



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

ELDER LUIS LIMA LEITE

**ALCALÓIDES ISOQUINOLÍNICOS E ATIVIDADE ANSIOLÍTICA DE TRÊS
ESPÉCIES DO GÊNERO *Griffinia* (AMARYLLIDACEAE)**

**FORTALEZA
2023**

ELDER LUIS LIMA LEITE

ALCALÓIDES ISOQUINOLÍNICOS E ATIVIDADE ANSIOLÍTICA DE TRÊS
ESPÉCIES DO GÊNERO *Griffinia* (AMARYLLIDACEAE)

Dissertação submetida à coordenação do
Programa de Pós-Graduação em Química
da Universidade Federal do Ceará como
pré-requisito para obtenção do título de
Mestre em Química. Área de
concentração: Química orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Otilia Deusdênia
Loiola Pessoa.

Coorientador: Dr. Kirley Marques Canuto.

FORTALEZA
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

L551a Leite, Elder Luis Lima.

Alcalóides isoquinolínicos e atividade ansiolítica de três espécies do gênero *Griffinia* (Amaryllidaceae) / Elder Luis Lima Leite. – 2023.
102 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa .

Coorientação: Prof. Dr. Kirley Marques Canuto .

1. Amaryllidaceae. 2. *Griffinia*. 3. Alcalóides isoquinolínicos. 4. Atividade ansiolítica. 5. CG-EM. I. Título.

CDD 540

ELDER LUIS LIMA LEITE

ALCALÓIDES ISOQUINOLÍNICOS E ATIVIDADE ANSIOLÍTICA DE TRÊS
ESPÉCIES DO GÊNERO *Griffinia* (AMARYLLIDACEAE)

Dissertação submetida à coordenação do
Programa de Pós-Graduação em Química
da Universidade Federal do Ceará como
pré-requisito para obtenção do título de
Mestre em Química. Área de
concentração: Química orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Otília Deusdênia
Loiola Pessoa.

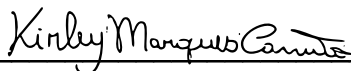
Coorientador: Dr. Kirley Marques Canuto.

Aprovada em: 27/11/2023.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



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

Profa. Dra. Antônia Torres Ávila Pimenta
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Dr. Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro
Embrapa Agroindústria Tropical (EMBRAPA)

FORTALEZA
2023

Ao meu filho amado e parceiro, João.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela Sua bondade em minha vida, pois é a benevolência do Senhor que me impulsiona a prevalecer

Aos meus pais, Luzanira e Braz, que me nortearam a seguir o caminho do saber de forma prazerosa.

À minha família por ser meu alicerce, em especial meus irmãos Elton e Tereza.

Ao meu eterno Amor, Maria, e à minha família estendida.

À minha orientadora, Profa. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa, pelo tempo e atenção dedicados à minha orientação.

Ao meu coorientador, Dr. Kirley Marques Canuto, pela oportunidade de trabalhar na Embrapa Agroindústria Tropical, pela paciência, dedicação, seriedade e, sobretudo, pela generosidade.

À Ma. Ana Sheila de Queiroz Souza, pela inestimável ajuda com as caracterizações e quimiometria e, sobretudo, pela generosidade.

À Dra. Rita de Cássia Alves Pereira, pela disponibilização do material de *Griffinia*.

Aos analistas do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais (LMQPN) da Embrapa, Dr. Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro, Dra. Lorena Mara Alexandre e Silva, Dra. Tigressa Helena Rodrigues, Me. Hilton Magalhães e Dra. Natália Florêncio Martins, pela empatia, ensino e apoio logístico, que contribuíram para a execução das atividades no laboratório.

Ao Prof. Dr. Hécio Silva dos Santos, ao Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN-S) e ao Grupo de Pesquisa em Química de Produtos Naturais e Bioensaios com *Zebrafish* (QPNSZ) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), pela contribuição com as análises *in vivo*.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química pelo direcionamento e pelo vasto saber compartilhado.

Aos membros da minha banca de qualificação, Profa. Dra. Antonia Torres Ávila Pimenta UFC, Profa. Dra. Davila de Souza Zampieri e ao Dr. Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro, pelas boas contribuições.

Aos profissionais da Coordenação do PPGQUIM-UFC pela solicitude e competência ao me guiar pelos trâmites da Universidade. E, em especial, à Célia por ter acompanhado meu processo de reaproximação com a Academia e por ter feito questão de dar um jeito de me avisar quando finalmente chegou a minha oportunidade.

Aos colegas do Laboratório de Fitoquímica de Plantas Medicinais II (LAFIPLAM II) da UFC pela grande ajuda com a minha apresentação e aos colegas da pós-graduação pelo conhecimento partilhado e acolhimento.

À Embrapa Agroindústria Tropical, à CAPES e ao CNPq, pela infraestrutura, suporte técnico e financeiro dado aos orientadores e parceiros desta pesquisa.

À Universidade Federal do Ceará.

RESUMO

Griffinia gardneriana (Herb.) Ravenna (GG), *Griffinia liboniana* Morren (GL) e *Griffinia nocturna* Ravenna (GN) (Amaryllidaceae), são bulbosas de fácil cultivo encontradas nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil, comumente utilizadas para fins ornamentais. O estudo químico de *Griffinia* é incipiente ou até mesmo inexistente como no caso de GG. A família Amaryllidaceae é caracterizada pela ocorrência de alcalóides isoquinolínicos singulares, os quais apresentam diversas atividades farmacológicas. Este trabalho visou determinar a composição química e atividade ansiolítica das frações alcaloídicas dos bulbos destas três espécies de *Griffinia*. As plantas estudadas foram cultivadas em casas de vegetação da Embrapa. Os bulbos secos e moídos foram desengordurados com hexano em banho ultrassônico e em seguida submetidos a uma sequência de partições líquido-líquido ácido-base, resultando em frações alcaloídicas que foram posteriormente analisadas por cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM). A atividade ansiolítica foi avaliada em *zebrafish* (*Danio rerio*) através de injeção intraperitoneal (i.p.) nas doses de 40, 100 e 200 mg/kg cada, usando diazepam (40 mg/kg) como controle-positivo em teste claro-escuro. As análises por CG-EM revelaram 23 alcalóides isoquinolínicos pertencentes aos esqueletos do tipo licorina, homolicorina, galantamina, crinina, haemantamina, montanina e narcisclatina. A análise quimiométrica revelou perfis químicos relativamente parecidos, sendo 8 compostos comuns às três espécies. Ademais, foi observada uma maior similaridade entre GG e GL em relação à GN. O componente majoritário para GG e GL foi a licorina, enquanto para GN foi a anidrolícorina. 11,12-desidro-2-metoxianidrolícorina e 11,12-desidro-2-hidroxianidrolícorina estão sendo relatadas pela primeira vez, pelo nosso melhor conhecimento. As frações das três espécies demonstraram efeito ansiolítico. O pré-tratamento com diazepam (40 mg/kg) e pizotifeno (32 mg/kg) foi capaz de reverter a ação ansiolítica, indicando o envolvimento dos sistemas GABAérgico e serotoninérgico. A docagem molecular mostrou que os compostos vitatina, licorina e 11,12-desidro-2-metoxiassoanina possuem boa afinidade com os receptores de 5-HT_{1A} e GABA humano, sugerindo estes compostos como responsáveis pelo efeito ansiolítico.

Palavras-chave: Amaryllidaceae, *Griffinia*, alcalóides isoquinolínicos, CG-EM, atividade ansiolítica.

ABSTRACT

Griffinia gardneriana (Herb.) Ravenna, *Griffinia liboniana* Morren and *Griffinia nocturna* Ravenna (Amarillydaceae) are easy-to-grow bulbous plants found in the Northeast and Southeast regions of Brazil, where they are commonly used for ornamental purposes. The chemical study of the genus *Griffinia* is still incipient or even non-existent, as in the case of *G. liboniana*. The Amarillydaceae family is characterized by the occurrence of unique isoquinoline alkaloids, which have diverse pharmacological activities. This work aimed to determine the alkaloid profile of *Griffinia* spp. bulbs and evaluate anxiolytic activity of the alkaloid fractions. The studied plants were grown in cultivation houses at Embrapa Agroindústria Tropical. The dried and ground bulbs were defatted with hexane in an ultrasonic bath and then subjected to an acidic-basic liquid-liquid partition sequence, resulting in alkaloid fractions that were later confirmed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Anxiolytic activity was evaluated in zebrafish (*Danio rerio*) through intraperitoneal (i.p.) injection at doses of 40, 100 and 200 mg/kg each, using diazepam (40 mg/kg) as a positive control and 3% DMSO (group control – drug diluent) in light-dark box test. GC-MS analyses revealed 23 isoquinoline alkaloids belonging to lycorine, homolycorine, galanthamine, crinine, haemanthamine, montanine and narcisclasine-type skeletons. The chemical profiles were relatively similar, being 13 compounds common to the three species. The major component for *G. gardneriana* and *G. liboniana* was lycorine, while anhydrolycorine was the main compound for *G. nocturna*. The alkaloids 11,12-dehydro-2-methoxyanhydrolycorine and 11,12-dehydro-2-hydroxyanhydrolycorine are being reported for the first time to the best of our knowledge. Alkaloid extracts from the three species of *Griffinia* spp. demonstrated anxiolytic effect. Pre-treatment with diazepam (40 mg/kg) and pizotifen (32 mg/kg) was able to reverse the anxiolytic action, indicating the involvement of the GABAergic and serotonergic systems. Molecular docking showed that the compounds vittatine, lycorine and 11,12-dehydro-2-methoxyanhydrolycorine have good affinity both with 5-HT_{1A} and human GABA receptors, suggesting these compounds as responsible for the anxiolytic effect.

Keywords: Amaryllidaceae, *Griffinia*, isoquinoline alkaloids, GC-MS, anxiolytic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Substâncias citadas no histórico dos produtos naturais.....	19
Figura 2 - Diversidade das Amaryllidaceae	20
Figura 3 - Filogenia da família Amaryllidaceae até o nível de tribo	21
Figura 4 - Distribuição geográfica das Amaryllidaceae	22
Figura 5 - Inflorescência de algumas espécies do gênero <i>Griffinia</i>	23
Figura 6 - Distribuição das espécies de <i>Griffinia</i> nos Estados do Brasil.....	24
Figura 7 - Trecho da árvore morfológica da tribo Griffiniae	25
Figura 8 - Espécime de <i>Griffinia gardneriana</i> (Herb.) Ravenna.....	26
Figura 9 - Espécime de <i>Griffinia nocturna</i> Ravenna.....	27
Figura 10 - Espécime de <i>Griffinia liboniana</i> C. Morren.....	28
Figura 11 - Exemplos de alcalóides não básicos	30
Figura 12 - Classificação dos alcalóides quanto à definição de Pelletier	31
Figura 13 - Estrutura química de alguns alcalóides bioativos	31
Figura 14 - Rota biossintética dos Alcalóides de Amaryllidaceae	35
Figura 15 - Estrutura química dos principais neurotransmissores.....	38
Figura 16 - Síntese do mecanismo de neuromodulação do sistema colinérgico.....	39
Figura 17 - Síntese do mecanismo de neuromodulação do sistema GABAérgico	41
Figura 18 - Síntese do mecanismo de neuromodulação do sistema serotoninérgico ..	43
Figura 19 - Material vegetal envazado	49
Figura 20 - Esquematização do processo de preparação do material vegetal	50
Figura 21 - Alcaloide isoquinolínico na forma salina e de base livre	50
Figura 22 - Fluxograma do processo de extração dos alcalóides de <i>Griffinia</i> spp	51
Figura 23 - Realização do teste de campo aberto com <i>zebrafish</i>	54
Figura 24 - Realização do teste do aparato claro/escuro com <i>zebrafish</i>	56
Figura 25 - Comparação dos cromatogramas CG-EM das espécies de <i>Griffinia</i>	58
Figura 26 - Normalização dos dados de CG-EM das frações alcaloídicas.....	59
Figura 27 - Estruturas dos alcalóides identificados na Tabela 1	62
Figura 28 - Padrão de fragmentação do composto 21	65
Figura 29 - Padrão de fragmentação do composto 23	66
Figura 30 - Análise ANOVA unidirecional.....	68
Figura 31 - Porcentagem de variância explicada pelas cinco PCs.....	69
Figura 32 - Gráficos de PCA para extratos alcaloídicos de <i>Griffinia</i>	70
Figura 33 - Gráfico de HCA-heatmap	71
Figura 34 - Número de cruzamentos entre os quadrantes	72
Figura 35 - Tempo médio de permanência em segundos do zebrafish na zona clara do aquário	74
Figura 36 - Efeito do pré-tratamento com flumazenil.....	75
Figura 37 - Efeito do pré-tratamento com pizotifeno	76
Figura 38 - Interação entre a vitatina e o receptor 5HTR	79
Figura 39 - Interação entre a vitatina e o receptor 4F11	79
Figura 40 - Interação entre a licorina e o receptor 5HTR	80

Figura 41 - Interação entre a licorina e o receptor 4F11	80
Figura 42 - Interação entre a 11,12-desidro-2-metoxiassoanina e o receptor 5HTR.	81
Figura 43 - Interação entre a 11,12-desidro-2-metoxiassoanina e o receptor 4F11.	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos alcalóides verdadeiros quanto ao núcleo estrutural....	32
Tabela 2 - Principais tipos de Alcalóides de Amaryllidaceae.....	33
Tabela 3 - Alcalóides ansiolíticos: origem vegetal, mecanismos de ação e estruturas químicas.....	47
Tabela 4 - Compostos detectados nas frações alcaloídicas de <i>Griffinia</i> por CG-EM	60
Tabela 5 - Teste de toxicidade aguda dos extratos alcaloídicos de <i>Griffinia</i> spp. em <i>zebrafish</i>	72
Tabela 6 - Afinidade de ligação e energia total com os receptores de 5-HT e GABA ...	78

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-HT	5-Hidroxitriptamina
AAs	Alcalóides de Amaryllidaceae
ANOVA	Análise de Variância Unidirecional
BZDs	Benzodiazepínicos
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
DL ₅₀	Dose Letal 50
DZP	Diazepam
EPM	Labirinto Elevado em T
FA	Fração Alcaloídica
FMZ	Flumazenil
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GG	<i>Griffinia gardneriana</i>
GIRK	Canais de Potássio Retificadores de Influxo
GL	<i>Griffinia liboninana</i>
GN	<i>Griffinia nocturna</i>
HBT	<i>Hole Board Test</i>
HCA	Análise Hierárquica de Agrupamentos
i.p.	Intraperitoneal
L-Phe	L-Fenilalanina
L-Tyr	L-Tirosina
LDB	Aparato Claro-Escuro
LSD	<i>Least Significant Difference</i>
M+	Íon Molecular
Me	Metila
MeOH	Metanol
NAc	Núcleo Accumbens
NIST	<i>National Institute of Standardization and Technology</i>
OMe	Metoxila
OFM	Teste de Campo Aberto
PCA	Análise de Componentes Principais
PDB	Protein Data Bank
PFC	Córtex Pré-Frontal

P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PNs	Produtos Naturais
PZT	Pizotifeno
RI	Índice de Retenção
RPM	Rotações Por Minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
TCA	Antidepressivos Tricíclicos
TCC	Terapia Cognitivo Comportamental
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>
VGCC	Canais de Cálcio Dependentes da Voltagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1	Histórico e contexto dos produtos naturais	17
3.2	Considerações botânicas	19
3.2.1	<i>Família Amaryllidaceae</i>	19
3.2.2	<i>Gênero Griffinia</i>	23
3.3	Alcalóides	29
3.3.1	<i>Visão geral</i>	29
3.3.2	<i>Alcalóides da família Amaryllidaceae</i>	32
3.4	Atividade ansiolítica em fitoquímicos	36
3.4.1	<i>Visão geral</i>	36
3.4.2	<i>Sistema colinérgico</i>	38
3.4.3	<i>Sistema GABAérgico</i>	40
3.4.4	<i>Sistema serotoninérgico</i>	42
3.4.5	<i>Alcalóides ansiolíticos</i>	44
4	JUSTIFICATIVA	48
5	MATERIAIS E MÉTODOS	49
5.1	Material vegetal	49
5.2	Extração de alcalóides	50
5.3	Análise por CG-EM	51
5.4	Análises estatística e quimiométrica	52
5.5	Ensaio farmacológicos <i>in vivo</i>	53
5.5.1	<i>Drogas e reagentes</i>	53
5.5.2	<i>Alojamento dos animais</i>	53
5.5.3	<i>Protocolo inicial</i>	54
5.5.4	<i>Teste de campo aberto (OFT)</i>	54
5.5.5	<i>Ensaio de toxicidade aguda</i>	55
5.5.6	<i>Ensaio de aparato claro/escuro (LDB)</i>	55

5.5.7	<i>Avaliação da neuromodulação GABAérgica e Serotoninérgica</i>	56
5.5.8	<i>Análise estatística</i>	57
5.6	Docagem molecular	57
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
6.1	Determinação do perfil alcaloídico por CG-EM	58
6.2	Análise não-supervisionada	67
6.3	Atividade farmacológica dos extratos alcaloídicos	71
6.3.1	<i>Avaliação de toxicidade aguda</i>	71
6.3.2	<i>Efeito sobre atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)</i>	72
6.3.3	<i>Atividade ansiolítica em zebrafish</i>	73
6.4	Docagem molecular	77
7	CONCLUSÃO	82
	REFERÊNCIAS	84
	ANEXO A – Espectro de massas de um padrão analítico de licorina	99
	ANEXO B - Espectro de massas de um padrão analítico de galantamina	100

1 INTRODUÇÃO

Os alcalóides figuram entre as principais classes de fitoquímicos. Nas plantas, desempenham um papel essencial como agentes naturais de defesa, protegendo-as de predadores e regulando o seu crescimento. Os alcalóides são uma classe bem conhecida de compostos reconhecidos pelo seu potencial terapêutico, especialmente pelas suas propriedades anestésicas, cardioprotetoras e anti-inflamatórias (HEINRICH; MAH; AMIRKIA, 2021). Alcalóides como morfina, estricnina, quinina, efedrina, colchicina, atropina e galantamina são exemplos de medicamentos comercializados utilizados em todo o mundo (ATANASOV *et al.*, 2021). Por exemplo, a galantamina (Reminyl®), um alcaloide isolado pela primeira vez de plantas do gênero *Galanthus* (Amaryllidaceae), é atualmente indicada para o tratamento da Doença de Alzheimer (MAMBRO; SOUZA; SILVA, 2022; TALLINI *et al.*, 2017).

Alcalóides são substâncias cíclicas, nitrogenadas e geralmente básicas que se originam de aminoácidos em seres vivos. Os alcalóides isoquinolínicos derivados de L-fenilalanina e L-tirosina normalmente encontrados em espécies da família Amaryllidaceae são conhecidos como Alcalóides Amaryllidaceae (AAs) (BERKOV *et al.*, 2020). Atualmente, existem mais de 650 AAs isolados, dos quais 15% foram relatados entre 2015 e 2020, revelando um interesse crescente nestes compostos (KA *et al.*, 2020). Os AAs mostraram um amplo espectro de propriedades farmacológicas, como antitumoral, antiviral, antibacteriana, antifúngica, antimalárica, anticolinesterásica, analgésica, ansiolítica e neuroprotetora (PAIVA, 2019), o que explica o interesse científico no estudo desta família botânica.

No Brasil, em especial nas regiões Nordeste e Sudeste, o gênero *Griffinia* (Amaryllidaceae) destaca-se, compreendendo 23 espécies de monocotiledôneas herbáceas e bulbosas, cujas flores exuberantes e o fácil cultivo as torna atraentes como plantas ornamentais (COLE, 2018). O conhecimento sobre o gênero *Griffinia* ainda é incipiente, pois a maioria de suas espécies carece de caracterização química. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) é uma técnica analítica comumente utilizada para identificação de alcalóides a partir de extratos vegetais. Ela se baseia em informações cromatográficas (índice de retenção) e espectrométricas (padrão de fragmentação) que em conjunto permitem a caracterização de compostos previamente descritos na literatura, bem como fornecer informações úteis para elucidação estrutural de novas moléculas (SOUZA, 2021).

A ansiedade é um dos transtornos neuropsiquiátricos mais prevalentes e um dos que mais cresceu nos últimos anos em decorrência da pandemia de Covid-19 (BARBIERI et al., 2019). Estima-se que quase 400 milhões de pessoas convivam com algum transtorno relacionado à ansiedade em todo o mundo (SANTOMAURO et al., 2021). O tratamento da ansiedade pode ser feito tanto por meio da terapia cognitivo-comportamental quanto pelo uso de diversos medicamentos (PHOOTHATHA et al., 2022). Nas últimas décadas, os benzodiazepínicos (BZDs) têm estado entre as classes medicamentosas mais utilizadas para o tratamento da ansiedade. Todavia há uma grande busca por novos medicamentos ansiolíticos devido aos efeitos adversos causados pelo uso prolongado desse tipo de fármaco (SILVA; SOUZA, 2021). Na área de transtornos neuropsiquiátricos, os resultados obtidos a partir de artigos de revisão e metanálises demonstraram os benefícios terapêuticos dos medicamentos fitoterápicos no tratamento de transtornos do humor, incluindo esquizofrenia, depressão, transtorno de ansiedade generalizada e outros (FARZAEI et al., 2016).

Portanto, decidimos identificar por meio CG-EM o perfil alcaloídico de três espécies de *Griffinia*, além de investigar o potencial ansiolítico *in vivo* de suas respectivas frações alcaloídicas, utilizando um modelo com peixes *zebrafish* e química computacional (docagem molecular).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar o perfil alcaloídico de bulbos cultivados de *G. gardneriana*, *G. nocturna* e *G. liboniana* e investigar o efeito ansiolítico, *in vivo*, das frações alcaloídicas no modelo animal *zebrafish* adulto (ambos os sexos).

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil das frações alcaloídicas de *Griffinia* spp. por CG-EM;
- Comparar as frações alcaloídicas através de análises quimiométricas não-supervisionadas (PCA e HCA) dos dados de CG-EM;
- Avaliar a atividade ansiolítica das frações alcaloídicas de *Griffinia* spp. através de um teste do aparato claro/escuro em *zebrafish*;
- Determinar o(s) mecanismo(s) de ação do efeito ansiolítico das frações alcaloídicas em *zebrafish* através do pré-tratamento com fármacos antagonistas;
- Identificar os possíveis alcalóides responsáveis pelo efeito ansiolítico em *zebrafish* usando docagem molecular.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Histórico e contexto dos produtos naturais

O uso de plantas para fins medicinais foi uma característica comum no desenvolvimento de diversos povos e culturas, o que resultou em registros históricos importantes, tanto na civilização oriental como na ocidental. O texto mais antigo a tratar de ervas e suas propriedades é atribuído ao imperador chinês Shen-Nung, em sua obra *Pen T'sao* (2800 a.C), na qual é descrita a utilização do ginseng e de outras centenas de ervas medicinais no tratamento das mais diversas chagas (VIEIRA, 2019). Outro importante documento trata-se do *Papiro de Ebers* (1500 a.C), batizado assim em homenagem ao egiptólogo Georg Ebers, que cataloga diversas técnicas medicinais antigas, incluindo a utilização de plantas como o sândalo e a papoula (SHUHATA *et al.*, 2023). A presença de escritos sobre plantas medicinais no Egito também revela que elas eram conhecidas e utilizadas por outros povos que comercializavam com a civilização do Nilo, como os minóicos pré-micênicos, que dominavam o comércio no Mediterrâneo, e o Reino de Sabá (ALMEIDA, 2011).

Avançando à era clássica, as ervas medicinais começaram a ser catalogadas sistematicamente. Em sua obra *Da Matéria Médica* (50-70 a.C.), Pedanius Dioscórides registrou a origem, as características e o uso na terapêutica de mais de 500 espécies vegetais. A obra de Dioscórides se transformou na principal referência para médicos e farmacêuticos até o fim da Idade Média (BRANDELLI, 2017), período no qual a influência da Igreja Católica criou uma espécie de apagão no avanço dos estudos nas mais diversas áreas, incluindo a pesquisa sobre ervas medicinais (BRAGA, 2011). Essa relevância faz com quem Dioscórides seja considerado por muitos o pai da farmacognosia moderna (ROCHA *et al.*, 2021).

Paralelamente, no Oriente, as civilizações árabes e a indiana desenvolviam suas contribuições. A Índia possivelmente conhecia as plantas medicinais desde 2.500 a.C. e o seu legado é lembrado na utilização de plantas como o cochim na medicina tradicional ayurvédica (MADALENO, 2015). Os árabes, por sua vez, possuem protocolos médicos que podem ser tão antigos como 500 a.C., como o *Taxacara-Samhita* e *Susruta-Samhita*, mas foi durante a Idade Média que a medicina árabe se consolidou. As plantas medicinais se destacam aqui através do famoso médico Avicena (980-1037), conhecido por usar flores no tratamento de problemas cardíacos (BRAGA, 2011). Cabe destacar que as incursões mouras na

Península Ibérica popularizaram algumas ervas medicinais de origem oriental como a canela, o limão e a cânfora por toda a Europa (ALMEIDA, 2011).

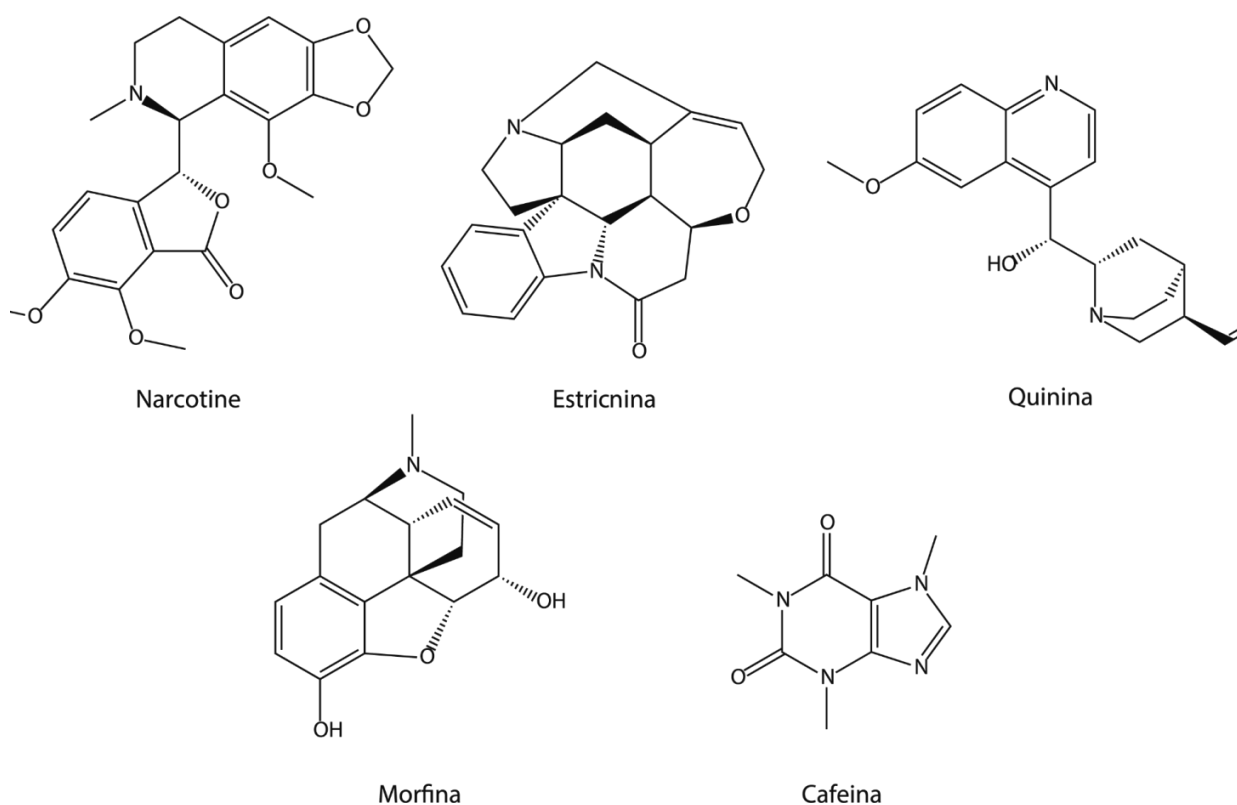
Com as grandes navegações dos séculos XV ao XVII novas terras se tornaram conhecidas pelos europeus e com elas novos conhecimentos botânicos foram introduzidos através do contato com a cultura de povos nativos da África e das Américas (ALMEIDA, 2011). No Brasil, por exemplo, a exploração das riquezas oriundas da flora, na figura do pau-brasil, foi um dos grandes motores para os primeiros esforços de colonização (VIEGAS-JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). As menções a paus, cipós e ervas da recém descoberta Terra de Santa Cruz são frequentes na carta de Pero Vaz de Caminha (FILGUEIRAS; PEIXOTO, 2002). As interações entre indígenas e portugueses somadas às influências mais tarde trazidas pelos escravizados africanos resultaram no extenso uso de plantas medicinais na cultura popular brasileira que se mantém até hoje (CASTILHOS; BARBATO; BOING, 2023).

A partir do século XVIII a fitoterapia começa a ter um maior arcabouço científico. Diversas substâncias químicas foram isoladas a partir de extratos vegetais, tais como a narcotina, morfina, estricnina, quinina e cafeína (Figura 1) (COLE, 2018). Data do início do século XIX, a realização dos primeiros isolamentos de alcalóides por Derosne e Serturmer (SEBBEN, 2020). Em meados do século XIX, a crescente industrialização fez com que o acesso a fármacos se tornasse cada vez mais comum, o que reduziu o uso direto de plantas medicinais (BRAGA, 2011). Desde então, o estudo das plantas medicinais tem sofrido diferenciação e especialização, gerando diferentes áreas de estudo como a farmacognosia e a química de produtos naturais (HENRIQUES *et al.*, 2010).

De acordo com a análise de Newman e Cragg (2020), quase um quarto das drogas aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) nos últimos 40 anos são de origem natural ou semissintética. Esses números se devem ao fato de que a indústria farmacêutica frequentemente se vale dos estudos com produtos naturais como ponto de partida na busca por novas moléculas farmacologicamente ativas (PAIVA, 2019). O desenvolvimento de medicamentos a partir de PNs oferece tanto vantagens quanto desvantagens em relação ao estudo de moléculas puramente sintéticas. Do ponto de vista positivo, os PNs possuem estruturas naturalmente adaptadas para atender finalidades biológicas específicas, tais como a regulação de mecanismos de defesa e a interação com outras espécies de seres vivos, o que

explica o sucesso dos PNs no combate ao câncer e a agentes infecciosos diversos (atividade citotóxica). Aliado a isso, a enorme diversidade dos PNs fornece uma fonte praticamente inesgotável de novas substâncias potencialmente capazes de serem utilizadas como protótipos para novos fármacos (ATANASOV *et al.*, 2021). Entretanto, essa mesma questão pode fazer com que a identificação de compostos de interesse se torne desafiadora, encarecendo o processo de pesquisa e desenvolvimento (P&D), o que fez com que na última década a maioria dos tomadores de decisão em multinacionais farmacêuticas reduzissem o investimento nos seus programas de P&D com produtos naturais (AMIRKIA; HEINRICH, 2015).

Figura 1 - Substâncias citadas no histórico dos produtos naturais.



Fonte: elaborado pelo autor.

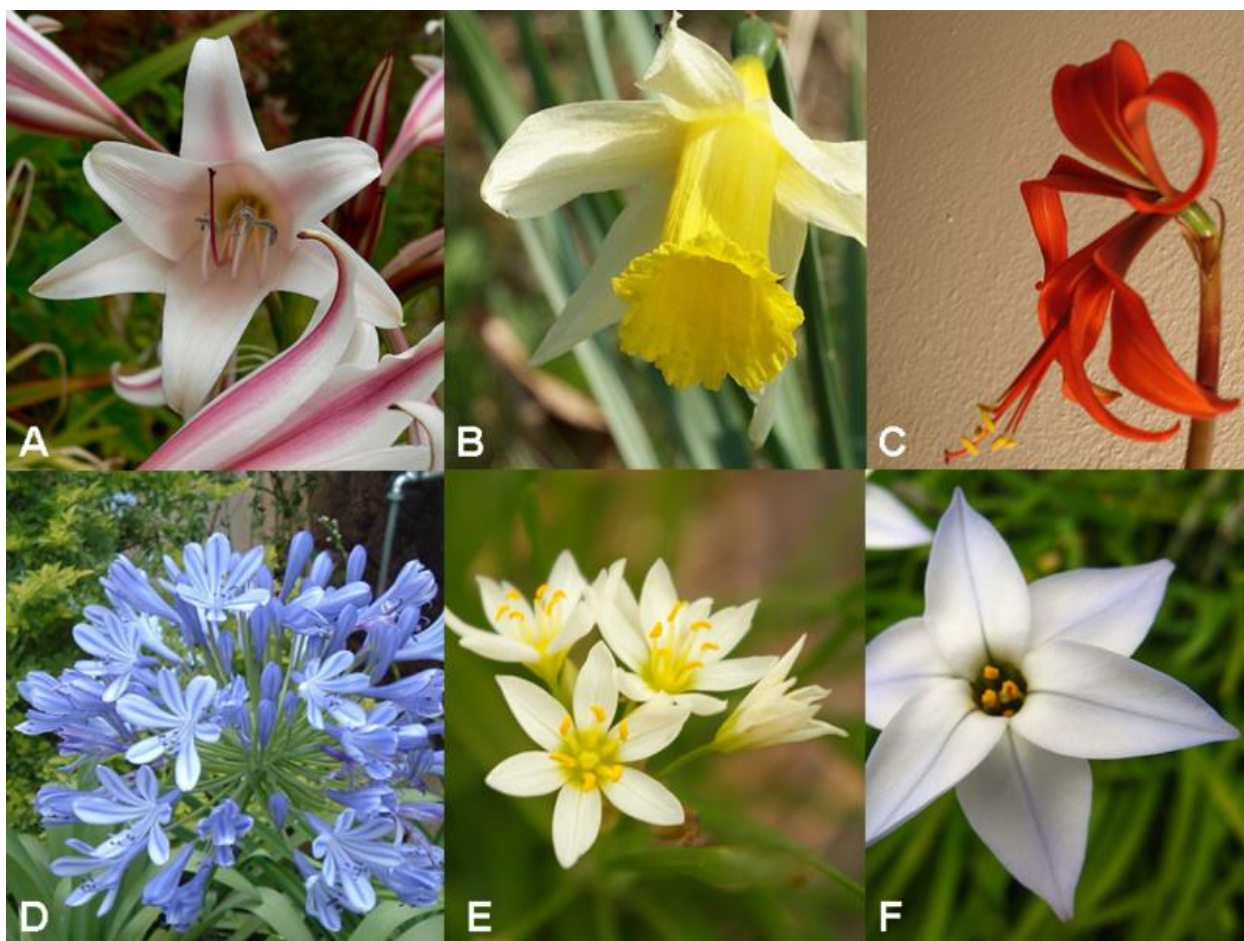
3.2 Considerações botânicas

3.2.1 Família Amaryllidaceae

Registrada pela primeira vez por Jean Henri Jaume Saint-Hilaire em 1805 (GOLLOSHI *et al.*, 2017), a família Amaryllidaceae é genericamente caracterizada por plantas monocotiledôneas, de hábito herbáceo, com bulbos subterrâneos

perenes, folhas simples, sésseis ou subpecioladas, dísticas e basais, podendo ser lanceoladas ou elípticas. Possuem inflorescência escaposa, umbeliforme ou uniflora, envolta por duas ou três espatas, podendo apresentar bractéolas internas, pedicelos não articulados, estilete longo e estigma seco ou úmido (ENGEL, 2014; DUTILH *et al.*, 2020).

Figura 2 - Diversidade das Amaryllidaceae. A: *Crinum*; B: *Narcissus*; C: *Sprekelia*; D: *Agapanthus*; E: *Allium*; F: *Tristagma*.

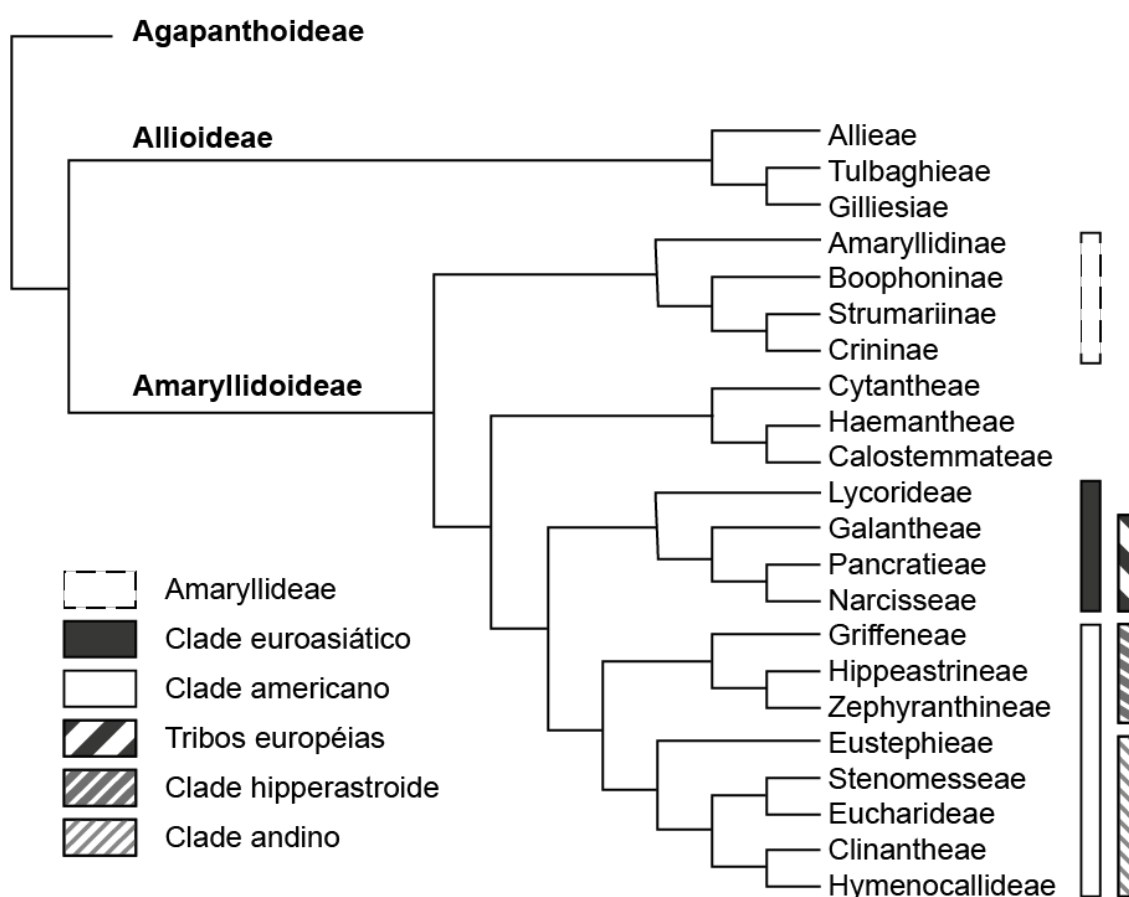


Fonte: Sam Wilson, 2009.

As flores bissexuadas e vistosas (Figura 2) geralmente são actinomorfas, podendo variar no formato de estrela, trompete ou tubular, e apresentam cores como vermelho, laranja, amarelo e branco, sendo flores azuladas encontradas apenas nos gêneros *Griffinia*, *Worsleya* e *Lycoris* (PAIVA, 2019). Seus frutos, de formatos variados, podem ser deiscentes ou indeiscentes, apresentando sementes largas e sem dormência (COLE, 2018).

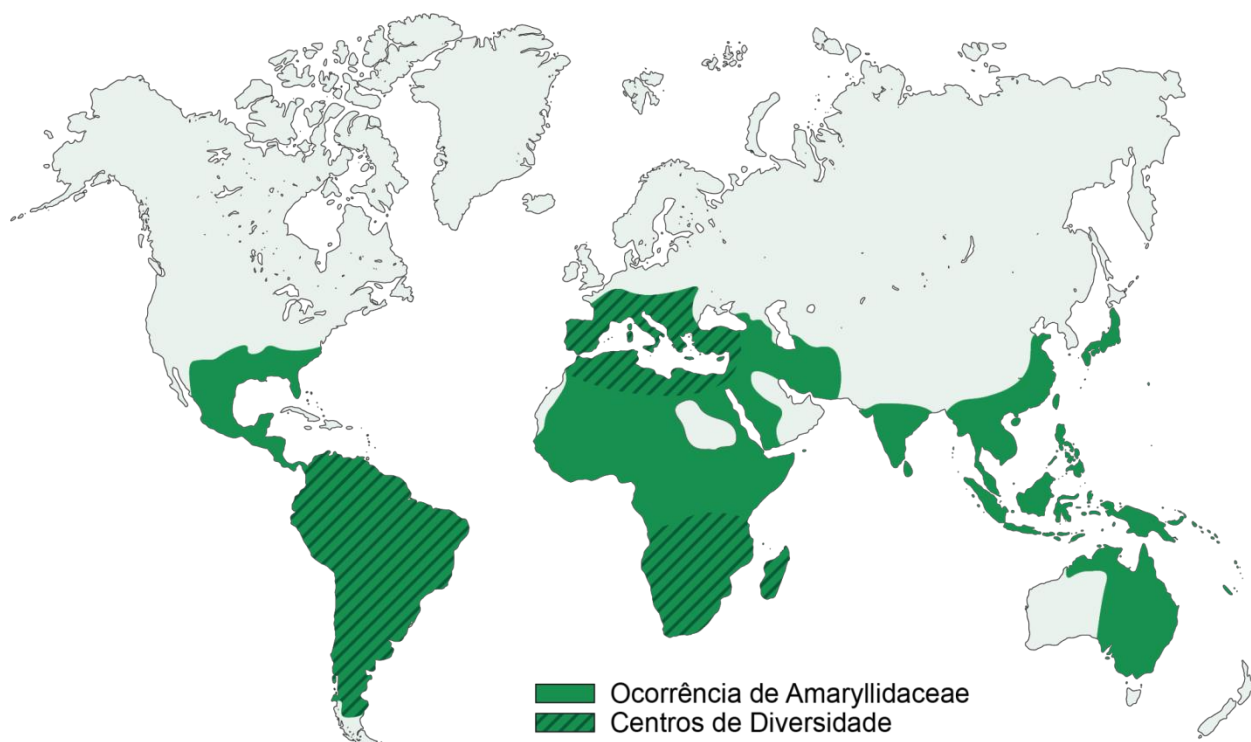
Pertencente a ordem das Asparagales, a família Amaryllidaceae engloba cerca de 70 a 75 gêneros botânicos e mais de 1600 espécies, com distribuição desde latitudes temperadas até o Equador, sendo os principais pontos de diversidade as regiões do Mediterrâneo, sul da África (Agapanthoideae) e América do Sul (ALVES-ARAÚJO; DUTILH; ALVES, 2009; ENGEL, 2014), conforme apresentado na Figura 4. A família é subdividida em três subfamílias, Allioideae, Amaryllidoideae e Agapanthoideae, que por sua vez por sua vez podem ou não apresentarem diferentes tribos divididas de acordo com o seu isolamento geográfico (GOLLOSHI *et al.*, 2017) (Figura 3).

Figura 3 - Filogenia da família Amaryllidaceae até o nível de tribo. É possível observar a separação em subfamílias e a diversificação em clades ou tribos associados principalmente ao isolamento geográfico.



Fonte: Elaborado pelo autor com base no trabalho de Engel (2014).

Figura 4 - Distribuição geográfica das Amaryllidaceae. Em hachura destacam-se os seus principais centros de diversidade na América do Sul, sul da África e mediterrâneo.



Fonte: Adaptado de Projeto MOBOT (mobot.org)

Por apresentarem flores belas e muitas vezes perfumadas, algumas plantas da família Amaryllidaceae são cultivadas com finalidade ornamental (MORAES, 2016; ENGEL, 2014), sendo espécies como *Narcissus pseudonarcissus*, *Leucojum aestivum* e *Galanthus elwesii* bastante apreciadas na jardinagem (COLE, 2018). Porém também há registros do seu uso medicinal desde a antiguidade (CASTILHOS *et al.*, 2007). Atualmente, as propriedades farmacológicas de compostos de amarilidáceas têm sido amplamente estudadas em busca de desenvolver novas aplicações terapêuticas, uma vez que essa família é considerada uma das 20 mais importantes do reino vegetal no tocante ao grande teor de alcalóides presentes em sua composição química (CARVALHO, 2014; OLIVEIRA, 2017). É sabido que alguns compostos isolados a partir de espécies de Amaryllidaceae têm demonstrado um grande potencial farmacológico possuindo atividades antitumoral, antiviral, antibacteriana, antifúngica, antimalárica, anticolinesterásica, analgésica, ansiolítica e neuroprotetora (CAHLÍKOVÁ *et al.*, 2021; NAIR; VAN STADEN, 2023; NAIR; VAN STADEN, 2020; HAO; SHEN; ZHAO, 2013; TRUJILLO-CHACÓN *et al.*, 2019).

3.2.2 Gênero *Griffinia*

Compondo junto a *Worsleya* a tribo Griffinae, o gênero *Griffinia* (Ker Gawl) corresponde a plantas com raízes adventícias de epiderme uni ou multisseriada, que geralmente apresentam micorrizas, bulbo subterrâneo ou superficial saxícola, globoso, ovóide ou elipsóide, tunicado com catáfilo externo esverdeado esbranquiçado a acastanhado, filotaxia dística, folhas anuais ou perenes, sésseis a pseudopecioladas, com lâminas histerantas ensiformes, falcadas, oblongas, elípticas, lanceoladas, lineares, ovaladas ou cordiformes, podendo possuir ornamentação (máculas) ou não, inflorescência umbeliforme, multiflora, com escapo cheio ou fistuloso e glabro com brácteas mais basais, flores sésseis a pediceladas, actinomorfas e deflexas, de coloração branca, rosa, azul ou violeta, sem corona, com cinco a seis estames, ovário ínfero com placentação axilar ou aparentemente basal, fruto tipo cápsula com ápice cuspidado a rostrado, loculicida ou com deiscência irregular e sementes globosas, com elaiossomo, alvas as esverdeadas (DUTILH *et al.*, 2020). Algumas flores do gênero podem ser vistas na Figura 5.

Figura 5 - Inflorescência de algumas espécies do gênero *Griffinia*. A: *Griffinia liboniana*; B: *Griffinia gardneriana*; C: *Griffinia nocturna*.

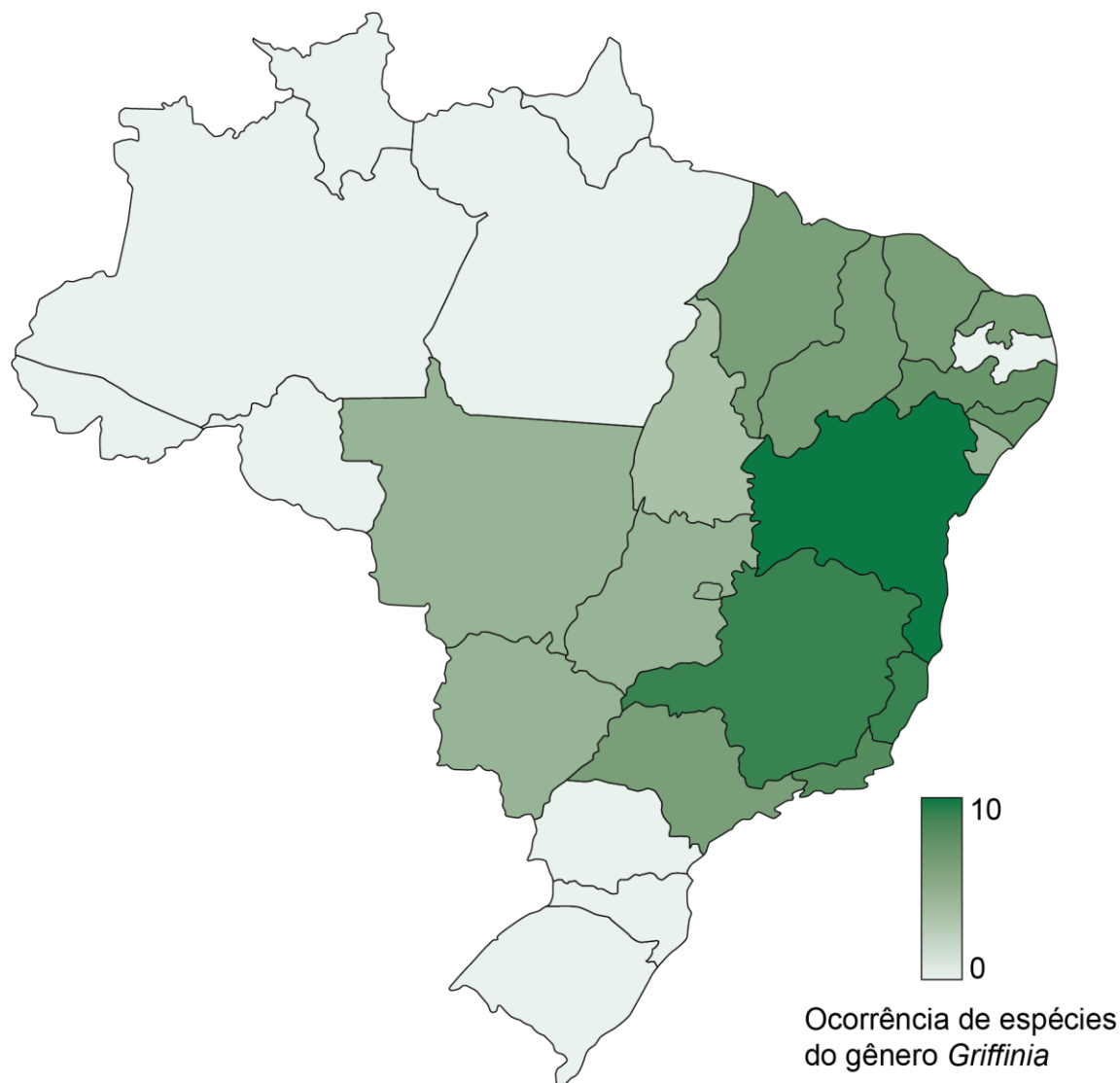


Fonte: A: Julie Dutilh; B: Mauro Peixoto; C: Antônio Campos.

As espécies do gênero são frequentemente endêmicas e estão distribuídas entre os biomas brasileiros da Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, tendo sido observadas em 16 Estados (Figura 6). O cultivo de grifínias tem tido sucesso na jardinagem, mas apesar disso o gênero corre sério risco de extinção, uma vez que algumas espécies não estão sendo mais encontradas em seu habitat natural,

enquanto alguns indivíduos remanescentes são conservados em coleções particulares (ENGEL, 2014).

Figura 6 - Distribuição das espécies de *Griffinia* nos Estados do Brasil.

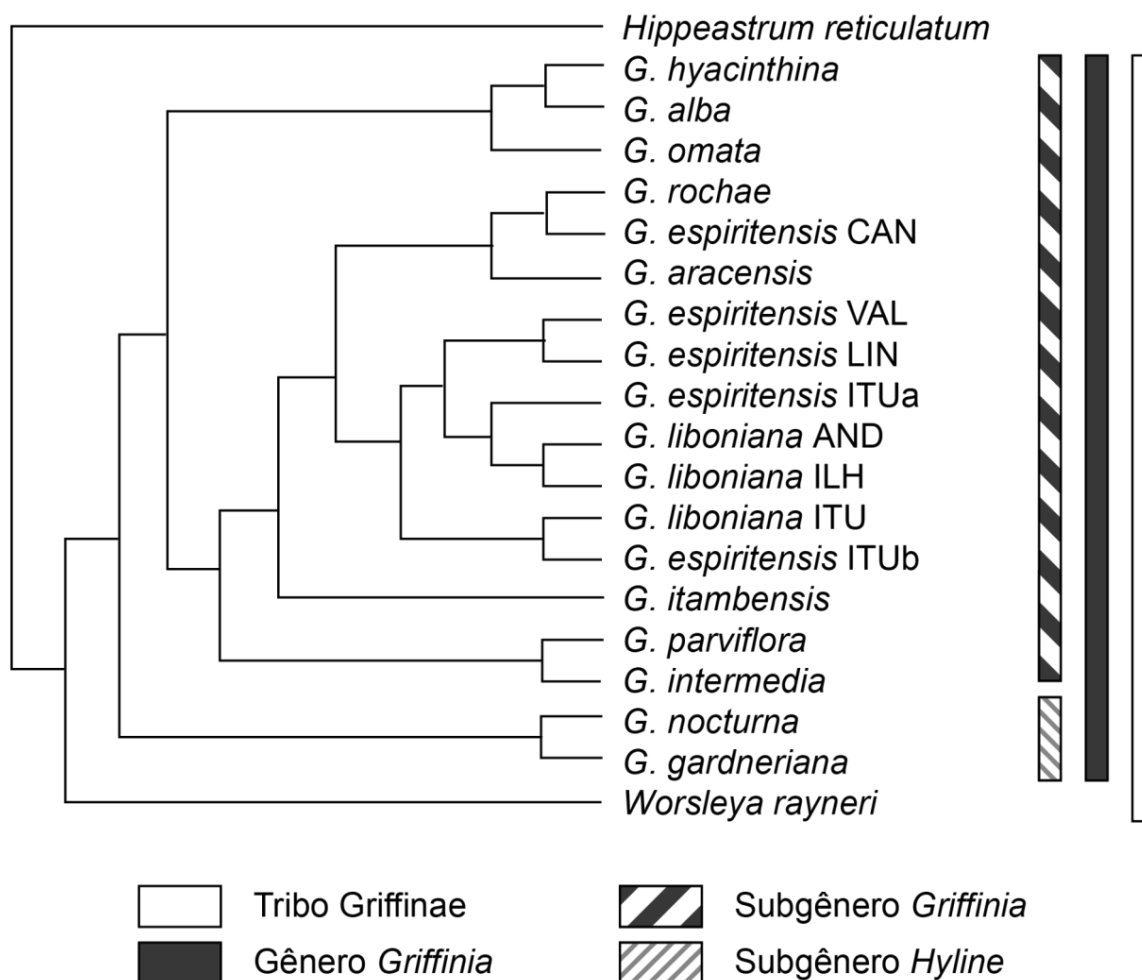


Fonte: Elaborado pelo autor a partir do trabalho de Julie Dutilh (2020).

O gênero *Griffinia* atualmente engloba 23 espécies vegetais divididas em dois subgêneros: *Griffinia* e *Hylne* (Figura 7). O subgênero *Griffinia* é composto por espécies que apresentam de quatro a quinze flores não perfumadas nas cores lilás, azul ou branca, enquanto o *Hylne* apresenta de duas a quatro flores na cor branca, com odor (COLE, 2018; DUTILH *et al.*, 2020). A filogenia (diferenciação entre as

espécies) é feita com base em uma chave de identificação com vinte características morfológicas (DUTILH *et al.*, 2020).

Figura 7 - Trecho da árvore morfológica da tribo Griffinae que explicita as relações filogenéticas entre algumas espécies do gênero *Griffinia*.



Fonte: Elaborado pelo autor a partir dos trabalhos de Engel (2014) e Preuss (1999).

3.2.2.1 *Griffinia gardneriana* (Herb.) Ravenna

Integrante do subgênero *Hyline*, a *Griffinia gardneriana* (Herb.) Ravenna (Figura 8) é uma espécie típica da caatinga de areia, presente na maioria dos Estados do Nordeste, no Rio de Janeiro e no Espírito Santo. Uma densa população conservada dessa erva pode ser observada no Parque Nacional do Catimbau, em Pernambuco, principalmente durante o período de chuvas, uma vez que as folhas da espécie são decíduas, isto é, se desprendem no período seco (COLE, 2018).

Figura 8 - Espécime de *Griffinia gardneriana* (Herb.) Ravenna.



Fonte: Julie Dutilh e Antônio Campos, 2015.

A espécie é caracterizada por possuir bulbo subterrâneo ovalado, folhas sésseis, ensiformes a falcadas e muito raramente maculadas. Sua inflorescência é umbeliforme e escaposa, com terço superior fistuloso e brácteas livres. As flores são odoríferas e deflexas, com perigônio infundibuliforme branco ou muito raramente róseo e sem mácula. Apresenta seis estames com filetes de comprimento parecido ou inferior ao das pétalas, um tubo do hipanto curto (0,1 - 1,0 cm) e antera amarela. Sua placentação é axilar e o fruto tem formato ovóide/elipsóide (DUTILH, 2020). Na natureza, seu florescimento ocorre de dezembro a março. A antese é noturna, tendo a abertura dos botões da mesma inflorescência quase concomitante e duração dos mesmos por apenas uma noite (ALVES-ARAÚJO; DUTILH; ALVES, 2009).

3.2.2.2 *Griffinia nocturna* Ravenna

Assim como *Griffinia gardneriana*, a *Griffinia nocturna* Ravenna (Figura 9) integra o subgênero Hyline, sendo elas seus únicos integrantes conhecidos (ENGEL,

2014). Assim como a sua parente mais próxima, a *Griffinia nocturna* é uma erva geófita que se distribui por regiões secas do Nordeste e Centro-Oeste brasileiros, sendo a *G. gardneriana* mais associada à Caatinga, enquanto a *G. nocturna* está mais associada ao Cerrado (ALVES-ARAÚJO; DUTILH; ALVES, 2009).

Figura 9 - Espécime de *Griffinia nocturna* Ravenna.



Fonte: Mauro Peixoto, 2015.

A *Griffinia nocturna* é caracterizada por possuir bulbo subterrâneo, folhas pseudopetioladas, estreitamente elípticas ou oblanceoladas e sem máculas. Sua inflorescência é umbeliforme e escaposa, com terço superior fistuloso e brácteas livres. As flores são odoríferas e deflexas, com perigônio infundibuliforme branco. Elas apresentam seis estames com filetes de comprimento parecido ou inferior ao das pétalas, um tubo do hipanto longo (maior que 5,0 cm) e antera amarela. Sua placentação é axilar e o fruto tem formato elipsóide (DUTILH, 2020). Cabe destacar que morfologicamente a *G. nocturna* e a *G. gardneriana* são diferenciadas principalmente pelo comprimento do tubo do hipanto (5,0 e 1,0 cm, respectivamente)

e as flores subsésseis presentes exclusivamente na primeira (*G. nocturna*) (ALVES-ARAÚJO; DUTILH; ALVES, 2009; DUTILH, 2020).

3.2.2.3 *Griffinia liboniana* C. Morren

Integrante do subgênero *Griffinia*, a espécie *Griffinia liboniana* C. Morren (Figura 10) ocorre em áreas florestais ao norte do rio São Francisco, em especial em áreas remanescentes da Mata Atlântica (CAMPOS-ROCHA; MEEROW; LIMA, 2019). Ela já foi registrada nos Estados nordestinos da Bahia, Ceará, Pernambuco e Rio Grande do Norte, mas também no Sudeste, em Minas Gerais e no Espírito Santo. No Espírito Santo, a planta é frequentemente encontrada em restingas e mussunungas. Quanto ao seu estado de conservação, a espécie está classificada como “em perigo” (NICHIO-AMARAL; CAMPOS-ROCHA; ALVES-ARAÚJO, 2020).

Figura 10 - Espécime de *Griffinia liboniana* C. Morren.



Fonte: Julie Dutilh, 2013.

A espécie é caracterizada por possuir bulbo subterrâneo, folhas pseudopetioladas ou não, com lâminas elípticas, estreitamente elípticas,

lanceoladas, oblanceoladas ou obovadas, apresentando ou não ornamentação, que por sua vez pode se manifestar através máculas ou estrias alvas, longitudinais ou centrais, ou até mesmo uma região mais clara próxima à nervura (DUTILH *et al.*, 2020). Cabe destacar que a *G. liboniana* possui grande variação na forma, tamanho e coloração das folhas, característica que pode ser observada tanto entre indivíduos diferentes quanto no mesmo indivíduo. Essa variabilidade pode estar ligada a influência de fatores ambientais (NICHIO-AMARAL; CAMPOS-ROCHA; ALVES-ARAÚJO, 2020). A inflorescência é do tipo umbeliforme com escapo inteiro sólido e brácteas fundidas. As flores são deflexas, não apresentam odor, apresentam perigônio infundibuliforme lilás ou muito raramente alvo e sem máculas, tubo do hipanto curto (0,1 - 1,0 cm) e anteras amarelas. Apresentam cinco ou seis estames com filetes menores que as pétalas. A placentação é basal e o fruto é globoso/obovóide (DUTILH *et al.*, 2020). A variação na quantidade de estames, cinco ou seis, também pode ocorrer em um mesmo indivíduo ou em indivíduos distintos. O florescimento e frutificação são registrados para quase todos os meses do ano, porém, no Estado do Espírito Santo, foram observados nos meses de março e junho e no período de outubro a dezembro. (NICHIO-AMARAL; CAMPOS-ROCHA; ALVES-ARAÚJO, 2020).

3.3 Alcalóides

3.3.1 Visão geral

De acordo com a definição proposta por Pelletier (1988), alcalóides são compostos orgânicos, cíclicos, nitrogenados, geralmente básicos - característica a qual se deve o nome do grupo, cujo átomo de nitrogênio apresenta-se em estado de oxidação negativa e que são provenientes de aminoácidos, possuindo assim distribuição limitada entre os seres vivos. Apesar de extensa, essa definição foi capaz de diferenciar as substâncias consideradas alcalóides até então de outras como aminas simples, peptídeos, porfirinas, etc (HENRIQUES *et al.*, 2010).

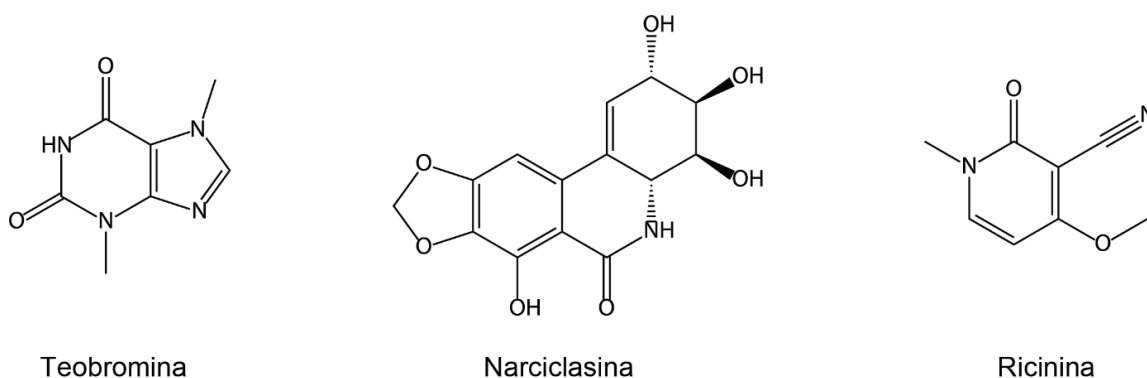
Atualmente são conhecidos dezenas de milhares de alcalóides estruturalmente diversos entre si, presentes em fungos, como a psilocibina (SOUZA, 2019), animais, como a bufotenina (BARROS, 2013), e sobretudo nos vegetais. Em plantas, fazem parte dos metabólitos secundários e são frequentemente encontrados entre as angiospermas dicotiledôneas, mas também podem estar presentes em

angiospermas monocotiledôneas, como é no caso das famílias Colchicaceae e Amaryllidaceae (OLIVEIRA, 2017).

Existem teorias através das quais se tenta explicar a presença de alcalóides nos vegetais. Por exemplo, o fato de alcalóides frequentemente possuírem um sabor adstringente pode representar uma adaptação evolutiva de certas plantas para inibir a herbivoria. Outra hipótese seria a de que os alcalóides fossem produto de processos de detoxificação de substâncias geradas no metabolismo primário, ou ainda que eles atuariam como hormônios no controle de crescimento e germinação, por conta de suas propriedades citotóxicas. Por fim, também é sabido que alcalóides atuam na proteção contra microrganismos, haja vista que, em algumas espécies, foi observado um aumento da sua produção durante o ataque de vírus ou bactérias (HENRIQUES *et al.*, 2010; BESSA *et al.*, 2017).

Os alcalóides podem ser classificados quanto ao seu caráter ácido/base, sendo geralmente alcalinos, mas eventualmente neutros ou até mesmo ácidos a depender da classificação do grupo amina (secundária, terciária ou quaternária), e da presença de outros grupos com efeito indutivo doador ou retirador de elétrons nas imediações do nitrogênio (KORNIENKO; EVIDENTE, 2008). Alguns alcalóides não básicos podem ser vistos na Figura 11.

Figura 11 -. Exemplos de alcalóides não básicos.

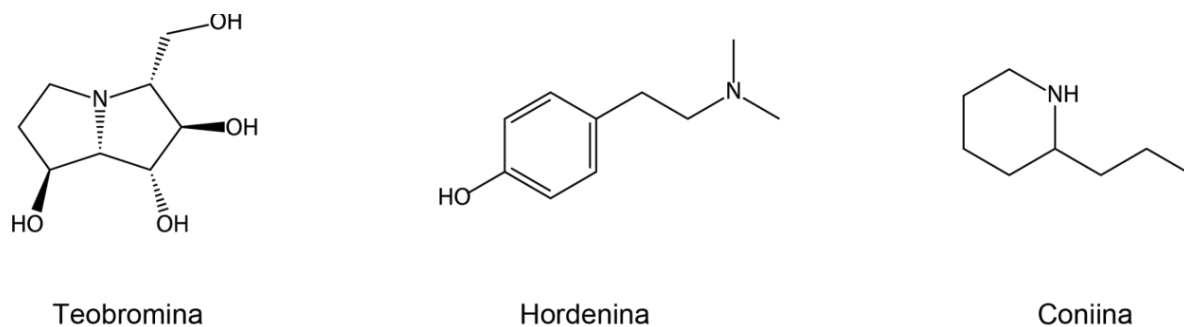


Fonte: elaborado pelo autor.

Ademais, podem ser classificados de acordo com a sua adequação à definição tradicional da classe: substâncias oriundas de aminoácidos que possuem um nitrogênio heterocíclico são denominadas alcalóides verdadeiros, enquanto aquelas que apresentam um nitrogênio fora do heterociclo são chamadas de protoalcalóides. Além disso, substâncias que apresentam um nitrogênio

heterocíclico, mas que não têm aminoácidos como origem sintética recebem a alcunha de pseudoalcalóides (CAVALLIERI, 2019). Exemplos da classificação de alcalóides conforme à sua adequação à definição clássica podem ser encontrados na Figura 12.

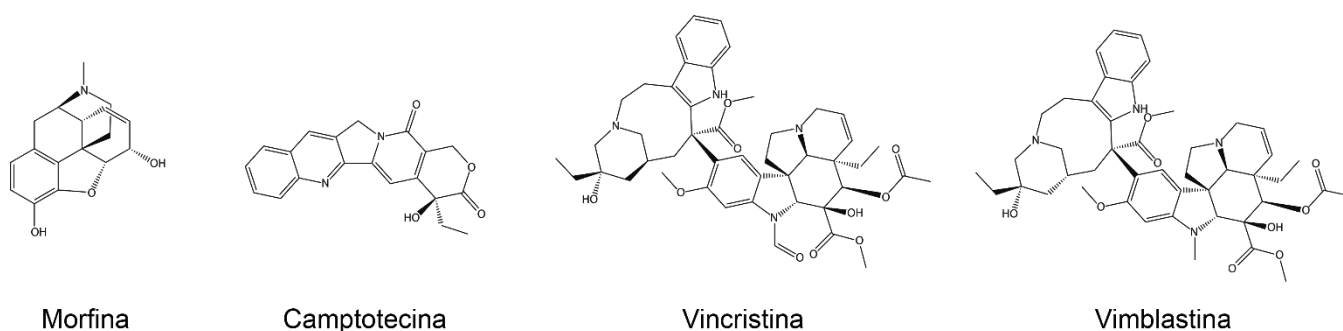
Figura 12 - Classificação dos alcalóides quanto à definição de Pelletier. Da esquerda pra direita: alcalóide verdadeiro, protoalcalóide e pseudoalcalóide.



Fonte: elaborado pelo autor.

Por fim, os alcalóides podem ser classificados quanto à sua bioatividade. Alguns alcalóides são compostos bioativos encontrados de diversos medicamentos, além de estarem associados a plantas medicinais popularmente conhecidas ao longo da história. O opióide morfina, isolado primeiramente da papoula, é indiretamente utilizado desde a Antiguidade para o tratamento de dores. Já a vimblastina e a vincristina, extraídas da *Catharanthus roseus*, e a camptotecina, proveniente de *Camptotheca acuminata*, são usadas comercialmente no combate ao câncer (MORAES, 2016). As estruturas químicas de alguns alcalóides conhecidos por suas propriedades bioativas podem ser vistas na Figura 13.

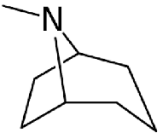
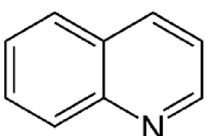
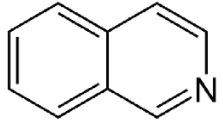
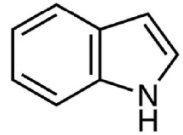
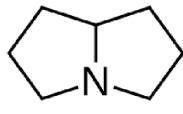
Figura 13 - Estrutura química de alguns alcalóides bioativos utilizados na medicina.



Fonte: elaborado pelo autor.

Por fim, dentre os alcalóides verdadeiros, também existe uma subclassificação de acordo com o seu núcleo estrutural em quinolínicos, isoquinolínicos, tropânicos, indólicos e pirrolizidínicos (HENRIQUES et al., 2010; FATTORUSSO; TAGLIALATELA-SCAFATI, 2007), conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação dos alcalóides verdadeiros quanto ao núcleo estrutural.

Classe de Alcalóide	Principais representantes	Núcleo
Alcalóides Tropânicos	Atropina Cocaína Beladona	
Alcalóides Quinolínicos	Quinidina Quinina Camptotecina	
Alcalóides Isoquinolínicos	Berberina Codeína Morfina	
Alcalóides Indólicos	Vincristina Reserpina Estricnina	
Alcalóides Pirrolizidínicos	Retronecina Licopsamina Senecionina	

Fonte: Adaptado de Paiva (2019).

3.3.2 Alcalóides da família Amaryllidaceae

O Estudo de alcalóides da família Amaryllidaceae data do ano de 1887, quando a licorina foi isolada pela primeira vez a partir da *Lycoris radiata* (COLE, 2018). Desde então, novos compostos químicos presentes em plantas dessa família têm sido descobertos. Entre os anos de 2015 a 2020, 91 novas estruturas de alcalóides da família Amaryllidaceae foram publicadas na literatura, desse modo ultrapassando as 650 substâncias catalogadas (KA et al., 2020). Os alcalóides de Amaryllidaceae são isoquinolínicos e geralmente não são encontrados em outras famílias de plantas, o que os torna praticamente exclusivos (ANDRADE et al., 2012).

Os alcalóides dessa família podem ser classificados em tipos de acordo com a sua estrutura e sua origem biossintética. Os principais tipos descritos na literatura são: norbeladina, galantamina, licorina, homolicorina, crinina, haemantamina, pretazetina e montanina (KA *et al.*, 2020; ANDRADE *et al.*, 2012). Mas outros tipos foram reportados em trabalhos diversos como os tipos cripovelina, plicamina, tazetina, gracilina, gracilamina e pancracina (BERKOV, 2020; JIN, 2009). Alguns tipos de alcalóides como plicamina e secoplicamina são encontrados exclusivamente em único gênero (*Zephyranthes*) (BERKOV, 2020). A classificação dos tipos de alcalóides mais comuns da família Amaryllidaceae junto de sua estrutura básica e um apanhado dos seus principais integrantes pode ser visto na Tabela 2.

A biossíntese dos diversos AAs envolve uma sequência complexa de reações bioquímicas de oxidação, redução, hidroxialquilação, metilação, acoplamento fenol-fenol e a formação de pontes de óxido. Experimentos de radiomarcagem demonstraram que todos eles compartilham uma via bioquímica comum: a norbeladina é gerada a partir dos aminoácidos L-fenilalanina (L-Phe) e L-tirosina (L-Tyr), que subsequentemente é O-metilada e então sofre ciclização dos tipos orto-para, para-para e para-orto dando origem a diversidade de esqueletos carbônicos encontrados na família (KA *et al.*, 2020; COLE, 2018; KILGORE; KUTCHAN, 2015 ANDRADE *et al.*, 2012). A rota biossintética dos principais esqueletos de AAs encontra-se ilustrada na Figura 14.

Tabela 2 - Principais tipos de Alcalóides de Amaryllidaceae.

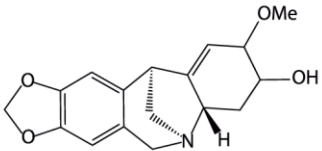
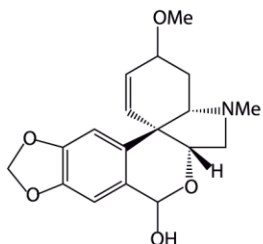
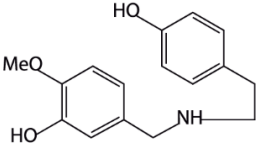
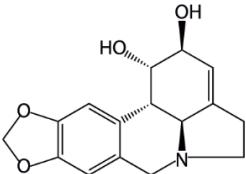
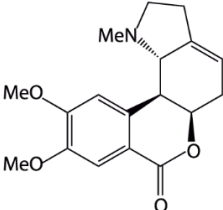
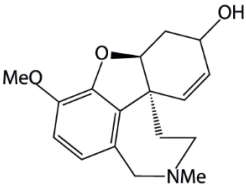
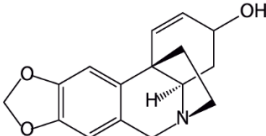
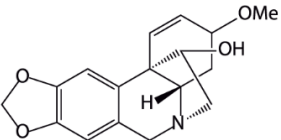
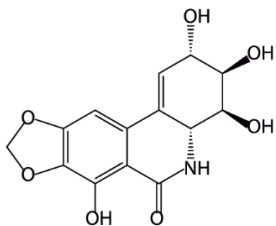
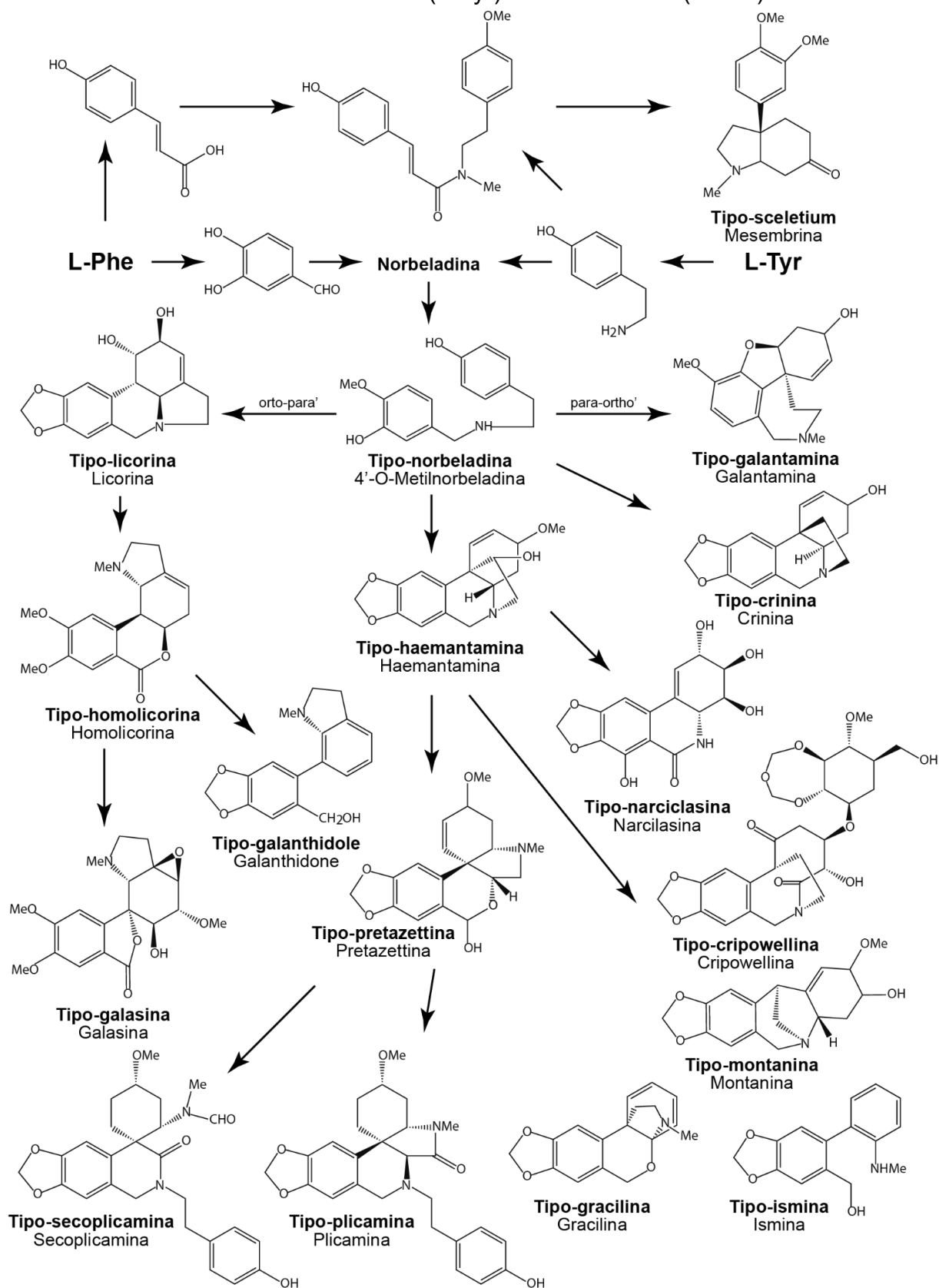
Grupo de Alcalóides	Alguns Integrantes	Esqueleto Representante
Tipo-Montanina	Nangustina Pancratinina C Mantidina	
Tipo-Pretazetina	Tazetina Criwelina Precriwelina	

Tabela 2 - Continuação.

Grupo de Alcalóides	Alguns Integrantes	Esqueleto Representante
Tipo-Norbeladina	Norbeladina 4'-O-Metilnorbeladina Beladina	
Tipo-Licorina	Anidrolicorina Pratosina Assoanina	
Tipo-Homolicorina	Nerinina Hippeastrina Hippapilina	
Tipo-Galantamina	Licoramina Sanguinina Norlicoramina	
Tipo-Crinina	Hippeastidina Undulatina Bufanidrina	
Tipo-Haemantamina	Vitatina Narcidina Maritidina	
Tipo-Narciclasina	Trisfaeredina Crinasiatina Narciprimina	

Fonte: Elaborado pelo autor com base em Paiva (2019).

Figura 14 - Rota biossintética dos Alcalóides de Amaryllidaceae a partir dos aminoácidos L-tirosina (L-Tyr) e L-fenilalanina (L-Phe).



Fonte: Adaptado de Berkov *et al.*, 2020.

3.4 Atividade ansiolítica em fitoquímicos

3.4.1 Visão geral

A ansiedade é a antecipação de uma preocupação futura e, em si, é uma adaptação evolutiva essencial para a sobrevivência dos indivíduos (BATESON; BRILOT; NETTLE, 2011). Mas quando ela é exacerbada se torna um termo guarda-chuva associado a diversas condições médicas reconhecidas como o estresse pós-traumático, a fobia social, fobias específicas, a síndrome do pânico e o transtorno de ansiedade generalizada. Os principais sintomas associados à ansiedade na literatura médica são medo, tensão, apreensão e irritabilidade, mas também sintomas psicossomáticos como dor no peito, taquicardia, ofegância, sudorese, tontura, tremores, insônia, dores de cabeça e de barriga e diarreia podem ser observados, em maior ou menor escala (ZHENG *et al.*, 2019).

A ansiedade está entre as desordens mentais mais comuns (BARBIERI *et al.*, 2021) e que mais crescem no mundo, tendo alcançado a prevalência global recorde de 4802,4 casos por 100.000 habitantes em 2020 (SANTOMAURO *et al.*, 2021), em decorrência da pandemia da COVID-19, sendo os indivíduos do sexo feminino e os mais jovens os principais afetados (GRENIER *et al.*, 2018; FLINT *et al.*, 2010). No Brasil, estima-se que 9,3% da população sofre de transtorno de ansiedade, a maior prevalência entre os países analisados à época (COSTA *et al.*, 2019). Esse dado é preocupante, uma vez que certos transtornos podem ter um impacto significativo na qualidade de vida dos indivíduos afetados (RAPAPORT *et al.*, 2005), além de estarem frequentemente associados a outras doenças e transtornos psiquiátricos (HORN; WUYEK, 2010; WASOWSKI; MARDER, 2011).

As evidências atuais sugerem que a etiologia dos transtornos de ansiedade se deve a combinação de fatores psicossociais tais como estresse, incidentes traumáticos e adversidades, e fatores genéticos que se manifestam em uma desregulação neuropsicológica (BANDELOW; MICHAELIS; WEDEKIND, 2017; GROSS; HEN, 2004). Dessa forma o tratamento da ansiedade pode ser feito tanto através da terapia cognitivo-comportamental (TCC) como através do uso de fármacos diversos (FARZAEI *et al.*, 2016). Também é sugerido um forte envolvimento de regiões como o hipocampo, a amígdala, o septo, o córtex pré-frontal (PFC) e núcleo accumbens (NAc) no desenvolvimento da ansiedade (ZARRINDAST; KHAKPAI, 2015).

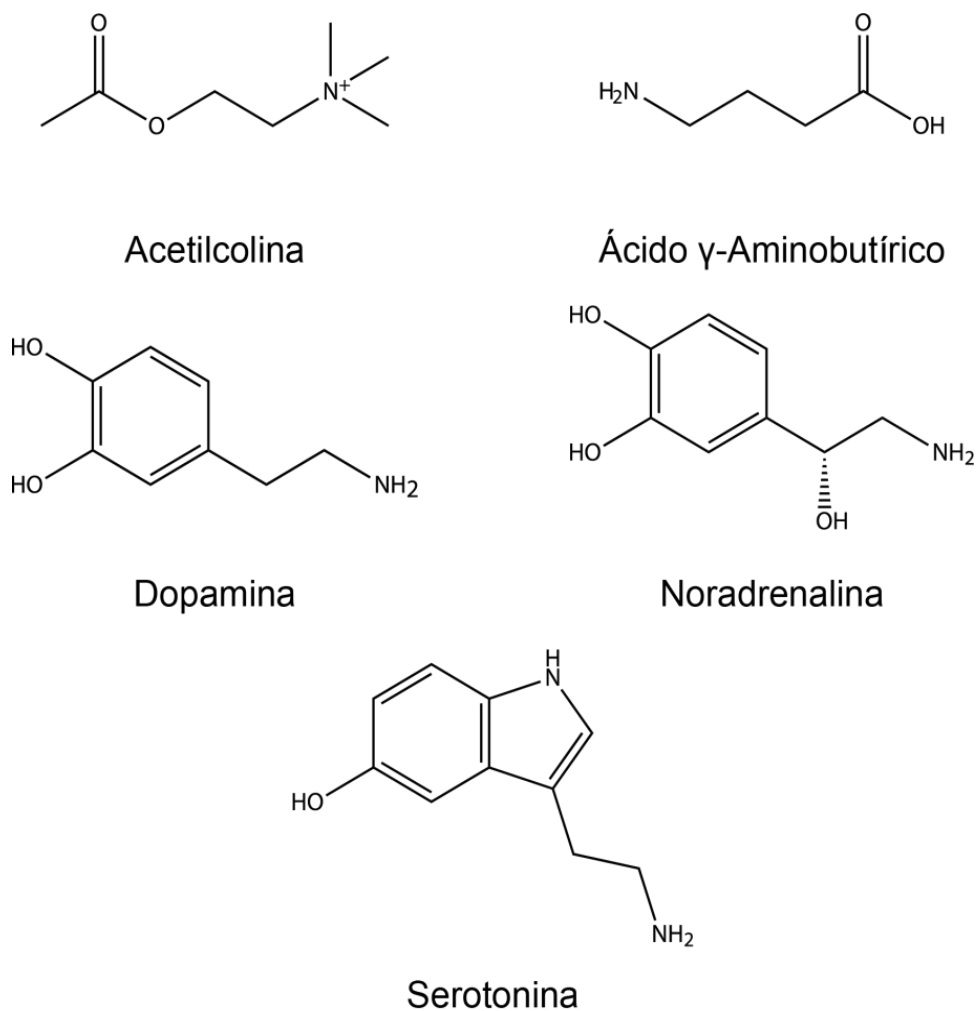
Nas últimas décadas, os benzodiazepínicos (BDZs) e antidepressivos tricíclicos (TCAs) têm estado entre as classes de fármacos mais utilizadas para o tratamento da ansiedade (OFFIDANI *et al.*, 2013), porém existe um grande interesse no desenvolvimento de novos medicamentos com atividade ansiolítica, uma vez que o uso de BDZs possui efeitos colaterais indesejados como dependência, diminuição da atividade psicomotora e prejuízo da memória (CROWE; STRANKS, 2017), enquanto a overdose de TCAs pode levar a morte (KERR, 2001). Nesse sentido, estudos envolvendo a observação e atividade ansiolítica de fitofármacos e substâncias semi-sintéticas, bem como a discussão dos seus mecanismos de ação ganharam relevância (FAJEMIROYE *et al.*, 2016; GELFUSO *et al.*, 2014).

Os mais diversos tipos de substâncias presentes em plantas podem apresentar atividade ansiolítica, sendo as principais classes químicas os flavonóides, terpenóides e alcalóides (PHOOTHHA *et al.*, 2022; FARZAEI *et al.*, 2016). Os estudos pré-clínicos de atividade ansiolítica de fitoquímicos geralmente são conduzidos através da aplicação de extratos vegetais em cobaias em modelos comportamentais de análise ou modelos animais de doença (TREIT; ENGIN; MCEOWN, 2009). Modelos animais de doença levam em conta o conhecimento biológico prévio sobre uma determinada espécie e sua analogia biológica com o ser humano, bem como outros fatores, para elaborar ensaios que tem como finalidade avaliar alguma atividade biológica (KUMAR; BHAT; KUMAR, 2013). Na área da farmacologia comportamental, estão entre os principais modelos biológicos utilizados para a avaliação da ansiedade o labirinto elevado em cruz (EMP) e o aparato claro-escuro (LDB), dentre outros (HOGG, 1996; BRITO, 2011).

Sob o ponto de vista neuroquímico essas substâncias podem atuar por vias diferentes, a depender dos neurotransmissores nos quais interferem, como os sistemas colinérgico, GABAérgico e monoaminérgicos (serotonina, dopamina e noradrenalina) (PHOOTHHA *et al.*, 2022; FARZAEI *et al.*, 2016). Muitos estudos que investigam a atividade ansiolítica de novas substâncias utilizam agonistas ou antagonistas conhecidos de determinados receptores químicos de neurotransmissores visando determinar a via de atuação das substâncias estudadas. A grande maioria dos fitofármacos ansiolíticos relatados na literatura atuam sobre o mecanismo GABAérgico, mas algumas substâncias podem atuar por mais de uma via de ação (PHOOTHHA *et al.*, 2022). É sabido que os alcalóides podem promover a modulação neuronal através de mecanismos de ação diversos tais como os canais

de Na^+ , enzimas (acetilcolinesterase), além de vários tipos de receptores tais como de acetilcolina, noradrenalina, dopamina, serotonina e GABA (Figura 15) (FATTORUSSO; TAGLIALATELA-SCAFATI, 2007).

Figura 15 - Estrutura química dos principais neurotransmissores capazes de modular o comportamento semelhante à ansiedade.



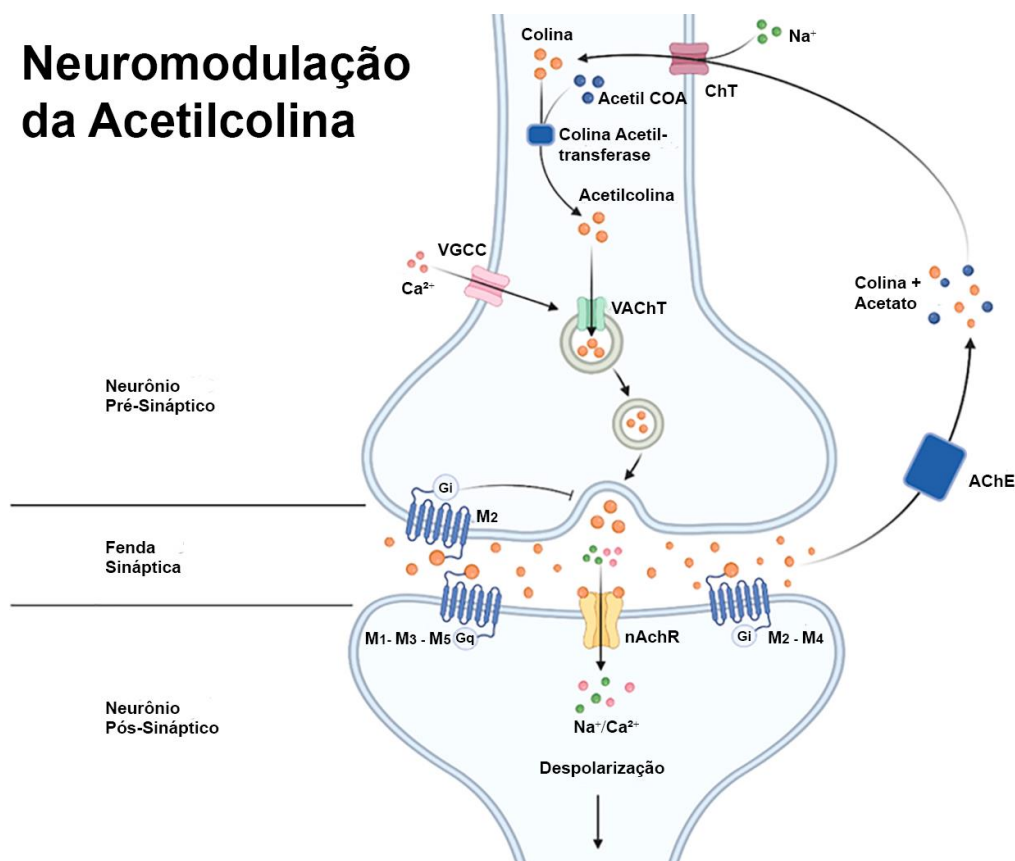
Fonte: elaborado pelo autor.

3.4.2 Sistema colinérgico

A acetilcolina é um neurotransmissor responsável pela comunicação entre as células nervosas e células motoras, exibindo também uma forte atuação em regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) relacionadas à ansiedade e à depressão: a amígdala e o hipocampo (MEI *et al.*, 2020; MINEUR *et al.*, 2018). A neuromodulação da acetilcolina no SNC pode ser vista na Figura 16.

Figura 16 - Síntese do mecanismo de neuromodulação do sistema colinérgico.

Neuromodulação da Acetilcolina



Fonte: Adaptado de Phootha *et al.*, 2022.

Existem dois tipos de receptores que se ligam à acetilcolina, os nicotínicos e os muscarínicos. Os primeiros são ionotrópicos, isto é, receptores de ação rápida que permitem a passagem direta de íons através da membrana dos neurônios. Já os muscarínicos são metabotrópicos, receptores de atuação mais lenta que dependem de reações metabólicas para indiretamente promover a abertura dos canais iônicos (HAMPEL *et al.*, 2018).

Durante a sinapse química a acetilcolina pode ser liberada a partir do terminal pré-sináptico de um neurônio e se ligar aos receptores colinérgicos do terminal pós-sináptico de outro neurônio causando um fluxo de íons positivos, especialmente Ca^{2+} , para dentro da membrana, promovendo a sua despolarização (KNOX, 2016). A presença de uma quantidade adequada de acetilcolina pode favorecer a cognição e a memória, entretanto o excesso desse neurotransmissor pode levar ao desenvolvimento de distúrbios emocionais e à ansiedade (PICCIOTTO *et al.*, 2015).

Nesse sentido, substâncias que conseguem se ligar aos receptores nicotínicos e muscarínicos, conhecidas como anticolinérgicos, competem com a acetilcolina e podem apresentar efeito ansiolítico. Já os anticolinesterásicos, substâncias que bloqueiam a atuação da enzima acetilcolinesterase, responsável pela hidrólise de acetilcolina, são usados quando há uma intenção de aumentar os níveis do neurotransmissor e podem possuir efeito ansiogênico (MEI *et al.*, 2020; MINEUR *et al.*, 2018; PICCIOTTO *et al.*, 2015).

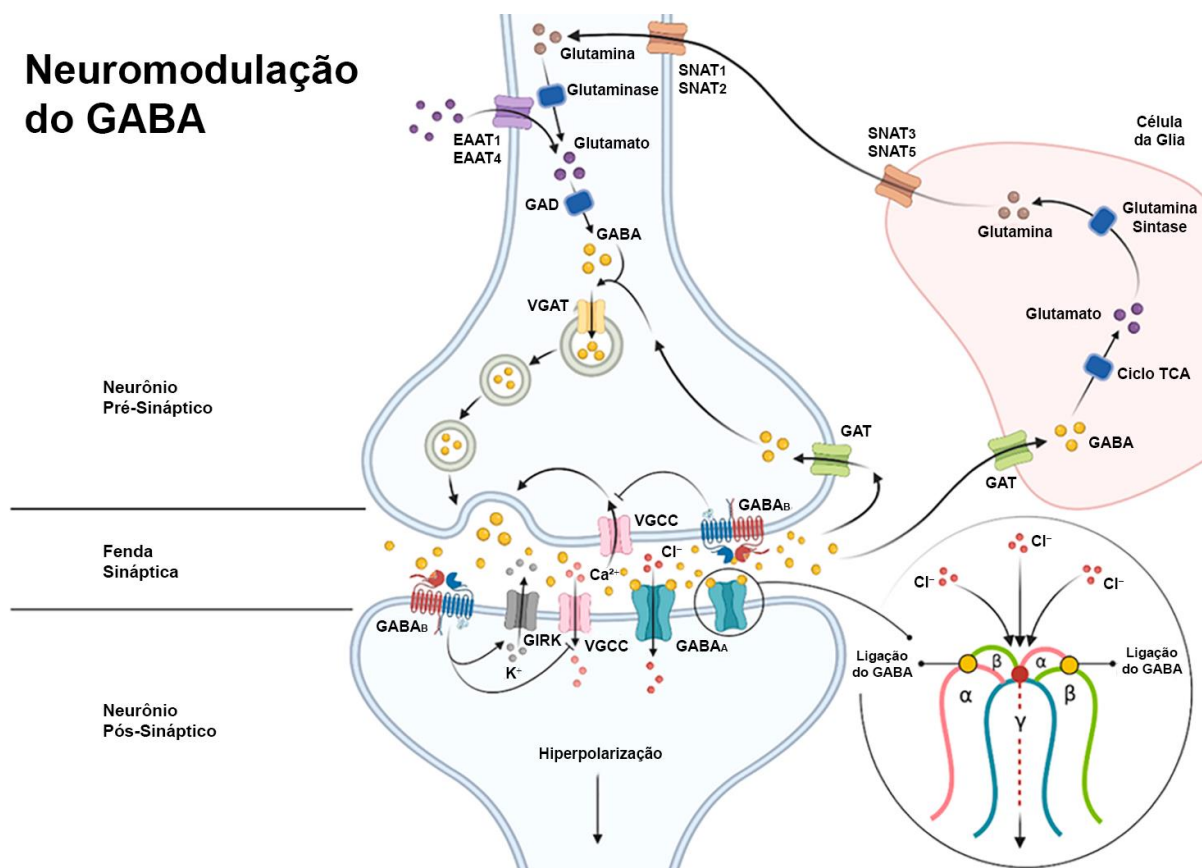
3.4.3 Sistema GABAérgico

O ácido gama-aminobutírico, conhecido pela sigla em inglês GABA (gamma-aminobutyric acid), é um neurotransmissor envolvido no processo de excitação/inibição dos neurônios e na regulação do tônus muscular (MIZUTA *et al.*, 2008; BOWERY, 2010), sendo o principal neurotransmissor inibidor presente no SNC de mamíferos, atuando em oposição ao glutamato (WU; SUN, 2014; LEE; LEE; LEE, 2019) por intermédio de três classes de receptores químicos. Os receptores do tipo GABA_A e GABA_C são ionotrópicos, enquanto os receptores do tipo GABA_B são metabotrópicos (WU; SUN, 2014; SIGEL; STEINMANN, 2012).

A síntese do GABA é feita a partir do neurotransmissor excitatório glutamato através da enzima glutamato descarboxilase (KAUFMAN; HOUSER; TOBIN, 1991). Durante a sinapse química, o GABA é transportado até a fenda sináptica, onde pode se ligar às subunidades α ou β dos receptores de GABA_A, permitindo a abertura dos canais iônicos para a passagem do íon Cl^- e consequentemente promovendo a hiperpolarização neuronal, de caráter inibidor (KARIM *et al.*, 2021; HANRAHAN; CHEBIB; JOHNSTON, 2011; JOHNSTON *et al.*, 2006).

Alternativamente, o GABA pode se ligar a um receptor do tipo GABA_B, que é responsável, através do intermédio de uma proteína G acoplada, por alargar os canais de potássio retificadores de influxo (GIRK) e por estreitar os canais de cálcio dependentes da voltagem (VGCC), favorecendo a saída do íon K^+ e dificultando a entrada de Ca^{2+} , suprimindo assim o processo de despolarização (excitação) da membrana (FELICE; CRYAN; O'LEARY, 2020). Ao fim desse mecanismo o GABA passa pelos processos de renovação, recaptção ao nervo pré-sináptico e degradação, através da enzima GABA-transaminase (GABA-T), em glutamato nas células gliais (KEROS; HABLITZ, 2005). Esses processos podem ser vistos na Figura 17.

Figura 17 - Síntese do mecanismo de neuromodulação do sistema GABAérgico.



Fonte: Adaptado de Phootha *et al.*, 2022.

A manutenção de um equilíbrio entre os processos de excitação e inibição dificulta a hiperexcitabilidade neuronal, no entanto uma desregulação das substâncias envolvidas no sistema GABAérgico pode levar a distúrbios emocionais e cognitivos e à ansiedade patológica (KALUEFF; NUTT, 2007; LYDIARD, 2003). Há diversos mecanismos pelos quais o sistema GABAérgico pode ser regulado. Substâncias com alta afinidade com os receptores tipo GABA_A podem ser utilizadas para promover a abertura dos canais iônicos desse receptor, aumentando o influxo de íon cloreto (Cl⁻) e alcançando efeito ansiolítico. Esse é o princípio de ação dos benzodiazepínicos comerciais (HOOD *et al.*, 2014). De outra maneira, substâncias capazes de estreitar os canais de cálcio dependentes da voltagem (VGCC) suprimem a excitação neuronal, diminuindo a ansiedade (ZAMPONI *et al.*, 2020). Por fim, bloqueadores da enzima GABA-T retardam o processo de degradação do GABA em glutamato, aumentando a sua disponibilidade na fenda sináptica e consequentemente seu potencial de inibição natural (KEROS; HABLITZ, 2005). O

sistema GABAérgico é a principal via de ação de fitoterápicos ansiolíticos (PHOOTHAN *et al.*, 2022; FARZAEI *et al.*, 2016).

3.4.4 Sistema serotoninérgico

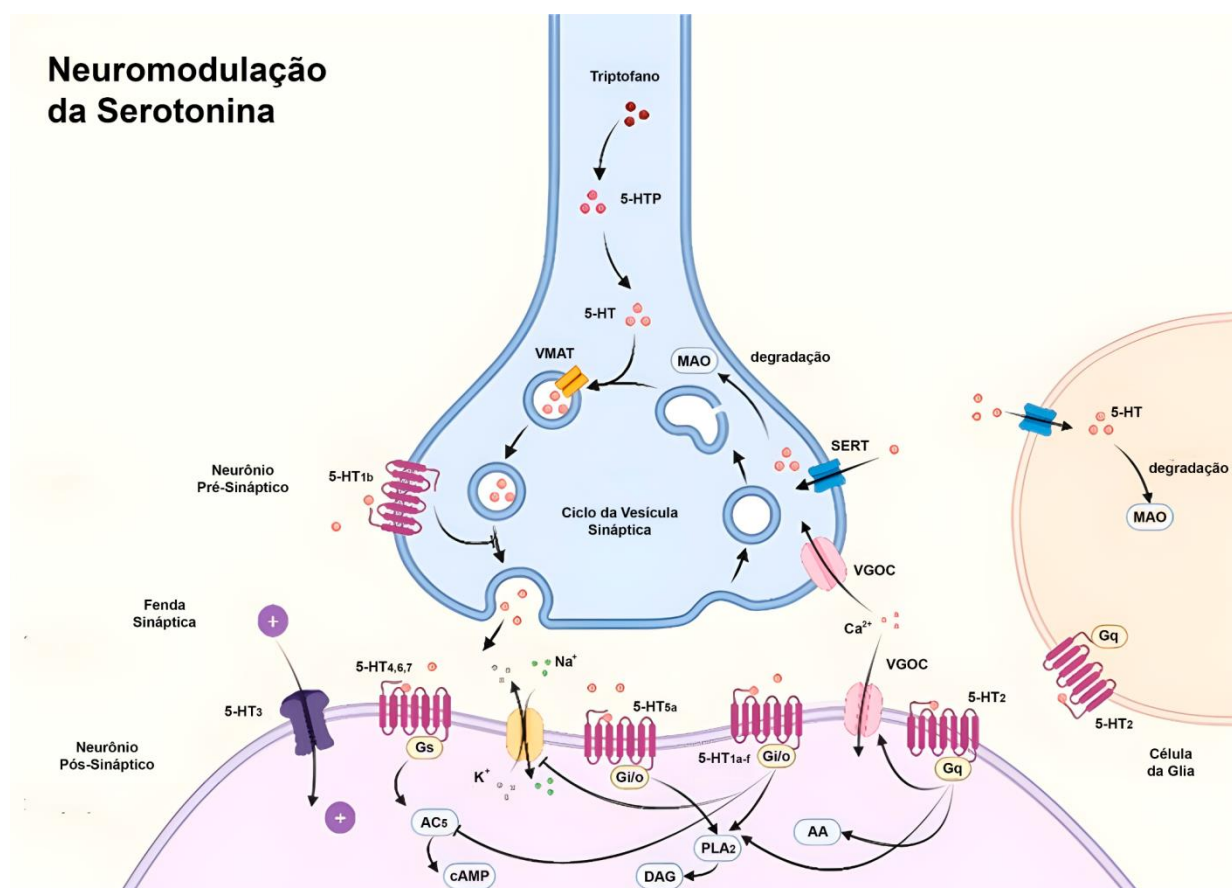
Os sistemas monoaminérgicos compreendem os mecanismos de ação de neurotransmissores monoaminérgicos com influência no desenvolvimento da ansiedade, ou seja, os sistemas de atuação da serotonina, dopamina e noradrenalina, sendo o sistema serotoninérgico o mais influente (GORDON; HEN, 2004; BARNES; SHARP, 1999; TALALAENKO *et al.*, 1994).

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é uma monoamina que age como neurotransmissor no SNC. Ela é sintetizada principalmente nos núcleos dorsal e mediano da rafe e possui um papel diverso na excitação e inibição dos neurônios através da sua interação com os diferentes tipos de receptores aos quais pode se ligar (PYTLIAK *et al.*, 2014; BARNES; SHARP, 1999). Existem 7 classes de receptores de serotonina nomeados 5-HT₁₋₇. Os receptores 5-HT₃ são os únicos ionotrópicos, possuindo resposta rápida na abertura de canais iônicos de influxo positivo (excitação). Já os demais são metabotrópicos, atuando de forma acoplada a proteínas G. Os receptores 5-HT₂₋₄ e 5-HT₆₋₇ promovem a excitação neuronal ao permitirem a entrada de íons Ca²⁺ e Na⁺ na membrana, enquanto os receptores 5-HT₁ e 5-HT₅ são responsáveis pelo estreitamento de canais ionotrópicos promovendo inibição neuronal (PYTLIAK *et al.*, 2014; HANNON; HOYER, 2008; BARNES; SHARP, 1999).

É sabido que uma desregulação do sistema serotoninérgico pode estar relacionada à patogênese de doenças neuropsiquiátricas, como estresse crônico, ansiedade, depressão, transtorno bipolar e distúrbios do sono (OHNO, 2010). Nesse sentido, a atuação dos receptores de 5-HT pode ser vista como uma chave para compreender o surgimento e o tratamento da ansiedade. A aplicação intra-amígdala de agonistas de serotonina demonstrou propriedades ansiolíticas em modelo de doença animal (EPM) (OHNO, 2010). Foi proposto que uso de agonistas dos receptores 5-HT_{1A} pode atuar no alargamento dos canais de potássio retificadores de influxo (GIRK) regulados pela proteína G, favorecendo o efluxo de íons K⁺ e resultando hiperpolarização do neurônio pós-sináptico e, conseqüentemente, em efeito ansiolítico (OHNO, 2010; AKIMOVA; LANZENBERGER; KASPER, 2009; HANNON; HOYER, 2008). De maneira oposta o uso de antagonistas dos receptores

5-HT₂ e 5-HT₃ também pode levar a uma redução da ansiedade. No primeiro caso, a estimulação dos subtipos de receptores 5-HT₂ leva ao acúmulo de Ca²⁺ intracelular como consequência do acoplamento com a fosfolipase C no tecido cerebral por meio do acoplamento da proteína G (BARNES; SHARP, 1999). Já os receptores 5-HT₃ permitem o influxo de Ca²⁺ e Na⁺ e efluxo de K⁺, levando à despolarização rápida no SNC (HANNON; HOYER, 2008). A supressão de ambos os mecanismos desfavorece a hiperativação neuronal. Por fim, inibidores seletivos da recaptação de serotonina (SSRIs) podem ser utilizados para aumentar a concentração extracelular de 5-HT alcançando efeitos ansiolíticos (MURPHY, 2010). A regulação do sistema serotoninérgico (Figura 18) é um dos principais mecanismos de ação utilizados por antidepressivos atualmente.

Figura 18 - Síntese do mecanismo de neuromodulação do sistema serotoninérgico.



Fonte: Adaptado de Phootha *et al.*, 2022.

3.4.5 Alcalóides ansiolíticos

A literatura aponta os alcalóides como uma das principais classes de substâncias de origem vegetal a apresentarem algum grau de atividade ansiolítica. Costa-Campos *et al.* (2004) observou efeito ansiolítico na aplicação do antipsicótico alstonina, isolado de plantas da família Apocynaceae (ELISABETSKY; COSTA-CAMPOS, 2006), em ratos utilizando os modelos aparato claro-escuro (LDB, do inglês *light dark box*) e o *hole board test* (HBT). No mesmo estudo, foi observado que o pré-tratamento das cobaias com ritanserina, um conhecido antagonista de receptores do tipo 5-HT₂, coibiu a redução da ansiedade, sugerindo o envolvimento do sistema serotoninérgico.

Já Felipe *et al.* (2007) investigou através do modelo labirinto em cruz elevado (EPM, do inglês *elevated plus maze*) o efeito ansiolítico da piplartina, substância extraída de raízes de *Piper tuberculatum* (Piperaceae). Foi observado que doses de 50 e 100 mg/kg i.p. do alcalóide obtiveram efeito semelhante ao benzodiazepínico diazepam no aumento do número de entradas e no tempo de permanência das cobaias nos braços abertos do labirinto, efeito que foi revertido através da aplicação de flumazenil nos dois grupos, sugerindo que a atuação da piplartina se dê através do sistema GABAérgico. Utilizando a mesma metodologia, Rejón-Orantes *et al.* (2010) investigou os efeitos sobre a ansiedade do alcalóide annomontina, isolado a partir de *Annona purpúrea* (Annonaceae), e obteve resultados similares na aplicação intraperitoneal de 30 mg/kg. Novamente ficou subentendida a participação de receptores GABA_A no mecanismo de ação.

O alcalóide hipnótico dl-tetrahidropalmatina, extraído de espécies do gênero *Carydalis* (Papaveraceae), atua no controle da ansiedade através da depleção de dopamina (LIU; ALGERI; GARATTINI, 1982). Leung *et al.* (2003) ratificou através de EPM em ratos a atividade ansiolítica desse fitofármaco em baixa dosagem, além de observar a inibição de parte desse efeito através do pré-tratamento com flumazenil, sugerindo uma possível participação conjunta dos sistemas GABAérgico e dopaminérgico no mecanismo de ação da droga. A berberina, oriunda da família Berberidaceae, também possui atuação sobre o sistema dopaminérgico e foi capaz de aliviar sintomas de ansiedade em ratos com estresse pós-traumático (LEE *et al.*, 2018). Peng *et al.* (2004) observou a possibilidade de atuação ansiolítica também através dos receptores de serotonina.

A piperina é um alcalóide extraído de diversos tipos de pimentas (Piperaceae) e que possui atividade ansiolítica conhecida. Khom *et al.* (2013) demonstrou que a atuação da piperina na regulação da ansiedade se dá através da sua afinidade com as subunidades α e β dos receptores GABA_A, enquanto Gilhotra e Dhingra (2014) sugerem que, além de possuir envolvimento com o sistema GABAérgico, esse alcalóide também atuaria no sistema nitrérgico através da inibição de óxido nítrico sintases. Hazim *et al.* (2014) mostrou que a administração do alcalóide mitragina, isolado da espécie *Mitragyna speciosa* (Rubiaceae) nas concentrações 10, 20 e 40 mg/kg em ratos aumentou o tempo de exploração da região central no teste de campo aberto (OFM, do inglês Open Field Model) e nos braços laterais no modelo EPM, demonstrando que essa substância possui atividade ansiolítica. O pré-tratamento com as substâncias flumazenil, naloxona e sulpirida foi capaz de reverter o efeito anti-ansiedade da mitragina, o que indica que seu mecanismo de ação deve envolver ambos os sistemas GABAérgico e serotoninérgico.

Liu *et al.* (2012) investigou o potencial ansiolítico de quatro alcalóides isolados a partir de *Gelsemium elegans* Benth. (Gelsemiaceae) em camundongos. Através desse estudo foi possível determinar que a aplicação subcutânea de gelsemina, gelsevirina e koumina são capazes de combater a ansiedade das cobaias em EPM e LDB. O tratamento prévio com estriçnina - antagonista dos receptores de glicina - reduziu o efeito ansiolítico, indicando que a via de ação pode estar relacionada ao sistema colinérgico.

Han *et al.* (2009) e Ma *et al.* (2007) avaliaram os efeitos calmantes do alcalóide sanjoinina A, isolado de sementes de *Zizyphus jujuba* Mill var. spinosa (Rhamnaceae). Ambos os estudos observaram o envolvimento do sistema GABAérgico nas propriedades da substância, sendo que o segundo apresentou evidências da sua atividade ansiolítica se valendo dos modelos HBT, EPM e OFT. Both *et al.* (2005) observou atividade ansiolítica em camundongos através de HBT e LDB, obtendo resultados semelhantes ao diazepam. O tratamento prévio das cobaias com ritanserina e picrotoxina (antagonista do GABA) foi avaliado, porém somente a ritanserina foi capaz de reverter o efeito ansiolítico, indicando uma via de ação serotoninérgica. Já Serrano *et al.* (2011) descreveu os efeitos ansiolíticos do alcalóide erisotrina isolado a partir de *Erythrina suberosa* (Erythroxylaceae) nos modelos EPM e LDB em ratos. No entanto, Rosa *et al.* (2012) apenas observou indícios de efeito ansiolítico da aplicação de erisotrina extraída da espécie *Erythrina*

mulungu Mart. ex Benth. no teste de campo aberto (OFT), não conseguindo obter resultados significativos no LDB. Isso levou Rosa *et al.* (2012) a categorizar a erisotrina como um alcalóide com leve atividade ansiolítica. O mecanismo de ação da substância não foi definido.

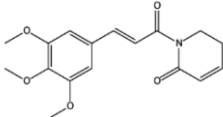
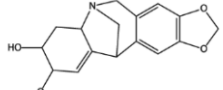
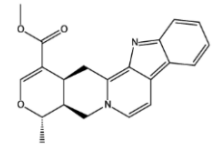
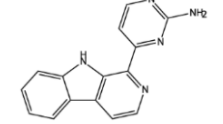
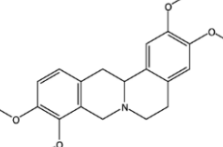
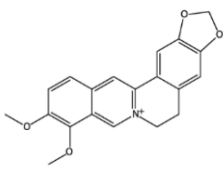
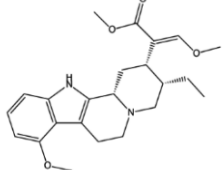
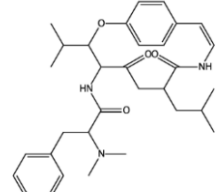
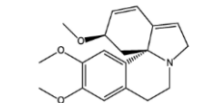
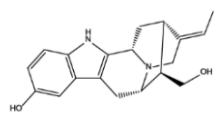
Sousa *et al.* (2023) reportou a atividade ansiolítica de um grupo de sete alcalóides indólicos extraídos de *Rauvolfia ligustrina*, dentre eles a sarpagina. A bioatividade foi avaliada através de LDB com peixes *zebrafish*, no qual foi constatado um incremento no tempo de permanência na zona clara do aquário nos peixes. No mesmo estudo, o mecanismo de ação dos alcalóides foi testado através do pré-tratamento com FMZ e PZT e desse modo foi possível inferir que o efeito ansiolítico provavelmente se deve a interação entre as diversas substâncias analisadas e os sistemas GABAérgico e serotoninérgico. Ademais foram feitos testes de docagem molecular visando estabelecer quais substâncias possuem mais afinidade com cada neurotransmissor e assim ficou demonstrado que a sarpagina demonstrou uma afinidade ao GABA superior à do próprio DZP.

A montanina é a representante dos alcalóides de Amaryllidaceae dentre os alcalóides ansiolíticos. Extraída de espécies dos gêneros *Haemanthus* (MASI *et al.*, 2019) e *Hippeastrum* (SILVA *et al.*, 2008), além de *Rhodophiala bifida* (FARINON *et al.*, 2017) e *Scadoxus multiflorus* (CAHLÍKOVÁ *et al.*, 2021), a montanina tem sido amplamente estudada quanto a diversas propriedades farmacológicas como atividades ansiolítica, anticonvulsivante, antidepressiva, anticolinesterásica, antitumoral, antirreumática, antibacteriana e antifúngica (KOUTOVÁ *et al.*, 2020).

Da Silva *et al.* (2006) investigou a atividade ansiolítica da montanina através do uso de camundongos no modelo do labirinto elevado em cruz e do teste de campo aberto. A aplicação intraperitoneal da montanina 60 mg/kg resultou na redução do número de passagens no OFT, enquanto a aplicação de 1,0 e 3,0 mg/kg i.p. foi capaz de aumentar de forma semelhante ao diazepam a quantidade de entradas e o tempo de permanência nos braços laterais no EPM. O estudo sugere que o efeito se deve à atuação do alcalóide sobre o sistema GABAérgico.

Um apanhado das informações de origem vegetal, mecanismo de ação e estrutura química dos alcalóides reportados na literatura como ansiolíticos pode ser consultado na Tabela 3.

Tabela 3 - Alcalóides ansiolíticos: origem vegetal, mecanismos de ação e estruturas químicas.

Alcalóide	Origem Vegetal	Mecanismo de Ação	Estrutura Química
Piplartina	<i>Piper tuberculatum</i>	GABA	
Montanina	<i>Haemanthus spp.</i> <i>Hippeastrum spp.</i> <i>Rhodophiala bifida</i> <i>Scadoxus multiflorus</i>	GABA	
Alstonina	<i>Alstonia boonei</i> <i>Catharanthus roseus</i> <i>Rauwolfia caffra</i>	Serotonina	
Annomontina	<i>Annona purpurea</i>	GABA	
dl-Tetrahidropalmatina	<i>Carydalis spp.</i>	Dopamina	
Berberina	<i>Berberis vulgaris</i> <i>Mahonia aquifolium</i> <i>Hydrastis canadensis</i> <i>Tinospora cordifolia</i>	Dopamina Serotonina	
Mitraginina	<i>Mitragyna speciosa</i>	GABA Serotonina	
Sanjoinina A	<i>Zizyphi jujuba</i>	Serotonina	
Erisotrina	<i>Erythrina suberosa</i> <i>Erythrina mulungu</i> Mart.	Desconhecido	
Sarpagina	<i>Rauwolfia ligustrina</i>	GABA	

Fonte: Elaborado pelo autor.

4 JUSTIFICATIVA

Griffinia gardneriana, *Griffinia nocturna* e *Griffinia liboniana* são espécies de Amaryllidaceae nativas do Brasil. *G. gardneriana* e *G. nocturna* são conhecidas por produzirem alcalóides anticolinesterásicos como a galantamina e a sanguinina (PAIVA, 2019; COLE, 2018; VIEGAS JUNIOR *et al.*, 2004), enquanto *G. liboniana* não possui nenhum estudo prévio relatando o seu perfil alcaloídico.

A ansiedade é um dos transtornos neuropsiquiátricos mais prevalentes na população e o que mais cresceu em decorrência da pandemia de Covid-19 (BARBIERI *et al.*, 2021). Estima-se que mais de 380 milhões de pessoas convivam com algum transtorno relacionado à ansiedade em todo o mundo (SANTOMAURO *et al.*, 2021). O tratamento da ansiedade pode ser feito tanto através da terapia cognitivo-comportamental (TCC) como através do uso de fármacos diversos (FARZAEI *et al.*, 2016).

Nas últimas décadas, os benzodiazepínicos (BDZs) e antidepressivos tricíclicos (TCAs) têm estado entre as classes de fármacos mais utilizadas para o tratamento da ansiedade (OFFIDANI *et al.*, 2013), porém existe um grande interesse no desenvolvimento de novos medicamentos com atividade ansiolítica, uma vez que ambas as classes apresentam efeitos adversos indesejados (CROWE; STRANKS, 2017).

Nesse sentido, diversas substâncias provenientes de produtos naturais foram validadas em testes com humanos e/ou modelos animais como boas alternativas no controle dos transtornos de ansiedade, tais como extratos de *Valeriana officinalis* (Valerimed®) (POOTHA *et al.*, 2022) e substâncias de classes químicas diversas como o flavonoide quercetina, o terpeno canabidiol e o alcalóide sanjoinina A (FARZAEI *et al.*, 2016).

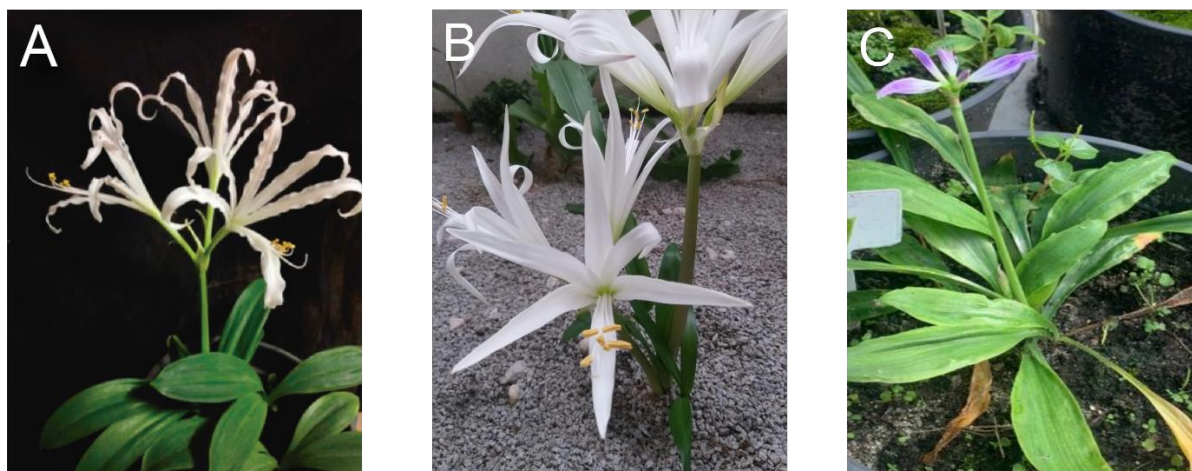
Portanto, os alcalóides de *Griffinia* podem ser uma opção terapêutica promissora. Por isso, desenvolvemos uma abordagem baseada em CG-EM associada a análise quimiométrica e docagem molecular em bulbos cultivados de *Griffinia* spp., utilizando o modelo animal de ansiedade do aparato claro/escuro em *zebrafish*.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Material vegetal

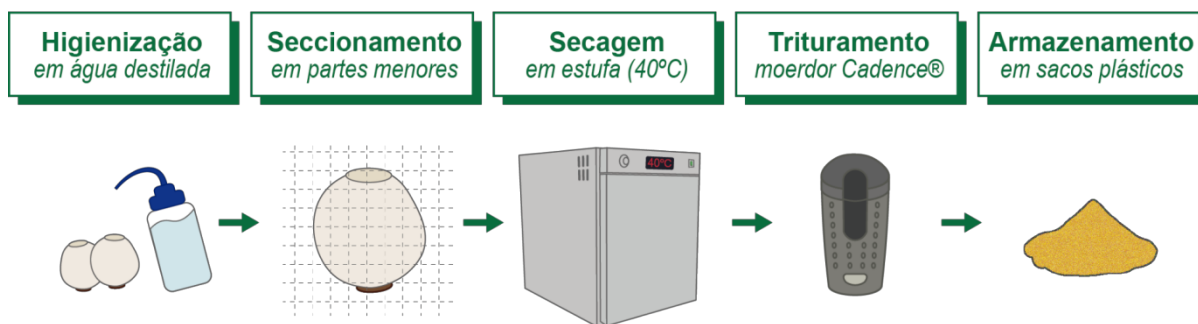
Inicialmente, os bulbos de *G. gardneriana*, *G. liboniana* e *G. nocturna* (Figura 19) foram adquiridos em floriculturas locais nos municípios de Cascavel (4.1312° S, 38.2470° W) e Massapê-CE (3.5263° S, 40.3421° W), em dezembro/2016, março/2019 e janeiro/2020, respectivamente. Os bulbos de *G. gardneriana* foram cultivados pela pesquisadora Dra. Rita de Cássia Alves Pereira, em casa de vegetação da Embrapa Agroindústria Tropical em Fortaleza-CE, no período de dezembro de 2016 a janeiro de 2018. Um espécime de *G. liboniana* e um de *G. gardneriana* foram depositados no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, onde foram identificados como *Griffinia liboniana* Morren sob o registro EAC 62370 e *Griffinia gardneriana* (Herb.) Ravenna sob o registro EAC 65330. Similarmente, uma exsicata de *G. nocturna* foi depositada no Herbário Prof. Francisco José de Abreu Matos da Universidade Estadual Vale do Acaraú, onde foi identificada como *Griffinia nocturna* Ravenna sob o registro HUVA 25777. Logo após as coletas, as plantas foram separadas em raízes, bulbos, folhas e flores (apenas para *G. gardneriana*). Então, os bulbos foram higienizados com água destilada, pesados, seccionados em partes menores e submetidos à secagem em estufa com circulação de ar forçado a 40°C por sete dias. Em seguida, os bulbos secos foram moídos em moinho de café comum (Cadence®, 150 W) e armazenados em sacos plásticos até o momento das extrações. Um esquema do método de preparo do material vegetal está indicado na Figura 20.

Figura 19 - Material vegetal. A) *G. nocturna*; B) *G. gardneriana*; C) *G. liboniana*.



Fonte: A) Antonio Campos Rocha; B) Ana Sheila Queiroz; C) O autor.

Figura 20 - Esquematisação do processo de preparação do material vegetal.

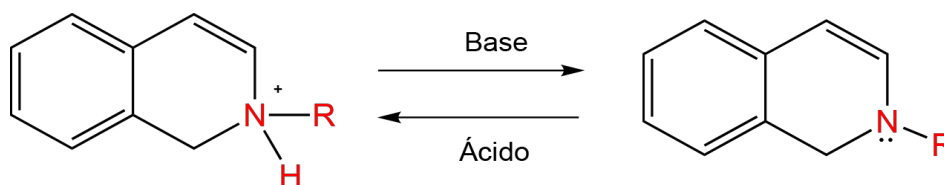


Fonte: elaborado pelo autor.

5.2 Extração de alcalóides

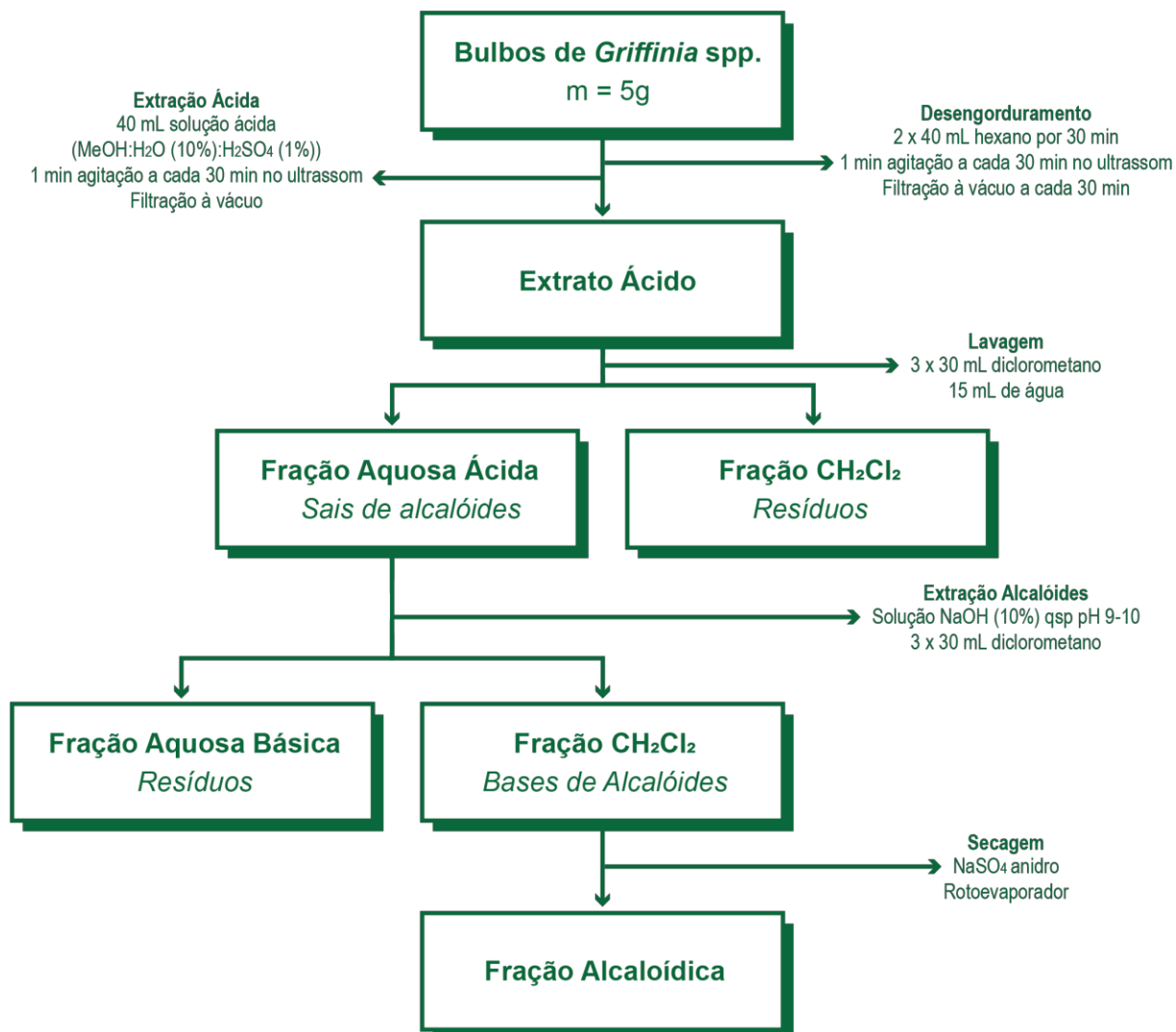
Os alcalóides foram extraídos utilizando metodologia clássica de partição líquido-líquido, adaptada por Souza *et al.* (2021), baseada no caráter básico da maioria dos alcalóides (Figura 21). Inicialmente, 5 g de bulbos foram desengordurados com hexano (40 mL) por 1 h em banho ultrassônico. Em seguida, após filtração a vácuo, o pó desengordurado foi submetido à maceração em banho ultrassônico por 2h com solução hidrometanólica ácida, composta por MeOH:H₂O:H₂SO₄ (89:10:1 v/v/v; pH 2; 40 mL) para extração dos alcalóides na forma de sais. Para a etapa de *clean-up*, o extrato ácido foi particionado em funil de separação com diclorometano em três lavagens sequenciais (3 x 30 mL) a fim de remover os interferentes. Adiante, a fração ácida foi alcalinizada com solução de hidróxido de sódio a 10% até pH 9-10. Finalmente, os alcalóides foram recuperados na forma de base livre com diclorometano (3 x 30 mL). O solvente foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotatório a 60 RPM e 40°C. As frações alcaloídicas foram armazenadas a -80° C até o momento das análises. Um fluxograma do processo de extração alcaloídica pode ser visto na Figura 22.

Figura 21 - Representação de um alcaloide isoquinolínico em sua forma salina e de base livre.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 22 - Fluxograma do processo de extração dos alcalóides de *Griffinia* spp.



Fonte: elaborado pelo autor.

5.3 Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

As frações alcaloídicas foram solubilizadas em uma mistura de acetonitrila:metanol (1:1, v/v, 1 mL) na concentração de 2 mg/mL e injetadas no CG-EM segundo metodologia descrita previamente por Souza *et al.* (2021).

As análises por CG-EM foram realizadas em um instrumento Agilent modelo GC-7890B/MSD-5977A (quadrupolo), com impacto de elétrons a 70 eV, coluna HP-5MS 5% fenil-metilpolissiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Agilent). Programação do forno cromatográfico: 1 min a 120°C, 120-210°C a 15 °C.min⁻¹, 210-260°C a 8°C.min⁻¹ e 260-300°C a 15 °C.min⁻¹, perfazendo 39 min de corrida. Temperatura do injetor 280 °C no modo *Splitless*. Gás carreador hélio com fluxo 1.00 mL.min⁻¹,

velocidade linear constante de 37,3 cm.s⁻¹ e volume de injeção de 1 µL. A faixa de massa foi de 40 - 600 m/z. Os dados foram adquiridos e processados através do software Agilent Masshunter B.07.01.

5.4 Análises estatística e quimiométrica

Os dados adquiridos por CG-EM (formato .D) foram convertidos para o formato *Analysis Base File (.abf)* usando o software *Abf Converter* (<http://www.reifycs.com/AbfConverter>) e, posteriormente, foram processados usando protocolo padrão para fluxo de trabalho de metabolômica do software MS-DIAL v. 4.70 (Tsugawa *et al.*, 2015), ajustando os seguintes parâmetros: faixa de massa *m/z* 40-600, tempo de análise 4-19 min, altura mínima do pico de 500 e tolerância de 0,075 - 0,5 min para alinhamento de pico. Os compostos foram identificados comparando-se a fragmentação espectral de massas de cada composto com espectros de referência padrão do banco de dados NIST (*NIST Mass Spectral Database, National Institute of Standardization and Technology, USA*) e com aqueles de ocorrência em Amaryllidaceae, bem como através da comparação dos seus índices de retenção (RI) 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. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média de três experimentos independentes no caso de *G. gardneriana* e cinco experimentos independentes no caso de *G. liboniana*, utilizando o Software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA.). O experimento para *G. nocturna* foi feito com uma única replicata biológica devido à indisponibilidade de material.

A matriz de dados foi carregada na plataforma Metaboanalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>), seguindo protocolo padrão descrito por Chong *et al.* (2019). Primeiramente, os dados foram normalizados pela soma, transformação logarítmica e escalonamento Pareto para se obter uma matriz com distribuição normal (Figura 6) e, adiante, aplicou-se a análise de variância unidirecional (ANOVA) para identificar compostos estatisticamente significativos entre as três espécies, ajustando o *p*-valor de acordo com FDR (*False Discovery Rate*) < 0,05 e teste post-hoc de Fisher's LSD (*Least Significant Difference*).

Os compostos estatisticamente significativos foram submetidos a análises quimiométricas não-supervisionadas de PCA (Análise de Componentes Principais) e

HCA-Heat map (Análise Hierárquica de Agrupamentos com Heat map) para detectar a presença de *outliers* e tendências de separação entre as espécies, baseadas na intensidade relativa dos compostos. Para construção do modelo de HCA-Heat map foram utilizados medida de distância Euclidiana e o algoritmo de agrupamento *Ward*.

5.5 Ensaios farmacológicos *in vivo*

Os experimentos farmacológicos foram realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN-S) da Universidade Estadual do Ceará, sob a supervisão do Prof. Hécio Silva dos Santos e da Profa. Jane Eire Silva Alencar de Menezes.

5.5.1 Fármacos e reagentes

Diazepam (DZP, Neo Química®), flumazenil (Fmz; Sandoz®), dimetilsulfóxido (3% DMSO; Dynamic®), cloridrato de granisetron (Corepharma/Middlesex, NJ, EUA), maleato de pizotifeno (Farmácia Central de Manipulação/São Paulo, SP, Brasil) e fluoxetina (Eli Lilly/Indianapolis, IN, EUA).

5.5.2 Acondicionamento dos animais

Os peixes zebra (*Danio rerio*) (idade de 90 a 120 dias; $0,4 \pm 0,1$ g, $3,5 \pm 0,5$ cm), silvestre, de ambos os sexos, foram adquiridos em loja local (Fortaleza, CE). Os animais foram mantidos em um aquário de vidro ($30 \times 15 \times 20$ cm) de 10 L ($n = 3$ / L), a uma temperatura de 25 ± 2 ° C, em ciclos claro-escuro de 24 h com água clorada (ProtecPlus®) e bomba de ar com filtros submersos, sob uma temperatura de 25 ° C e pH 7,0, Ciclo circadiano de 10 - 14 h (claro/escuro). Os peixes receberam ração (*Spirulina*®) ad libitum 24 h antes dos experimentos. Antes das aplicações dos medicamentos, os animais foram anestesiados em água gelada e após os experimentos, os animais foram sacrificados por imersão em água gelada ($2-4$ ° C) por 1 min até a perda dos movimentos operculares. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE; nº 04983945/2021), estando de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal.

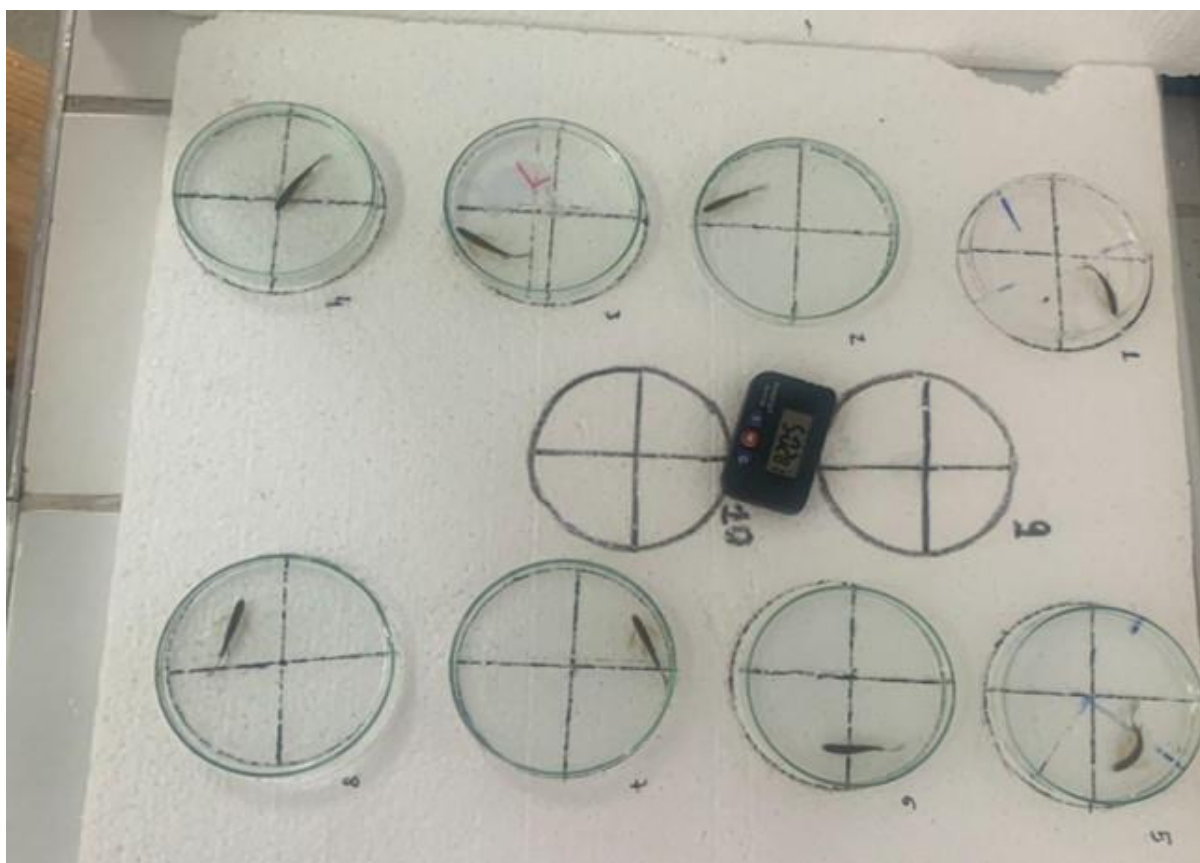
5.5.3 Protocolo inicial

Os animais de ambos os sexos foram selecionados aleatoriamente, anestesiados em água gelada, transferidos para uma esponja úmida, e em seguida tratados ($n = 6$ peixes/grupo) com 20 μ L de cada extrato nas doses de 40, 100 e 200 mg/kg cada, Diazepam (40 mg/kg) e DMSO a 3 % (grupo controle – diluente das drogas). Em seguida, para mimetizar o isolamento social que é um fator indutor de ansiedade, os animais foram acondicionados individualmente em béquer (500 mL) contendo 250 mL de água do aquário e mantidos em repouso.

5.5.4 Teste de campo aberto (OFT)

O teste de campo aberto (Figura 23) foi realizado para avaliar a presença ou ausência de alterações na coordenação motora em animais (FERREIRA *et al.*, 2021; SILVA MENDES *et al.*, 2022), seja devido ao efeito ansiolítico, sedação e/ou relaxamento muscular.

Figura 23 - Realização do teste de campo aberto com *zebrafish*.



Fonte: o autor.

Inicialmente, os peixes (n = 6/grupo) foram tratados por via intraperitoneal (i.p) com os extratos nas dosagens de 40, 100 e 200 mg/kg cada, Diazepam (40 mg/kg) e DMSO a 3 % (grupo controle – diluente das drogas). Após 30 min de tratamento, os animais foram adicionados a placas de Petri de vidro (10 x 15 cm) contendo a mesma água do aquário, com quadrantes, e analisadas quanto à atividade locomotora pela contagem do número de linhas de cruzamento (CL) pelos animais durante cinco minutos de análise (Figura 23) (GONÇALVES *et al.*, 2020).

5.5.5 Ensaio de toxicidade aguda

Após o teste de campo aberto, os peixes (n = 6/grupo) foram deixados em repouso para análise da taxa de mortalidade por um período de 96 h, registrando-se a cada 24 h o número de peixes mortos em cada grupo (OECD, 1992), sendo a dose letal capaz de matar 50 % dos animais (DL₅₀) determinada pelo método matemático probit com intervalo de confiança de 95%.

5.5.6 Ensaio de aparato claro/escuro (LDB)

O comportamento de ansiedade de um animal pode ser observado através do teste do aparato claro/escuro. Semelhante aos roedores, o *zebrafish* evita naturalmente as áreas iluminadas (GONÇALVES *et al.*, 2020).

O experimento foi realizado em um aquário de vidro (30 cm x 15 cm x 20 cm) dividido em uma área clara e uma área escura (Figura 24). O aquário foi cheio até 3 cm com água da torneira sem cloro e metais pesados, o que simulou um novo ambiente raso diferente do aquário convencional e capaz de induzir comportamentos de ansiedade.

Nos animais (n = 6/grupo) foram aplicados 20 µL (i.p) dos extratos nas doses de 40, 100 e 200 mg/kg cada. Os grupos de controle negativo e positivo consistiram em DMSO a 3% (diluente dos extratos) e solução de Diazepam 40 mg/kg, respectivamente.

Após 30 min de tratamentos, os animais foram colocados individualmente na zona clara e o efeito ansiolítico foi medido com base no tempo gasto pelos animais na zona clara do aquário durante 5 minutos de análise (GEBAUER *et al.*, 2011).

Figura 24 - Realização do teste do aparato claro/escuro com *zebrafish*.



Fonte: o autor.

5.5.7 Avaliação da neuromodulação GABAérgica e Serotoninérgica

O mecanismo de ação do efeito ansiolítico dos extratos foi investigado utilizando antagonistas específicos da neuromodulação GABAérgica e serotoninérgica, utilizando o flumazenil (antagonista dos benzodiazepínicos no receptor GABA_A) e o antagonista pizotifeno (antagonista de 5-HT₁ e 5-HT_{2A/2C}) (Benneh *et al.*, 2017). Grupos de peixes (n = 6/grupo) foram pré-tratados com flumazenil (4 mg/kg; 20 µL; i.p.), ou pizotifeno (32 mg/Kg; 20 µL; v.o.). Após 15 min, foi administrada a melhor dose efetiva dos extratos encontrada no teste piloto: *Griffinia gardneriana* (40 mg/kg) *Griffinia nocturna* (40 mg/kg) e *Griffinia liboniana* (100 mg/kg) (ver seção 6.3.3, p.67-70). O DMSO a 3 % (veículo; 20 µL; v.o.) foi usado como controle negativo. Diazepam (DZP; 4 mg/kg, 20 µL; v.o.) e fluoxetina (Flx; 0,05 mg/Kg; i.p.) foram usados como agonistas GABA_A e 5-HT, respectivamente. Após 1 hora dos tratamentos, os animais foram submetidos ao teste de claro/escuro, descrito na seção anterior.

5.5.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como valores da média $\pm$ erro padrão da média para cada grupo de 6 animais. Depois de confirmar a normalidade de distribuição e homogeneidade dos dados, as diferenças entre os grupos foram submetidas à análise de variância one-way ANOVA unidirecional para os testes de campo aberto e claro e escuro e two-way ANOVA para os mecanismos de ação, seguido do teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism v. 8.0. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

5.6 Docagem molecular

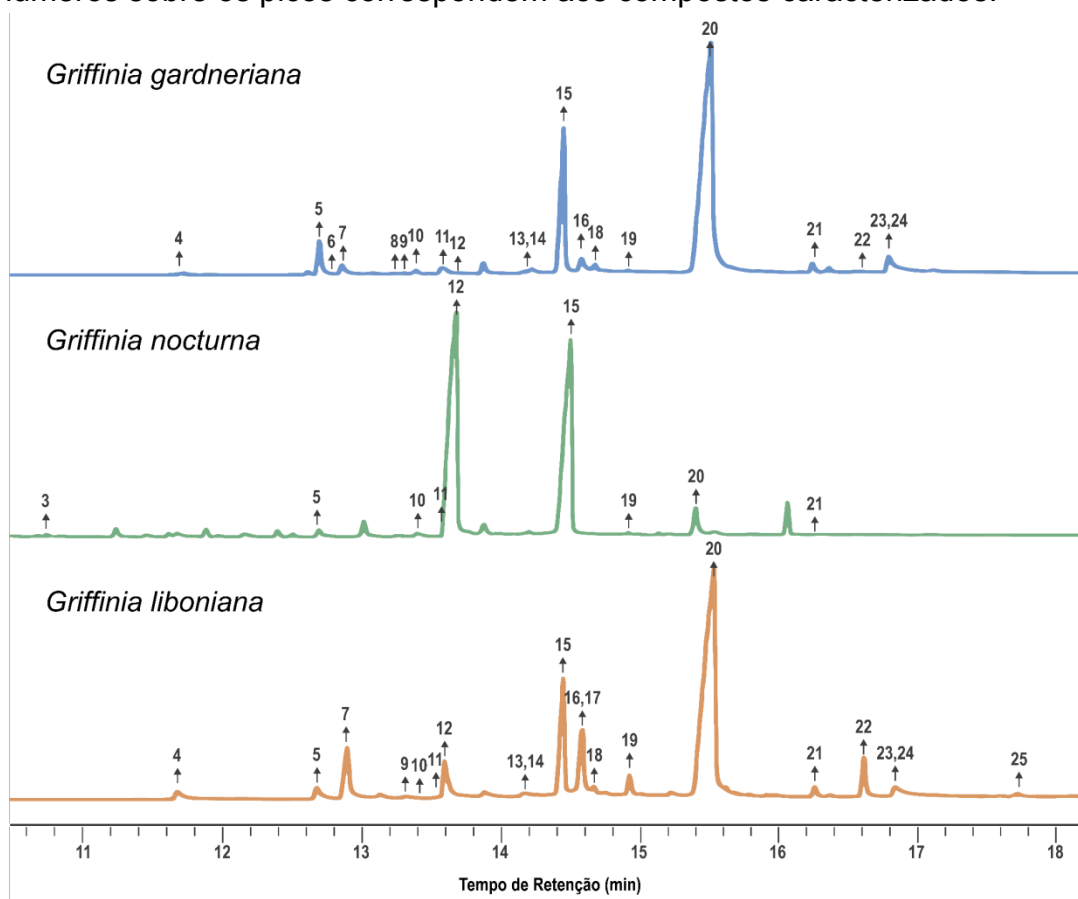
Docagem molecular ou *molecular docking* trata-se da ancoragem entre compostos químicos e alvos selecionados por meio de simulações computacionais. A docagem molecular foi calculada através do servidor SWISS DOCK (disponível em: <http://www.swissdock.ch/docking>) pela Dra. Natália Florêncio Martins da Embrapa Agroindústria Tropical. Os vários compostos identificados foram submetidos a possibilidade de acoplamento ao conjunto a dois receptores: 5HTR, que é um receptor para a serotonina, e a estrutura 4F11, correspondente ao segmento extracelular do receptor GABA humano, obtidos a partir do *Protein Data Bank* (PDB). Para cada acoplamento, foram utilizados os arquivos SMILES dos compostos, submetidos a conversão tridimensional, seguido da conversão do arquivo tridimensional em formato MOL2 através do software Chimera. Para as conformações de cada ligante foram usados o protocolo de ancoragem cega, no algoritmo FAST do servidor SWISS DOCK, que estima as diversas possibilidades de ancoragem dos compostos em cavidades da proteína alvo. Cada ancoragem foi avaliada conforme os parâmetros de energia livre de Gibbs (ΔG) e afinidade de ligação, que é considerada como uma das melhores funções de pontuação para ligação de proteína-ligante.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Determinação do perfil alcaloídico por CG-EM

A Figura 25 apresenta uma comparação entre os cromatogramas obtidos para as três espécies de *Griffinia*. A deconvolução dos dados obtidos por CG-EM no MS-Dial resultou em 42 espectros de massas compatíveis com alcalóides, distribuídos entre as espécies investigadas. A utilização desse artifício computacional permitiu a identificação de uma quantidade significativa de compostos (11) além dos que poderiam ser identificados analisando a matriz original proveniente do Agilent Masshunter, uma vez que o MS-Dial foi capaz de elucidar picos com baixa intensidade ou que sofreram co-eluição. Na Tabela 4, estão apresentados a relação dos compostos encontrados e suas respectivas áreas relativas de pico, as quais foram utilizadas para determinar a concentração relativa de cada pico nas análises quimiométricas. Ademais, a Figura 26 apresenta o resultado da normalização dos dados a partir da plataforma Metaboanalyst 5.0.

Figura 25 - Comparação dos cromatogramas CG-EM das três espécies de *Griffinia*. Os números sobre os picos correspondem aos compostos caracterizados.



Dos 42 compostos detectados, vinte e três (**1-20**, **22**, **24** e **25**) já haviam sido previamente relatados na literatura. Em *G. gardneriana* foram identificados 22 compostos, correspondendo a 79,60% da área relativa dos picos. De *G. nocturna*, foram identificados 9 compostos, correspondendo a 73,45% da área relativa. Por fim, 22 compostos puderam ser identificados em *G. liboniana*, correspondendo a 84,00% da área relativa.

Figura 26 - Normalização dos dados de CG-EM das frações alcaloídicas de três espécies de *Griffinia*. A) Distribuição dos dados antes da normalização; B) Distribuição dos dados após a normalização. Os números correspondem aos compostos listados na Tabela 4.

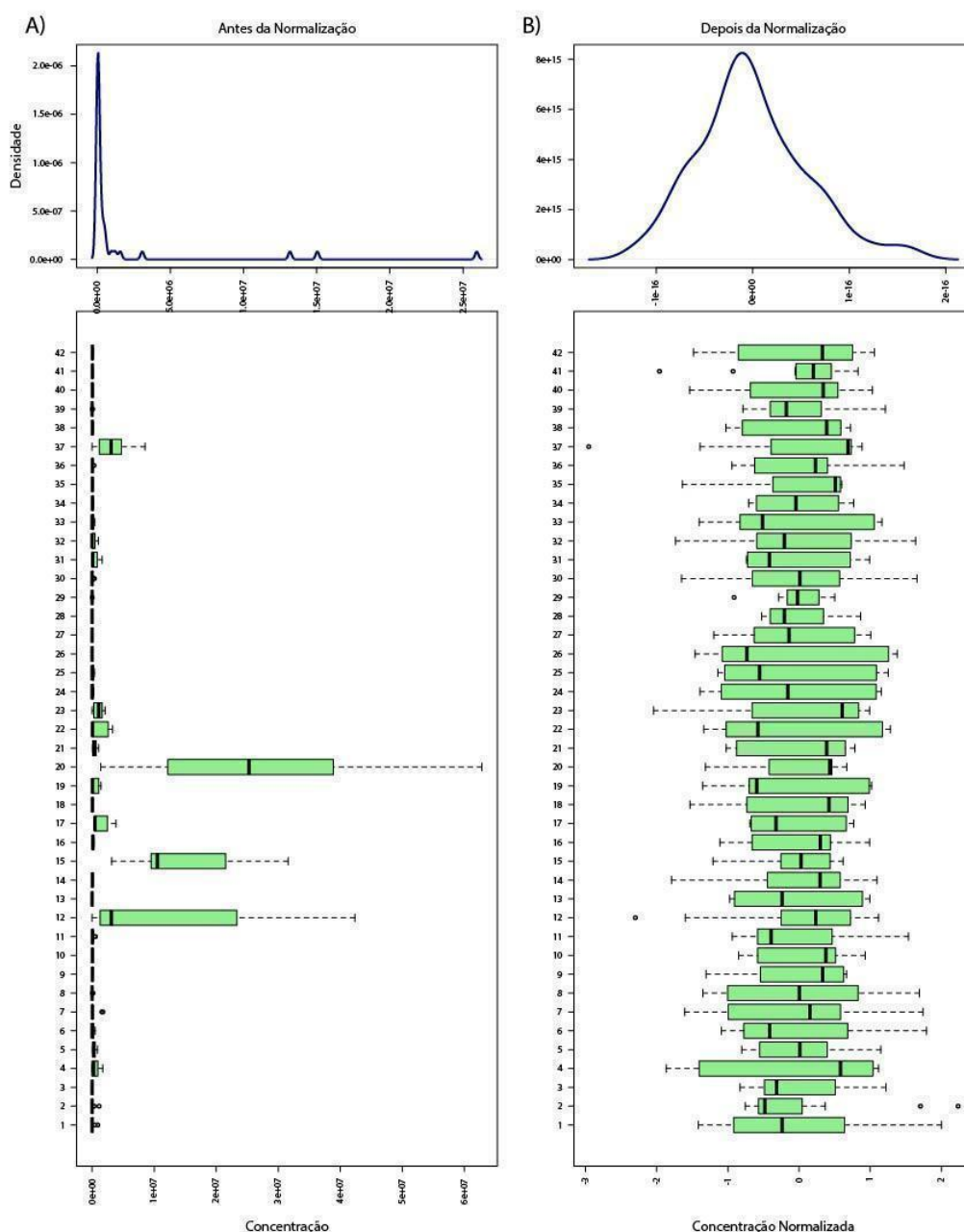


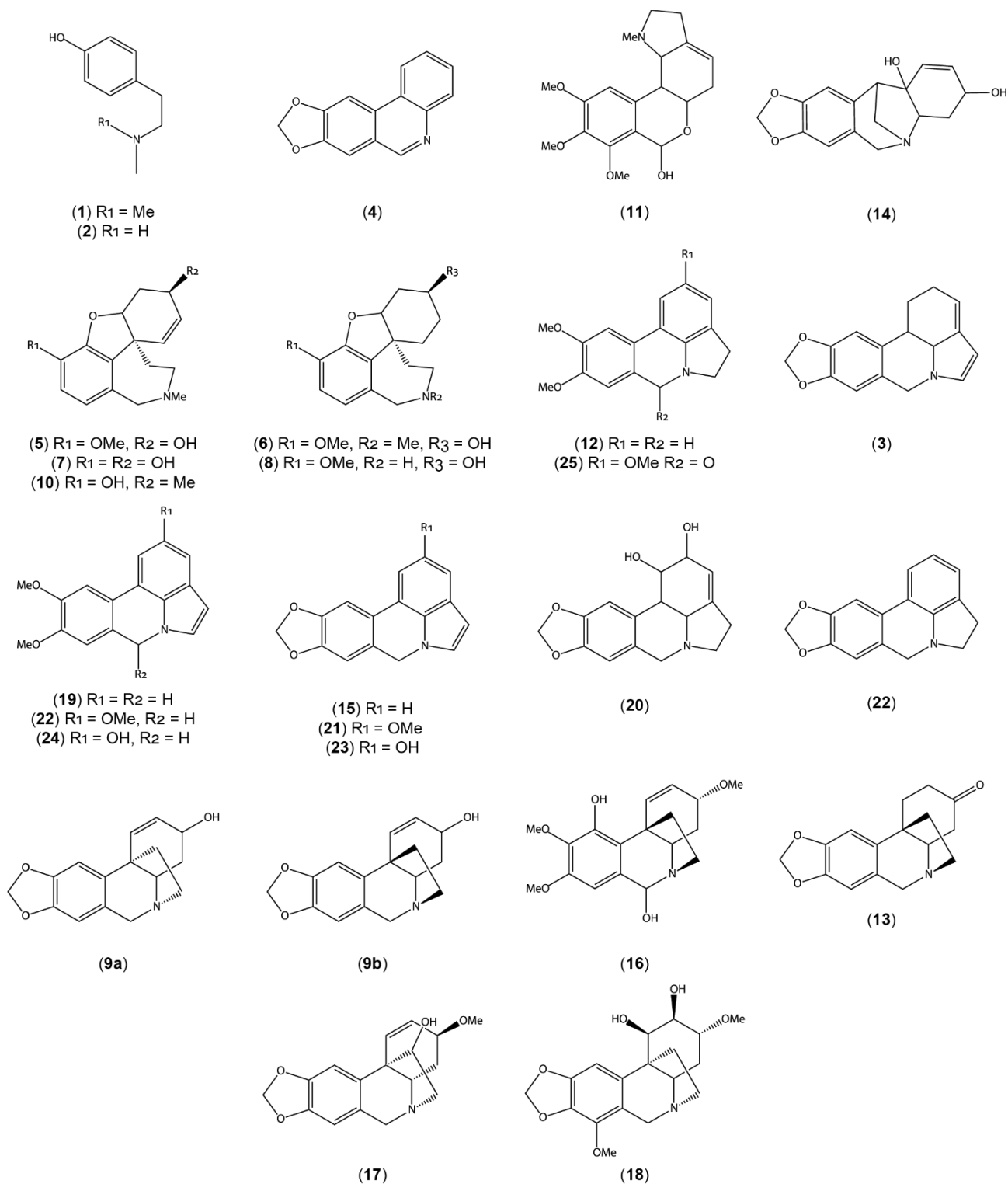
Tabela 4 - Compostos detectados nas frações alcaloídicas de três espécies de *Griffinia* spp. por CG-EM.

Pico	Composto	TR ^a (min)	IR ^b _{exp}	IR ^b _{lit}	M ^{+c}	m/z (Abundância %) ^d	Área (%) ^e			Ref. ^f
							G. gardneriana*	G. liboniana**	G. nocturna*	
1	Hordenina ⁸	5.11	1484	1467	165 (1)	121 (2), 107 (6), 91 (3), 77 (8), 58 (100)	0.73 ± 0.71	0.02 ± 0.02	-	[1]
2	Isômero de metiltiramina ⁸	5.15	1489	-	151 (6)	107 (18), 91 (8), 77 (16), 58 (23), 44 (100)	0.79 ± 0.89	0.01 ± 0.01	-	[1]
3	11,12-Desidrollicorena ¹	10.86	2208	-	253 (40)	252 (100), 224 (40), 166 (17)	-	-	0.05 ± 0.00	[6]
4	Trisfaeridina ⁴	11.70	2303	2304	223 (100)	222 (37), 164 (14), 138 (21), 137 (10), 111 (12) 286 (100), 270 (13), 244 (23), 230 (12), 216 (32), 174 (29), 115 (15)	0.23 ± 0.21	1.51 ± 0.30	-	[2]
5	Galantamina ^{3g}	12.71	2418	2424	287 (84)	288 (100), 202 (9), 187 (9), 159 (6), 115 (11)	1.19 ± 0.42	0.10 ± 0.03	0.24 ± 0.01	[2]
6	Licoramina ³	12.88	2437	2444	289 (59)	272 (81), 256 (20), 216 (14), 202 (34), 160 (41)	0.68 ± 0.17	-	-	[2]
7	Sanguinina ³	12.92	2441	2444	273 (100)	274 (100), 244 (10), 188 (20)	0.02 ± 0.01	1.11 ± 1.37	-	[2]
8	Norlicoramina ³	13.26	2479	2481	275 (76)	228 (19), 199 (73), 187 (65), 173 (23), 115 (22) 284 (100), 242 (21), 228 (12), 216 (22), 199 (23), 174 (39)	0.09 ± 0.04	-	-	[2]
9	Vitatina(9a)/Crinina(9b) ⁵	13.34	2488	2498	271 (100)	207 (5), 110 (9), 109 (100), 108 (17), 94 (4)	0.03 ± 0.01	0.08 ± 0.01	-	[2]
10	Narwedina ³	13.42	2498	2482	285 (84)	250 (100), 192 (20), 96 (10)	0.08 ± 0.05	0.01 ± 0.00	0.06 ± 0.00	[3]
11	Nerinina ²	13.60	2519	2498	347 (2)	270 (41), 238 (12), 211 (21), 181 (75), 152 (21) 203 (53), 188 (61), 176 (96), 174 (100), 161 (56), 148 (60)	0.66 ± 0.35	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	[2]
12	Anidrollicorina ¹	13.64	2524	2529	251 (65)	248 (100), 190 (39), 124 (8), 96 (20)	0.32 ± 0.51	4.84 ± 1.62	40.23 ± 0.23	[2]
13	Crinan-3-ona ⁵	14.23	2597	2579	271 (100)	272 (100), 257 (8), 240 (13), 211 (8), 181 (14)	0.01 ± 0.00	0.08 ± 0.02	-	[4]
14	Pancratinina C ⁵	14.27	2602	2602	287 (74)	334 (47), 318 (100), 291 (52), 258 (23), 232 (39)	0.13 ± 0.04	0.03 ± 0.00	-	[2]
15	11,12-Desidroanhidrollicorina ¹	14.49	2632	2633	249 (74)	264 (100), 248 (20), 220 (12), 191 (13), 178 (20) 286 (20), 268 (34), 250 (14), 227 (69), 226 (100), 211 (5), 147 (11)	14.11 ± 9.80	12.52 ± 3.12	30.16 ± 0.19	[2]
16	6α-Hidroxihippeastidina ^{2g}	14.61	2649	-	335 (100)	278 (100), 264 (8), 248 (6), 235 (13), 220 (2), 193 (1), 178 (10)	0.36 ± 0.28	0.21 ± 0.04	-	-
17	Haemantamina ⁵	14.61	2649	2637	301 (15)	294 (100), 278 (10), 264 (3), 250 (6), 194 (1), 178 (7)	-	3.90 ± 0.42	-	[4]
18	Undulatiana diol ⁵	14.70	2661	2668	349 (68)	0.07 ± 0.06	0.06 ± 0.03	-	[2]	
19	11,12-Desidroassoanina ¹	14.96	2697	2703	265 (76)	264 (100), 234 (2), 206 (13), 179 (2), 178 (10)	0.02 ± 0.01	1.60 ± 0.09	0.04 ± 0.00	[2]
20	Licorina ^{1g}	15.54	2786	2771	287 (32)	0.59 ± 0.49	0.91 ± 0.37	0.05 ± 0.00	-	[2]
21	11,12-Desidro-2-metoxianhidrollicorina ¹	16.29	2909	-	279 (73)	0.02 ± 0.01	3.59 ± 0.59	-	[2]	
22	11,12-Desidro-2-metoxiassoanina ¹	16.64	2963	2967	295(87)	2.28 ± 1.63	1.75 ± 0.77	-	-	
23	11,12-Desidro-2-hidroxianhidrollicorina ¹	16.87	2999	-	265 (62)					

24	11,12-Desidro-2-hidroxiassoanina ¹	16.89	3001	2991	281 (70)	280 (100), 265 (45), 236 (9), 207 (4), 194 (8)	0.01 ± 0.00	0.25 ± 0.08	-	[2]
25	11,12-Dihidro-2-metoxipratosina ¹	17.75	3075	-	311 (100)	310 (99), 295 (25), 280 (11), 268 (8), 148 (10)	-	0.35 ± 0.09	-	[5]
26	Desconhecido A	09.06	1999	-	227 (100)	196(15), 182(13), 168(18)	-	0.05 ± 0.01	-	-
27	Desconhecido B	11.16	2242	-	269 (100)	254 (8), 226 (20), 211 (41), 193 (30), 181 (26), 165 (59), 152 (29)	-	-	0.01 ± 0.00	-
28	Desconhecido C	11.99	2335	-	269 (100)	254 (40), 226 (60), 211 (50), 193 (50), 165 (95), 152 (25)	-	-	0.03 ± 0.00	-
29	Desconhecido D	12.49	2393	-	319 (40)	287 (30), 237 (100), 272 (25), 191 (15)	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	-
30	Desconhecido E (tipo-homolicorina) ^{2h}	12.63	2410	-	-	109 (100)	0.39 ± 0.29	0.01 ± 0.01	-	-
31	Desconhecido F	12.70	2418	-	259 (66)	258 (83), 226 (50), 200 (100), 115 (13)	-	1.24 ± 0.48	-	-
32	Desconhecido G	13.04	2454	-	253 (63)	252 (56), 225 (57), 224 (100)	-	0.01 ± 0.00	0.93 ± 0.02	-
33	Desconhecido H	13.16	2469	-	257 (46)	225 (97), 224 (100), 199 (43)	-	0.35 ± 0.06	0.01 ± 0.00	-
34	Desconhecido I (tipo-homolicorina) ^{2h}	13.40	2496	-	285 (35)	109 (100)	0.04 ± 0.02	0.09 ± 0.08	0.12 ± 0.00	-
35	Desconhecido J	13.97	2565	-	249 (58)	248 (100), 190 (26), 96 (15)	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.00	-	-
36	Desconhecido K (tipo-galantamina) ^{3h}	14.36	2615	2601	345 (40)	344 (100), 250 (34)	0.13 ± 0.16	0.04 ± 0.02	0.01 ± 0.00	[6]
37	Desconhecido L	15.54	2786	-	251 (30)	250 (100), 241 (9), 192 (20)	6.60 ± 2.16	5.05 ± 1.22	0.01 ± 0.01	-
38	Desconhecido M	15.72	2814	-	279 (80)	278 (100), 263 (5), 248 (10), 235 (20)	0.06 ± 0.05	0.11 ± 0.03	0.01 ± 0.00	-
39	Desconhecido N (tipo-homolicorina) ^{2h}	15.87	2840	-	-	109 (100)	0.05 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	-
40	Desconhecido O (tipo-pretazetina) ^{7h}	16.40	2926	-	333 (60)	318 (15), 305 (23), 272 (40), 260 (36), 247 (100), 232 (26), 218 (16), 115 (9)	0.11 ± 0.09	0.06 ± 0.01	-	-
41	Desconhecido P	16.60	2957	-	265 (70)	264 (100), 206 (20)	0.11 ± 0.09	0.07 ± 0.04	0.03 ± 0.00	-
42	Desconhecido Q	17.15	3024	-	293 (73)	292 (100), 264 (25)	0.14 ± 0.11	0.08 ± 0.05	-	-
Total							79.60	84.00	73.45	

¹Tipo-Licorina; ²Tipo-Homolicorina; ³Tipo-Galantamina; ⁴Tipo-Narciclasina; ⁵Tipo-Crinina; ⁶Tipo-Haemantamina; ⁷Tipo-Pretazetina; ⁸Tipo-Montanina; ⁹Outro. ^aTempo de retenção; ^bÍndice de retenção obtido em uma coluna HP-5MS; ^cÍon molecular; ^dFragmentos dos compostos obtidos por ionização de elétrons; ^eValores expressos em % no cromatograma de íons totais (TIC); ^f[1] Berkov *et al.*, 2011; [2] Souza *et al.*, 2021; [3] Bozkurt *et al.*, 2017; [4] Trujillo-Chacón *et al.*, 2019; [5] Wu *et al.*, 2014. [6] Correa *et al.*, 2020. ^gConfirmados a partir de padrões analíticos autênticos (disponíveis nos apêndices). ^hTipos de esqueleto confirmados a partir do padrão de fragmentação. **n* = 3; ***n* = 5.

Figura 27 - Estruturas dos alcalóides identificados na Tabela 1.



As estruturas dos alcalóides de amarilidáceas (AA) identificados estão apresentadas na Figura 27. Destaca-se a grande diversidade estrutural dos

compostos, os quais se dividem entre os esqueletos narciclasina (**4**), homolicorina (**11**), galantamina (**5-8** e **10**), licorina (**3**, **15** e **19-25**), crinina (**9**, **13**, **16** e **18**), haemantamina (**17**) e montanina (**14**).

Em *G. liboniana* foram encontrados os protoalcalóides hordeína (**1**) e um isômero de metiltiramina (**2**), além dos alcalóides trisfaeredina (**4**), galantamina (**5**), sanguinina (**7**), vitatina/crinina (**9**), narwedina (**10**), nerinina (**11**), anidrolícorina (**12**), crinan-3-ona (**13**), pancratinina C (**14**), 11,12-desidroanidrolícorina (**15**), 6 α -hidroxihipeastidina, (**16**) haemantamina (**17**), undulatiane diol (**18**), 11,12-desidroassoanina (**19**), licorina (**20**), 11,12-desidro-2-metoxianidrolícorina (**21**), 11,12-desidro-2-metoxiassoanina (**22**), 11,12-desidro-2-hidroxianidrolícorina (**23**), 11,12-desidro-2-hidroxiassoanina (**24**) e 11,12-dihidro-2-metoxipratossina (**25**). No melhor do nosso conhecimento, não há, até então, nenhum estudo químico sobre a referida espécie.

Na fração alcaloídica de *G. gardneriana* foram encontrados licoramina (**6**) e norlicoramina (**8**), além dos já citados alcalóides **1**, **2**, **4**, **5**, **7**, **9-16** e **18-24**. Porém, apenas os alcalóides licorina (**20**), trisfaeredina (**4**) e sanguinina (**7**) já haviam sido relatados para a espécie Cole (2018).

Os compostos 11,12-desidrolícorena (**3**) e **5**, **10-12**, **15** e **19-21** compõem o perfil alcaloídico de *G. nocturna*. Paiva (2019) relatou a presença do alcalóide galantamina (**5**) em *G. nocturna*, além de pseudolícorina e narciclasina, que não foram observados no presente estudo.

Os alcalóides **21** e **23** são novos e suas estruturas foram propostas com base em estudos de fragmentação de massas, comparação com dados de massas para compostos análogos e bibliografia pertinente. Embora o composto **25** seja conhecido e sua estrutura tenha sido determinada por RMN ^1H e ^{13}C , neste trabalho está sendo apresentado os dados de fragmentação de massas pela primeira vez.

O espectro de massas do composto **21** (Figura 28) (RI = 2909) apresentou um pico correspondente ao íon molecular $[\text{M}]^{++}$ com m/z 279 e íon base em m/z 278 $[\text{M} - \text{H}]^+$, referente à perda de hidrogênio radical. Uma análise dos íons minoritários (menor que 30%) mostrou picos correspondentes a íons diagnósticos 248 $[\text{M} - 31]^+$, 220 $[\text{M} - 59]^+$ e 193 $[\text{M} - 86]^+$ para alcalóides do tipo licorina com anel C aromático (Berkov *et al.*, 2020). A presença do grupo metilenodioxido em C8/C9 foi proposta com base nos íons m/z 220 e 192, referentes as perdas de CO_2 e CO , respectivamente, a partir do íon m/z 264. Os íons m/z 249 e 248, formados pela

perda de CH₂O a partir do íon molecular e do íon base, respectivamente, sugerem fortemente a presença de um grupo metoxila em C2. Destaca-se também, os íons em m/z 264 e 263, os quais podem ser formados através da perda de um radical metila a partir do íon molecular e do íon base, respectivamente. Os íons encontrados sedimentam a proposta de que **21** se trata do alcaloide 11,12-desidro-2-metoxianidrolícorina, um derivado da 11,12-desidro-anidrolícorina previamente relatado por Rodríguez-Escobar *et al.* (2023), a partir de espécies do gênero *Clinanthus* Herb. (Amaryllidaceae). Uma proposta de mecanismo de fragmentação justificando a estrutura de **21** foi detalhada na Figura 26.

O espectro de massas do composto **23** (Figura 29) (RI = 2999) exibiu um pico referente ao íon molecular com m/z 265 [M]⁺, diferindo de **21** por apenas 14 unidades de massa. O íon base, com m/z 264 [M - H]⁺, também foi formado pela perda de hidrogênio radical. A exemplo de **21**, os íons com m/z 234 [M - 31]⁺, 206 [M - 59]⁺ e 179 [M - 86]⁺, indicaram a presença do substituinte metilenodioxido em C8/C9. Os íons com m/z 264 e 236, referentes as perdas de hidrogênio radical e CO, são compatíveis com um grupo hidroxila em C-2. Para compostos do tipo lícorina com anel C aromático, essa é uma das posições mais comumente substituída. Portanto, o composto **23** foi proposto como sendo 11,12-desidro-2-hidroxianidrolícorina. Cortes *et al.* (2015) já havia relatado a existência de uma substância não identificada com padrão de fragmentação espectral semelhante ao de **23** a partir de um estudo com *Narcissus serotinus*.

O composto **25** exibiu íon molecular com m/z 311 [M]⁺, o qual também corresponde ao íon base, caracterizando a presença de um grupo ceto em C6 (Berkov 2020). Além disso, apresentou picos diagnósticos (menor que 30%) com m/z 296 [M - 15]⁺, 280 [M - 31]⁺, 268 [M - 43]⁺, 253 [M - 58]⁺ e 224 [M - 87]⁺ indicando a presença do anel C aromático e grupos metoxila como substituintes em C2, C8 e C9. Tendo em vista que o padrão de fragmentação de **25** foi semelhante ao do alcaloide 2-metoxipratosina (m/z 309 [M]⁺), porém com apenas uma diferença de 2 unidades de massas, este foi sugerido ser 11,12-dihidro-2-metoxipratosina. Este alcaloide, denominado de licosprenina, já havia sido registrado anteriormente por Wu *et al.* (2013), cuja estrutura foi elucidada através de experimentos de RMN de ¹H e ¹³C.

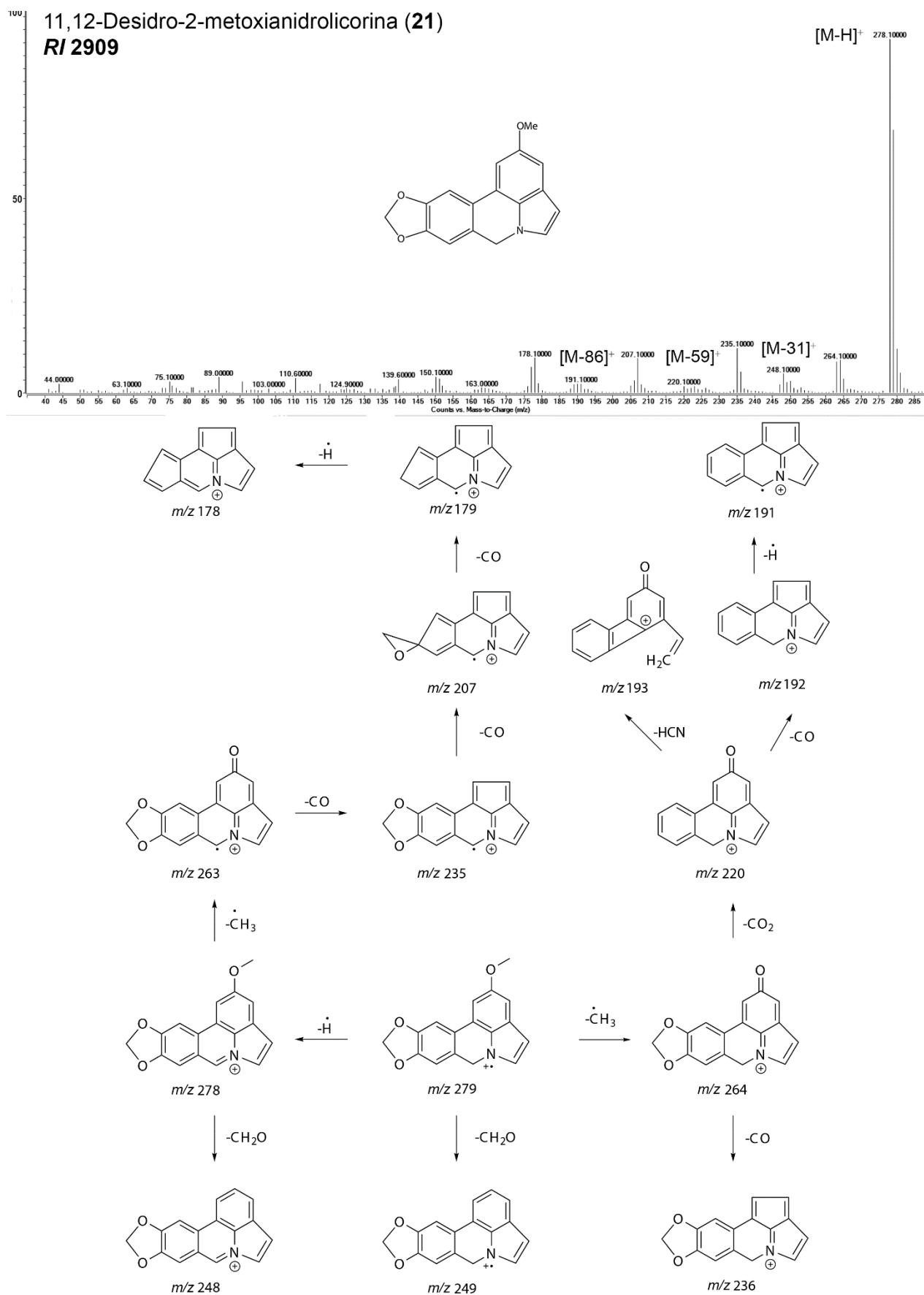
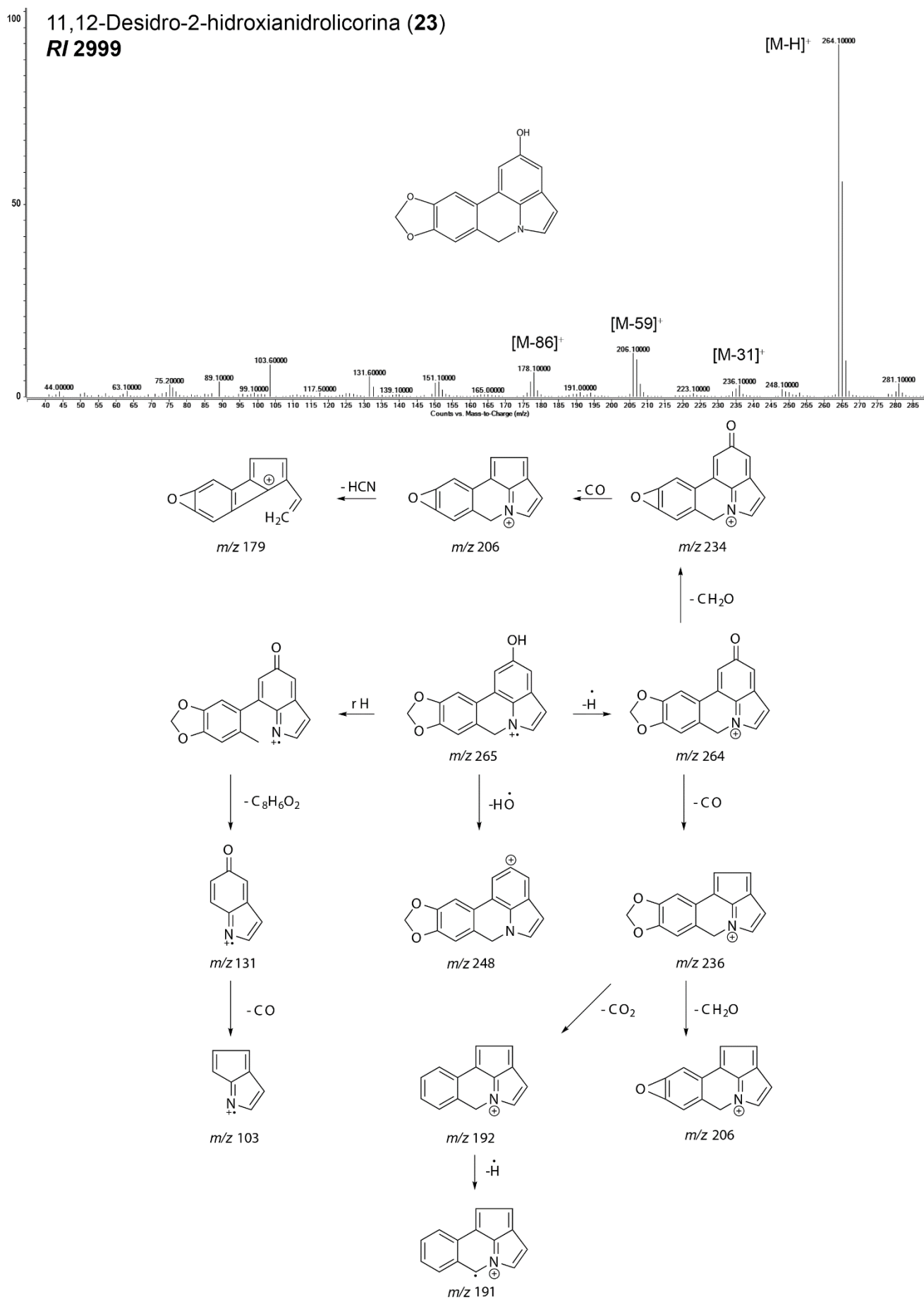
Figura 28 - Padrão de fragmentação do composto **21**.

Figura 29 - Padrão de fragmentação do composto **23**.

Neste estudo, os alcaloides de esqueleto licorina foram majoritários, tanto em número de estruturas quanto em porcentagem relativa em área. Ademais, 17 compostos não puderam ser identificados (Desconhecidos A-T). Entretanto, 5 compostos foram caracterizados como pertencentes aos esqueletos de homolicorina (**30**, **34** e **39**), galantamina (**36**) e pretazetina (**40**) devido à presença de picos característicos a esses tipos em seus espectros de massa (BERKOV *et al.*, 2012; BERKOV *et al.*, 2023).

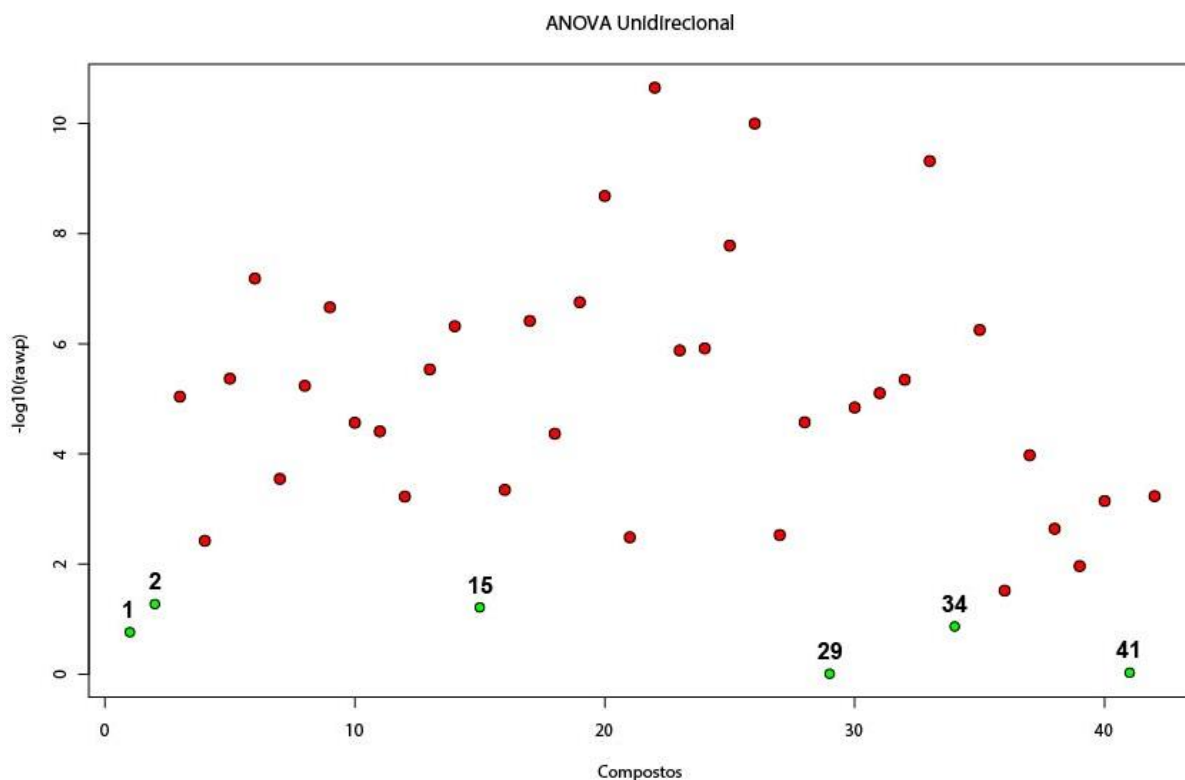
Variações na composição alcaloídica entre diferentes estudos podem estar relacionadas a fatores ambientais, bem como a diferenças ou problemas na aplicação da metodologia. Por exemplo, é sabido que a extração de narciclasina e outros alcalóides com grupos amina não básicos é desfavorável através de partição ácido-base, como utilizada neste trabalho.

6.2 Análise não-supervisionada

Os dados obtidos a partir do MS-Dial foram inseridos na plataforma Metaboanalyst 5.0, onde foi realizada uma análise de variância (ANOVA) unidirecional, visando verificar quais compostos seriam estatisticamente significativos ($p < 0,05$). A análise de variância (Figura 30) revelou que hordeína (**1**), isômero de metiltiramina (**2**), 11,12-desidroanidrolícoriana (**15**), desconhecido D (**29**), desconhecido I (**34**) e desconhecido P (**41**) não foram estatisticamente significativos. Esses compostos foram removidos da matriz de dados e a versão resultante da matriz foi novamente carregada na plataforma Metaboanalyst 5.0 a fim de realizar uma análise não supervisionada.

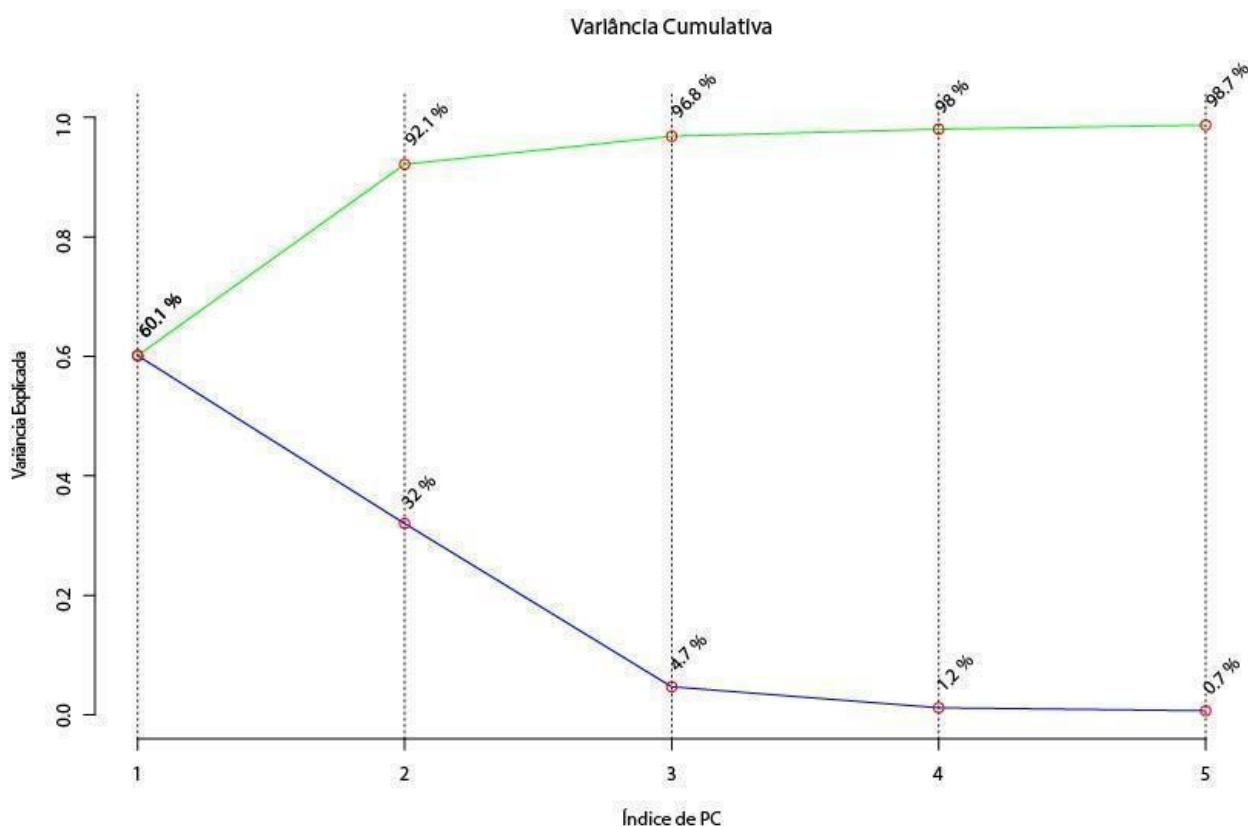
A análise de componentes principais (PCA) (Figura 31) foi capaz de simplificar a relação entre as 36 dimensões (compostos) sob análise em duas componentes principais, PC1 e PC2, capazes de explicar 92,1% da variância. O plot de PC1 (60,1%) x PC2 (32,0%) (Figura 32A) mostra a separação dos compostos em três grupos, correspondentes às três espécies de *Griffinia* estudadas. As amostras de *G. gardneriana* e *G. liboniana* ficaram no quadrante negativo em relação a PC1, enquanto as amostras de *G. nocturna* ficaram na região positiva. Já em relação a PC2, *G. liboniana* ficou na parte negativa, enquanto *G. gardneriana* e *G. nocturna* ficaram na região positiva.

Figura 30 - Análise ANOVA unidirecional. Os pontos em vermelho são os compostos significativos postos com base no valor de $p < 0,05$. Os números correspondem aos compostos listados na Tabela 4.



O biplot entre PCs e seus respectivos carregamentos (Loadings) resultou em um gráfico bidimensional (Figura 32B) que foi usado para determinar quais compostos foram discriminantes na separação dos clusters. Ao todo foram identificados 14 alcalóides com forte influência na separação dos perfis químicos das três espécies: galantamina (**5**), licoramina (**6**), norlicoramina (**8**), nerinina (**11**) e desconhecido E (**30**) para *G. gardneriana*; 11,12-desidroassoanina (**19**), 11,12-desidrometoxiassoanina (**22**), 11,12-dihidro-2-metoxipratosina ou licosprenina (**25**), desconhecido A (**26**) e desconhecido H (**33**) para *G. liboniana*; e finalmente isômero de 11,12-desidrolcorena (**3**), anidrolcorina (**12**), desconhecido C (**28**) e desconhecido G (**32**). Os resultados da PCA e seus loadings revelaram uma maior proximidade química da espécie *G. gardneriana* com *G. liboniana*, o que é curioso, uma vez que *G. gardneriana* é filogeneticamente mais próxima de *G. nocturna*. De qualquer forma, os perfis químicos das três espécies se mostraram relativamente parecidos.

Figura 31 - Porcentagem de variância explicada pelas cinco componentes principais (PC). A linha azul mostra a variância explicada por cada PC individualmente, enquanto a linha verde mostra a variância acumulada.



Ademais, foi gerado um HCA-heatmap (Figura 33) a fim de verificar a presença de outliers e confirmar as observações feitas através da PCA. O mapa de calor para os 36 compostos significativos corroborou os resultados da PCA. É possível observar a formação de dois grandes agrupamentos, revelando maior dissimilaridade entre a espécie de *G. nocturna* das demais espécies de *Griffinia*, sem nenhum erro de classificação. Além disso, a abundância relativa dos íons detectados em cada amostra está representada pela intensidade das cores vermelho (alta intensidade) e azul (baixa intensidade). Desta forma, alcalóides como galantamina (5) e licoramina (6) aparecem em maior intensidade em *G. gardneriana*; e sanguinina (7) e haemanthamina (17) em *G. liboniana*. Licorina (20) é o alcalóide majoritário nestas duas espécies. Enquanto em *G. nocturna* destacam-se os alcalóides anidrolicorina (12) e isômero de 11,12-desidrollicorena (3).

Figura 32 - Gráficos de PCA para extratos alcaloídicos de três espécies de *Griffinia*: A) Scores de PC1 x PC2. B) Biplot entre PCs e seus respectivos loadings.

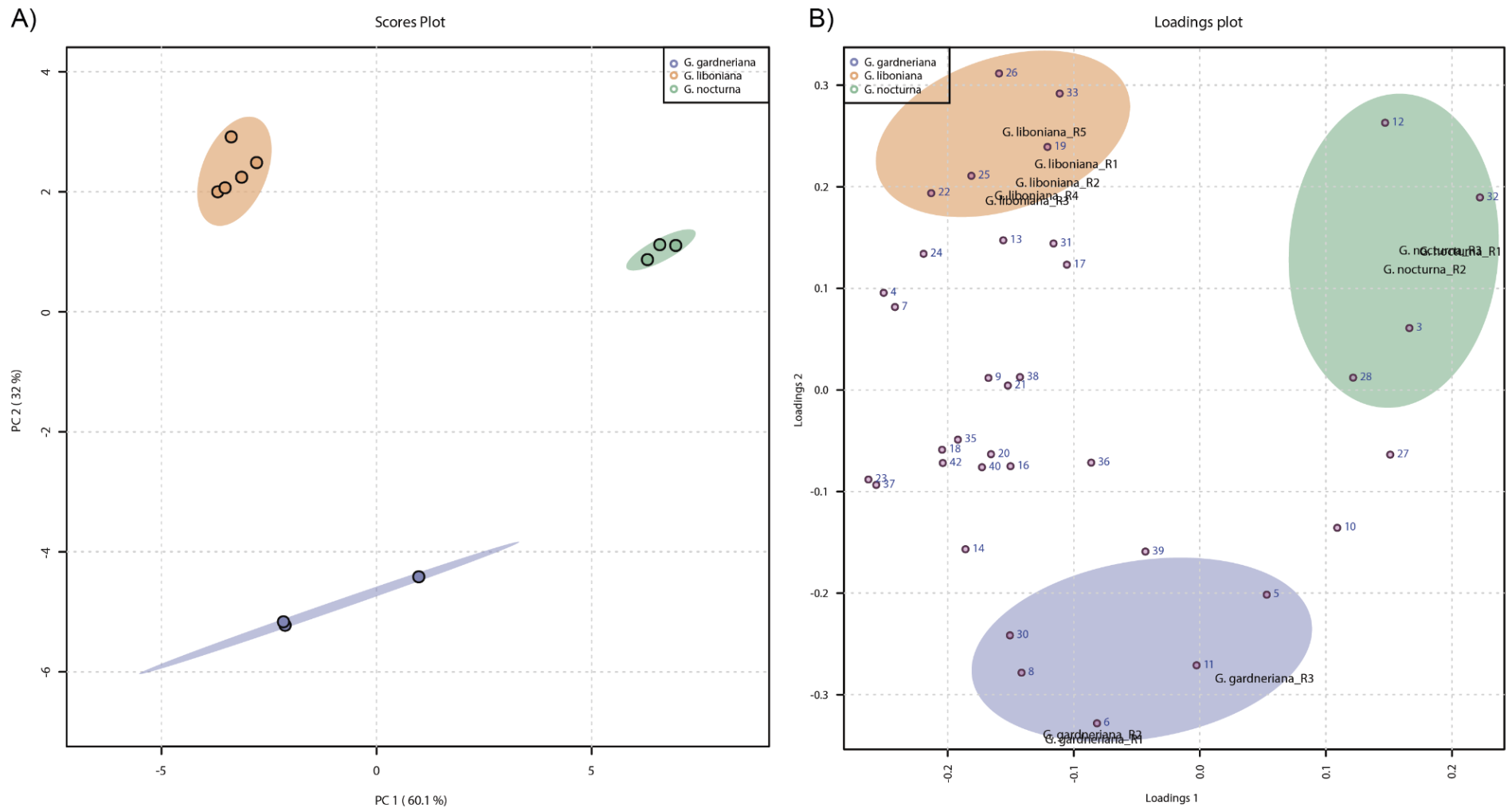
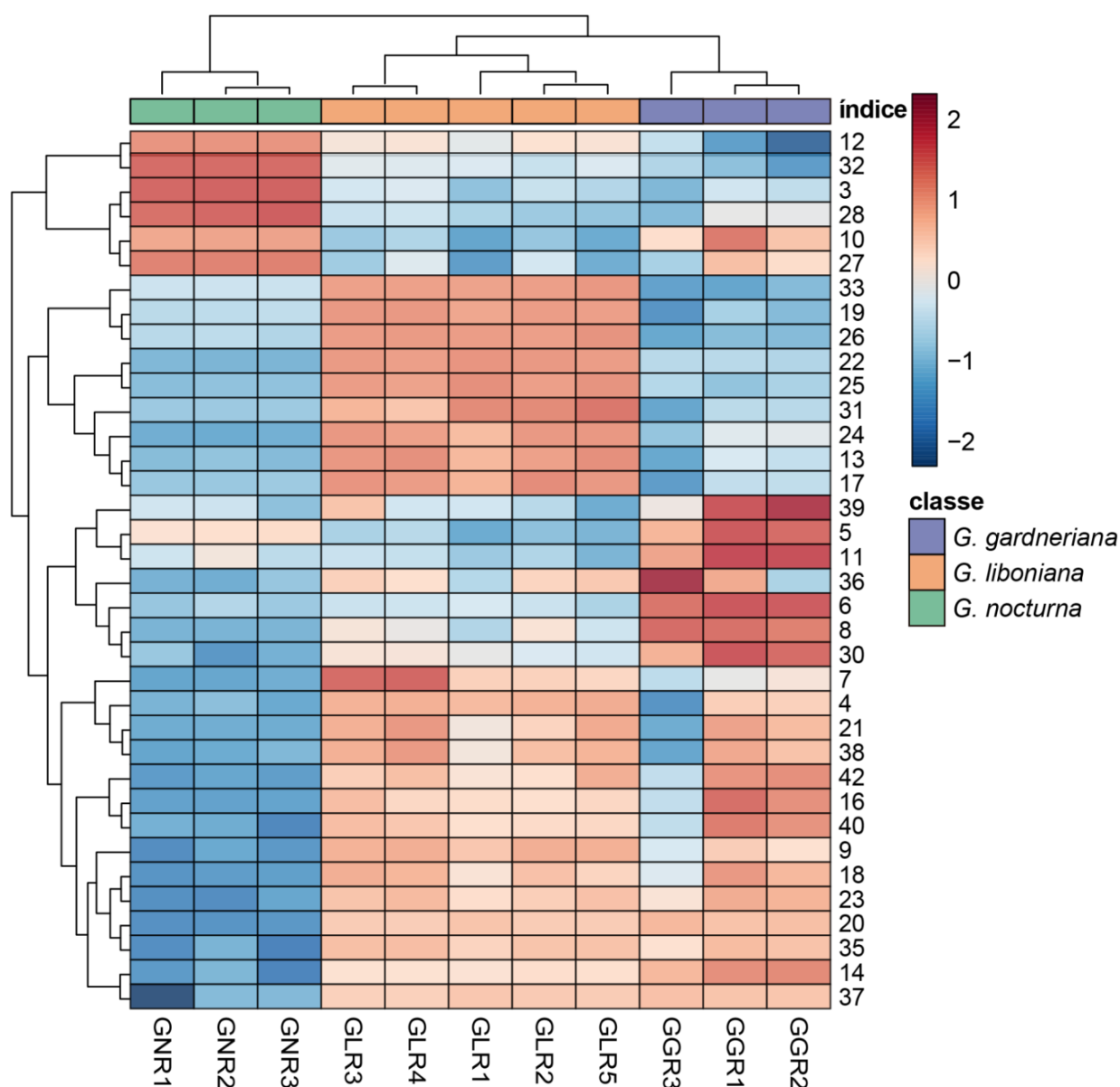


Figura 33 - Gráfico de HCA-heatmap para os componentes alcaloídicos encontrados em extratos de três espécies de *Griffinia* spp.



6.3 Atividade farmacológica dos extratos alcaloídicos

6.3.1 Avaliação de toxicidade aguda

Após a aplicação dos fármacos, os *zebrafish* adultos (6 peixes / grupo) foram deixados em repouso para avaliação da taxa de mortalidade por um período de 96 h, registrando-se a cada 24 h o número de peixes mortos em cada grupo, sendo a dose letal capaz de matar 50 % dos animais (DL_{50}). De acordo com a Tabela 5, nenhum extrato foi tóxico em uma DL_{50} de 200 mg/kg.

Tabela 5 - Teste de toxicidade aguda dos extratos alcaloídicos de *Griffinia* spp. em zebrafish.

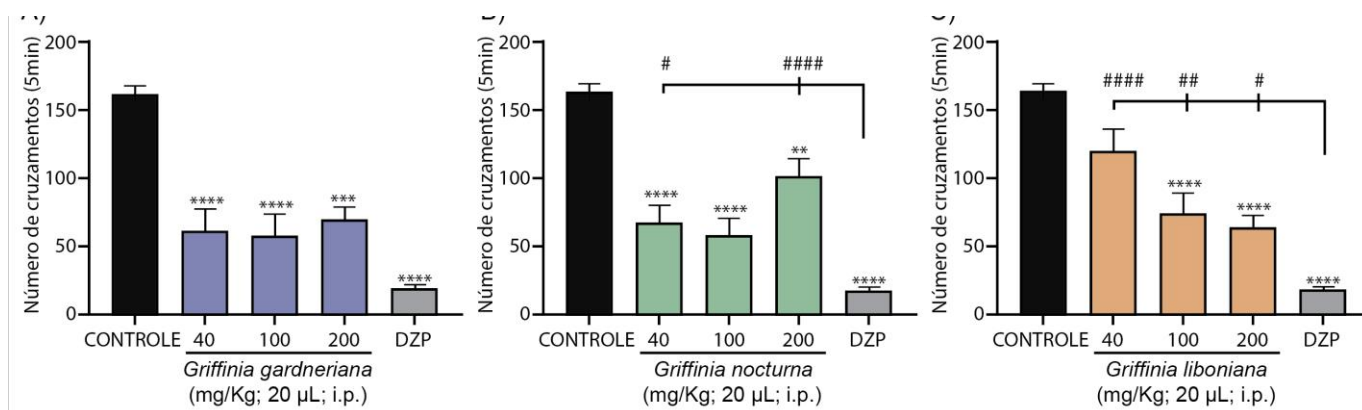
Amostra	Mortalidade (mg/kg)			96h DL50 ^a (mg/kg) / IV
	40	100	200	
<i>G. gardneriana</i>	0	0	0	>200
<i>G. nocturna</i>	0	0	0	>200
<i>G. liboniana</i>	0	0	0	>200
DMSO ^b 3%	0	0	0	>200

^aDose letal para matar 50% dos Zebrafish adulto; ^bDimetilsulfóxido.

6.3.2 Efeito sobre atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)

O teste de campo aberto (OFT) (Figura 34) foi realizado para avaliar a presença ou ausência de alterações na coordenação motora em animais, seja devido ao efeito ansiolítico, sedação ou relaxamento muscular. Os peixes foram tratados com os extratos nas dosagens de 40, 100 e 400 (i.p) mg/kg cada, Diazepam (40 mg/kg) e DMSO a 3 % (grupo controle – diluente das drogas). Como resultado do teste OFT, com exceção da dose de 40mg/Kg da fração alcaloídica de *G. liboniana*, todas as demais doses dos extratos reduziram a locomoção dos animais, porém não paralisaram a locomoção como ocorrido com grupo controle DZP (# # # # $p < 0,0001$ vs. Controle), que reduziu drasticamente a locomoção dos animais, indicando sedação.

Figura 34 - Número de cruzamentos entre os quadrantes (A): *G. gardneriana*; (B): *G. nocturna* e (C): *G. liboniana* (ANOVA, teste de Tukey - ** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vs. Controle; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,0001$; vs. DZP).



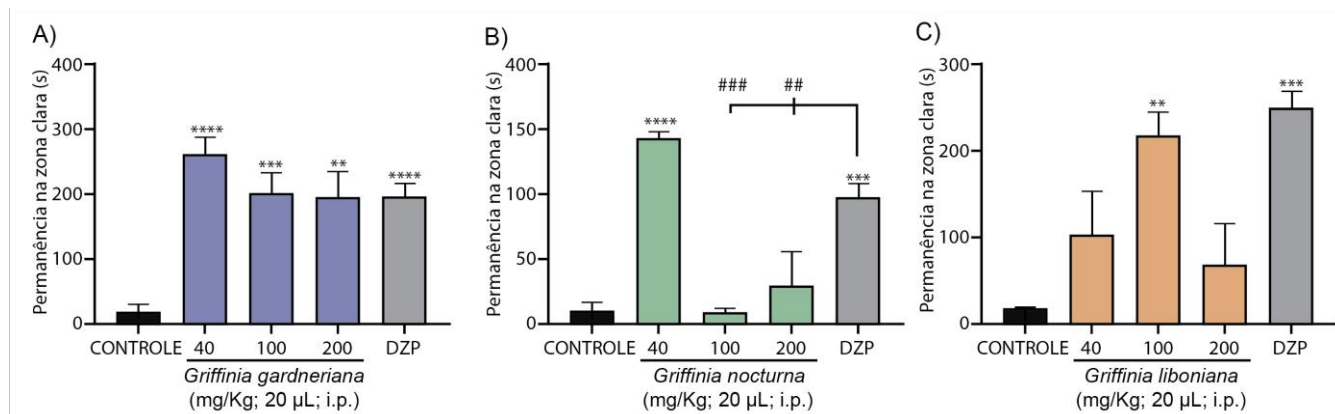
6.3.3 Atividade ansiolítica em *zebrafish*

O aparato claro-escuro é um dos testes pré-clínicos frequentemente empregado para triagem de drogas ansiolíticas (HASCOËT; BOURIN; NIC DHONNCHADHA, 2001). Baseia-se na tendência inata de animais que apresentam comportamento similar à ansiedade de escapar de um compartimento bem iluminado para um compartimento escuro, uma resposta antipredatória natural adaptativa induzida e observada facilmente em *zebrafish* adulto no aquário. Estudos de validação farmacológica foram conduzidos em *zebrafish* adulto e mostraram que os compostos ansiolíticos reduzem a preferência pelo compartimento escuro no peixe-zebra de forma semelhante ao que ocorre em roedores (MAXIMINO *et al.*, 2011). Deste modo, utilizou-se o teste do aparato claro/escuro para avaliar o efeito ansiolítico dos extratos em *zebrafish* adulto.

Os gráficos da Figura 35 mostram o tempo médio gasto em segundos pelo peixe-zebra (6 peixes por grupo) no compartimento claro do teste LDB após ser submetido a uma injeção intraperitoneal de extratos de alcalóides de *Griffinia* spp. (40, 100 e 200 mg/kg), diazepam (DPZ) 40 mg/kg ou DMSO 3% (CONTROL). Na figura é possível observar um aumento do tempo de permanência na zona clara dos peixes que receberam extratos de *Griffinia gardneriana* em todas as concentrações quando comparado com o tempo de permanência do grupo de controle. Naturalmente o mesmo ocorre com animais que receberam uma dose de DZP, um conhecido ansiolítico benzodiazepínico.

Nesse sentido, os grupos tratados com extratos de *Griffinia gardneriana* apresentaram um tempo de permanência semelhante ou até mesmo superior ao dos grupos que receberam DPZ em todas as concentrações. Por outro lado, o tempo de permanência na zona clara dos animais receberam DZP só pode ser comparado àqueles que receberam extratos alcaloídicos de *G. nocturna* na concentração de 40 mg/kg. De forma semelhante, a concentração de comparação entre DZP e o extrato de *Griffinia liboniana* é a de 100 mg/kg, ainda que o tempo de permanência na zona clara seja superior ao do grupo de controle em todas as concentrações.

Figura 35 - Tempo médio de permanência em segundos do zebrafish na zona clara do aquário quando submetido a diferentes tratamentos: A) *G. gardneriana*; B) *G. nocturna*; C) *G. liboniana*. (ANOVA e Tukey's test - ** $p < 0.0001$; *** $p < 0.0001$ **** $p < 0.0001$ vs. control; # $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ vs. DZP).



Muitos neurotransmissores são capazes de modular comportamentos na medida em que regulam as ações dos neurônios (HANDLEY, 1995; JIA; PITTMAN, 2014). É o caso do ácido gama-aminobutírico (GABA) e da serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT). O flumazenil (FMZ) é conhecido por antagonizar os efeitos dos benzodiazepínicos, uma vez que possui um perfil de seletividade na subunidade α receptor GABA_A semelhante ao DZP (HERDE *et al.*, 2017). Nesse sentido, a reversão do comportamento ansiolítico de animais pré-tratados com FMZ é um indicativo da presença de propriedades anti-ansiedade nos extratos de *Griffinia* spp. De forma semelhante, o pizotifeno (PZT) é conhecido por antagonizar os efeitos de ansiolíticos que atuam nos receptores de 5-HT₁ e 5-HT_{2A/2C}, como é o caso da fluoxetina (FLX) (GONÇALVES, 2020). Igualmente, a reversão do comportamento ansiolítico de animais pré-tratados com PZT é um indicativo da presença de propriedades ansiolíticas nos extratos.

A investigação sobre o mecanismo de ansiedade via neurotransmissão GABAérgica foi realizada através do pré-tratamento com FMZ. A menor dose que mostrou efeito ansiolítico de cada extrato foi analisada. Na Figura 36, foi observado que o pré-tratamento com flumazenil bloqueou o efeito ansiolítico de cada extrato e do diazepam, o que indica o envolvimento do sistema GABAérgico. Similarmente, a neuromodulação serotoninérgica dos extratos foi investigada através do pré-tratamento dos animais com pizotifeno (PZT), um conhecido antagonista dos receptores 5-HT₁ e 5-HT_{2A/2C}. A análise da Figura 37 indicou que os extratos das três espécies de *Griffinia* tiveram seus efeitos na ansiedade bloqueados pelos pré-

tratamento com PZT, indicando que os fitoquímicos presentes nos extratos modulam o efeito ansiolítico através dos receptores 5-HT₁ e ou 5-HT_{2A/2C}, efeito similar ao ocorrido com o fármaco padrão fluoxetina, que atua pela via serotoninérgica e também teve seus efeitos significativamente bloqueados. De uma maneira geral, esses resultados indicam um razoável potencial ansiolítico dos extratos de *Griffinia* spp., especialmente dos extratos de *Griffinia gardneriana*. Mais estudos se fazem necessários para compreender que substâncias podem ser responsáveis por essa atividade, bem como para a aprofundar a compreensão sobre os mecanismos de atuação.

Figura 36 - Efeito do pré-tratamento com flumazenil para animais tratados com os extratos alcaloídicos: A) *G. gardneriana*; B) *G. nocturna* e C) *G. liboniana* (ANOVA e Tukey test - ##### $p > 0,0001$ vs. *G. gardneriana* e *G. nocturna* e ## $p > 0,0001$ vs *G. liboniana*).

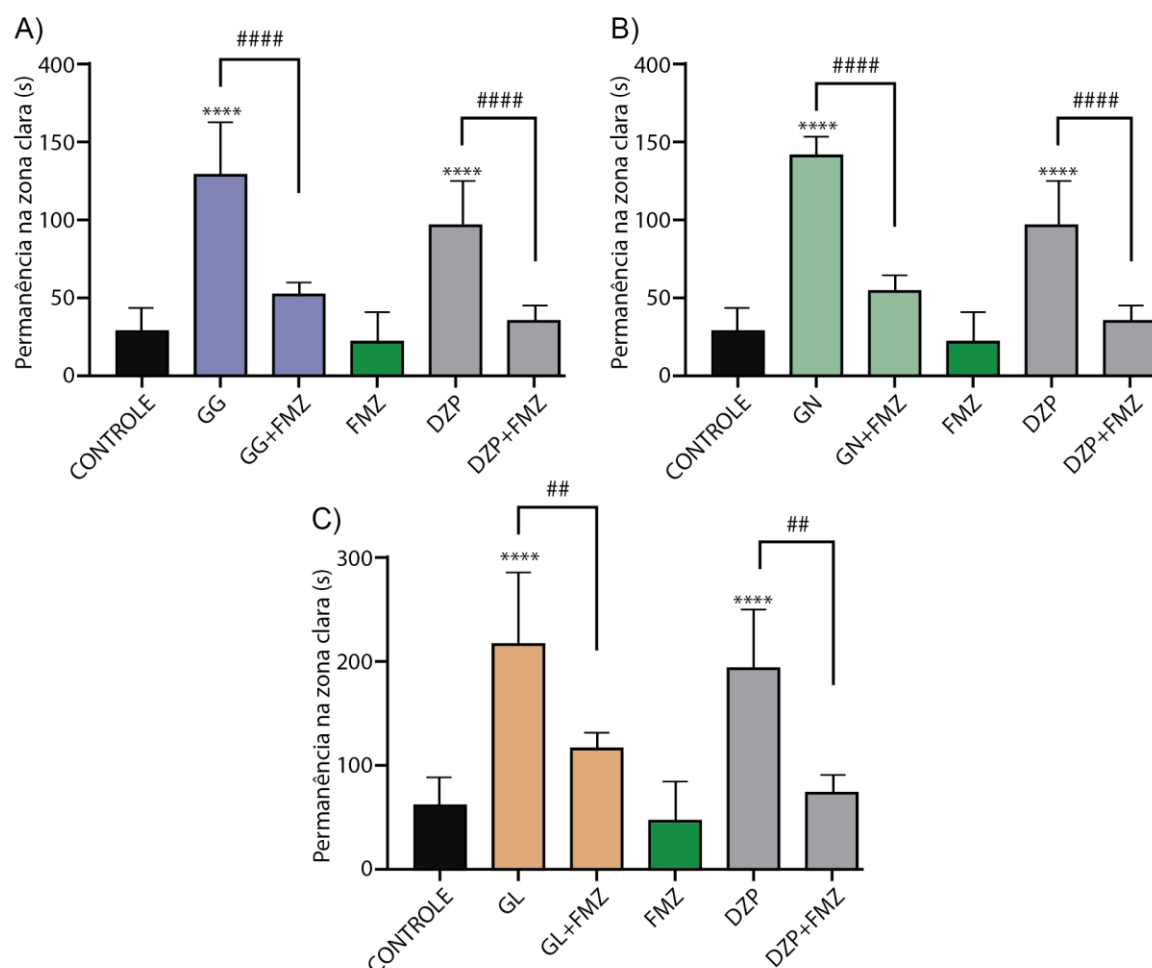
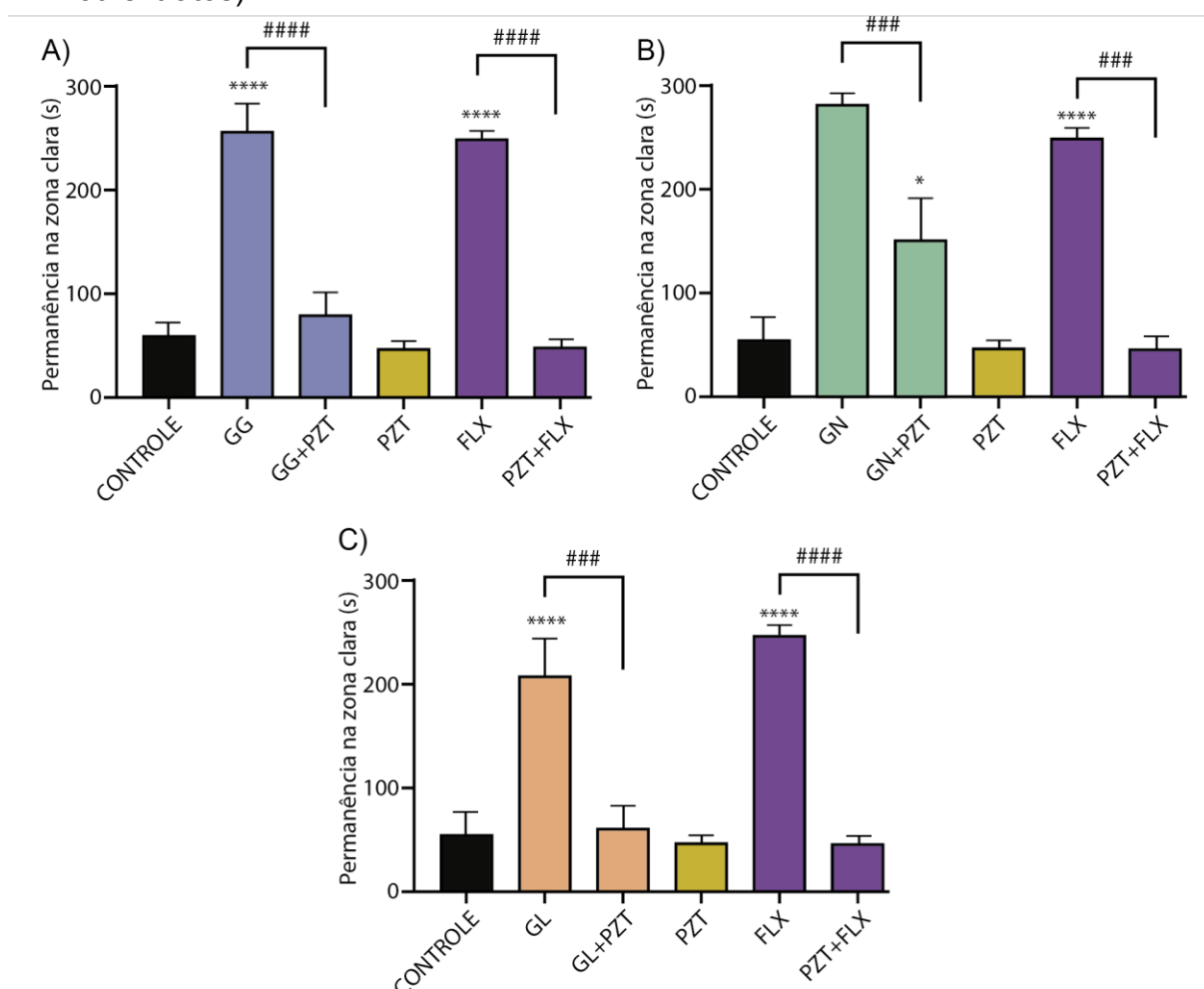


Figura 37 - Efeito do pré-tratamento com pizotifeno; A) *G. gardneriana*; B) *G. nocturna* e C) *G. liboniana* (ANOVA e Tukey test – ##### $p < 0,0001$, ### $p < 0,001$ vs. FLX ou extratos).



Vários estudos apontam uma diversidade de alcalóides como responsáveis por algum grau de atividade ansiolítica. Alstolina, piperina, annomontina, dl-tetraidropalmatina, berberina, mitragina e erisotrina estão entre os alcalóides oriundos de espécies botânicas conhecidos por suas propriedades ansiolíticas (PHOOTHAI et al., 2022; FARZAEI et al., 2016).

A montanina é a principal representante dos alcalóides de Amaryllidaceae dentre os alcalóides ansiolíticos. Extraída de espécies dos gêneros *Haemanthus*, *Hippeastrum Rhodophiala* e *Scadoxus* (MASI et al., 2019; SILVA et al., 2008; FARINON et al., 2017; CAHLÍKOVÁ et al., 2021), a montanina tem sido amplamente estudada quanto a diversas propriedades farmacológicas como atividades ansiolítica, anticonvulsivante, antidepressiva, anticolinesterásica, antitumoral, antirreumática, antibacteriana e antifúngica (KOUTOVÁ et al., 2020). Da Silva et al. (2006) investigou a atividade ansiolítica da montanina através do uso de

camundongos no modelo do labirinto elevado em cruz e do teste de campo aberto. A aplicação intraperitoneal da montanina 60 mg/kg resultou na redução do número de passagens no teste de campo aberto, enquanto a aplicação de 1,0 e 3,0 mg/kg i.p. foi capaz de aumentar de forma semelhante ao diazepam a quantidade de entradas e o tempo de permanência nos braços laterais do labirinto. O estudo sugere que o efeito se deve à atuação do alcalóide sobre o sistema GABAérgico.

Berkov *et al.* (2021) apresentou outro relato de atividade ansiolítica na família Amaryllidaceae. Nesse estudo, foi observado que camundongos machos permaneceram mais tempo nos braços laterais do labirinto elevado em cruz após a aplicação intraperitoneal de 50 mg/kg de um extrato de *Narcissus* cv. Hawera contendo 40,8% e 16,2% dos alcalóides 6-epi-mesembranol e 6-epi-mesembrenol, respectivamente, e 13,8% do alcalóide sanguinina, já reportado anteriormente como um potente anticolinesterásico (VIEGAS JUNIOR *et al.*, 2004). Já as fêmeas não mostraram nenhuma alteração no seu comportamento semelhante à ansiedade. A sanguinina é o único composto dentre os supracitados a ser identificado nas frações alcaloídicas analisadas no presente estudo (*G. gardneriana* e *G. noctura*).

6.4 Docagem molecular

Com a finalidade de avaliar quais compostos são possivelmente responsáveis pela atividade ansiolítica foi realizada a ancoragem molecular entre os alcalóides e receptores pertencentes aos sistemas serotoninérgico e GABAérgico. Os diversos compostos identificados foram submetidos ao acoplamento de conjunto ao receptor de serotonina 5HTR, depositado no *Protein Data Bank* (PDB) por Xie, Li e Chang (2016), e à estrutura 4F11 (GENG *et al.*, 2012) que corresponde ao segmento extracelular do receptor GABA humano. Desse modo foi possível determinar a pose (conformação e orientação) de menor energia e afinidade entre cada alcalóide e proteína-alvo. Esses valores encontram-se descritos em kJ/mol na Tabela 6.

Dentre as 26 estruturas analisadas, cinco apresentaram afinidade (<-7,00 kJ/mol) exclusivamente ao receptor GABAérgico: hordenina (**1**), norlicoramina (**8**), crinina (**10**), crinan3-ona (**13**) e undulatiana diol (**18**). Enquanto outros cinco compostos demonstraram potencial de ligação apenas com o receptor de serotonina: isômero de metiltiramina (**2**), 11,12-desidrolcorena (**3**), galantamina (**5**), pancratinina C (**14**) e haemantamina (**17**). Ademais, os compostos vitatina (**9a**), licorina (**20**) e 11,12-desidro-2-metoxiassoanina (**22**) demonstraram afinidade razoável com ambos

os receptores. A ancoragem digital entre esses últimos e os receptores 4F11 e 5HTR pode ser vista nas Figuras 38-43. Por fim, os compostos trisfaeridina (**4**), norlicoramina (**8**), narwedina (**10**), nerinina (**11**) e anidrolícorina (**12**) não mostraram possibilidade de ligação com o receptor serotoninérgico. Dentre os compostos que demonstraram afinidade de ligação, os tipos de esqueleto licorina (**3**, **20** e **22**) e haemantamina (**9a**, **13** e **17**) são os que mais se destacam, possuindo 3 integrantes cada. A eles seguem-se os tipos galantamina (**5** e **8**) e crinina (**10** e **18**), com dois representantes, e o tipo montanina representado exclusivamente pela pancratina C (**14**).

Tabela 6 - Afinidade de ligação e energia total com os receptores de 5-HT e GABA.

Compostos	5-HT		GABA	
	Afinidade	Energia Total	Afinidade	Energia Total
1 Hordenina	-6,352	-33,683	-7,845	12,173
2 Isômero de metiltiramina	-8,97	-4844,87	-6,21	-2148,75
3 11,12-Desidrolicorena	-8,33	-4841,83	-5,065	-18566
4 Trisfaeridina	Sem ligação		-5,987	-17562
5 Galantamina	-8,12	-4819,16	-5,64	-2089,82
6 Licoramina	-6,80	-4813,72	-5,27	-2121,23
7 Sanguinina	-6,980	-10,064	-5,87	-8956
8 Norlicoramina	Sem ligação		-7,01	-2122,59
9a Vitatina	-7,064	-23,254	-7,321	-13,962
9b Crinina	-6,987	-23,025	-7,288	-13,947
10 Narwedina	Sem ligação		-6,34	-2116,14
11 Nerinina	Sem ligação		-6,17	-2088,51
12 Anidrolícorina	Sem ligação		-5,80	-2082,34
13 Crinan-3-ona	-6,79	-4822,25	-7,00	-2138,91
14 Pancratina C	-7,67	-4794,98	-6,05	-2109,93
15 11,12-Desidroanidrolícorina	-6,11	-4783,00	-5,85	-2093,85
16 6 α -Hidroxihippeastidina	-6,85	-4769,77	-5,83	-18830,30
17 Haemantamina	-7,179	-32,004	-6,21	-2209,39
18 Undulatiana diol	-6,90	-4770,60	-7,27	-2088,63
19 11,12-Desidroassoanina	-6,37	-4764,89	-5,67	-2078,57
20 Licorina	-7,384	-39,592	-7,178	-25058
21 11,12-Desidro-2-metoxianidrolícorina	-6,48	-4786,88	-5,78	-19456
22 11,12-Desidro-2-metoxiassoanina	-8,433	-22,493	-7,859	-22,590
23 11,12-Desidro-2-hidroxiandrolícorina	-6,32	-4783,66	-5,76	-2093,70
24 11,12-Desidro-2-hidroxiassoanina	-6,33	-4777,60	-5,65	-2091,45
25 11,12-Dihidro-2-metoxipratosina	-6,88	-4762,98	-6,29	-2074,21

Figura 38 - Interação entre a vitatina e o receptor 5HTR.

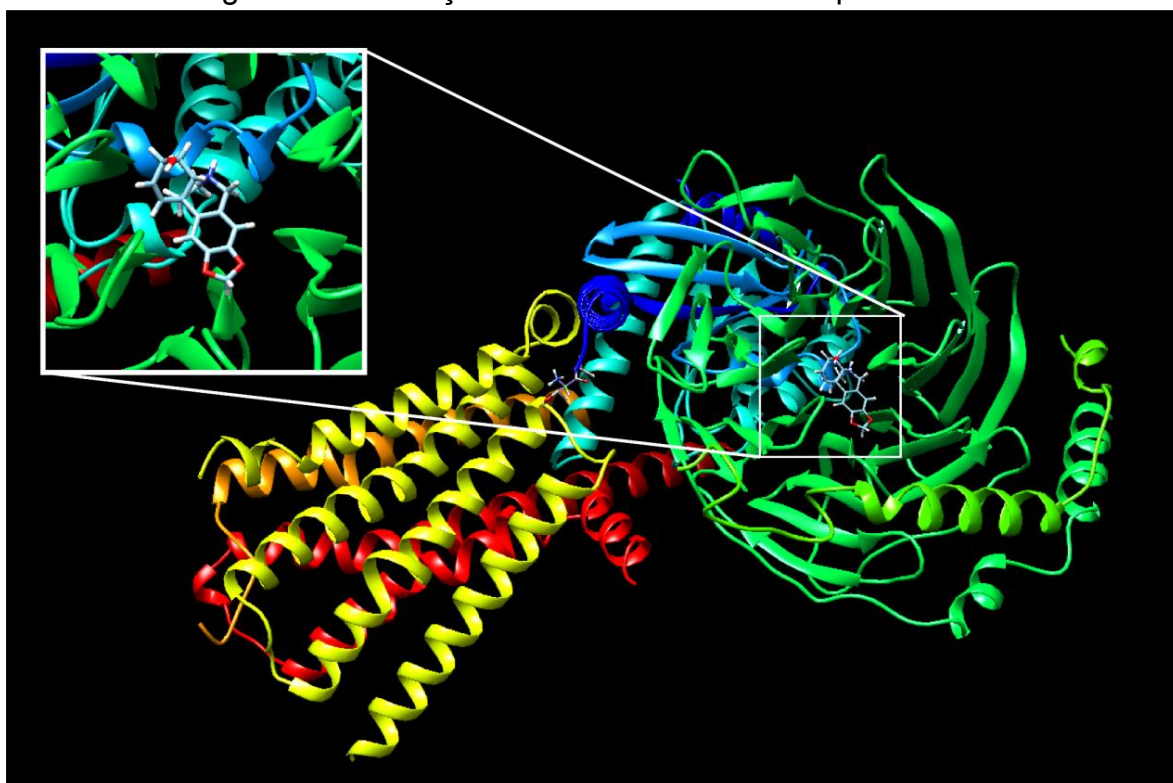


Figura 39 - Interação entre a vitatina e o receptor 4F11.

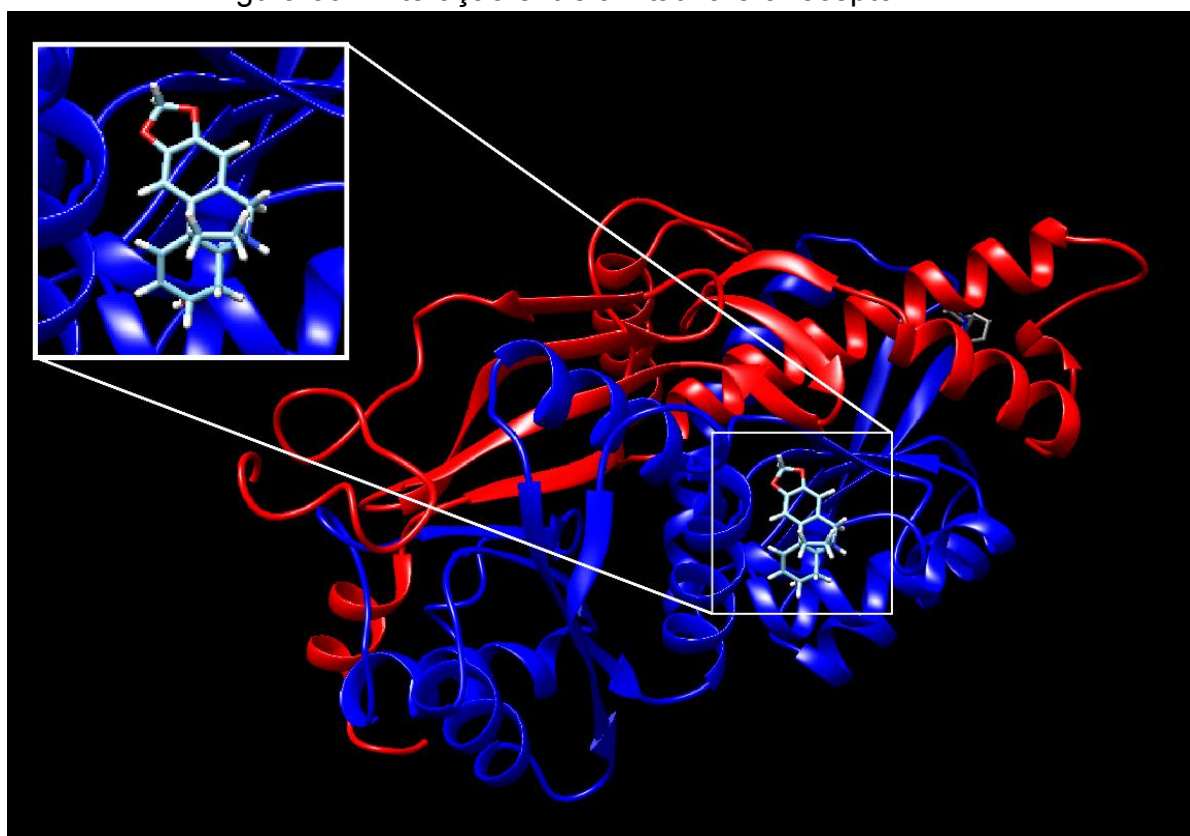


Figura 40 - Interação entre a licorina e o receptor 5HTR.

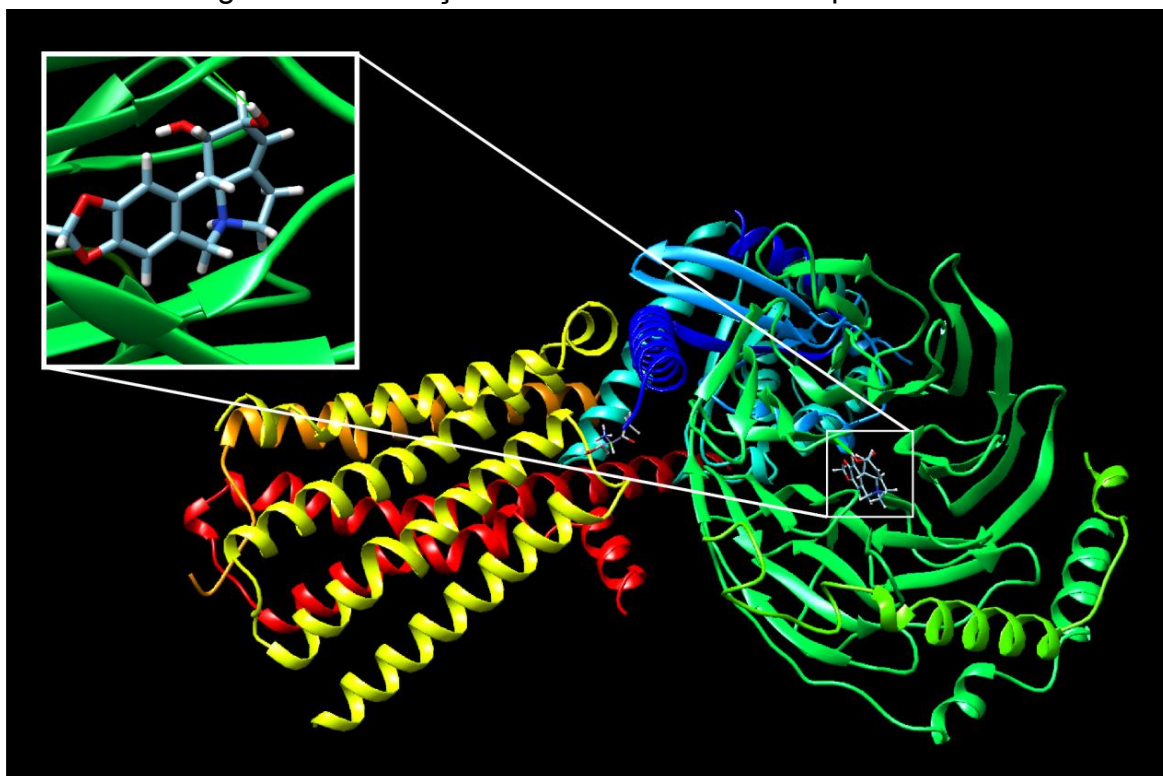


Figura 41 - Interação entre a licorina e o receptor 4F11.

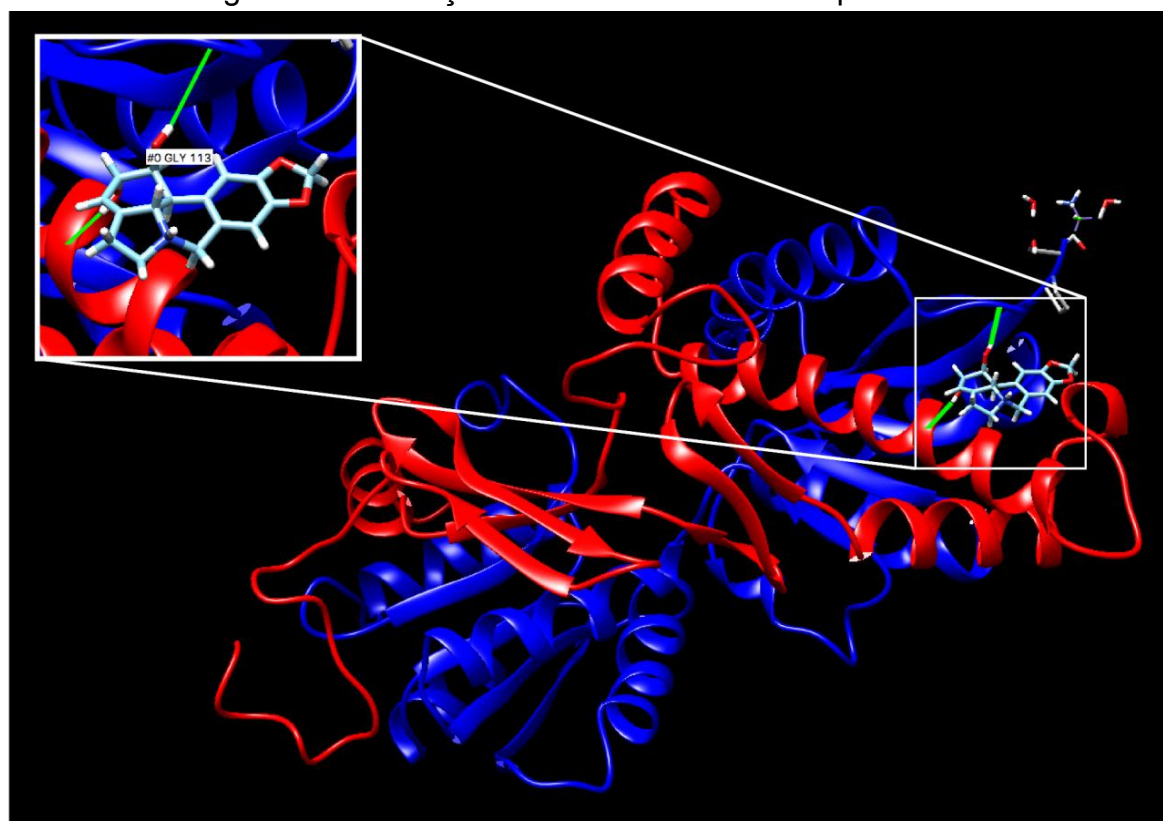


Figura 42 - Interação entre a 11,12-desidro-2-metoxiassoanina e o receptor 5HTR.

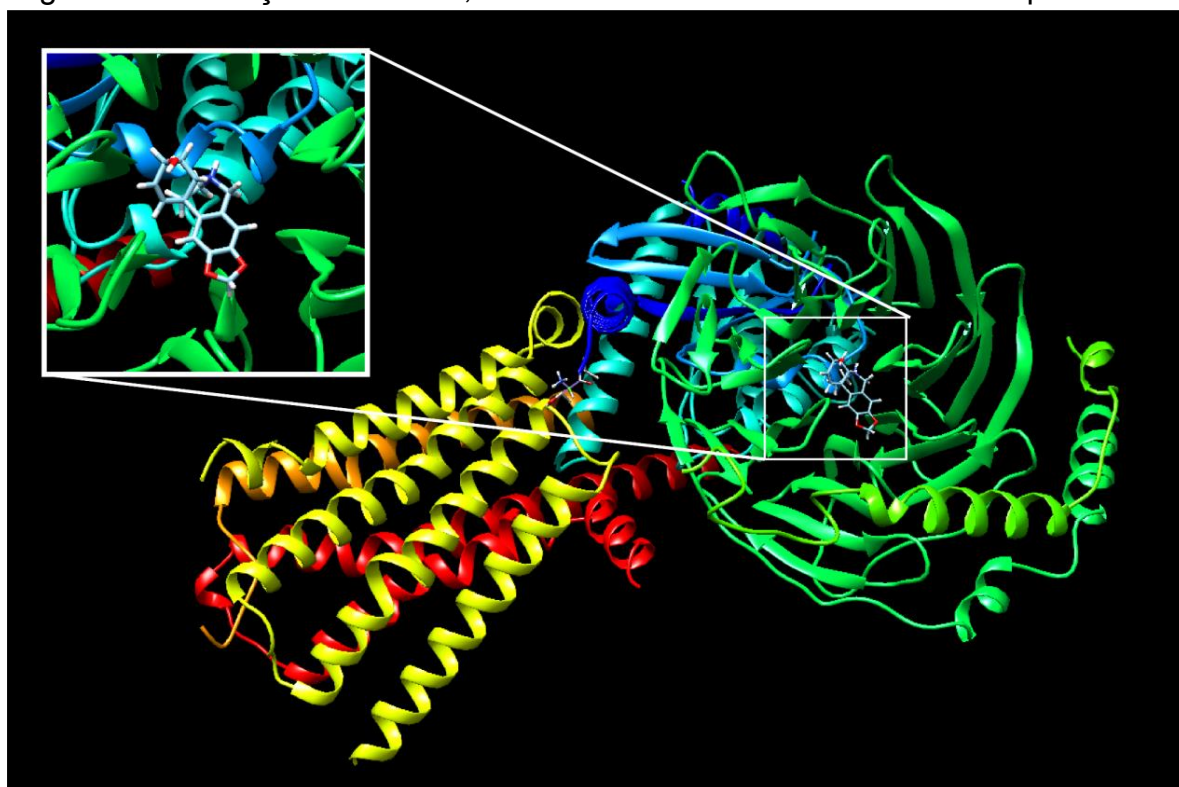
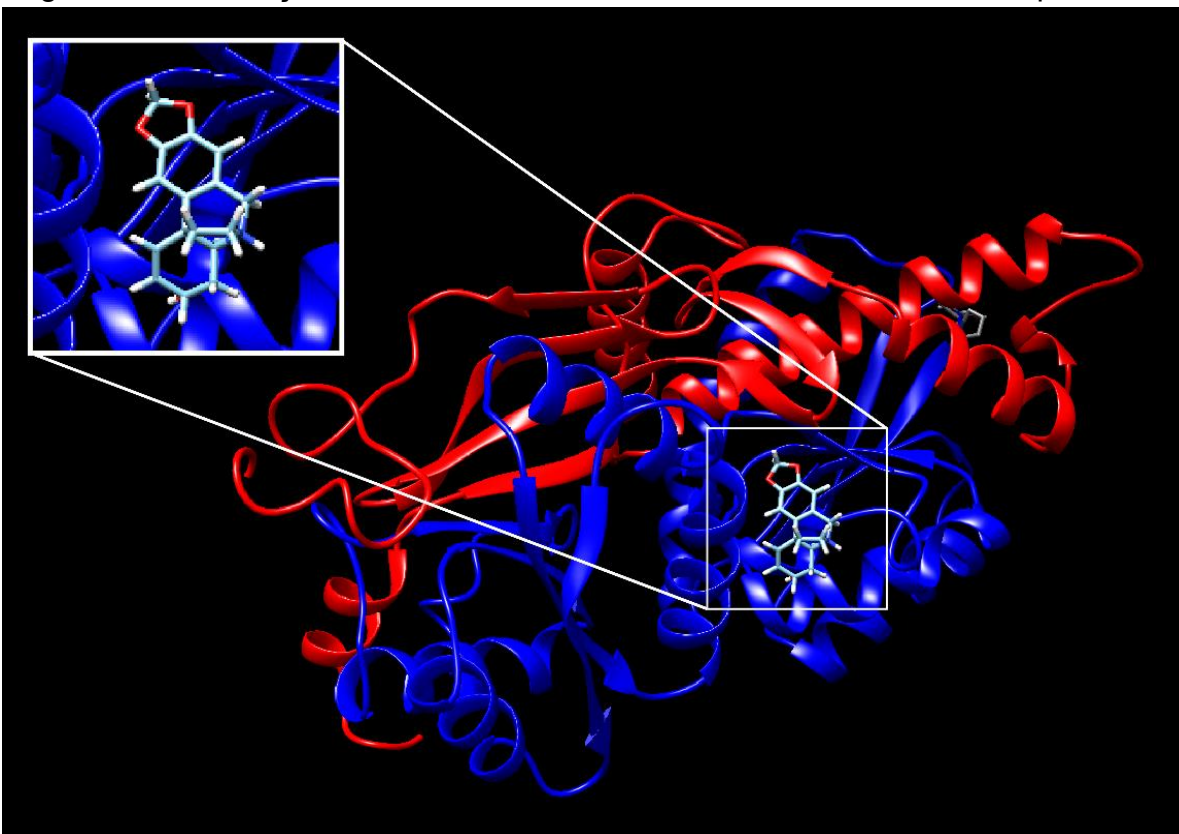


Figura 43 - Interação entre a 11,12-desidro-2-metoxiassoanina e o receptor 4F11.



7 CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu determinar a composição química e a atividade farmacológica de extratos alcaloídicos das espécies de *Griffinia liboniana*, *G. gardneriana* e *G. nocturna*, sendo o primeiro relato do perfil químico da espécie *G. liboniana* e um dos pioneiros na investigação do efeito ansiolítico de Amarilidáceas. O rendimento médio das extrações variou de 1,12-4,78 mg/g bulbo. As análises por CG-EM revelaram dois protoalcalóides: (1) hordeína e isômero de metiltiramina (2); e 23 alcalóides isoquinolínicos de Amaryllidaceae: isômero de 11,12-desidrolícorena (3), trisfaeredina (4), galantamina (5), licoramina (6), sanguinina (7), norlicoramina (8), vitatina/crinina (9a/9b), narwedina (10), nerinina (11), anidrolícorena (12), crinan-3-ona (13), pancratina C (14), 11,12-dehidroanidrolícorena (15), 6 α -hidroxihipeastridina (16), haemantamina (17), undulatiana diol (18), 11,12-desidroassoanina (19) e lícorena (20), 11,12-deshidro-2-metoxianidrolícorena (21), 11,12-desidro-2-metoxiassoanina (22), 11,12-desidro-2-hidroxianidrolícorena (23), 11,12-desidro-2-hidroxiassoanina (24) e 11,12-dihidro-2-metoxipratosina (25). Os alcalóides pertencentes ao tipo lícorena 11,12-desidro-2-hidroxianidrolícorena e 11,12-deshidro-2-metoxianidrolícorena estão sendo identificados pela primeira vez na literatura pelo melhor do nosso conhecimento. Os perfis químicos foram relativamente parecidos, sendo 8 alcalóides comuns às três espécies. *G. gardneriana* e *G. liboniana* exibiram a lícorena (20) como componente majoritário, enquanto *G. nocturna* teve o seu análogo desidratado anidrolícorena (12) como principal componente. Curiosamente, os perfis químicos de *G. gardneriana* e *G. liboniana* se mostram mais similares entre si do que com *G. nocturna*, apesar da proximidade filogenética maior entre *G. gardneriana* e *G. nocturna*.

Nosso estudo demonstrou o efeito ansiolítico de extratos de *Griffinia* spp. nas dosagens de 40 mg/kg (*G. nocturna* e *G. gardneriana*) e 100 mg/kg (*G. liboniana*), semelhante ao do diazepam em *zebrafish* (*Danio rerio*), usando o teste do aparato claro/escuro após a injeção intraperitoneal. Ademais, o pré-tratamento com flumazenil e pizotifeno foi capaz de reverter a atividade ansiolítica, o que indica o envolvimento dos sistemas GABAérgico e serotoninérgico no mecanismo de ação biológico das frações alcaloídicas. A docagem molecular mostrou que os compostos **9a**, **20** e **22** possuem boa afinidade com os receptores 5HTR e 4F11 (GABA humano), indicando que estes compostos são possivelmente os principais responsáveis pelo efeito ansiolítico. Em um futuro estudo, esperamos avaliar a ação

destas substâncias isoladamente, a fim de ratificar esta informação e assim contribuir para descoberta de novos fármacos ansiolíticos.

REFERÊNCIAS

- AKIMOVA, E.; LANZENBERGER, R.; KASPER, S. The Serotonin-1A Receptor in Anxiety Disorders. **Biological Psychiatry**, [S.L.], v. 66, n. 7, p. 627-635, out. 2009.
- ALMEIDA, M. Z. **Plantas medicinais: abordagem histórico-contemporânea**. In: Plantas Medicinais [online]. 3.ed. Salvador: EDUFBA, 2011, p. 34-66.
- ALVES-ARAÚJO, A.; DUTILH, J. H. A.; ALVES, M. Amaryllidaceae s.s. e Alliaceae s.s. no Nordeste Brasileiro. **Rodriguésia**, [S.L.], v. 60, n. 2, p. 311-331, 2009.
- AMIRKIA, V.; HEINRICH, M. Natural products and drug discovery: a survey of stakeholders in industry and academia. **Frontiers in Pharmacology**, [S.L.], v. 6, p. 1-8, 26 out. 2015.
- ANDRADE, J. P.; PIGNI, N. B.; TORRAS-CLAVERIA, L.; GUO, Y.; BERKOV, S.; REYES-CHILPA, R.; AMRANI, A.; ZUANAZZI, J. A. S.; CODINA, C.; VILADOMAT, F. Alkaloids from the *Hippeastrum* genus: chemistry and biological activity. **Revista Latinoamericana de Química**, Naucalpan de Juárez, v. 2, n. 40, p. 83-98. 2012.
- ATANASOV, A. G.; ZOTCHEV, S. B.; DIRSCH, V. M.; SUPURAN, C. T. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 200-216, 28 jan. 2021.
- BANDELOW, B.; MICHAELIS, S.; WEDEKIND, D. Treatment of anxiety disorders. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 93-107, 30 jun. 2017.
- BARBIERI, S. S.; SANDRINI, L.; MUSAZZI, L.; POPOLI, M.; IERACI, A. Apocynin Prevents Anxiety-Like Behavior and Histone Deacetylases Overexpression Induced by Sub-Chronic Stress in Mice. **Biomolecules**, [S.L.], v. 11, n. 6, p. 885, 15 jun. 2021.
- BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, [S.L.], v. 38, n. 8, p. 1083-1152, ago. 1999.
- BARROS, H. V. **Estudo do possível efeito de alcalóides obtidos a partir da secreção cutânea de *Rhinella jimi* e *R. icterica* na penetração do vírus da raiva em células de mamífero mediado pelo receptor nicotínico de acetilcolina**. 2013. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências - Toxinologia) - Instituto Butantan, São Paulo, 2013. Toxinologia), Instituto Butantan, São Paulo, 2019. 134 p.
- BATESON, M.; BRILOT, B.; NETTLE, D. Anxiety: an evolutionary approach. **The Canadian Journal of Psychiatry**, [S.L.], v. 56, n. 12, p. 707-715, dez. 2011.

BERKOV, S.; OSORIO, E.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J. Chemodiversity, chemotaxonomy and chemoecology of Amaryllidaceae alkaloids. **The Alkaloids: Chemistry and Biology**, [S.L.], p. 113-185, jan. 2020.

BERKOV, S.; PECHLIVANOVA, D.; DENEV, R.; NIKOLOVA, M.; GEORGIEVA, L.; SIDJIMOVA, B.; BAKALOV, D.; TAFRADJIISKA, R.; STOYNEV, A.; MOMEKOV, G. GC-MS analysis of Amaryllidaceae and Scelletium-type alkaloids in bioactive fractions from *Narcissus* cv. Hawera. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [S.L.], v. 35, n. 14, p. 1-26, 25 maio 2021.

BERKOV, S.; DENEV, R.; SIDJIMOVA, B.; ZAREV, Y.; SHKONDROV, A.; TORRAS-CLAVERIA, L.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J. Gas chromatography–mass spectrometry of some homolycorine-type Amaryllidaceae alkaloids. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [S.L.], v. 37, n. 12, p. e9506, 3 maio 2023.

BERKOV, S.; TORRAS-CLAVERIA, L.; VILADOMAT, F.; SUÁREZ, S.; BASTIDA, J. GC–MS of some lycorine-type Amaryllidaceae alkaloids. **Journal of Mass Spectrometry**, [S.L.], v. 56, n. 3, p. e4704, 8 fev. 2021.

BERKOV, S.; VILADOMAT, F.; CODINA, C.; SUÁREZ, S.; RAVELO, A.; BASTIDA, J. GC-MS of amaryllidaceous galanthamine-type alkaloids. **Journal of Mass Spectrometry**, [S.L.], v. 47, n. 8, p. 1065-1073, ago. 2012.

BESSA, C.; ANDRADE, J.; OLIVEIRA, R.; DOMINGOS, E.; SANTOS, H.; ROMÃO, W.; BASTIDA, J.; BORGES, W. Identification of Alkaloids from *Hippeastrum aulicum* (Ker Gawl.) Herb. (Amaryllidaceae) Using CGC-MS and Ambient Ionization Mass Spectrometry (PS-MS and LS-MS). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 819-830, jun. 2017.

BOTH, F. L.; MENEGHINI, L.; KERBER, V. A.; HENRIQUES, A. T.; ELISABETSKY, E. Psychopharmacological Profile of the Alkaloid Psychollatine as a 5HT_{2A/C} Serotonin Modulator. **Journal of Natural Products**, [S.L.], v. 68, n. 3, p. 374-380, 1 mar. 2005.

BOWERY, N. G. Historical Perspective and Emergence of the GABA_B Receptor. **GABA_B Receptor Pharmacology - A Tribute to Norman Bowery**, [S.L.], p. 1-18, 2010.

BOZKURT, B.; EMİR, A.; KAYA, G. I.; ÖNÜR, M. A.; BERKOV, S. Alkaloid Profiling of *Galanthus woronowii* Losinsk. by GC-MS and evaluation of its biological activity. **Marmara Pharmaceutical Journal**, [S.L.], v. 21, n. 4, p. 915-920, 3 out. 2017.

BRAGA, C. M. **Histórico da utilização de plantas medicinais**. 2011. 24 f. Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas)- Consórcio Setentrional de Educação a Distância, Universidade de Brasília, Universidade Estadual de Goiás, Brasília, 2011.

BRANDELLI, C. L. C. **Plantas medicinais: histórico e conceitos**. In: MONTEIRO, S. C.; BRANDELLI, C. L. C. **Farmacobotânica: aspectos teóricos e aplicação**. [S.I.]: Metha, 2017. Cap. 1. p. 1-13.

BRITO, T. M. **Validação da preferência claro/escuro como modelo comportamental de análise no *Carassius auratus* (peixe dourado)**. 2011. 27 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, Departamento de Psicobiologia, USP, Ribeirão Preto, 2011.

CAHLÍKOVÁ, L.; BENESOVÁ, N.; MACÁKOVA, K.; URBANOVÁ, K.; OPLETAL, L. GC/MS analysis of three Amaryllidaceae species and their cholinesterase activity. **Natural Product Communications**. Thousand Oaks, p. 1255-1258. set. 2021.

CAHLÍKOVÁ, L.; BREITEROVÁ, K.; OPLETAL, L. Chemistry and Biological Activity of Alkaloids from the Genus Lycoris (Amaryllidaceae). **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 20, p. 4797-4817, 19 out. 2020.

CAHLÍKOVÁ, L.; VRABEC, R.; PIDANÝ, F.; PEŘINOVÁ, R.; MAAFI, N.; MAMUN, A. A.; RITOMSKÁ, A.; WIJAYA, V.; BLUNDEN, G. Recent Progress on Biological Activity of Amaryllidaceae and Further Isoquinoline Alkaloids in Connection with Alzheimer's Disease. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 17, p. 5240-5268, 29 ago. 2021.

CAMPOS-ROCHA, A.; MEEROW, A. W.; LIMA, D. A. V. The rediscovery of *Griffinia alba* (Amaryllidaceae), a poorly known and endangered species. **Brittonia**, [S.L.], v. 71, n. 2, p. 134-143, 15 fev. 2019.

CARVALHO, K. R. **Alcalóides bioativos e fenólicos de *Hippeastrum solandriflorum* (Lindl.) - Amaryllidaceae**. 2014. 140 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, UFC, Fortaleza, 2014.

CASTILHOS, P. F.; BARBATO, P. R.; BOING, A. C. Prevalência e fatores associados à utilização de plantas medicinais e fitoterapia no Brasil. **Revista Fitos**, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 400-410, 5 maio 2023. Fiocruz - Instituto de Tecnologia em Farmacos.

CASTILHOS, T. S.; GIORDANI, R. B.; HENRIQUES, A. T.; MENEZES, F. S.; ZUANAZZI, J. A. S. Avaliação in vitro das atividades anti-inflamatória, antioxidante e

antimicrobiana do alcalóide montanina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 17, n. 2, p. 209-214, jun. 2007.

CAVALLIERI, K. **Estudo químico e avaliação biológica dos alcalóides presentes em *Erythrina mulungu* (FABACEAE)**. 2019. 132 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

CHONG, J.; WISHART, D. S.; XIA, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, [S.L.], v. 68, n. 1, p. 68-86, 20 set. 2019.

COLE, E. R. 2018. Tese (Doutorado em Química) **Alcaloides dos Bulbos das Espécies *Griffinia gardneriana* (Herb.) Ravenna e *Habranthus itabrinus* Ravenna (Amaryllidaceae): Perfil Químico e Propriedades Citotóxicas e Genotóxicas** – Departamento de Química, Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, p. 86. 2018.

CORTES, N.; ALVAREZ, R.; OSORIO, E. H.; ALZATE, F.; BERKOV, S.I.; OSORIO, E. Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five Amaryllidaceae plants. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S.L.], v. 102, p. 222-228, jan. 2015.

COSTA-CAMPOS, L.; DASSOLER, S. C.; RIGO, A. P.; IWU, M.; ELISABETSKY, E. Anxiolytic properties of the antipsychotic alkaloid alstonine. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S.L.], v. 77, n. 3, p. 481-489, mar. 2004.

COSTA, C. O.; BRANCO, J. C.; VIEIRA, I. S.; SOUZA, L. D. M.; SILVA, R. A. Prevalência de ansiedade e fatores associados em adultos. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, [S.L.], v. 68, n. 2, p. 92-100, jun. 2019.

CROWE, S. F; STRANKS, E. K. The Residual Medium and Long-term Cognitive Effects of Benzodiazepine Use: an updated meta-analysis. **Archives of Clinical Neuropsychology**, [S.L.], v. 33, n. 7, p. 901-911, 13 dez. 2017.

DUTILH, J. H. A; CAMPOS-ROCHA, A.; SASSONE, A. B.; OLIVEIRA, R. S.; GIUSSANI, L. M.; MEEROW, A. W.; SEMIR, J.; STREHER, N. S.; GARCIA, N. 2020. **Griffinia** in Flora do Brasil. 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

ELISABETSKY, E.; COSTA-CAMPOS, L. The Alkaloid Alstonine: a review of its pharmacological properties. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 39-48, 2006.

ENGEL, T. B. J. **Estudos cariotípicos em *Griffinia* Ker Gawl e espécies relacionadas (Amaryllidaceae)**. 2014. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Unicamp., Campinas, 2014.

FAJEMIROYE, J. O.; SILVA, D. M.; OLIVEIRA, D. R. de; COSTA, E. Treatment of anxiety and depression: medicinal plants in retrospect. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, [S.L.], v. 30, n. 3, p. 198-215, 4 mar. 2016.

FARINON, M.; CLARIMUNDO, V. S.; PEDRAZZA, G. P. R.; GULKO, P. S.; ZUANAZZI, J. A.; XAVIER, R. M.; OLIVEIRA, P. G. Disease modifying anti-rheumatic activity of the alkaloid montanine on experimental arthritis and fibroblast-like synoviocytes. **European Journal of Pharmacology**, [S.L.], v. 799, p. 180-187, mar. 2017.

FARZAEI, M. H.; BAHRAMSOLTANI, R.; RAHIMI, R.; ABBASABADI, F.; ABDOLLAHI, M. A Systematic Review of Plant-Derived Natural Compounds for Anxiety Disorders. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 16, n. 17, p. 1924-1942, 29 abr. 2016.

FATTORUSSO, E.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. **Modern Alkaloids**. Napoli: Wiley-Vch, 2007. 689 p.

FELICE, D.; CRYAN, J. F.; O'LEARY, O. F. GABA_B Receptors: anxiety and mood disorders. **Behavioral Neurobiology of GABA_B Receptor Function**, [S.L.], p. 241-265, 2020.

FELIPE, F. C. B.; SOUSA FILHO, J. T.; SOUZA, L. E. O.; SILVEIRA, J. A.; UCHOA, D. E. A.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; VIANA, G. S. B. Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. **Phytomedicine**, [S.L.], v. 14, n. 9, p. 605-612, set. 2007.

FERREIRA, M. K. A.; SILVA, A. W.; MOURA, A. L. S.; SALLES, K. V. B.; MARINHO, E. M.; CARDOSO, J. M. N.; MARINHO, M. M.; BANDEIRA, P. N.; MAGALHÕES, F. E. A.; MARINHO, E. S.; MENEZES, J. E. S.; SANTOS, H. S. Chalcones reverse the anxiety and convulsive behavior of adult zebrafish. **Epilepsy Behav**, [s. l.], v. 117, p. 107881, 2021.

FILGUEIRAS, T. S.; PEIXOTO, A. L. Flora e vegetação do Brasil na carta de Caminha. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 3, p. 263-272, 2002.

FLINT, A. J.; PEASLEY-MIKLUS, C.; PAPADEMETRIOU, E.; MEYERS, B. S.; MULSANT, B. H.; ROTHSCHILD, A. J.; WHYTE, E. M. Effect of age on the frequency of anxiety disorders in major depression with psychotic features. **The**

American Journal of Geriatric Psychiatry, [S.L.], v. 18, n. 5, p. 404-412, maio 2010.

GEBAUER, D. L. PAGNUSSAT, N.; PIATO, A. L.; SCHAEFER, I. C.; BONAN, C. D.; LARA, D. R. Effects of anxiolytics in zebrafish: Similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 99, n. 3, p. 480–486, 2011.

GELFUSO, E.; ROSA, D.; FACHIN, A.; MORTARI, M.; CUNHA, A.; BELEBONI, R. Anxiety: a systematic review of neurobiology, traditional pharmaceuticals and novel alternatives from medicinal plants. **CNS and Neurological Disorders - Drug Targets**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 150-165, fev. 2014.

GENG, Y.; XIONG, D.; MOSYAK, L.; MALITO, D. L.; KNIAZEFF, J.; CHEN, Y.; BURMAKINA, S.; QUICK, M.; BUSH, M.; A JAVITCH, Jonathan. Structure and functional interaction of the extracellular domain of human GABA_B receptor GBR2. **Nature Neuroscience**, [S.L.], v. 15, n. 7, p. 970-978, 3 jun. 2012.

GILHOTRA, N.; DHINGRA, D. Possible involvement of GABAergic and nitriergic systems for antianxiety-like activity of piperine in unstressed and stressed mice. **Pharmacological Reports**, [S.L.], v. 66, n. 5, p. 885-891, out. 2014.

GOLLOSHI, A.; KAPIDANI, G.; LIKA, M.; DAUTI, A.; PUPULEKU, B.; KALLAJXHIU, N.; JANCE, A.; BREÇANI, M.; TURKU, S. The Palynomorphological Characteristics of Amaryllidaceae in Albania. J. Int. **Environmental Application and Science**, Elbasan, v. 12, n. 4, p. 318-324, mar. 2017.

GONÇALVES, N. G. G.; DE ARAJÚO, J. I. F.; MAGALHÃES, F. E. A.; MENDES, F. R. S.; LOBO, M. D. P.; MOREIRA, A. C. O. M.; MOREIRA, R. A. Protein fraction from *Artocarpus altilis* pulp exhibits antioxidant properties and reverses anxiety behavior in adult zebrafish via the serotonergic system. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 66, n. April 2019, p. 103772, 2020.

GORDON, J. A.; HEN, R. The Serotonergic System and Anxiety. **Neuromolecular Medicine**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 027-040, 2004.

GRENIER, S.; PAYETTE, M.-C.; GUNTHER, B.; ASKARI, S.; DESJARDINS, F. F.; RAYMOND, B.; BERBICHE, D. Association of age and gender with anxiety disorders in older adults: a systematic review and meta :analysis. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, [S.L.], v. 34, n. 3, p. 397-407, 10 dez. 2018.

GROSS, C.; HEN, R. The developmental origins of anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, [S.L.], v. 5, n. 7, p. 545-552, jul. 2004.

HAMPEL, H.; MESULAM, M. M.; CUELLO, A. C.; FARLOW, M. R.; GIACOBINI, E.; GROSSBERG, G. T.; KHACHATURIAN, A. S.; VERGALLO, A.; CAVEDO, E.; SNYDER, P. J. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. **Brain**, [S.L.], v. 141, n. 7, p. 1917-1933, 29 mai. 2018.

HAN, H.; MA, Y.; EUN, J. S.; LI, R.; HONG, J.-T.; LEE, M.-K.; OH, K.-W. Anxiolytic-like effects of sanjoinine A isolated from *Zizyphi Spinosi* Semen: possible involvement of gabaergic transmission. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S.L.], v. 92, n. 2, p. 206-213, abr. 2009.

HANNON, J.; HOYER, D. Molecular biology of 5-HT receptors. **Behavioural Brain Research**, [S.L.], v. 195, n. 1, p. 198-213, dez. 2008.

HANRAHAN, J. R.; CHEBIB, M.; JOHNSTON, G. A. R. Flavonoid modulation of GABA_A receptors. **British Journal of Pharmacology**, [S.L.], v. 163, n. 2, p. 234-245, 18 abr. 2011.

HAO, B.; SHEN, S.-F.; ZHAO, Q.-J. Cytotoxic and Antimalarial Amaryllidaceae Alkaloids from the Bulbs of *Lycoris radiata*. **Molecules**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 2458-2468, 25 fev. 2013.

HASCOËT, M.; BOURIN, M.; NIC DHONNCHADHA, B. A. The mouse light-dark paradigm: A review. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 141-166, 2001.

HAZIM, A. I.; RAMANATHAN, S.; PARTHASARATHY, S.; MUZAIMI, M.; MANSOR, S. M. Anxiolytic-like effects of mitragynine in the open-field and elevated plus-maze tests in rats. **The Journal of Physiological Sciences**, [S.L.], v. 64, n. 3, p. 161-169, 25 jan. 2014.

HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. **Alcalóides: generalidades e aspectos básicos**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da Ufsc/Editora da Ufrgs, 2010. Cap. 29. p. 765-791.

HERDE, A. M.; BENKE, D.; RALVENIUS, W. T.; MU, L.; SCHIBLI, R.; ZEILHOFER, H. U.; KRÄMER, S. D. GABA_A receptor subtypes in the mouse brain: regional mapping and diazepam receptor occupancy by in vivo [¹⁸F] flumazenil pet. **Neuroimage**, [S.L.], v. 150, n. 1, p. 279-291, abr. 2017.

HEINRICH, M.; MAH, J.; AMIRKIA, V. Alkaloids Used as Medicines: structural phytochemistry meets biodiversity: an update and forward look. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 7, p. 1836, 25 mar. 2021.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the Elevated Plus-Maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S.L.], v. 54, n. 1, p. 21-30, maio 1996.

HOOD, Sean David; NORMAN, Amanda; HINCE, Dana Adelle; MELICHAR, Jan Krzysztof; HULSE, Gary Kenneth. Benzodiazepine dependence and its treatment with low dose flumazenil. **British Journal of Clinical Pharmacology**, [S.L.], v. 77, n. 2, p. 285-294, 22 jan. 2014.

HORN, P. J.; WUYEK, L. A. Anxiety disorders as a risk factor for subsequent depression. **International Journal of Psychiatry in Clinical Practice**, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 244-247, 12 out. 2010.

JOHNSTON, G. A. R.; HANRAHAN, J. R.; CHEBIB, M.; DUKE, R. K.; MEWETT, K. N. Modulation of Ionotropic GABA Receptors by Natural **Products of Plant Origin**. GABA, [S.L.], p. 285-316, 2006.

KA, S.; KOIRALA, M.; MÉRINDOL, N.; DESGAGNÉ-PENIX, I. Biosynthesis and Biological Activities of Newly Discovered Amaryllidaceae Alkaloids. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 21, p. 1-17, 23 out. 2020.

KALUEFF, A. V.; NUTT, D. J. Role of GABA in anxiety and depression. **Depression and Anxiety**, [S.L.], v. 24, n. 7, p. 495-517, 2007.

KARIM, N.; KHAN, I.; ABDELHALIM, A.; HALIM, S. A.; KHAN, A.; AL-HARRASI, A. Stigmasterol can be new steroidal drug for neurological disorders: evidence of the GABAergic mechanism via receptor modulation. **Phytomedicine**, [S.L.], v. 90, p. 153646, set. 2021.

KAUFMAN, D. L.; HOUSER, C. R.; TOBIN, A. J. Two Forms of the Gama-Aminobutyric Acid Synthetic Enzyme Glutamate Decarboxylase Have Distinct Intraneuronal Distributions and Cofactor Interactions. **Journal of Neurochemistry**, [S.L.], v. 56, n. 2, p. 720-723, fev. 1991.

KEROS, S.; HABLITZ, J. J. Subtype-Specific GABA Transporter Antagonists Synergistically Modulate Phasic and Tonic GABA_A Conductances in Rat Neocortex. **Journal of Neurophysiology**, [S.L.], v. 94, n. 3, p. 2073-2085, set. 2005.

KERR, G W. Tricyclic antidepressant overdose: a review. **Emergency Medicine Journal**, [S.L.], v. 18, n. 4, p. 236-241, 1 jul. 2001.

KHOM, S.; STROMMER, B.; SCHÖFFMANN, A.; HINTERSTEINER, J.; BABURIN, I.; ERKER, T.; SCHWARZ, T.; SCHWARZER, C.; ZAUGG, J.; HAMBURGER, M.

GABA_A receptor modulation by piperine and a non-TRPV1 activating derivative. **Biochemical Pharmacology**, [S.L.], v. 85, n. 12, p. 1827-1836, jun. 2013.

KILGORE, M. B.; KUTCHAN, T. M. The Amaryllidaceae alkaloids: biosynthesis and methods for enzyme discovery. **Phytochemistry Reviews**, [S.L.], v. 15, n. 3, p. 317-337, 17 dez. 2015.

KNOX, D. The role of basal forebrain cholinergic neurons in fear and extinction memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, [S.L.], v. 133, p. 39-52, set. 2016.

KORNIENKO, A.; EVIDENTE, A. Chemistry, Biology, and Medicinal Potential of Narciclasine and its Congeners. **Chemical Reviews**, [S.L.], v. 108, n. 6, p. 1982-2014, 20 mai. 2008.

KOUTOVÁ, D.; MAAFI, N.; HAVELEK, R.; OPLETAL, L.; BLUNDEN, G.; ŘEZÁČOVÁ, M.; CAHLÍKOVÁ, L. Chemical and Biological Aspects of Montanine-Type Alkaloids Isolated from Plants of the Amaryllidaceae Family. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 10, p. 2337, 16 mai. 2020.

KUMAR, V.; BHAT, Z. A.; KUMAR, D. Animal models of anxiety: a comprehensive review. **Journal Of Pharmacological And Toxicological Methods**, [S.L.], v. 68, n. 2, p. 175-183, set. 2013.

LEE, Bombi; SHIM, Insop; LEE, Hyejung; HAHM, Dae-Hyun. Berberine alleviates symptoms of anxiety by enhancing dopamine expression in rats with post-traumatic stress disorder. **The Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 183, 2018.

LEE, S.-E.; LEE, Y.; LEE, G. H. The regulation of glutamic acid decarboxylases in GABA neurotransmission in the brain. **Archives of Pharmacal Research**, [S.L.], v. 42, n. 12, p. 1031-1039, 30 nov. 2019.

LEUNG, W. C.; ZHENG, H.; HUEN, M.; LAW, S. L.; XUE, H. Anxiolytic-like action of orally administered dl-tetrahydropalmatine in elevated plus-maze. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 775-779, ago. 2003.

LIU, G. Q.; ALGERI, S.; GARATTINI, S. D-L-tetrahydropalmatine as monoamine depletor. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**. Gent, p. 39-50. jul. 1982.

LIU, M.; HUANG, H.-H.; YANG, J.; SU, Y.-P.; LIN, H.-W.; LIN, L.-Q.; LIAO, W.-J.; YU, C.-X. The active alkaloids of *Gelsemium elegans* Benth. are potent anxiolytics. **Psychopharmacology**, [S.L.], v. 225, n. 4, p. 839-851, 5 out. 2012.

MA, Y.; HAN, H.; EUN, J. S.; KIM, H.-C.; HONG, J.-T.; OH, K.-W. Sanjoinine A Isolated from *Zizyphi Spinosi* Semen Augments Pentobarbital-Induced Sleeping Behaviors through the Modification of GABA-ergic Systems. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [S.L.], v. 30, n. 9, p. 1748-1753, 2007.

MADALENO, I. M. Plantas medicinais consumidas em Cochim, no século XVI e na atualidade. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**. Ciências Humanas, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 109-142, abr. 2015.

MAMBRO, L.; SOUZA, N. Vasconcelos.; SILVA, W. M. B. Atividade de alcaloides inibidores da acetilcolinesterase no tratamento da doença de Alzheimer: uma revisão sistemática. **Journal of Health and Biological Sciences**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1, 22 nov. 2022. Instituto para o Desenvolvimento da Educação.

MASI, M.; VAN SLAMBROUCK, S.; GUNAWARDANA, S.; VAN RENSBURG, M. J.; JAMES, P. C.; MOCHEL, J. G.; HELISO, P. S.; ALBALAWI, A. S.; CIMMINO, A.; VAN OTTERLO, W. A. L. Alkaloids isolated from *Haemanthus humilis* Jacq., an indigenous South African Amaryllidaceae: anticancer activity of coccinine and montanine. **South African Journal of Botany**, [S.L.], v. 126, p. 277-281, nov. 2019.

MAXIMINO, C.; DA SILVA, A. W. B.; GOUVEIA JUNIOR, A.; HERCULANO, A. M. Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], 2011.

MEI, L.; ZHOU, Y.; SUN, Y.; LIU, H.; ZHANG, D.; LIU, P.; SHU, H. Acetylcholine Muscarinic Receptors in Ventral Hippocampus Modulate Stress-Induced Anxiety-Like Behaviors in Mice. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [S.L.], v. 13, p. 1-12, 15 dez. 2020.

MINEUR, Y. S.; CAHUZAC, E. L.; MOSE, T. N.; BENTHAM, M. P.; PLANTENGA, M. E.; THOMPSON, D. C.; PICCIOTTO, M. R. Interaction between noradrenergic and cholinergic signaling in amygdala regulates anxiety- and depression-related behaviors in mice. **Neuropsychopharmacology**, [S.L.], v. 43, n. 10, p. 2118-2125, 22 fev. 2018.

MIZUTA, K.; XU, D.; PAN, Y.; COMAS, G.; SONETT, J. R.; ZHANG, Y.; PANETTIERI, R. A.; YANG, J.; EMALA, C. W. GABA_A receptors are expressed and facilitate relaxation in airway smooth muscle. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, [S.L.], v. 294, n. 6, p. 1206-1216, jun. 2008.

MORAES, C. T. **Estudo fitoquímico das partes aéreas de *Worsleya procera* (Lem.) Traub (Amaryllidaceae)**. 2016. 186 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química, UFES, Vitória, 2016.

MURPHY, S. E. Using Functional Neuroimaging to Investigate the Mechanisms of Action of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs). **Current Pharmaceutical Design**, [S.L.], v. 16, n. 18, p. 1990-1997, 1 jun. 2010.

NAIR, J. J.; VAN STADEN, J. Antiviral alkaloid principles of the plant family Amaryllidaceae. **Phytomedicine**, [S.L.], v. 108, p. 154480, jan. 2023.

NAIR, J. J.; VAN STADEN, J. Insight to the antifungal properties of Amaryllidaceae constituents. **Phytomedicine**, [S.L.], v. 73, p. 152753, jul. 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**, [S.L.], v. 83, n. 3, p. 770-803, 12 mar. 2020.

NICHIO-AMARAL, R.; CAMPOS-ROCHA, A.; ALVES-ARAÚJO, A. Flora do Espírito Santo: amaryllidaceae. **Rodriguésia**, [S.L.], v. 71, p. 1-26, fev. 2020.

OFFIDANI, E.; GUIDI, J.; TOMBA, E.; FAVA, G. A. Efficacy and Tolerability of Benzodiazepines versus Antidepressants in Anxiety Disorders: a systematic review and meta-analysis. **Psychotherapy And Psychosomatics**, [S.L.], v. 82, n. 6, p. 355-362, 2013.

OHNO, Y. New Insight into the Therapeutic Role of 5-HT_{1A} Receptors in Central Nervous System Disorders. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 148-157, 1 jun. 2010.

OLIVEIRA, M. V. L. **Estudo químico em alcalóides de *Hippeastrum reginae* (L.) Herb. (Amaryllidaceae)**. 2017. 140 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFES, Vitória, 2017.

PAIVA, J. **Estudo dos alcalóides de amaryllidaceae e sua correlação com a atividade anti-acetilcolinesterase**. 2019. 148 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

PENG, W.-H.; WU, C.-R.; CHEN, C.-S.; CHEN, C.-F.; LEU, Z.-C.; HSIEH, M.-T. Anxiolytic effect of berberine on exploratory activity of the mouse in two experimental anxiety models: interaction with drugs acting at 5-HT receptors. **Life Sciences**, [S.L.], v. 75, n. 20, p. 2451-2462, out. 2004.

PHOOTHAN, N.; YONGPARNICHKUL, N.; FANG, Z.; GAN, R. Y.; ZHANG, P. Plants and phytochemicals potentials in tackling anxiety: a systematic review. **Phytomedicine Plus**, [S.L.], v. 2, n. 4, p. 100375, nov. 2022.

PICCIOTTO, M. R.; LEWIS, A. S.; VAN SCHALKWYK, G. I.; MINEUR, Y. S. Mood and anxiety regulation by nicotinic acetylcholine receptors: a potential pathway to modulate aggression and related behavioral states. **Neuropharmacology**, [S.L.], v. 96, p. 235-243, set. 2015.

PYTIAK, M.; VARGOVÁ, V.; MECHÍROVÁ, V.; FELŐCI, M. Serotonin Receptors – From Molecular Biology to Clinical Applications. **Physiological Research**, [S.L.], p. 15-25, 14 fev. 2011.

RAPAPORT, M. H.; CLARY, C.; FAYYAD, R.; ENDICOTT, J. Quality-of-Life Impairment in Depressive and Anxiety Disorders. **American Journal of Psychiatry**, [S.L.], v. 162, n. 6, p. 1171-1178, jun. 2005.

REJÓN-ORANTES, J.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A.; LAMORA, M.; ROLDAN, G. R.; CORTES, D. Annomontine, an Alkaloid Isolated from *Annona purpurea*, Has Anxiolytic-Like Effects in the Elevated Plus-Maze. **Planta Medica**, [S.L.], v. 77, n. 04, p. 322-327, 1 out. 2010.

ROCHA, L. P. B.; ALVES, J. V. O.; AGUIAR, I. F. S.; SILVA, F. H.; SILVA, R. L.; ARRUDA, L. G.; NASCIMENTO FILHO, E. J.; BARBOSA, B. V. D. R.; AMORIM, L. C.; SILVA, P. M.; SILVA, M. V. Uso de plantas medicinais: Histórico e relevância. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, [S. l.], v. 10, n. 10, p. 82, 2021.

RODRÍGUEZ-ESCOBAR, M. L.; TALLINI, L. R.; LISA-MOLINA, J.; BERKOV, S.; VILADOMAT, F.; MEEROW, A.; BASTIDA, J.; TORRAS-CLAVERIA, L. Chemical and Biological Aspects of Different Species of the Genus *Clinanthus* Herb. (Amaryllidaceae) from South America. **Molecules**, [S.L.], v. 28, n. 14, p. 5408, 14 jul. 2023.

ROSA, D. S.; FAGGION, S. A.; GAVIN, A. S.; SOUZA, M. A.; FACHIM, H. A.; SANTOS, W. F.; PEREIRA, A. M. S.; CUNHA, A. O. S.; BELEBONI, R. O. Erysothrane, an alkaloid extracted from flowers of *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth: evaluating its anticonvulsant and anxiolytic potential. **Epilepsy and Behavior**, [S.L.], v. 23, n. 3, p. 205-212, mar. 2012.

SANTOMAURO, Damian F; HERRERA, Ana M Mantilla; SHADID, Jamileh; ZHENG, Peng; ASHBAUGH, Charlie; PIGOTT, David M; ABBAFATI, Cristiana; ADOLPH, Christopher; AMLAG, Joanne O; ARAVKIN, Aleksandr y (org.). Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in

2020 due to the COVID-19 pandemic. **The Lancet**, [S.L.], v. 398, n. 10312, p. 1700-1712, nov. 2021.

SEBBEN, C. **Investigação Química e Biológica em *Hippeastrum breviflorum* Herb. (Amaryllidaceae)**. 2005. 140 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 2005.

SERRANO, M. A. R.; BATISTA, A. N. L.; BOLZANI, V. S.; SANTOS, L. A.; NOGUEIRA, P. J. C.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; LATIF, A.; ARFAN, M. Anxiolytic-like effects of erythrinian alkaloids from *Erythrina suberosa*. **Química Nova**, [S.L.], v. 5, n. 39, p. 808-811, fev. 2011.

SHUHATA, M. H.; ALHILI, A.; AL-TAEE, M. M.; MOHAMEED, D. A.; ALI, N. H. History of Egyptian Medicine. **History of Medicine**, S.L., v. 8, n. 2, p. 12-21, mar. 2023.

SIGEL, E.; STEINMANN, M. E. Structure, Function, and Modulation of GABA_A Receptors. **Journal of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 287, n. 48, p. 40224-40231, nov. 2012.

SILVA MENDES, F. R.; DA SILVA, A. W.; FERREIRA, M. K. A.; REBOUÇAS, E. L.; MARINHO, M. M.; BANDEIRA, P. N.; TEIXEIRA, A. M. R.; MENEZES, J. E. R. A.; SIQUEIRA, E. A.; MENEZES, R. R. P. P. B.; MARINHO, E. S.; DOS SANTOS, H. S. GABA_A receptor participation in anxiolytic and anticonvulsant effects of (E)-3-(furan-2-yl)-1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one in adult zebrafish. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 155, n. October 2021, 2022.

SILVA, A. F. S.; ANDRADE, J. P.; MACHADO, K. R. B.; ROCHA, A. B.; APEL, M. A.; SOBRAL, M. G.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J. A. Screening for cytotoxic activity of extracts and isolated alkaloids from bulbs of *Hippeastrum vittatum*. **Phytomedicine**, [S.L.], v. 15, n. 10, p. 882-885, out. 2008.

SILVA, Adrielle Aquino da; SOUZA, Gabriel Oliveira de. Dependência química induzida pelo uso de benzodiazepínicos na senescência. **Research, Society and Development**, [S.L.], v. 10, n. 14, p. 476101422321, 10 nov. 2021.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Florianópolis: UFSC, 2007.

SOUSA, H. M. de; SILVA, A. B. da; FERREIRA, M. K. A.; SILVA, A. W. da; MENEZES, J. E. S. A. de; MARINHO, E. S.; MARINHO, M. M.; SANTOS, H. S. dos; PESSOA, O. D. L. Indole alkaloids of *Rauvolfia ligustrina* and their anxiolytic effects in adult zebrafish. **Planta Medica**, [S.L.], v. 89, n. 10, p. 979-989, 20 mar. 2023.

SOUZA, A. S. Q. **Perfil alcaloídico de açucena (*Hippeastrum elegans*) e efeito anti-inflamatório em neutrófilo e micróglia**. 2021. 121 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

SOUZA, A. S. Q.; DE SOUSA, J. A. C.; PINTO, C. S.; ALVES FILHO, E. G.; PEREIRA, R. C. A.; BRITO, E. S.; CANUTO, K. M.; LEAL, L. K. A. M. Untargeted GC/MS-based approach for identification of anti-inflammatory alkaloids from *Hippeastrum elegans* (Amaryllidaceae) using a human neutrophil model. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S.L.], v. 199, p. 114061, maio 2021.

SOUZA, J. L. B. **A psilocibina e seu potencial terapêutico em saúde mental**. 2019. 50 f. TCC (Graduação) - Curso de Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

TALALAENKO, A. N.; ABRAMETS, I. A.; STAKHOVSKII, Yu. V.; SHEKHOVTSOV, A. A.; CHERNIKOV, A. V.; SHEVCHENKO, S. L. The role of dopaminergic mechanisms of the brain in various models of anxious states. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, [S.L.], v. 24, n. 3, p. 284-288, maio 1994.

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.

TREIT, D.; ENGIN, E.; MCEOWN, K. Animal Models of Anxiety and Anxiolytic Drug Action. **Behavioral Neurobiology of Anxiety and Its Treatment**, [S.L.], p. 121-160, 2009.

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. R. Neuroprotective activity of isoquinoline alkaloids from Chilean Amaryllidaceae plants against oxidative stress-induced cytotoxicity on human neuroblastoma SH-SY5Y cells and mouse hippocampal slice culture. **Food and Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 132, p. 110665, out. 2019.

TSUGAWA, H.; CAJKA, T.; KIND, T.; MA, Y.; HIGGINS, B.; IKEDA, K.; KANAZAWA, M.; VANDERGHEYNST, J.; FIEHN, O.; ARITA, M. MS-DIAL: data-independent ms/ms deconvolution for comprehensive metabolome analysis. **Nature Methods**, [S.L.], v. 12, n. 6, p. 523-526, 4 maio 2015.

VIEGAS-JUNIOR, C.; REZENDE, A.; SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBÔA, I.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.; MIRANDA, A. L. P.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; YOUNG, M. C. M. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. **Química Nova**, [S.L.], v. 29, n. 6, p. 1279-1286, dez. 2006.

VIEGAS-JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. **Química Nova**, [S.L.], v. 27, n. 4, p. 655-660, ago. 2004.

VIEIRA, A. S. **Conhecimento popular do uso de plantas medicinais por idosos**. 2019. 64 f. TCC (Doutorado) - Curso de Enfermagem, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

WASOWSKI, C.; MARDER, M. Central nervous system activities of two diterpenes isolated from *Aloysia virgata*. **Phytomedicine**, [S.L.], v. 18, n. 5, p. 393-401, mar. 2011.

WU, C.; SUN, D. GABA receptors in brain development, function, and injury. **Metabolic Brain Disease**, [S.L.], v. 30, n. 2, p. 367-379, 13 maio 2014.

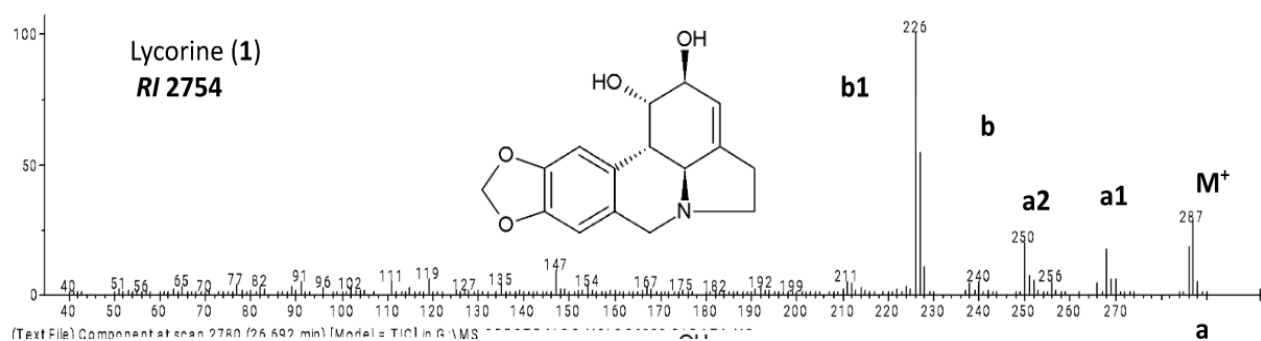
WU, W.-M.; ZHU, Y.-Y.; LI, H.-R.; YU, H.-Y.; ZHANG, P.; PI, H.-F.; RUAN, H.-L. Two new alkaloids from the bulbs of *Lycoris sprengerii*. **Journal of Asian Natural Products Research**, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 192-199, 6 dez. 2013.

XIE, Y.; LI, M.; CHANG, W. Crystal Structures of Putative Sugar Kinases from *Synechococcus elongatus* PCC 7942 and *Arabidopsis thaliana*. **Plos One**, [S.L.], v. 11, n. 5, p. e0156067, 25 maio 2016.

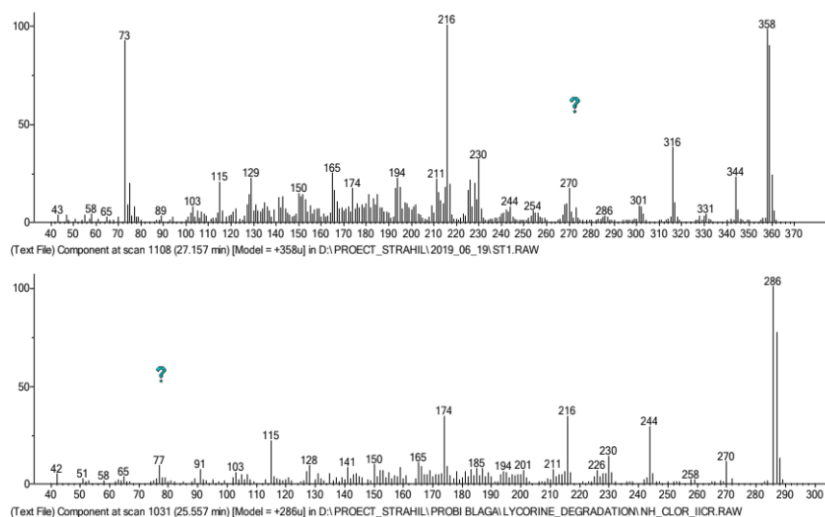
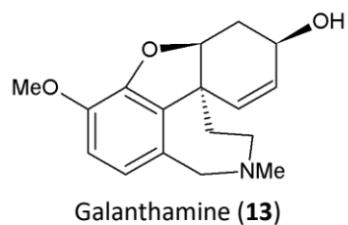
ZAMPONI, G. W.; STRIESSNIG, J.; KOSCHAK, A.; DOLPHIN, A. C. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. **Pharmacological Reviews**, [S.L.], v. 67, n. 4, p. 821-870, 10 set. 2015.

ZARRINDAST, M.R.; KHAKPAI, F. The modulatory role of dopamine in anxiety-like behavior. **Archives of Iranian Medicine**. Tehran, p. 591-603. set. 2015.

ZHENG, F.; DUAN, Y.; LI, J.; LAI, L.; ZHONG, Z.; HU, M.; DING, S. Somatic symptoms and their association with anxiety and depression in Chinese patients with cardiac neurosis. **Journal of International Medical Research**, [S.L.], v. 47, n. 10, p. 4920-4928, 26 ago. 2019.

ANEXO A – Espectro de massas de um padrão analítico autêntico de licorina

Fonte: Material Suplementar. Berkov, 2020.

ANEXO B - Espectro de massas de um padrão analítico autêntico de galantamina

Fonte: Material Suplementar. Berkov, 2021.