



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

**Método LC-MS/2D utilizando biorreatores enzimáticos como pós-coluna para triagem *on-flow* de ligantes em extratos naturais**

Discente: Ananda Ferreira Pires  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carmen Lúcia Cardoso

Ribeirão Preto  
2022

## RESUMO

PIRES, A. F. Método LC-MS/2D utilizando biorreatores enzimáticos como pós-coluna para triagem *on-flow* de ligantes em extratos naturais. 2022. 54p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Extratos naturais são matrizes complexas, constituídos de várias substâncias com atividades biológicas diversas, dentre as quais algumas podem ser utilizadas como inibidores enzimáticos. Inibidores enzimáticos têm sido amplamente utilizados no tratamento de diversas doenças, como por exemplo a doença de Alzheimer (DA), que utiliza a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) para o resgate da função colinérgica em portadores da DA. Os métodos clássicos de fracionamento bioguiado de extratos naturais envolvem alto consumo de tempo, e triagens *off-line* de extratos brutos não resultam em informações sobre os compostos individuais presentes no extrato. Como alternativa surge o acoplamento de técnicas de separação cromatográfica com os ensaios biológicos. Neste contexto, com a perspectiva de desenvolver um sistema eficiente de ensaios para triagem de ligantes, foi otimizado um sistema *on-flow* abrangente com duas dimensões (2D-LC/MS), sendo a primeira dimensão constituída de uma coluna cromatográfica de HPLC, e a segunda dimensão composta pelo biorreator, também chamado de cIMER (*capillary immobilized enzyme reactor*), para o ensaio de ligantes. A detecção dos compostos separados pela fase cromatográfica e a análise da capacidade inibitória das frações dos extratos é realizada por meio do monitoramento do produto da reação enzimática após ensaio biológico por meio de espectrometria de massas (MS). No presente trabalho, o sistema 2D-LC/MS foi aplicado, comprovando sua eficiência na análise da atividade inibitória para a enzima AChE de inibidores padrão e também do extrato bruto da espécie *Hippeastrum calyptratum* (Amaryllidaceae), sem purificações prévias. Foi possível identificar de modo *on-flow* qual fração do extrato apresentava atividade inibitória e então se aprofundar no estudo dessa fração, que indica que a inibição da AChE se dá pela presença do íon de  $m/z$  266 e/ou  $m/z$  360 encontrados no extrato, os quais ainda não foram completamente caracterizados, porém que resulta em uma imensa diminuição das possibilidades de compostos presentes nesse extrato responsáveis pela atividade inibitória detectada que, de outra forma, não seria capaz de se esmiuçar sem fracionamento e purificação prévias do extrato.

Palavras-chave: enzimas imobilizadas; triagem de alta eficiência; extratos de produtos naturais; acetilcolinesterase; inibidores enzimáticos

## ABSTRACT

PIRES, A. F. LC-MS/2D method using enzymatic bioreactors as post-column for on-flow ligand screening in natural extracts. 2022. 54p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Natural extracts are complex matrices, consisting of several substances with different biological activities, among which some can be used as enzyme inhibitors. Enzyme inhibitors have been widely used in the treatment of several diseases, such as Alzheimer's disease (AD), which uses the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) to restore cholinergic function in AD patients. Classical methods of bioguided fractionation of natural extracts are time consuming, and off-line screenings of raw extracts do not result in information about the individual compounds present in the extract. As an alternative, there is the coupling of chromatographic separation techniques with biological assays. In this context, with the perspective of developing an efficient assay system for screening ligands, a comprehensive on-flow system with two dimensions was optimized, with the first dimension consisting of an HPLC chromatographic column, and the second dimension comprises the bioreactor, also called cIMER (capillary immobilized enzyme reactor), for the ligand assay. The detection of the compounds separated by the chromatographic phase and the analysis of the inhibitory capacity of the fractions of the extracts is performed by monitoring the enzymatic reaction product after biological assay by mass spectrometry (MS). In the present work, the 2D-LC/MS system was applied, proving its efficiency in the analysis of the inhibitory activity for AChE of standard inhibitors and also crude extract of the species *Hippeastrum calyptratum* (Amaryllidaceae), without previous purifications. It was possible to identify, in an on-flow way, which fraction of the extract had inhibitory activity and then to deepen the study of this fraction, which indicates that the inhibition of AChE is due to the presence of the ion of  $m/z$  266 and/or  $m/z$  360 found in the extract, which have not yet been totally characterized, but which results in an immense decrease in the possibilities of compounds present in this extract responsible for the inhibitory activity detected that, otherwise, would not be able to be analyzed without prior fractionation and purification of the extract.

Keywords: immobilized enzymes; high-efficiency screening; natural products extracts; acetylcholinesterase; enzyme inhibitors

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	ii
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1. Ensaio <i>on-flow</i> de ligantes utilizando biorreatores enzimáticos .....	1
1.1.1. Imobilização enzimática .....	4
1.2. Enzima modelo - Acetilcolinesterase.....	7
1.3. Produtos naturais como fonte de inibidores de Colinesterases .....	7
<b>2. Conclusões</b> .....	10
<b>3. Referências</b> .....	11

## 1. Introdução

### 1.1. Ensaio *on-flow* de ligantes utilizando biorreatores enzimáticos

A utilização de medicamentos provenientes da natureza no tratamento de doenças não é novidade, os fitoterápicos são conhecidos e passados de geração em geração desde o início da História do ser humano. Com os avanços tecnológicos e científicos, o que era conhecimento popular passa a ser alvo de pesquisas. Inúmeros extratos naturais (derivados de plantas, microorganismos, etc.) são utilizados em pesquisas em busca de substâncias ativas presentes nesses extratos, que podem servir como protótipos para a criação de novos fármacos, ou até mesmo como matéria-prima para a obtenção desses fármacos. O interesse em extratos de produtos naturais em pesquisas já sofreu uma queda, devido às dificuldades de separação e purificação dos alvos de interesse, porém, com o passar dos anos, os desenvolvimentos tecnológicos e científicos, como técnicas de perfil químico e isolamento, como HPLC-MS/MS, fizeram com que esse interesse voltasse a crescer (ATANASOV et al., 2021; GIACOBINI, 2000). Tendo em vista os obstáculos da complexidade das amostras de produtos naturais, associada às limitações dos ensaios enzimáticos em solução, o Grupo de Cromatografia de Bioafinidade e Produtos Naturais (GCBPN) tem proposto ensaios inovadores, com o uso de técnicas *on-flow* para triagem de bioativos (DA SILVA et al., 2013; SEIDL et al., 2019; VILELA et al., 2014, 2018).

Como os métodos clássicos de fracionamento de extratos naturais bioguiados envolvem alto consumo de tempo, e os ensaios enzimáticos em solução para triagem de ligantes não resultam em informações sobre os compostos individuais e muitas vezes apresentam resultados falsos positivos ou falsos negativos (BERKOV et al., 2021), surge então, como alternativa, o acoplamento das técnicas de separação cromatográfica com os ensaios biológicos.

A necessidade de melhorar a triagem de ligantes para amostras complexas, como extratos de produtos naturais, tem impulsionado a pesquisa e desenvolvimento de maneiras alternativas para realizar esses ensaios. O acoplamento de métodos cromatográficos com os bioensaios para triagem de inibidores tem sido desenvolvido para vários alvos ao longo dos anos, como por

exemplo inibidores da fosfodiesterase, peroxidase,  $\alpha$ -glucosidase e catepsina B (DE BOER et al., 2004; GUO et al., 2018; SCHENK et al., 2003; WU et al., 2018).

Mais especificamente se tratando de inibidores de acetilcolinesterase (AChE), Verpoorte e colaboradores desenvolveram e aplicaram um método acoplando cromatografia líquida de alta eficiência, detecção UV e MS (HPLC-UV/MS) e caracterização bioquímica pós-coluna *online* para identificar inibidores de AChE em extratos brutos (INGKANINAN et al., 2000). Embora este sistema tenha sido aplicado com sucesso para avaliar o efeito inibitório de AChE da fração rica em alcaloides do extrato, o solvente orgânico na fase móvel do HPLC causou a redução da atividade da enzima mesmo com a concentração de metanol mantida abaixo de 30%.

Já no método apresentado por Irth e colaboradores, utiliza-se enzimas em fluxo, o que se torna inviável devido à quantidade excessiva de enzimas e outros reagentes (substrato enzimático e agentes colorimétricos) a serem gastos, e o bioensaio continua sendo afetado pela presença de solvente orgânico (DE JONG et al., 2006).

A imobilização enzimática de AChE se envolve com o acoplamento de métodos cromatográficos com Wang e colaboradores, que propuseram uma plataforma de pesca de ligantes *online* para triagem de inibidores de AChE usando um IMER, na qual os ligantes são primeiramente capturados e separados dos compostos inativos pelo IMER e posteriormente direcionados ao sistema LC-MS para análise (WANG et al., 2018). E mais recentemente, Yuan e colaboradores desenvolveram e aplicaram um método que acoplou a separação por LC com detecção de MS e um reator de enzima imobilizada para triagem de inibidores de AChE em extratos brutos da espécie *Lycoris radiata* (YUAN et al., 2020).

O principal desafio de incluir uma etapa de pré-separação antes do bioensaio é superar a incompatibilidade do solvente entre a fase móvel orgânica e as condições necessárias para o bioensaio sem comprometer a análise de MS. Na prática, isso significa que o efluente da separação analítica deve ser diluído de alguma forma e combinado com o substrato enzimático antes de chegar à

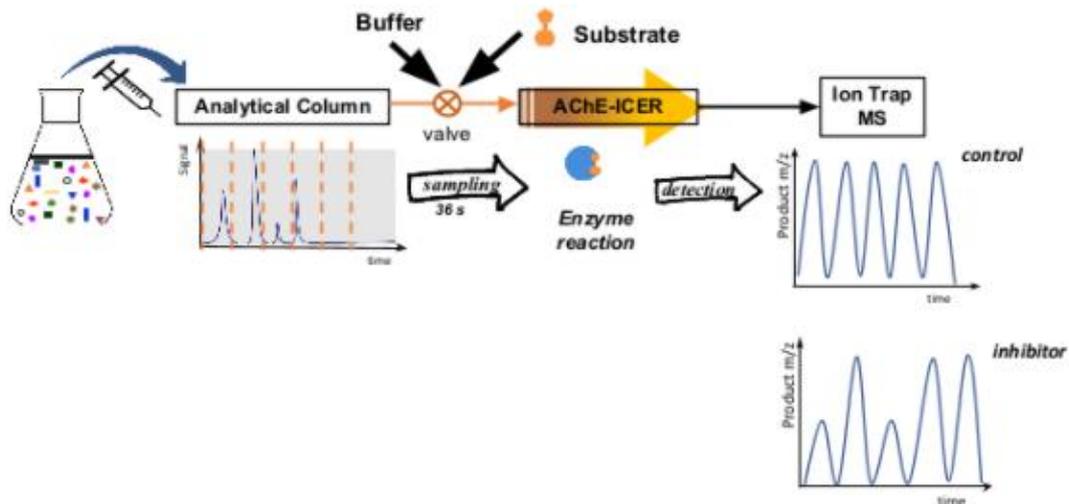
enzima, que levou então à proposta do método 2D-LC/MS desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (SEIDL et al., 2022).

Neste trabalho, foi empregado o método cromatográfico bidimensional, que é uma estratégia interessante para se obter uma maior eficiência na separação, com redução do tempo de análise. As separações por cromatografia líquida bidimensional já são bem estabelecidas e podem ser classificadas em abrangente, pseudo-abrangente e heart-cutting, que variam na porção do efluente da primeira dimensão (<sup>1</sup>D) que é introduzida na segunda dimensão (<sup>2</sup>D) (CASS; CASSIANO, 2015; MOGOLLÓN et al., 2014; STOLL; CARR, 2017); como no ensaio utilizado neste trabalho todo o efluente da <sup>1</sup>D é transferido para a <sup>2</sup>D, pode ser considerada uma análise abrangente.

Neste contexto, o sistema *on-flow* com duas dimensões foi desenvolvido, sendo a <sup>1</sup>D constituída de uma coluna cromatográfica de HPLC, e a <sup>2</sup>D pelo biorreator, também chamado de cIMER (*capillary immobilized enzyme reactors*), para a triagem de ligantes.

O sistema descrito por Seidl et al. (SEIDL et al., 2022), foi utilizado neste trabalho. Em resumo, o extrato é fracionado na <sup>1</sup>D, e em seguida as bandas cromatográficas, após a diluição da amostra pela introdução da solução tampão+substrato, são transferidas para o biorreator, onde a atividade inibitória é avaliada (Figura 1). Os resultados geram importantes informações sobre o composto responsável pela atividade sem a necessidade de purificação de cada componente para ensaios posteriores.

Figura 1. Representação ilustrativa do sistema 2D-LC/MS



Autoria: Dra. Claudia Seidl. Reproduzido com permissão.

#### 1.1.1. Imobilização enzimática

Utilizando o princípio da cromatografia de bioafinidade, os biorreatores são construídos em um processo que ocorre, essencialmente, em três passos: a imobilização da enzima; a avaliação das modificações sofridas pela enzima após a imobilização; e determinação das mudanças nos parâmetros de ligação do substrato após a inserção da enzima imobilizada no sistema de separação. A metodologia utilizada para a imobilização de AChE já foi extensivamente estudada pelo grupo GCBPN em diversos métodos anteriores (DA SILVA et al., 2013; SEIDL et al., 2019; VILELA et al., 2014).

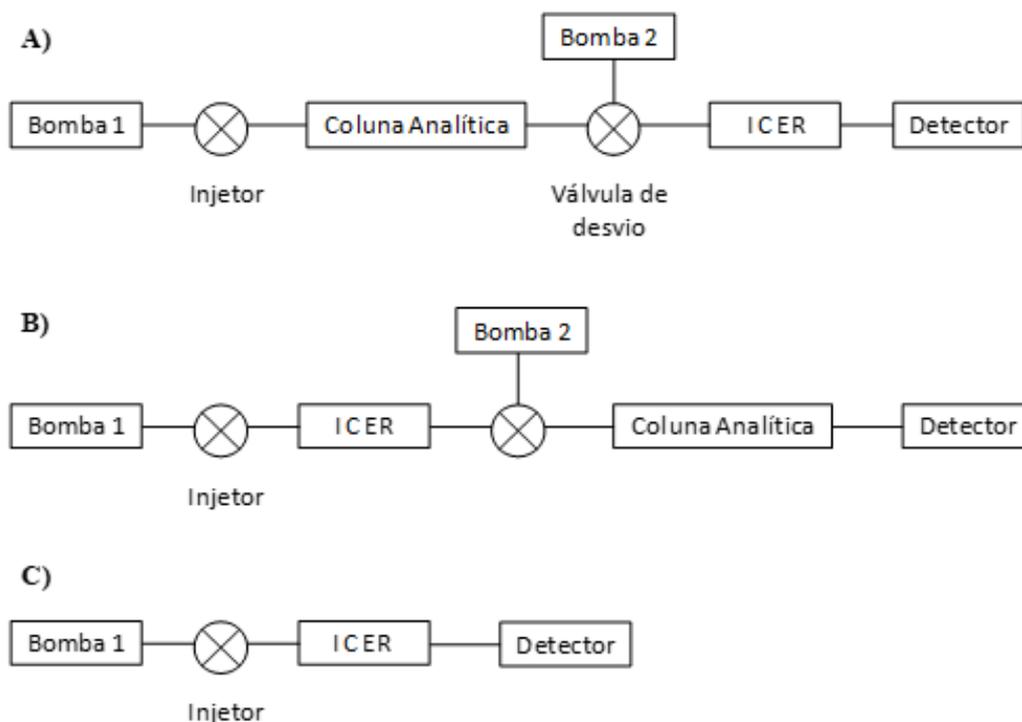
Imobilização de uma biomolécula significa fazer a sua retenção sobre um suporte sólido ou no interior de um suporte, que pode ser ligado a um sistema analítico, quando se pensa em sua utilização em métodos *on-flow*. Existem ainda os métodos que utilizam enzimas imobilizados em métodos *off-flow* ou estáticos. Um método comum de imobilização de enzimas para utilização em sistemas cromatográficos é por meio de ligação covalente, no qual a enzima é fixada ao suporte de maneira a evitar a sua dessorção (CAO, 2005; GUI SAN et al., 2020; QUEISSADA; DA SILVA, 2020).

As vantagens de se utilizar enzimas imobilizadas ao invés de enzimas livres em solução são o aumento do tempo de vida e da estabilidade da enzima em

relação à temperatura, na presença de solventes orgânicos e à variação de pH sem perda considerável de sua atividade catalítica, além da utilização de uma quantidade menor de enzimas, e a possibilidade de reutilização dessas enzimas (CASS; CASSIANO, 2015; DE SIMONE et al., 2018; GIRELLI; MATTEI, 2005; LUCKARIFT, 2008).

Os cIMERs podem ser conectados ao sistema cromatográfico em diferentes configurações, como mostra a Figura 2. Pode ser utilizado sequencialmente à coluna analítica, após a válvula de desvio (Figura 2(A)). Desse modo, as substâncias da amostra são inicialmente separadas por uma coluna analítica e, em seguida, as substâncias de interesse são transferidas para o cIMER, onde é possível monitorar o produto da reação e determinar constantes cinéticas como  $K_m$ ,  $V_{max}$ , constante de inibição e realizar triagem de ligantes. Na Figura 2(B), o cIMER é utilizado antes da coluna analítica, e o produto formado pela catálise enzimática em ensaios de atividade ou substâncias que interajam com a enzima (ensaios de afinidade) são transferidos com a utilização de válvulas de desvio para uma coluna analítica que permita uma análise completa do produto da catálise ou dos ligantes. Nessa configuração, por não haver nenhum contato entre as enzimas e solventes orgânicos seu uso é amplamente difundido. Na Figura 2(C), o cIMER é conectado diretamente a um detector permitindo uma triagem dos analitos e seleção de inibidores com base na modulação da atividade catalítica ou a identificação de ligantes pelo tempo de retenção.

Figura 2. Representação esquemática do uso de biorreatores em sistemas *on-flow*



Adaptado de CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C. de. in *Analytical Chemistry for Pharmaceutical and medical sciences*, 2009.

Quanto aos detectores, os CIMERs podem ser acoplados diretamente ao espectrômetro de massas, bem como podem ser utilizados em sistemas de cromatografia de alta eficiência multidimensional, com diferentes sistemas de detecção, como UV e fluorescência.

Com o acoplamento de cromatografia líquida e a espectrometria de massas, obtêm-se vantagens como alta seletividade e eficiência de separação, juntamente com a possibilidade de se obter informações da estrutura e massa molar dos compostos bioativos selecionados (MOGOLLÓN et al., 2014; VÉKEY, 2001; YUAN et al., 2020).

## 1.2. Enzima modelo - Acetilcolinesterase

A enzima selecionada para a proposta de estudo e aplicação do sistema 2D-LC/MS foi a acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) da espécie *Electrophorus electricus* (AChEeel).

A AChE é uma serina-hidroxilase, associada à hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh), estando presente nas junções neuromusculares e nas sinapses cerebrais colinérgicas de todo reino animal. Deste modo, a sua regulação nos processos biológicos é crucial e tem recebido atenção devido ao seu envolvimento em potencial nas desordens do sistema nervoso central, como a doença de Alzheimer (DA) e também na descoberta de novos pesticidas (FOTIOU et al., 2015; KHORSHID, 2015; MARUCCI et al., 2021; SAXENA; DUBEY, 2019).

Em portadores da DA, observou-se que a atividade colinérgica no sistema nervoso central se encontra acentuadamente reduzida. Portanto, estas enzimas são alvo de interesse nos estudos de desenvolvimento de fármacos para a DA (FERREIRA-VIEIRA, 2016; HAMPEL et al., 2018). Em pesquisas para o tratamento da DA, uma possibilidade é buscar ligantes que atuem como inibidores enzimáticos de AChE, pois como a maioria dos sintomas estão associados à diminuição da atividade colinérgica no sistema nervoso central, procura-se compostos que aumentem essa atividade, seja mimetizando a ação da acetilcolina nos receptores, ou como nesse caso, aumentando a disponibilidade do neurotransmissor na fenda sináptica (MARUCCI et al., 2021; TREVISAN; SALLES; VIANA, 2003).

Como a AChE já foi objeto de estudos pelo grupo em diversos outros trabalhos de imobilização (SEIDL et al., 2019; VILELA et al., 2014, 2018; VILELA; NARCISO DOS REIS; CARDOSO, 2021), ela foi selecionada para a aplicação do ensaio LC-MS/2D (SEIDL et al., 2022).

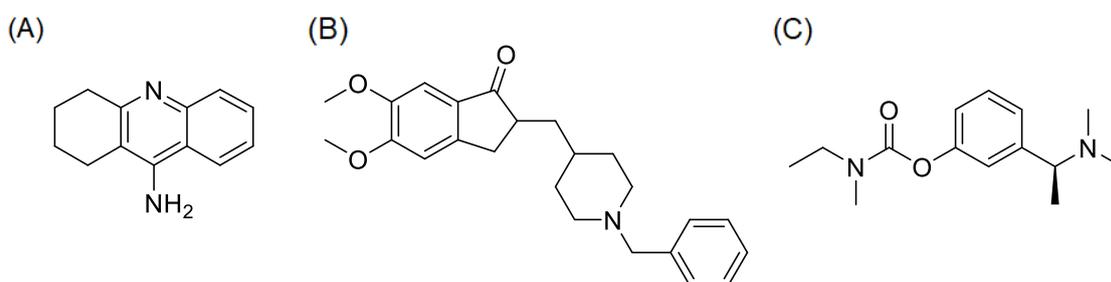
## 1.3. Produtos naturais como fonte de inibidores de Colinesterases

Há uma grande diversidade de compostos inibidores de colinesterases provenientes de fontes naturais, destacando-se os alcaloides, cumarinas,

flavonoides quinonas e xantonas (BRÜHLMANN et al., 2004; ERDOGAN, 2011; HOUGHTON et al., 2006; WANG et al., 2018).

O primeiro inibidor de AChE originário de uma planta foi a fisostigmina, um alcaloide isolado em 1864 de *Physostigma venenosum* L. (Fabaceae) (THOMSEN, 1990). Após o início do seu uso clínico como inibidor da AChE, alguns medicamentos comerciais com efeito inibitório de colinesterases tornaram-se disponíveis para o tratamento da DA, sendo eles: tacrina (Cognex®), donepezil (Aricept®), e rivastigmina (Exelon®) (Figura 3). No geral, estes medicamentos demonstraram graus de eficácia similares para o tratamento da DA, porém, ao aumentar as doses, a fim de potencializar a eficácia, o risco de efeitos colaterais também pode aumentar, como efeitos colaterais gastrointestinais (que são mais comuns, devido à estimulação autonômica excessiva) ou até hepatotoxicidade (KAUFER, 2002). Esse risco de efeitos colaterais, portanto, estimula o estudo para identificação de novos alcaloides com potencial anticolinesterásico que possam ser usados no lugar destes.

Figura 3: Estruturas de (A) tacrina, (B) donepezila e (C) rivastigmina



Fonte: Autoria própria

Alcaloides são substâncias que podem agir tanto como ativadores quanto inibidores da AChE, porém especificamente os alcaloides das plantas da família Amaryllidaceae – conhecidos por terem uma ampla quantidade de atividades biológicas, como por exemplo propriedades analgésicas, antivirais, antineoplásicas e até efeitos no sistema nervoso central – apresentam capacidade inibitória para essa enzima (ANISZEWSKI, 2007; ELGORASHI; STAFFORD; VAN STADEN, 2004).

A galantamina é um exemplo de alcaloide do tipo crinina, de origem vegetal, isolado dos bulbos de *Galanthus woronowii* (Amaryllidaceae) em 1952 (PRVULOVIC; HAMPEL; PANTEL, 2010), o qual apresenta capacidade inibitória para AChE. Outros alcaloides mais comumente encontrados nas plantas dessa família são licorina, homocolina, hipeastina, pancracina, montanina, tazetina, pancratistatina, dentre outros alcaloides do tipo licorina (AL SHAMMARI et al., 2021; DAL PIERO BETZEL BESSA, 2015; JÄRVINEN et al., 2011; NAIR; VAN STADEN, 2021). Além destes, há também um grande número de produtos naturais como compostos fenólicos e flavonoides presentes nessas plantas.

Um dos gêneros da família Amaryllidaceae, o gênero *Hippeastrum* é composto por cerca de 70 espécies, das quais 34 são encontradas no Brasil, ainda não foi muito estudado quimicamente (ALVES; MENINI NETO, 2014). A espécie *Hippeastrum calyptratum*, uma planta bulbosa herbácea perene, é encontrada na Serra dos Órgãos dentro da altamente ameaçada eco-região da Mata Atlântica do Brasil, polinizada por morcegos, já teve sua fragrância estudada (BESTMANN; WINKLER; VON HELVERSEN, 1997; MEEROW et al., 2017) e nos bulbos dessa espécie foram detectados os alcaloides 3-O-metil-epimacovina, albomaculina, licorina, pseudolicorina, homolicorina, 2- $\alpha$ -7-dimetoxi-homolicorina, 2- $\alpha$ -metoxi-homolicorina tazetina, pretazetina, narvedina, nerinina, ismina, trisfaeridina, galantindol, 11-hidroxivitatina e galantamina, por GC-MS (DE ANDRADE, 2014; DE ANDRADE et al., 2014).

Figura 4: Planta *H. calyptratum*



Fonte: (“*Hippeastrum calyptratum* | Pacific Bulb Society”, [s.d.]

Por se tratar de um membro de uma família de plantas rica em alcaloides que apresentam atividade inibitória para AChE, e a espécie ser pouco estudada quimicamente, o extrato bruto de *H. calyptratum* foi selecionada para aplicação do sistema 2D-LC/MS. O acesso ao patrimônio genético foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o código ABE20A2.

## 2. Conclusões

O sistema 2D-LC/MS, utilizado nesse trabalho, permitiu a análise de atividade em extrato bruto de bulbos da espécie *H. calyptratum*, determinando quais frações do extrato apresentam atividade inibitória da enzima AChE, assim como a identificação dos alcaloides licorina, 7-metoxi-*o*-metil-licorenina e 2- $\alpha$ -7-dimetoxi-homolicorina no extrato, destacando-se que o alcaloide 7-metoxi-*o*-metil-licorenina foi identificado pela primeira vez neste extrato; e foi aferida a atividade inibitória do alcaloide albomaculina.

Embora ainda esteja na fase de identificação dos compostos de  $[M + H]^+$   $m/z$  266 e 360, que foram indicados como possíveis responsáveis pela atividade inibitória do extrato de bulbos da espécie *H. calyptratum*, o método serviu seu propósito de restringir o número de compostos a serem estudados quando se trata de uma amostra complexa como extratos de produtos naturais, demonstrando a funcionalidade do método para análise de extratos, identificando a presença de compostos ativos sem necessidade de purificação prévia ou fracionamento da amostra.

O método aplicado demonstrou ser uma plataforma capaz de identificar a inibição da atividade da AChE com especificidade, sensibilidade e repetibilidade e apresenta vantagens como a utilização de instrumentação e software comercialmente disponíveis, além do biorreator (AChE-clMER) bem estabelecido para uso em sistemas *on-flow*.

Além disso, o sistema mostrou-se útil tanto para análise de amostras menos complexas, como uma mistura de poucos compostos com os inibidores padrão e alcaloides, como na triagem de inibidores a partir de extratos, sem a necessidade de pré-tratamento da amostra.

Nesse contexto, a principal vantagem do sistema 2D-LC/MS aplicado neste trabalho é sua configuração única em comparação com outros métodos já descritos na literatura, que até onde sabemos, pela primeira vez possibilitou a separação analítica que antecede o bioensaio ser realizada em modo gradiente utilizando um gradiente de solvente de até 100% de metanol sem interferir no ensaio enzimático. Ao usar uma configuração 2D-LC no modo abrangente, pode-se manter a separação alcançada na 1<sup>D</sup> e, portanto, facilitar a correlação de frações do efluente que apresentam atividade inibitória a regiões específicas no cromatograma do extrato bruto e, em seguida, direcionar a pesquisa a essas regiões para a busca de novos potenciais inibidores.

### 3. Referências

AL SHAMMARI, L. et al. Amaryllidaceae alkaloids from *Hippeastrum X Hybridum* CV. Ferrari, and preparation of vittatine derivatives as potential ligands for Alzheimer's disease. **S Afr J Bot**, v. 136, p. 137–146, 1 jan. 2021.

ALVES, F. E.; MENINI NETO, L. Vascular epiphytes in a forest fragment of Serra da Mantiqueira and floristic relationships with Atlantic high-altitude areas in Minas Gerais. **RBB**, v. 37, n. 2, p. 187–196, 1 jun. 2014.

ANISZEWSKI, T. Alkaloids-Secrets of Life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role. Elsevier, p. 334, 22 mar. 2007.

ATANASOV, A. G. et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nat Rev Drug Discov**, v. 20, p. 200-216, 28 jan. 2021.

BERKOV, S. et al. The Amaryllidaceae alkaloids: an untapped source of acetylcholinesterase inhibitors. **Phytochem Rev**, v. 21, n. 5, p. 1415-1443, 18 nov. 2021.

BESTMANN, H. J.; WINKLER, L.; VON HELVERSEN, O. Headspace analysis of volatile flower scent constituents of bat-pollinated plants. **Phytochemistry**, v. 46, n. 7, p. 1169–1172, 1 dez. 1997.

BRÜHLMANN, C. et al. Screening of non-alkaloidal natural compounds as acetylcholinesterase inhibitors. **Chem Biodivers**, v. 1, n. 6, p. 819–829, 2004.

CAO, L. Carrier-bound immobilized enzymes: principles, applications and design. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.

CASS, Q.; CASSIANO, N. (org) Cromatografia líquida: novas tendências e aplicações. Rio de Janeiro: Elsevier, p.20-37, 2015.

DA SILVA, J. I. et al. Acetylcholinesterase capillary enzyme reactor for screening and characterization of selective inhibitors. **J Pharm Biomed Anal**, v. 73, p. 44–52, 25 jan. 2013.

DAL PIERO BETZEL BESSA, C. **Estudo Químico e Biológico em alcaloides de Hippeastrum aulicum (KER GAWL.) HERB.: uma espécie da família Amaryllidaceae**. 2015. 120 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2015. Disponível em: <http://repositorio.ufes.br/handle/10/1808>.

DE ANDRADE, J. P. **Estudio de la composición alcaloídica de Narcissus broussonetii y de tres especies brasileñas del género Hippeastrum (Amaryllidaceae)**. 2014. 190 p. Tese (Doutorado) – Universidade de Barcelona, Barcelona, 2014. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10803/147272>.

DE ANDRADE, J. P. et al. Crinine-type alkaloids from *Hippeastrum aulicum* and *H. calypratrum*. **Phytochemistry**, v. 103, p. 188–195, 1 jul. 2014.

DE BOER, A. R. et al. On-Line Coupling of High-Performance Liquid Chromatography to a Continuous-Flow Enzyme Assay Based on Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Anal Chem**, v. 76, n. 11, p. 3155-3161, 1 jun. 2004.

DE JONG, C. F. et al. High-performance liquid chromatography–mass spectrometry-based acetylcholinesterase assay for the screening of inhibitors in natural extracts. **J Chromatogr A**, v. 1112, n. 1–2, p. 303–310, 21 abr. 2006.

DE SIMONE, A. et al. Immobilized Enzyme Reactors: an Overview of Applications in Drug Discovery from 2008 to 2018. **Chromatographia**, v. 82, n. 1, p. 425–441, 3 dez. 2018.

ELGORASHI, E. E.; STAFFORD, G. I.; VAN STADEN, J. Acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. **Planta Med**, v. 70, n. 3, p. 260–262, mar. 2004.

ERDOGAN, O. An overview on natural cholinesterase inhibitors-a multi-targeted drug class-and their mass production. **Mini-Rev Med Chem**, v.11, n. 10, p. 836-842, 2011.

FERREIRA-VIEIRA, T. Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system. **Cur Neuropharmacol**, v. 14, n. 1, p. 101-115, jan. 2016.

FREITAS, L. da S. **Desenvolvimento de método multidimensional de cromatografia líquida para triagem de inibidores seletivos em extratos brutos de plantas utilizando biorreatores enzimáticos de acetilcolinesterase como pós coluna**. 2017. 130 p Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/002851462>.

FOTIOU, D. et al. Evaluation of the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease with neuropsychological methods. **Aging Clin Exp Res**, v. 27, n. 5, p. 727–733, 14 out. 2015.

GIACOBINI, E. Cholinesterase Inhibitors Stabilize Alzheimer Disease. **Neurochem Res**, v. 25, n. 9–10, p. 1185–1190, 2000.

GIRELLI, A. M.; MATTEI, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 819, n. 1, p. 3–16, 5 maio. 2005.

GUISAN, J. M. et al (org). Immobilization of Enzymes and Cells: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*. n. 4, p. 83-92, 2020.

GUO, P. C. et al. On-line high-performance liquid chromatography coupled with biochemical detection method for screening of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors in green tea. **Biomed Chromatogr**, v. 32, n. 9, 1 set. 2018.

HAMPEL, H. et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. **Brain**, v. 141, n. 7, p. 1917–1933, 1 jul. 2018.

**Hippeastrum calyptratum | Pacific Bulb Society**. Disponível em: <[https://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/Hippeastrum\\_calyptratum](https://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/Hippeastrum_calyptratum)>. Acesso em: 29 abr. 2022.

HOUGHTON, P. et al. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. **Nat. Prod. Rep.**, v. 23, n. 2. p. 181-199, 1 fev. 2006.

INGKANINAN, K. et al. High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products. **J Chromatogr A**, v. 872, n. 1–2, p. 61–73, 3 mar. 2000.

JÄRVINEN, P. et al. Potency determinations of acetylcholinesterase inhibitors using Ellman's reaction-based assay in screening: Effect of assay variants. **Anal Biochem**. v. 408, n. 1, p. 166-168, 1 jan. 2011.

KAUFER, D. Cholinesterase-inhibitor therapy for dementia: novel clinical substrates and mechanisms for treatment response. **CNS Spectr**. v. 7, n. 10, p. 742-750, 7 oct. 2002.

KHORSHID, M. A. Effect of some Plants and Pesticides on Acetylcholinesterase. Dairy Science View project. **Am J Food Technol**. v. 10, n. 3, p. 93-99, 2015.

LUCKARIFT, H. R. Silica-immobilized enzyme reactors. **J Liq Chromatogr Relat Technol**, v. 31, n. 1-2, p. 1568-1592, 18 jun. 2008.

MARUCCI, G. et al. Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, v. 190, p. 108352, 1 jun. 2021.

MCNULTY, J. et al. Structure–activity studies on acetylcholinesterase inhibition in the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 20, n. 17, p. 5290–5294, 1 set. 2010.

MEEROW, A. W. et al. Fragrance Analysis of Two Scented *Hippeastrum* Species. **HortScience**, v. 52, n. 12, p. 1853–1860, 1 dez. 2017.

MOGOLLÓN, N. G. S. et al. O estado da arte da cromatografia líquida bidimensional: Conceitos fundamentais, instrumentação e aplicações. **Quim Nova**, v. 37, n. 10, p. 1680-1691, 22 set. 2014.

NAIR, J. J.; VAN STADEN, J. Cytotoxic tazettine alkaloids of the plant family Amaryllidaceae. **S Afr J Bot**, v. 136, p. 147–156, 1 jan. 2021.

OBERACHER, H.; WHITLEY, G.; BERGER, B. Evaluation of the sensitivity of the ‘Wiley registry of tandem mass spectral data, MSforID’ with MS/MS data of the ‘NIST/NIH/EPA mass spectral library’. **J Mass Spectrom**, v. 48, n. 4, p. 487–496, 1 abr. 2013.

PRVULOVIC, D.; HAMPEL, H.; PANTEL, J. Galantamine for Alzheimer’s disease. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 6, n. 3, p. 345-354, 6 mar. 2010.

QUEISSADA, D. D.; DA SILVA, J. A. Imobilização enzimática em suportes orgânicos e inorgânicos: vantagens e desvantagens. **Holos Environment**, v. 20, n. 2, p. 271, 9 abr. 2020.

RÖST, H. L. et al. OpenMS: a flexible open-source software platform for mass spectrometry data analysis. **Nat Methods**, v. 13, n. 9, p. 741–748, 1 ago. 2016.

SAXENA, M.; DUBEY, R. Target Enzyme in Alzheimer’s disease: Acetylcholinesterase Inhibitors. **Curr Top Med Chem**, v. 19, n. 4, p. 264–275, 1 fev. 2019.

SCHENK, T. et al. Screening of Natural Products Extracts for the Presence of Phosphodiesterase Inhibitors Using Liquid Chromatography Coupled Online to Parallel Biochemical Detection and Chemical Characterization. **J Biomol Screen**, v. 8, n. 4, p. 421-429, ago. 2003.

SEIDL, C. et al. A novel on-flow mass spectrometry-based dual enzyme assay. **Anal Chim Acta**, v. 1072, p. 81–86, 23 set. 2019.

SEIDL, C. et al. A Comprehensive 2D-LC/MS Online Platform for Screening of Acetylcholinesterase Inhibitors. **Front Mol Biosci**, v. 9, 16 mar. 2022.

SHARMA, K. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer’s therapeutics (Review). **Mol Med Rep**, v. 20, n. 2, p. 1479–1487, 1 ago. 2019.

SMITH, A. M. E. et al. An automated materials screening approach for the development of sol–gel derived monolithic silica enzyme reactor columns. **RSC Adv**, v. 4, n. 31, p. 15952–15960, 28 mar. 2014.

STEIN, S.; MIKAIA, A.; MIROKHIN, Y. An Automated Method for Verifying Structure-Spectral Consistency Based on Ion Thermochemistry. 2003. National Institute of Standards and Technology. Disponível em: <https://chemdata.nist.gov/mass-spc/interpreter/>. Mass spectrometry Data Center. <https://chemdata.nist.gov/>

STOLL, D. R.; CARR, P. W. Two-Dimensional Liquid Chromatography: A State of the Art Tutorial. **Anal Chem**, v. 89, n. 1, p. 519–531, 3 jan. 2017.

TALLINI, L. et al. *Hippeastrum reticulatum* (Amaryllidaceae): Alkaloid Profiling, Biological Activities and Molecular Docking. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2191, 9 dez. 2017.

THOMSEN, T. Selective inhibition of human acetylcholinesterase by galanthamine in vitro and in vivo. **Life Sci**, v. 46, n. 21, p. 1553-1558, 19 mar. 1990.

TREVISAN, T. M.; SALLES, V.; VIANA, F. M. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Quim Nova**. v. 26, n. 3. p. 301-304, 11 maio. 2002.

VANZOLINI, K. L. et al. Acetylcholinesterase Immobilized Capillary Reactors–Tandem Mass Spectrometry: An On-Flow Tool for Ligand Screening. **J Med Chem**, v.56, n. 5, p. 2038-2044, 14 mar. 2013.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in a chromatography. **J Chromatogr A**, v. 921, n. 2, p. 229-23, 6 jul. 2001

VILELA, A. F. L. et al. Immobilized cholinesterases capillary reactors on-flow screening of selective inhibitors. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 968, p. 87–93, 1 out. 2014.

VILELA, A. F. L. et al. An improved immobilized enzyme reactor-mass spectrometry-based label free assay for butyrylcholinesterase ligand screening. **Anal Biochem**, v. 549, p. 53–57, 15 maio. 2018.

VILELA, A. F. L.; NARCISO DOS REIS, V. E.; CARDOSO, C. L. Co-Immobilized Capillary Enzyme Reactor Based on Beta-Secretase1 and Acetylcholinesterase: A Model for Dual-Ligand Screening. **Front Chem**, v. 9, p. 529, 8 jul. 2021.

WANG, L. et al. Online screening of acetylcholinesterase inhibitors in natural products using monolith-based immobilized capillary enzyme reactors combined with liquid chromatography-mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v. 1563, p. 135-143, 17 ago. 2018.

WU, S. Q. et al. A fast and accurate method for the identification of peroxidase inhibitors from *Radix Salvia Miltiorrhizae* by on-flow biochemical assay coupled with LC/Q-TOF-MS: comparison with ultrafiltration-based affinity selection. **Anal Bioanal Chem**, v. 410, n. 18, p. 4311–4322, 3 maio 2018.

YUAN, Y. et al. Online acetylcholinesterase inhibition evaluation by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry hyphenated with an immobilized enzyme reactor. **J Chromatogr A**, v. 1609, p. 460506, 4 jan. 2020.