



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
ESCOLA NORMAL SUPERIOR - ENS
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



VIVIANE GONÇALVES DE FARIAS

**ANÁLISE METABOLÔMICA DE ESPÉCIES DE ANNONACEAE OCORRENTES
EM MANAUS POR MEIO DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS.**

MANAUS - 2021



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
ESCOLA NORMAL SUPERIOR – ENS
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



VIVIANE GONÇALVES DE FARIAS

**ANÁLISE METABOLÔMICA DE ESPÉCIES DE ANNONACEAE OCORRENTES
EM MANAUS POR MEIO DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à coordenação do curso de Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Amazonas, para obtenção do título de Graduação em Licenciatura em Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen

MANAUS – 2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

F224a Farias, Viviane Gonçalves de
Análise Metabolômica de espécies de Annonaceae
ocorrentes em Manaus por meio de Espectrometria de
Massas / Viviane Gonçalves de Farias. Manaus : [s.n],
2021.
33 f.: color.; 30 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura
- Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2021.
Inclui bibliografia
Orientador: Hector Henrique Ferreira Koolen

1. Annonaceae. 2. Alcaloides. 3. Guatteria discolor.
4. Aporfinicos. 5. Oxoaporfinicos. I. Hector Henrique
Ferreira Koolen (Orient.). II. Universidade do Estado do
Amazonas. III. Análise Metabolômica de espécies de
Annonaceae ocorrentes em Manaus por meio de
Espectrometria de Massas

Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463

*Dedico a Deus por me dar a vida e aos meus pais,
que sempre estiveram ao meu lado e me
incentivaram a seguir os meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por me dar saúde e por fazer com que este sonho se tornasse real, sem Ele nada seria possível.

À minha família, pelo apoio, incentivo e por estarem comigo nos altos e baixos despertando o melhor que há em mim. Vocês são os maiores responsáveis por essa conquista, eu os amo muito.

Ao meu orientador, Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen pela paciência, ensinamentos e conselhos que me deu durante este trabalho, obrigado por tudo.

Às minhas amigas e companheiras de faculdade Gigliola Mayara e Kathiane Rebouças. Obrigado pelas conversas, risadas, apoios e por fazer as manhãs mais leves e engraçadas, vocês são incríveis.

À equipe MMSRG que me acolheu durante o projeto.

E à Universidade do Estado do Amazonas e aos professores pelo ensino de qualidade.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Martin Luther King Jr.

Análise metabolômica de espécies de Annonaceae ocorrentes em Manaus por meio de espectrometria de massas.

RESUMO

Considera-se planta medicinal toda espécie que administrada ao homem ou animal, por qualquer via ou forma, exerça alguma função terapêutica e devido ao grande uso dessas ervas, estudos em busca de suas substâncias químicas foram e são realizados continuamente. A família Annonaceae é amplamente conhecida pelos seus alcaloides que estão presentes em diversas espécies, entretanto, ainda há exemplares cujos componentes químicos ainda não foram totalmente elucidados. Deste modo, o objetivo deste estudo foi reconhecer comparativamente diferentes espécies de plantas da família Annonaceae por meio de espectrometria de massas. Para isso, foram coletadas cinco espécies de plantas pertencentes ao gênero *Annona*, *Duguetia*, *Fusaea*, *Guatteria* e *Xylopia*, seus extratos foram obtidos e analisados através da cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massa de alta resolução (LC-HRMS/MS). Das cinco plantas, somente as folhas da espécie *Guatteria discolor* foram analisadas e os resultados apresentados mostraram a presença de quatro substâncias alcaloídicas (puterina, oxoputerina, assimilobina e anonaína), sendo estas duas últimas inéditas para tal espécie. Dentre as moléculas identificadas, somente a puterina ainda não possui a sua atividade biológica elucidada, sugerindo assim novos estudos para essa substância.

Palavras chave: Annonaceae, alcaloides, *Guatteria discolor*, aporfínicos e oxoporfínicos.

Metabolomic analysis of Annonaceae species occurring in Manaus by Mass Spectrometry.

ABSTRACT

A medicinal plant is considered like any species that administered to man or animal, by any means or form, exerts some therapeutic function and due to the great use of these herbs, studies in search of their chemical substances were and are carried out continuously. The Annonaceae family is widely known for its alkaloids that are present in several species, however, there are still specimens whose chemical components have not been fully elucidated. Thus, the aim of this study was to comparatively recognize different species of plants from the Annonaceae family by means of mass spectrometry. For this, five plant species belonging to the genus *Annona*, *Duguetia*, *Fusaea*, *Guatteria* and *Xylopia* were collected, their extracts were obtained and analyzed by Liquid Chromatography coupled to High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS/MS). Of the five plants, only the leaves of the species *Guatteria discolor* were analyzed and the results presented showed the presence of four alkaloid substances (puterine, oxoputerine, asimilobine and anonaine), the latter two being unpublished for this species. Among the identified molecules, only puterine has not yet had its biological activity elucidated, thus suggesting new studies for this substance.

Keywords: Annonaceae, alkaloids, *Guatteria discolor*, aporphinic and oxoaporphinic.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura química da (A) cafeína, (B) nicotina e (C) liriodenina	16
FIGURA 2 - Distribuição geográfica da família Annonaceae	17
FIGURA 3 - Exemplos de alguns alcaloides extraídos das cascas da <i>G. discolor</i> ...	18
FIGURA 4 - Estruturas da puterina [5], oxoputerina [6], assimilobina [7] e anonaína [8].....	23
FIGURA 5 - Perfil de fragmentação da molécula puterina.....	24
FIGURA 6 - Perfil de fragmentação da molécula oxoputerina.....	25
FIGURA 7 - Perfil de fragmentação da molécula assimilobina.....	26
FIGURA 8 - Perfil de fragmentação da molécula anonaína.....	27

LISTA DE TABELA

TABELA 1 – Espécies de plantas, estrutura química dos compostos e suas propriedades.....	14
---	----

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	v
EPÍGRAFE	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Plantas medicinais	13
1.2 Plantas como fonte de fármacos	14
1.3 Metabólitos secundários de plantas	15
1.4 Família Annonaceae	16
1.4.1 Espécie <i>Guatteria discolor</i>	17
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Seleção de espécies	19
3.2 Obtenção de extratos brutos	19
3.3 Análise por LC-HRMS/MS dos extratos	20
3.4 Ensaios <i>in vitro</i>	21
3.4.1 Determinação <i>in vitro</i> do percentual de inibição de crescimento de células tumorais <i>versus</i> células não tumorais.....	21
3.4.2 Ensaios antimaláricos.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	23
4.1 Obtenção dos extratos brutos	23
4.2 Amostras analisadas por LC-HRMS/MS	23
4.2.1 Alcaloide puterina.....	24
4.2.2 Alcaloide oxoputerina.....	25
4.2.3 Alcaloide assimilobina.....	26
4.2.4 Alcaloide anonaína.....	26

4.3 Ensaio <i>in vitro</i>	27
5. CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

1.1 Plantas Medicinais


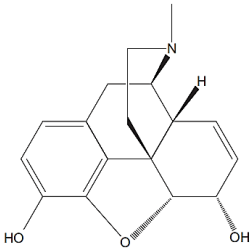

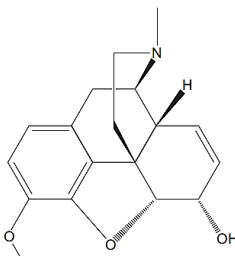

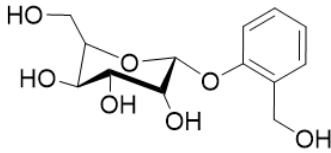

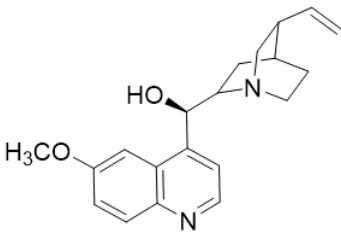
Denomina-se planta medicinal toda espécie que administrada ao homem ou animal, por qualquer via ou forma, exerça alguma função terapêutica (ALMASSY-JÚNIOR *et al.*, 2005). Essa utilização de plantas para finalidade medicinal era realizada desde a antiguidade, quando o homem recorria às plantas para o tratamento de diversas doenças visando a cura (GIANNENAS *et al.*, 2020).

Várias partes dessas ervas eram e são utilizadas para o tratamento de doenças, significando que suas sementes, raízes, folhas, frutos, cascas, flores e até mesmo a planta inteira servem para combater diversos males (JAMSHIDI-KIA *et al.*, 2018). E devido ao grande uso desses vegetais, pesquisas com interesse nas suas composições químicas começaram a ser realizadas originando assim um ramo da ciência conhecido como fitoquímica (ROCHA *et al.*, 2015).

Este ramo tem como intuito estudar as contribuições da botânica, da etnologia, além da química e ciências farmacêuticas e evidenciar as interações entre o homem e as plantas como sistemas dinâmicos (ALMEIDA *et al.*, 2011). E a partir desses estudos foi possível identificar, purificar e isolar alguns compostos bioativos eficazes ao organismo, como por exemplo, a morfina e a codeína, alcaloides oriundos da espécie *Papaver somniferum*, sendo a morfina o primeiro composto isolado de uma planta em 1817 e a codeína isolada em 1833 (DASGUPTA, 2020). Outro composto isolado e identificado foi a salicina, que é oriunda da casca da espécie *Salix alba* e dela se desenvolveu o ácido acetilsalicílico que é um potente anti-inflamatório e há também a quinina, composto isolado da casca da espécie *Cinchona officinalis* e que originou o primeiro fármaco anti-malárico (NEWMAN *et al.*, 2010; CRAGG *et al.*, 2013).

Na Tabela 1 são apresentadas algumas espécies de plantas que tiveram compostos bioativos retirados, estrutura química e suas propriedades.

TABELA 1. Espécies de plantas, estrutura química dos compostos e suas propriedades.

Espécie	Estrutura Química	Propriedades	Referências
 <i>Papaver somniferum</i>	 Morfina	Analgésica, eufórica, sedativa e viciante.	DASGUPTA, A., 2020; HAMED & BOGUSZEWSKI, 2018.
 <i>Papaver somniferum</i>	 Codeína	Hipnoanalgésicas, analgésicas e antitussígenos.	DASGUPTA, A., 2020; PAPICH, M.G., 2016; MARTINDALE, 2007
 <i>Salix alba</i>	 Salicina	Produce o ácido acetilsalicílico, um potente anti-inflamatório.	NEWMAN <i>et al.</i> , 2010; CRAGG <i>et al.</i> , 2013
 <i>Cinchona officinalis</i>	 Quinina	Anti-malárico.	NEWMAN <i>et al.</i> , 2010; CRAGG <i>et al.</i> , 2013

1.2 Plantas como Fonte de Fármacos

Como as plantas sempre foram utilizadas para tratamento de diversas doenças e como a fitoquímica possibilitou o melhor entendimento deste processo, os

compostos químicos obtidos através de análises propiciaram o surgimento de medicamentos oriundos de vegetais. E conforme as pesquisas sobre os produtos naturais provenientes de plantas estão avançando, as empresas deste ramo estão atentas para o desenvolvimento de novos fármacos.

Alguns exemplos de substâncias oriundas de plantas e que possuem potencial farmacológico são a codeína, citada anteriormente, que nos medicamentos está na forma de fosfato de codeína e serve no tratamento de dores, além de ter o efeito antitussígeno (SWEETMAN, 2007). Outra substância é a vincristina, que é obtida através das folhas de *Catharanthus roseus* e combate a leucemia e outros tipos de câncer (SRIVASTAV *et al.*, 2020), há a galantamina (Coglive[®]) que é derivada dos bulbos e flores da espécie *Galanthus caucasicus* e está associada ao Mal de Alzheimer (ATASANOVA *et al.*, 2015) e também há a substância canabidiol que é oriunda da espécie *Cannabis sativa*, popularmente conhecida como maconha. Esta substância está presente em um medicamento chamado Mevatyl[®] e é indicada para o tratamento de espasmos musculares relacionados com a esclerose múltipla (MATOS *et al.*, 2017).

1.3 Metabólitos Secundários de Plantas

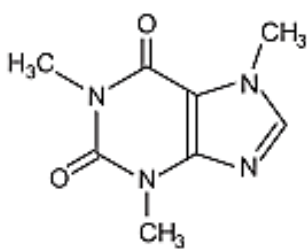
Todas estas substâncias são moléculas orgânicas provenientes do metabolismo secundário (metabólitos secundários) que são produzidas por organismos vivos (CROTEAU *et al.*, 2000). Geralmente possuem uma estrutura complexa, de baixo peso molecular e são importantes para a manutenção da vida da planta (VIZOTTO, KROLOW e WEBER, 2010; CROTEAU *et al.*, 2000). Nos vegetais, eles são fundamentais no processo de adaptação, proteção contra herbivoria e agentes patogênicos, além de atrair polinizadores e dispersores atuando assim na interação entre planta-animal ou planta-ambiente (TEIXEIRA, 2007). Mas para o ser humano, essas substâncias desempenham um efeito terapêutico e dependendo da dose podem até se tornar tóxicas (REZENDE *et al.*, 2016).

Já foram identificados mais de 50 mil metabólitos secundários de espécies de plantas e os três principais grupos são: os terpenos, substâncias fenólicas e substâncias nitrogenadas, mas há também os derivados de ácidos graxos e os policetídeos aromáticos (REZENDE *et al.*, 2016).

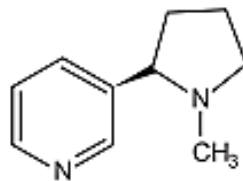
As moléculas analisadas neste trabalho pertencem ao grupo dos compostos nitrogenados que são formados a partir de aminoácidos aromáticos e alifáticos, estas

moléculas são os Alcaloides que são um grupo de substâncias orgânicas, de origem natural, cíclica, contendo um nitrogênio em um estado de oxidação negativa e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos (PELLETIER, 1983). Estão bastante presentes na família Annonaceae, Papaveraceae, Rubiaceae, Menispermaceae, Solanaceae, entre outras e possuem grande atividade biológica. Alguns exemplos de alcaloides são a cafeína (Rubiaceae), a nicotina (Solanaceae) e a liriodenina (Annonaceae) que possui atividade analgésica, atividade antibacteriana, atividade anti-crustáceo, atividade antifúngica (LÚCIO *et al.*, 2015; ASHIHARA *et al.*, 2008; REZENDE *et al.*, 2016).

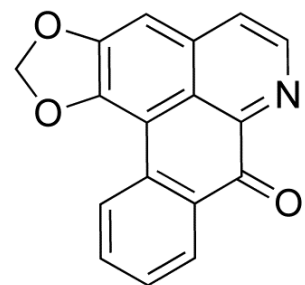
Figura 1. Estrutura química da (A) cafeína, (B) nicotina e (C) liriodenina



A



B



C

FONTE: modificado de <https://uniquim.iquimica.unam.mx/compuesto-item/liriodenina-973/>; <https://www.qconursos.com/questoes-de-vestibular/questoes/b40d4280-09>

1.4 Família Annonaceae

A família Annonaceae pertence a ordem Magnoliales e é composta por árvores, arvoretas ou pequenas árvores e arbustos, distribuídos em regiões tropicais e subtropicais (LOPES; MELLO-SILVA, 2014). Nela há cerca de 2500 espécies distribuídas em 135 gêneros por todo o mundo (CHATROU *et al.*, 2004) sendo 392 espécies distribuídas em 29 gêneros no Brasil (MAAS; RAINER, 2015a). Podem ser encontradas na maioria dos biomas brasileiros, entretanto, é predominante na Amazônia, Mata Atlântica e Cerrado (LOBÃO *et al.*, 2020a). As espécies dessa família podem ser identificadas através de seus frutos, flores e folhas característicos, além

do forte odor obtido pelo corte de seus troncos e ramos (LOPES; MELLO-SILVA, 2014; LOBÃO, 2016).

Figura 2. Distribuição geográfica da família Annonaceae



Fonte: <<http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/maps/annonaceae.gif>>.

Acesso em 10 de setembro de 2020.

Membros dessa família são utilizados em diversas aplicações, principalmente no ramo alimentício através da comercialização de seus frutos, o gênero que se destaca é a *Annona* com a *A. muricata* (graviola), *A. squamosa* (fruta-do-conde), *A. mucosa* (biribá) e *A. cherimola* (cherimoia) (RABELO *et al.*, 2016). Algumas espécies tem uso na medicina natural, podem apresentar diversas atividades biológicas e possuem importância farmacológica, servindo de matéria-prima para produção de cosméticos e perfumaria (KRINSKI *et al.*, 2014).

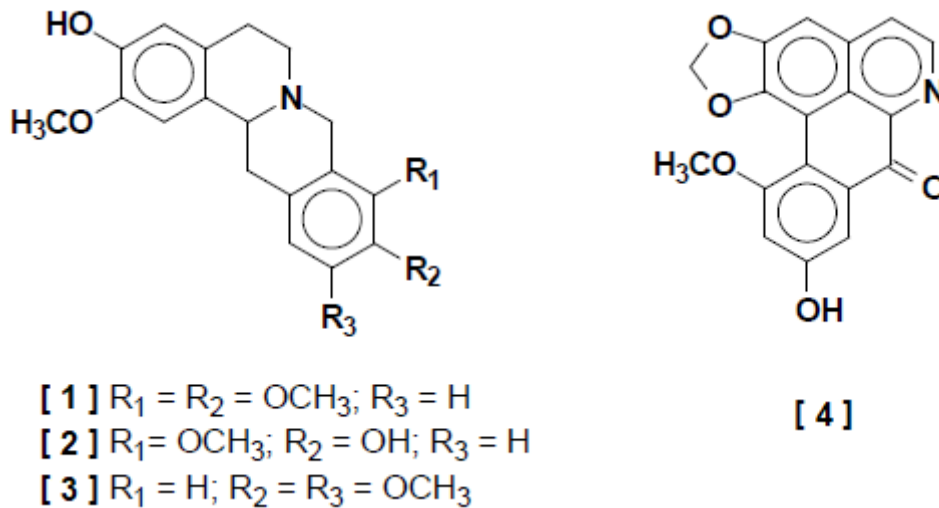
Além disso, as plantas pertencentes à essa família possuem como os principais metabólitos secundários os alcaloides, entretanto, outras substâncias podem ser encontradas (LÚCIO *et al.*, 2015).

1.4.1 Espécie *Guatteria discolor*

O gênero *Guatteria* é o maior em número de espécies dentro da família Annonaceae. Existem cerca de 300 espécies de *Guatteria* distribuídas em regiões neotropicais, sendo que 88 ocorrem no Brasil (LOPES; MELLO-SILVA, 2014). É composta majoritariamente por árvores que possuem flores com pétalas externas visíveis e internas eretas cobrindo os estames e carpelos. Os frutos têm vários carpídios livres, estipitados e indeiscentes, com semente em cada um (LOPES; MELLO-SILVA, 2012).

A espécie *Guatteria discolor*, conhecida como “envira-rolinha”, está distribuída na Bolívia, Brasil, Colômbia, Guiana Francesa e Peru, sendo que no Brasil encontra-se na região norte (Acre, Amazonas e Rondônia) e Centro-Oeste (Mato Grosso) e ocorre em Florestas de Terra Firme e Floresta Ombrófila (LOBÃO e ERKENS, 2020b; MAAS *et al.*, 2015b). Em alguns estudos realizados, comprovou-se a presença de alguns alcaloides, como por exemplo, a coripalmina [1], discretamina [2], discretina [3] e a oxoisocalicina [4] que foram identificadas e isoladas das cascas do caule dessa espécie (HOCQUEMILLER *et al.*, 1984).

Figura 3 – Exemplos de alguns alcaloides extraídos das cascas da *G. discolor*



Fonte: SANTOS, 2015

Considerando que a família Annonaceae possui estudos que comprovam a presença de alcaloides em seus membros, o presente trabalho tem como intuito analisar quimicamente algumas espécies de anonáceas que não foram elucidadas nessa área.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Reconhecer comparativamente diferentes espécies de plantas da família Annonaceae ocorrentes no jardim botânico de Manaus (MUSA) por meio de ferramentas metabolômicas e através das suas potencialidades farmacológicas.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar as espécies catalogadas da família Annonaceae ocorrentes no MUSA;
- Analisar as espécies da família Annonaceae que apresentem poucos estudos de bioatividade e de prospecção química;
- Registrar moléculas oriundas dos extratos das plantas selecionadas;
- Definir quais moléculas possuem ação contra células tumorais e contra o agente causador da malária, *Plasmodium falciparum*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção e coleta das espécies

Antes de ser realizado a coleta, as espécies já haviam sido previamente identificadas e catalogadas por integrantes do projeto Catálogo Florístico do Jardim Botânico, iniciado em 2014 e ainda em andamento. Foram feitas buscas de informações no banco de dados para obter-se o número de identificação botânica e localização das plantas no Jardim Botânico, com o auxílio de tabela contendo gênero e espécie.

Com o auxílio da professora Nállaret Marina Dávila Cardozo, integrante do projeto Catálogo Florístico do Jardim Botânico, a coleta se sucedeu. Os materiais utilizados foram: bússola; terçado; tesoura de poda; saco plástico (100 L); lápis de grafite, papel para anotações. Todas as espécies coletadas foram colocadas em saco plástico identificados com o nome da espécie, data da coleta e marco.

Após a coleta, as espécies foram comparadas a exsicatas depositadas no Herbário do INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) e somente as que possuíam exsicatas e identificação foram selecionadas. Para saber quais dessas espécies com exsicatas seriam estudadas, foi feita uma revisão bibliográfica das mesmas por meio de SciFinder, Science direct, Scielo e Google Escola. E assim, as cinco espécies *Annona neoinsignis*, *Duguetia asterotricha*, *Fusaea longifolia*, *Guatteria discolor* e *Xylopia benthamii* foram escolhidas.

3.2 Obtenção de extratos brutos

Para obtenção dos extratos, o material vegetal, isto é, as folhas e os galhos coletados, foram higienizados com detergente neutro, água corrente e submetido à

secagem em estufa (Marconi®) de ar circulante, com temperatura de aproximadamente 45 °C por 5 dias. Após a secagem, o material foi pulverizado em moinho de facas, para aumentar a superfície de contato entre o material vegetal e os solventes extratores utilizados. Em seguida, foram pesados para determinar o peso seco, e colocados em saco de papel identificado.

Para ocorrer a extração, 200g de cada vegetal seco foi deixado em contato com 1L de metanol 80% em um erlenmeyer por 48 h. Passado o tempo de extração, o conteúdo foi filtrado através de filtros de papel, funil e balão de fundo redondo obtendo somente a parte líquida, que foi rotaevaporado (Fisatom®) em banho termostático à 40 °C para a remoção parcial do solvente, isto é, o metanol.

No material metanólico obtido após a rotaevaporação foi adicionado 100 ml de água destilada. Após isso, o líquido foi colocado em um funil de separação de 1L e nele foi acrescentado 200 ml de Hexano (Qhemis®, P.A). Para que o solvente entrasse em contato com o líquido rotaevaporado, alguns movimentos no vidro foram realizados surgindo assim um conteúdo bifásico. Feito isso, o sobrenadante, isto é, o material hexânico foi filtrado e o restante do líquido metanólico foi retirado e colocado novamente no funil. Todo este processo foi repetido mais duas vezes com o solvente Hexano.

Após a extração hexânica, ainda no funil de separação, no líquido metanólico 200 ml de Diclorometano (Synth®, P.A) foi acrescentado. Houve a mistura do diclorometano com o líquido originando um conteúdo bifásico. Entretanto, somente a parte inferior foi filtrada, isto é, o material com diclorometano. A mistura e filtração com o solvente foi repetida mais duas vezes. Após isso, o líquido metanólico foi descartado e o material hexânico e o material com diclorometano foram rotaevaporados.

Após a rotaevaporação, os extratos com hexano e com diclorometano foram colocados em recipientes de vidro etiquetados e pré-pesados, armazenados em um dessecador para que os solventes fossem evaporados originando assim os extratos brutos, onde foram novamente pesados e armazenados em um refrigerador a uma temperatura entre 2 °C - 8 °C até o momento das análises.

3.3 Análise por LC-HRMS/MS dos extratos

Este ensaio foi realizado em colaboração com a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob a coordenação da Prof. Dr. Rafael Garrett.

Para a realização desta análise, os extratos foram analisados em um sistema de cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massa de alta resolução (LC-HRMS/MS). Para isso, às amostras foram adicionados metanol grau HPLC em um tubo de centrífuga até uma concentração final de 2mg/mL. Cada amostra foi levada ao vortex por 30 s. Depois, cada tubo foi colocado em banho de ultrassom por 15 minutos à 30 °C ou até dissolver as amostras. Novamente, cada amostra foi levada ao vortex por 1 min para posteriormente ser centrifugado por 10 minutos a 9000 RPM e o sobrenadante removido para outro tubo de 1,5 mL. Finalmente, foi retirado 100 µL de sobrenadante da amostra e adicionado 100 µL de solvente MeOH:H₂O (1:1) para uma concentração final de 1mg/mL em insertes de 250 µL para a análise por CL-EMAR.

O equipamento utilizado foi o Cromatógrafo Líquido Dionex LC UltiMate 3000 acoplado ao espectrômetro de massas Thermo QExactive Plus com fonte de ionização por eletronebulização.

As condições cromatográficas eram coluna cromatográfica Hypersil Gold C₁₈ (50 mm x 2,1 mm; 1,9 µm), Fase Móvel A (H₂O + 0,1 % ácido fórmico e 5Mm formiato de amônio) e Fase Móvel B (MEOH + 0,1 % ácido fórmico). Eluição em modo gradiente: 0-0.5 min B 30 %; 10-12 min B 95 %; 12.1-16.0 min B 30 %, vazão de 350 µL.min⁻¹, injeção de 3 µL, temperatura do forno da coluna de 40 °C e tempo total de análise 16 min.

E as condições do espectrômetro de massas eram: *Método 1, troca de polaridade*: Modos ESI (±), Full scan m/z 100-1000, resol. 35K, AGC 1e6, IT 120 ms + dd-MS2 (topN 3), resol. 17,5K, AGC 1e5, IT 50 ms, N(CE)=15, 45 (pos) e 10,30 (neg). *Método 2*: Modos ESI (+), Full scan m/z 100-1000, resol. 70K, AGC 1e6, IT 150 ms + dd-MS2 (topN 10), resol. 17,5K, AGC 1e5, IT 50 ms, N(CE)=15, 45. *Método 3*: Modos ESI (+), Full scan m/z 450-200, resol. 70K, AGC 1e6, IT 150 ms + dd-MS2 (topN 10), resol. 17,5K, AGC 1e5, IT 50 ms, N(CE)=15, 45.

3.4 Ensaios *in vitro*

3.4.1 Determinação *in vitro* do percentual de inibição de crescimento de células tumorais versus células não tumorais

Para avaliar a citotoxicidade das substâncias sobre a proliferação de células tumorais e normais, o ensaio do alamar blue será realizado após 72 horas de

exposição. As células tumorais ou não tumorais serão distribuídas em multiplacas de 96 cavidades numa densidade de $0,3 \times 10^6$ células/mL ou $0,7 \times 10^5$ células/mL. Também serão utilizadas as linhagens *knockouts* para estudar os mecanismos de apoptoses. A substância teste (0,09 a 50 µg/mL) dissolvida em DMSO será adicionado em cada poço, utilizando o HTS (*high-throughput screening*), e encubadas por 72 horas. A doxorrubicina será utilizada como controle positivo com concentrações variando de 0,003 a 5 µg/mL. O controle negativo receberá a mesma quantidade de DMSO. As substâncias serão testadas em diluições seriadas, em duplicata ou triplicata. Será registrada a percentagem de inibição x log da concentração e determinado suas CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

3.4.2 Ensaio antimaláricos

Para o cultivo de *Plasmodium falciparum* (cepa FRC3) será utilizado o meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 25 mM de HEPES, hipoxantina (50 mg/L), glicose (2g/L) e de gentamicina (50 mg/L) (LJUNGSTRÖM et al., 2004). Ao meio RPMI será adicionado 10% de soro humano tipo AB+ e eritrócitos humanos normais. A incubação será realizada durante 72 horas em câmara de hipóxia à 37 °C em uma atmosfera contendo mistura gasosa específica (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂) (TRAGER & JENSEN, 1976).

Os ensaios antimaláricos serão realizados em placas de 96 poços de fundo chato, com um volume total de 100 µL, nos quais serão testadas diferentes concentrações dos extratos vegetais por meio de diluições seriadas (50 → 3,12 µg/mL). A proporção para cada poço será de 50 µL de extrato em DMSO para 50 µL de suspensão de eritrócitos infectados por *P. falciparum* em meio RPMI (hematócrito final 2% e parasitemia 1%). O crescimento parasitário será comparado com os controles positivo (ausência de droga), e negativo (quinina). As placas de 96 poços ficarão incubadas por 72 horas à 37 °C na mesma atmosfera utilizada anteriormente.

A verificação da parasitemia final será realizada por citometria de fluxo em um equipamento modelo FACSCanto II. A análise das amostras será realizada através do software Getting Started with BD FACSDiva. Como corante para a fluorescência será utilizado brometo de etídio. Ao final será calculada a inibição do crescimento parasitário no software GraphPad GraphPad Prism 6 de acordo com a fórmula:

$$\%inib. = 100 - \frac{\%fluoresc\hat{e}ncia\ amostra - \%fluoresc\hat{e}ncia\ erit.\ s\acute{a}dios}{\%fluoresc\hat{e}ncia\ controle - \%fluoresc\hat{e}ncia\ erit.\ s\acute{a}dios} \times 100$$

Ao final serão considerados ativos os extratos com inibições superiores a 70% (parasitemia ~ 3,5).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Obtenção dos extratos brutos

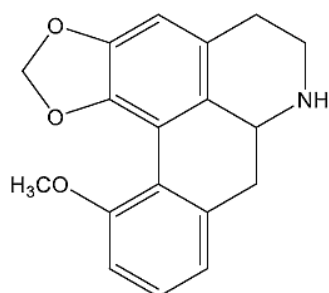
Foram obtidos 10 extratos a partir do diclorometano (5 de galhos e 5 de folhas) e 10 extratos hexânicos (5 de galhos e 5 de folhas), totalizando 20 extratos. Entretanto, somente as amostras diclorometânicas foram utilizadas nas análises.

4.2 Amostras analisadas por LC-HRMS/MS

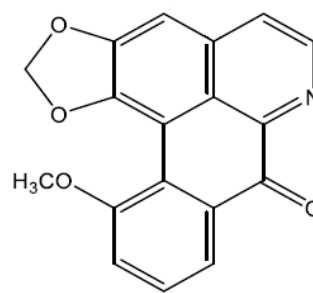
Os 10 extratos diclorometânicos foram enviados para a análise no Instituto de Química, na Universidade Federal do Rio de Janeiro. Entretanto, somente uma amostra conseguiu ser analisada, as demais apresentaram problemas na dissolução. A que pôde ser solubilizada pertencia às folhas da espécie *Guatteria discolor*.

Através da análise de espectrometria de massas, obtidas por meio da ionização por eletrospray em modo positivo de aquisição dos dados (ESI⁺), foi identificado os alcaloides puterina com *m/z* 296, oxoputerina com *m/z* 306, assimilobina com *m/z* 268 e anonaína com *m/z* 266.

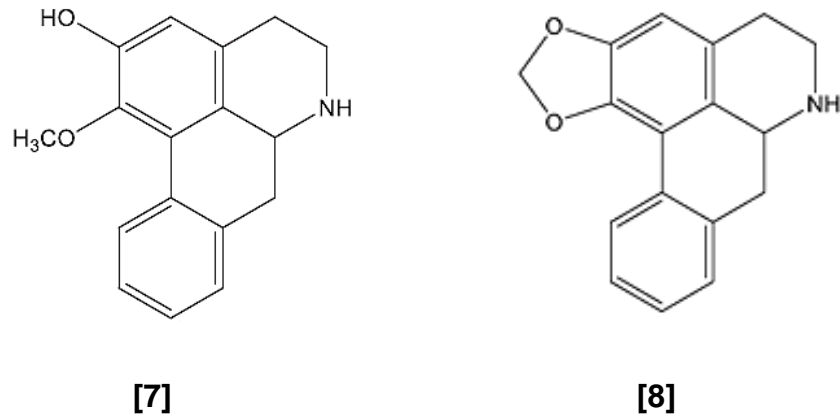
Figura 4 – Estruturas da puterina [5], oxoputerina [6], assimilobina [7] e anonaína [8].



[5]



[6]



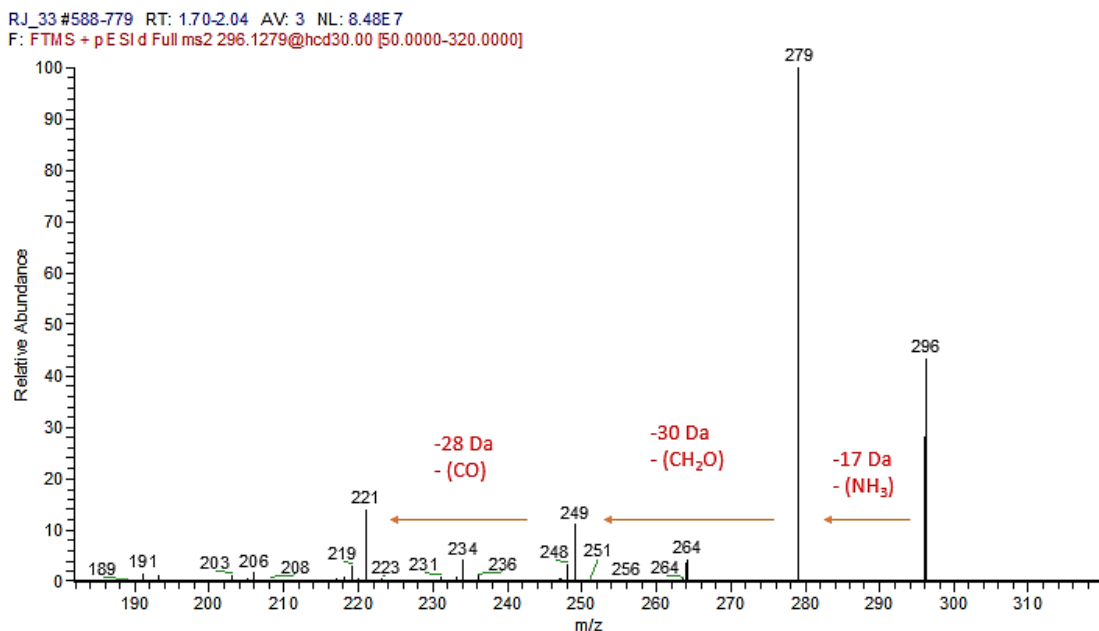
Fonte: modificado de ARAÚJO,2019.

As fórmulas moleculares das moléculas encontradas são $C_{18}H_{17}NO_3$ (puterina), $C_{18}H_{11}NO_4$ (oxoputerina), $C_{17}H_{17}NO_2$ (asimilobina) e $C_{17}H_{17}NO_2$ (anonaína).

4.2.1 Alcaloide puterina

A primeira molécula protonada $[M+H]^+$ encontrada possuía m/z 296, este íon apresentou perdas sequenciais de 17 ($-NH_3$), 30 ($-CH_2O$) e 28 Da ($-CO$) quando foi submetido a fragmentação, corroborando os relatos de STÉVIGNY *et al.* (2005) para os alcaloides do tipo aporfínico. A identificação desta molécula é comprovada através da obra de ARAÚJO (2019) que descreveu as mesmas perdas no íon encontrado e o identificou como um alcaloide aporfínico *sensu stricto* chamado puterina.

Figura 5 – Perfil de fragmentação da molécula puterina.



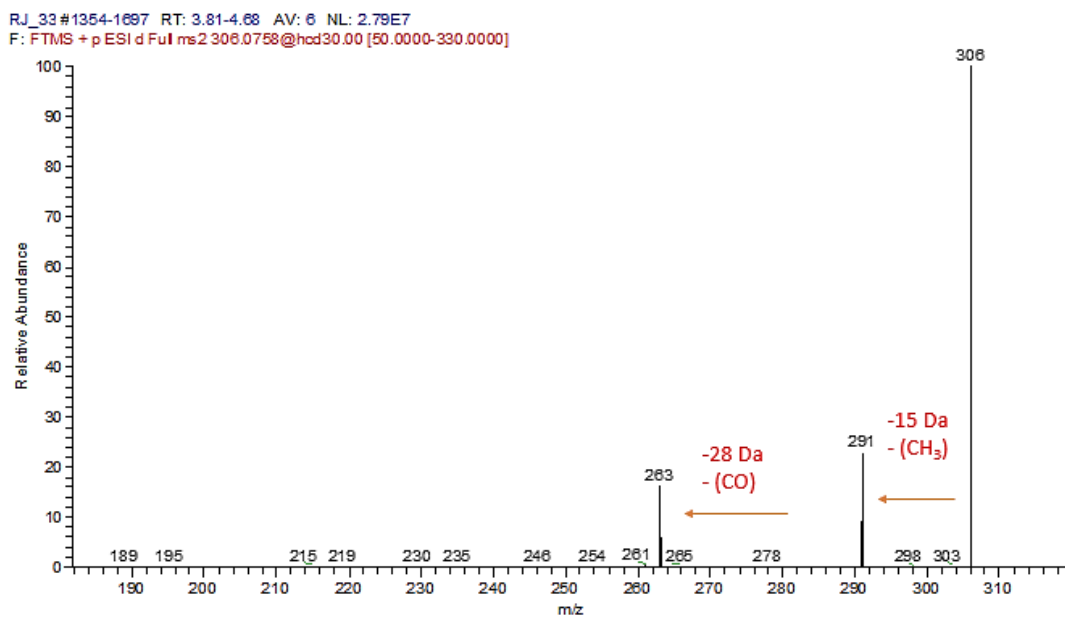
Fonte: Dados do autor, 2021.

Além de ter sido descrito na espécie *G. discolor* (HOCQUEMILLER, *et al.*, 1984), este íon já foi encontrado em outras espécies do gênero *Guatteria* (HSU *et al.*, 1977b; RASAMIZAFY *et al.*, 1986). Na literatura, não há relatos de sua atividade biológica.

4.2.2 Alcaloide oxoputerina

Na fragmentação do íon com m/z 306 constatou-se uma perda inicial de 15 Da, correspondente ao grupo metil (-CH₃) originando um fragmento com m/z 291. Na segunda fragmentação a partir da m/z 291, ocorreu a perda de 28 Da (-CO) surgindo assim um fragmento com m/z 263, conforme a Figura 6. Essa análise confirma o perfil de fragmentação para um alcaloide oxoaporfínico chamado oxoputerina, de acordo com SILVA *et al.* (2017).

Figura 6 – Perfil de fragmentação da molécula oxoputerina.



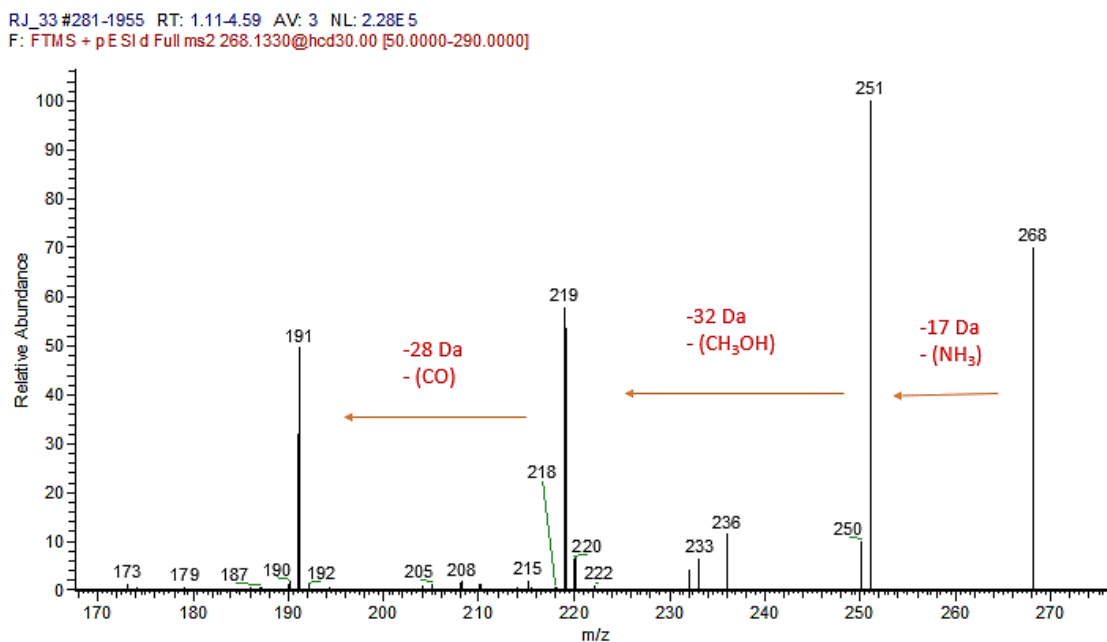
Fonte: Dados do autor, 2021.

Esse alcaloide já foi descrito na espécie *G. discolor* (HOCQUEMILLER, *et al.*, 1984) entretanto, já foi identificado em várias outras espécies de anonáceas, como na *Duguetia calycina*, *G. elata*, *G. sagotiana* e *G. citriodora* (ROBLOT *et al.*, 1978; HSU *et al.*, 1977a; RASAMIZAFY *et al.*, 1986; RABELO *et al.*, 2014). Em relação a sua atividade biológica, conforme relata FERREIRA *et al.* (2017) tem potencial leishmanicida.

4.2.3 Alcaloide assimilobina

A molécula protonada com m/z 268 quando submetida a fragmentação, obteve perdas sequenciais sucessivas de 17 (-NH₃), 32 (-CH₃OH) e 28 Da (-CO), confirmando os relatos de YAN *et al.* (2013); SILVA *et al.* (2012) e SILVA *et al.* (2014) para o alcaloide aporfínico *sensu stricto* conhecido como assimilobina.

Figura 7 – Perfil de fragmentação da molécula assimilobina.



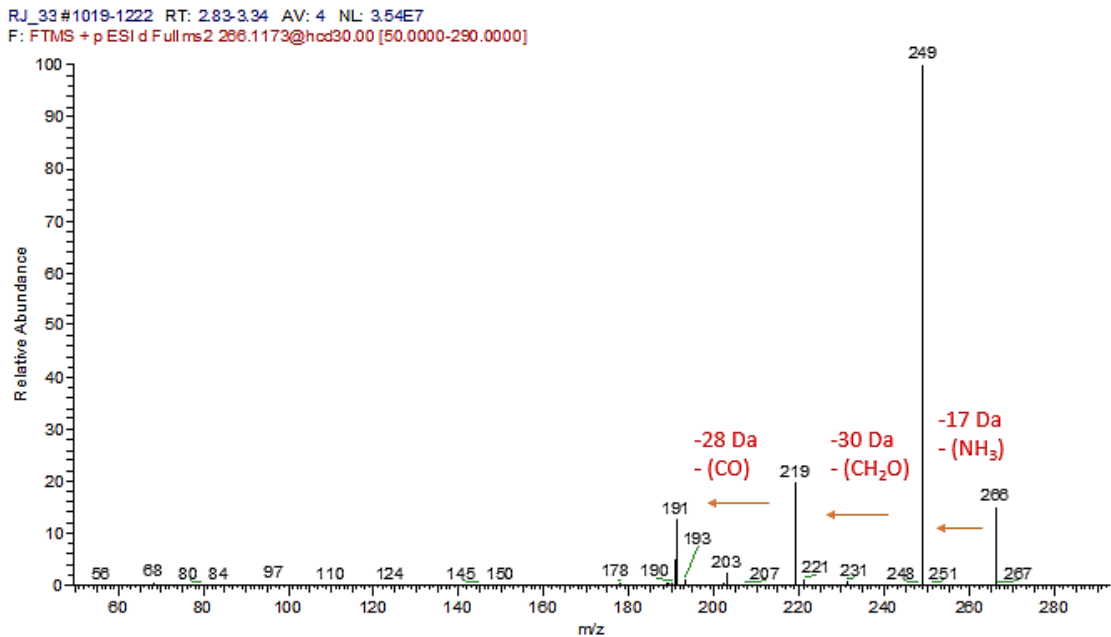
Fonte: Dados do autor, 2021.

Esta molécula é amplamente encontrada em vários gêneros da família Annonaceae, como por exemplo, no gênero *Annona*, *Guatteria*, *Cananga* e *Unonopsis* (HASRAT *et al.*, 1997; HOCQUEMILLER *et al.*, 1983; HSIEH *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2012) e possui efeito antidepressivo (HASRAT *et al.*, 1997) e uma potencial atividade antioxidante, de acordo com COSTA *et al.* (2013).

4.2.4 Alcaloide anonaína

E a quarta molécula protonada encontrada possuía a m/z 266. Quando este íon foi submetido a fragmentação, as consequentes m/z encontradas foram 249, 219 e 191, respectivamente, sugerindo primeiramente a perda do grupo amino (NH₃) e sucessivas perdas dos grupos constituintes CH₂O e CO (-17, -30 e -28 Da). Este tipo de fragmentação comprova os relatos de SILVA *et al.* (2012) e SILVA *et al.* (2014) para o alcaloide aporfínico *sensu stricto* anonaína.

Figura 8 – Perfil de fragmentação da molécula anonaína.



Fonte: Dados do autor, 2021.

Este íon já foi identificado em algumas espécies da família Annonaceae (SILVA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2014) e tem potencial antidepressivo (HASRAT *et al.*, 1997), além de efeitos vasorrelaxantes, antibacterianos, antifúngicos, antioxidantes e anticancerígenos (LI *et al.*, 2013).

Segundo CAVÉ *et al.*, (1989), as substâncias puterina e oxoputerina pertencem a espécie *G. discolor*, entretanto, não consta na literatura a presença das moléculas assimilobina e anonaína nesta planta. Estas duas substâncias só foram relatadas em outras espécies do gênero *Guatteria*, como na *G. pogonopus*, *G. olivaceae* e *G. scandens* (SANTOS, 2015; ARAÚJO, 2019 e HOCQUEMILLER *et al.*, 1983) e em outros gêneros pertencentes a família Annonaceae (HASRAT *et al.*, 1997; HSIEH *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2012). Sendo assim, são inéditas para a *G. discolor*.

4.3 Ensaios *in vitro*

Em decorrência da pandemia de 2020, os ensaios contra células tumorais e contra o agente causador da malária não puderam ser realizados.

5 CONCLUSÃO

A análise das folhas da espécie *Guatteria discolor* por meio de espectrometria de massas resultou no isolamento de 4 substâncias alcaloídicas (3 aporfínicos *sensu stricto* e um oxoporfínico), sendo duas inéditas para esta espécie. As que foram relatadas em trabalhos anteriores com a *G. discolor* foram as substâncias **puterina** e a **oxoputerina**, as moléculas **asimilobina** e **anonáina** foram identificadas somente em outras espécies do gênero.

Dentre os alcaloides encontrados, não há relatos na literatura sobre as possíveis atividades biológicas da molécula puterina e poucos estudos afirmando as potenciais bioatividades da molécula oxoputerina, sugerindo assim a realização de novos estudos com estas substâncias.

Em decorrência da pandemia, não foi possível realizar os ensaios contra as células tumorais e contra o agente da malária, *Plasmodium falciparum* sugerindo assim pesquisas futuras das moléculas encontradas nestes ensaios.

E apesar das demais plantas não terem sido analisadas, os resultados obtidos através da *G. discolor* mostram que as espécies da família Annonaceae são fontes promissoras de substâncias biologicamente ativas e contribui para o conhecimento quimiotaxonômico do gênero, da espécie, assim como, da família em geral.

Como perspectivas futuras está a realização das análises com as demais plantas que não puderam ser avaliadas e também dos ensaios *in vitro* para o registro das moléculas que possuem atividades antimaláricas e antitumorais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M.R.; PINTO, A.C. Uma breve história da química Brasileira. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 63, p.41-44, 2011.
- ALMASSY-JÚNIOR, A.A.; LOPES, C.R.; SILVA, F.D.; ARMOND, C.; JÚNIOR, A.A. A.; CASALI, V.W.D. **Folhas de chá: Plantas medicinais na terapêutica humana**. Viçosa: UFV, 2005. 233 p.
- ARAÚJO, M. de S. **Constituintes químicos e investigação do potencial citotóxico das cascas e folhas de *Guatteria olivacea* (Annonaceae)**. 2019. 172 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pesquisa e Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019.
- ASHIHARA, H.; SANO, H.; CROZIER, A. Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. **Phytochemistry**, v. 69, p. 841-856, 2008.
- ATANASOVA, M.; YORDANOV, N.; DIMITROV, I.; BERKOV, S.; DOYTCHINOVA, I. Molecular docking study on galantamine derivatives as cholinesterase inhibitors. **Molecular Informatics**, v. 34, p. 394-403, 2015.
- CAVÉ, A.; LEBOEUF, M.; CASSELS, B.K. Alkaloids from *Guatteria*. In: BROSSI, A. **The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology**. USA: Academic Press, 1989. cap. 1, p.1-76.
- CHATROU, L.W.; RAINER, H.; MAAS, P.J.M. Annonaceae (Soursop Family). In: SMITH, N.; MORI, S.A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D.W.; HEALD, S.V (eds.). **Flowering Plants of the Neotropics**. Princeton University Press, publicado em associação com The New York Botanical Garden, Princeton, 2004. p. 18-20.
- CHATROU, L.W.; PIRIE, M.D.; ERKENS, R.H.J.; COUVREUR, T.L.P.; NEUBIG, K.M.; ABBOTT, J.R.; MOLS, J.B.; MAAS, J.W.; SAUNDERS, R.M.K.; CHASE, M.W. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.169, p. 5–40, 2012.
- COSTA, E.V.; CRUZ, P.E.O. da.; LOURENCO, C.C. de.; MORAES, V. R. de S.; NOGUEIRA, P.C. de L.; SALVADOR, M.J. Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* A. DC. (Annonaceae). **Natural Product Research**, v. 27, p.1002–1006, 2013.
- CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.B.; GRUSSEIM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. USA: Rockville, Md.: American Society Of Plant Physiologists, 2000. cap. 24. p. 1250-1319.

DASGUPTA, A. **Fighting an opioid epidemic: the role of providers and the clinical laboratory in understanding who is vulnerable.** Texas: Elsevier, 2020. 149 p.

FERREIRA, C.; PASSOS, C.L.A.; SOARES, D.C.; COSTA, K.P.; REZENDE, M.J.C.; LOBÃO, A.Q.; PINTO, A.C.; HAMERSKI, L.; SARAIVA, E.M. Leishmanicidal activity of the alkaloid-rich fraction from *Guatteria latifolia*. **Experimental Parasitology**. v.172, p. 51-60, 2017.

GIANNENAS, I.; SIDIROPOULOU, E.; BONOS, E.; CHRISTAKI, E.; FLOROU-PANERI, P. The history of herbs, medicinal and aromatic plants, and their extracts: past, current situation and future perspectives. In: FLOROU-PANERI, P.; CHRISTAKI, E.; GIANNENAS, I. (ed.). **Feed additives: aromatic plants and herbs in animal nutrition and health.** USA: Academic Press, 2020. p. 1-18.

HAMED, A.; BOGUSZEWSKI, P.M. Effects of Morphine and Other Opioid Ligands on Emission of Ultrasonic Vocalizations in Rats. **Handbook of Ultrasonic Vocalization**, Polônia, v. 25, p. 327-334, 2018.

HASRAT, J. A.; BRUYNE, T. de.; BACKER, J.-P. de.; VAUQUELIN, G.; VLIETINCK, A. J. Isoquinoline Derivatives Isolated from the Fruit of *Annona muricata* as 5-HTergic 5-HT_{1A} Receptor Agonists in Rats: Unexploited Antidepressive (Lead) Products. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.49, p. 1145-1149, 1997.

HOCQUEMLLER, R.; RASAMIZAFY, S.; CAVÉ, A. Alcaloides des Annonacees xxxvii: alcaloides du *Guatteria scandens*. **Journal of Natural Products**. v.46, p.335-341, 1983.

HOCQUEMILLER, R.; DEBITUS, C.; ROBLOT, F.; CAVÉ, A. Alcaloides Des Annonacees, XLVIII. Alcaloides des Écorces de *Guatteria discolor*. **Journal of Natural Products**, v. 47, p.353-362, 1984.

HSIEH, T.J.; CBANG, F.R.; WU, Y. The Constituents of *Cananga odorata*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v.46, p.607-611, 1999.

HSU, C.C.; DOBBERSTEIN, R.H.; CORDELL, G.A.; FARNSWORTH, N.R. Isolation of lauterine and oxoputerine, two new oxoaporphine alkaloids from *Guatteria elata*. **Lloydia**, v. 40, p. 152-156, 1977a.

HSU, C.C.; DOBBERSTEIN, R.H.; CORDELL, G.A.; FARNSWORTH, N.R. Structure elucidation of norlaureline and puterine, new noraporphine alkaloid from *Guatteria elata*. **Lloydia**, v. 40, p. 505-507, 1977b.

KRINSKI, D.; MASSAROLI, A.; MACHADO, M. Potencial inseticida de plantas da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 225-242, 2014.

LI, H.T.; WU, H.M.; CHEN, H.L.; LIU, C.M.; CHEN, C.Y. The Pharmacological Activities of (-)-Anonaine. **Molecules**, v.18, p.8257-8263, 2013.

LOBÃO, A.Q. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Annonaceae. **Rodriguésia**, v. 67, p. 1205-1209, 2016.

LOBÃO, A.Q.; LOPES, J.C.; ERKENS, R.H.J.; MENDES-SILVA, I.; PONTES PIRES, A.F.; SILVA, L.V.; OLIVEIRA, M.L.B.; JOHNSON, D.; MELLO-SILVA, R. (in

memoriam). *Annonaceae in Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2020a. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB110219>>. Acesso em: 01 de junho de 2020.

LOBÃO, A.Q.; ERKENS, R.H.J. *Guatteria in Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2020b. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB110388>>. Acesso em: 01 de junho de 2020.

LOPES, J.C.; MELLO-SILVA, R. Annonaceae do Parque Estadual de Ibitipoca, Minas Gerais. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 30, p. 157-164, 2012.

LOPES, J.D.C.; MELLO-SILVA, R. Diversidade e Caracterização das Annonaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 125-131, 2014.

LUCIO, A.S.S.C.; ALMEIDA, J.R.G.S.; CUNHA, E.V.L.; TAVARES, J.F.; BARBOSA FILHO, J.M. Alkaloids of the Annonaceae: Occurrence and a Compilation of Their Biological Activities. In: A CORDELL, G. **The Alkaloids - Chemistry and Biology**. Usa: Academic Press, 2015. cap. 5. p. 233-409.

MAAS, P.; LOBÃO, A.; RAINER, H. *Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015a Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110219>>. Acesso em 01 de junho de 2020.

MAAS, P.J.M.; WESTRA, L.Y.T.; ARIAS GUERRERO, S.; LOBÃO, A.Q.; SCHARF, U.; ZAMORA, N.A; ERKENS, R.H.J. Enfrentando um pesadelo morfológico: revisão do gênero neotropical *Guatteria* (Annonaceae). **Blumea**. v. 50, p.1-219, 2015b.

MATOS, R. L. A.; SPINOLA, L. A.; BARBOZA, L. L.; GARCIA, D. R.; FRANÇA, T. C. C.; AFFONSO, R. S. O Uso do Canabidiol no Tratamento da Epilepsia. **Revista Virtual de Química**, v.9, p. 786-814, 2017.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as drugs and leads to drugs: the historical perspective. In: BUSS, Antony D.; BUTLER, M.S. **Natural Product Chemistry for Drug Discovery**, USA: Royal Society of Chemistry, 2010. cap 1, p. 3-27.

PAPICH, M.G. **Saunders Handbook of Veterinary Drugs: small and large animal**. 4. ed. Missouri: Elsevier, 2016.

PELLETIER, S. W. **Alkaloids Chemical and Biological Perspectives**. v.1. New York, USA: Springer, 1983.

RABELO, D. de M.; PINHEIRO, M.L.B.; BARISON, A.; SALOMÉ, K.S.; COSTA, E.V.; SILVA, F.M.A. da.; CHAVES, Y.O.; BASTOS, I. dos S. Alcaloides isoquinolínicos e investigação das atividades antiplasmódica e antibacteriana de *Guatteria citriodora* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 37, p.1453-1458, 2014.

RABELO, S.V.; QUINTANS, J.D.S.S.; COSTA, E.V.; ALMEIDA, J.R.G.D.S.; QUINTANS JÚNIOR, L.J. Annona Species (Annonaceae) Oils. In: PREEDY, V. R. **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. Uk: Academic Press, 2016. cap. 24. p. 221-229.

RASAMIZAFY, S.; HOCQUEMLLER, R.; CAVÉ, A. Alcaloides des Annonacees lxxii, alcaloides du *Guatterla sagotlana*, **Journal of Natural Products**. v. 49, p.1078-1085, 1986.

REZENDE, F.M.D.; ROSADO, D.; MOREIRA, F.A.; CARVALHO, W.R.S.D. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. In: BOTÂNICA NO INVERNO, 2016, São Paulo. **IX Botânica no Inverno 2016**. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, 2016. p. 93-104.

ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; JACQUEM, R.H.; CAVÉ, A. Alcaloïdes des annonacees. Xxiv. - alcaloïdes de *Duguetia calycina* benoist, annonacée guyanaise. **Plantes Médicinales et phvtothérapie**. v. 12, p. 259-266, 1978.

ROCHA, F.A.G.; ARAÚJO, M.F.F.; COSTA, N.D.L.; SILVA, R.P. **O uso terapêutico da flora na história mundial**. Holos, 2015.

SANTOS, M. de F.C. **Estudo Fitoquímico e Investigação da Atividade Citotóxica das Folhas e Cascas do Caule de *Guatteria pogonopus***. 2015. 177 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Química, Química, Universidade Federal de Sergipe, Manaus, 2015.

SILVA, F.M.A.; KOOLEN, H.H.F.; ALMEIDA, R.A.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Desrepliação de alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos de *Unonopsis guatterioides* por esi-it-ms. **Química Nova**, v. 35, p.944-947, 2012.

SILVA, F.M.A.; SOUZA, A.D.L.; KOOLEN, H.H.F.; BARISSON, A.; VENDRAMIN, M.E.; COSTA, E.V.; FERREIRA, A.G.; PINHEIRO, M. L. B. Phytochemical Study of the Alkaloidal Fractions of *Unonopsis duckei* R. E. Fr. Guided by Electrospray Ionisation Ion-trap Tandem Mass Spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v. 25, p.45–49, 2014.

SILVA, F.M.A.; ALMEIDA, R.A.; HEERDT, G.; SOUSA, I.L.; SILVA-FILHO, F.A.; ALENCAR, D. C.; COSTA, E.V.; SOUZA, A.D.L.; PINHEIRO, M.L.B.; MORGON, N.H.; KOOLEN, H.H.F. Positive electrospray ionization ion trap mass spectrometry and ab initio computational studies of the multi-pathway fragmentation of oxoaporphine alkaloids. **International Journal of Mass Spectrometry**, v.418, p.30-36, 2017.

SRIVASTAV, V.K.; EGBUNA, C.; TIWARI, M. Plant secondary metabolites as lead compounds for the production of potent drugs. In: EGBUNA, C.; KUMAR, S.; IFEMEJE, J.C.; EZZAT, S.M.; KALIYAPERUMAL, S. (ed.). **Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug Discovery**, USA: Elsevier, 2020. cap. 1, p. 3-14.

STÉVIGNY, C.; BAILLY, C.; QUETIN-LACLERCQ, J. Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents**, v.5, p.173-182, 2005.

SWEETMAN, S.C. **Martindale: The Complete Drug Reference.** Londres: Pharmaceutical Press, 2007. 4160 p.

TEIXEIRA, A. F. **Metabólitos secundários de frutos de *Virola molissima* (Poepp. ex A. DC.) Warb.: Neoliganas e atividades antifúngicas.** 158 fls. Tese (Doutorado em Química) – Universidade de São Paulo, Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Química, São Paulo, 2007.

VIZZOTO, M.; KROLOW, A.C.; WEBER, G.E. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância.** – Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 16 p. – (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316).

YAN, R.; WANG, W.; GUO, J.; LIU, H.; ZHANG, J.; YANG, B. Studies on the Alkaloids of the Bark of *Magnolia officinalis*: Isolation and On-line Analysis by HPLC-ESI-MSn. **Molecules**, v. 18, p. 7739-7750, 2013.