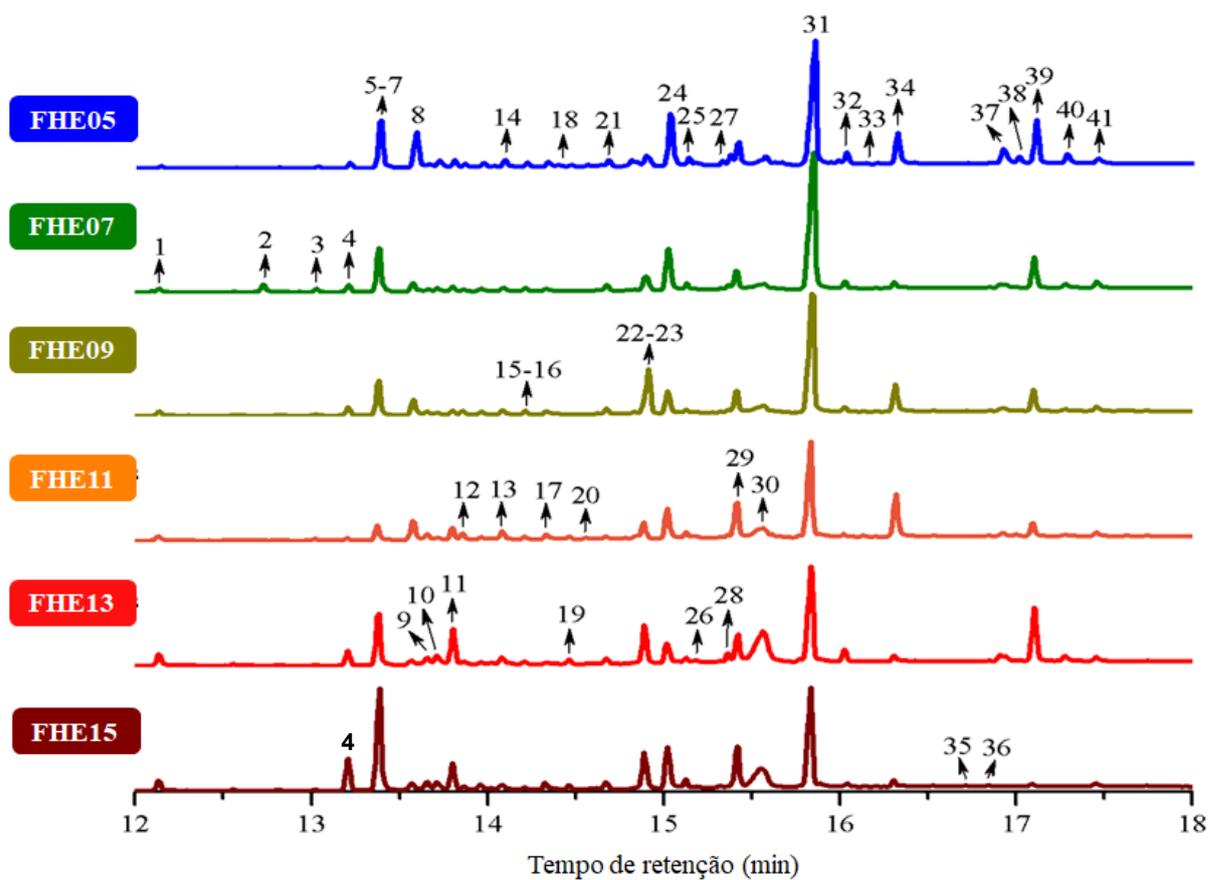
Tabela 3 - Alcaloides detectados nos cromatogramas de CG-EM dos bulbos de *Hippeastrum elegans*, comuns aos seis tempos de colheita (Continuação).

Alcaloide	Tr ^a (min)	IR ^b _{exp.}	IR ^b _{lit.}	M ^{+c}	MS (intensidade %) ^d	Área (%) [±] EPM						Ref.
						FHE05	FHE07	FHE09	FHE11	FHE13	FHE15	
Tipo-Licorina												
Anhidrolicorina (14)	14.100	2529	2528	251(43)	250(100), 192(12), 191(11), 125(06), 96(12)	0,83 ^{±0,05}	0,79 ^{±0,02}	0,58 ^{±0,04}	0,63 ^{±0,02}	0,30 ^{±0,01}	0,28 ^{±0,02}	[2,7]
O-Acetilpluvina (19)	14.462	2575	2580	329(80)	268(82), 254(25), 242(100), 224(37), 199(25)	0,26 ^{±0,00}	0,03 ^{±0,00}	0,02 ^{±0,00}	0,58 ^{±0,01}	0,78 ^{±0,01}	0,70 ^{±0,00}	[2,6]
11,12-Dehidroanhidrolicorina (22)	14.888	2633	2634	249(60)	248(100), 190(22), 124(9), 96(15)	0,65 ^{±0,04}	1,53 ^{±0,02}	1,79 ^{±0,03}	2,80 ^{±0,03}	6,15 ^{±0,11}	5,30 ^{±0,02}	[2,7]
11,12-Dehidroassoanina (28)	15.378	2703	2701	265(75)	264(100), 248(16), 220(13), 191(13), 178(21)	1,78 ^{±0,03}	1,05 ^{±0,03}	0,73 ^{±0,02}	0,64 ^{±0,03}	1,62 ^{±0,08}	0,19 ^{±0,00}	[2,11,13]
Licorina (31)	15.855	2771	2766	287(20)	286(12), 268(18), 250(14), 227(68), 226(100), 211(06), 147(12)	26,5 ^{±0,62}	41,0 ^{±0,16}	34,3 ^{±0,59}	26,4 ^{±0,13}	19,1 ^{±0,20}	19,9 ^{±0,16}	[5]
11,12-Dehidrogalantina (32)	16.027	2805	2805	315(38)	284(10), 266(28), 241(93), 240(100)	2,70 ^{±0,07}	1,69 ^{±0,08}	1,03 ^{±0,06}	0,57 ^{±0,02}	2,81 ^{±0,10}	0,10 ^{±0,00}	[7, 11]
Esternbergina (33)	16.135	2822	2831	331(35)	270(25), 252(10), 229(69), 228(100)	0,26 ^{±0,01}	0,01 ^{±0,01}	0,08 ^{±0,01}	0,57 ^{±0,02}	0,18 ^{±0,01}	0,20 ^{±0,01}	[7, 11]
Pseudolicorina (34) ^f	16.320	2851	2837	289(30)	270(18), 229(70), 228(100)	5,22 ^{±0,21}	1,48 ^{±0,19}	6,89 ^{±0,52}	11,4 ^{±0,16}	1,03 ^{±0,07}	1,11 ^{±0,07}	[5, 11]
Narcissidina (37)	16.924	2932	2942	333(12)	315(56), 284(100), 266(36), 258(48), 230(57), 228(57)	2,72 ^{±0,13}	0,94 ^{±0,10}	0,59 ^{±0,07}	0,24 ^{±0,02}	1,32 ^{±0,12}	0,01 ^{±0,01}	[2, 11,12]
Anhidronarcissidina (38)	17.007	2942	-	315(37)	284(100), 266(51), 228(18)	1,37 ^{±0,02}	0,12 ^{±0,00}	0,19 ^{±0,00}	0,60 ^{±0,01}	0,07 ^{±0,00}	0,01 ^{±0,00}	[11]
11,12-Dehidro-2-metoxi- assoanina (39)	17.102	2967	2963	295(88)	294(100), 278(11), 264(03), 250(07), 221(05), 208(05)	8,05 ^{±0,04}	7,02 ^{±0,25}	4,93 ^{±0,24}	3,27 ^{±0,09}	10,0 ^{±0,30}	0,47 ^{±0,01}	[7,11,13]
11,12-Dehidro-2-hidroxi- assoanina (40)	17.268	2991	2979	281(75)	280(100), 264(16), 236(11), 207(02), 194(08)	0,49 ^{±0,01}	0,93 ^{±0,13}	0,20 ^{±0,02}	0,26 ^{±0,01}	0,05 ^{±0,01}	0,04 ^{±0,00}	[3,11]
Montanina												
Pancratina C (21)	14.672	2602	2600	287(78)	203(52), 188(59), 176(100), 174(89)	1,12 ^{±0,01}	1,48 ^{±0,01}	1,40 ^{±0,01}	0,75 ^{±0,01}	1,20 ^{±0,00}	1,57 ^{±0,01}	[5,7,14]
Montanina (23)	14.914	2636	2637	301(100)	270(82), 257(34), 252(20), 223(24), 115(16)	0,37 ^{±0,01}	1,38 ^{±0,02}	8,62 ^{±0,21}	0,09 ^{±0,01}	0,43 ^{±0,00}	1,04 ^{±0,01}	[5,6]
Panracina (29)	15.423	2709	2718	287(100)	270(19), 243(23), 223(23), 214(22), 199(26), 185(33), 115(19)	3,69 ^{±0,04}	4,31 ^{±0,09}	5,09 ^{±0,09}	9,06 ^{±0,05}	5,03 ^{±0,00}	8,01 ^{±0,01}	[6]
Não identificado												
Desconhecido A (3)	13.018	2402	-	285(100)	270(12), 238(07), 210(12), 156(20)	0,23 ^{±0,02}	0,16 ^{±0,01}	0,29 ^{±0,02}	0,39 ^{±0,02}	0,13 ^{±0,01}	0,17 ^{±0,01}	-
Desconhecido B (7) (tipo- licorina)	13.413	2447	-	287(25)	253(05), 228(100)	0,66 ^{±0,02}	1,01 ^{±0,06}	0,56 ^{±0,04}	0,20 ^{±0,01}	0,90 ^{±0,04}	2,22 ^{±0,08}	-
Desconhecido C (9)	13.654	2475	-	245(54)	244(80), 226(30), 200(100), 115(15)	0,39 ^{±0,00}	0,33 ^{±0,06}	0,82 ^{±0,14}	1,74 ^{±0,14}	2,16 ^{±0,10}	2,36 ^{±0,17}	-
Desconhecido D (15) (tipo- licorina) ^g	14.195	2541	-	315(20)	287(71), 254(60), 242(100), 228(79)	0,23 ^{±0,04}	0,17 ^{±0,01}	0,10 ^{±0,01}	0,16 ^{±0,00}	0,31 ^{±0,01}	0,10 ^{±0,01}	[11]
Desconhecido E (17)	14.341	2559	-	317(61)	316(81), 275(100), 204(53), 115(25)	1,10 ^{±0,01}	0,24 ^{±0,02}	0,52 ^{±0,02}	1,59 ^{±0,02}	0,17 ^{±0,02}	0,19 ^{±0,01}	-
Desconhecido F (20) (tipo- homolicorina) ^g	14.564	2588	-	375(10)	125(100), 96(51)	0,61 ^{±0,01}	0,03 ^{±0,01}	0,17 ^{±0,05}	0,66 ^{±0,09}	0,02 ^{±0,00}	0,01 ^{±0,00}	[4]

Tabela 3 - Alcaloides detectados nos cromatogramas de CG-EM dos bulbos de *Hippeastrum elegans*, comuns aos seis tempos de colheita (Conclusão).

Alcaloide	Tr ^a (min)	IR ^b _{exp.}	IR ^b _{lit.}	M ^{+c}	MS (intensidade %) ^d	Área (%) ^{±EPM}						Ref.
						FHE05	FHE07	FHE09	FHE11	FHE13	FHE15	
Desconhecido G (24)	15.035	2654	-	335(100)	316(22), 304(41), 286(32), 248(35), 120(24)	8,76 ^{±0,32}	9,42 ^{±0,44}	4,48 ^{±0,28}	6,55 ^{±0,41}	3,57 ^{±0,12}	7,76 ^{±0,15}	-
Desconhecido H (27)	15.327	2695	-	269(100)	254(65), 248(28), 191(12)	1,43 ^{±0,05}	0,31 ^{±0,00}	0,47 ^{±0,01}	0,28 ^{±0,01}	0,40 ^{±0,02}	0,41 ^{±0,02}	-
Desconhecido I (35) (tipo-licorina) ^g	16.708	2900	-	279(73)	278(100), 262(14), 248(11), 192(11)	0,16 ^{±0,02}	0,30 ^{±0,03}	0,15 ^{±0,01}	0,16 ^{±0,01}	0,11 ^{±0,01}	0,30 ^{±0,01}	[11]
Desconhecido J (36)	16.854	2911	-	333(55)	305(21), 272(40), 260(37), 247(100), 232(25)	0,29 ^{±0,04}	0,34 ^{±0,01}	0,18 ^{±0,00}	0,29 ^{±0,00}	0,16 ^{±0,00}	0,34 ^{±0,01}	-

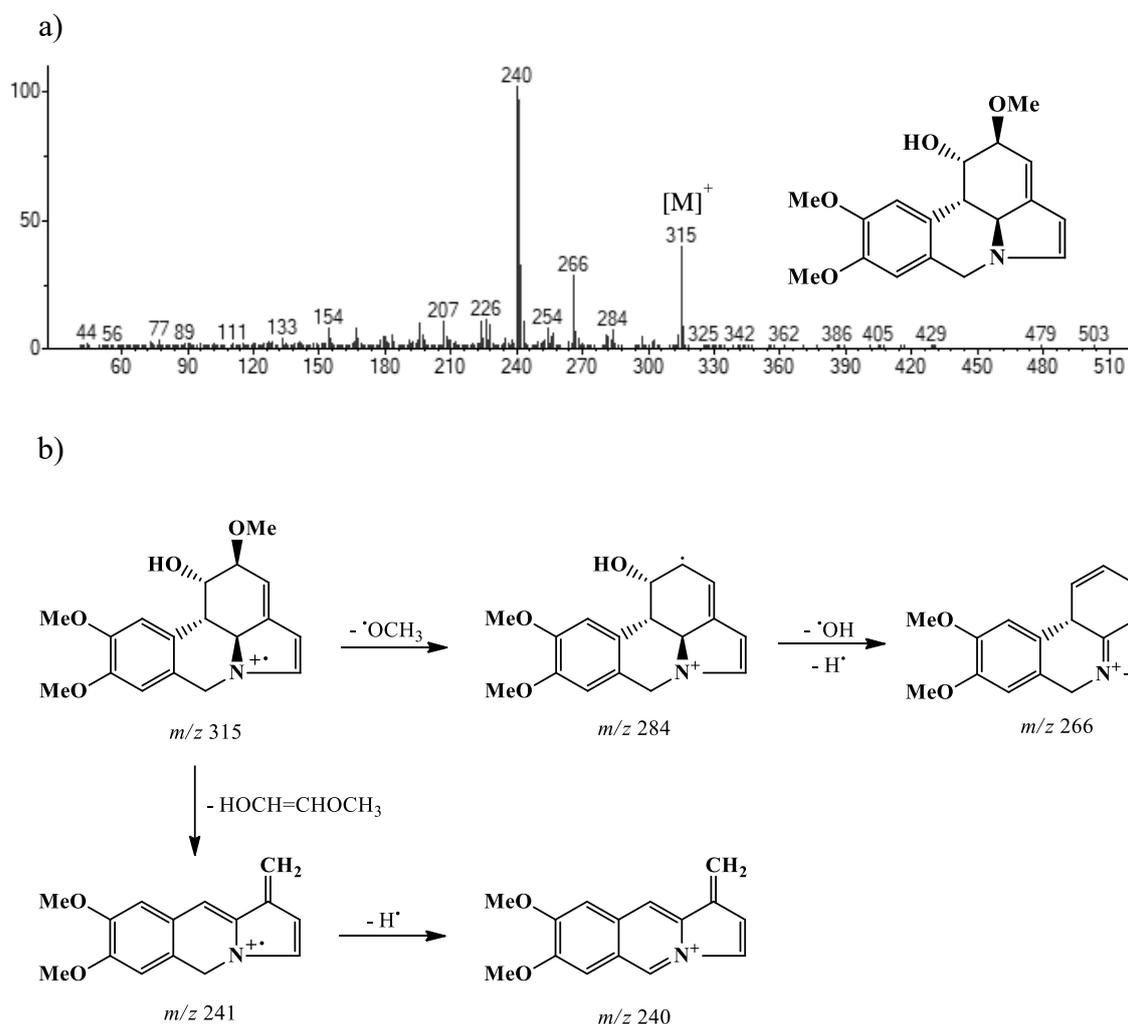
^aTempo de retenção; ^bÍndice de retenção obtido em coluna HP-5MS; ^cÍon molecular; ^dFragmentação dos compostos por ionização de elétrons; ^eOs compostos conhecidos **11a** e **11b** não podem ser definidos apenas por meio de CG-EM (LIANZA et al., 2020); ^fConfirmado com padrão analítico autêntico; ^gTipo de esqueleto de acordo com o padrão de fragmentação espectral (BERKOV et al., 2021; LIANZA et al., 2020); ^hProposta baseada na ocorrência em *H. elegans* e espectro de massas compatíveis (Apêndice C, página 116). [1] BESSA et al., 2017; [2] HAVLASOVÁ et al., 2014; [3] TALLINI et al., 2017; [4] LIANZA et al., 2020; [5] GUO et al., 2014; [6] TRUJILLO-CHACÓN et al., 2019b; [7] MORENO et al., 2020; [8] PAIVA et al., 2021; [9] GUO et al., 2016; [10] CARVALHO et al., 2015; [11]: BERKOV et al., 2021; [12] BREITEROVÁ et al., 2018; [13] CORTES et al., 2018; [14] KARAKOYUN et al., 2020.

Figura 31 - Cromatogramas de íons totais das frações alcaloídicas de *Hippeastrum elegans*.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os números acima de cada pico representam os alcaloides listados na Tabela 3.

Figura 32 – Espectro de massas e proposta de mecanismo de fragmentação para o alcaloide 11,12-dehidrogalantina.

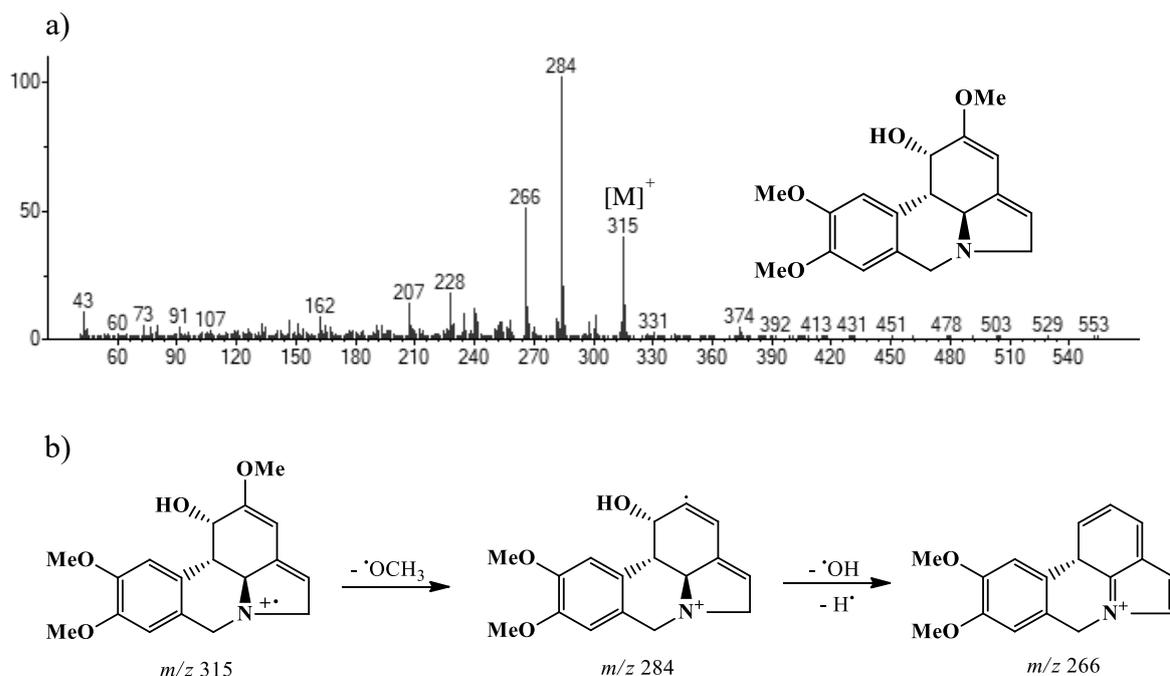


a) Espectro de massas do composto **32**; b) Mecanismo fragmentação para os principais íons do espectro de massa, justificando a proposta de identificação para o composto 11,12-dehidrogalantina (**32**).

O composto **38** (IR = 2942) foi proposto como anidronarcissidina devido ao íon molecular $[M]^+$ de m/z 315, seu íon base de m/z 284 (perda de metoxila) e o íon fragmento de m/z 266 (perda de água) que são compatíveis com alcaloides do tipo licorina contendo uma ligação dupla $\Delta^{4,11}$ (anel D), grupos metoxilas em C8 e C9, bem como substituintes em C1, C2 e C3 (por exemplo, narcissidina). Para esta classe de alcaloide, espera-se que o íon de m/z 284 seja o pico principal, sendo gerado pela liberação de substituintes em C2 e C3 (BERKOV et al., 2021), enquanto o íon de m/z 266 é formado pela saída de substituintes de C1 e C2. Além disso,

a ausência do íon fragmento de m/z 258, que é típico para metoxila ou hidroxila em C3, confirma que esta posição foi substituída por uma ligação dupla (FIGURA 33).

Figura 33 – Espectro de massas e proposta de mecanismo de fragmentação para o alcaloide anhidronarcissidina.

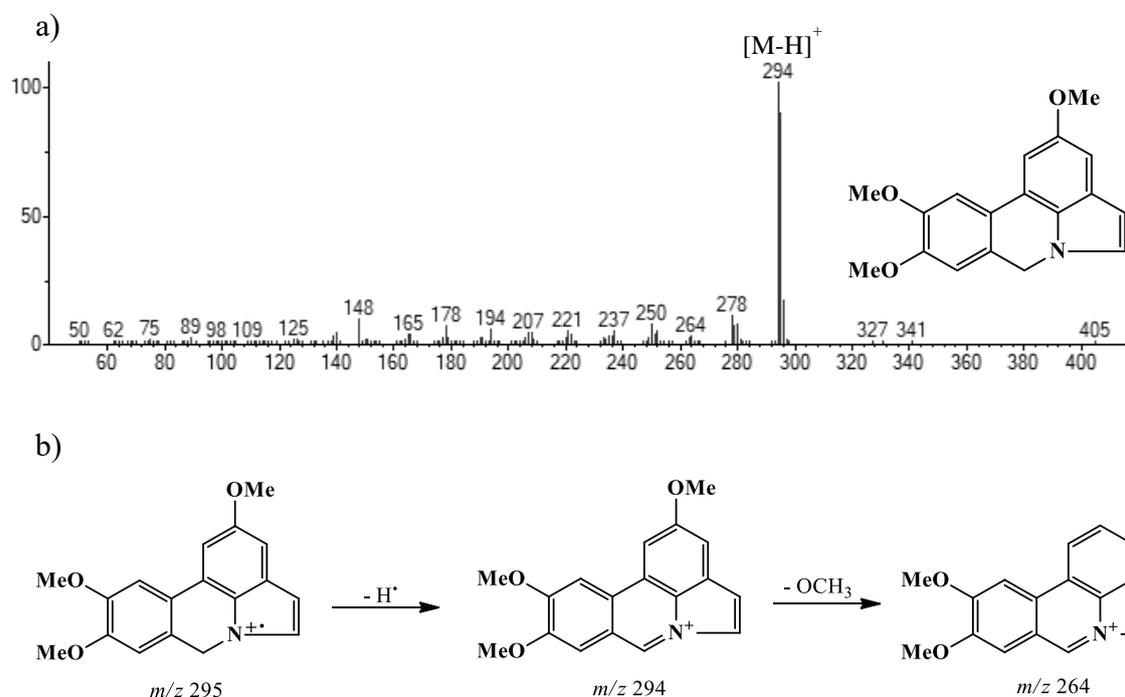


Fonte: Elaborado pela autora.

a) Espectro de massas do composto **38**; b) Mecanismo fragmentação para os principais íons do espectro de massa, justificando a proposta de identificação para o composto anhidronarcissidina (**38**).

O composto **39** (IR = 2967) apresentou um íon molecular $[M]^+$ de m/z 295, um íon base de m/z 294 $[M-H]^+$ e íons fragmentos menores de m/z 278 $[M-17]^+$, 250 $[M-45]^+$, 221 $[M-74]^+$ e 208 $[M-87]^+$ (FIGURA 34), que são consistentes com aqueles observados para alcaloides do tipo licorina contendo anel aromático C e grupos metoxilas em C8 e C9, mas não substituído em C6 como no alcaloide 11,12-dehidroassoanina (BERKOV et al., 2021). Além disso, o íon de m/z 264 $[M-31]^+$ está relacionado à perda de uma metoxila. Assim, o composto **39** foi identificado provisoriamente como 11,12-dehidro-2-metoxi-assoanina. Cortes et al. (2018) e Tallini et al. (2017) descreveram a presença de um composto de espectro de massas e IR semelhante ao **39**, até então desconhecido, em extratos de *H. elegans* e *H. reticulatum*, respectivamente.

Figura 34 – Espectro de massas e proposta de mecanismo de fragmentação para o alcaloide 11,12-dehidro-2-metoxi-assoanina.

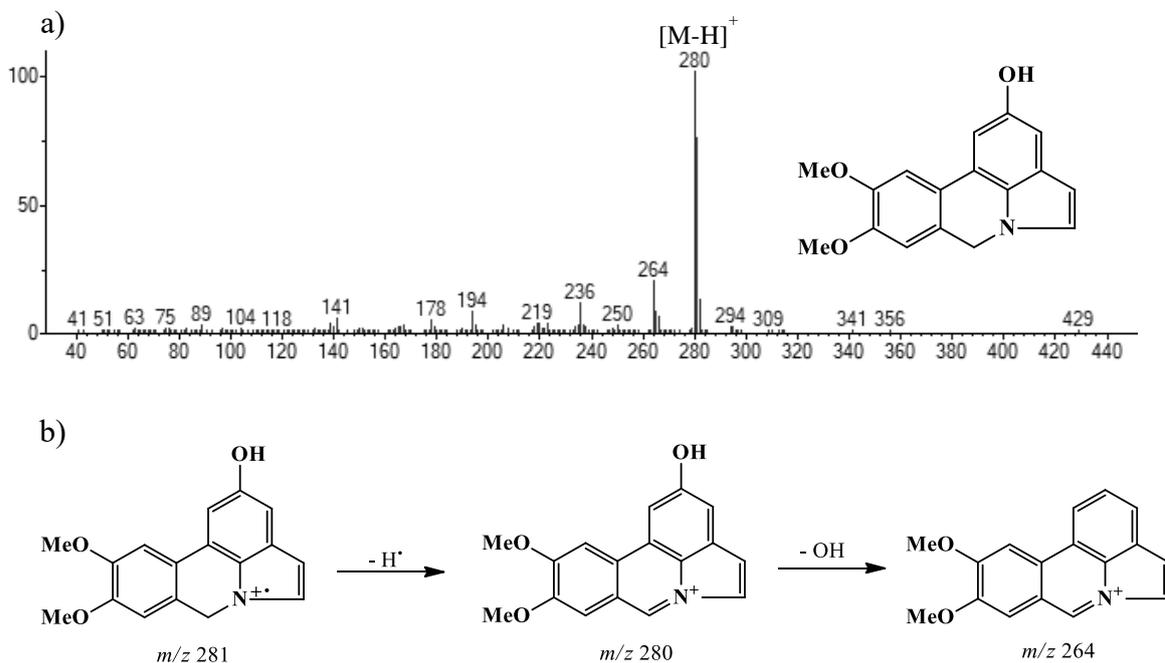


Fonte: Elaborado pela autora.

a) Espectro de massas do composto **39**; b) Mecanismo fragmentação para os principais íons do espectro de massa, justificando a proposta de identificação para o composto 11,12-dehidro-2-metoxi-assoanina (**39**).

O composto **40** (IR = 2991) tem um íon base de m/z 280 $[M-H]^+$ e íons fragmentos de baixa intensidade de m/z 264 $[M-17]^+$, 235 $[M-45]^+$, 207 $[M-74]^+$ e 194 $[M-87]^+$ que corresponderam aos encontrados em 11,12-dehidroassoanina. No entanto, seu íon molecular $[M]^+$ de m/z 281 caracterizou a presença de uma hidroxila (FIGURA 35). Assim, o composto **40** foi provisoriamente identificado como 11,12-dehidro-2-hidroxi-assoanina. Anteriormente, compostos exibindo espectro de massas e IR semelhantes ao composto **40** foram relatados para *H. reticulatum* (TALLINI et al., 2017) e *Narcissus tazetta* (TARAKEMEH et al., 2019), embora tenham sido descritos como desconhecido e erroneamente identificado como oxoassoanina nesses estudos anteriores, respectivamente. Aliás, segundo Berkov et al. (2021), a oxoassoanina possui padrão de fragmentação caracterizado pelo íon molecular como pico de base, juntamente com perdas neutras correspondentes a $[M-15]^+$, $[M-31]^+$, $[M-43]^+$, $[M-58]^+$ e $[M-87]^+$, enquanto espera-se que a assoanina e seus derivados exibam $[M-H]^+$ como pico base, além de íons fragmentos resultantes de perdas neutras em $[M-17]^+$, $[M-45]^+$, $[M-74]^+$ e $[M-87]^+$.

Figura 35 – Espectro de massas e proposta de mecanismo de fragmentação para o alcaloide 11,12-dehidro-2-hidroxi-assoanina.



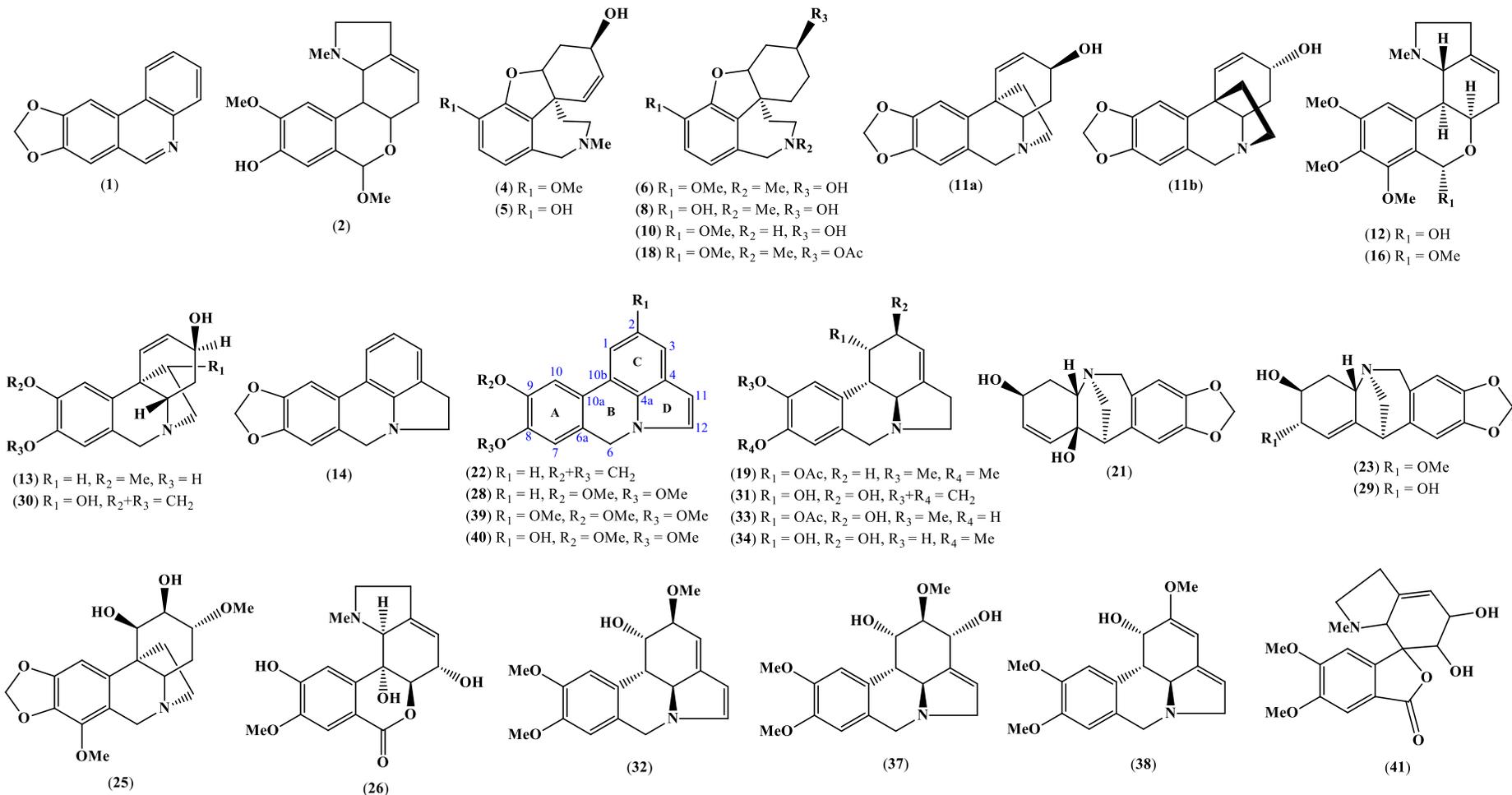
Fonte: Elaborado pela autora.

a) Espectro de massas do composto **40**; b) Mecanismo fragmentação para os principais íons do espectro de massa, justificando a proposta de identificação para o composto 11,12-dehidro-2-hidroxi-assoanina (**40**).

Além disso, 10 dos 41 compostos não puderam ser identificados (**3, 7, 9, 15, 17, 20, 24, 27, 35 e 36**), uma vez que seus dados cromatográficos e espectrais não coincidiram com os da literatura. No entanto, um dos compostos desconhecidos pode ser classificado como derivado do tipo homolicorina (**20**) e três deles como derivados do tipo licorina (**7, 15, 35**), com base em seus íons fragmentos diagnósticos, descritos por Lianza et al. (2020) e Berkov et al. (2021), respectivamente.

A Figura 36 mostra a diversidade estrutural dos 31 alcaloides identificados nas frações alcalóidicas de *H. elegans*, os quais pertencem aos esqueletos tipo narciclasina- (**1**), galantamina- (**4-6, 8, 10 e 18**), haemantamina/crinina-, (**11, 13, 25 e 30**), homolicorina- (**2, 12, 16 e 26**), montanina- (**21, 23 e 29**), licorina- (**14, 19, 22, 28, 31, 32-34 e 37-40**) e galasina- (**41**). Alcaloides do tipo licorina foram encontrados em maiores quantidades (número e porcentagem relativa) em todos os tempos de colheita analisados (FIGURA 37).

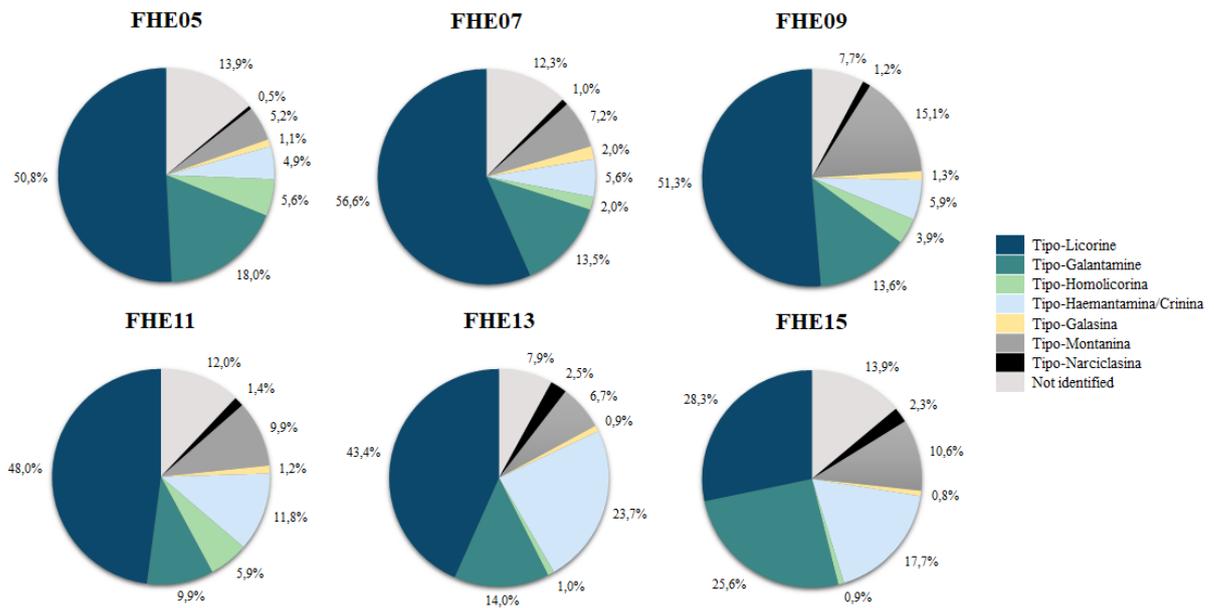
Figura 36 – Representações estruturais dos alcaloides identificados por CG-EM nos bulbos de *Hippeastrum elegans*.



Fonte: Elaborado pela autora.

Diversidade estrutural dos alcaloides identificados nas frações alcalóidicas de *H. elegans*. Os compostos identificados como 11a e 11b não podem ser definidos apenas por meio de CG-EM, segundo Lianza et al. (2020).

Figura 37 - Porcentagem de alcaloides por tipo de esqueleto identificado nos seis tempos de cultivo de *Hippeastrum elegans*.



Fonte: Elaborado pela autora.

Contribuição percentual, por tipo de esqueleto, dos alcaloides identificados nos seis tempos de cultivo de *H. elegans* (FHE05, FHE07, FHE09, FHE11, FHE13 e FHE15), expressa em porcentagem de corrente de íons totais (TIC). FHE05: Fração de *H. elegans* aos 5 meses; FHE07: Fração de *H. elegans* aos 7 meses; FHE09: Fração de *H. elegans* aos 9 meses; FHE11: Fração de *H. elegans* aos 11 meses; FHE13: Fração de *H. elegans* aos 13 meses e FHE15: Fração de *H. elegans* aos 15 meses.

A licorina é o alcaloide mais frequente no gênero *Hippeastrum* (ANDRADE et al., 2012) e também o esqueleto de maior diversidade estrutural entre os mais de 650 alcaloides isolados de Amaryllidaceae (BERKOV et al., 2020; KA et al., 2020). Segundo Berkov et al. (2020), são conhecidos cerca de 119 alcaloides do tipo licorina, dentre os quais, 74% são passíveis de análise por CG-EM.

Os alcaloides hippapilina-isômero (2), *O*-demetil-licoramina (8), norlicoramina (10), nerinina (12), 8-*O*-demetilmaritidina (13), anhidrolicorina (14), 7-metoxi-*O*-metillicorenina (16), acetil-licoramina (18), *O*-acetilpluvina (19), pancratina C (21), 11,12-dehidroanhidrolicorina (22), pancracina (29), 11,12-dehidrogalantina (28), esternbergina (33), anhidronarcissidina (38), 11,12-dehidro-2-hidroxi-assoanina (40) e 7-demetoxi-9-*O*-metilhostasina-isômero (41) estão sendo relatados pela primeira vez em *H. elegans*. Enquanto os alcaloides trisfaeridina (1), galantamina (4), sanguinina (5), licoramina (6), vitatina (11a), montanina (23), undulatiene diol (25), 2 α -10 β -dihidroxi-9-*O*-demetilhomolicorina (26), 11,12-dehidroassoanina (28), 11-hidroxivitatina (30), licorina (31), pseudolicorina (34),

narcissidina (37) e 11,12-dehidro-2-metoxi-assoanina (39) foram descritos anteriormente em *H. elegans* (PAIVA et al., 2021; PAIVA et al., 2020; CORTES et al., 2018; CARVALHO et al., 2015; BASTIDA et al., 1996).

Em contraste, narciclasina hamaina, ismina, ungeremina, hippeastrina, galanthamina N-óxido, isopseudolicorina e macronina/epi-macronina, relatados anteriormente em *H. elegans* (PAIVA et al., 2021; CORTES et al., 2018; CARVALHO et al., 2015; BASTIDA et al., 1996), não foram encontrados neste momento. Em geral, a ausência de narciclasina pode ser atribuída a uma limitação bem conhecida do método de extração empregado (partição ácido-base), que não é apropriado para a extração de alcaloides contendo nitrogênio de amida (caráter não-básico) (KORNIENKO; EVIDENTE, 2008).

Variações na composição dos alcaloides são comumente influenciadas por vários fatores, como as condições ambientais e o estágio de desenvolvimento da planta (AKRAM; VERPOORTE; POMAHAČOVÁ, 2021; LUBBE et al., 2013; LUBBE et al., 2011; LUBBE et al., 2010). Por exemplo, Akram e colaboradores (2021) avaliaram o efeito da idade do bulbo (1, 2 e 3 anos) e o local de cultivo no teor de quatro alcaloides, incluindo galantamina, por CG-DIC (Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama) em *Narcissus pseudonarcissus* 'Calton'. Os teores de três dos quatro alcaloides sofreram significativa variação em função da idade, com maiores quantidades de galantamina e licorenina nos bulbos de 2 anos, enquanto homolicorina e haemantamina apresentaram maiores teores em bulbos de 1 ano e 3 anos, respectivamente. Em relação ao local de cultivo, não houve variação significativa entre as quatro regiões investigadas (Lisse e Noordwijk, na Holanda e dois locais em Lincolnshire, no Reino Unido), embora o maior teor de galantamina tenha sido observado em Lisse. Os autores atribuem essa pequena diferença ao tipo de solo e a composição em micro e macronutrientes de cada região.

6.3 Avaliação quimiométrica não-supervisionada

Para reduzir a dimensão do conjunto de dados e inferir tendências no perfil alcaloídico de *H. elegans*, entre os seis tempos de colheita, duas abordagens quimiométricas não-supervisionadas, do tipo PCA e HCA-*heatmap* foram aplicadas.

Na PCA, duas componentes principais responderam por 73,81% da variância total. O gráfico de dispersão de *scores* mostra os tempos de colheita (FHE05, FHE07, FHE09, FHE11, FHE13 e FHE15) separados e agrupados em três grupos (FIGURA 38a), dispostos principalmente ao longo de um gradiente gerado pela primeira componente principal (PC1), que explica a maior variação no conjunto de dados (52,76%). Em valores positivos de PC1,

encontram-se as frações FHE05, FHE07 e FHE09, enquanto as frações FHE13 e FHE15 encontram-se em valores negativos de PC1. A segunda componente principal (PC2) corresponde à variância não explicada pela PC1, destacando a fração FHE11 em valores negativos de PC2. O gráfico de *loadings* (FIGURA 38b) demonstra a contribuição de 41 alcaloides relevantes para a disposição dos grupos. Notavelmente, em *loadings* positivos de PC1, licorina (**31**) compreende o principal alcaloide presente nas frações de FHE05, FHE07 e FHE09, enquanto em *loadings* negativos de PC1, licoramina (**6**) e 11-hidroxivitatina (**30**) são relevantes para a disposição das frações de FHE13 e FHE15 em valores negativos de PC1. Por outro lado, em *loadings* negativos de PC2, pseudolicorina (**34**) destaca-se na fração de FHE11.

De forma complementar, a HCA confirmou a tendência de separação visualizada na PCA. O dendrograma associado ao *heatmap* apontou claramente a separação dos tempos de colheita em três grupos (I: FHE05, FHE07 e FHE09; II: FHE11 e III: FHE13 e FHE15) (FIGURA 39). A variação nas áreas dos alcaloides, facilmente visualizada pela intensidade das cores vermelho, branco e azul no *heatmap*, ilustra a relação de alta, média e baixa intensidade dos alcaloides, respectivamente, de acordo com o crescimento de *H. elegans*.

Desse modo, as análises de PCA e HCA-*heatmap* das frações de *H. elegans* mostraram um metaboloma dinâmico, no qual as variações na abundância dos alcaloides separou os seis tempos de cultivo em três grupos, os quais podem estar associados as variações nas condições ambientais aos quais foram expostos ao longo do tempo de cultivo, assim como a idade ou fase fenológica do bulbo, como pontuado em trabalhos anteriores (AKRAM; VERPOORTE; POMAHAČOVÁ, 2021; LUBBE et al., 2013; LUBBE et al., 2010). Essa abordagem foi ainda igualmente importante para selecionar, dentre as seis frações, apenas aquelas frações com composição química distinta, para prosseguir o estudo com a avaliação da atividade anti-inflamatória em neutrófilo humano, otimizando, assim, tempo e custos.

Figura 38 – PC1 × PC2 sistema coordenado de scores e respectivos *loadings* de *Hippeastrum elegans* sob diferentes tempos de colheita (FHE05, FHE07, FHE09, FHE11, FHE13 e FHE15).

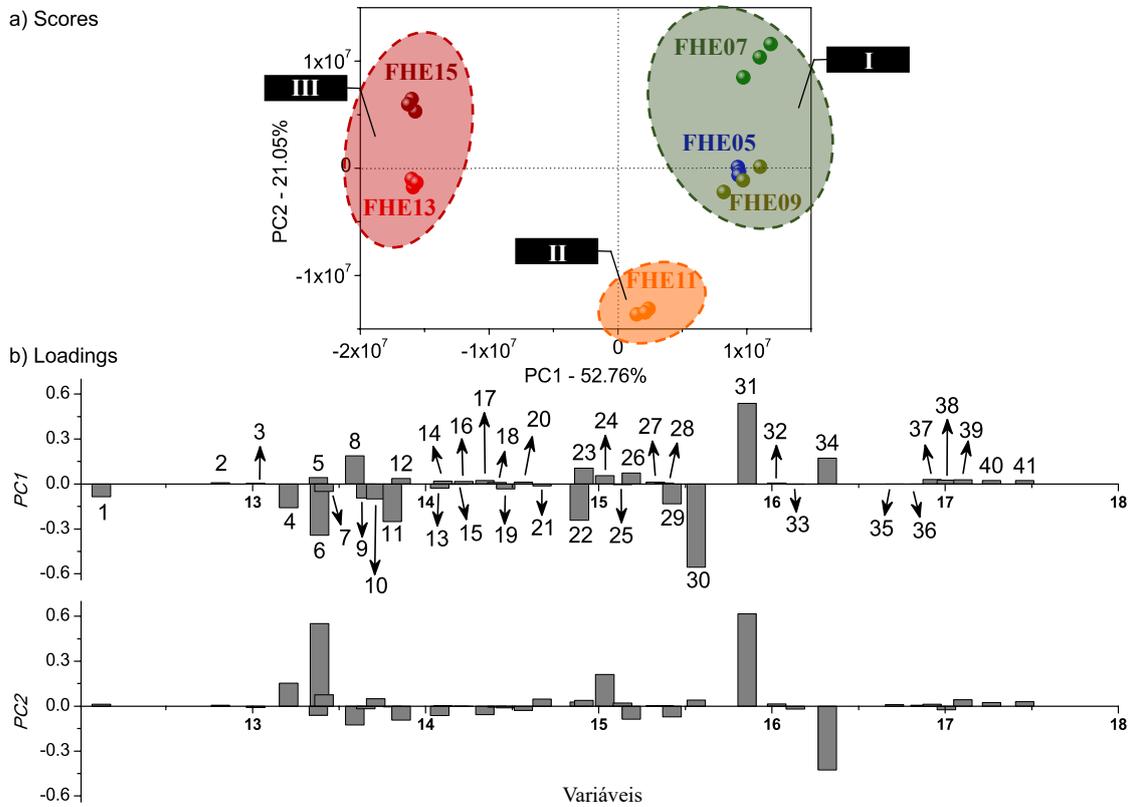
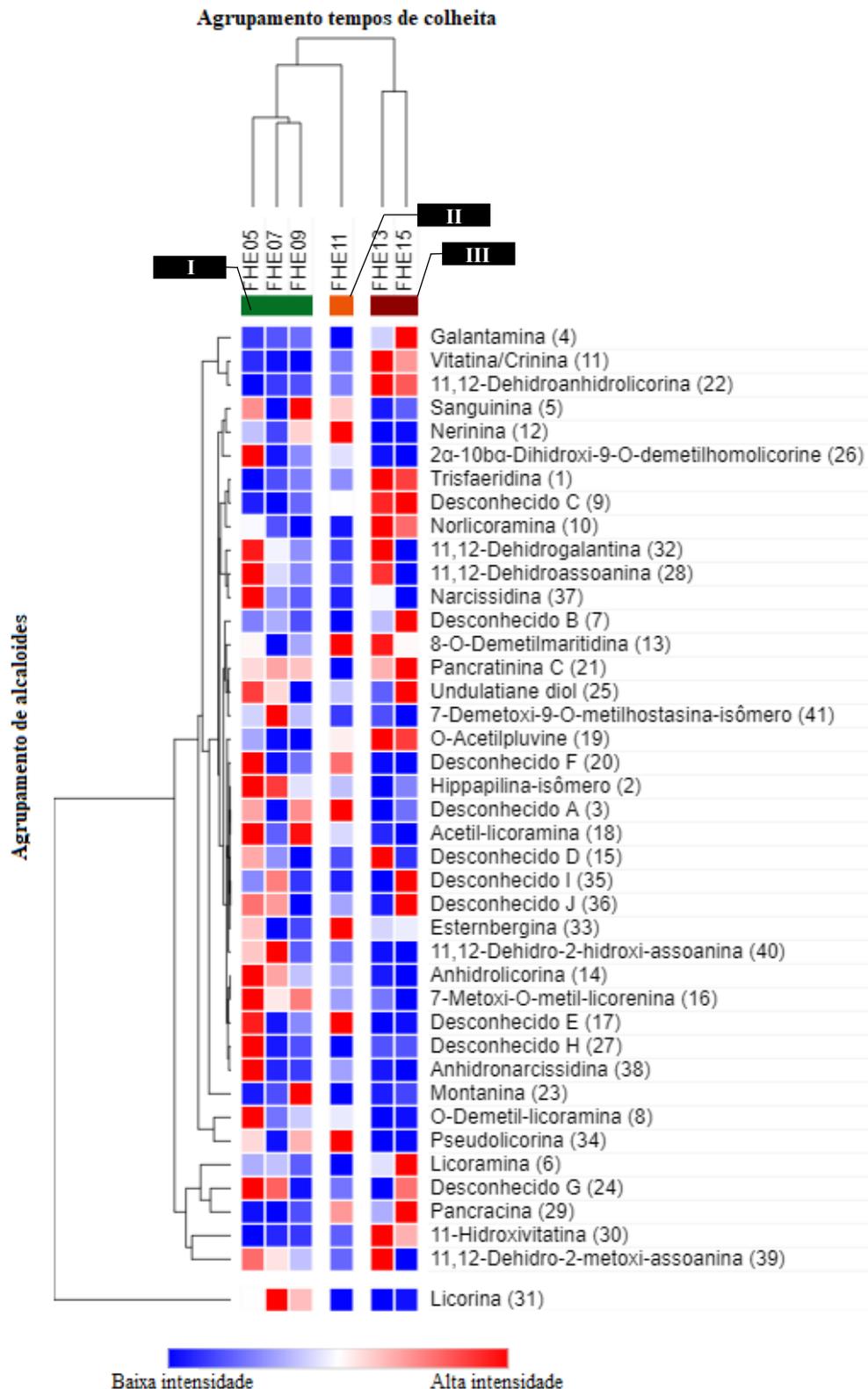


Figura 39 – HCA associado a *heatmap* representando a relação de dissimilaridade entre os tempos de colheita de *Hippeastrum elegans* (colunas) e os alcaloides (linhas).



Fonte: Elaborado pela autora.

A variação nas áreas dos alcaloides, facilmente visualizada pela intensidade das cores vermelho, branco e azul no *heatmap*, ilustra a relação de alta, média e baixa intensidade dos alcaloides, respectivamente, de acordo com o crescimento de *H. elegans*.

6.4 Avaliação da citotoxicidade e do efeito anti-inflamatório em neutrófilo humano e micróglia murino (linhagem BV-2)

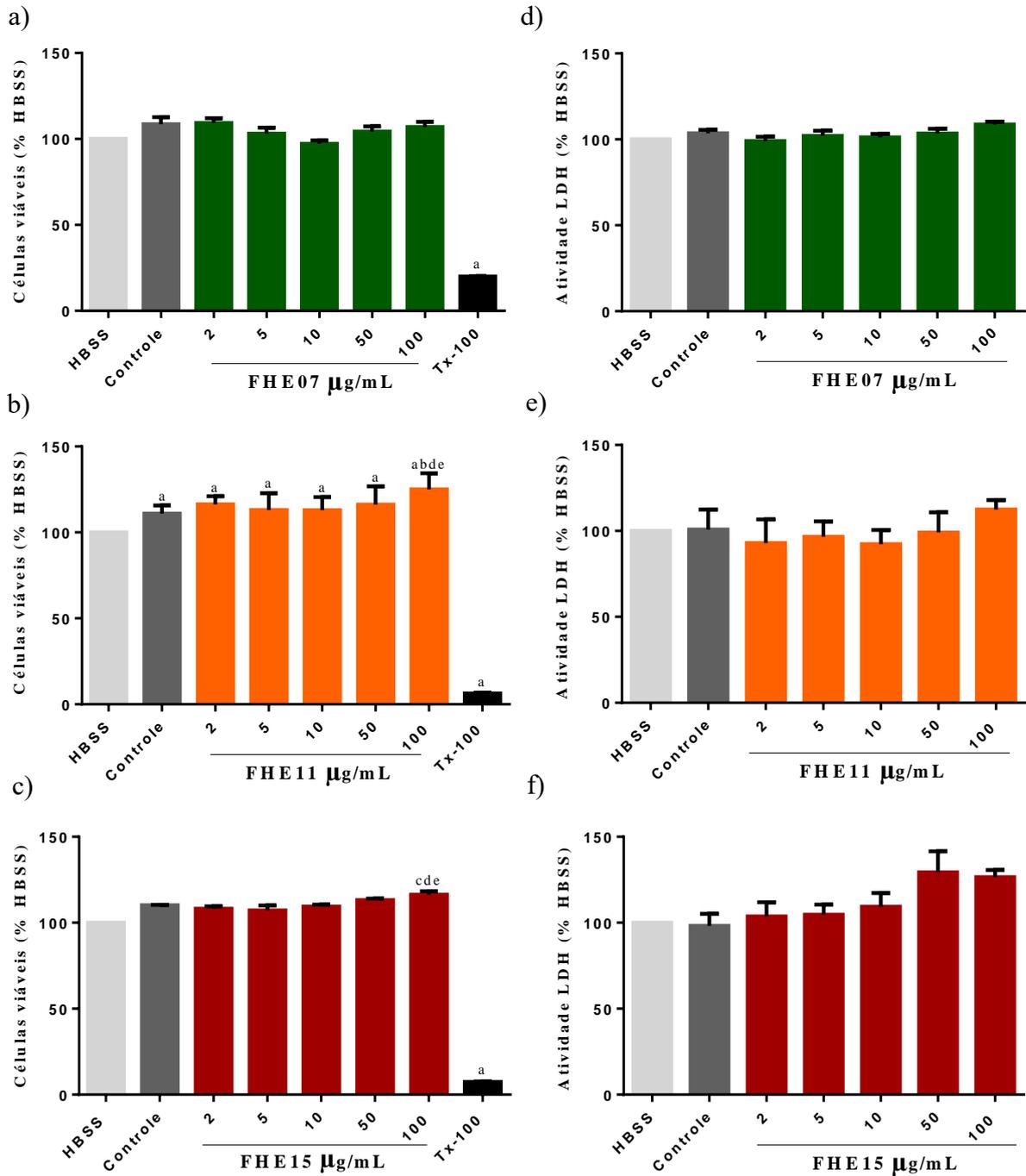
Inicialmente, três frações alcaloídicas representante de cada grupo discriminado na análise quimiométrica não-supervisionada (I: FHE07, II: FHE11 e III: FHE15) foram avaliadas quanto a citotoxicidade em neutrófilo humano, com emprego de dois modelos experimentais, avaliando a integridade da membrana celular, através da atividade da LDH e quanto ao metabolismo celular, através do ensaio colorimétrico de MTT.

6.4.1 Efeito na viabilidade celular de neutrófilo humano

No ensaio colorimétrico de MTT, a adição de concentrações crescentes (2 – 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) das frações alcaloídicas (FHE07, FHE11 e FHE15) à suspensão de neutrófilos não reduziu significativamente o percentual de células viáveis em relação ao grupo HBSS/controle, conforme mostrado na Figura 40a-c. Como esperado, a adição de triton X-100 (0,2%, v/v – padrão citotóxico) reduziu significativamente a viabilidade celular ($19,93 \pm 0,31\%$; $6,30 \pm 0,19\%$ e $7,40 \pm 0,31\%$, respectivamente) em relação ao grupo HBSS (100% células viáveis).

Da mesma forma, as três frações alcaloídicas (FHE07, FHE11 e FHE15), em todas as concentrações testadas (2 – 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), não induziram alteração significativa na membrana celular dos neutrófilos, mensurada pela atividade da LDH, em relação ao grupo HBSS/controle, conforme mostrado na Figura 40d-f. Apenas o grupo triton X-100 (0,2%, v/v – padrão citotóxico) induziu lesão significativa na membrana celular dos neutrófilos ($838,7 \pm 50,08\%$, $2.569 \pm 40,47\%$ e $4.075 \pm 148,6\%$, respectivamente – dados não mostrados) em relação ao grupo HBSS (100% atividade da LDH).

Figura 40 – Efeito das frações alcalóidicas de *Hippeastrum elegans* (FHE07, FHE11 e FHE15) sobre a viabilidade de neutrófilo humano, determinada pelo teste de MTT e atividade da LDH.



Fonte: Elaborado pela autora.

Ensaio colorimétrico de MTT para a) FHE07, b) FHE11 e c) FHE15. Atividade da LDH para d) FHE07, e) FHE11 e f) FHE15. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média de três experimentos independentes. ^a vs HBSS; ^b vs Controle; ^c vs 2 µg/mL; ^d vs 5 µg/mL; ^e vs 10 µg/mL ($p < 0,05$ - ANOVA e Teste de Tukey). HBSS: solução balanceada de Hanks; Controle: DMSO (1%, v/v); Tx-100: triton X-100 (0,2%, v/v - padrão citotóxico); MTT: 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; LDH: Lactato Desidrogenase.

Assim, os resultados sugerem que as frações alcaloides de *H. elegans* não afetam o metabolismo e a membrana plasmática dos neutrófilos humanos nas concentrações testadas. Ausência de toxicidade para frações alcaloídicas extraídas de bulbos e folhas de *H. elegans*, foram anteriormente descritas em neurônios corticais de ratos, determinado pelo ensaio de LDH (CORTES et al., 2018). Além disso, alcaloides isolados de Amaryllidaceae, por exemplo, a licorina, também foi isento de toxicidade em macrófagos RAW264.7 (KANG et al., 2012).

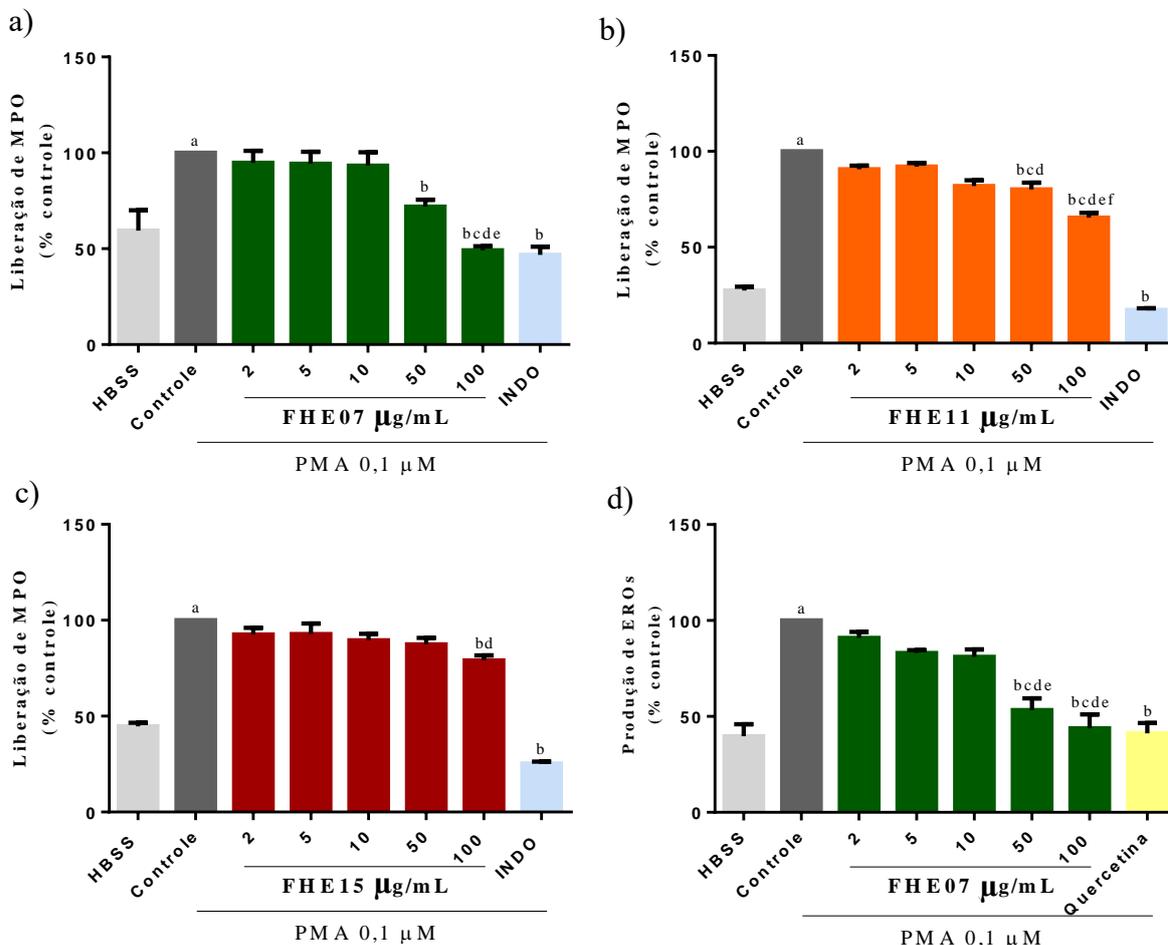
Diante dos resultados obtidos, foi investigado o efeito anti-inflamatório das frações (FHE07, FHE11 e FHE15) com auxílio do modelo de degranulação neutrofílica, induzida por PMA, mensurada pela liberação de MPO.

6.4.2 Efeito na degranulação neutrofílica e produção de EROs

A exposição das células ao PMA aumentou significativamente os níveis de MPO (40,4 - 72,6%) no grupo controle em relação ao grupo HBSS (não tratado) (FIGURA 41a-c). Esse aumento na liberação de MPO foi parcialmente reduzido pela adição das frações alcaloídicas (FHE07, FHE11 e FHE15) à suspensão celular, especialmente na concentração mais alta (100 µg/mL). Nesta concentração, as frações (FHE07, FHE11 e FHE15) reduziram significativamente a liberação de MPO ($49,20 \pm 2,05\%$, $65,50 \pm 2,39\%$ e $79,01 \pm 2,67\%$, respectivamente), quando comparadas ao grupo controle (liberação de MPO: 100%). Inclusive, o efeito anti-inflamatório da FHE07 (100 µg/mL) não diferiu estatisticamente do grupo da indometacina ($46,85 \pm 4,19\%$, 36 µg/mL), um anti-inflamatório não esteroide utilizado como padrão (FIGURA 41a).

A ativação direta da proteína quinase C (PKC) pelo PMA em neutrófilos resulta em múltiplas respostas, incluindo a degranulação e a ativação do complexo da enzima NADPH oxidase, levando à produção de EROs, que desempenha um papel central nas respostas inflamatórias (DAVIES; KAWKINS, 2020; BERTRAM; LEY, 2011; SAITO et al., 2005). Nesse sentido, foi investigado o efeito da FHE07 na produção de EROs por meio do ensaio de quimioluminescência dependente de luminol. Esta fração foi selecionada com base em seu notável efeito na degranulação celular entre as frações alcaloídicas testadas. A FHE07 reduziu significativamente a produção de EROs induzida por PMA, nas concentrações de 50 e 100 µg/mL ($53,31 \pm 6,09\%$ e $43,77 \pm 7,25\%$, respectivamente), em relação ao grupo controle (100% de liberação). Inclusive, a redução na produção de EROs para a FHE07 (50 e 100 µg/mL) não diferiu estatisticamente da quercetina, flavonoide anti-inflamatório empregado como padrão ($41,24 \pm 5,36\%$, 50 µg/mL) (FIGURA 41d).

Figura 41 – Efeito das frações alcalóidicas de *Hippeastrum elegans* (FHE07, FHE11 e FHE15) sobre a degranulação neutrofílica e produção de EROs em neutrófilo humano.



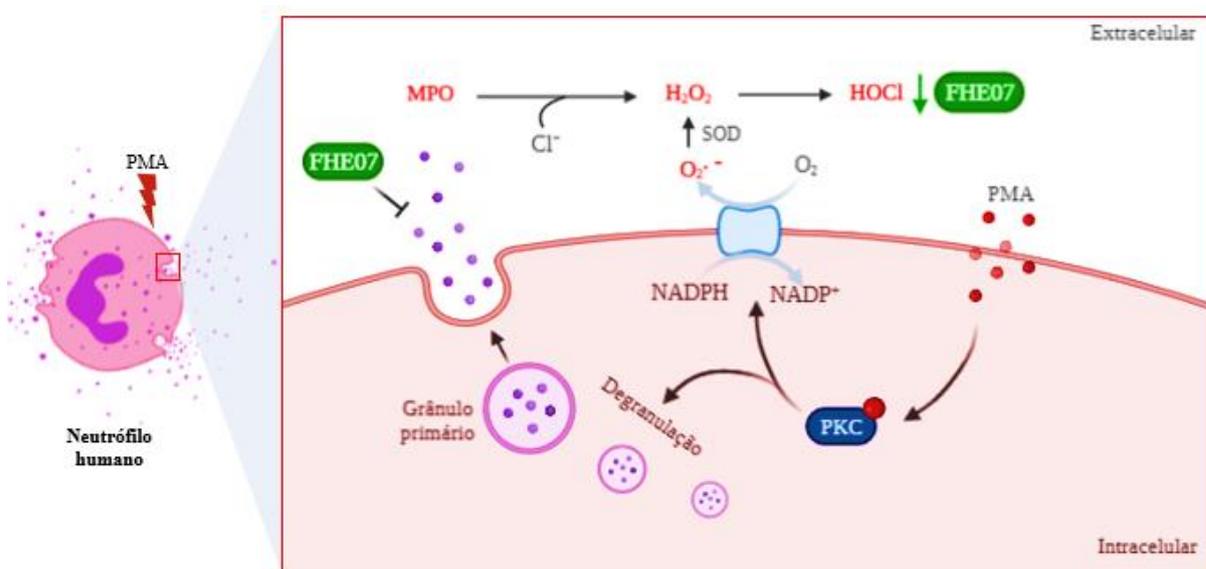
Fonte: Elaborado pela autora.

Ensaio de degranulação neutrofílica, expressa em % de liberação de MPO, para a) FHE07, b) FHE11 e c) FHE15; d) ensaio de quimioluminescência, expressa em % de produção de EROs, para FHE07. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. ^a vs HBSS; ^b vs Controle; ^c vs 2 μ g/mL; ^d vs 5 μ g/mL; ^e vs 10 μ g/mL; ^f vs 50 μ g/mL ($p < 0,05$ - ANOVA e Teste de Tukey). HBSS: solução balanceada de Hanks; Controle: DMSO (1%, v/v); INDO: indometacina (36 μ g/mL); Quercetina (50 μ g/mL); MPO: mieloperoxidase; EROs: espécies reativas de oxigênio; PMA: acetato miristato de forbol (0,1 μ M).

O luminol é um composto que amplifica a quimioluminescência gerada durante a produção de EROs por células fagocitárias, como macrófagos e neutrófilos. Essas células possuem o sistema NADPH responsável pela produção do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que na presença da superóxido dismutase gera o H_2O_2 , utilizado como substrato da MPO para a produção do ácido hipocloroso (HOCl), poderoso oxidante e microbicida (DAVIES; KAWKINS, 2020). Tomados em conjunto, os resultados demonstraram que a inibição da produção de EROs pela FHE07 induzido por PMA em neutrófilos humanos está relacionada, pelo menos em parte, com sua capacidade de modular do sistema MPO- H_2O_2 -HOCl (FIGURA

42). Estudos adicionais são necessários para melhor determinação do mecanismo molecular de ação anti-inflamatória e antioxidante da FHE07, incluindo a avaliação de uma possível ação direta sobre enzimas que têm um papel importante na resposta (ex.: PKC, MPO, SOD e sistema NADPH oxidase) e efeito sequestrador de radicais livres.

Figura 42 – Esquema ilustrativo representando o mecanismo de ativação do neutrófilo humano após estímulo com PMA e possíveis pontos de atuação da FHE07.



Fonte: Elaborado pela autora, com recursos da plataforma BioRender.com, versão gratuita.

O PMA ativa as isoformas da PKC, com consequente produção de EROs e degranação celular. A fração alcaloídica de *Hippeastrum elegans* cultivada por 7 meses (FHE07) demonstrou efeito sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos, através da modulação do sistema MPO-H₂O₂-HOCl. PMA: acetato miristato de forbol (0,1 μM); PKC: proteína quinase C; SOD: superóxido dismutase; MPO: mieloperoxidase; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; HOCl: ácido hipocloroso.

6.4.1.3 Alcaloides marcadores para a redução da liberação de MPO: análise de PLS

A fim de destacar os compostos determinantes para a atividade anti-inflamatória, a matriz de dados das frações FHE07, FHE11 e FHE15 foram submetidas a análise quimiométrica supervisionada. A Tabela 4 descreve o número de variáveis latentes (LV), erros de calibração e validação cruzada, e seus respectivos coeficientes de correlação e valores de viés, parâmetros utilizados para avaliar os alcaloides mais correlacionados com a atividade anti-inflamatória. A proximidade entre os erros de calibração e de validação cruzada, altos coeficientes de correlação e baixos valores de vieses, mostram a boa capacidade de correlação do modelo. Enquanto a Figura 43 ilustra os resultados da modelagem de regressão multivariada representado pelos *scores* (a), gráfico de influência de Hotelling T₂ × Q resíduos (b), e valores

de liberação de MPO (%) mensurados \times preditos (c), obtidos de acordo com a composição dos cromatogramas (12 a 18 min), bem como os alcalóides mais correlacionados com a atividade anti-inflamatória apresentado pelos picos mais negativos no gráfico de *loadings* (d), os quais foram corroborados pelo gráfico VIP (Variável de Importância na Projeção). Compostos com limiar VIP superior a 1 é considerado relevante para a modelagem (BALLABIO, 2015).

Tabela 4 – Parâmetros estatísticos da modelagem de regressão pelo método PLS.

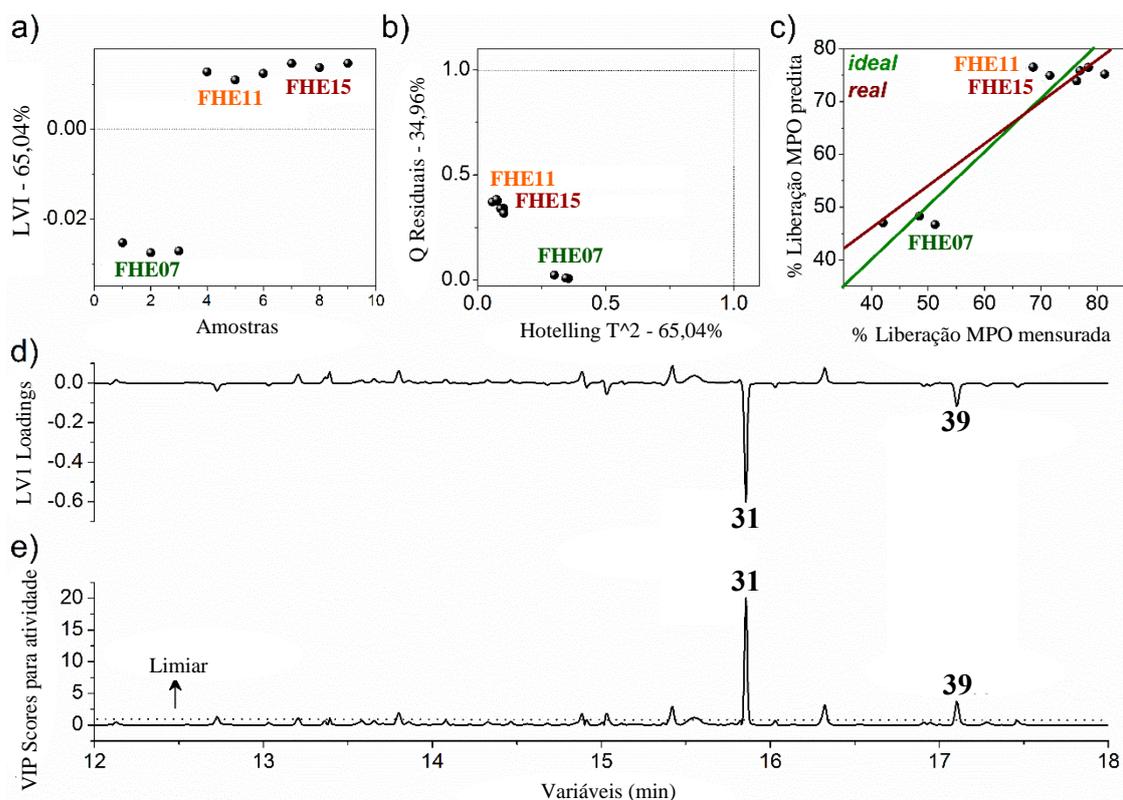
RMSEC ^a	RMSECV ^b	RMSEC/RMSECV ^c	r ² cal ^d	r ² CV ^e	Viés	Viés CV ^f
4,32	5,90	0,73	0,90	0,82	0,00	-0,31

^araiz do erro médio quadrático de calibração; ^braiz do erro médio quadrático de validação cruzada; ^cíndice de similaridade; ^dcoeficiente de calibração; ^ecoeficiente de validação cruzada. ^fviés de validação cruzada.

Fonte: Elaborado por Elenilson Godoy.

Conforme mostrado na Figura 43, as frações foram separadas em ativa (FHE07) e inativas (FHE11 e FHE15) (a). A fração FHE07 com *scores* negativos apresentou forte correlação com o alcaloide licorina (**31**), pico mais negativo no gráfico de *loadings* LV1 (d) correspondendo a 65,04% da variância total. O gráfico Hotelling T2 \times Q resíduos (b) não mostrou *outliers* e a proximidade entre as atividades anti-inflamatórias medidas e previstas (c) com base na composição do cromatograma corroborou o bom ajuste da modelagem de regressão. Portanto, os resultados da regressão quimiométrica indicam a licorina (**31**) como principal alcaloide marcador para a atividade anti-inflamatória testada. Além disso, o derivado de licorina, 11,12-dehidro-2-metoxi-assoanina (**39**), cuja estrutura está sendo proposta pela primeira vez, pode estar correlacionada com a atividade anti-inflamatória, embora em menor proporção (d,e).

Figura 43 – Análise de PLS discriminando os alcaloides marcadores para a atividade anti-inflamatória.



Fonte: Elaborado por Elenilson Godoy.

a) Sistema de coordenadas de LV1 scores; b) gráfico de influência de Hotelling T² × Q resíduos; c) valores de atividade anti-inflamatória mensurados × preditos; d) LV1 loadings; e) VIP scores para atividade com limiar superior a 1. LV: variável latente; VIP: variável de importância na projeção.

Diversas atividades farmacológicas foram descritas para licorina e seus derivados, incluindo antiviral, antitumoral, anticolinesterase e anti-inflamatória (ROY et al., 2018; CAO; YANG; ZHOU, 2013; DE ANDRADE et al., 2012). Particularmente, a licorina já demonstrou potencial anti-inflamatório ao suprimir a expressão da enzima pró-inflamatória iNOS e a produção de NO, PGE₂, TNF- α e IL-6 de macrófagos RAW264.7 estimulados com LPS (KANG et al., 2012). Recentemente, Liang et al. (2020) demonstraram que a administração de licorina reduziu a inflamação pulmonar aguda e a fibrose induzida por bleomicina em camundongos, suprimindo, por exemplo, a expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL6) e a infiltração de neutrófilos no tecido pulmonar, medida pela atividade da MPO. Ilavenil et al. (2011) demonstraram que a licorina extraída de *Crinum asiaticum* (Amarallydaceae) tem atividade significativa de eliminação de radicais livres (por exemplo, ânion superóxido), inibição da peroxidação lipídica e redução da depleção de glutathiona (antioxidante não enzimático) em eritrócitos humanos expostos ao radical peroxil (AAPH).

A produção de EROs ocorre em todos os organismos aeróbicos como parte dos processos metabólicos normais, no entanto, pode aumentar drasticamente como resultado da inflamação, principalmente como resposta a ativação de fagócitos. Além disso, as EROs também estimulam a inflamação através da liberação de citocinas, as quais induzem o recrutamento de neutrófilos e macrófagos adicionais. Assim, a neutralização de radicais livres por antioxidantes pode levar a redução da inflamação. Moléculas capazes de reduzir o estresse oxidativo gerado por esses radicais podem ter potencial terapêutico na prevenção/tratamento de várias doenças inflamatórias (CORTES et al., 2018; PRAVALIKA et al., 2018; ILAVENIL et al., 2011).

Portanto, as evidências supracitadas sustentam as projeções para os alcaloides discriminados na PLS, os quais, isolados ou em associação, são os possíveis compostos responsáveis pela modulação das vias pró-inflamatórias de neutrófilos ativados com PMA, observadas para a fração de *H. elegans* cultivada por 7 meses.

6.4.2 Efeito anti-inflamatório em micróglia (linhagem BV-2)

Para a triagem de alcaloides com potencial anti-inflamatório em células microgliais, linhagem BV-2, apenas a fração de *H. elegans* cultivada por 15 meses (FHE15) foi considerada, em função dos alcaloides presentes que têm mostrado efeitos neuroprotetor e anti-inflamatório *in vitro* (CORTES et al., 2018; LI et al., 2013; KIHARA et al., 2004). Ademais, a FHE15 possui maior concentração relativa do alcaloide galantamina (**4**), e outro alcaloide estruturalmente relacionado, licoramina (**6**), em comparação as demais frações coletas em tempos diferentes (FHE05, FHE07, FHE09, FHE11 e FHE13), como pode ser visualizado na Tabela 3. Além disso, a FHE15 também apresenta um percentual considerável de outros alcaloides, como a 11,12-dehidroanhidrolícorina (**22**), pancracina (**29**), 11-hidroxivitatina (**30**), licorina (**31**) e o composto ainda não identificado, denominado desconhecido G (**24**).

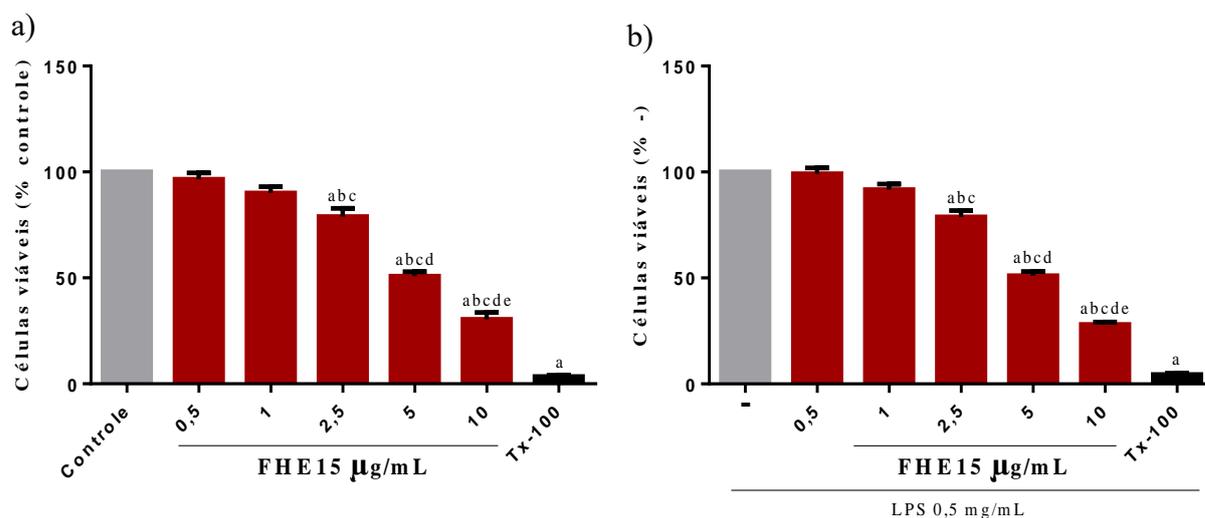
6.4.2.1 Efeito da FHE15 na viabilidade celular de micróglia (linhagem BV-2)

Inicialmente, a citotoxicidade da FHE15 sobre células BV-2 foi avaliada para definir as concentrações a serem utilizadas no ensaio de avaliação da atividade anti-inflamatória. Para tanto, dois ensaios de citotoxicidade foram considerados: ensaio colorimétrico de MTT e o perfil de morte celular por citometria de fluxo, com emprego de corantes de viabilidade celular, como 7-AAD (marcador de necrose) e anexina V (marcador de apoptose).

A adição de FHE15 (0,5 - 10 µg/mL) às células microgliais na ausência (FIGURA 44a) ou na presença de LPS (FIGURA 44b) interferiu na viabilidade celular de maneira

comparável, sem alterações significativas no percentual de células viáveis até a concentração de 1 µg/ml (FHE15: 90,10 ± 2,90%; FHE15+LPS: 91,67 ± 2,67%) em relação ao grupo controle (veículo) e grupo LPS (-) com 100% de células viáveis). Por outro lado, a FHE15 na ausência ou na presença de LPS reduziu significativamente o percentual de células viáveis a partir da concentração de 2,5 µg/ml, com máxima redução na concentração de 10 µg/ml (% células viáveis - FHE15: 30,40 ± 3,28%; - FHE15 +LPS: 28,11 ± 1,09%) em relação ao grupo controle (veículo) e LPS (-). O triton X-100 (0,2%, v/v), padrão citotóxico, provocou uma redução significativa na viabilidade das células microgliais, na ausência ou na presença de LPS, com percentual de células viáveis em torno de apenas 4%.

Figura 44 – Efeito da fração FHE15 de *Hippeastrum elegans* sobre a viabilidade celular de células microgliais (linhagem BV-2), determinada pelo ensaio colorimétrico de MTT.



Fonte: Elaborado pela autora.

Ensaio colorimétrico de MTT em micrógliia (linhagem BV-2) após exposição da FHE15 por 24 h na ausência a) e na presença de LPS b). Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média de três experimentos independentes. ^a vs Controle/(-); ^b vs 0,5 µg/mL; ^c vs 1 µg/mL; ^d vs 2,5 µg/mL; ^e vs 5 µg/mL ($p < 0,05$ - ANOVA e Teste de Tukey). Controle: DMSO (0,1%, v/v - veículo); (-): grupo estimulado com LPS (0,5 mg/mL, p/v); Tx-100: triton x-100 (0,2%, v/v - padrão citotóxico); MTT: (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide); LPS: lipopolissacarídeo.

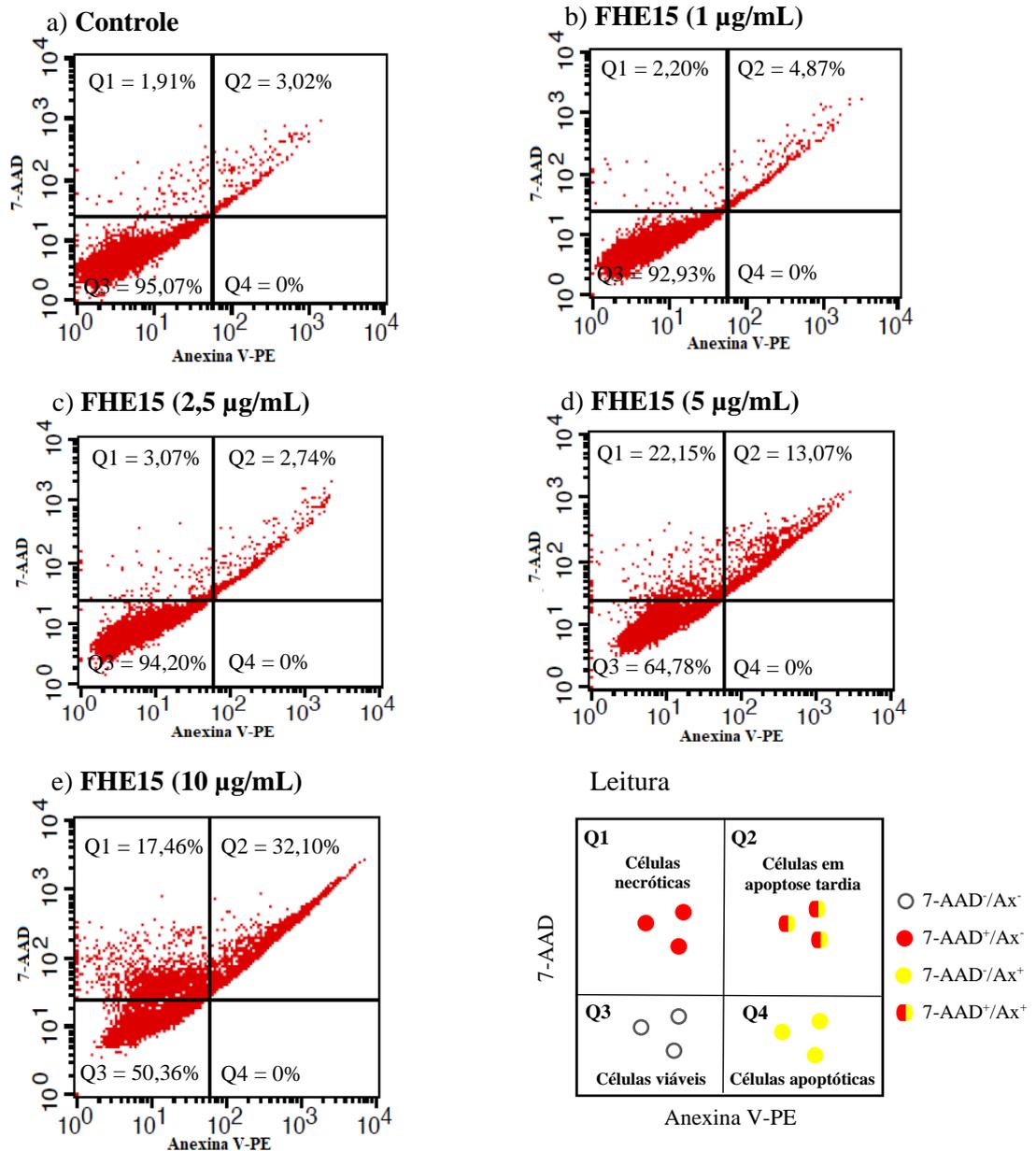
O ensaio de MTT avalia a capacidade metabólica de células expostas a substâncias bioativas e/ou agentes nocivos para metabolizar o sal de tetrazólio à formazan com auxílio das desidrogenases mitocondriais. Portanto, os resultados sugerem que a FHE15 interfere no metabolismo das células microgliais a partir da concentração de 2,5 µg/mL, estando ou não na presença do LPS. A avaliação da citotoxicidade da FHE15 na presença do LPS constitui um dado importante, porque mimetiza as condições que a fração estará exposta na avaliação da sua possível atividade anti-neuroinflamatória. Corroborando nossos dados, Zhao e colaboradores

(2019) investigaram o efeito do extrato de *Lycoris chejuensis* (Amaryllidaceae) e de seu alcaloide isolado, 7-desoxi-trans-dihidronarciclasina (E144) na viabilidade celular de micrógliia, linhagem BV-2, também pelo ensaio colorimétrico de MTT (na ausência e na presença de LPS). Tanto o extrato (5 - 50 $\mu\text{g/mL}$) quanto o alcaloide isolado, E144 (0,5 - 2 μM), reduziram significativamente (abaixo de 50%; valores percentuais exatos não foram mostrados) o total de células BV-2 viáveis, apenas nas maiores concentrações testadas (50 $\mu\text{g/mL}$ e 2 μM (0,59 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente). Semelhante ao nosso estudo, não foi observado diferença significativa na viabilidade celular, na ausência ou na presença do estímulo com LPS.

Prosseguindo os estudos de citotoxicidade, foi investigado o efeito da FHE15 sobre o perfil de morte celular por citometria de fluxo, através da marcação com 7-AAD e anexina V-PE. De acordo com a marcação, as células foram classificadas em: células viáveis (7-AAD⁻/Ax⁻); células necróticas (7-AAD⁺/Ax⁻); células apoptóticas (7-AAD⁻/Ax⁺) e células em apoptose tardia (7-AAD⁺/Ax⁺).

Na Figura 45 pode ser observado o efeito da FHE15 sobre a viabilidade de células microgliciais com o auxílio dos gráficos de *dot plot* (Anexina V-PE versus 7-AAD), de acordo com cada concentração testada (FIGURA 45a-e). Cada gráfico é dividido em quatro quadrantes, nos quais as células são dispostas de acordo com a absorção de um ou ambos fluorocromos. As células viáveis (7-AAD⁻/Ax⁻) ocupam o quadrante inferior esquerdo do gráfico (Q3), enquanto as células necróticas (7-AAD⁺/Ax⁻), ocupam o quadrante superior esquerdo (Q1). No quadrante superior direito (Q2), dispõem-se as células em apoptose tardia (7-AAD⁺/Ax⁺) e no quadrante inferior direito (Q4), dispõem-se as células em apoptose (7-AAD⁻/Ax⁺). Neste quadrante, nenhum evento foi registrado.

Figura 45 – Gráficos de pontos (Anexina V-PE versus 7-AAD) da FHE15 de *Hippeastrum elegans* em células microgliais (linhagem BV-2), avaliadas por citometria de fluxo.

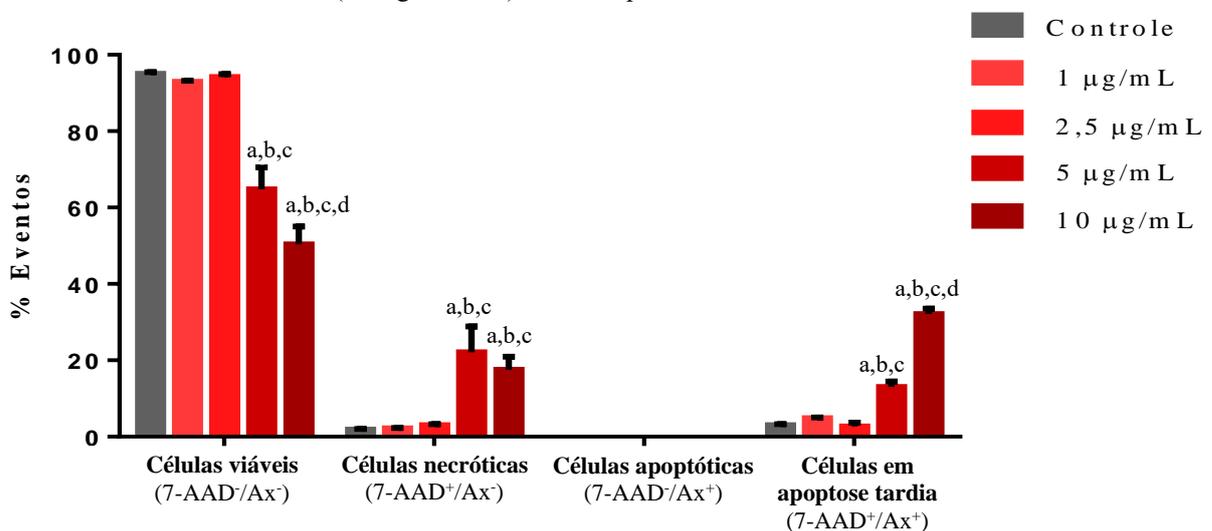


Fonte: Elaborado pela autora.

Dot plot mostrando a dispersão das células BV-2 por intensidade de marcação com 7-AAD e anexina V-PE. Cada ponto no gráfico corresponde a uma célula. No quadrante superior esquerdo (Q1) estão dispostas as células necróticas (7-AAD⁺/Ax⁻) e no quadrante inferior esquerdo (Q3) as células viáveis (7-AAD⁻/Ax⁻), enquanto nos quadrantes superior (Q2) e inferior direito (Q4), estão as células em apoptose tardia (7-AAD⁺/Ax⁺) e células apoptóticas (7-AAD⁻/Ax⁺), respectivamente. Controle: DMSO (0,1%, v/v - veículo); 7-AAD: 7-aminoactinomicyn D; Ax: anexina V marcada com ficoeritrina.

Na Figura 46 pode ser observado que a FHE15 apenas nas duas maiores concentrações (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$), causou uma redução significativa do percentual de células viáveis – 7AAD⁻/Ax⁻ ($64,78 \pm 5,80\%$ e $50,36 \pm 4,66\%$, respectivamente), relacionadas ao aumento do percentual de células marcadas com 7-AAD ($22,15 \pm 6,76\%$ e $17,46 \pm 3,43\%$, respectivamente) e aumento do percentual de células marcadas duplamente, 7-AAD e anexina V, ($13,07 \pm 1,40\%$ e $32,10 \pm 1,47\%$, respectivamente), em relação ao grupo controle (7AAD⁻/Ax⁻: $95,07 \pm 0,38\%$; 7AAD⁺/Ax⁻: $1,91 \pm 0,15\%$ e 7AAD⁺/Ax⁺: $3,02 \pm 0,24\%$), indicando morte celular por necrose e apoptose tardia. Não foi observado percentual de células marcadas apenas com anexina V em nenhum dos grupos avaliados, indicando que a FHE15 não induziu morte celular por apoptose, então, o aumento de morte celular no grupo duplamente marcado (em apoptose tardia) deve-se à ligação da anexina V-PE com a fosfatidilserina internamente, como resultado da lesão da membrana celular. Além disso, na concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$, a FHE15 não reduziu significativamente o percentual de células BV-2 viáveis ($94,20 \pm 0,76\%$), assim como o percentual de células necróticas, marcadas com 7-AAD ($3,07 \pm 0,24\%$), não foi significativo em relação ao grupo controle.

Figura 46 – Perfil de morte celular induzido pela FHE15 de *Hippeastrum elegans* em células microgliais (linhagem BV-2), avaliado por citometria de fluxo.



Fonte: Elaborado pela autora.

Grupos celulares: células viáveis = 7-AAD⁻/Ax⁻; células necróticas = 7-AAD⁺/Ax⁻; células apoptóticas = 7-AAD⁻/Ax⁺; células em apoptose tardia = 7-AAD⁺/Ax⁺. O aumento da intensidade da cor refere-se ao aumento da concentração avaliada (1 - 10 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. ^a vs Controle, ^b vs 1 $\mu\text{g/mL}$, ^c vs 2,5 $\mu\text{g/mL}$, ^d vs 5 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey). Controle: DMSO (0,1%, v/v - veículo); 7-AAD: 7-aminoactinomicyn D; Ax: anexina V marcada com ficoeritrina.

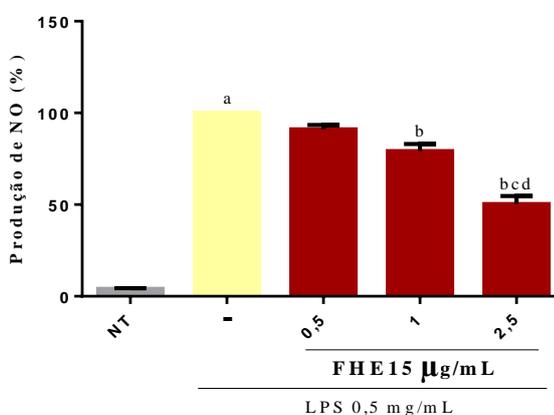
O 7-AAD é um corante de DNA, que distingue células viáveis e células necróticas por citometria de fluxo. Células com membrana íntegra não permitem a penetração e ligação do 7-AAD ao DNA, por isso, células 7-AAD positivas são consideradas necróticas (KUMAR et al., 2015; ZIMMERMANN; MEYER, 2011). Dessa forma, os resultados sugerem que a FHE15 em concentrações mais elevadas (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) reduziu parcialmente a viabilidade celular provocando morte celular por necrose.

Diante dos resultados obtidos a FHE15 parece não interferir no metabolismo celular das células microgliais, mas interfere na permeabilidade da membrana plasmática nas concentrações maiores. Dessa forma, o estudo prosseguiu com a avaliação do efeito da FHE15 sobre a neuroinflamação induzida por LPS, empregando como marcador o NO, determinado através do reagente de Griess. Para tanto, foram empregadas as concentrações de FHE15 isentas de citotoxicidade (0,5 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$).

6.4.2.2 Efeito da FHE15 sobre o aumento na concentração de NO induzida por LPS em micróglia (linhagem BV-2)

Como mostrado na Figura 47, o tratamento das células BV-2 com LPS aumentou significativamente a produção de NO (95,92%) em relação ao grupo não tratado ($4,08 \pm 0,38\%$). Porém, a adição de FHE15 às células nas concentrações de 1 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$ reduziram significativamente a produção de NO ($79,17 \pm 3,94\%$ e $50,28 \pm 4,45\%$, respectivamente) induzida por LPS. Na concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, a redução de NO não foi significativa ($91,0 \pm 2,48\%$).

Figura 47 – Efeito da fração FHE15 de *Hippeastrum elegans* sobre a produção de NO em micróglia (linhagem BV-2).



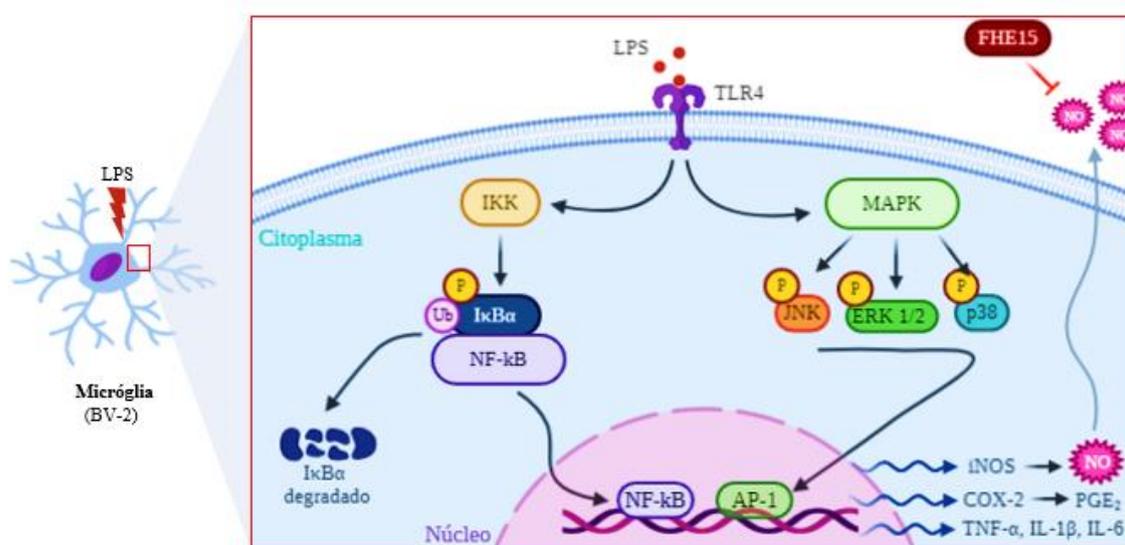
Fonte: Elaborado pela autora.

Produção de NO após 24 h de exposição à FHE15 (0,5 - 2,5 $\mu\text{g/mL}$) e estímulo com LPS, mensurado indiretamente pela quantificação de nitrito na reação de Griess. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média

de três experimentos independentes. ^a vs grupo NT; ^b vs (-); ^c vs 0,5 µg/mL; ^d vs 1 µg/mL ($p < 0,05$ - ANOVA e Teste de Tukey). NT: grupo não tratado (DMSO 0,1%, v/v – veículo); (-): grupo estimulado com LPS (0,5 mg/mL, p/v); LPS: lipopolissacarídeo; NO: óxido nítrico.

A micróglia ativada desempenha um papel crítico na mediação de vários processos inflamatórios em doenças neurodegenerativas (ZHANG et al., 2015). O LPS, um indutor representativo de polarização M1, ativa a micróglia por meio da ligação ao receptor TLR4, o qual aciona as vias de sinalização gênica NF-κB (fator nuclear kappa B) e MAPK (proteína-quinase ativada por mitógeno) para a expressão de genes e produção de mediadores inflamatórios, tais como TNF-α, IL-1β, IL-6, iNOS, COX-2, NO e PGE₂ (GU et al., 2018; CAO; HE, 2013). O NO está entre os mediadores inflamatórios chave na micróglia (BV2) estimulada por LPS (JUNG et al., 2016). Dessa forma, a FHE15 ao reduzir a produção de NO induzida por LPS, torna-se um produto derivado promissor como anti-neuroinflamatório. Contudo, considerando o caráter preliminar do estudo, são necessários estudos adicionais para melhor descrição do efeito anti-neuroinflamatório da FHE15. A Figura 48 ilustra as vias de sinalização na micróglia ativada com LPS que resultam na expressão de mediadores pró-inflamatórios.

Figura 48 – Esquema ilustrativo representando as vias de sinalização na micróglia (linhagem BV-2) ativada com LPS e consequente produção de mediadores inflamatórios.



Fonte: Elaborado pela autora, com recursos da plataforma BioRender.com, versão gratuita.

O LPS liga-se ao receptor TLR4, o qual aciona as vias de sinalização NF-κB e MAPK. O TLR4 desencadeia a ativação do complexo IKK, fosforila IκBα, levando à sua ubiquitinação e consequente degradação, o que permite a translocação de NF-κB para o núcleo. Em paralelo, a via da MAPK, composta pelos subgrupos p38, ERK-1/2 e JNK, regula a transcrição de mediadores inflamatórios por meio da ativação do fator de transcrição AP-1. Essas vias, em conjunto, expressam genes inflamatórios, incluindo iNOS, COX-2, TNF-α e IL-6. O pré-tratamento com FHE15 reduziu a produção de NO. Os mecanismos pelos quais ocorre esse efeito ainda serão investigados. LPS: Lipopolissacarídeo; TLR4: Receptor *tool like 4*; IKK: Complexo IκB quinase; IκBα: Inibidor kappa B; P: Fosfato;

Ub: Ubiquitina; NF- κ B: Fator nuclear kappa B; MAPK: Proteína-quinase ativada por mitógeno; ERK: Quinase reguladora de sinal extracelular; AP-1: Proteína ativadora 1; iNOS: Óxido nítrico sintase induzida; COX-2: Ciclo-oxigenase 2; TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa; IL: Interleucina; NO: óxido nítrico. PGE₂: Prostaglandina E₂.

O efeito observado para a fração FHE15 pode estar relacionado a presença dos alcaloides galantamina (4), licoramina (6), 11,12-dehidroanhidrolicorina (22), pancracina (29) e licorina (31). A galantamina é utilizada como um anticolinesterásico de ação central, seletivo, competitivo e reversível para o tratamento sintomático da Doença de Alzheimer. Adicionalmente, vários estudos demonstraram atividade neuroprotetora para a galantamina (LI et al., 2013; TAKATA et al., 2010; KIHARA et al., 2004), constituindo uma vantagem adicional no tratamento clínico da DA (TAKATA et al., 2010). Por exemplo, Kihara et al. (2004) demonstraram que a galantamina promove efeito protetor contra a citotoxicidade induzida por glutamato, quando associado ao peptídeo β -amiloide, em cultura primária de neurônios corticais de rato, através da modulação alostérica de receptores nicotínicos. Da mesma forma, licoramina e pancracina mostraram efeito neuroprotetor contra a toxicidade induzida por H₂O₂ em células de neuroblastoma dopaminérgico humano (SH-SY5Y) (LI et al., 2013).

Cortes et al. (2018) investigaram o efeito neuroprotetor da fração alcaloídica de *H. elegans* (0,75 - 6 μ g/mL) sobre a toxicidade induzida por glutamato em neurônios corticais de ratos, empregando como marcador a atividade da LDH. A fração foi adicionado aos neurônios antes ou após a exposição ao glutamato, mostrando efeito neuroprotetor mediante o pré-tratamento. Efeito contrário foi observado no tratamento após a adição de glutamato. Contudo, vale ressaltar que o perfil alcaloídico dessa fração de *H. elegans* é consideravelmente diferente do perfil da FHE15, principalmente quanto aos percentuais de licorina (1,45%) e licoramina (87,33%), que parece influenciar no efeito investigado, por exemplo, a fração alcaloídica de *Clivia miniata* (Amaryllidaceae), composta apenas por licorina (77,24%), 11,12-dehidroanhidrolicorina (12,63%) e licoramina (10,13%). A fração de *C. miniata* (0,75 μ g/mL) administrada após a adição de glutamato demonstrou efeito neuroprotetor equivalente à memantina (6 μ g/mL, antagonista receptores NMDA), com significativa redução na liberação da LDH. Dessa forma, a licorina é possivelmente responsável, pelo menos em parte, pelo efeito anti-neuroinflamatório da FHE15, determinado de maneira preliminar. Porém, estudos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese.

Especificamente em células microgliais (linhagem BV-2), Zhao e colaboradores (2019), demonstram efeito anti-neuroinflamatório do extrato etanólico e de um derivado de narciclasina isolado (E144) de *L. chejuensis* (Amaryllidaceae), que mostraram-se capazes de reduzir a produção de NO, PGE₂, TNF- α , IL-6 e a expressão das enzimas iNOS e COX-2

induzida por LPS, *in vitro*. Ambas amostras regularam, *in vitro*, tanto a polarização M1 quanto a polarização M2 da micróglia, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e estimulando a produção da citocina anti-inflamatória, IL-10, respectivamente. Além disso, o alcaloide E144, administrado por via oral, reduziu significativamente a expressão de TNF- α e COX-2 no córtex de camundongo estimulado com LPS (*Western blot*). Portanto, esses resultados mostram que espécies de Amaryllidaceae são promissoras fontes de alcaloides bioativos para modulação do processo inflamatório mediado por células microgлияis.

7 CONCLUSÃO

A análise de CG-EM de *H. elegans* associada à análise quimiométrica (PCA e HCA) mostrou um perfil metabolômico dinâmico, com variações na abundância relativa dos alcaloides no decorrer do tempo de cultivo, permitindo discriminar três grupos distintos. As frações alcaloídicas de cada grupo (FHE07, FHE11 e FHR15), não foram tóxicas para os neutrófilos humanos. No entanto, apenas a fração FHE07 apresentou efeito anti-inflamatório significativo, reduzindo os mecanismos pró-inflamatórios dos neutrófilos humanos de degranulação e produção de EROs. Além disso, os alcaloides licorina (**31**) e 11,12-dehidro-2-metoxi-assoanina (**39**) foram considerados responsáveis, pelo menos em parte, pela atividade anti-inflamatória da FHE07 (análise de PLS). Na micróglia (linhagem BV-2), a FHE15 reduziu significativamente a produção de NO em concentrações não tóxicas.

Estudos adicionais são necessários para melhor determinação do mecanismo molecular de ação anti-inflamatória e antioxidante da FHE07 em neutrófilos humanos e FHE15 em micróglia (linhagem BV-2), bem como para os alcaloides isolados.

REFERÊNCIA

- 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, 2021.
- ALBRECHT, D.; JUNGI, T.W. Luminol-enhanced chemiluminescence induced in peripheral blood-derived human phagocytes: obligatory requirement of myeloperoxidase exocytosis by monocytes. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 54, n. 4, p. 300-306, 1993.
- ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007.
- ALEGRE, E.; SAMMAMED, M.; FERNÁNDEZ-LANDÁZURI, S.; ZUBIRI, L.; GONZÁLEZ, A. Circulating biomarkers in malignant melanoma. **Advances in Clinical Chemistry**. p. 47-89, 2015.
- ALLEN, N. J.; BARRES, B. A. Glia - more than just brain glue. **Nature**. v. 457, n. 7230, p. 675-677, 2009.
- ALSHETAIWI, H. S.; BALIVADA, S.; SHRESTHA, T. B.; PYLE, M.; BASEL, M. T.; BOSSMANN, S. H.; TROYER, D. L. Luminol-based bioluminescence imaging of mouse mammary tumors. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 127, p. 223-228, 2013.
- ALVES-ARAÚJO, A.; PESSOA, E.; ALVES, M. Caracterização morfoanatômica de espécies de Amaryllidaceae s.s. e Alliaceae s.s. do Nordeste brasileiro. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 25, n.4, p. 68-81, 2012.
- Alzheimer's Disease International. 2019. World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia. London: Alzheimer's Disease International. Disponível online: <<https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2019.pdf>>. Acesso em: 29 Abr 2020.
- ANDREWS, P. C.; KRINSKY, N. I. Quantitative determination of myeloperoxidase using tetramethylbenzidine as substrate. **Analytical Biochemistry**. v. 127, n. 2, p. 346-350, 1982.
- ANISZEWSKI, T. **Alkaloids: secrets of life**. Alkaloid chemistry, biological, significance, applications and ecological role. Oxford: Elsevier; 2007.
- BALLABIO, D.; A MATLAB toolbox for principal component analysis and unsupervised exploration of data structure. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. v. 149, p. 1-9, 2015.
- BARTEL, J.; KRUMSIEK, J.; THEIS, F. J. Statistical methods for the analysis of high-throughput metabolomics data. **Computational and Structural Biotechnology Journal**. v. 4, n. 5, p. 1-9, 2013.
- BASTIDA, J.; LAVILLA, R.; VILADOMAT, F. Chapter 3: Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. **The Alkaloids: Chemistry and Biology**. p. 87-179, 2006.

BASTIDA, J.; CODINA, C.; PORRAS, C. L.; PAIZ, L. Alkaloids from *Hippeastrum solandriiflorum*. **Planta Med.** v. 62, p. 74-75, 1996.

BEALE, D. J.; PINU, F. R.; KOUREMENOS, K. A.; POOJARY, M. M.; NARAYANA, V. K.; BOUGHTON, B. A.; KANOJIA, K.; DAYALAN, S.; JONES, O. A. H.; DIAS, D. A. Review of recent developments in GC-MS approaches to metabolomics-based research. **Metabolomics.** v. 14, n. 11, p. 1-31, 2018.

BEDOUEHÈNE, S.; MOULTI-MATI, F.; HURTADO-NEDELEC, M.; DANG, P. M. C.; BENNA, J. E. Luminol-amplified chemiluminescence detects mainly superoxide anion produced by human neutrophils. **American Journal of Blood Research.** v. 7, p. 41-48, 2017.

BERGMEYER, H. U.; BERNT, E. Lactate dehydrogenase. In: Bergmeyer HU, editor. **Methods of Enzymatic Analysis.** London: Academic Press; 1963. Pp 574-579.

BERKOV, S.; TORRAS-CLAVERIA, L.; VILADOMAT, F.; SUÁREZ, S.; BASTIDA, J. GC-MS of some lycorine-type Amaryllidaceae alkaloids. **Journal of Mass Spectrometry,** v. 56, n. 3, p. 1-11, 2021.

BERKOV, S.; OSORIO, E.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J. Chemodiversity, chemotaxonomy and chemoecology of Amaryllidaceae alkaloids, in: H. J. Knölker (Ed.), **The Alkaloids: Chemistry and Biology**, Elsevier Inc., Amsterdam, p. 135-185, 2020.

BERTRAM, A.; LEY, K. Protein Kinase C Isoforms in Neutrophil Adhesion and Activation. **Arch. Immunol. Ther. Exp.** v. 59, p. 79-87 2011.

BERNY-LANG, M. A.; FRELINGER, A. L.; BARNARD, M. R.; MICHELSON, A. D. Flow Cytometry. **Platelets.** p. 581-602, 2013.

BESSA, C. D. P. B.; DE ANDRADE, J. P.; OLIVEIRA, R. S.; DOMINGOS, E.; SANTOS, H.; ROMÃO, W.; BASTIDA, J.; BORGES, W. S. Identification of alkaloids from *Hippeastrum aulicum* (ker Gawl.) Herb. (Amaryllidaceae) using CGC-MS and ambient ionization mass spectrometry (OS-MS and LS-MS). **Journal of Brazilian Chemical Society.** v. 28, n. 5, p. 819-830, 2017.

BREITEROVÁ, K.; LOČÁREK, M.; KOHELOVÁ, E.; TALÁCKOVÁ, M.; HULCOVÁ, D.; OPLETAL, L.; CAHLÍKOVÁ, L. Daffodils as Potential Crops of Biologically-active Compounds: assessment of 40 ornamental taxa for their alkaloid profile and cholinesterases inhibition activity. **Natural Product Communications.** v. 13, n. 4, p. 1-4, 2018.

BRYAN, N. S.; GRISHAM, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radical Biology and Medicine.** v. 43, n. 5, p. 645-657, 2007.

BROWN, G. C.; VILALTA, A. How microglia kill neurons. **Brain Research.** v. 1628, p. 288-297, 2015.

CAO, L.; HE, C. Polarization of macrophages and microglia in inflammatory demyelination. **Neuroscience Bulletin.** v. 29, n. 2, p. 189-198, abr. 2013.

CAO, Z. F.; YANG, P.; ZHOU, Q. S. Multiple biological functions and pharmacological effects of lycorine. **Science China Chemistry**. v. 56, p. 1382-1391, 2013.

CARVALHO, K. R.; SILVA, A. B.; TORRES, M. C. M.; PINTO, F. C. L.; GUIMARÃES, L. A.; ROCHA, D. D.; SILVEIRA, E. R.; COSTA-LOTUFO, L. V.; BRAZ-FILHO, R.; PESSOA, O. D. L. Cytotoxic Alkaloids from *Hippeastrum solandriiflorum* Lindl. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 26, n.10, p. 1976-1980, 2015.

CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; CARVALHO, D. C. M.; LIMA, E. A.; GALVÃO, J. G. F. M.; SILVA, J. S. F.; SALES-NETO, J. M.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S. Neutrophils and COVID-19: the road so far. **International Immunopharmacology**. v. 90, p. 107233-107241, 2021.

CHEN, M.; HUO, J. M.; HU, J.; XU, Z. P.; ZHANG, X. Amaryllidaceae alkaloids from *Crinum latifolium* with cytotoxic, antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities. **Fitoterapia**. v. 130, p. 48-53, 2018.

CHRISTY, M. P.; UEKUSA, Y.; GERWICK, L.; GERWICK, W. H. Natural Products with potential to treat RNA virus pathogens including SARS-CoV-2. **Journal of Natural Products**. p. 1-22, 2020.

CITOGU, G. S.; TANKER, M.; GUMUSEL, B. Antiinflammatory effects of lycorine and haemanthidine. **Phytotherapy Research**. v. 12, p. 205-206, 1998.

CORTES, N.; CASTAÑEDA, C.; OSORIO, E. H.; CARDONA-GOMEZ, G. P.; OSORIO, E. Amaryllidaceae alkaloids as agents with protective effects against oxidative neural cell injury. **Life Sciences**, v. 203, p.54-65, 2018.

CORTES, N.; SIERRA, K.; ALZATE, F.; OSORIO, E. H.; OSORIO, E. Alkaloids of Amaryllidaceae as inhibitors of cholinesterases (aches and bches): an integrated bioguided study: an integrated bioguided study. **Phytochemical Analysis**. v. 29, n. 2, p. 217-227, 2017.

CORTES, N.; DUQUE-POSADA, R. A.; ALVAREZ, R.; ALZATE, F.; BERKOV, S.; CARDONA-GÓMEZ, G. P.; OSORIO, E. Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five Amaryllidaceae species: A comparative study. **Life Sciences**. v. 122, p.42-50, 2015.

DE ANDRADE, J. P.; PIGNI, N. B.; TORRAS-CLAVERIA, L. BERKOV, S.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J. Bioactive alkaloid extracts from *Narcissus broussonetii*: Mass spectral studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 70, p. 13-25, 2012.

DEMARQUE, D. P.; DUSI, R. G.; SOUSA, F. D. M.; GROSSI, S. M.; SILVÉRIO, M. R. S.; LOPES, N. P.; ESPINDOLA, L. S. Mass spectrometry-based metabolomics approach in the isolation of bioactive natural products. **Scientific Reports**. v. 10, p. 1051-1059, 2020.

DESGAGNÉ-PENIX, I. Biosynthesis of alkaloids in Amaryllidaceae plants: a review. **Phytochemistry Reviews**. p. 1-23, 2020.

DEVI, S.; WANG, Y.; CHEW, W. K.; LIMA, R.; A-GONZÁLEZ, N.; MATTAR, C. N. Z.; CHONG, S. Z.; SCHLITZER, A.; BAKOCEVIC, N.; CHEW, S.; KEEBLE, J. L.; GOH, C. C.; LI, J. L. Y.; EVRARD, M.; MALLERET, B.; LARBI, A.; RENIA, L.; HANIFFA, M.; TAN, S. M.; CHAN, J. K. Y.; BALABANIAN, K.; NAGASAWA, T.; BACHELERIE, F.; HIDALGO, A.; GINHOUX, F.; KUBES, P.; NG, L. G. Neutrophil mobilization via plerixafor-mediated CXCR4 inhibition arises from lung demargination and blockade of neutrophil homing to the bone marrow. **Journal of Experimental Medicine**. v. 210, n. 11, p. 2321-2336, 2013.

DUTILH, J. H. A.; CAMPOS-ROCHA, A.; OLIVEIRA, R.S.; SASSONE, A. B.; MEEROW, A. W.; SEMIR, J.; GIUSSANI, L. M.; STREHER, N. S.; GARCIA, N. *Amaryllidaceae in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB33490>>. Acesso em: 03 dez. 2020.

DUTILH, J. H. A. BARBOSA, M. R. V.; SOTHERS, C.; MAYO, S.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L.; MESQUITA, A. C. Alliaceae & Amaryllidaceae. *In: Checklist das plantas do nordeste brasileiro: Angiospermas e Gymnospermas*. Brasília. p. 26-27, 2006.

EMWAS, A.-H. M.; AL-TALLA, Z. A.; YANG, Y.; KHARBATIA, N. M. Gas Chromatography–Mass Spectrometry of Biofluids and Extracts. **Methods in Molecular Biology**. p. 91-112, 2015.

FIELDING, B. C.; BEZERRA FILHO, C. S. M.; ISMAIL, N. S. M.; SOUSA, D. P. Alkaloids: therapeutic potential against human coronaviruses. **Molecules**. v. 25, n. 23, p. 5496-5512, 2020.

FILIPPI, M. D. Mechanism of diapedesis: importance of the transcellular route. **Advances in Immunology**. v. 129, p. 25-53, 2016.

GASCA, C. A.; MOREIRA, N. C. S.; ALMEIDA, F. C.; GOMES, J. V. D.; CASTILLO, W. O.; FAGG, C. W.; MAGALHÃES, P. O.; FONSECA-BAZZO, Y. M.; SAKAMOTO-HOJO, E.; MEDEIROS, Y. K. Acetylcholinesterase inhibitory activity, anti-inflammatory, and neuroprotective potential of *Hippeastrum psittacinum* (Ker Gawl.) herb (Amaryllidaceae). **Food and Chemical Toxicology**. v. 145, p. 111703-111715, 2020.

GE, X.; MENG, X.; FEI, D.; KANG, K.; WANG, Q.; ZHAO, M. Lycorine attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury through the HMGB1/TLRs/NF- κ B pathway. **3 Biotech**. v. 10, n. 8, p. 369-379, 2020.

GEORGIEV, V.; IVANOV, I.; PAVLOV, A. Recent progress in Amaryllidaceae biotechnology. **Molecules**. v. 25, n. 20, p. 4670-4683, 2020.

GIORDANI, R. B.; DE ANDRADE, J. P.; VERLI, H.; DUTILH, J. H.; HENRIQUE, A. T.; BERKOV, S.; BASTIDA, J.; ZUANAZZI, J. A. S. Alkaloids from *Hippeastrum morelianum* Lem. (Amaryllidaceae). **Magnetic Resonance in Chemistry**. v. 49, p. 668–672, 2011.

GRANATO, D.; SANTOS, J. S.; ESCHER, G. B.; FERREIRA, B. L.; MAGGIO, R. M. Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A

critical perspective. **Trends in Food Science & Technology**. v. 72, p. 83-90, 2018.

GRAZIANI, V.; SCOGNAMIGLIO, M.; BELLI, V.; ESPOSITO, A.; D'ABROSCA, B.; CHAMBERY, A.; RUSSO, R.; PANELLA, M.; RUSSO, A.; CIARDIELLO, F. Metabolomic approach for a rapid identification of natural products with cytotoxic activity against human colorectal cancer cells. **Scientific Reports**. v. 8, p. 1-11, 2018.

GREENHALGH, A. D.; DAVID, S.; BENNETT, F. C. Immune cell regulation of glia during CNS injury and disease. **Nature Reviews Neuroscience**. v. 21, n. 3, p. 139-152, 2020.

GU, C.; HU, Q.; WU, J.; MU, C.; REN, H.; LIU, C.-F.; WANG, G. P7C3 inhibits LPS-induced microglial activation to protect dopaminergic neurons against inflammatory factor-induced cell death in vitro and in vivo. **Frontiers in Cellular Neuroscience**. v. 12, p. 1-16, 2018.

GUO, Y.; DE ANDRADE, J. P.; PIGNI, N. B.; TORRAS-CLAVERIA, L.; TALLINI, L. R.; BORGES, W. S.; VILADOMAT, F.; NAIR, J. J.; ZUANAZZI, J. A. S.; BASTIDA, J. New alkaloids from *Hippeastrum papilio* (Ravenna) Van Scheepen. **Helvetica Chimica Acta**. v. 99, p. 143-147, 2016.

GUO, Y.; PIGNI, N. B.; ZHENG, Y.; ANDRADE, J. P.; TORRAS-CLAVERIA, G.; BORGES, W. S.; VILADOMAT, F. CODINA, C.; BASTIDA, J. Analysis of bioactive Amaryllidaceae alkaloid profiles in *Lycoris* species by GC-MS. **Natural Product Communications**. v. 9, n. 8, p. 1081-1086, 2014.

HAVLASOVÁ, J.; ŠAFRATOVÁ, M.; SIATKA, T.; ŠTĚPÁNKOVÁ, Š.; NOVÁK, Z.; LOČÁREK, M.; OPLETAL, L.; HRABINOVÁ, M.; JUN, D.; NINA BENEŠOVÁ, J.; KUNEŠ, J.; CAHLÍKOVÁ, L. Chemical composition of bioactive alkaloid extracts from some *Narcissus* species and varieties and their biological activity. **Natural Product Communications**. v. 9, p. 1151-1155, 2014.

HENSON, P. M. The Immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. I. The Role of antibody and complement on nonphagocytosable surfaces or phagocytosable particles. **The Journal of Immunology**. v. 107, n. 6, p. 1535-1546, 1971.

HETRICK, E. M.; SCHOENFISCH, M. H. Analytical Chemistry of Nitric Oxide. **Annual Review of Analytical Chemistry**. v. 2, n. 1, p. 409-433, 2009.

HOUGHTON, P. J.; REN, Y.; HOWES, M.-J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. **Natural Product Reports**. v. 23, n. 2, p. 181-200, 2006.

HUGHES, M. J.; SAPEY, E.; STOCKLEY, R. Neutrophil phenotypes in chronic lung disease. **Expert Review of Respiratory Medicine**. v. 13, n. 10, p. 951-967, 2019.

ILAVENIL, S.; KALEESWARAN, B.; SUMITHA, P.; TAMILVENDAN, D.; RAVIKUMAR, S. Protection of human erythrocyte using *Crinum asiaticum* extract and lycorine from oxidative damage induced by 2-amidinopropane. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 18, n. 2, p. 181-187, 2011.

JIN, Y.-H.; MIN, J. S.; JEON, S.; LEE, J.; KIM, S.; PARK, T.; PARK, D.; JANG, M. S.;

PARK, C. M.; SONG, J. H. Lycorine, a non-nucleoside RNA dependent RNA polymerase inhibitor, as potential treatment for emerging coronavirus infections. **Phytomedicine**. p. 153440-153448, 2020.

JOHNSEN, L. G.; SKOU, P. B.; KHAKIMOV, B.; BRO, R. Gas chromatography – mass spectrometry data processing made easy. **Journal of Chromatography A**. v. 1503, p. 57-64, 2017.

JUNG, Y. S.; PARK, J. H.; KIM, H.; KIM, S. Y.; HWANG, J. Y.; HONG, K. W.; BAE, S. S.; CHOI, B. T.; LEE, S.-W.; SHIN, H. K. Probucol inhibits LPS-induced microglia activation and ameliorates brain ischemic injury in normal and hyperlipidemic mice. **Acta Pharmacologica Sinica**. v. 37, n. 8, p. 1031-1044, 2016.

KA, S.; KOIRALA, M.; MÉRINDOL, N.; DESGAGNÉ-PENIX, I. Biosynthesis and biological activities of newly discovered Amaryllidaceae alkaloids. **Molecules**. v. 25, n. 21, p. 4901-4928, 2020.

KANG, J.; ZHANG, Y.; CAO, X.; FAN, J.; LI, G.; WANG, Q.; DIAO, Y.; ZHAO, Z.; LUO, L.; YIN, Z. Lycorine inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 up-regulation in RAW264.7 cells through suppressing P38 and STATs activation and increases the survival rate of mice after LPS challenge. **International Immunopharmacology**. v. 12, n. 1, p. 249-256, 2012.

KARAKOYUN, Ç.; BOZKURT, B.; ÇOBAN, G.; MASI, M.; CIMMINO, A.; EVIDENTE, A.; SOMER, N. U. A comprehensive study on *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* L.: chemo-profiling, isolation, anticholinesterase activity and molecular docking of amaryllidaceae alkaloids. **South African Journal of Botany**. v. 130, p. 148-154, 2020.

KIHARA, T.; SAWADA, H.; NAKAMIZO, T.; KANKI, R.; YAMASHITA, H.; MAELICKE, A.; SHIMOHAMA, S. Galantamine modulates nicotinic receptor and blocks A β -enhanced glutamate toxicity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 325, n. 3, p. 976-982, 2004.

KORNIENKO, A.; EVIDENTE, A. Chemistry, biology, and medicinal potential of narciclasine and its congeners. **Chemical Reviews**, v. 6, p. 1982–2014, 2008.

KUETE, V.; KARAOSMANOĞLU, O.; SIVAS, H. Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. **Medicinal Spices and Vegetables from Africa**. p. 271-297, 2017.

KUMAR, G.; DEGHEIDY, H.; CASEY, B. J.; GOERING, P. L. Flow cytometry evaluation of in vitro cellular necrosis and apoptosis induced by silver nanoparticles. **Food and Chemical Toxicology**. v. 85, p. 45-51, 2015.

KURIAKOSE, B. B.; DEEPA, C. P.; SAMPAYAN, E. L. Antiinflammatory and wound healing activity of *Hippeastrum puniceum* bulb extract. **World Journal of Pharmaceutical Research**. v. 8, n. 3, p. 1-13, 2019.

LAZAREVIC-PASTI, T.; LESKOVAC, A.; VASIC, V. Myeloperoxidase Inhibitors as Potential Drugs. **Current Drug Metabolism**. v. 16, n. 3, p. 168-190, 2015.

- LI, S.; CHEN, C.; ZHANG, H.; GUO, H.; WANG, H.; WANG, L.; ZHANG, X.; HUA, S.; YU, J.; XIAO, P. Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. **Antiviral Research**. v. 67, n. 1, p.18-23, 2005.
- LI, X.; YU, H. Y.; WANG, Z. Y.; PI, H. F.; ZHANG, P.; RUAN, H. L. Neuroprotective compounds from the bulbs of *Lycoris radiata*. **Fitoterapia**. v. 88, p. 82-90, 2013.
- LIANG, Q.; CAI, W.; ZHAO, Y.; XU, H.; TANG, H.; CHEN, D.; QIAN, F.; SUN, L. Lycorine ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibiting NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis. **Pharmacological Research**. v. 158, p. 104884-104926, 2020.
- LIU, J.; HU, J. L.; SHI, B. W.; HE, Y.; HU, W. X. Up-regulation of p21 and TNF- α is mediated in Lycorine-induced death of HL-60 cells. **Cancer Cell International**. v. 10, n. 25, p. 1-9, 2010.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, p. 515 2002.
- LUBBE, A.; GUDE, H.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Seasonal accumulation of major alkaloids in organs of pharmaceutical crop *Narcissus Carlton*. **Phytochemistry**. v. 88, p. 43-53, 2013.
- LUBBE, A.; CHOI, Y. H.; VREEBURG, P.; VERPOORTE, R. Effect of fertilizers on galanthamine and metabolite profiles in *Narcissus* bulbs by 1H NMR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 59, n. 7, p. 3155-3161, 2011.
- LUBBE, A.; POMAHACOVÁ, B.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Analysis of metabolic variation and galanthamine content in *Narcissus* bulbs by 1H NMR. **Phytochemical Analysis**. v. 21, n. 1, p. 66-72, 2010.
- LUCISANO, Y. M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorfonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and IgG. **The Journal of Immunology**. v. 132, p. 2015-2020, 1984.
- LUZ, L. R.; PORTO, D. D.; CASTRO, C. B.; SILVA, M. F. S.; GODOY, E. A. F.; CANUTO, K. M.; BRITO, E. S.; BECKER, H.; PESSOA, C. Ó.; ZOCOLO, G. J. Metabolomic profile of *Schinopsis brasiliensis* via UPLC-QTOF-MS for identification of biomarkers and evaluation of its cytotoxic potential. **Journal of Chromatography B**. v. 1099, p. 97-109, 2018.
- MAGRO, A. Apoptotic Events in Glioma Activate Metalloproteinases and Enhance Invasiveness. **Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications**. p. 1-28, 2013.
- MATER METHODS. Flow Cytometry - A Survey and the basics. **The World of Laboratories**. v. 2, p. 125, 2012.
- MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The Multifaceted Functions of Neutrophils. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**. v. 9, n. 1, p.181-218,

2014.

MCKINNON, K. M. Flow Cytometry: an overview. **Current Protocols in Immunology**. v. 120, n. 1, p. 1-11, 2018.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**. v. 140, n. 6, p.771-776, 2010.

MENEZES, R.R.P.P.B.; SAMPAIO, T. L.; LIMA, D. B.; SOUSA, P. L.; AZEVEDO, I. E.P.; MAGALHÃES, E. P.; TESSAROLO, L. D.; MARINHO, M. M.; SANTOS, R. P.; MARTINS, A. M. C. Antiparasitic effect of (-)- α -bisabolol against *Trypanosoma cruzi* Y strain forms. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 95, n. 3, p. 114860-114870, 2019.

MINHAS, R; BANSAL, Y; BANSAL, G. Inducible nitric oxide synthase inhibitors: a comprehensive update. **Medicinal Research Reviews**. v. 40, n. 3, p. 823-855, 2019.

MORAGA-NICOLÁS, F.; JARA, C.; GODOY, R.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; VENTHUR, H.; QUIROZ, A.; BECERRA, J.; MUTIS, A.; HORMAZÁBAL, E. *Rhodolirium andicola*: a new renewable source of alkaloids with acetylcholinesterase inhibitory activity, a study from nature to molecular docking. **Revista Brasileira de Farmacognosia**.v. 28, n. 1, p.34-43, 2018

MORENO, R.; TALLINI, L. R.; SALAZAR, C.; OSORIO, E. H.; MONTERO, E.; BASTIDA, J.; OLEAS, N. H.; LEÓN, K. A. Chemical profiling and cholinesterase inhibitory activity of five *Phaedranassa* Herb. (Amaryllidaceae) species from Ecuador. **Molecules**. v. 25, n. 9, p. 1-12, 2020.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, p. 55-63, 1983.

MULLARD, A. 2020 FDA drug approvals. **Nature Reviews Drug Discovery**. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/d41573-021-00002-0>>. Acesso em: 19 jan. 2021.

NASCIMENTO, R. F.; LIMA, A. C. A.; BARBOSA, P. G. A.; SILVA, V. P. A. **Cromatografia gasosa: aspectos teóricos e práticos**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2018.

NÉMETH, T.; SPERANDIO, M.; MÓCSAI, A. Neutrophils as emerging therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 19, p. 253-275, 2020.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**. v. 83, p. 770-803, 2020.

OLIVIERI, A. C. Introduction to Multivariate Calibration. **Springer Nature Switzerland**. p. 1-250, 2018.

OLIVERI, P.; SIMONETTI, R. Chemometrics for food authenticity applications. **Advances**

in **Food Authenticity Testing**, p.701-728, 2016.

PAIVA, J. R.; SOUZA, A. S. Q.; PEREIRA, R. C. A.; RIBEIRO, P. R. V.; ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; ZOCOLO, G. J.; BRITO, E. S.; ALVES, D. R.; MORAIS, S. M.; TAVARES, J.; PINTO, F. C. L.; ANDRADE, G. M.; PESSOA, O. D. L.; CANUTO, K. M. Chemical composition and anticholinesterase activity of cultivated bulbs from *Hippeastrum elegans*, a potential tropical source of bioactive alkaloids. **Phytochemistry Letters**. v. 43, p. 27-34, 2021.

PAIVA, J. R.; SOUZA, A. S. Q.; PEREIRA, R.C.A.; RIBEIRO, P. R. V.; ZOCOLO, G. J.; BRITO, E. S.; PESSOA, O. D. L.; CANUTO, K. M. Development and validation of a UPLC-ESI-MS method for quantitation of the anti-alzheimer drug galantamine and other Amaryllidaceae alkaloids in plants. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 31, n. 2, p.265-272, 2020.

PARK, S.; SHIN, H.; PARK, Y.; CHOI, I.; PARK, B.; LEE, K. Y. Characterization of inhibitory constituents of NO production from *Catalpa ovata* using LC-MS coupled with a cell-based assay. **Bioorganic Chemistry**, v. 80, p.57-63, 2018.

PILON, A.; SELEGATO, D.; FERNANDES, R.; BUENO, P.; PINHO, D.; CARNEVALE NETO, F.; FREIRE, R.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V.; LOPES, N. Metabolômica de plantas: métodos e desafios. **Química Nova**. p. 1-26, 2020.

PIWOWARSKI, J.; GRANICA, S.; KISS, A. Influence of Gut Microbiota-Derived Ellagitannins' Metabolites Urolithins on Pro-Inflammatory Activities of Human Neutrophils. **Planta Medica**. v. 80, n. 11, p. 887-895, 2014.

PRAVALIKA, K.; SARMAH, D.; KAUR, H.; WANVE, M.; SARAF, J.; KALIA, K.; BORAH, A.; YAVAGAL, D. R.; DAVE, K. R.; BHATTACHARYA, P. Myeloperoxidase and Neurological Disorder: A Crosstalk. **Acs Chemical Neuroscience**. v. 9, n. 3, p. 421-430, 2018.

ROY, M.; LIANG, L.; XIAO, X.; FENG, P.; YE, M.; LIU, J. Lycorine: a prospective natural lead for anticancer drug discovery. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 107, p. 615-624, 2018.

SAITO, T.; TAKAHASHI, H.; DOKEN, H.; KOYAMA, H.; ARATANI, Y. Phorbol Myristate Acetate Induces Neutrophil Death through Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase That Requires Endogenous Reactive Oxygen Species Other Than HOCl. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v. 69, p. 2207-2212, 2005.

SILVA, A.F.S.; ANDRADE, J.P.; BEVILAQUA, L.R.M.; SOUZA, M.M.; IZQUIERDO, I.; HENTIQUES, A.T. Anxiolytic, antidepressant and anticonvulsant like effects of the alkaloids montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v.85, p. 146-154, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

STANLEY, B.; POST, J. HENSLEY, K. A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**. v. 9. p. 1-8, 2012.

STARK, A.; SCHWENK, R.; WACK, G.; ZUCHTRIEGEL, G.; HATEMLER, M. G.; BRÄUTIGAM, J.; SCHMIDTKO, A.; REICHEL, C. A.; BISCHOFF, I.; FÜRST, R. Narciclasine exerts anti-inflammatory actions by blocking leukocyte–endothelial cell interactions and down-regulation of the endothelial TNF receptor 1. **The FASEB Journal**. v. 33, n. 8, p. 8771-8781, 2019.

SUBRAMANIAM, S. R.; FEDEROFF, H. J. Targeting microglial activation states as a therapeutic avenue in Parkinson's Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**. v. 9, p. 1-18, 2017.

TAKATA, K.; KITAMURA, Y.; SAEKI, M.; TERADA, M.; KAGITANI, S.; KITAMURA, R.; FUJIKAWA, Y.; MAELICKE, A.; TOMIMOTO, H.; TANIGUCHI, T. Galantamine-induced amyloid- β clearance mediated via stimulation of microglial nicotinic acetylcholine receptors. **Journal of Biological Chemistry**. v. 285, n. 51, p. 40180-40191, 2010.

TALLINI, L.; OSORIO, E. H.; SANTOS, V. D.; BORGES, W. S.; KAISER, M.; VILADOMAT, F.; ZUANAZZI, J. A. S.; BASTIDA, J. *Hippeastrum reticulatum* (Amaryllidaceae): Alkaloid Profiling, Biological Activities and Molecular Docking. **Molecules**. v. 22, n. 12, p. 2191-2204, 2017.

TARAKEMEH, A. A.; MAJID, R.; VAHID, S.; HASSAN, S.; ROSELLA, D.; FRANÇOIS, A. H.; LAURAIN-MATTAR, D. Screening of Amaryllidaceae alkaloids in bulbs and tissue cultures of *Narcissus papyraceus* and four varieties of *N. tazetta*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 172, p. 230-237, 2019.

TAY, M. Z.; POH, C. M.; RÉNIA, L.; MACARY, P. A.; NG, L. F. P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews Immunology**. v. 20, p. 363-374, 2020.

TORRAS-CLAVERIA, L.; BERKOV, S.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J. QToF exact mass and ESI fragmentation of bioactive amaryllidaceae alkaloids. **South African Journal of Botany**. p. 1-10, 2020.

TORRAS-CLAVERIA, L.; BERKOV, S.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J. Metabolomic analysis of bioactive Amaryllidaceae alkaloids of ornamental varieties of *Narcissus* by GC–MS combined with k-means cluster analysis. **Industrial Crops and Products**. v. 56, p. 211-222, 2014.

TRAM, N.T. N.; TITORENKOVA, T. V.; BANKOVA, V. S.; HANDJIEVA, N. V.; POPOV, S. S. *Crinum L.* Amaryllidaceae. **Fitoterapia**, v. 73, p. 83-208, 2002.

TRUJILLO-CHACÓN, L. M.; PASTENE-NAVARRETE, E. R.; BUSTAMANTE, L.; BAEZA, M.; ALARCÓN-ENOS, J.; CESPEDES-ACUÑA, C. L. In vitro micropropagation and alkaloids analysis by GC–MS of Chilean Amaryllidaceae plants: *Rhodophiala pratensis*. **Phytochemical Analysis**. v. 31, n. 1, p. 46-56, 2019a.

- TRUJILLO-CHACÓN, L. M.; ALARCÓN-ENOS, J. E.; CÉSPEDES-ACUÑA, C. L.; BUSTAMANTE, L.; BAEZA, M.; LÓPEZ, M. G.; FERNÁNDEZ-MENDÍVIL, C.; CABEZAS, F.; PASTENE-NAVARRETE, E. Neuroprotective activity of isoquinoline alkaloids from of Chilean Amaryllidaceae plants against oxidative stress-induced cytotoxicity on human neuroblastoma SH-SY5Y cells and mouse hippocampal slice culture. **Food and Chemical Toxicology**. v. 132, p. 110665-110676, 2019b.
- WANG, H. Y.; QU, S. M.; WANG, Y.; WANG, H. T. Cytotoxic and anti-inflammatory active plicamine alkaloids from *Zephyranthes grandiflora*. **Fitoterapia**. v. 130, p.163-168, 2018.
- WEI, J.; CHENG, Y.; GUO, W.-H.; WANG, D.-C.; ZHANG, Q.; LI, D.; RONG, J.; GAO, J. Molecular Diversity and Potential Anti-neuroinflammatory Activities of Cyathane Diterpenoids from the Basidiomycete *Cyathus africanus*. **Scientific Reports**. v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.
- WU, Z.; HUANG, Z.; LEHMANN, R.; ZHAO, C.; XU, G. The Application of Chromatography-Mass Spectrometry: methods to metabonomics. **Chromatographia**. v. 69, n. 1, p. 23-32, 2009.
- ÚBEDA, A. FERRÁNDIZ, M. L.; HERENCIA, F. Activación celular: desgranulación leucocitaria. In: ALCARAZ, M. J.; CALIXTO, J. B.; DELGADO, R. Técnicas *in vitro* para el estudio de fármacos anti-inflamatorio. CYTED – Subprograma X Projeto X.6. Espanha, 2002.
- YI, L.; DONG, N.; YUN, Y.; DENG, B.; REN, D.; LIU, S.; LIANG, Y. Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: a review. **Analytica Chimica Acta**. v. 914, p. 17-34, 2016.
- ZHANG, Y.-N.; ZHANG, Q.-Y.; LI, X.-D.; XIONG, J.; XIAO, S.-Q.; WANG, Z.; ZHANG, Z.-R.; DENG, C.-L.; YANG, X.-L.; WEI, H.-P. Gemcitabine, lycorine and oxysporidine inhibit novel coronavirus (SARS-CoV-2) in cell culture. **Emerging Microbes & Infections**. v. 9, n. 1, p.1170-1173, 2020.
- ZHANG, Q.; ZHU, B.; LI, Y. Resolution of Cancer-Promoting Inflammation: a new approach for anticancer therapy. **Frontiers in Immunology**. v. 8, p. 1-11, 2017.
- ZHANG, X.; WANG, J.; QIAN, W.; ZHAO, J.; SUN, L.; QIAN, Y.; XIAO, H. Dexmedetomidine inhibits inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-stimulated microglia by suppression of extracellular signal-regulated kinase. **Neurological Research**. v. 37, n. 3, p. 238-245, 2015.
- ZHAO, D. GU, M.Y; ZHANG, L. J.; JEON, H. J.; CHO, Y. B.; YANG, O. K. 7-Deoxy-trans-dihydronarciclasine Isolated from *Lycoris chejuensis* Inhibits Neuroinflammation in Experimental Models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 67, n. 35, p. 9796-9804, 2019.
- ZIMMERMANN, M.; MEYER, N. Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. **Methods in Molecular Biology**. p. 57-63, 2011.

APÊNDICE A - ÁREAS DE PICO DE CG-EM DECONVOLUÍDAS POR PARADISE.

Tabela 2 - Áreas de pico de CG-EM deconvoluídas por PARADISE, para os seis tempos de colheita de *Hippeastrum elegans* (Continua).

Pico	Alcaloide	FHE05		FHE07		FHE09		FHE11		FHE13		FHE15	
		AM	DS	AM	DS	AM	DS	AM	DS	AM	DS	AM	DS
1	Trisfaeridina	686560	13043	1095162	14313	1352793	75877	1436695	34411	3405986	15331	3076581	52161
2	Hippapilina-isômero	488003	85944	446390	31908	284409	42306	259523	19240	121936	13845	215264	19747
3	Desconhecido A	323001	31654	185300	25557	332441	49746	389192	37554	183242	14022	228477	23914
4	Galantamina	1329281	85941	1747404	77355	2084016	152060	539066	34050	3508043	85401	7811818	230866
5	Sanguinina	2431877	83366	667051	58272	3121747	459061	2143155	174876	771711	32826	1120487	49779
6	Licoramina	8260748	174276	8987630	363932	5035120	245933	1434114	53834	10211536	182312	21392767	401140
7	Desconhecido B (tipo-licorina)	902999	13547	1155231	13420	633214	13082	202812	4867	1248323	47514	3008474	58136
8	O-Demetil-licoramina	10090898	128062	2791258	253998	4407982	511972	4992578	265975	656517	30202	909237	40276
9	Desconhecido C	541192	15005	383099	89899	944729	238486	1795521	202859	2991374	185821	3197051	304406
10	Norlicoramina	2213325	32984	1017217	107061	442324	44114	561796	33252	4070429	90678	3306251	132515
11	Vitatina/Crinina	1627275	103088	1142302	63755	957845	87737	2853604	82892	8897589	104390	6543476	115282
12	Nerinina	1059237	60512	463235	43172	1572868	158803	2565568	120608	142478	8527	179823	12411
13	8-O-Demetilmaritidina	1297366	65672	407619	40575	971454	116074	2128185	97310	2054063	52468	1283236	72193
14	Anhidrolicorina	1142646	94722	897045	74533	668824	105608	635524	49421	413888	24956	377957	37779
15	Desconhecido D (tipo-licorina)	318933	67731	198027	16817	109749	19410	156153	10531	422361	13674	137794	12036
16	7-Metoxi-O-metil-licorenilina	1123898	71024	823727	52646	963003	62646	669757	18067	616299	14855	463818	14797
17	Desconhecido E	1522039	50400	279597	38151	597742	64168	1597487	83970	230130	24057	260887	19778
18	Acetil-licoramina	506526	92732	162041	23464	496617	105627	263163	26237	113517	2261	83201	7319
19	O-Acetilpluvina	363646	15200	33334	2784	18079	2142	580264	25870	1073309	28449	952222	28449
20	Desconhecido F (tipo-homolicorina)	839147	29012	29329	7397	195792	74845	661699	114895	27419	2512	15362	2226
21	Pancratina C	1544748	61140	1685596	103056	1606342	150828	755227	34788	1655009	30892	2127650	61966
22	11,12-Dehidroanhidrolicorina	890212	26663	1746351	98861	2052299	206035	2805644	88017	8493634	141333	7187096	163903
23	Montanina	512996	3846	1578782	102138	9852569	600973	89101	11001	599962	12486	1408798	44244
24	Desconhecido G	12079428	764819	10730772	93128	5116018	113681	6555020	217023	4925141	150628	10508389	99973
25	Undulatiene diol	1826512	199872	1493093	56596	857107	35935	1279179	83617	1061659	39088	1957005	20224
26	2 α -10 β -Dihidroxi-9-O-demetilhomolicorina	5017351	357278	494057	62940	1615235	372731	2402342	233593	461774	36005	342243	36679
27	Desconhecido H	1966175	114419	349712	22529	540933	54476	277862	13016	547698	28318	550617	35691
28	11,12-Dehidroassoanina	2454226	113083	1195998	34079	838229	45163	638665	14862	2240888	102915	255244	4330

Tabela 2 - Áreas de pico de CG-EM deconvoluídas por PARADISE, para os seis tempos de colheita de *Hippeastrum elegans* (Continuação).

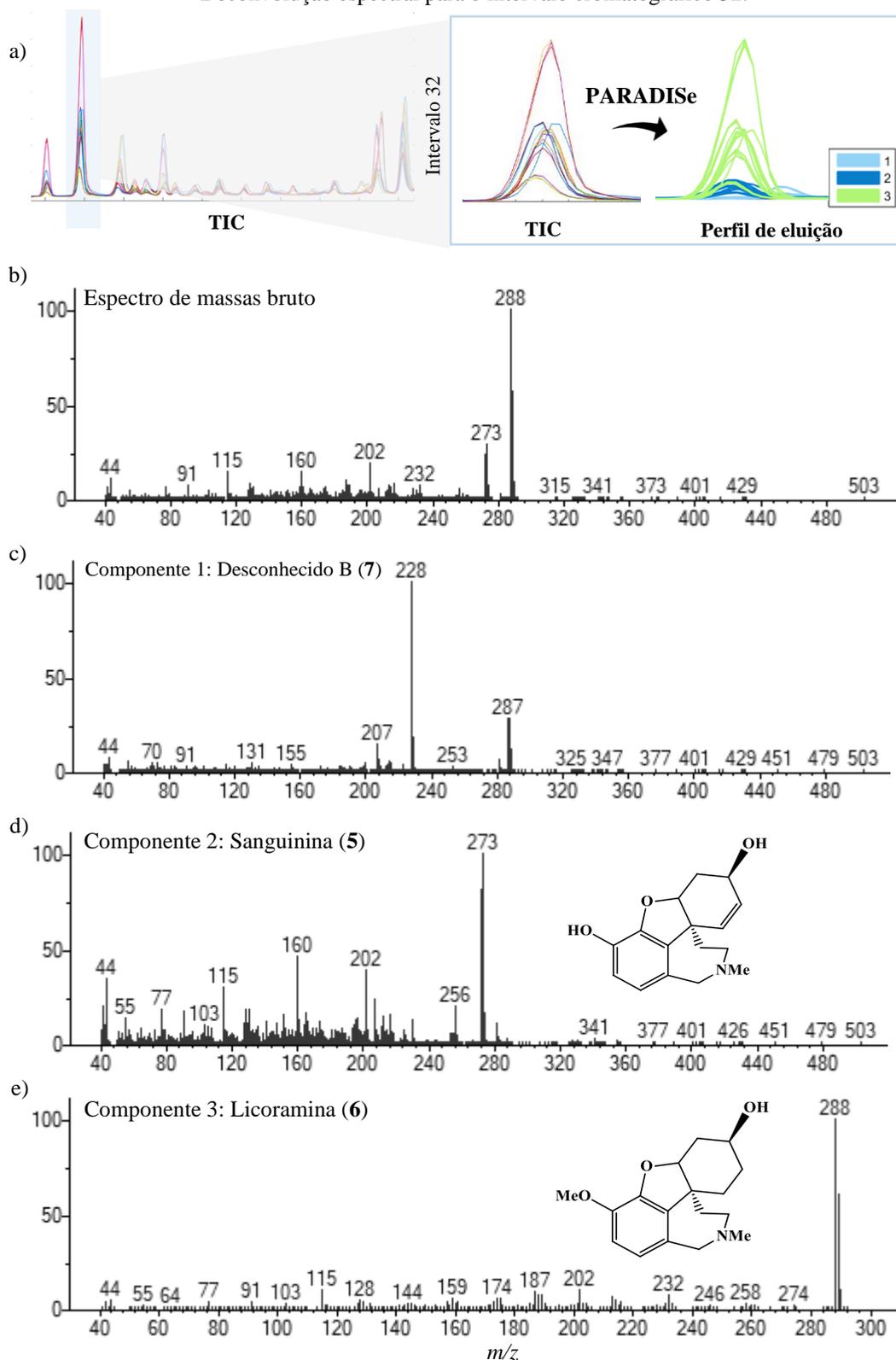
Pico	Alcaloide	FHE05		FHE07		FHE09		FHE11		FHE13		FHE15	
		AM	DS	AM	DS	AM	DS	AM	DS	AM	DS	AM	DS
29	Pancracina	5088667	191709	4923204	356806	5829192	595281	9080334	340953	6949861	102394	10848848	289475
30	11-Hidroxivitatina	1990927	97278	3361988	259204	3970332	338589	5455350	201713	20696510	400536	14212590	453806
31	Licorina	36536286	167998	46790694	2450090	39199934	2680842	26412960	971650	26331767	534739	26957670	595736
32	11,12-Dehidrogalantina	3712793	24483	1923839	9220	1181033	29736	575016	7736	3886276	113705	136981	6414
33	Esternbergina	356180	20367	11896	10363	87819	18088	569938	40929	244691	12846	269955	23996
34	Pseudolicorina	7182110	107429	1698580	303819	7924288	1259207	11448201	605482	1430032	108622	1500096	128347
35	Desconhecido I (tipo-licorina)	217530	33331	343718	47178	172901	27976	161854	16511	146863	13194	409025	25956
36	Desconhecido J	404553	60787	384840	12054	211817	21805	291549	14817	223810	3659	459595	4994
37	Narcissidina	3752700	276072	1072370	167595	674881	131362	238458	27790	1829061	180504	8341	7240
38	Anhidronarcissidina	1886032	72544	137190	2395	223089	23091	604456	37096	95761	4375	14370	3791
39	11,12-Dehidro-2-metoxi- assoanina	11093115	337211	7997754	147890	5626277	205528	3277345	55359	13837655	320521	635718	25808
40	11,12-Dehidro-2-hidroxi- assoanina	672959	28745	1068241	203606	228202	45110	263424	37433	74049	8669	48315	2923
41	7-Demetoxi-9-O-metilhostasina- isômero	1563365	35696	2246977	251945	1520036	184590	1213304	52844	1262977	49621	1085861	66695

A variação nas áreas absolutas dos alcaloides, facilmente visualizada pela intensidade das cores vermelho, branco e azul, ilustra a relação de alta, média e baixa intensidade dos alcaloides, respectivamente. AM: Área média; DS: Desvio padrão.

Fonte: Elaborado pela autora.

APÊNDICE B - INTERVALOS DECONVOLUÍDOS NO PARADISE

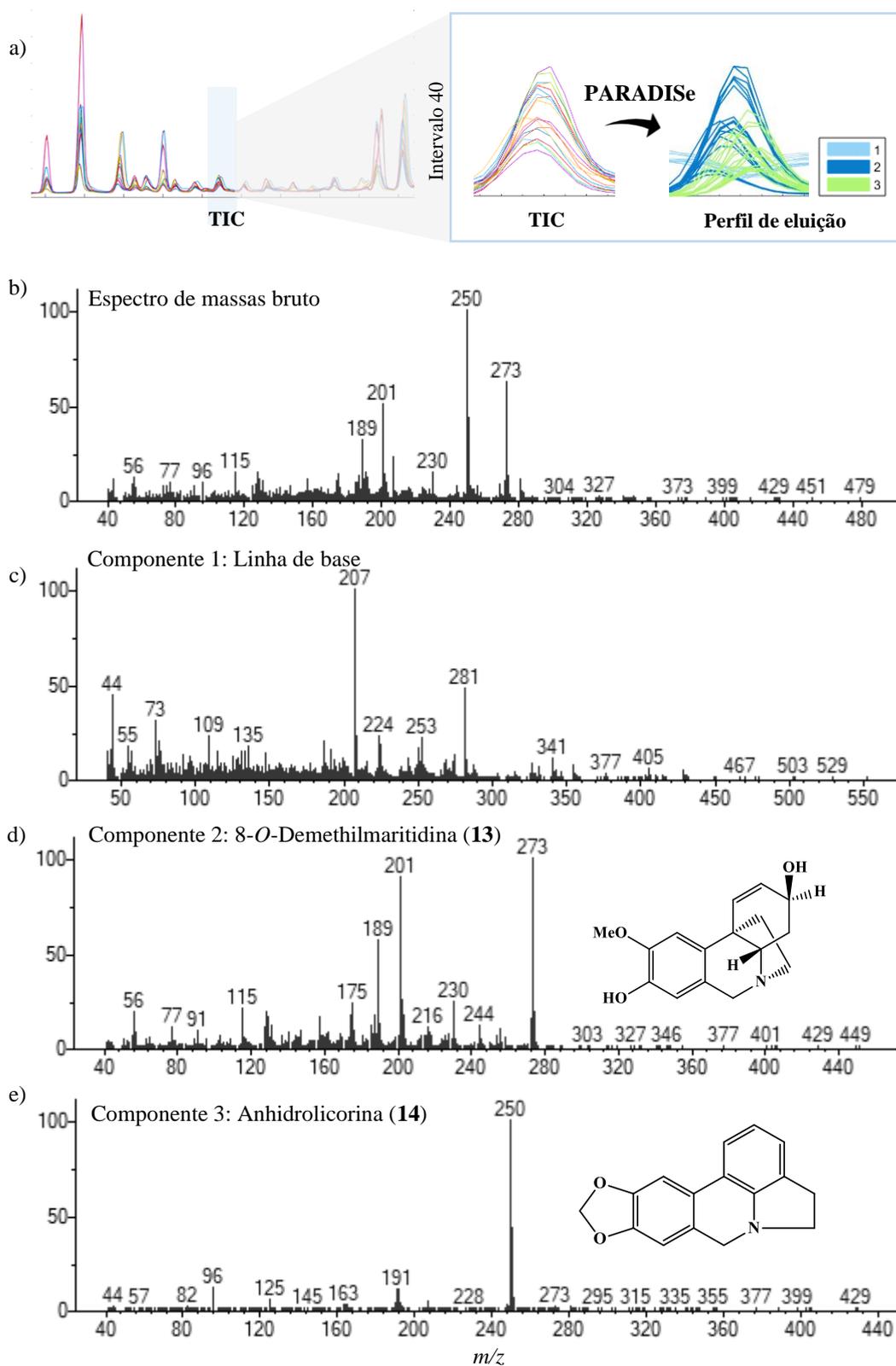
Deconvolução espectral para o intervalo cromatográfico 32.



Fonte: Elaborado pela autora.

a) Intervalo cromatográfico deconvolvido (3 componentes); b) Espectro de massas bruto; c) O componente 1 trata-se de um composto não identificado, denominado desconhecido B; d) Componente 2 é compatível com o alcaloide sanguinina; e) Componente 3 corresponde a licoramina.

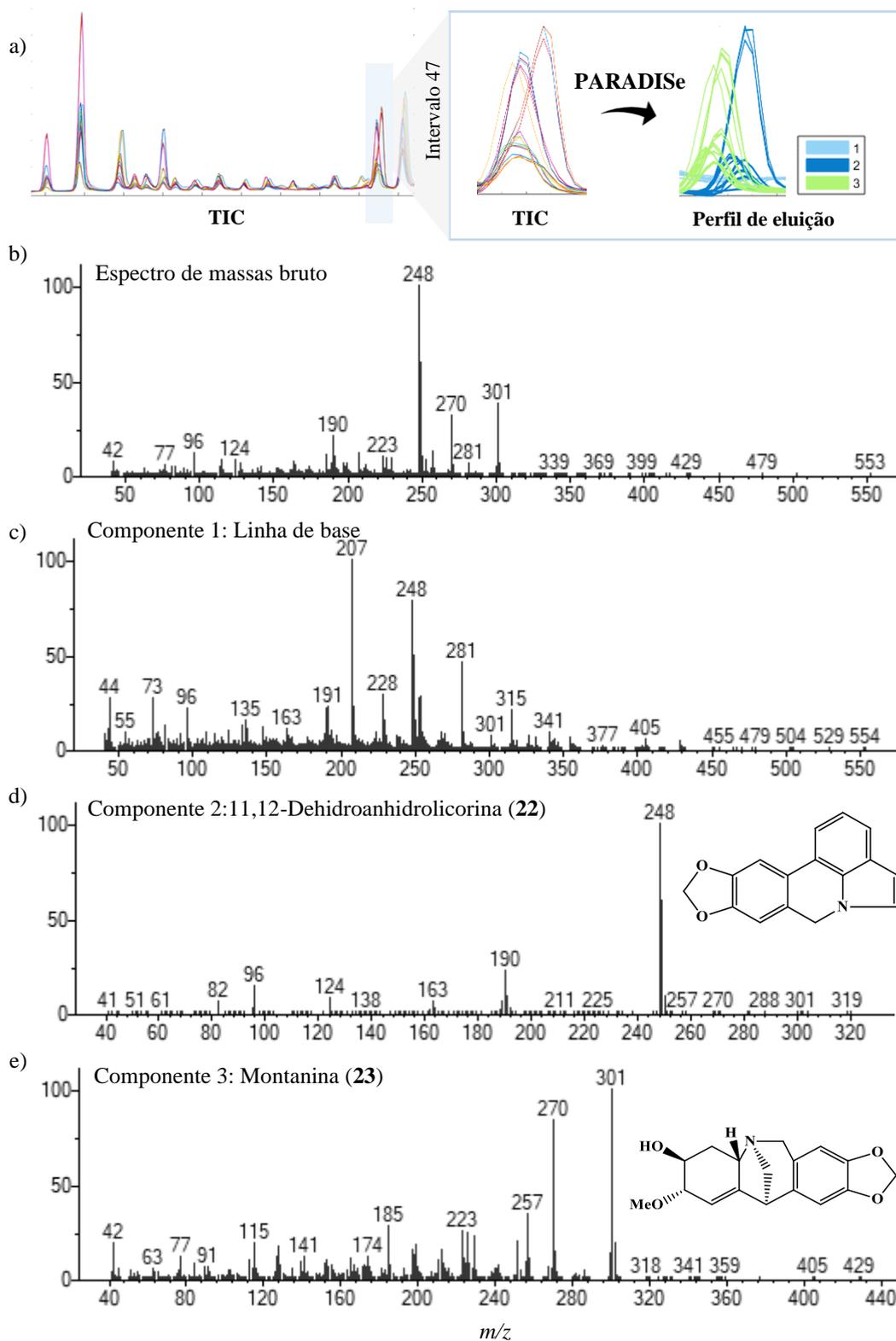
Deconvolução espectral para o intervalo cromatográfico 40.



Fonte: Elaborado pela autora.

a) Intervalo cromatográfico deconvolvido (3 componentes); b) Espectro de massas bruto; c) O componente 1 corresponde a contribuição da linha de base; d) Componentes 2 é compatível com o alcaloide 8-*O*-demethylmaritidina; e) Componente 3 corresponde a anhidrolicorina.

Deconvolução espectral para o intervalo cromatográfico 47.

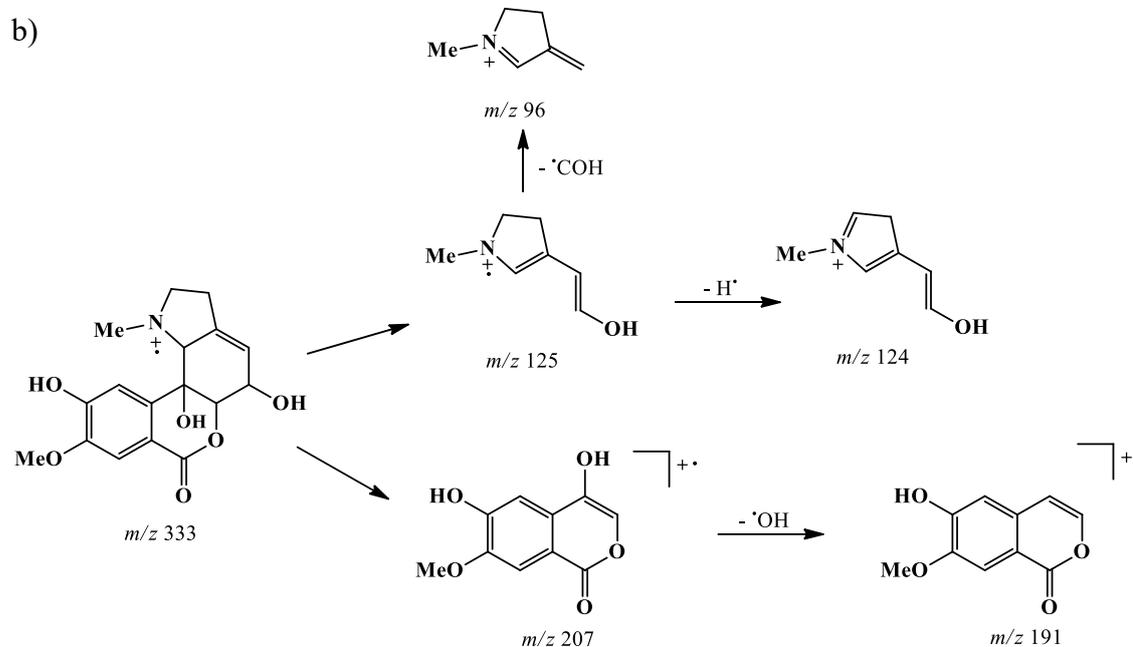
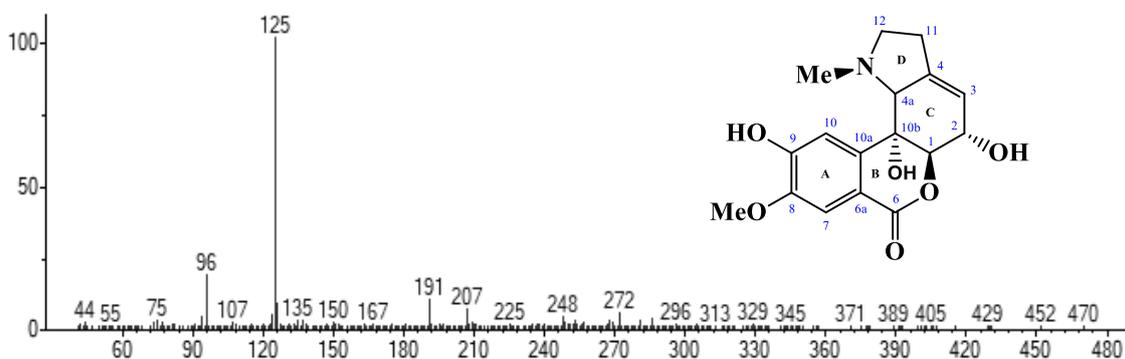


Fonte: Elaborado pela autora.

a) Intervalo cromatográfico deconvolvido (3 componentes); b) Espectro de massas bruto; c) Componente 1 corresponde a contribuição da linha base; d) Componentes 2 é compatível com o alcaloide 11,12-dehidroanhidrolicorina; e) Componente 3 corresponde a montanina.

APÊNDICE C – ESPECTRO DE MASSAS E PROPOSTA DE MECANISMO DE FRAGMENTAÇÃO PARA O ALCALOIDE 2 α -10 β α -DIHIDROXI-9-*O*-

a) DEMETILHOMOLICORINA.



Fonte: Elaborado pela autora.

a) Espectro de massas do composto **26**; b) Mecanismo fragmentação para os principais íons do espectro de massa, justificando a proposta de identificação para o composto 2 α -10 β α -dihidroxi-9-*O*-demetilhomolcorina (**26**), isolado, inicialmente, de *H. elegans* por Carvalho et al. (2015). Alcaloides de esqueleto tipo homolcorina 2-hidroxi substituído, apresentam íon base de m/z 125, característico, resultante da clivagem das ligações lábeis do anel C, por reação retro-Diels-Alder. Os demais íons fragmentos são de baixa intensidade.

**ANEXO A - COMPROVANTE DE CADASTRO DE *HIPPEASTRUM ELEGANS* NO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO
CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO (SISGEN).**



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Certidão
Cadastro nº A3A7543**

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro:	A3A7543
Usuário:	Embrapa
CPF/CNPJ:	00.348.003/0001-10
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Crinum sp.

Griffinia spp.

Habranthus spp.

Hippeastrum spp

Hymenocallis spp.

Zephyranthes spp.

Impossibilidade de identificação

Crinum sp.

Crinum sp.

Crinum sp

Griffinia liboniana

Hippeastrum elegans

Hippeastrum elegans

Impossibilidade de identificação

Hippeastrum solandriflorum

Título da Atividade:	Avaliar o potencial da Açucena (<i>Hippeastrum spp</i>) como fonte tropical de galantamina e de outros alcaloides bioativos
----------------------	--

ANEXO B - COMPROVANTE DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA,
PLATAFORMA BRASIL.

UFC - UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ /	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA	
Título da Pesquisa: Estudo químico-farmacológico de frações alcaloídicas de açucena (<i>Hippeastrum elegans</i> (Spreng) H. E. Moore)	
Pesquisador: ANA SHEILA DE QUEIROZ SOUZA	
Área Temática:	
Versão: 2	
CAAE: 21210219.2.0000.5054	
Instituição Proponente: Departamento de Farmácia	
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio	
DADOS DO PARECER	
Número do Parecer: 3.836.231	
<small>Página 01 de 03</small>	
Situação do Parecer: Aprovado	
Necessita Apreciação da CONEP: Não	
FORTALEZA, 13 de Fevereiro de 2020	
<hr/> Assinado por: FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA (Coordenador(a))	
Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000	
Bairro: Rodolfo Teófilo	CEP: 60.430-275
UF: CE	Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8344	E-mail: comepe@ufc.br
<small>Página 03 de 03</small>	

ANEXO C - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS*.



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpba



Untargeted GC/MS-based approach for identification of anti-inflammatory alkaloids from *Hippeastrum elegans* (Amaryllidaceae) using a human neutrophil model

Ana Sheila de Queiroz Souza^{a,b}, João Antônio Costa de Sousa^a, Caroline Sampaio Pinto^a, Elenilson G. Alves Filho^c, Rita de Cassia Alves Pereira^b, Edy Souza de Brito^b, Kirley Marques Canuto^{b,*,**}, Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal^{a,*}

^a Centro de Estudos Farmacológicos e Cosméticos (CEFAC), Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^b Empresa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, Brazil

^c Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Bloco 858, 60440-908, Fortaleza, CE, Brazil



ARTICLE INFO

Article history:
 Received 21 December 2020
 Received in revised form 26 March 2021
 Accepted 1 April 2021
 Available online 3 April 2021

Keywords:
Hippeastrum elegans
 Amaryllidaceae
 Alkaloids
 GC-MS
 Chemometrics
 Anti-inflammatory activity

ABSTRACT

Hippeastrum elegans is an Amaryllidaceae species producing alkaloids with pharmaceutical potential including lycorine and galanthamine. Herein, we developed a non-targeted metabolomic study associated to chemometrics and biological evaluations to identify the *H. elegans* constituents that were able to reduce the human neutrophils proinflammatory mechanisms. The alkaloid fraction were extracted from bulbs cultivated for 15 months (m) and harvested in six harvest periods (5, 7, 9, 11, 13, and 15 m). The GC-MS analysis allowed the detection of 41 alkaloids being 31 identified. All alkaloid components varied over the cultivation and most of them were lycorine-type skeletons. Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA) distinguished three groups according to the chemical profile (group I: 5, 7, and 9 m; group II: 11 m and group III: 13 and 15 m). Therefore, the biological assays were only performed with one of the representative samples of each group: 7 m, 11 m and 15 m. None of them was toxic to human neutrophils by LDH activity and MTT test. The 7 m and 15 m-alkaloid fractions showed anti-inflammatory effects by reducing human neutrophil degranulation. However, the former one was more effective in inhibiting the cell activation based on the reduction of myeloperoxidase (MPO) release and reactive oxygen species (ROS) production. Afterwards, Partial Least Squares analysis (PLS) indicated lycorine and 11,12-dihydro-2-methoxy-ascaridone as the compounds responsible for the anti-inflammatory activity of the bioactive fraction. Thus, the 7 m-alkaloid fraction of *H. elegans* seems to be a promising anti-inflammatory drug that deserves additional research.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Alkaloids are one of the main classes of secondary metabolites that have contributed to the development of drugs as analgesic, antineoplastic, antiparasitic and anti-inflammatory agents [1–3]. Inflammation is a protective response of the organism. However, when it is triggered in an exacerbated or inappropriate manner, it

plays an important role in the pathophysiology of various inflammatory diseases. Cells of the immune system (eg. neutrophils) are therapeutic targets of interest in the search for anti-inflammatory drugs. Neutrophils are the first defense cells to migrate from blood vessels to the inflammation site, acting to maintain or restore the body's homeostasis through intra and extracellular mechanisms [4]. However, the acute and chronic cellular inflammatory responses are associated with the progression of many diseases such as cancer, cardiovascular, neurodegenerative diseases and, more recently, SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2). Therefore, the neutrophil-mediated inflammatory response modulation is a promising target for therapeutic management of many diseases with high socioeconomic impact [5,6]. Several molecules of medicinal plants such as the alkaloids epi-

* Corresponding author at: Universidade Federal do Ceará, Rua Pastor Sarney Mangúha 1238, Rodolfo Tedêlo, Fortaleza, CE, CEP 60430-372, Brazil.

** Corresponding author at: Empresa Agroindústria Tropical, Rua Dra. Sara Meneguete, 2270, Pici, Fortaleza, CE, CEP 60511-110, Brazil.
 E-mail addresses: kirley.sarano@embrapa.br (K.M. Canuto), kalyne@ufc.br (L.K.A.M. Leal).

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114061>
 0731-7085/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

Fonte: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.