



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO - UFMT  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE  
BIOTECNOLOGIA - REDE BIONORTE



**ESTUDO QUÍMICO-BIOLÓGICO DAS FOLHAS DE *BOCAGEOPSIS*  
*MULTIFLORA* (MART.) R.E.FR, *DUGUETIA QUITARENSIS* BENTH ,  
*FUSAEA LONGIFOLIA* (AUBL.) SAFF E *GUATTERIA PUNCTATA* (AUBL.)  
R. A. HOWARD (ANNONACEAE)**

**MÁRCIA BAY**

**Cuiabá-MT  
2022**

**MÁRCIA BAY**

**ESTUDO QUÍMICO-BIOLÓGICO DAS FOLHAS DE *BOCAGEOPSIS*  
*MULTIFLORA* (MART.) R.E.FR, *DUGUETIA QUITARENSIS* BENTH,  
*FUSAEA LONGIFOLIA* (AUBL.) SAFF E *GUATTERIA PUNCTATA* (AUBL.)  
R. A. HOWARD (ANNONACEAE)**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal de Mato Grosso, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor(a) em Biotecnologia.

Orientador(a): Prof. Dr. Domingos Tabajara  
de Oliveira Matins

**Cuiabá-MT  
FEVEREIRO/2022**

## FICHA CATALOGRÁFICA

### Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

B356c BAY, MÁRCIA.  
ESTUDO QUÍMICO-BIOLÓGICO DAS FOLHAS DE  
BOCAGEOPSIS MULTIFLORA (MART.) R.E.FR, DUGUETIA  
QUITARENSIS BENTH, FUSAEA LONGIFOLIA (AUBL.) SAFF E  
GUATTERIA PUNCTATA (AUBL.) R. A. HOWARD (ANNONACEAE)  
/ MÁRCIA BAY. -- 2022  
154 f. ; 30 cm.

Orientador: Domingos Tabajara de Oliveira Matins.  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Rede  
Bionorte, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia,  
Cuiabá, 2022.  
Inclui bibliografia.

1. Óleo Essencial. 2. Extrato Bruto. 3. Alcalóides. 4. HRQTOF-  
ESI/MS. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.**

MÁRCIA BAY

**ESTUDO QUÍMICO-FARMACOLÓGICO DAS FOLHAS DE  
*BOCAGEOPSIS MULTIFLORA* (MART.) R.E.FR, *DUGUETIA*  
*QUITARENSIS* BENTH, *FUSAEA LONGIFOLIA* (AUBL.) SAFF E  
*GUATTERIA PUNCTATA* (AUBL.) R.A. HOWARD (ANNONACEAE)**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado  
do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e  
Biotecnologia da Rede BIONORTE, na (Universidade  
Federal de Mato Grosso), como requisito parcial para a  
obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia.

Aprovada em: 23 /agosto / 2022

**Banca examinadora**

Documento assinado digitalmente  
 DOMINGOS TABAJARA DE OLIVEIRA MARTINS  
Data: 28/10/2022 11:06:06-0300  
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Domingos Tabajara de Oliveira Martins (UFMT)  
Orientador e Presidente da Banca

Documento assinado digitalmente  
 ARUNACHALAM KARUPPUSAMY  
Data: 24/10/2022 12:31:45-0300  
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Karuppusamy Arunachalam (UFMS)  
Examinador

Documento assinado digitalmente  
 RIVALDO NIERO  
Data: 21/10/2022 16:41:39-0300  
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Rivaldo Niero (UNIVALI)  
Examinador

Documento assinado digitalmente  
 SÉRGIO DONIZETI ASCÊNCIO  
Data: 27/10/2022 11:07:10-0300  
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Sérgio Donizeti Ascêncio (UFT)  
Examinador

Documento assinado digitalmente  
 ANA CAROLINE ZANATTA SILVA  
Data: 20/10/2022 10:16:48-0300  
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dra. Ana Caroline Zanatta Silva (UNESP)  
Examinador

## AGRADECIMENTOS

Esta tese é o resultado de um esforço conjunto, e sua produção seria impossível sem a generosidade de Deus, por sempre estar ao meu lado, ter me dado esperança, força de vontade e acima de tudo a sabedoria para a conquista de mais uma vitória pessoal e profissional.

Gratidão ao meu amigo Anderson Rogério dos Santos, que se fez muito presente em todo o processo de elaboração desta tese, meu guia, minha força e inspiração desde a época da faculdade, que se mostrou alguém tão fundamental nesse ciclo, sempre disposto a me ajudar.

A Fernanda Bay Hurtado e Minelly Azevedo da Silva que se mostraram estar atentas, quando que eu precisava de apoio e não hesitaram em se disponibilizar para ajudar.

Agradeço ao Lucas Silva Abreu da Universidade Federal da Paraíba, pelas análises de espectrometria de massas e pela valiosa contribuição na elucidação dos espectros.

Em especial à minha mãe Josefina, com quem aprendo muito. Agradeço por toda paciência, confiança, carinho e amizade, que com sua simplicidade, se preocupou a cada instante com essa etapa da minha vida. Ao meu Pai Teodósio (*in memoriam*), pelo exemplo e amor, que ajudaram em muito a definir o meu caráter, e cujas lembranças estarão sempre na minha memória.

Um agradecimento especial à Plataforma da FIOCRUZ-MG René Rachou de Belo Horizonte-MG e a Plataforma Leônidas & Maria Deane de Manaus-AM, na realização dos testes biológicos os quais fizeram parte deste trabalho.

Ao LABCEM -Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas da UFAM que colaborou com as análises solicitadas de forma cordial e profissional.

A Rede Bionorte por ter me oferecido a oportunidade em realizar o doutorado e ter me apoiado nos momentos necessários, principalmente ao Coordenador Estadual Domingos Tabajara de Oliveira Martins, em me passar a confiança buscando a solução em momentos conflituosos.

Ao Instituto Federal de Ciência e Tecnologia de Rondônia (IFRO), pela oportunidade de realizar esse trabalho. Pelo espaço e apoio para realização desse trabalho no Laboratório de Química de Produtos Naturais- Campus Calama pelo suporte com as análises. Aos técnicos e alunos dos laboratórios por serem sempre solícitos nas necessidades.

A todos os que colaboraram de forma geral, que de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho, e que, por ventura, eu tenha me esquecido de agradecer.

*“Os que se encantam com a prática sem a ciência são  
como os timoneiros que entram no navio sem timão nem  
bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”*

*(Leonardo da Vinci)*

BAY, Márcia. **Estudo químico-farmacológico das folhas de *Bocageopsis multiflora*, *Duguetia quitarensis*, *Fusaea longifolia* e *Guatteria punctata* (Annonaceae).** (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia). Universidade Federal de Mato Grosso-UFMT – Cuiabá, 2022.

## RESUMO

As Annonaceas, que são frequentes nas florestas tropicais, apresentam uma diversificada produção de metabolitos secundários. Portanto, a fim de contribuir sobre o conhecimento científico desta família, estudou-se as espécies *Bocageopsis multiflora* (BM), *Duguetia quitarensis* (DG), *Fusaea longifolia* (FL) e *Guatteria punctata* (GP) comumente encontradas no Estado de Rondônia. Espécies da família Annonaceae são conhecidas por suas citações etnobotânicas, apresentando uma ampla gama de propriedades farmacológicas. Diante desse pressuposto foram escolhidas essas espécies para o estudo químico e biológico. As folhas foram coletadas, secas em temperatura ambiente, trituradas e extraído os óleos essenciais (OEs) com o aparelho tipo *Clevenger* modificado. Análises por CG-EM levaram à identificação de 23 (BG), 20 (DQ), 21 (FL) e 23 (GP) constituintes, observando-se a predominância dos sesquiterpenos e seus derivados oxigenados, sendo o (*E*)-cariofileno um dos constituintes presentes em todas as espécies investigadas em maior concentração. Nos testes biológicos realizados com OEs, observou-se atividade *in vitro* frente ao *Trypanosoma cruzi*, nos quais todos mostraram-se ativos, destacando o da *G. punctata* ( $CI_{50} = 0,029 \pm 0,014 \mu\text{g/mL}$ ) que foi 34 vezes mais ativo que o benznidazol utilizado como padrão de referência. Destacam-se também os resultados promissores para a atividade antibacteriana apresentada pelos OEs, sendo o OE de BG o mais ativo contra as cepas *Gram*-negativas e *Gram*-positivas, e o OE de FL contra bactérias *Gram*-negativas. Com os extratos brutos etanólico e metanólico das folhas, quando realizado os testes fitoquímicos preliminares confirmaram a presença de fenóis e taninos para BG, FL, GP, flavonoides DQ, alcaloides para DQ, GP e esteroides e triterpenos para FL e GP. Na determinação do teor de fenóis totais a BM apresentou também o melhor valor de  $CE_{50}$  para os extratos brutos etanólico ( $11,1 \mu\text{g/mL} \pm 0,24$ ) e metanólico ( $4,2 \mu\text{g/mL} \pm 0,75$ ). Através da técnica de desreplicação por infusão direta (IES-EM) do extrato metanólico de DQ(EMDq) foi possível identificar quatro alcaloides aporfínicos, enquanto que no extrato da GP(EMGp) foram identificados vinte alcaloides através de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UHPLC-QTOF-MS), sendo nove do tipo benzilisoquinolínico, sete aporfínico, um

oxoaporfínico, um isoquinolinico simples e dois de outras classes: um pirrolidínico e outro do tipo azaantracênico. Os resultados obtidos acerca dos constituintes fixos das espécies *DQ* e *GP* contribuem com a classificação destas espécies dentro da família Annonaceae, uma vez que os alcaloides derivados de isoquinolina estão presentes na maioria dos gêneros pertencentes a esta família. Os extratos brutos nas concentrações de 1, 3, 9, 27, 81 e 243  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentaram considerável atividade antioxidante nos ensaios realizados pelo método do DPPH, apresentando a melhor atividade para *BM*. A atividade antibacteriana dos extratos brutos etanólicos e metanólicos quando avaliada pelo método de difusão em Ágar – técnica do poço, todas as amostras testadas foram inativas frente aos microrganismos testados: *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella entérica subsp. Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sumulans*.

**Palavras-chave:** Óleo Essencial; Extrato Bruto; Alcalóides; HRQTOF-ESI/MS



BAY, Marcia. **Chemical-pharmacological study of the leaves of *Bocageopsis multiflora*, *Duguetia quitarensis*, *Fusaea longifolia* and *Guatteria punctata* (Annonaceae).** (Doctorate in Biodiversity and Biotechnology). Federal University of Mato Grosso-UFMT – Cuiabá, 2022.

## ABSTRACT

Annonaceae are frequently found in tropical rainforests, and present a wide variety of secondary metabolites. Therefore, in order to contribute with the scientific knowledge of this family, we studied the species *Bocageopsis multiflora* (BG), *Duguetia quitarensis* (DQ), *Fusaea longifolia* (FL) and *Guatteria punctata* (GP), commonly found in the state of Rondônia. Species of the family Annonaceae are known by their ethnobotanical studies, presenting a wide variety of pharmacological activities. Within this context, these species were chosen for Chemical and biological investigations. The leaves were collected, dried at room temperature, crushed, and their essential oils (EO's) were extracted with a modified *Clevenger* apparatus. GC-ME analysis lead to the identification of 23 (BG), 20 (DQ), 21 (FL) and 23 (GP) constituents, observing the predominance of sesquiterpenes and their oxygen derivatives, where (E)-caryophyllene was present in all investigated species at a higher concentration. In the biological experiments carried out with the EO's, we observed *in vitro* activity against *Trypanosoma cruzi*, for which all extracts were active. Among the investigated extracts, the EO from *G. punctata* stands out ( $IC_{50} = 0.029 \pm 0.014 \mu\text{g/mL}$ ), being 34 times more potent than benznidazole, used as reference drug. Antibacterial activity was also observed, with the EO from BG being the most active compound against Gram-negative and Gram-positive bacteria, and the EO from FL being active against Gram-negative bacteria. For the methanol and ethanol extracts from the leaves, preliminary phytochemical screening detected the presence of phenols and tannins for BG, FL, GP, flavonoids for DQ, alkaloids for DQ and GP, and sterols and triterpenes for FL and GP. When determining the total phenol content, BG also presented the best  $EC_{50}$  value for the ethanolic ( $11.1 \mu\text{g/mL} \pm 0.24$ ) and methanolic ( $4.2 \mu\text{g/mL} \pm 0.75$ ) crude extracts. Through dereplication by direct infusion (ESI-IT-MS), it was possible to identify four aporphinic alkaloids in the methanol extract from DQ (MEDq), while for GP (MEGp), 20 alkaloids were identified through mass spectroscopy coupled to ultra performance liquid chromatography (UHPLC-QTOF-MS): nine from the benzyloisoquinoline class, seven aporphine alkaloids, one oxoaporphine alkaloid, one

simple isoquinoline alkaloid, and two of other classes: one pyrrolidine alkaloid and the other belonging to the azaanthracene class. The results obtained for the fixed constituents of DQ and GP contributed with the classification of these species within the Annonaceae family, once the isoquinoline-derived alkaloids are presente in most genera belonging to this family. Crude extracts at concentrations of 1, 3, 9, 27, 81 and 243  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  showed considerable antioxidant activity in the assays performed by the DPPH method, with BM showing the best activity. The antibacterial activity of ethanolic and methanolic crude extracts when evaluated by the Agar diffusion method - well technique, showed that all samples tested were inactive against the microorganisms tested: enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sumulans*

**Keywords:** Essential Oil; Crude Extract; Alkaloids; HRQTOF-ESI/MS

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> - Distribuição da família Annonaceae (representada em verde) no mundo em zonas pantotrópicas e temperadas. ....                                                           | 9  |
| <b>Figura 2</b> - <i>Xylopia aromatica</i> Mart (A), <i>Anaxagorea dolichocarpa</i> Sprague & Sandwith (B), <i>Phaeanthus vietnamensis</i> Ban (C) e <i>Annona squamosa</i> , L (D). .... | 9  |
| <b>Figura 3</b> - Estruturas óxido de cariofileno (1) e o espatulenol (2) .....                                                                                                           | 12 |
| <b>Figura 4</b> - Flavonoides de <i>Milusa balansae</i> .....                                                                                                                             | 16 |
| <b>Figura 5</b> - Acetogeninas de <i>Annona segenaloës</i> , <i>Xylopia emarginata</i> e <i>Annona cornifolia</i> .....                                                                   | 17 |
| <b>Figura 6</b> - <i>Bocageopsis multiflora</i> (Mart.) R.E.Fr .....                                                                                                                      | 24 |
| <b>Figura 7</b> - Estruturas dos flavonoides e alcaloides isolados de espécies pertencentes ao gênero <i>Bocageopsis</i> . ....                                                           | 25 |
| <b>Figura 8</b> - Estrutura do constituinte $\beta$ - bisaboleno e espatulenol .....                                                                                                      | 25 |
| <b>Figura 9</b> - Fruto da <i>F. longifolia</i> .....                                                                                                                                     | 27 |
| <b>Figura 10</b> - Estrutura dos constituintes isolados da <i>F. Longifolia</i> .....                                                                                                     | 28 |
| <b>Figura 11</b> - <i>Duguetia quitarensis</i> Benth. ....                                                                                                                                | 30 |
| <b>Figura 12</b> - Estrutura do flavonoide Isoramentina. ....                                                                                                                             | 32 |
| <b>Figura 13</b> - Estrutura do Alcaloide N-acetilanonaína. ....                                                                                                                          | 32 |
| <b>Figura 14</b> - Alcaloides isolados da espécie da <i>D. furfuracea</i> .....                                                                                                           | 33 |
| <b>Figura 15</b> - Estruturas dos constituintes voláteis majoritários do gênero <i>Duguetia</i> . ....                                                                                    | 35 |
| <b>Figura 16</b> - <i>Guatteria punctata</i> (Aubl.) R.A Howard. ....                                                                                                                     | 37 |
| <b>Figura 17</b> - Estrutura do alcaloide isocoreximina .....                                                                                                                             | 37 |
| <b>Figura 18</b> - Alcaloides isolados da espécie <i>Guatteria citriodora</i> . ....                                                                                                      | 40 |
| <b>Figura 19</b> - Estruturas dos constituintes voláteis majoritários de espécies do gênero <i>Guatteria</i> .....                                                                        | 42 |
| <b>Figura 20</b> - Gráfico da Curva de calibração do Ácido Gálico. ....                                                                                                                   | 49 |
| <b>Figura 21</b> - Constituintes voláteis majoritários do OE de <i>B. multiflora</i> .....                                                                                                | 61 |
| <b>Figura 22</b> - Constituintes voláteis majoritários do OE de <i>D. quitarensis</i> .....                                                                                               | 61 |
| <b>Figura 23</b> - Constituintes voláteis majoritários do OE de <i>G. punctata</i> .....                                                                                                  | 62 |
| <b>Figura 24</b> - Perfil LC-MS da amostra EMDq no modo positivo (+) .....                                                                                                                | 68 |
| <b>Figura 25</b> - Alcaloides aporfinicos identificados no EMDq por ESI-MS/MS .....                                                                                                       | 69 |
| <b>Figura 26</b> - Espectro de MS/MS (+) do íon m/z 282 (nornuciferina) .....                                                                                                             | 71 |
| <b>Figura 27</b> - Espectro de MS/MS (+) do íon 292 (Lisicamina) .....                                                                                                                    | 72 |
| <b>Figura 28</b> - Espectro de MS/MS (+) do íon 326 (guatterina) .....                                                                                                                    | 73 |
| <b>Figura 29</b> - Espectro de MS/MS (+) do íon 342 (N-óxido de guatterina) .....                                                                                                         | 74 |
| <b>Figura 30</b> - Espectro de MS/MS (+) do íon 314. ....                                                                                                                                 | 75 |
| <b>Figura 31</b> - Alcaloides identificados no EMGp. ....                                                                                                                                 | 77 |
| <b>Figura 32</b> - Alcaloides identificados no EMGp. ....                                                                                                                                 | 78 |
| <b>Figura 33</b> - Alcaloides identificados no EMGp. ....                                                                                                                                 | 79 |
| <b>Figura 34</b> - Alcaloides identificados no EMGp. ....                                                                                                                                 | 79 |
| <b>Figura 35</b> - Alcaloides identificados no EMGp. ....                                                                                                                                 | 80 |
| <b>Figura 36</b> - Alcaloides identificados no EMGp. ....                                                                                                                                 | 80 |
| <b>Figura 37</b> - Espectro de massas de segunda ordem para a reticulina (m/z 330) .....                                                                                                  | 81 |
| <b>Figura 38</b> - Espectro LC-MS/MS para N-metilcoclaurina .....                                                                                                                         | 81 |
| <b>Figura 39</b> - Espectro LC-MS/MS para a higenamina. ....                                                                                                                              | 83 |
| <b>Figura 40</b> - Espectro LC-MS/MS para a N-metilhigenamina. ....                                                                                                                       | 83 |
| <b>Figura 41</b> - Espectro LC-MS/MS para a coclaurina. ....                                                                                                                              | 84 |

|                                                                                   |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 42</b> - Espectro LC-MS/MS para a N-O-dimetilcocclaurina .....          | 85  |
| <b>Figura 43</b> - Espectro LC-MS/MS para a Jusifina .....                        | 86  |
| <b>Figura 44</b> - Espectro de LC-MS/MS para a lotusina .....                     | 88  |
| <b>Figura 45</b> - Espectro de LC-MS/MS para a oblongina.....                     | 88  |
| <b>Figura 46</b> - Espectro de LC-MS/MS para a anolobina .....                    | 89  |
| <b>Figura 47</b> - Espectro de LC-MS/MS para a norushinsunina .....               | 91  |
| <b>Figura 48</b> - Espectro LC-MS/MS para a xilopina .....                        | 92  |
| <b>Figura 49</b> - Espectro LC-MS/MS para a nandigerina.....                      | 93  |
| <b>Figura 50</b> - Espectro LC-MS/MS para a lanuginosina .....                    | 94  |
| <b>Figura 51</b> - Espectro LC-MS/MS para a N-óxido guatterina .....              | 95  |
| <b>Figura 52</b> - Espectro de LC-MS/MS para a nornuciferina .....                | 95  |
| <b>Figura 53</b> - Espectro LC-MS/MS para a isoboldina.....                       | 96  |
| <b>Figura 54</b> - Espectro LC-MS/MS para a Picnarrina .....                      | 97  |
| <b>Figura 55</b> - Espectro LC-MS/MS para 4-hidróxi-N-metilprolina .....          | 98  |
| <b>Figura 56</b> - Espectro LC-MS/MS para geovanina.....                          | 99  |
| <b>Figura 57</b> – Estruturas do ácido gálico (69) e do ácido ascórbico (70)..... | 102 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 1</b> - Composição química dos óleos essenciais das folhas de <i>B. multiflora</i> , <i>D. quitarensis</i> , <i>F. longifolia</i> e <i>G. punctata</i> por CG-EM. ....                                                                            | 58  |
| <b>Tabela 2</b> - Constituintes fitoquímicos dos extratos vegetais das espécies <i>B. multiflora</i> , <i>D. quitarensis</i> , <i>F. longifolia</i> e <i>G. punctata</i> .....                                                                              | 64  |
| <b>Tabela 3</b> - Teor de fenólicos totais (mg de AG/g de extrato) dos extratos brutos etanólico e metanólico das folhas das espécies <i>B. multiflora</i> , <i>D. quitarensis</i> , <i>F. longifolia</i> e <i>G. punctata</i> .....                        | 65  |
| <b>Tabela 4</b> – Principais íons observados no EMDq por ESI-MS/MS no modo positivo e íons fragmentos observados a partir do íon precursor .....                                                                                                            | 68  |
| <b>Tabela 5</b> - Propostas de Identificação dos metabólitos secundários do EMGp por HPLC-ESI-TOF-MS/MS .....                                                                                                                                               | 75  |
| <b>Tabela 6</b> - alcaloides benzilisoquinolínicos das folhas <i>G. punctata</i> identificados por HPLC-ESI-TOF- .....                                                                                                                                      | 78  |
| <b>Tabela 7</b> - alcaloides aporfinicos das folhas <i>G. punctata</i> identificados por HPLC-ESI-TOF-MS/MS .....                                                                                                                                           | 79  |
| <b>Tabela 8</b> -Atividade antioxidante (%) dos extratos brutos etanólicos em diferentes concentrações (método DPPH). ....                                                                                                                                  | 103 |
| <b>Tabela 9</b> - Atividade antioxidante (%) dos extratos brutos metanólicos em diferentes concentrações (método DPPH). ....                                                                                                                                | 103 |
| <b>Tabela 10</b> - Concentração efetiva 50% para os extratos brutos etanólicos e metanólicos das folhas de <i>B. multiflora</i> , <i>D. quitarensis</i> , <i>F. longifolia</i> e <i>G. punctata</i> .....                                                   | 104 |
| <b>Tabela 11</b> - Concentração inibitória 50% (CI <sub>50</sub> ) para a atividade anti – <i>T. cruzi</i> <i>in vitro</i> , citotoxicidade e índice de seletividade dos OEs .....                                                                          | 106 |
| <b>Tabela 12</b> - Atividade antibacteriana, <i>in vitro</i> , dos OEs de <i>B. multiflora</i> , <i>D. quitarenses</i> , <i>F. longifolia</i> e <i>G. punctata</i> .....                                                                                    | 109 |
| <b>Tabela 13</b> - Atividade antibacteriana dos extratos etanólicos e metanólicos de <i>B. multiflora</i> , <i>D. quitarensis</i> , <i>F. longifolia</i> e <i>G. punctata</i> pelos métodos de Difusão em Ágar e Concentração Inibitória Mínima (CIM) ..... | 111 |

## LISTA DE QUADROS

|                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Quadro 1</b> - Classificação botânica da família Annonacea .....                                                             | 8  |
| <b>Quadro 2</b> - Usos medicinais tradicionais de algumas espécies de Annonacea. ....                                           | 10 |
| <b>Quadro 3</b> - Atividades farmacológicas de algumas espécies de Annonacea .....                                              | 11 |
| <b>Quadro 4</b> - Alguns alcaloides ou derivados empregados como fármacos .....                                                 | 19 |
| <b>Quadro 5</b> - Composição química majoritária dos OEs e atividades biológicas de espécies do gênero <i>Bocageopsis</i> ..... | 26 |
| <b>Quadro 6</b> - Composição química majoritária dos OEs e atividade biológica da espécie <i>F. Longifolia</i> .....            | 28 |
| <b>Quadro 7</b> - Atividades biológicas para o gênero <i>Duguetia</i> . ....                                                    | 31 |
| <b>Quadro 8</b> - Alcaloides encontrados no gênero <i>Duguetiae</i> .....                                                       | 33 |
| <b>Quadro 9</b> - Atividades Biológicas de Alcaloides Isoquinolínicos de <i>Duguetia</i> .....                                  | 34 |
| <b>Quadro 10</b> - Composição química majoritária dos OEs e atividades biológicas de espécies do gênero <i>Duguetia</i> .....   | 34 |
| <b>Quadro 11</b> - Atividades biológicas para espécies do gênero <i>Guatteria</i> .....                                         | 38 |
| <b>Quadro 12</b> - Atividades Biológicas de Alcaloides Isoquinolínicos da espécie <i>Guatteria</i> .....                        | 38 |
| <b>Quadro 13</b> - Exemplos de alcaloides encontrados no gênero <i>Guatteria</i> .....                                          | 39 |
| <b>Quadro 14</b> - Constituintes químicos voláteis e atividades biológicas de espécies do gênero <i>Guatteria</i> .....         | 41 |

## LISTA DE ESQUEMAS

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Esquema 1</b> - Rota biossintética simplificada das unidades isoprenoides preces precursoras dos terpenoides. .... | 14 |
| <b>Esquema 2</b> - Biosíntese de terpenos e sua classificação de acordo com as unidades de isopreno.....              | 15 |
| <b>Esquema 3</b> - Classificação das principais classes de alcaloides isoquinolínicos de Annonacea.....               | 20 |
| <b>Esquema 4</b> - Biosíntese da (S)-reticulina, precursora do núcleo aporfínico.....                                 | 21 |
| <b>Esquema 5</b> – Biosíntese dos alcaloides aporfínicos.....                                                         | 22 |
| <b>Esquema 6</b> - Biosíntese de alcalóides oxoaporfínicos .....                                                      | 23 |
| <b>Esquema 7</b> – Resumo da metodologia utilizada desenvolvimento da primeira etapa do trabalho.....                 | 47 |
| <b>Esquema 8</b> - Preparo dos Extratos Brutos: <b>EMDq</b> e <b>EMGp</b> .....                                       | 48 |
| <b>Esquema 9</b> - Para avaliação da atividade anti <i>T. cruzi</i> .....                                             | 52 |
| <b>Esquema 10</b> - Proposta de fragmentação do íon precursor da nornuciferina .....                                  | 72 |
| <b>Esquema 11</b> - Proposta de fragmentação do íon molecular da Lisicamina.....                                      | 72 |
| <b>Esquema 12</b> - Proposta de fragmentação do íon molecular da guatterina.....                                      | 73 |
| <b>Esquema 13</b> - Proposta de fragmentação da N-óxido de guatterina.....                                            | 74 |
| <b>Esquema 14</b> - Proposta de fragmentação para o íon 330,1700 observado em LC-MS/MS .....                          | 82 |
| <b>Esquema 15</b> – Proposta de fragmentação para o íon 300,1591 observado em LC-MS/MS .....                          | 82 |

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Esquema 16</b> - Proposta de fragmentação para o íon 272,1279 observado em LC-MS/MS | 83 |
| <b>Esquema 17</b> - Proposta de fragmentação para o íon 286,1438 observado em LC-MS/MS | 84 |
| <b>Esquema 18</b> - Proposta de fragmentação para o íon 286,1435 observado em LC-MS/MS | 85 |
| <b>Esquema 19</b> - Proposta de fragmentação para o íon 314,1754 observado em LC-MS/MS | 86 |
| <b>Esquema 20</b> - Proposta de fragmentação para o íon 300,1589 observado em LC-MS/MS | 87 |
| <b>Esquema 21</b> - Proposta de fragmentação para o íon 314,1750 observado em LC-MS/MS | 88 |
| <b>Esquema 22</b> - Proposta de fragmentação para o íon 314,1748 observado em LC-MS/MS | 89 |
| <b>Esquema 23</b> - Proposta de fragmentação para o 282,1121 observado em LC-MS/MS     | 90 |
| <b>Esquema 24</b> - Proposta de fragmentação para o íon 282,1122 observado em LC-MS/MS | 91 |
| <b>Esquema 25</b> - Proposta de fragmentação para o íon 296,1280 observado em LC-MS/MS | 92 |
| <b>Esquema 26</b> - Proposta de fragmentação para o íon 312,1223 observado em LC-MS/MS | 93 |
| <b>Esquema 27</b> - Proposta de fragmentação para o íon 306,0759 observado em LC-MS/MS | 94 |
| <b>Esquema 28</b> - Proposta de fragmentação para o íon 282,1485 observado em LC-MS/MS | 96 |
| <b>Esquema 29</b> - Proposta de fragmentação para o íon 328,1538 observado em LC-MS/MS | 97 |
| <b>Esquema 30</b> - Proposta de fragmentação para o íon 192,1021 observado em LC-MS/MS | 98 |
| <b>Esquema 31</b> - Proposta de fragmentação para o íon 146,0815 observado em LC-MS/MS | 98 |
| <b>Esquema 32</b> - Proposta de fragmentação para o íon 300,1230 observado em LS-MS/MS | 99 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                                            |                                                                              |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A ASCÓRBICO</b>                         | <b>Ácido ascórbico</b>                                                       |
| <b>AMH</b>                                 | <b>Ágar Müeller Hinton</b>                                                   |
| <b>ATCC 29336</b>                          | <b>Pseudomonas aeruginosa</b>                                                |
| <b>ATCC 5175</b>                           | <b>Streptococcus mutans</b>                                                  |
| <b>ATCC 19615</b>                          | <b>Streptococcus pyogenes</b>                                                |
| <b>BHI</b>                                 | <b>Caldo Cérebro Coração</b>                                                 |
| <b>CE50</b>                                | <b>concentração eficiente</b>                                                |
| <b>CI50</b>                                | <b>concentração inibitória</b>                                               |
| <b>CG</b>                                  | <b>Cromatografia Gasosa</b>                                                  |
| <b>CG-EM<br/>Massas</b>                    | <b>Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de</b>                     |
| <b>CG-FID</b>                              | <b>Detetor por Ionização de Chama</b>                                        |
| <b>CID</b><br><i>Induced Dissociation)</i> | <b>Dissociação induzida por colisão (do inglês, <i>Collision</i></b>         |
| <b>CIM</b>                                 | <b>Concentração Inibitória Mínima</b>                                        |
| <b>CNT</b>                                 | <b>Células não tratadas</b>                                                  |
| <b>CPRG</b>                                | <b>Composto galactopiranosídeo vermelho <math>\beta</math>-D- clorofenol</b> |
| <b>CT</b>                                  | <b>Células tratadas</b>                                                      |
| <b>CTT</b>                                 | <b>Cloreto de trifenil tetrazólio</b>                                        |
| <b>Da</b>                                  | <b>unidade de massa atômica unificada</b>                                    |
| <b>DFT</b>                                 | <b>distancias de ligação e ângulos</b>                                       |
| <b>DMAPP</b>                               | <b>Difosfato de dimetilalila</b>                                             |
| <b>DMSO</b>                                | <b>Dimetilsulfóxido</b>                                                      |
| <b>DNDi</b><br><b>Negligenciadas</b>       | <b>Iniciativa de Medicamentos para Doenças</b>                               |
| <b>DPPH</b>                                | <b>2,2-difenil-1-picrilhidrazil</b>                                          |
| <b>DXP</b>                                 | <b>1- desoxi-D-xilulose</b>                                                  |
| <b>EAG</b>                                 | <b>Equivalente de ácido gálico</b>                                           |
| <b>EBEBM</b>                               | <b>Extrato bruto etanólico da <i>Bocageopsis multiflora</i></b>              |

|                                                |                                                                             |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| <b>EBEDQ</b>                                   | Extrato bruto etanólico da <i>Duguetiae quitarensis</i>                     |
| <b>EBEFL</b>                                   | Extrato bruto etanólico da <i>Fusaea longifolia</i>                         |
| <b>EBEGP</b>                                   | Extrato bruto etanólico <i>Guatteria punctata</i>                           |
| <b>EBFE</b>                                    | Extrato bruto das folhas etanolico                                          |
| <b>EBFM</b>                                    | Extrato bruto das folhas metanolico                                         |
| <b>EBMBM</b>                                   | Extrato bruto metanólico da <i>Bocageopsis multiflora</i>                   |
| <b>EBMDQ</b>                                   | Extrato bruto metanólico da <i>Duguetiae quitarensis</i>                    |
| <b>EBMFL</b>                                   | Extrato bruto metanólico da <i>Fusaea longifolia</i>                        |
| <b>EBMGP</b>                                   | Extrato bruto metanólico da <i>Guatteria punctata</i>                       |
| <b>EHEC</b>                                    | <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica                                   |
| <b>EMDq</b><br>estudo da desreplicação         | Extrato metanólico da <i>Duguetiae quitarensis</i> para o                   |
| <b>EMGp</b><br>da desreplicação                | Extrato metanólico da <i>Guatteria punctata</i> para o estudo               |
| <b>EHEC</b>                                    | <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica                                   |
| <b>P. AERUGINOSA</b>                           | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                                               |
| <b>S. ENTERICA SER. TYPHIMURIUM</b>            | <i>Salmonella entérica subsp. Typhimurium</i>                               |
| <b>S. AUREUS</b>                               | <i>Staphylococcus aureus</i>                                                |
| <b>S. SUMULANS</b>                             | <i>Staphylococcus sumulans</i>                                              |
| <b>ESI-IT/MS</b>                               | Espectrometria de massas eletrospray íon trap                               |
| <b>ESI</b>                                     | Ionização por electrospray                                                  |
| <b>ESI-MS</b><br>eletrospray                   | Espectrometria de massas com ionização por                                  |
| <b>FIOCRUZ</b>                                 | Fundação Oswaldo Cruz                                                       |
| <b>FPP</b>                                     | Farnesil difosfato                                                          |
| <b>GC-TOF-MS</b><br>associada a espectrometria | Cromatografia gasosa bidimensional abrangente<br>de massas por tempo de voo |
| <b>GPP</b>                                     | Geranil difosfato                                                           |
| <b>HPLC</b>                                    | Cromatografia líquida de alta eficiência                                    |
| <b>HPLC-ESI-TOF</b>                            | Espectrometria de Massas - Electrospray - tempo de voo                      |
| <b>IFRO</b><br>Rondônia                        | Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de                      |
| <b>ILMD</b>                                    | Instituto Leônidas e Maria Deane                                            |



|                          |                                                             |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------|
| <b>IPP</b>               | <b>Difosfato de isopentinila</b>                            |
| <b>IS</b>                | <b>Difosfato de isopentinila</b>                            |
| <b>LABCEM</b>            | <b>Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de</b>     |
| <b>Massas</b>            |                                                             |
| <b>LC/MS</b>             | <b>Cromatografia líquida com a espectrometria em massa</b>  |
| <b>MH</b>                | <b>Müeller Hinton Brother</b>                               |
| <b>MRSA</b>              | <b><i>Staphylococcus Aureus</i> Resistente à Meticilina</b> |
| <b>MS</b>                | <b>Espectrometria de massa</b>                              |
| <b>MS/MS</b>             | <b>Espectrometria de massa em tandem</b>                    |
| <b>M/Z</b>               | <b>Massa/carga</b>                                          |
| <b>[M+H]<sup>+</sup></b> | <b>Molécula protonada</b>                                   |
| <b>OE<sub>s</sub></b>    | <b>Óleos essenciais</b>                                     |
| <b>PIDC</b>              | <b>Programa Integrado de Doença de Chagas</b>               |
| <b>RI</b>                | <b>Índices de retenção experimentais</b>                    |
| <b>RO</b>                | <b>Estado de Rondônia</b>                                   |
| <b>RON</b>               | <b>Herbário Rondoniense João Geraldo Kuhlmann</b>           |
| <b>RPT11H</b>            | <b>Plataforma de Bioensaios Biotecnológicos</b>             |
| <b>RT</b>                | <b>Tempo de retenção</b>                                    |
| <b>T. A.</b>             | <b>Temperatura ambiente</b>                                 |
| <b>UFAM</b>              | <b>Universidade Federal do Amazonas</b>                     |
| <b>UHPLC/Q-TOF-MS</b>    |                                                             |
| <b>µg/ml</b>             | <b>Microgramas por mililitro ug/ml</b>                      |
| <b>%AA</b>               | <b>Atividade antioxidante</b>                               |

## SUMARIO

|            |                                                                                                                                                                        |           |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUÇÃO</b>                                                                                                                                                      | <b>5</b>  |
| <b>2</b>   | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>                                                                                                                                           | <b>8</b>  |
| <b>2.1</b> | <b>Família Annonaceae</b>                                                                                                                                              | <b>8</b>  |
| 2.1.1      | A Fitoquímica da Família Annonaceae                                                                                                                                    | 11        |
| 2.1.1.1    | Óleos Essenciais                                                                                                                                                       | 12        |
| 2.1.1.2    | Biossíntese de óleos essenciais                                                                                                                                        | 13        |
| 2.1.1.3    | Flavonoides                                                                                                                                                            | 15        |
| 2.1.1.4    | Acetogeninas                                                                                                                                                           | 17        |
| 2.1.1.5    | Alcalóides                                                                                                                                                             | 18        |
| 2.1.1.5.1  | Benzilisoquinolinas                                                                                                                                                    | 21        |
| 2.1.1.5.2  | Aporfínicos                                                                                                                                                            | 22        |
| 2.1.1.5.3  | Oxoaporfínicos                                                                                                                                                         | 23        |
| <b>2.2</b> | <b>Gênero <i>Bocageopsis</i> e <i>Fusaea</i>: uso popular, constituintes químicos e atividades biológicas</b>                                                          | <b>24</b> |
| 2.2.1      | Gênero <i>Bocageopsis</i>                                                                                                                                              | 24        |
| 2.2.2      | Gênero <i>Fusaea</i>                                                                                                                                                   | 27        |
| <b>2.3</b> | <b>Gênero <i>Duguetia</i>: uso popular, constituintes químicos e atividades biológicas</b>                                                                             | <b>30</b> |
| <b>2.4</b> | <b>Gênero <i>Guatteria</i>: uso popular, constituintes químicos e atividades biológicas</b>                                                                            | <b>36</b> |
| <b>3</b>   | <b>OBJETIVOS</b>                                                                                                                                                       | <b>43</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Geral</b>                                                                                                                                                           | <b>43</b> |
| <b>3.2</b> | <b>Específicos</b>                                                                                                                                                     | <b>43</b> |
| <b>4</b>   | <b>MATERIAS E MÉTODOS</b>                                                                                                                                              | <b>44</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Materiais</b>                                                                                                                                                       | <b>44</b> |
| 4.1.1      | Equipamentos                                                                                                                                                           | 44        |
| 4.1.2      | Solventes, reagentes e material cromatográfico                                                                                                                         | 44        |
| 4.1.3      | Material botânico                                                                                                                                                      | 44        |
| 4.1.4      | Extração dos OEs                                                                                                                                                       | 45        |
| 4.1.5      | Análise e determinação de OEs por CG-EM e CG-FID                                                                                                                       | 46        |
| 4.1.6      | Preparo dos Extratos Brutos Etanólico (EBFE) e Metanólico (EBFM) das Folhas de <i>B multiflora</i> , <i>D. quitarensis</i> , <i>F. longifolia</i> e <i>G. punctata</i> | 46        |
| 4.1.7      | Obtenção dos EMDq e EMGp das folhas das espécies <i>D. quitarensis</i> e <i>G. punctata</i>                                                                            | 48        |
| 4.1.8      | Triagem fitoquímica                                                                                                                                                    | 48        |

|                                                                                                                                                        |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.1.9 Determinação dos fenólicos totais                                                                                                                | 49         |
| 4.1.10 Análises por Espectrometria de massa (infusão direta) do <b>EMDq</b>                                                                            | 50         |
| 4.1.11 Análises do <b>EMGp</b> por UHPLC-qTOF-MS/MS                                                                                                    | 50         |
| <b>4.2 Ensaios Biológicos</b>                                                                                                                          | <b>51</b>  |
| 4.2.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)                                                           | 51         |
| 4.2.2 Avaliação da atividade <i>anti-Trypanosoma cruzi in vitro</i> dos OEs contra formas Amastigotas e Tripomastigotas.                               | 51         |
| 4.2.3 Ensaio de Citotoxicidade sobre células L929 de vertebrado com os OEs                                                                             | 53         |
| 4.2.4 Índice de Seletividade                                                                                                                           | 53         |
| 4.2.5 Ensaio da Atividade antibacteriana dos OEs através da Concentração Inibitória Mínima pelo Método de Microdiluição em caldo contra microrganismos | 53         |
| 4.2.6 Ensaio da atividade antibacteriana pelo método de difusão em Ágar – técnica do poço                                                              | 54         |
| 4.2.7 Ensaio da atividade antibacteriana pelo método de Concentração Inibitória Mínima (CIM)                                                           | 55         |
| <b>4.3 Análises Estatísticas</b>                                                                                                                       | <b>56</b>  |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                                                                                        | <b>57</b>  |
| <b>5.1 Estudo químico das folhas de B. multiflora, D. quitarenses, F. longifolia e G. punctata</b>                                                     | <b>57</b>  |
| 5.1.1. Constituintes voláteis                                                                                                                          | 57         |
| <b>5.1.1.1 Bocageopsis multiflora</b>                                                                                                                  | 60         |
| <b>5.1.1.2 Duguetia quitarensis</b>                                                                                                                    | 61         |
| <b>5.1.1.3 Fusaea longifolia</b>                                                                                                                       | 61         |
| <b>5.1.1.4 Guatteria punctata</b>                                                                                                                      | 62         |
| 5.1.2 Constituintes fixos                                                                                                                              | 63         |
| 5.1.3 Triagem Fitoquímica                                                                                                                              | 63         |
| 5.1.4 Determinação de fenóis totais (FT)                                                                                                               | 64         |
| 5.1.5. Alcalóides de <i>D. quitarensis</i> e <i>G. punctata</i>                                                                                        | 65         |
| 5.1.6. Estudos de desreplicação do EMDq (ESI-MS)                                                                                                       | 67         |
| 5.1.7 Estudos de desreplicação do EMGp (UHPLC-qTOF-MS/MS)                                                                                              | 75         |
| <b>5.2 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS</b>                                                                                                                      | <b>101</b> |
| 5.2.1 Avaliação da Atividade Antioxidante pelo método do DPPH (2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazil)                                                          | 101        |
| 5.2.2 Atividade <i>Anti-Trypanosoma cruzi</i> e Índice de Seletividade (IS)                                                                            | 105        |

|                                                                                                                                                         |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.2.3 Atividade Antibacteriana dos OEs através da Concentração Inibitória Mínima (MIC)                                                                  | 108        |
| 5.2.4 Avaliação da atividade antibacteriana dos Extratos Brutos pelo método de Difusão em Ágar (Técnica do Poço) e Concentração Inibitória Mínima (CIM) | 110        |
| <b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>                                                                                                                           | <b>112</b> |
| <b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>                                                                                                                     | <b>114</b> |
| <b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA</b>                                                                                                                              | <b>138</b> |
| <b>A – Artigos publicados como autora– 2019/2020</b>                                                                                                    | <b>138</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A importância dos produtos naturais na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos é um tema bem documentado (NEWMAN et al., 2000; BUTLER, 2004; PATRIDGE et al., 2016; NEWMAN; CRAGG, 2020; ATANASOV et al., 2021). É comum na literatura encontrar relatos de dificuldades associadas a triagem, isolamento, caracterização, otimização e obtenção de quantidades suficientes de material purificado para realização de ensaios biológicos (ROUHI, 2003a; ROUHI, 2003b; KOEHN, CARTER, 2005; CARLSON, 2010; KRAUSE, TOBIN, 2013; ATANASOV et al., 2021). E mesmo diante de tantos desafios, os produtos naturais tem histórica contribuição para a farmacoterapia (ATANASOV et al., 2021).

Uma das grandes contribuições dos produtos naturais foi reconhecida em 2015 com o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina aos pesquisadores William C. Campbell, Satoshi Omura e Tu Youyou, pioneiros na descoberta de fármacos usados para o tratamento de doenças parasitárias, especialmente a ivermectina B<sub>1a</sub>/B<sub>1b</sub>, isolada de culturas de *Streptomyces* e utilizada no tratamento de filariose, e a artemisinina, isolada de *Artemisia annua* L., utilizada no tratamento da malária (MCKERROW, 2015).

Os avanços científicos e tecnológicos recentes tem contribuído com a superação dos desafios na descoberta de fármacos baseados em produtos naturais (KOEHN, CARTER, 2005; NAHARA, SARKER, 2020).

Newmann e Cragg em seu artigo de revisão, discutem a natureza e os tipos de fármacos aprovados de 1981 até 2019. Neste trabalho, fica evidente que uma porção significativa de fármacos que chegaram ao mercado, são compostos encontrados em plantas e outras fontes. Os produtos naturais ainda se destacam como sendo as melhores opções de inspirações para novos compostos com ação farmacológica, e oferecem potencial de descoberta de novas estruturas que podem servir como farmacóforos base para vários medicamentos para inúmeras doenças humanas (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Embora a importância conferida aos produtos naturais extraídos de plantas, seja grande, a exploração de seu potencial no Brasil, por exemplo, ainda é considerada baixa (SANTOS; LIMA; OLIVEIRA, 2014). De uma maneira geral, a fitoterapia vem aumentando no país à medida que órgãos governamentais a implementam em comunidades carentes (BRASIL, 2006; SANTOS; LIMA; OLIVEIRA, 2014).

Na flora Amazônica, dentre as diversas famílias estudadas, destaca-se a família Annonaceae que possui espécies de interesse industrial e econômico. Além disso,

algumas dessas espécies possuem potencial farmacológico. Desta forma, tendo em mãos o recurso de produtos naturais que a Região Amazônica oferece, é imprescindível a realização de estudos a fim de levantar dados acerca dos constituintes químicos e atividades biológicas das espécies pertencentes a esta família (SOARES, 2014).

Diante desse pressuposto, foi realizado um levantamento de espécies endêmicas da família Annonaceae na região de Porto Velho-RO. Neste sentido visando com a pesquisa envolvendo plantas medicinais da flora amazônica, foram escolhidas quatro espécies: *Bocageopsis multiflora* (Mart.) R.E.Fr., *Duguetia quitarensis* Benth, *Fusaea longifolia* (Aubl.) Saff. e *Guatteria punctata* (Aubl.) R.A. Howard. Por serem de localização conhecida e fácil acesso para coleta. Todas estão catalogadas no Herbário Rondoniense João Geraldo Kuhlmann, da Universidade Federal da Rondônia (UNIR).

O uso popular de plantas medicinais tem o importante papel de determinar algumas espécies com potencial terapêutico, porém, não foram encontrados relatos do uso popular na medicina tradicional das espécies citadas pela população local. Somado a isso, foram localizados poucos estudos fitoquímicos e farmacológicos envolvendo as espécies *Guatteria punctata*, *Bocageopsis multiflora* e *Fusaea longifolia*.

SANTOS (2019) descreveu o potencial ansiolítico do extrato metanólico das folhas da espécie *Guatteria punctata* em camundongos. OLIVEIRA *et al.* (2014) descreveu os constituintes químicos dos óleos essenciais (**OEs**) de folhas frescas da espécie *Bocageopsis multiflora*; e TAVARES *et al.* (2005) relataram o isolamento de dois alcaloides inéditos e a análise da composição química do óleo essencial do caule para a espécie *Fusaea longifolia*.

Até o presente, os únicos relatos na literatura dos constituintes químicos voláteis e avaliações biológicas para a espécie *Duguetia quitarensis* são os trabalhos de BAY *et al.*, (2019) e BAY *et al.*, (2020).

Diversos estudos reportam atividades biológicas com **OEs** e extratos brutos de diversas partes de plantas pertencentes a família Annonaceae, como atividade espasmolítica, tripanocida, anti-inflamatória, antimicrobiana, neuralgia, reumatismo, anti-hipertensiva, entre outras (BRAGA *et al.*, 2000; FERRAZ *et al.*, 2013; ISHOLA, *et al.*, 2014; SOLANKI, MANDALIYA, GEORGE, 2020).

A potencialidade química das espécies da família Annonaceae apresentada no referencial teórico desta tese, bem como relatos de estudos *in vitro* e *in vivo*, direcionaram a escolha para avaliação das atividades biológicas antioxidante (LIMA *et*

*al.*, 2010), antimicrobiana (VELIKOVA *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2008), e tripanocida (VIEIRA *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2011).

Desta forma, neste momento de pesquisa básica, o objetivo deste trabalho foi analisar a composição química e o potencial biológico dos **Extratos brutos** e dos **óleos essenciais** das folhas das espécies *Bocageopsis multiflora*, *Duguetia quitarensis*, *Fusaea longifolia* e *Guatteria punctata*, buscando novos agentes com potencial antioxidante, antimicrobiano e antiparasitário.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Família Annonaceae

A família Annonaceae é a que mais se destaca em número de gêneros e de espécies dentro da ordem *Magnoliales* junto com outras famílias como Degeneriaceae, Eupomatiaceae, Himantandraceae, Magnoliaceae e Myristicaceae. Tem cerca de 2.500 espécies descritas em todo o mundo, divididas em cerca de 130 gêneros (LÚCIO, 2015). Outros pesquisadores acreditam que existem 107 gêneros, com aproximadamente 2.400 espécies (GUO *et al.*, 2017), destes, 29 gêneros e 385 espécies ocorrem no Brasil, com considerável riqueza de espécies principalmente na Floresta Amazônica e Mata Atlântica (BFG, 2015).

A classificação botânica da família Annonaceae Juss. está representada no **Quadro 1**, baseado na classificação APG IV, 2016 (BYNG *et al.*, 2016).

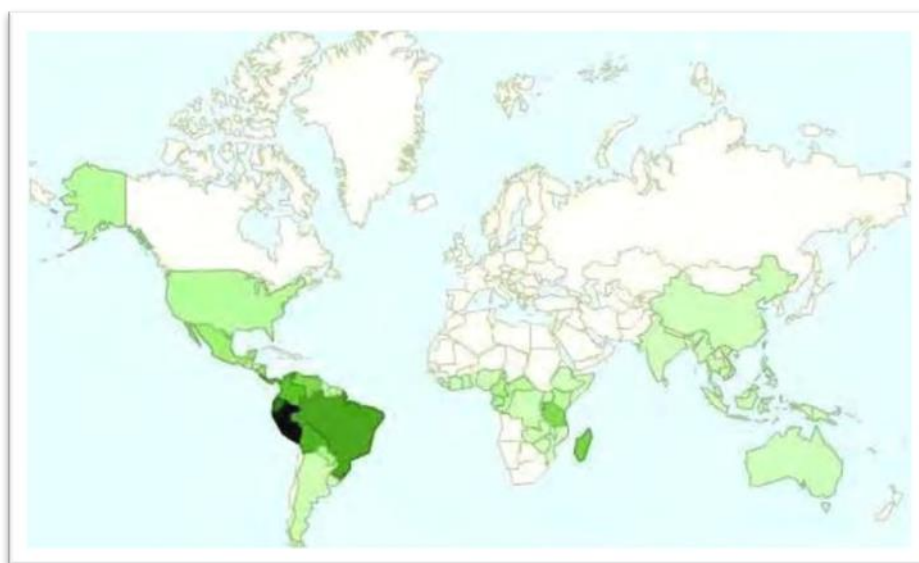
**Quadro 1** - Classificação botânica da família Annonacea

| Classificação botânica |               |
|------------------------|---------------|
| Reino                  | Plantae       |
| Divisão                | Magnoliophyta |
| Classe                 | Magnoliopsida |
| Subclasse              | Magnolidae    |
| Ordem                  | Magnoliales   |
| Família                | Annonacea     |

Annonaceae é uma família de plantas pantropicais que ocorre na América do Sul e Central, África e Ásia. A **Figura 1** mostra em destaque onde se encontra a maior concentração de Annonacea, estando mais presentes espécimes na América do Sul. De acordo com SILVA (2020), no Brasil, o centro de diversidade está no bioma Amazônia, que abriga  $\frac{3}{4}$  da diversidade das espécies, sendo uma das dez famílias mais representativas, com 27 gêneros e 268 espécies (LOPES & MELLO-SILVA, 2014a; BFG, 2015; Flora do Brasil 2020, em construção).



**Figura 1** - Distribuição da família Annonaceae (representada em verde) no mundo em zonas pantotrópicas e temperadas.



Fonte: Adaptado de [www.tropicos.org/name/42000007?tab=maps](http://www.tropicos.org/name/42000007?tab=maps) (acesso em 03 de maio 2021).

A título de exemplificação, a **Figura 2** mostra quatro espécies, de uso popular, pertencentes à família Annonaceae.

**Figura 2** - *Xylopia aromatica* Mart (A), *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith (B), *Phaeanthus vietnamensis* Ban (C) e *Annona squamosa*, L (D).



Fonte- <https://pt.wikipedia.org/wiki/Annonaceae> (acesso em 14 de julho 2021).

Os frutos de *Xylopia aromática* Mart. são usados na medicina popular pelas suas propriedades carminativas (melhora da digestão), estimulantes e afrodisíacas (OLIVEIRA *et al.*, 2014). As folhas, raízes e cascas do caule da *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith, são utilizadas para tratamento de cefaleias (MAAS *et al.*, 2013). *Phaeanthus vietnamensis* Bân é uma conhecida planta medicinal que tem sido utilizada no tratamento de várias doenças inflamatórias na medicina tradicional (NHIEM *et al.*, 2017). A espécie *Annona squamosa* L. tem usos relacionados a malária e outras doenças transmitidas por insetos, como repelente contra mosquitos (FRAUSIN *et al.*, 2014).

Espécies de diversos gêneros tais como *Annona*, *Guatteria*, *Unonopsis* e *Xylopia* têm sido utilizadas na medicina popular, algumas das quais no tratamento de doenças negligenciadas, tais como a malária (TSABANG *et al.*, 2012; FRAUSIN *et al.*, 2014). A busca de novos agentes farmacologicamente ativos obtidos pela pesquisa de fontes naturais tais como extratos de plantas, levou a descoberta de drogas úteis clinicamente, que desempenham papel importante no tratamento de doenças humanas.

No **Quadro 2** são apresentados exemplos de espécies da família Annonaceae utilizadas na medicina popular tradicional

**Quadro 2** - Usos medicinais tradicionais de algumas espécies de Annonacea.

| <b>Espécie</b>                     | <b>Uso popular</b>                                                      | <b>Referências</b>                                              |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| <i>Annona muricata</i> L.          | Malária e febre                                                         | (FRAUSIN <i>et al.</i> , 2014).                                 |
| <i>Annona muricata</i> L.          | artrite, reumatismo e neuralgia                                         | (CERCATO, 2015).                                                |
| <i>Annona exsucca</i> DC.          | Febre e prevenção de aborto espontâneo                                  | (VAN ANDEL, 2000).                                              |
| <i>Annona exsucca</i> DC.          | Febre e prevenção de aborto espontâneo                                  | (VAN ANDEL, 2000).                                              |
| <i>Rollinia mucosa</i> Jacq.       | Eliminação de pulgas e outros insetos infestantes de animais domésticos | (DOS SANTOS, 2009)                                              |
| <i>Ununopsis stipitata</i> Diels   | Doenças cognitivas                                                      | (ADAMS <i>et al.</i> , 2007).                                   |
| <i>Xylopia aethiopica</i> A. Rich. | Bronquites, disenterias e malária                                       | (BOYOM <i>et al.</i> , 2003)<br>(FRAUSIN <i>et al.</i> , 2014). |
| <i>Xylopia parvifolia</i> Spruce   | Úlceras gastrointestinais e inflamações                                 | (ATTIQ; JALIL; HUSAIN, 2017)                                    |
| <i>Xylopia frutescens</i> Aubl.    | Analgésico e anti-inflamatório.                                         | (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002)                                  |

Considerando o uso tradicional medicamentoso de muitas dessas espécies, salienta-se que muitas das propriedades terapêuticas atribuídas à família já foram confirmadas cientificamente em ensaios pré-clínicos (**Quadro 3**).

**Quadro 3** - Atividades farmacológicas de algumas espécies de Annonaceae

| <b>Espécie</b>                              | <b>Parte da planta Estudada</b> | <b>Atividades biológicas</b>                                                                         | <b>Referências</b>                  |
|---------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Rollinia leptopetala</i><br>RE Fries.    | Folhas                          | Resultados <i>in vivo</i> com reduções significativas em células do sarcoma 180                      | (COSTA <i>et al.</i> , 2012).       |
| <i>Annona muricata</i> L.                   | Frutos                          | Propriedades antidiarréicas potente                                                                  | (AFROZ <i>et al.</i> , 2020).       |
| <i>Annona coriacea</i><br>Mart.             | Folhas                          | Efeitos ansiolíticos e antidepressivos                                                               | (MONTEIRO <i>et al.</i> 2020).      |
| <i>Xylopia vielana</i><br>Pierre            | Raiz                            | Atividade inibitória contra a produção de NO nas células                                             | (GUO <i>et al.</i> , 2018a).        |
| <i>Uvaria cherrevensis</i><br>Pierre        | Raiz                            | Atividade antimalárica contra <i>Plasmodium falciparum</i>                                           | (LEKPHROM <i>et al.</i> , 2018).    |
| <i>Annona. reticulata</i><br>L.             | Casca da raiz                   | Inibição da inflamação neuronal e a dor neurogênica                                                  | (KANDIMALLA <i>et al.</i> , 2017).  |
| <i>Xylopia sericea</i><br>A.St.-Hil         | Folhas                          | Atividade antiplasmódica.                                                                            | (GONTIJO <i>et al.</i> , 2020).     |
| <i>Uvaria klaineana</i><br>Engler and Diels | Galhos finos                    | Atividade <i>in vitro</i> contra a cepa K1 resistente à cloroquina de <i>Plasmodium falciparum</i> . | (AKENDENGUE, <i>et al.</i> , 2002). |

### 2.1.1 A Fitoquímica da Família Annonaceae

Os metabólitos secundários, ao contrário dos metabólitos primários, são compostos encontrados em grupos específicos de organismos, que são expressos individualmente em cada espécie, como por exemplo, vegetais, fungos e alguns animais. Os metabólitos secundários podem ser classificados de acordo com a sua rota de

biossíntese e estrutura, as principais classes estudadas são os alcaloides, os terpenos, os policetídeos, os flavonoides e compostos esteroidais (FUMAGALI *et al.*, 2012).

Quimicamente, a família Annonaceae é constituída por diversas classes de metabólitos primários e secundários, dentre elas: substâncias aromáticas, ácidos fenólicos, taninos, flavonoides, catequinas, proantocianidina, óleos essenciais, terpenos, esteroides, acetogeninas, carboidratos, lipídios, proteínas, lactonas, vitaminas, carotenos, saponinas, entre outros (DOS REIS NUNES, *et al.*, 2012).

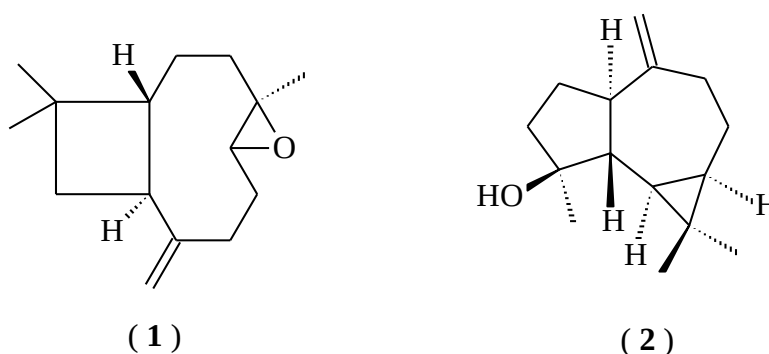
### 2.1.1.1 Óleos Essenciais

Na família Annonaceae, é comumente observado que os principais constituintes dos **OEs** são monoterpenos em frutas e sementes, e os sesquiterpenos em folhas e cascas de raízes (FOURNIER; LEBOEUF; CAVÉ, 1999).

Os sesquiterpenos (**Figura 3**) óxido de cariofileno (**1**) e o espatulenol (**2**), já foram descritos em **OEs** de folhas de espécies dos gêneros *Annona*, *Duguetia*, *Guatteria*, *Hexalobus* e *Xylopia*, podendo ser considerados marcadores quimiotaxonômicos desses gêneros (DUTRA, 2012).

O espatulenol também foi identificado nas espécies de *Unonopsis duckei* (19,10-40,20%), as menores quantidades em *Unonopsis guatterioides* (4,80%), enquanto as maiores concentrações de óxido de cariofileno foram registradas em *Unonopsis rufescens* (15,95%) e as menores em *Unonopsis guatterioides* (4,80%) no estudo realizado por (SILVA, 2016).

**Figura 3** - Estruturas óxido de cariofileno (**1**) e o espatulenol (**2**)



Ensaio farmacológicos realizados com os **OEs** de Annonaceae revelaram propriedades interessantes, tais como antitumoral, antioxidante, larvicida, tripanocida, antimicrobiana e antileishmania (COSTA *et al.*, 2009, 2011, 2013; QUINTANS *et al.*, 2013).

Os **OEs** de diversas espécies do gênero *Annona* como *Annona vepretorum*, (COSTA *et al.*, 2012), *Annona pickelii* e *Annona salzmännii* (COSTA *et al.*, 2013), foram eficientes contra formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*. Também há relatos que os **OEs** de *Xylopia frutescens* e *Xylopia laevigata* foram eficazes contra formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* em concentrações não citotóxicas para macrófagos murinos (SILVA *et al.*, 2013).

Referenciando outros autores, BORGES *et al.*, (2012) destacam que os constituintes terpênicos são responsáveis pela característica hidrofóbica dos óleos essenciais, o que permite que eles permeiem livremente as membranas celulares e eliminam os parasitas, afetando seu metabolismo citoplasmático vias ou organelas.

O ensaio realizado com o óleo essencial da *Annona coriacea* mostrou inatividade contra bactérias gram-positivas. Porém, o óleo fixo extraído das sementes da espécie apresentou 84% de inibição da enzima acetilcolinesterase (DE SOUSA *et al.*, 2021).

O óleo volátil de folhas da espécie *Annona foetida* apresentou atividade leishmanicida, se mostrado mais ativo contra formas promastigotas de *Leishmania guyanensis*. Neste estudo, a atividade leishmanicida é atribuída a mistura de sesquiterpenos oxigenados presentes na sua composição (COSTA *et al.*, 2009).

#### **2.1.1.2 Biossíntese de óleos essenciais**

Os terpenóides compreendem o maior grupo de produtos naturais, com mais de 35.000 membros conhecidos, muitos outros produtos naturais contêm terpenóides em suas moléculas, em combinação com esqueletos de carbono derivados de outras fontes, como as vias acetato e shikimato (DEWICK, 2001; DEWICK, 2009).

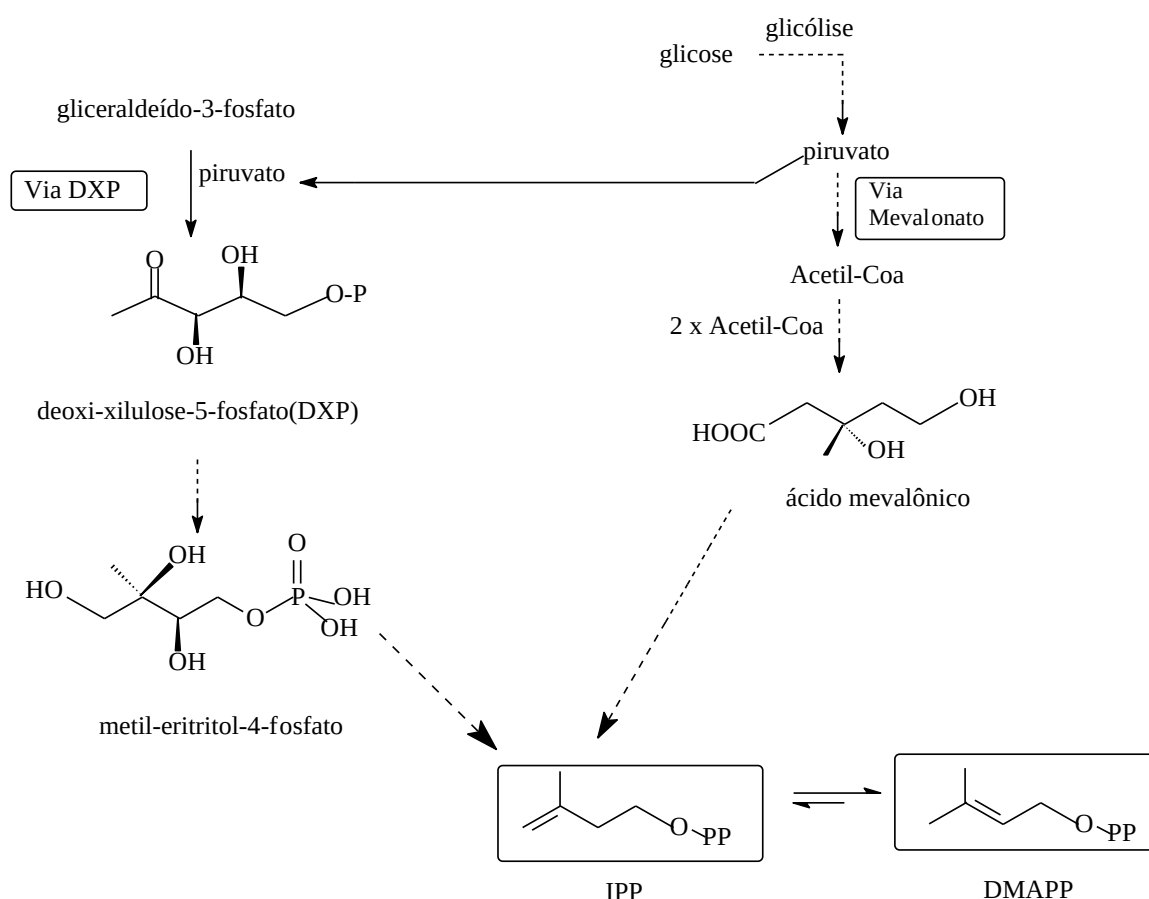
Terpeno é uma classe de metabólitos secundários, derivados de unidades do isopreno: hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40). Um novo tipo de terpeno cíclico foi obtido e identificado a partir de três espécies não patogênicas de *Mycobacterium sp.* classificado como sesquiterpeno (C35), este foi o primeiro exemplo de biossíntese de um triterpeno natural através da ciclização de um isoprenóide linear (SATO *et al.*, 2008).

Existem ao menos duas vias envolvidas na biossíntese de terpenos: a rota do mevalonato, que opera no citoplasma e mitocôndrias e a rota do 5-fosfato de 1- desoxi-D-xilulose (DXP), que opera no plastídio. As duas rotas convergem para a produção dos

isômeros do isopreno, o difosfato de isopentinila (IPP) e o difosfato de dimetilalila (DMAPP), os quais são as unidades isoprênicas bioquimicamente ativas na biossíntese dos terpenos (BARROS *et al.*, 2009; DEWICK, 2009).

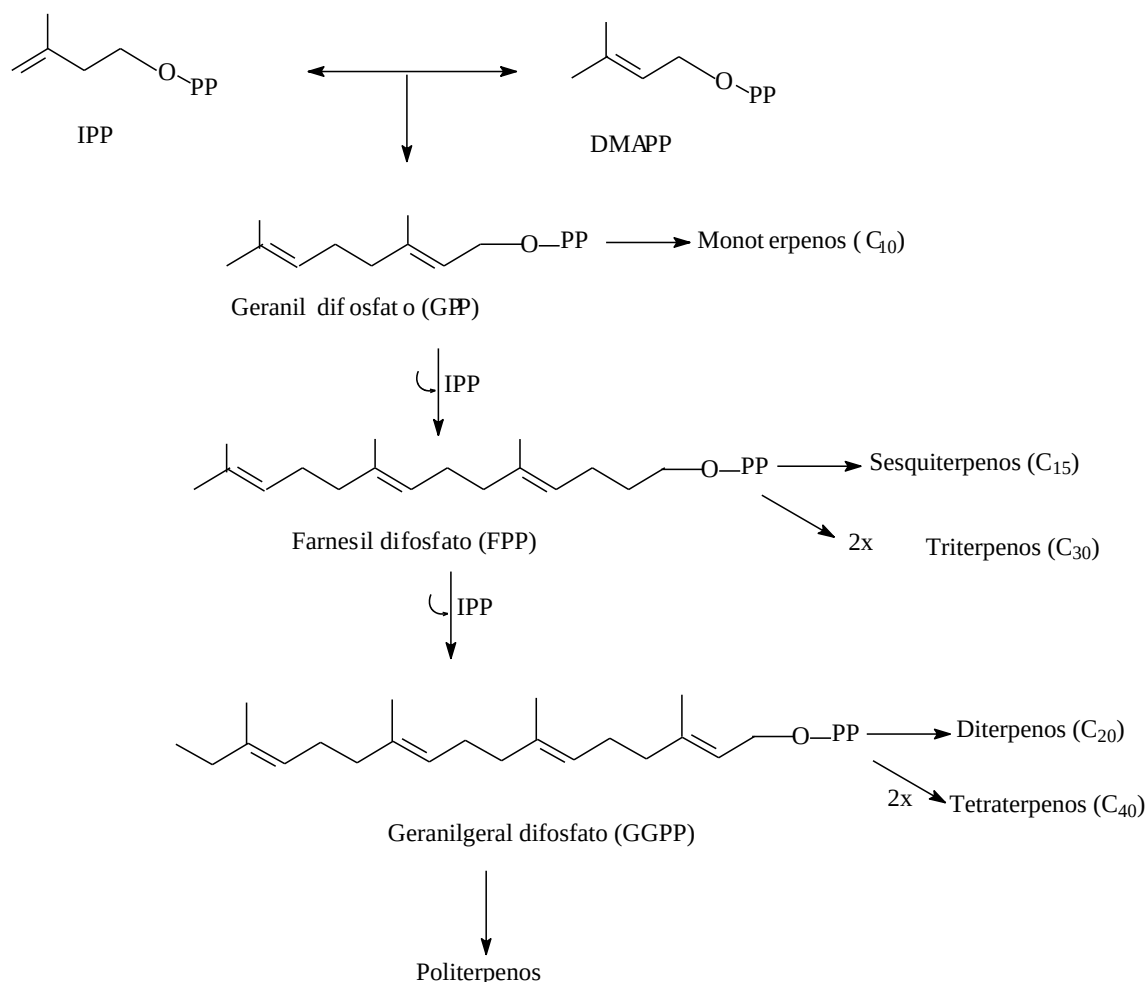
No **Esquema 1** é representada a rota biosintética simplificada dos terpenóides.

**Esquema 1** - Rota biosintética simplificada das unidades isoprenoides preces precursoras dos terpenoides.



**Fonte:** Adaptado de BARTRAM *et al.* (2006).

Independentemente de sua origem, uma molécula de IPP e uma de DMAPP são os precursores na biossíntese dos terpenos. Eles combinam-se, também, por meio de reações de condensação para formar moléculas maiores. Na formação dos monoterpênicos o IPP e o DMAPP se juntam para formar o geranyl difosfato (GPP), formado por 10 átomos de carbono (BARROS *et al.*, 2009; DEWICK, 2009). O GPP, por sua vez, pode reagir com outra molécula de IPP e formar o farnesil difosfato (FPP), composto formado por 15 átomos de carbono e precursor dos sesquiterpenos, e assim sucessivamente até formar os politerpenos, como observado no **Esquema 2** (ÁVALOS E PÉREZ, 2009)

**Esquema 2** - Biosíntese de terpenos e sua classificação de acordo com as unidades de isopreno

**Fonte:** Adaptado de ÁVALOS E PÉREZ (2009).

### 2.1.1.3 Flavonoides

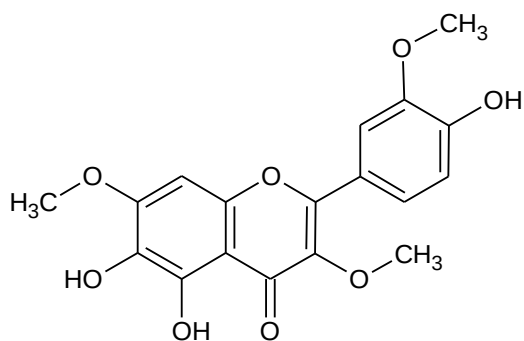
Entre os metabólitos secundários isolados de espécies da família Annonaceae podem-se destacar os flavonoides, considerados de grande interesse econômico e farmacológico, possuem atividades antitumorais, antiinflamatórias, antioxidantes, antibacteriana, antivirais, dentre outras (SHIRWAIKAR *et al.*, 2004; SIMÕES *et al.*, 2017).

Os flavonoides são capazes de estabilizar os radicais livres, prevenindo que eles causem danos às biomoléculas das células. Essa função é extremamente importante nas plantas, uma vez que esses seres estão expostos constantemente aos raios ultravioletas (UV) do sol durante a fotossíntese (PIETTA, 2000).

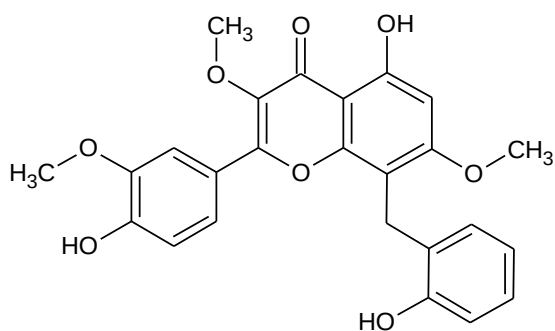
HUONG *et al.* (2005) isolaram e caracterizaram do extrato de folhas e ramos finos (fração metanol-água (95:5)) da Annonacea *Miliusa balansae* seis flavonas:

ombuina (3), chrysosplenol (4), miliufavol (5), pachypodol (6) e chrysosplenol C (7). Na **Figura 4** estão relacionados as estruturas desses flavonóides isolados.

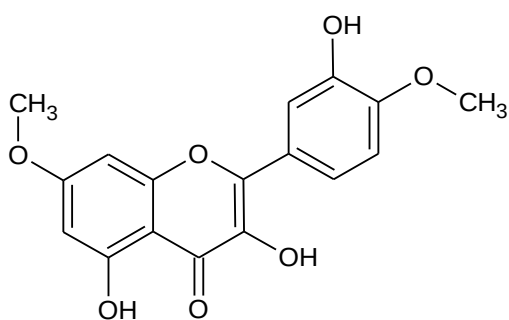
**Figura 4** - Flavonoides de *Milusa balansae*



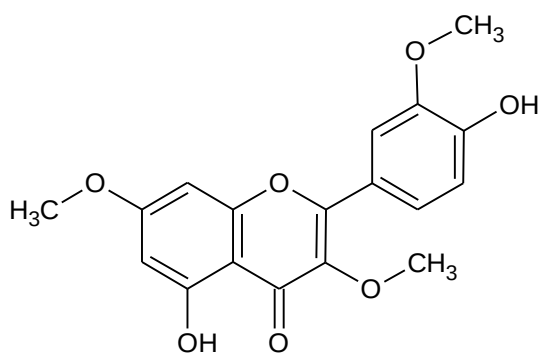
(3)



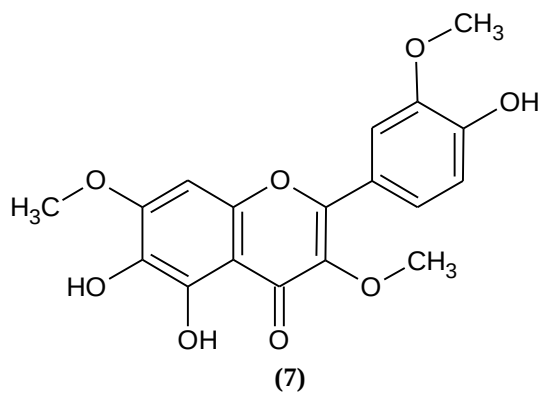
(4)



(5)



(6)



(7)



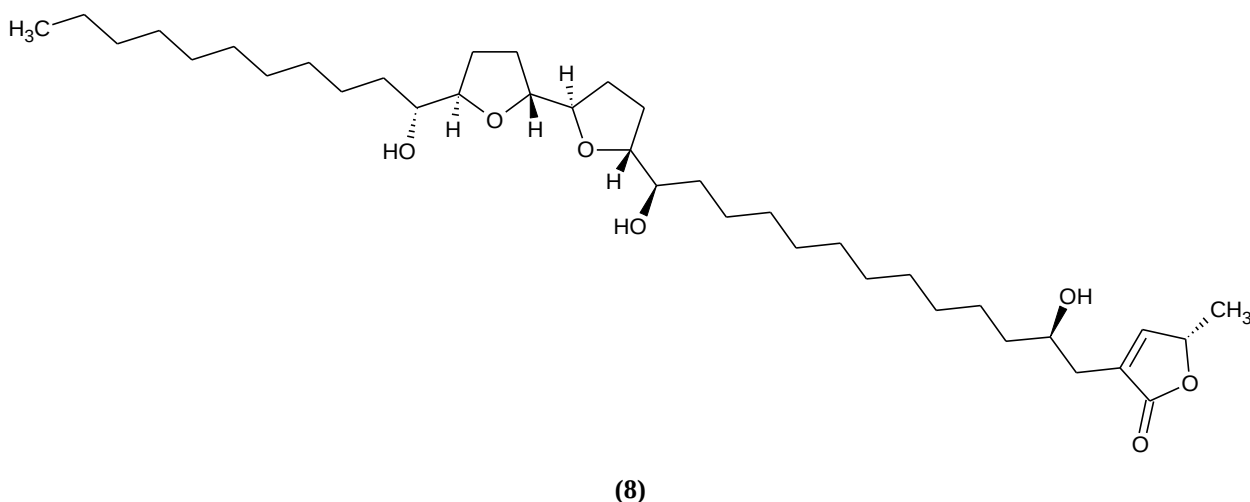
### 2.1.1.4 Acetogeninas

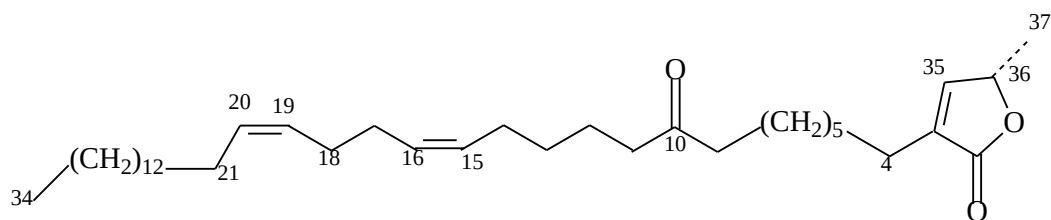
As acetogeninas constituem uma classe de produtos naturais promissora como protótipos de agentes antitumorais e pesticidas, que são encontradas exclusivamente em plantas da família Annonaceae. Essas substâncias apresentam uma variedade de propriedades biológicas, tais como atividades citotóxica, imunossupressora, pesticida, antiparasitária e antimicrobiana (BERMEJO *et al.*, 2005).

O crescente número de substâncias com características estruturais semelhantes extraídas das espécies desta família levou a denominar comumente este grupo de produtos naturais de “acetogeninas de Annonaceas” (CAVÉ *et al.*, 1997; FANG *et al.*, 1993).

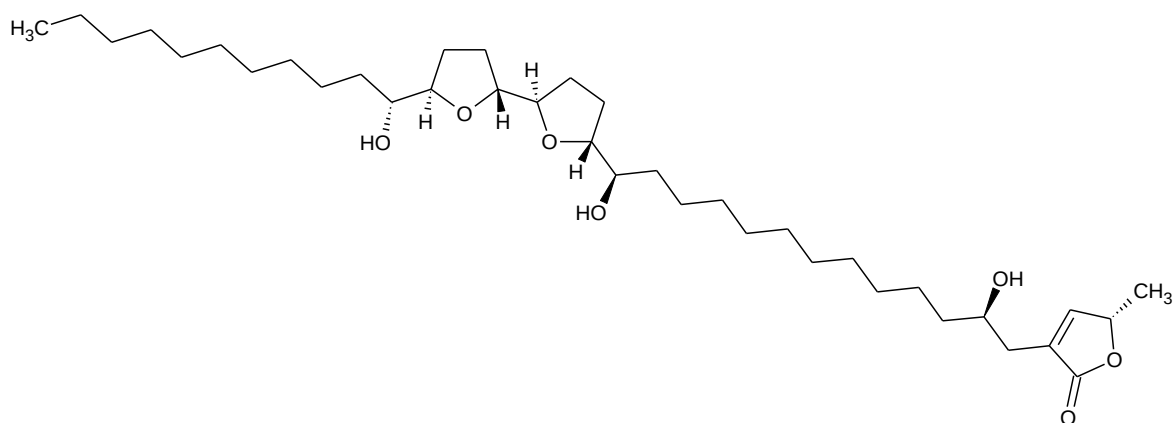
No trabalho realizado por TAMFU *et al.* (2021) é descrito o isolamento e a identificação da acetogenina asimicina (**8**) a partir de sementes da espécie *Annona senegalenis*. No estudo de COLMAN-SAIZARBITORIA *et al.* (2009) com o extrato etanólico da *Xylopia emarginata* foi isolada a ximarginatina (**9**). Da *Annona cornifolia* (LIMA *et al.*, 2012), foram isoladas algumas acetogeninas, como exemplo, a esquamocina L (**10**). Na **Figura 5** são apresentadas as estruturas das acetogeninas asimicina, ximarginatina e a esquamocina L.

**Figura 5** - Acetogeninas de *Annona segenaloes*, *Xylopia emarginata* e *Annona cornifolia*





(9)



(10)

Foi relatado que as acetogeninas podem inibir seletivamente o crescimento de células cancerosas e também de inibir o crescimento de células tumorais resistentes a múltiplos fármacos, demonstrando extraordinária seletividade entre certas linhagens celulares, especificamente, contra câncer prostático (FAGUNDES *et al.*, 2005).

Em relação ao perfil citotóxico um estudo *in vitro* mostrou efeito preferencial sobre células neoplásicas em comparação com as células saudáveis, sugerindo um potencial antitumoral destes agentes (ALVAREZ-GONZALEZ *et al.*, 2008).

#### 2.1.1.5 Alcalóides

Os alcalóides constituem um vasto grupo de metabólitos que exercem poderosos efeitos fisiológicos no organismo dos mamíferos. Com grande diversidade estrutural, muitos alcalóides, por exemplo: atropina, morfina, quinina e vincristina, tem efeitos terapêuticos importantes e são utilizados no tratamento de várias doenças (DAHMER, 2013). No **Quadro 4** estão dispostos alguns exemplos de medicamentos com alcalóides em sua formulação.

**Quadro 4** - Alguns alcaloides ou derivados empregados como fármacos

| <b>Protótipo natural</b> | <b>Fármaco descoberto</b> | <b>Indicação terapêutica</b>                                            |
|--------------------------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Paclitaxel               | Abraxane                  | Câncer do ovário, da mama, do pulmão                                    |
| Galantamina              | Coglive®                  | Demência do tipo Alzheimer                                              |
| Vincristina              | Oncovin                   | Câncer, entre eles leucemia, câncer de pulmão e de mama                 |
| Vimblastina              | Velban                    | Vários tipos de câncer, entre eles o de mama, dos rins e dos testículos |
| Ergometrina              | Ergotrate                 | Hemorragias pós-parto                                                   |
| Efedrina                 | Efedrina                  | Vasoconstritor, broncodilatador e descongestionante                     |
| Pilocarpina              | Pilocarpina               | Diminuição da pressão intraocular                                       |
| Atropina                 | Atropion                  | Estimulante do sistema nervoso parassimpático                           |
| Nicotina                 | Niquitin                  | Auxiliares à cessação tabágica                                          |
| Colquicina               | Colcichimil               | O tratamento de crises de gota                                          |
| Quinina                  | Quinina                   | Antitérmicas, antimaláricas e analgésicas.                              |
| Cafeína                  | Cafeína                   | Estimulante do sistema nervoso central                                  |
| Papaverina               | Papaverina                | Espasmolítico                                                           |

**Fonte:** (CABRAL; PITA, 2015).

Os alcaloides são metabólitos secundários que têm três características em comum: são solúveis em água, contêm pelo menos um átomo de nitrogênio na molécula e exibem atividade biológica. A maioria são heterocíclicos, embora alguns sejam compostos nitrogenados alifáticos (não cíclicos) (ÁVALOS, 2009).

Segundo HENRIQUES *et al.* (2004), os alcaloides são classificados em três grupos amplamente aceitos: alcaloides verdadeiros, protoalcaloides e pseudoalcaloides. Os alcaloides verdadeiros derivam de aminoácidos, e possuem um anel heterocíclico com um átomo de nitrogênio. Podem ocorrer em plantas no estado livre, como sais e como *N*-óxidos e em número limitado de espécies e famílias. Os precursores primários dos alcaloides verdadeiros são aminoácidos como a L-ornitina, L-lisina, L-fenilalanina / L-tirosina, L-triptofano e L-histidina.

Os protoalcaloides são compostos em que o átomo de nitrogênio derivado do aminoácido, não faz parte do anel heterocíclico. Alguns deste tipo de alcaloides incluem compostos derivados da L-tirosina e L-triptofano. Possuem um anel, sendo uma minoria quando se considera o grande conjunto de alcaloides (DEWICK, 2009)

Os pseudoalcaloides são compostos em que o esqueleto base de carbono não deriva de aminoácidos. São derivados de precursores da biodegradação de aminoácidos. Podem também resultar de reações de aminação e transaminação de diferentes

precursores de aminoácidos, ou de outros precursores que não de aminoácidos (SOUZA, 2014).

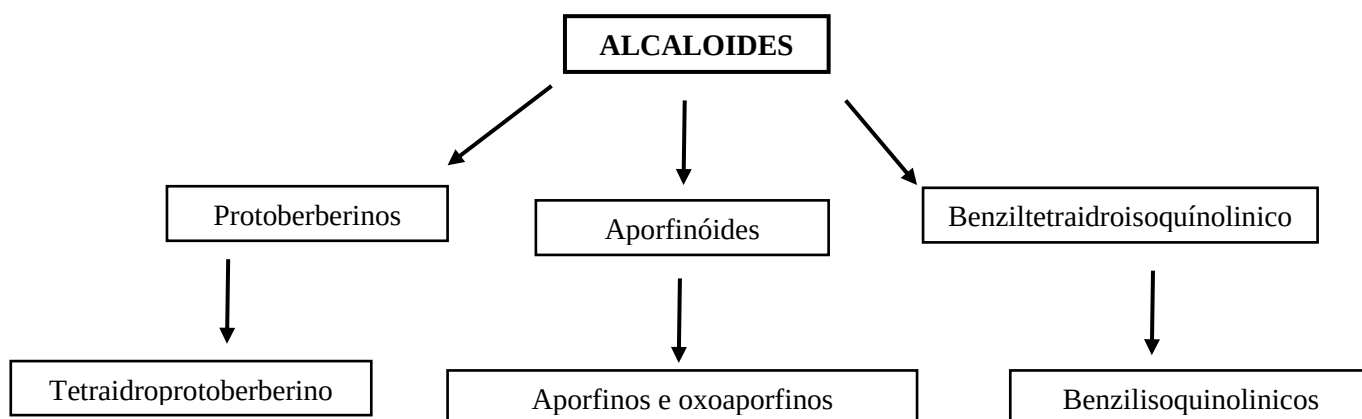
Os alcalóides são bases orgânicas nitrogenadas, encontradas em muitas plantas superiores. Nestas moléculas podem ser encontrados um ou mais átomos de nitrogênio, sendo possível observar a formação de aminas primárias, secundárias ou terciárias. Estas estruturas conferem propriedades básicas aos alcalóides, facilitando a extração e a posterior purificação devido a sua capacidade de formar sais solúveis em água na presença de ácidos inorgânicos e orgânicos (DEWICK, 2001; SIMÕES *et al.*, 2001).

As espécies pertencentes as Annonaceae são ricas em alcaloides, sendo recorrente na literatura registros de alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico (LEBOEUF *et al.*, 1980). As Annonaceae tem como efeitos biológicos a citotoxicidade, propriedades antimicrobianas e atividade antiparasitária; essas bioatividades são atribuídas à presença de terpenos e alcaloides presentes em espécies dessa família (HUSEIN, 2016).

Os alcaloides isoquinolínicos são os mais comuns da classe nos vegetais e estão relacionados com a biossíntese de diversas outras classes, como (**Esquema 3**): tetraidroquinolínicos, benziltetraidroquinolínicos, aporfinínicos, proaporfinínicos, bisbenzilisquinolínicos, dibenzopirrolínicos, protoberberínicos e benzofenantridínicos (HUSEIN, 2016).

Entre os alcaloides isoquinolínicos, existem os aporfinóides (também conhecidos como alcalóides aporfinínicos) são os mais comumente encontrados, seguido do grupo dos oxaporfinínicos. Há registro de grupos menores como os fenantrênicos, benziltetrahydroisoquinolínicos e bisbenziltetrahydroisoquinolínicos (LÚCIO, 2011; DOS SANTOS E VAZ, 2019).

**Esquema 3** - Classificação das principais classes de alcaloides isoquinolínicos de Annonacea



Fonte: Esquema adaptado de acordo com (DOS SANTOS; VAZ, 2018).

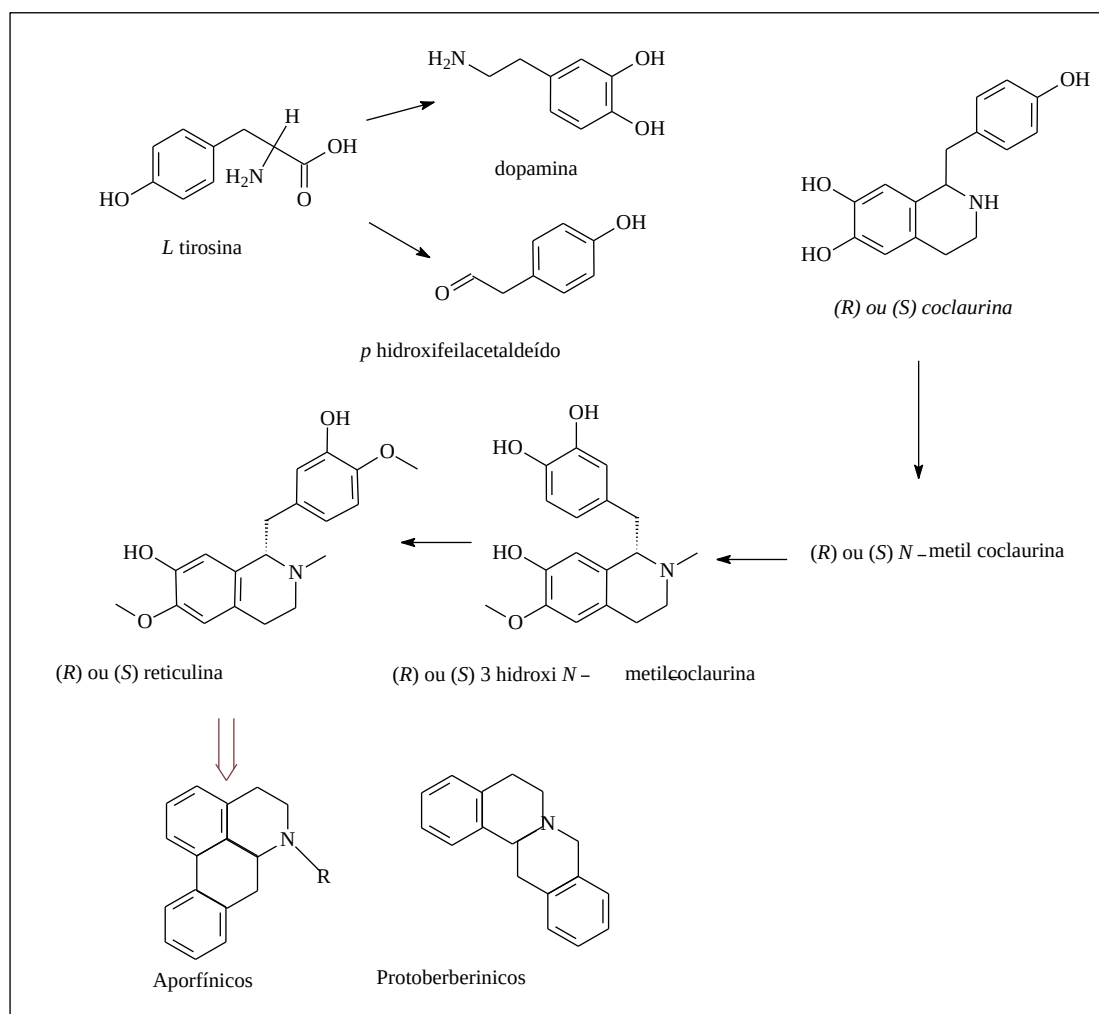
Existem várias subclasses de alcaloides isoquinolínicos, no entanto, sua origem biossintética é única. Apesar da diversidade das vias metabólicas, as modernas técnicas de triagem têm contribuído significativamente para a descoberta e compreensão dos alcaloides pela biossíntese (DEWICK, 2001).

#### 2.1.1.5.1 Benzilisoquinolinas

Segundo DEWICK (2009) a rota biossintética do esqueleto benziltetraidroisoquinolínico tem início a partir do aminoácido *L*-tirosina. Duas moléculas de *L*-tirosina paralelamente sofrem reação, uma é descarboxilada para formar a dopamina e a outra sofre uma reação de transaminação dando origem ao ácido 4-hidroxifenilpirúvico.

Posteriormente, os produtos das duas reações sofrem condensação através da reação de Mannich, formando assim o benziltetraidroisoquinolínico (*S*) norcoclaurina. Reações seguintes de metilação e oxidação levam a formação de (*S*)- reticulina, sendo precursora dos alcaloides aporfínicos e protoberberínicos (**Esquema 4**) (DEWICK, 2009)

**Esquema 4** - Biossíntese da (*S*)-reticulina, precursora do núcleo aporfínico

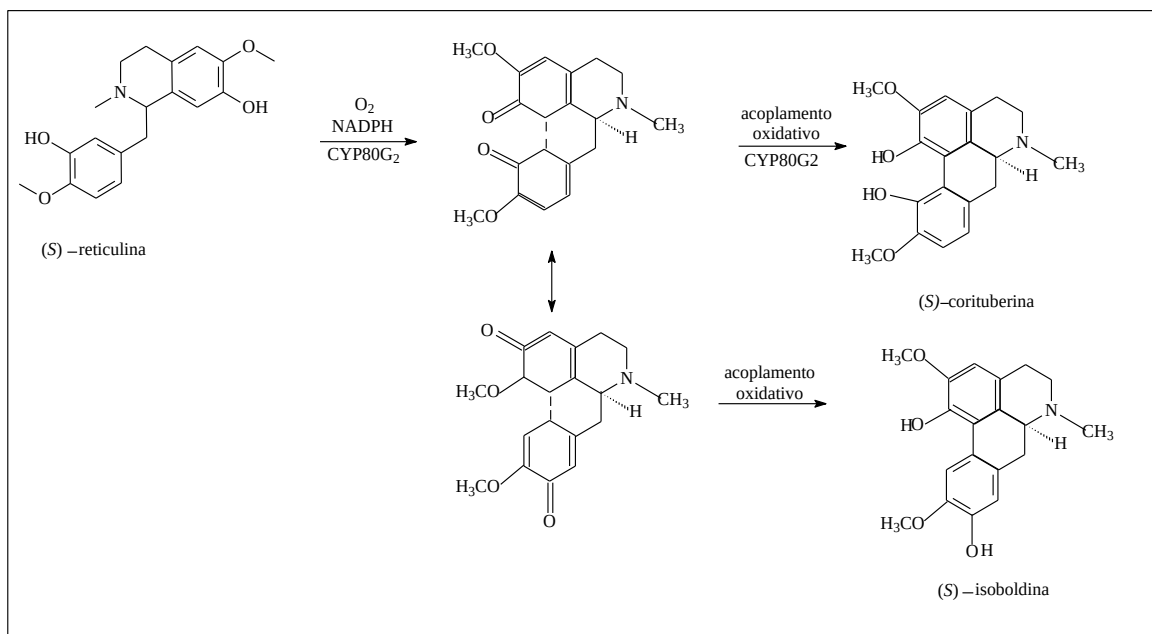


**Fonte:** adaptado de Dewick (2009).

#### 2.1.1.5.2 Aporfínicos

Os alcaloides aporfínicos são biossintetizados em plantas por meio de um acoplamento oxidativo intramolecular na *(S)*-reticulina, através de um mecanismo radicalar entre as bisdienonas. A rota simplificada para a biossíntese dos aporfínicos envolve o acoplamento oxidativo direto da *(S)*-reticulina na forma do radical *bis*-dienona que consequentemente os dois radicais podem ser *orto-orto* ao ser iniciado nos anéis A e D contendo o grupamento fenol em que nesse caso resultaria em um padrão de substituição nas posições 1,2, 10 e 11 ou *orto-para* resultando em um aporfino “com substituição nas posições 1, 2, 9 e 10 (PELLETIER, 1996) (**Esquema 5**).

**Esquema 5** – Biossíntese dos alcaloides aporfínicos

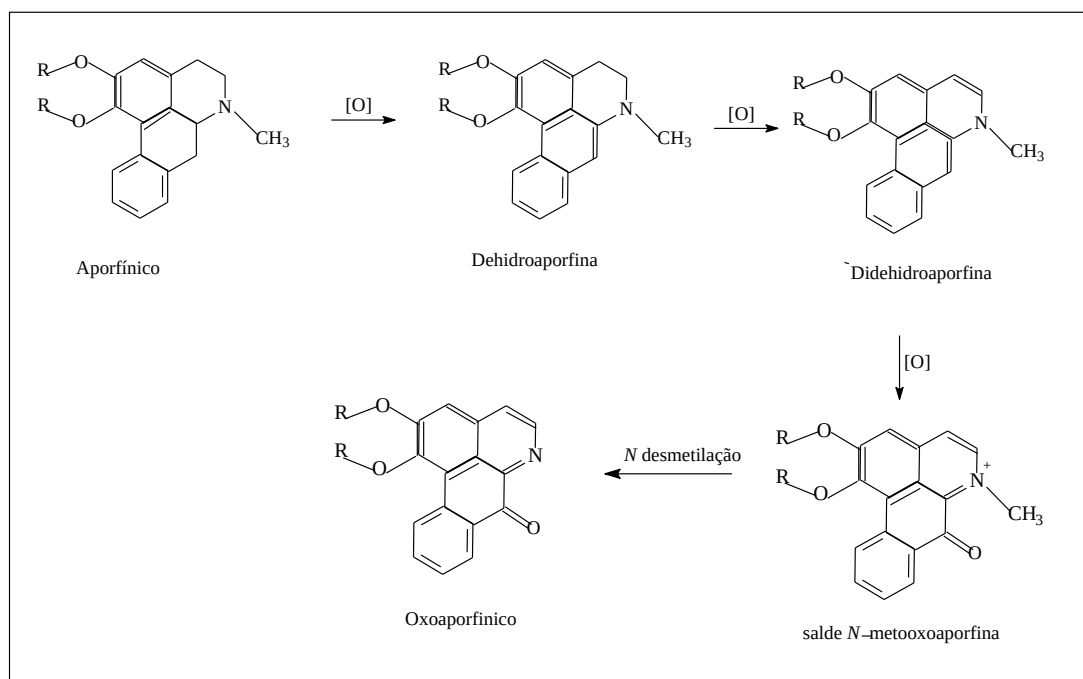


**Fonte:** adaptado de Dewick (2009).

#### 2.1.1.5.3 Oxoaporfínicos

Os alcaloides oxoaporfínicos são considerados uma subclasse dos alcaloides isoquinolínicos outra maneira natural das quais os alcaloides podem ser metabolizados (PHILLIPSON *et al.*, 1989). Esta subclasse de alcaloides é normalmente encontrada nas cores amarelo, laranja ou laranja-avermelhado, devido ao seu alto grau de aromaticidade, e quase sempre na presença de alcaloides aporfínicos (COSTA, 2009). No **Esquema 6** é apresentada a biossíntese dos alcaloides oxoaporfínicos.

**Esquema 6** - Biossíntese de alcalóides oxoaporfínicos



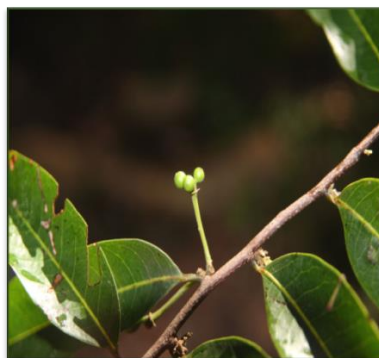
**Fonte:** Adaptado de acordo com Dos Santos e Vaz (2018).

## 2.2 Gênero *Bocageopsis* e *Fusaea*: uso popular, constituintes químicos e atividades biológicas

### 2.2.1 Gênero *Bocageopsis*

O gênero *Bocageopsis* (R.E.Fr.) é constituído por quatro espécies: *B. canescens* (Benth.) R.E.Fr, *B. mattogrossensis* (R.E.Fr.) R.E.Fr., *B. multiflora* (Mart.) R.E.Fr. **Figura 6** e, mais recentemente a espécie *B. pleiosperma* Maas (MAAS; WESTRA; VERMEER, 2007). A maioria das espécies concentra-se na Floresta Amazônica, porém há algumas que são endêmicas da Mata Atlântica.

**Figura 6** - *Bocageopsis multiflora* (Mart.) R.E.Fr



**Fonte:** Elaborado pela autora

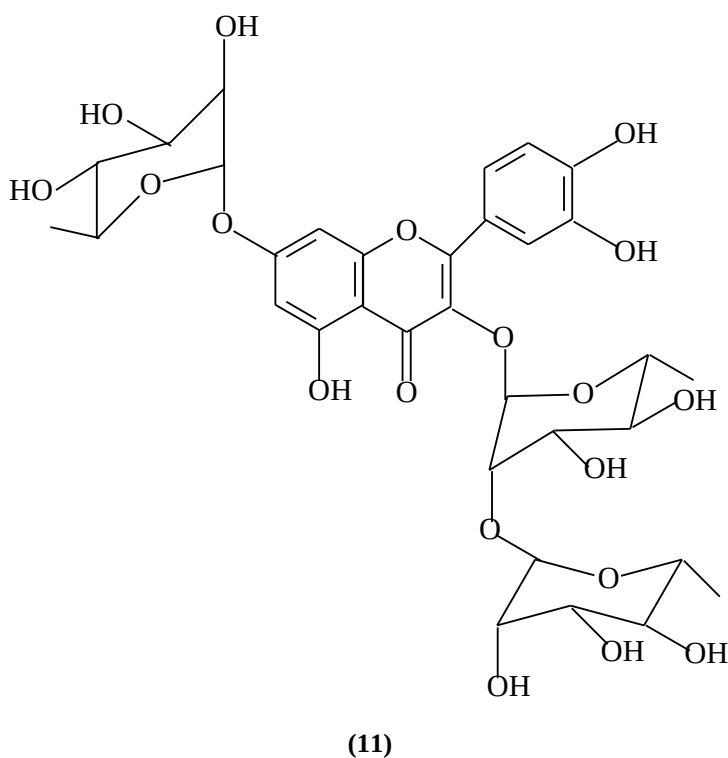
*Bocageopsis multiflora* (Mart.) é a espécie mais comum do gênero. Sua distribuição ocorre na Amazônia boliviana (Beni, Pando), Brasil (Amazonas, Mato



Grosso, Rondônia, Roraima), Colômbia, Venezuela, Guiana e Suriname (MAAS; WESTRA; VERMEER, 2007). É uma das espécies mais procuradas para se queimar na torragem da farinha e, segundo diferentes informantes, “ela pega fogo até molhada” AMMANN (2014). Em relação ao uso medicinal tradicional não foram encontrados relatos para este gênero (SOARES *et al.*, 2019).

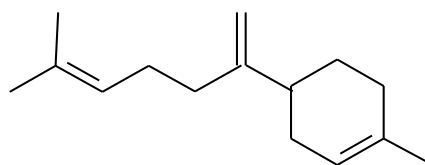
SOARES e colaboradores (2019) ao estudar a espécie *B. canescens* isolou os flavonoides glicosilados (11) e (12), **Figura 7**. A partir da fração alcaloídica dos galhos grossos de *B. multiflora*, foram isolados os alcaloides salsolina (13), isosalsolina (14) e pronuciferina (15), **Figura 7**.

**Figura 7** - Estruturas dos flavonoides e alcaloides isolados de espécies pertencentes ao gênero *Bocageopsis*



No estudo da espécie *B. pleiosperma* Maas (folhas, galhos e cascas), é evidente a presença de sesquiterpenos e ausência de monoterpenos, e o principal constituinte identificado foi o  $\beta$ -bisaboleno (16) da **Figura 8**. Apesar de apresentar fraca atividade antimicrobiana, a este constituinte, é atribuída uma atividade biológica importante, a antimalárica (SOARES *et al.*, 2015).

**Figura 8** - Estrutura do constituinte  $\beta$ - bisaboleno e espatulenol



(16)

No **Quadro 5** são apresentadas as composições químicas de compostos majoritários encontrados nos **OEs**, descritos na literatura. É possível observar a presença do  $\beta$ -bisaboleno (**16**) nas duas espécies, *B. multiflora* e *B. pleiosperma*.

**Quadro 5** - Composição química majoritária dos OEs e atividades biológicas de espécies do gênero *Bocageopsis*

| Espécies                    | Parte estudada           | Constituintes principais dos OEs analisados <sup>1</sup>                                                                                                                                                                                                         | Atividades biológicas                                                                                                                                                   | Referências                       |
|-----------------------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>B. multiflora</i> (Mart) | Folhas                   | Espatuleno (2)<br>Óxido de cariofileno (1),<br>$\beta$ -bisaboleno (16)                                                                                                                                                                                          | Atividade contra o <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>                                                                                          | (ALCÂNTARA <i>et al.</i> , 2017). |
| <i>B. pleiosperma</i> Maas  | Folhas, cascas e galhos. | $\beta$ -bisaboleno (16)<br><i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoteno (22)<br>( <i>E</i> )- $\beta$ -farneseno (23)<br>$\delta$ -cadineno (24)<br>$\beta$ -selineno (25)<br>$\alpha$ -selineno (26)<br>criptomeriona (27)<br>(2 <i>Z</i> , 6 <i>Z</i> )-farnesol (28) | O óleo essencial obtido das cascas exibiu um efeito moderado contra <i>Staphylococcus epidermidis</i> , enquanto os outros óleos não exibiram atividade antimicrobiana. | (SOARES <i>et al.</i> , 2015).    |

O estudo sobre a composição química do óleo essencial da espécie *B. multiflora* descrito por OLIVEIRA *et al.* (2014) mostrou que na estação chuvosa o  $\beta$ -bisaboleno (**16**) foi o constituinte principal e os sesquiterpenos foram a classe de metabólitos secundários majoritária, enquanto o principal componente do óleo coletado na estação seca foi o espatuleno (2), **Figura 3**.

SOARES *et al.* (2015) ao estudar folhas, galhos e cascas da espécie *Bocageopsis pleiosperma* Maas, descrevem bons resultados para a atividade antibacteriana contra *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*.

O óleo essencial das folhas frescas da espécie *B. multiflora*, investigada por OLIVEIRA *et al.* (2014) apresentou inibição significativa contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*.

### 2.2.2 Gênero *Fusaea*

*Fusaea* (Baill.) Saff. é outro gênero da família Annonaceae que foi encontrado por Safford em 1914. A espécie *F. longifolia* (Aubl.) Saff. foi, originalmente, descrita por AUBLET (1775) como *Annona longifolia* que, posteriormente, foi colocada no gênero *Duguetia* separada do resto do gênero sob o nome seccional de *Fusaea*. Atualmente, o gênero *Fusaea* é constituído por três espécies: *F. longifolia*, *F. decurrens* e *F. peruviana* (FLORES, 2018).

A *F. longifolia* é conhecida popularmente como “envira”, “araticum”, “envireira” e “espitana”. Tem boa distribuição na América do Sul, presente na Colômbia, Venezuela, Suriname, Bolívia, Equador, Peru, Brasil e nas Guianas. No Brasil, ocorre nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato grosso, Pará, Rio de Janeiro, Rondônia e Roraima (CHATROU, 1998)

O fruto, **Figura 9**, de *F. longifolia* exala um odor forte e agradável quando maduro e os índios Urubu-Kaapor utilizam-no como comestível, sendo uma importante fonte de proteínas para quem habita a selva, a espécie também tem uso como remédio (RIOS E PASTORE, 2011).

**Figura 9** - Fruto da *F. longifolia*



**Fonte:** Elaborado pela própria autora

A fitoquímica desse gênero é pouco explorada e apenas dois estudos foram encontrados na literatura sobre *F. longifolia*.

Um dos alcaloides isolados por TAVARES *et al.* (2005) foi do tipo tetraidroprotoberberínico, a estefolidina **(17)**, **Figura 10**. Este alcalóide já foi anteriormente descrito em espécies da família Annonaceae como *Annona cherimolia* e *Alphonsea sclerocarpa* (VILLAR *et al.*, 1985; TADIC *et al.*, 1987).

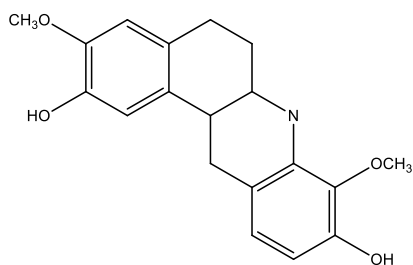
No estudo realizado por TAVARES *et al.* (2005) com os caules finos, foram isolados alcaloides e extraído o óleo essencial das folhas. A composição química dos OEs obtidos a partir do caule da espécie *F. longifolia* (Aubl.) Saff foi relatado principalmente são os sesquiterpenos: espatulenol (12,0%) **(2)** **Figura 3**,  $\alpha$ -cadinol (12,5%) **(29)**,  $\delta$ -elemeno (4,2%) **(30)**,  $\beta$ -elemeno (3,8%) **(31)**, germacreno D (3,7%) **(32)** e germacreno B (2,9%) **(33)**, **Figura 8 e Quadro 6**.

**Quadro 6** - Composição química majoritária dos OEs e atividade biológica da espécie *F. Longifolia*

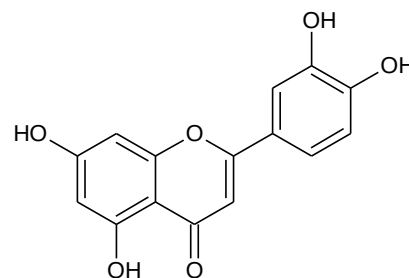
| Espécies                          | Parte estudada | Constituintes principais dos OEs analisados <sup>1</sup>                                                                                                                         | Referências                     |
|-----------------------------------|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| <i>F. longifolia</i> (Aubl.) Saff | Caule          | $\alpha$ -cadinol <b>(29)</b><br>espatulenol <b>(2)</b><br>$\delta$ -elemeno <b>(30)</b><br>$\beta$ -elemeno <b>(31)</b><br>germacreno B <b>(32)</b><br>germacreno D <b>(33)</b> | (TAVARES <i>et al.</i> , 2005). |

No estudo desenvolvido por MORALES (2019) com *F. longifolia* com extratos de acetato de etila, foi verificada a atividade antiviral promissora para Herpes Simplex Vírus tipo 1 (HSV-1). A análise cromatográfica do extrato por UPLC-MS/MS, revelou a presença dos compostos: taxifolina **(18)**, luteolina **(19)**, quercetina-3- $\beta$ -D-glicosídeo **(20)** e quercetina **(21)** **(Figura 10)**.

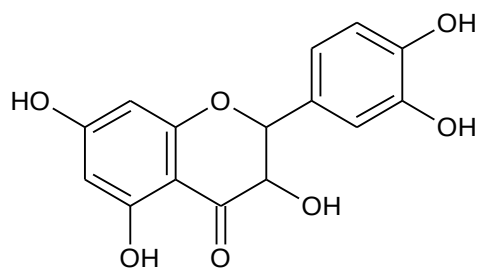
**Figura 10** - Estrutura dos constituintes isolados da *F. Longifolia*



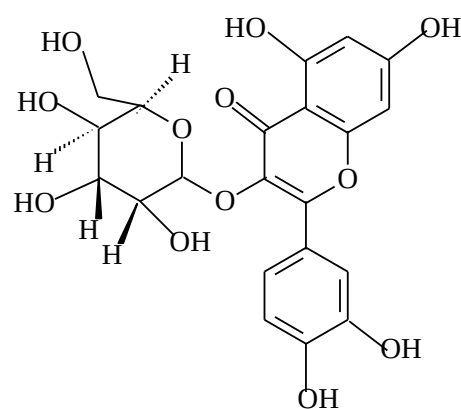
**(17)**



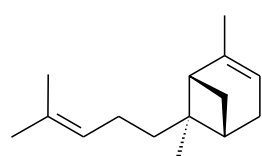
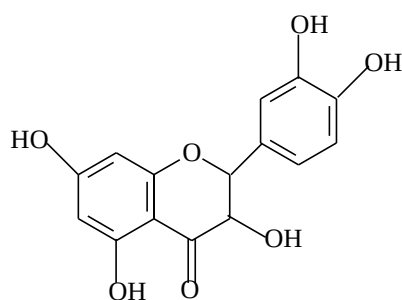
**(18)**



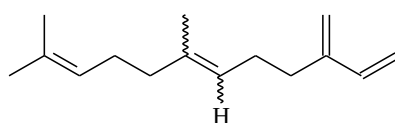
(19)



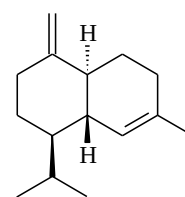
(20)



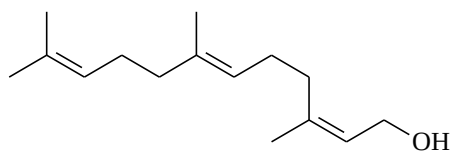
(22)



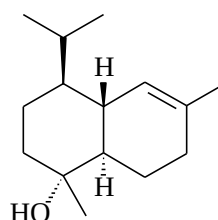
(23)



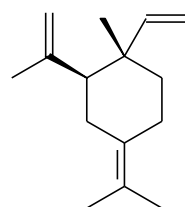
(24)



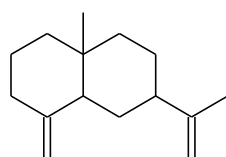
(26)



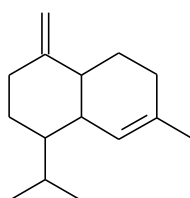
(27)



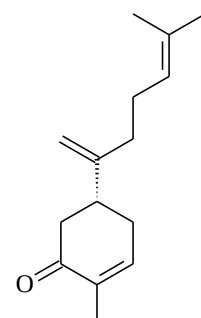
(28)



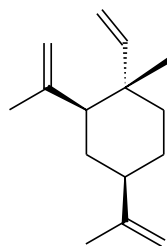
(29)



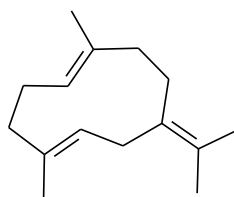
(30)



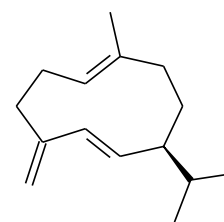
(31)



(31)



(32)



(33)

### 2.3 Gênero *Duguetia*: uso popular, constituintes químicos e atividades biológicas

O gênero *Duguetia* A. St.-Hil. compreende 100 espécies, das quais 89 ocorrem em regiões Neotropicais e 4 na África. No Brasil, o gênero é um dos mais representados. A espécie *D. quitarensis* **Figura 11** (sinônimas: *Aberemoa quitarensis* Benth. R.E.Fr., *D. ibonensis* Rusby, e *D. tessmannii* R.E.Fr.) é a espécie mais comum do gênero e está distribuída na região Amazônica e da Venezuela até a Bolívia (ALARCÓN, 2007).

**Figura 11** - *Duguetia quitarensis* Benth



**Fonte:** Elaborada pela autora

Este gênero abrange cerca de 100 espécies, e é um dos mais abundantes da família Annonaceae. Há estudos que relatam o uso tradicional de algumas espécies desse gênero como alternativas medicinais para o tratamento de diversos problemas de saúde dos habitantes de diferentes regiões tropicais do mundo onde essas plantas estão distribuídas (FUENTES, 2020).

Para o gênero *Duguetia* são encontrados alguns usos tradicionais, como exemplo, o chá das folhas de *D. furfuracea* é indicado para combater dismenorreia, metrorragia e diarreia (SANGALLI; VIEIRA; HEREDIA, 2008). Segundo RODRIGUES; CARVALHO (2001) e CAROLLO *et al.* (2006) as folhas são anti-reumáticas e podem ser usadas na forma de infusão. O chá da casca do caule de *D. staudtii* também é utilizado na medicina popular para o tratamento de dores no peito, bronquite, problemas gastrointestinais, edemas e câncer.

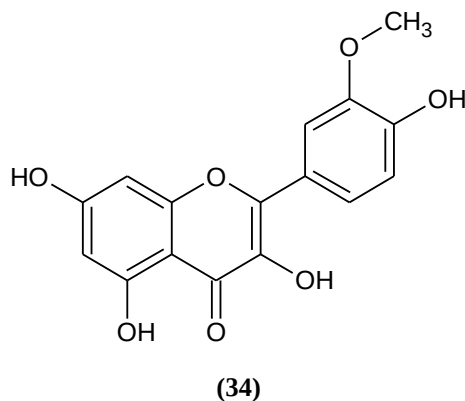
Além disso a espécie *D. staudtii*, pode ser adicionada à mistura de veneno de flecha e é considerada um excelente vermífugo (NGOUONPE *et al.*, 2019). A infusão de pequenos ramos e folhas dessa espécie é indicada para reumatismo (VALTER *et al.*, 2008). No **Quadro 7** são apresentados alguns estudos de cunho científico com o gênero *Duguetia*.

**Quadro 7** - Atividades biológicas para o gênero *Duguetia*.

| <b>Espécies Estudadas</b>               | <b>Partes Estudadas</b> | <b>Atividades Biológicas</b>                                                   | <b>Referências</b>               |
|-----------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| <i>D. furfuracea</i> (A.St.-Hil.) Saff. | Folhas                  | Atividade antioxidante e antifúngica                                           | (PINHO <i>et al.</i> , 2016).    |
| <i>D. furfuracea</i> (A.St.-Hil.) Saff. | Folhas                  | combate a metais pesados, apresentando-se como protetora de seres procariontes | (FERNANDES <i>et al.</i> , 2014) |
| <i>D. lanceolata</i> A. St.-Hil         | Casca-tronco            | Atividade inseticida para <i>Spodoptera frugiperda</i>                         | (ALVES <i>et al.</i> , 2020).    |
| <i>D. pycnastera</i> Sandwith           | Casca                   | Atividade citotóxica                                                           | (DE SOUZA <i>et al.</i> , 2021). |

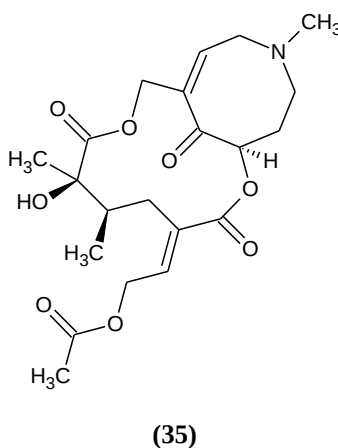
O gênero *Duguetia* não está entre os gêneros mais estudados quimicamente, sendo precedido pelos gêneros *Annona*, *Goniothalamus*, *Monodora*, *Uvaria* e *Xylopia* (CUNHA, 2009).

CAROLLO e colaboradores (2006) trabalhando com a espécie *D. furfuraceae* isolaram o flavonoide isoramentina (**34**) que apresentou atividade tripanocida **Figura 12**.

**Figura 12** - Estrutura do flavonoide Isoramentina

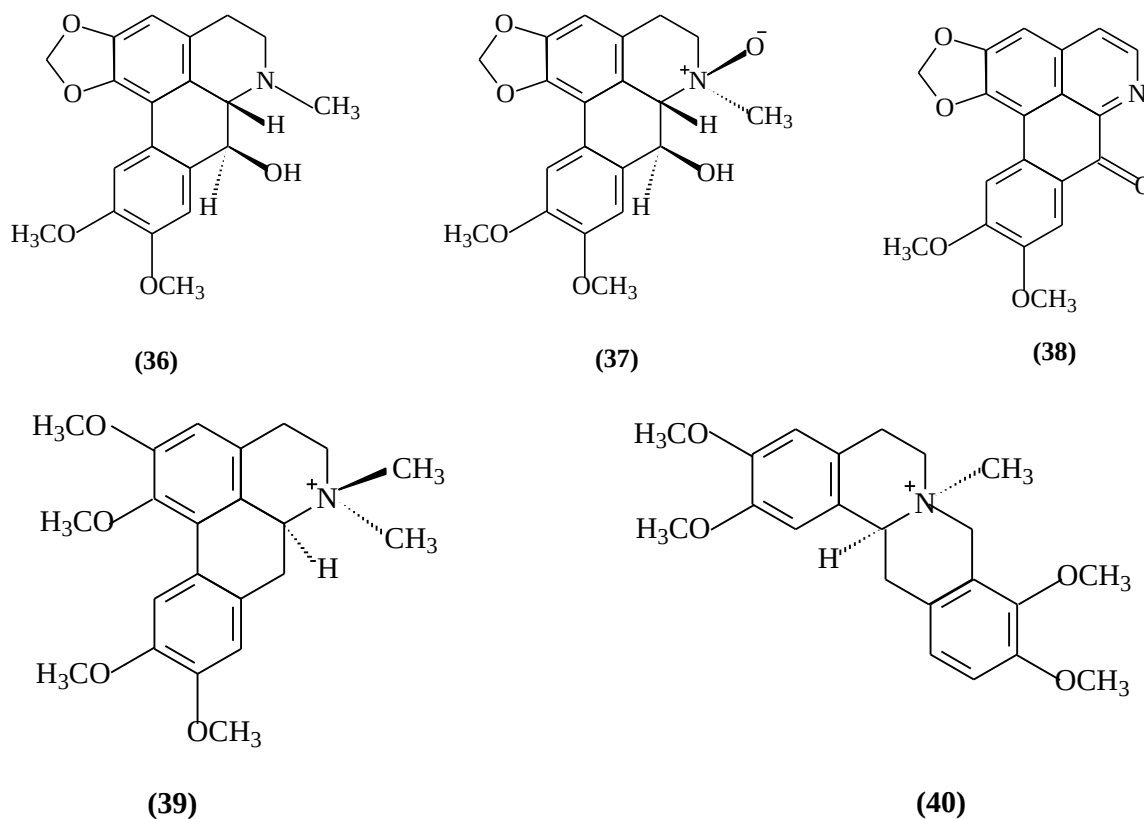
No entanto diversas substâncias, principalmente alcaloides, já foram isolados de suas espécies (GONÇALVES *et al.*, 2017, OLIVEIRA, 2017). Entre os alcaloides mais comuns encontrados no gênero *Duguetia* destacam-se aqueles derivados do esqueleto isoquinolínico.

BONOTTO (2005) relata o estudo químico da espécie *D. lanceolata*. O extrato etanólico e os alcalóides totais (100 µg/mL) da espécie, demonstraram níveis de atividade (percentual de morte de cerca de 100% e 66%, respectivamente) contra às formas tripomastigotas de *T. Cruzi*. Desse extrato foi obtido o alcalóide majoritário aporfínico *N*-acetilanonaína (35) **Figura 13**.

**Figura 13** - Estrutura do Alcaloide *N*-acetilanonaína

Na **Figura 14** e **Quadro 8** são apresentados alguns alcaloides que foram isolados do gênero *Duguetia*.



**Figura 14** - Alcaloides isolados da espécie da *D. furfuracea***Quadro 8** - Alcaloides encontrados no gênero *Duguetia*

| Alcaloide        | Tipo de esqueleto    | Espécie                               | Referência                          |
|------------------|----------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Isopilina        | aporfinico           | <i>D. vallicola</i><br>J.F.Macbr.     | (PEREZ <i>et al.</i> , 2004).       |
| Discretamina     | protoberberinico     | <i>D. moricandiana</i><br>Mart        | (ALMEIDA <i>et al.</i> , 2011).     |
| Cleistofolina    | Azaantracênico       | <i>D. Vallicola</i><br>J.F.Macbr.     | (PÉREZ <i>et al.</i> , 2004).       |
| Duguetina        | aporfinico           | <i>D.furfuracea</i> (A.<br>St.-Hil.)  | (SILVA <i>et al.</i> , 2009).       |
| Liriodenina      | Oxoaporfinico        | <i>D. stelichantha</i><br>Diels.      | (LÚCIO <i>et al.</i> , 2015).       |
| Hadranthina      | aporfinico           | <i>D. hadrantha</i> Diels             | (MUHAMMAD <i>et al.</i> , 2001).    |
| Sampangina       | Azaoxoaporfinico     | <i>D. hadrantha</i> Diels             | (MUHAMMAD <i>et al.</i> , 2001).    |
| S-(+)-dicentrina | oxoaporfinico        | <i>D. furfuracea</i> (A.<br>St.-Hil.) | (MIGUEL <i>et al.</i> , 2016).      |
| Lisicamina       | aporfinico           | <i>D. pycnastera</i><br>Sandwith      | (DE SOUZA <i>et al.</i> , 2020).    |
| Dicentrinona     | oxoaporfinico        | <i>D. furfuracea</i> (A.<br>St.-Hil.) | (SANTOS <i>et al.</i> , 2018).      |
| Oliverolina      | 7-hidroxi-aporfinico | <i>D. odorata</i> (Diels)<br>J.F.     | (BRASTIANOS, <i>et al.</i> , 2007). |

No **Quadro 9**, estão descritos alguns alcaloides isoquinolínicos isolados de algumas espécies de *Duguetia* e suas respectivas atividades biológicas.

**Quadro 9** - Atividades Biológicas de Alcaloides Isoquinolínicos de *Duguetia*

| Alcaloide              | Atividade Biológica                                                 | Espécie                | Referências              |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------|
| S-(+) Dicentrina (A)   | Analgésica                                                          | <i>D. surinames</i>    | (MONTRUCCHIO, 2012).     |
| Dicentrinona (O)       | Anti-inflamatória                                                   | <i>D. furfuracea</i>   | (DE SOUZA, 2013).        |
| O-metilmoscatoлина (A) | Carcinoma de laringe                                                | <i>D. glabriuscula</i> | (SILVA et al., 2007).    |
| Hadrantina (P)         | Atividade antimalárica <i>in vitro</i> contra Plasmodium falciparum | <i>D. hadrantha</i>    | (MUHAMMAD et al., 2001). |

Legenda: (O) oxoaporfinico, (A) aporfinico, (P) protoberberínico.

No **Quadro 10 e Figura 15** são apresentados alguns componentes voláteis de algumas espécies de *Duguetia* e suas respectivas atividades biológicas.

**Quadro 10** - Composição química majoritária dos OEs e atividades biológicas de espécies do gênero *Duguetia*

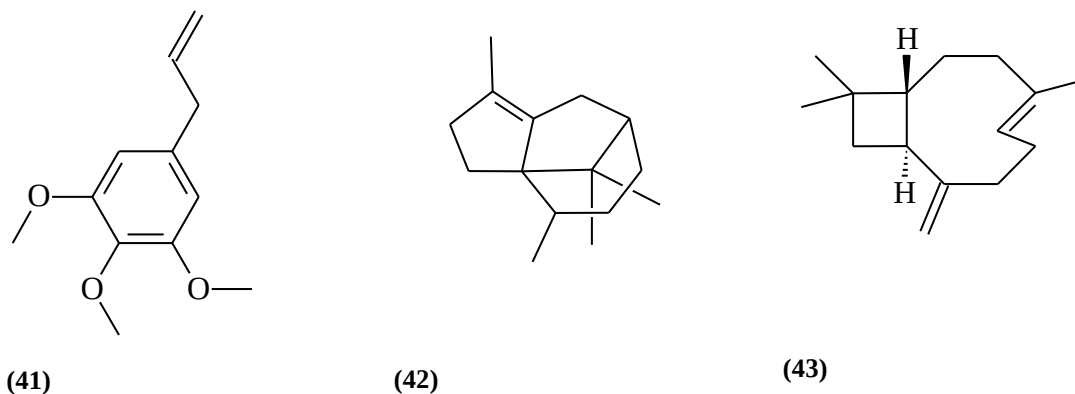
| <i>Duguetia</i>                  | Parte estudada | Constituintes principais dos OEs analisados <sup>1</sup>                                  | Atividades biológicas.                                                                      | Referências bibliográficas  |
|----------------------------------|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| <i>D. gardneriana</i> Mart       | Folhas         | Cipereno (42)<br>$\beta$ -bisaboleno (16)<br>elemicina(41)<br>germacreno D (33)           | Potencial citotóxico e antitumoral                                                          | (RODRIGUES et al., 2015).   |
| <i>D. moricandiana</i> Mart.     | Folhas         | $\alpha$ -pineno (44)<br>$\beta$ -pineno (45)<br>E-cariofileno (46)<br>germacreno D (33 ) | Ativo contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Candida albicans</i> na concentração de 100% | (ALMEIDA et al., 2011).     |
| <i>D. glabriuscula</i> (R.E.Fr.) | Folhas         | Aromadendrano (43)                                                                        | Atividades contra <i>Artemia salina</i>                                                     | (DE SIQUEIRA et al., 2003). |
| <i>D. lanceolata</i> A.St.-Hil   | Cascas         | $\beta$ -elemeno (31)<br>óxido de cariofileno(1)                                          | Inibição do crescimento da <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> ,   | (SOUSA et al., 2012).       |

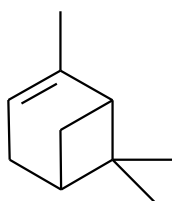
|                                          |       |                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                   |                                  |
|------------------------------------------|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
|                                          |       |                                                                                                                                                                                                                                                                | <i>Escherichia coli</i> e<br><i>Candida albicans</i>              |                                  |
| <i>Duguetiae lanceolata</i><br>A.St.-Hil | Ramos | $\delta$ -elemeno (30)<br>$\beta$ -elemeno (31)<br><i>E</i> -cariofileno (46)<br>$\beta$ -selineno (31)<br>$\delta$ -cadineno(24)<br>Óxido de cariofileno (1)<br>humulenoepóxido II (47)<br>$\beta$ -eudesmol(48)<br>cadina-1,4-dien-3-ol (49)<br>cadaleno(50) | Propriedades antinociceptivas, anti-inflamatórias e antioxidante. | (DE SOUSA <i>et al.</i> , 2016). |

No estudo do óleo essencial das folhas da *Duguetia gardneriana* Mart. RODRIGUES *et al.* (2015) foram obtidos o  $\beta$ -bisaboleno (16), a elemicina (41), o germacreno D (33) e o cipereno (42). No óleo essencial das folhas de *D. glabriuscula*, a presença dos sesquiterpenos do tipo aromadendrano (43) predominou em 61,3% e 59,0%, das folhas frescas e secas, respectivamente (DE SIQUEIRA *et al.*, 2003).

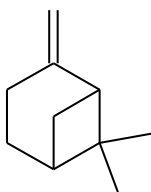
Na extração do óleo essencial das cascas da espécie *D. lanceolata* os sesquiterpenoides representaram o maior número de constituintes detectados no óleo essencial. O  $\beta$ -elemeno (31) e óxido de cariofileno (1) como sendo os principais, para duas e quatro horas de hidrodestilação, respectivamente (SOUSA *et al.*, 2012). Outro estudo realizado por DE SOUSA *et al.* (2016) com a *Duguetia lanceolata* apresentou uma variedade de constituintes, prevalecendo os sesquiterpenos hidrocarbonetos (40%) e os oxigenados com (44,9%).

**Figura 15** - Estruturas dos constituintes voláteis majoritários do gênero *Duguetia*

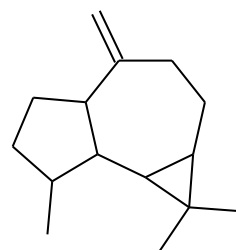




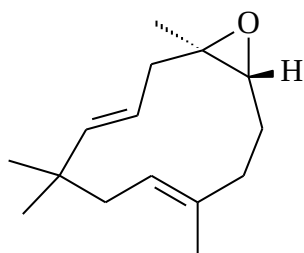
(44)



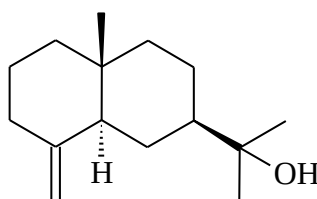
(45)



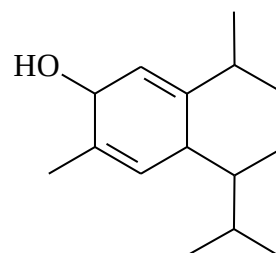
(46)



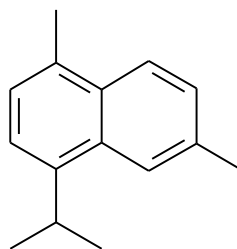
(47)



(48)



(49)



(50)

Não foram encontrados relatos na literatura de estudos químico-farmacológicos para a espécie *D. quitarensis*, sendo este trabalho o primeiro a reportar os constituintes químicos para esta espécie.

## 2.4 Gênero *Guatteria*: uso popular, constituintes químicos e atividades biológicas

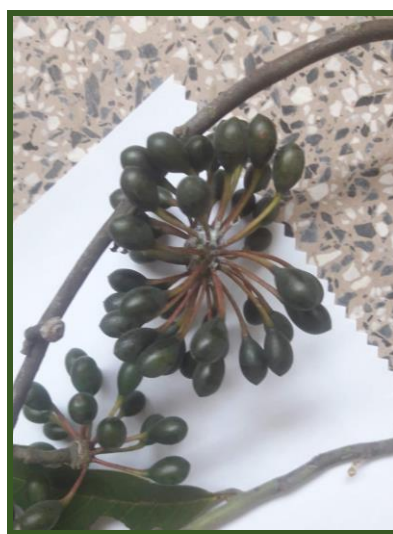
*Guatteria* Ruiz et Pav. é um dos gêneros mais antigos da família Annonaceae aceitos no Novo Mundo, sendo distribuído do sudeste do México à Bolívia e sul do Brasil, sendo a maioria encontrada na floresta amazônica (LOBÃO *et al.*, 2012). No Brasil, são registradas 88 espécies, das quais 47 são endêmicas (LOBÃO *et al.*, 2012).

*Guatteria* é o maior gênero da família Annonaceae com cerca de 300 espécies, e é o único membro da tribo *Guatterieae*. É exclusivamente neotropical ERKENS *et al.* (2007), e 88 espécies ocorrem no Brasil (MAAS; RAINER; LOBÃO, 2013).

Espécies do gênero *Guatteria* são utilizadas popularmente como antiparasitárias, vermífugas, inseticidas e odoríferas (RABELO, *et al.*, 2014). A *Guatteria foliosa* é utilizada pelo povo indígena como repelente de insetos (PAREDES, 2001). Da *Guatteria modesta* Diels a infusão da casca durante a menstruação serve como contraceptivo (RIOS e PASTORE, 2011).

Em relação a estudos fitoquímicos e de suas propriedades biológicas há um estudo desenvolvido para a *Guatteria punctata* (**Figura 16**) por ALMEIDA (2018), que cita seu poder ansiolítico, apresentando um possível efeito ansiolítico na dose 400mg.

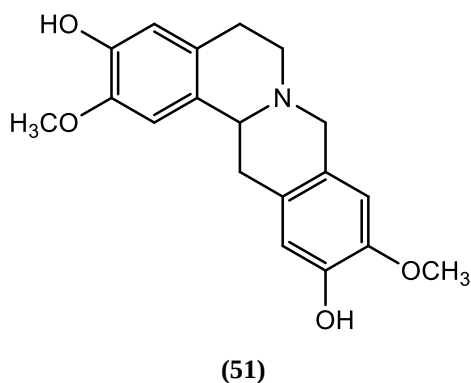
**Figura 16** - *Guatteria punctata* (Aubl.) R.A Howard



**Fonte:** Elaborada pela autora

No trabalho desenvolvido por COSTA *et al.* (2011), com o cerne da *Guatteria blepharophylla* (Mart.), foram isolados dois alcaloides, sendo um deles o majoritário a isocoreximina (**51**) (**Figura 17**), onde foi atribuído a atividade antitumoral observada, uma vez que já possui atividade antitumoral comprovada.

**Figura 17** - Estrutura do alcaloide isocoreximina



As espécies pertencentes ao gênero *Guatteria*, têm mostrado que suas características químicas são semelhantes as demais dos gêneros da família Annonaceae, sendo assim, caracterizadas, em geral, pela ocorrência de alcaloides, embora outras classes de substâncias como os terpenos sejam de frequente relato no gênero (DOS SANTOS *et al.*, 2017).

Os principais metabólitos secundários encontrados no gênero *Guatteria* são os alcaloides, com destaque para a classe dos isoquinolínicos, como mostrados no levantamento realizado por (SANTOS, 2015).

No **Quadro 11** são apresentados alguns estudos com o gênero *Guatteria*.

**Quadro 11** - Atividades biológicas para espécies do gênero *Guatteria*

| <b><i>Guatteria</i></b>                | <b>Partes Estudadas</b> | <b>Atividades Biológicas</b>                                                   | <b>Referências</b>               |
|----------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| <i>G. pogonopus</i> Mart               | Folhas                  | Atividades citotóxicas e forte atividade contra leucemia promielocítica humana | (SANTOS <i>et al.</i> , 2018).   |
| <i>G. latifolia</i> R.E.Fr.            | Galhos, folhas e frutos | Atividade leishmanicida                                                        | (FERREIRA <i>et al.</i> , 2017). |
| <i>G. blepharophylla</i> Mart          | Casca                   | Mostrou atividade significativa contra linhagens celulares de mama             | (COSTA, <i>et al.</i> , 2011).   |
| <i>G. boliviana</i> H. Winkl.          | Caule                   | Atividade <i>in vitro</i> (100 µg/mL) contra <i>Leishmania braziliensis</i>    | (MAHIOU <i>et al.</i> , 2000).   |
| <i>Guatteria schomburgkiana</i> Mart . | Cascas                  | Atividade antimalárica <i>in vitro</i> (4µg/ml)                                | (MUÑOZ <i>et al.</i> , 2000).    |

No **Quadro 12**, estão descritos alguns alcaloides isoquinolínicos isolados da espécie *Guatteria* e suas respectivas atividades biológicas.

**Quadro 12** - Atividades Biológicas de Alcaloides Isoquinolínicos da espécie *Guatteria*

| <b>Alcaloide</b>               | <b>Atividade Biológica</b>                      | <b>Espécie</b>           | <b>Referências</b>                |
|--------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| Aterospermidina (O)            | Atividade citotóxica e tripanocida              | <i>G. friesiana</i>      | (COSTA <i>et al.</i> , 2013).     |
| (-)-3-Hidroxinornuciferina (A) | Tripanocida                                     | <i>G. latifolia</i>      | (LUCIO <i>et al.</i> , 2015).     |
| Isocoreximina (P)              | Atividade antifúngica                           | <i>G. blepharophylla</i> | (COSTA <i>et al.</i> , 2011).     |
| oxostefanina (O)               | Redução do índice mitótico das células tumorais | <i>G. calva</i>          | (RODRIGUEZ <i>et al.</i> , 1999). |
| Liriodenina (O)                | Citotóxica                                      | <i>G. friesiana</i>      | (COSTA <i>et al.</i> , 2013).     |

Legenda: (O) oxoaporfinico, (A) aporfinico, (P) protoberberínico.

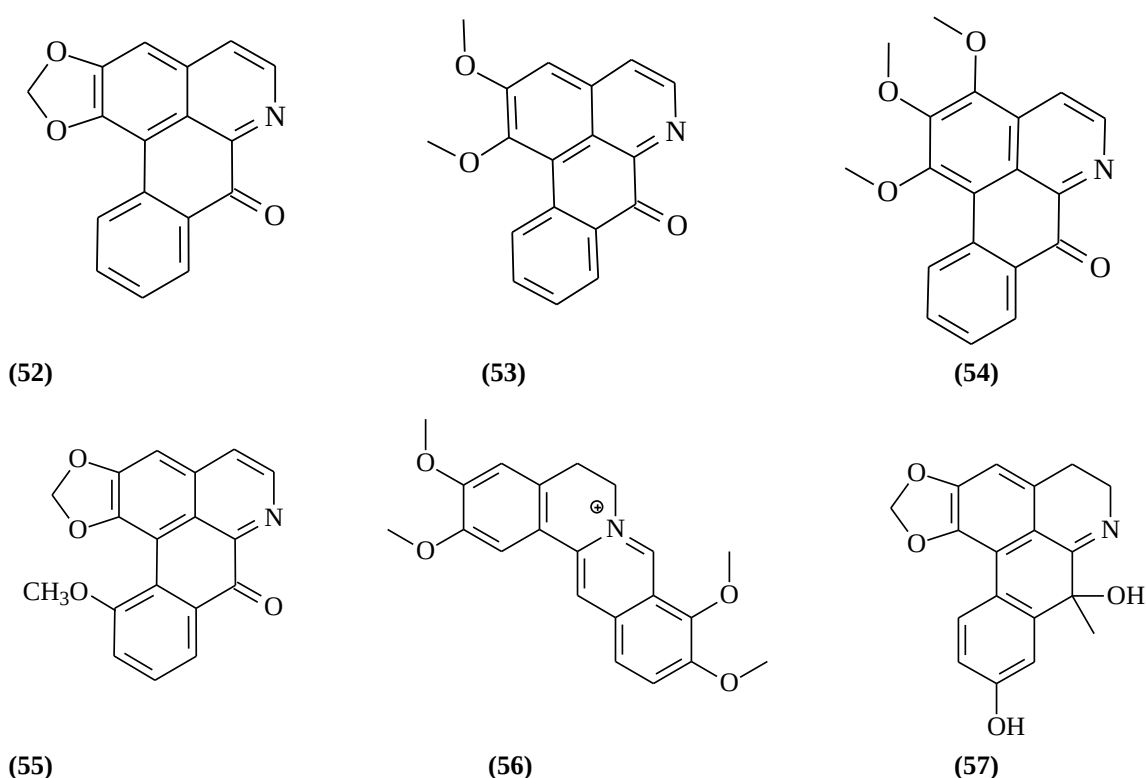
No levantamento feito na base de dados *Web of Science* utilizando as palavras *Guatteria*, alkaloid, dos resultados estão apresentados, alguns exemplos de alcaloides isoquinolínicos encontrados no gênero retirados de alguns artigos mais recentes (**Quadro 13**).

**Quadro 13** - Exemplos de alcaloides encontrados no gênero *Guatteria*

| Alcaloide                  | Tipo de esqueleto | Espécie                                                    | Referências                             |
|----------------------------|-------------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Guadiscina                 | oxoaporfínico     | <i>Guatteria friesiana</i> (W. A. Rodrigues) Erkens & Maas | (COSTA <i>et al.</i> , 2021).           |
| guadiscidina               | aporfinoide       | <i>Guatteria friesiana</i> (W. A. Rodrigues) Erkens & Maas | (COSTA <i>et al.</i> , 2021).           |
| Asimilobina                | aporfinico        | <i>Guatteria olivacea</i> R. E. Fries                      | (DE SOUZA ARAÚJO <i>et al.</i> , 2020). |
| Puterina                   | aporfinico        | <i>Guatteria olivacea</i> R. E. Fries                      | (DE SOUZA ARAÚJO <i>et al.</i> , 2020). |
| (+)-roemerina              | Aporfínico        | <i>Guatteria pogonopus</i> Mart.                           | (SANTOS <i>et al.</i> 2018).            |
| (+)-isocorydina            | aporfinico        | <i>Guatteria pogonopus</i> Mart.                           | (SANTOS <i>et al.</i> 2018)             |
| 3-hidroxi<br>nornuciferina | aporfinico        | <i>Guatteria ferrugínea</i> A.St.-Hil                      | (DOS SANTOS <i>et al.</i> , 2017).      |
| isomoschatolina            | oxoaporfinico     | <i>Guatteria ferrugínea</i> A.St.-Hil                      | (DOS SANTOS <i>et al.</i> , 2017).      |
| Liriodenina                | oxoaporfinico     | <i>Guatteria citriodora</i> Ducke                          | (RABELO <i>et al.</i> 2014).            |
| 3-metoxioxoputerina        | aporfinico        | <i>Guatteria citriodora</i> Ducke                          | (RABELO <i>et al.</i> 2014).            |

O estudo da *Guatteria citriodora* RABELO *et al.* (2014) levou ao isolamento de oito alcaloides pertencentes a quatro importantes tipos de derivados isoquinolínicos: liriodenina (**52**), lisicamina (**53**), O-metilmoschatolina (**54**), oxoputerina (**55**), palmatina (**56**), e guattescidina (**57**), evidenciando a diversidade estrutural característica do gênero *Guatteria*.

Para demonstrar a diversidade de alcaloides, na **Figura 18** estão dispostas estruturas de alcaloides isolado do estudo feito com a *Guatteria citriodora*.

**Figura 18** - Alcaloides isolados da espécie *Guatteria citriodora*

Os sesquiterpenos oxigenados, contendo 53,9% de espatulenol (**2**) como componente principal e também uma quantidade considerável de óxido de cariofileno (**1**) foram encontrados na *Guatteria elliptica* (RAJKA FERREIRA *et al.*, 2018). Estes dois sesquiterpenos oxigenados são comumente encontrados em **OEs** de *Guatteria*, geralmente em grandes quantidades. O espatulenol (**2**), como principal constituinte, foi identificado no óleo de *G. juruensis* 77,1% (MAIA *et al.*, 2005). O óxido de cariofileno (**1**) também foi encontrado em grandes quantidades nos **OEs** da espécie *Guatteria spp.*, e também na espécie *G. microcalyx* onde foi responsável por 44,2% da composição do óleo (MAIA *et al.*, 2005).

No estudo realizado por MEIRA *et al.* (2017) com a espécie *Guatteria friesiana* e *Guatteria pogonopus* os sesquiterpenos foram mais abundantes nos **OEs** investigados, compreendendo 93,0% e 88,4%, respectivamente. Os principais compostos identificados para o óleo essencial de *G. pogonopus* foram: espatulenol (**2**),  $\gamma$ -amorfeno (**10**) e para a espécie *G. friesiana* o  $\beta$ -eudesmol (**11**) e o  $\gamma$ -eudesmol (**12**).

No estudo realizado por SANTOS *et al.* (2017) os constituintes presentes para as espécies *G. australis*, *G. latifolia*, *G. ferruginea* e *G. sellowiana*, foram encontrados os sesquiterpenos oxigenados em maior concentração seguidos pelos monoterpenos oxigenados: O espatulenol (**2**) como constituinte majoritário de *G. australis* e o óxido



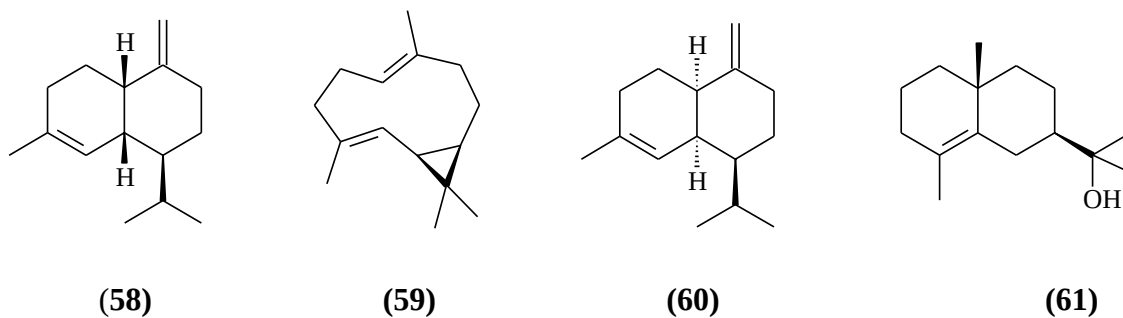
de cariofileno **(1)** o constituinte majoritário nas espécies *G. latifolia* (31,45%) e *G. ferruginea* (40,13%) e encontrado como um dos constituintes majoritários de *G. sellowiana* (13,36%).

No **Quadro 14 e Figura 19** são apresentados alguns constituintes químicos voláteis e atividades farmacológicas encontrados para algumas espécies do gênero *Guatteria*.

**Quadro 14** - Constituintes químicos voláteis e atividades biológicas de espécies do gênero *Guatteria*

| <i>Guatteria</i>                                    | Partes estudadas | Constituintes principais dos OEs analisados <sup>1</sup>                                                                                                           | Atividades biológicas                                                                     | Referências                     |
|-----------------------------------------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| <i>G. Megalophylla</i> Diels                        | Folhas           | Espatulenol( <b>2</b> )<br>$\gamma$ -muuroleno( <b>58</b> )<br>biciclogermacreno( <b>59</b> )<br>$\beta$ - elemeno ( <b>31</b> )<br>$\delta$ -elemeno( <b>30</b> ) | Potencial anti-leucemia                                                                   | (COSTA <i>et al.</i> ,2020).    |
| <i>G. blepharophylla</i> Mart.                      | Folhas           | óxido de cariofileno ( <b>1</b> )                                                                                                                                  | Capacidade de inibir a proliferação de células tumorais                                   | (FERRAZ <i>et al.</i> , 2014).  |
| <i>G. hispida</i> (R.E.Fr.) Erkens & Maas           | Folhas           | $\beta$ -pineno ( <b>45</b> )<br>$\alpha$ -pineno ( <b>44</b> )<br><i>E</i> -cariofileno ( <b>46</b> )                                                             | Capacidade de inibir a proliferação de células tumorais                                   | (FERRAZ <i>et al.</i> , 2014).  |
| <i>G. elliptica</i> R.E Fries                       | Folhas           | espatulenol( <b>2</b> )<br>óxido de cariofileno ( <b>1</b> )                                                                                                       | Atividade antitumoral contra células de câncer de mama e próstata                         | (RAJCA FERREIRA, 2016).         |
| <i>G. pogonopus</i> Mart.                           | Folhas           | Espatulenol ( <b>2</b> )<br>$\gamma$ -amorfenol ( <b>60</b> )                                                                                                      | Demonstraram potentes tripanocidas e antimaláricos                                        | (MEIRA <i>et al.</i> , 2017).   |
| <i>G. friesiana</i> (W. A. Rodrigues) Erkens & Maas | Folhas           | $\beta$ -eudesmol ( <b>48</b> )<br>$\gamma$ -eudesmol ( <b>61</b> )                                                                                                | Demonstraram potentes atividades tripanocidas e antimaláricos                             | (MEIRA <i>et al.</i> , 2017).   |
| <i>G. australis</i> A.St.-Hil.                      | Folhas           | germacreno B ( <b>32</b> )<br>germacreno D ( <b>33</b> )<br><i>E</i> -cariofileno ( <b>46</b> )<br>espatulenol( <b>2</b> )                                         | Atividades antiproliferativa, antileishmanial, antibacteriana, antifúngica e antioxidante | (SIQUEIRA <i>et al.</i> ,2015). |

**Figura 19** - Estruturas dos constituintes voláteis majoritários de espécies do gênero *Guatteria*



Após revisão da literatura constatou-se que há um maior número de estudos fitoquímicos de algumas espécies do gênero *Bocageopsis*, *Dugetia*, *Fusaea* e *Guatteria*, concentrados na identificação dos constituintes químicos voláteis e no isolamento de alcaloides, metabólitos secundários de grande importância farmacológica.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Contribuir para ampliação do conhecimento químico-farmacológico de espécies da família Annonaceae da região através da obtenção do perfil químico, bem como do potencial de atividades biológicas.

#### 3.2 Específicos

- a) Proceder à coleta e ratificação taxonômica das espécies *Bocageopsis multiflora*, *Duguetia quitarensis*, *Fusaea longifolia* e *Guatteria punctata*
- b) Identificar e quantificar os constituintes químicos voláteis dos **OEs** das folhas;
- c) Avaliar a atividade, *in vitro*, dos **OEs** frente às formas amastigotas e tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*;
- d) Avaliar a atividade antibacteriana, *in vitro*, dos **OEs** frente aos microrganismos Gram-negativos: *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Pseudomonas aeruginosa* e Gram-positivos: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenis* e *Staphylococcus* resistente à meticilina;
- e) Preparar os extratos brutos etanólicos (**EBFE**) e metanólicos (**EBFM**) das folhas de *B. multiflora*, *D. quitarensis*, *F. longifolia* e *G. punctata* e caracterizar as suas principais classes de metabólitos secundários por meio de análises químicas por via úmida (triagem fitoquímica);
- f) Avaliar o potencial antioxidante e o teor de fenóis totais dos **EBFE** e **EBFM**;
- g) Avaliar a atividade antibacteriana, *in vitro* dos **EBFE** e **EBFM** contra à *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. mutans*, *S. pyogenis* e *Staphylococcus* resistente à meticilina.
- h) Elucidar as substâncias presentes no extrato metanólico das folhas de *D. quitarensis* (**EMDq**) através de desreplicação utilizando técnicas espectrométricas ESI-MS;
- i) Elucidar as substâncias presentes no extrato metanólico das folhas de *G. punctata* (**EMGp**) por UHPLC-QTOF-MS.

## **4 MATERIAS E MÉTODOS**

### **4.1 Materiais**

#### **4.1.1 Equipamentos**

- Balança analítica (Shimadzu);
- Balanças analíticas (Mettler, modelos H6 e AE-50) ;
- Espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu 1800;
- Espectrômetro de massas ESI-MS, triplo quadrupolo, modelo TSQ Quantum Access (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA)
- Espectrômetro de massas UFLC-DAD (Shimadzu) acoplado a um espectrômetro de massas ESI-qtof microtof-Q III (Bruker Daltonics).
- Estufa (Fanem de secagem, modelo 315 SE);
- Liquidificador JBM 58 - Profissional - Copo Inox - Motor: 800 w;
- Manta aquecedora (Fisatom, modelo 52);
- Pipeta automática (P100, P1000, P5000);
- Rotaevaporador Fisatom 8 0 2 ;

#### **4.1.2 Solventes, reagentes e material cromatográfico**

- Ácido ascórbico (Sigma-Aldrich);
- Ácido gálico monohidratado (Fluka);
- Carbonato de sódio a 7 % (Merck);
- Clorofórmio deuterado – Sigma Aldrich
- DPPH 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (Sigma-Aldrich);
- Etanol (Neon);
- Hexano (Neon);
- Metanol (Neon);
- Reagente de Folin-Ciocalteu (Merck);
- Sílica coluna; sílica CCD; sephadex? etc.

#### **4.1.3 Material botânico**

As folhas de *B. multiflora* e *F. longifolia* foram coletadas em julho de 2018 na Floresta Nacional do Bom Futuro na cidade de Porto Velho/RO ([lat: -8.393611 long: -63.585833 WGS84] [lat: -9.454722 long: -64.390111 WGS84]) e uma amostra de cada espécie foi depositada no RON (herbário) da UNIR e registrada sob os números RON 11518 e RON 8392, respectivamente. As espécies foram identificadas pela botânica Ingrid Mendes da Silva.

As folhas de *D. quitarensis* foram coletadas em junho de 2018 às margens do Rio Jaci Paraná na cidade de Porto Velho/RO ([lat: -9.357778 long: -64.4125 WGS84]) e uma amostra está depositada no RON (herbário) da UNIR e registrada sob o número RON 648, identificada por Eduarda A. Dias.

As folhas de *G. punctata* foram coletadas em setembro de 2018 em um fragmento de mata às margens do campus da UNIR, BR 364 ([lat -8,8355739 WG-63,9376764]) e uma amostra foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Acre e registrada sob o número UFACPZ 20683. *D. quitarensis* e *G. punctata* foram depositadas e catalogadas pelas botânicas Eduarda A. Dias e Adriana Q. Lobão, respectivamente.

O material fresco foi limpo de impurezas e depois seco em temperatura ambiente durante três semanas. Posteriormente, o material foi moído usando um moinho de facas, tipo Croton.

#### 4.1.4 Extração dos OEs

O material botânico (30 g) foi moído, pesado e submetido à hidrodestilação, segundo a recomendação da Farmacopeia Brasileira (2010), utilizando extratores do tipo *Clevenger* modificado até esgotamento total do óleo essencial, sendo a extração realizada em triplicata para cada espécie. O óleo obtido foi seco com sulfato de sódio anidro, unidos e estocado no congelador da geladeira até a análise. O cálculo do rendimento foi realizado pela fórmula abaixo:

$$(\%) = 100 + \frac{n}{p} \quad (1)$$

Onde, n: é o volume do óleo essencial destilado em mL; P: massa, em gramas, da planta.

#### 4.1.5 Análise e determinação de OEs por CG-EM e CG-FID

As análises das composições químicas dos **OEs** foram realizadas no Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Foi empregado um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu GCMS-QP 2010 ULTRA, coluna capilar Rxi-1MS (apolar, 100% dimetil polisiloxano 30m x 0.25mm x 0.25  $\mu$ m – Restek). Hélio foi utilizado como gás de arraste com quociente de vazão de 3 mL/min. A temperatura programada foi de 50°C para 5 minutos aumentada em 3°C/min até 220°C. A temperatura do injetor foi de 220°C split (1:50) e a temperatura do detector MS (impacto eletrônico a 70 eV) a 230°C. O volume de injeção foi de 1  $\mu$ L.

Análises quantitativas dos constituintes químicos foram realizadas por cromatografia de alta resolução (CG) usando um cromatógrafo a gás HP7820 (Agilent) equipado com detector de ionização de chama (CG-FID), coluna capilar Rxi-1MS (apolar, 100% dimetil polisiloxano 30m x 0.25mm x 0.25 $\mu$ m - Restek). Hidrogênio foi utilizado como gás de arraste com quociente de vazão de 4 mL/min. A temperatura programada foi de 50°C para 5 minutos aumentada em 3°C/min até 220°C. A temperatura do injetor foi de 220°C split (1:50) e a temperatura do detector foi de 230°C. O volume de injeção foi de 1  $\mu$ L.

A quantificação de cada constituinte foi estimada por normalização da área (%). As concentrações dos compostos foram calculadas a partir da área do pico e eles foram organizados em ordem de eluição. Os componentes dos **OEs** foram identificados comparando seus espectros de massa com os espectros disponíveis no banco de dados do equipamento (NIST11). Além disso, a medida dos índices de retenção foi comparada aos da literatura (ADAMS, 2007).

Índices de retenção experimentais (RI) foram determinados usando a equação de Van den Dool e Kratz e um padrão da série homóloga de *n*-alcanos (C10 – C18) foram injetadas nas mesmas condições cromatográficas descritas acima.

#### 4.1.6 Preparo dos Extratos Brutos Etanólico (EBFE) e Metanólico (EBFM) das Folhas de *B. multiflora*, *D. quitarensis*, *F. longifolia* e *G. punctata*

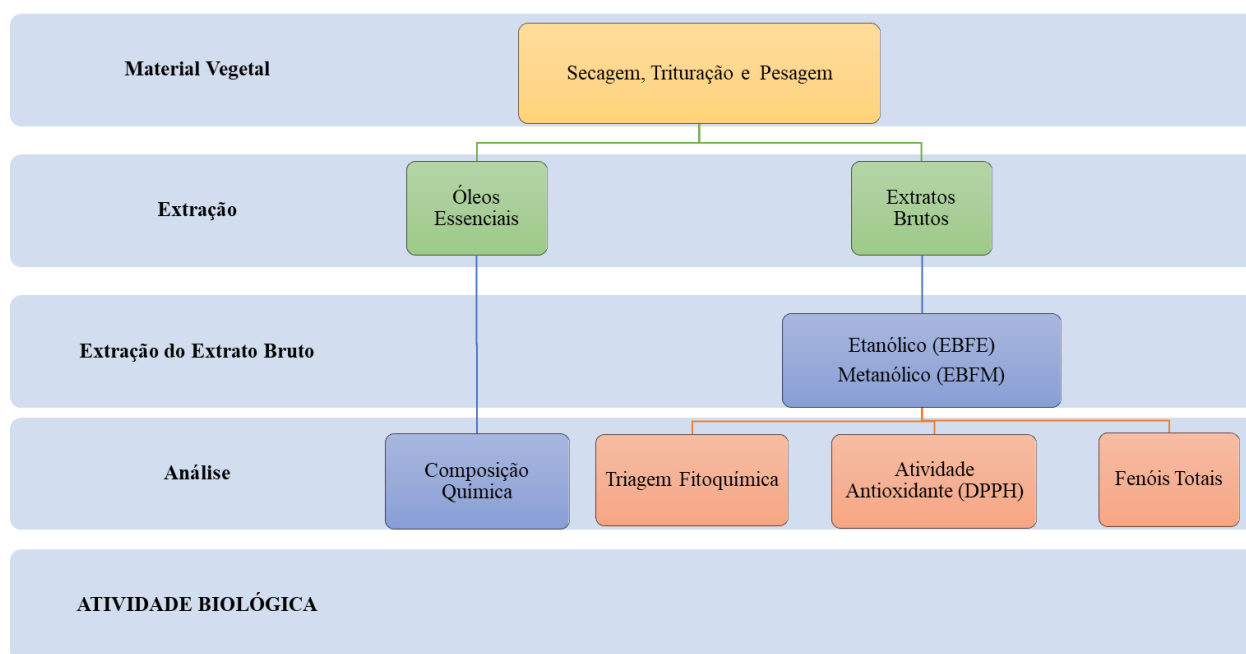
Os **EBFE** e **EBFM** das folhas de *B multiflora*, *D. quitarensis*, *F. longifolia* e *G. punctata* foram obtidos a partir de folhas secas e moídas, através de extração por maceração. O **Esquema 6** mostra as etapas realizadas para a primeira etapa do trabalho.

Após trituração de 200g do material vegetal, de cada espécie, este foi transferido para um recipiente apropriado onde se acrescentou hexano (1000 mL) até a completa submersão do material. Após três dias à temperatura ambiente, o material foi filtrado e evaporado em rotaevaporador até completa evaporação do solvente.

Ao resíduo foi adicionado etanol 96% (500 mL) ou metanol (500 mL). A extração em sete ciclos, onde a cada 24 hs a mistura foi filtrada, o solvente rotaevaporado e reintroduzido no macerador. Desta forma, foram obtidos os **EBFE** e **EBFM** das folhas de *B multiflora*, *D. quitarensis*, *F. longifolia* e *G. punctata*.

Após a obtenção dos extratos e evaporação do solvente, os mesmos eram deixados em capela para evaporação total dos solventes.

**Esquema 7** – Resumo da metodologia utilizada desenvolvimento da primeira etapa do trabalho.



**Fonte:** Elaborada pela autora

Cálculo rendimento dos extratos brutos obtidos

Calculou-se o rendimento total dos extratos, de acordo com a fórmula:

$$Re = \frac{P_{ext}}{P_{folhas}} \times 100 \quad (2)$$

Onde: Re = Rendimento total do extrato (%);

Pext = Peso do extrato seco (g);

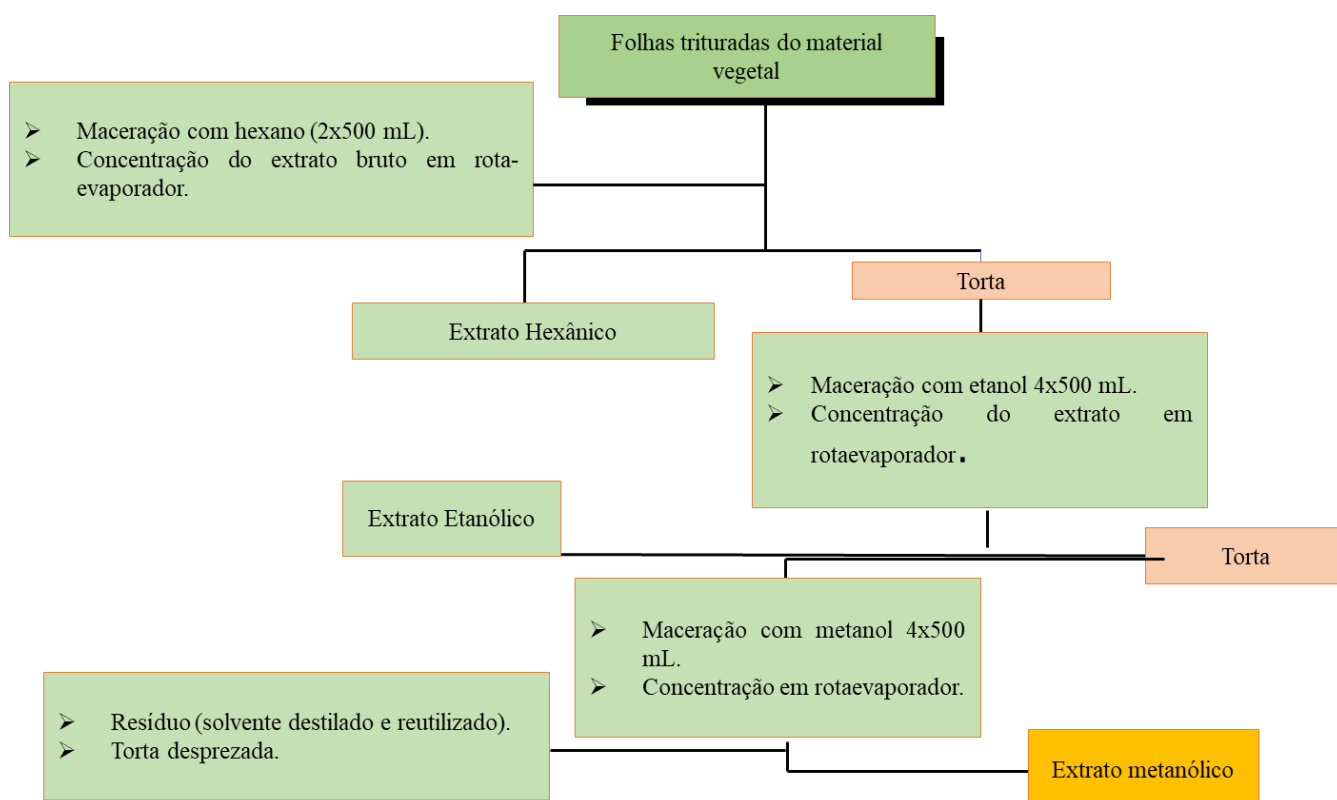
Pfolhas = Peso das folhas frescas ou secas (g).

#### 4.1.7 Obtenção dos EMDq e EMGp das folhas das espécies *D. quitarensis* e *G. punctata*

As folhas secas (200g) de *D. quitarensis* e *G. punctata* depois de trituradas foram submetidas à extração exaustiva por macerações, em temperatura ambiente, inicialmente com hexano (500 mL), seguido por etanol a 96% (500 mL) e finalmente com metanol (500 mL). Após filtração e remoção do solvente extrator, por destilação a pressão reduzida, e secagem em capela para a remoção do solvente residual, obtiveram-se os **EMDq** e **EMGp**.

Um esquema do trabalho desenvolvido para obtenção dos extratos pode ser observado no **Esquema 8**.

**Esquema 8** - Preparo dos Extratos Brutos: **EMDq** e **EMGp**



#### 4.1.8 Triagem fitoquímica



Os testes fitoquímicos foram realizados segundo metodologia proposta por BARBOSA *et al.* (2004). Os extratos obtidos foram submetidos aos testes de: fenóis, taninos, flavonoides e esteroides/triterpenoides. Todos os testes acima citados foram realizados em todos os extratos etanólicos (**EBFE**) e metanólicos (**EBFM**).

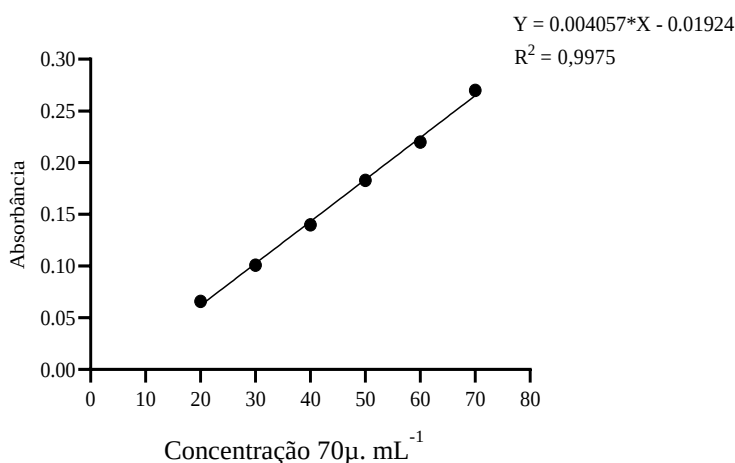
#### 4.1.9 Determinação dos fenólicos totais

A determinação do teor de fenóis totais presentes nas amostras dos extratos etanólicos (**EBFE**) e metanólicos (**EBFM**) das espécies estudadas foi realizada por espectroscopia na região visível através do método de Folin-Ciocalteu conforme descrito por SANTI *et al.* (2014). Os extratos brutos foram diluídos em etanol para obter soluções com concentrações de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A uma alíquota de 0,1 mL de cada solução foram adicionados 7,0 mL de água, 0,8 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (1:3 de água) e 1,2 mL de solução aquosa de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 20%. Após 2 horas, as absorbâncias das amostras foram medidas a 760 nm.

Para tanto, é necessário realizar uma curva de calibração com o padrão ácido gálico a fim de interpolar os valores de absorbância das amostras a partir da equação de regressão linear gerada pela curva de calibração, possibilitando calcular o teor de fenóis totais em mg equivalente de ácido gálico (EAG)/g de amostra. Para gerar a curva utilizaram-se as concentrações de 20, 30, 40, 50, 60 e 70  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os valores dos teores de fenóis totais foram expressos em termos de equivalente de ácido gálico (mg EAG/g de extrato bruto).

A equação obtida foi  $y = 0,004057 - 0,01924$ ;  $R^2 = 0,9975$ ) e o conteúdo total de constituintes fenólicos dos extratos alcoólicos usando o reagente de Folin-Ciocalteu foi expresso em termos de equivalente de ácido gálico /g de extrato vegetal (**Figura 20**).

**Figura 20** - Gráfico da Curva de calibração do Ácido Gálico



#### 4.1.10 Análises por Espectrometria de massa (infusão direta) do **EMDq**

As análises exploratórias foram utilizando a espectrometria de massas com a ionização por *eletrospray* (ESI-MS) para inferir sobre a composição química dessas espécies. As análises foram realizadas no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) pelo Dr. Felipe Moura Araújo da Silva.

O **EMDq** foi ressuspensão em metanol (grau HPLC), criando soluções estoque ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). As soluções estoque foram posteriormente diluídas para  $5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  e analisadas por infusão direta no espectrômetro de massa. Um espectrômetro de massa triplo quadrupolo, modelo TSQ Quantum Access (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) com interface de ionização por *electrospray* (ESI) e funcionando no modo positivo e negativo foi usado para realizar análises ESI-MS e ESI-MS / MS. Condições analíticas MS: voltagem de pulverização, 5 kV; gás de bainha, 10 unidades arbitrárias (arb); gás auxiliar, 5 arb; gás de varredura, 0 arb; temperatura capilar  $200^\circ \text{C}$ ; tensão capilar, 40 V; lente tubular, 115 V; faixa de massa,  $m/z$  100 a 1000. Sendo o argônio usado como gás de colisão, e os espectros ESI-MS / MS foram obtidos usando energias de colisão variando de 25 a 30 eV.

#### 4.1.11 Análises do **EMGp** por UHPLC-qTOF-MS/MS

O perfil químico do extrato foi analisado utilizando o cromatógrafo a líquido do modelo *Nexera 2 da Shimadzu* e o espectrômetro de massa com analisador de massa híbrido: quadrupolo e tempo de voo da *Bruker Daltonics*, modelo *Impact II*, equipado com fonte de ionização: ESI (Ionização por *eletrospray*), disponível no Laboratório de Técnicas Cromatográficas acopladas a espectrometria de massa do IQ – UFRGS. A separação dos compostos foi feita em uma coluna cromatográfica Kinetex C-18. A fase móvel utilizada foi água ultrapura (A) e acetonitrila (JTBaker®) acidificada [0.1% ácido fórmico (v/v)] (B). O gradiente de eluição será de 0–27 min de 5-95% (B); 27-28min 95-5% (B); 28–30 min 5% (B). O fluxo foi de  $0.3 \text{ mL.min}^{-1}$ , a temperatura do forno em  $40^\circ \text{C}$  e o volume de injeção da amostra de  $1 \text{ }\mu\text{L}$ , com o espectrômetro de massas operando no modo positivo e negativo ( $m/z$  120–1200). Os solventes utilizados foram todos, grau HPLC com pureza (99,9%) e água ultrapura.

## 4.2 Ensaios Biológicos

### 4.2.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Os ensaios de atividade antioxidante dos extratos brutos etanólico (**EBFE**) e metanólico (**EBFM**) das espécies vegetais *B. multiflora*, *D. quitarensis*, *F. longifolia* e *G. punctata* foram avaliados através do método do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) conforme descrito por TORRES *et al.* (2018).

As soluções estoques foram preparadas dos extratos e do padrão ácido ascórbico na concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup>. A partir dessas soluções foram realizadas diluições nas concentrações finais de 1, 3, 9, 27, 81 e 243 µg.mL<sup>-1</sup> em etanol absoluto. Uma solução do radical DPPH foi preparada em etanol, na concentração de 50 µg.mL<sup>-1</sup>. Em seguida, foi adicionado 1 mL desta solução a 2,5 mL de cada uma das diluições dos extratos. A mistura reacional foi mantida em repouso a temperatura ambiente e ao abrigo de luz durante 30 minutos e, posteriormente, foram realizadas as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro em 518 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em percentual de atividade antioxidante através da equação 3:

$$AA(\%) = 100 \frac{(\Delta Abs \times 100)}{Abs_{controle}} \quad (2)$$

Onde:

$\Delta Abs$  é a diferença entre as absorbâncias da amostra e do branco e  $Abs_{controle}$  representa a absorbância do controle negativo (1 mL da solução de DPPH + 2,5 mL de etanol absoluto).

Como branco foram utilizadas soluções de etanol (1 mL) com as amostras (2,5 mL). As medidas foram realizadas em triplicatas.

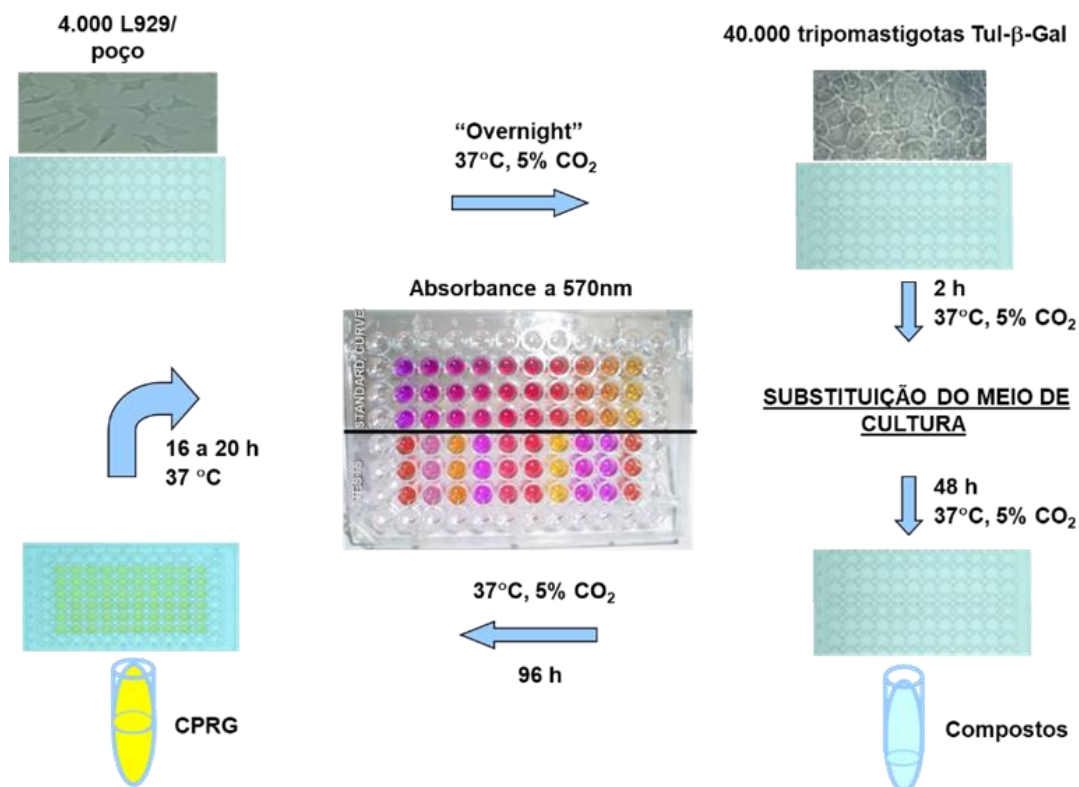
### 4.2.2 Avaliação da atividade *anti-Trypanosoma cruzi in vitro* dos OEs contra formas Amastigotas e Tripomastigotas.

Os experimentos *in vitro* foram realizados no Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular de Belo Horizonte-MG, sob supervisão do pesquisador Dr. Policarpo Ademar Sales Júnior e pela pesquisadora Profa. Dra. Silvana Maria Fonseca Murta.

A atividade *in vitro*, anti-*T. cruzi* foi realizada utilizando-se o ensaio da beta-galactosidase desenvolvido por BUCKNER *et al.* (1996), com modificações ROMANHA *et al.* (2010) como mostrado no **Esquema 8**.

**Esquema 9** - Para avaliação da atividade anti *T. cruzi*

## Ensaio da $\beta$ -Galactosidase



Este ensaio utilizou a cepa Tulahuen de *T. cruzi* que expressa o gene da beta-galactosidase de *E. coli*. Resumidamente, para a realização dos ensaios, fibroblastos de camundongos da linhagem L929, célula hospedeira; foram semeados em placas de 96 poços e incubados por 24 horas a 37°C para a adesão e, infecção com 10 parasitas/célula. Após 2 horas, o meio contendo os parasitas extracelulares foi substituído por meio novo e a placa novamente incubada a 37°C por 48 horas. Após esse período o meio de cultura foi substituído por meio novo, além dos **OEs** em concentrações decrescentes, (5; 2,5; 1,25; 0,62; 0,31; 0,15; 0,078  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Após 96 horas de incubação, foi adicionado o composto galactopiranosídeo vermelho  $\beta$  - D - clorofenol (CPRG) substrato da beta -galactosidase, à placa incubada a 37°C, e a leitura realizada após 16-20 h em espectrofotômetro utilizando um filtro de 570 nm. O benzonidazol foi utilizado como controle positivo. Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição do crescimento parasitário.

#### 4.2.3 Ensaio de Citotoxicidade sobre células L929 de vertebrado com os OEs

Os **OEs** ativos contra o *T. cruzi* foram testados sobre as células L929 para determinação da citotoxicidade (ROMANHA *et al.*, 2010). A viabilidade das células submetidas aos tratamentos foi determinada utilizando-se o indicador de viabilidade celular alamar Blue TM. As amostras foram testadas em concentrações crescentes a partir da  $CI_{50}$  encontrada sobre o parasita; as seguintes condições foram idênticas às utilizadas no ensaio da beta-galactosidase: número de células, tempo de desenvolvimento celular e tempo de exposição aos **OEs**. Após a adição do alamar Blue TM, a placa foi incubada em um intervalo de 4 a 6 horas e a leitura foi realizada a 570 e 600 nm. Os resultados foram expressos como a diferença na porcentagem de redução entre células tratadas (CT) e células não tratadas (CNT), através da seguinte equação 4:

$$\frac{(117.216)(Abs_{570} CT) - (80.586)(Abs_{600} CT) \times 100}{(117.216)(Abs_{570} CNT) - (80.586)(Abs_{600} CNT)} \quad (3)$$

Onde:

células tratadas (CT);

células não tratadas (CNT).

#### 4.2.4 Índice de Seletividade

A partir da análise da citotoxicidade dos diferentes **OEs** sobre as células L929 foi determinado o índice de seletividade (IS), o qual indica o quanto cada óleo é tóxico para estas formas em relação às células de mamíferos. O IS foi calculado dividindo o  $CI_{50}$  do **OE** sobre as células L929 pelo  $CI_{50}$  encontrado sobre *T. Cruzii*.

#### 4.2.5 Ensaio da Atividade antibacteriana dos OEs através da Concentração Inibitória Mínima pelo Método de Microdiluição em caldo contra microrganismos

Os **OEs** foram avaliados frente às linhagens bacterianas pertencentes à bacterioteca da Plataforma de Bioensaios Biotecnológicos (RPT11H), do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) – Fiocruz, Manaus/AM, Brasil. Para os ensaios foram utilizados cepas *Gram*-negativas: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC – CDC-EDL933-171-0157:H3) e *P. aeruginosa* (ATCC 29336) e *Gram*-positivas: *S. mutans* (ATCC

25175), *S. pyogenis* (ATCC 19615) e *S. resistente à meticilina* (MRSA) (ATCC 33591). Para a avaliação da atividade antibacteriana dos **OEs** foram preparadas soluções estoque onde 150 µL da amostra a ser analisada foram solubilizadas em 50 µL de dimetilsulfóxido 100%. Ao orifício foi adicionado 40 µL desta solução estoque.

A determinação da atividade antibacteriana foi realizada pelo método de difusão, pela técnica do poço, segundo GROVE e RANDALL (1955), com modificações. Utilizou-se o meio de cultura Ágar Müeller Hinton (AMH) (Himedia, Mumbai, Índia) para a realização dos testes. Como controle positivo foram utilizadas as drogas TIENAM (imipenem + cilastatina sódica) na concentração de 500 µg/mL devido a excelente atividade apresentada contra as cepas de MRSA (SA *et al.*, 2014).

As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, e então foi adicionada, às placas, 10 mL de uma solução corante de cloreto de trifetil tetrazólio (CTT) a 0,01% acrescido de 0,1% de ágar bacteriológico, ocorrendo uma reincubação por 30 minutos. Após a conversão de coloração na sobrecamada foi feita a medição dos halos de inibição. A atividade antibacteriana foi avaliada medindo o diâmetro da zona de inibição em milímetros.

#### 4.2.6 Ensaio da atividade antibacteriana pelo método de difusão em Ágar – técnica do poço

Os ensaios de atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar foram realizados frente às bactérias *Gram*-negativas: *E. coli* enterohemorrágica – EHEC (CDC-EDL 933-171-0157:H3), *P. aeruginosa* (ATCC CDC-EDL 1284), *S. entérica subsp. Typhimurium* (ATCC 13311-084) e *Gram*-positivas: *S. aureus* (ATCC 80958) e *S. sumulans* (ATCC 27851).

As linhagens bacterianas utilizadas foram da bacterioteca da Plataforma de Bioensaios Biotecnológicos (RPT11H), do Instituto Leônidas Marques e Maria Deana (ILMD) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Manaus, AM, Brasil. Os **EBEBM**, **EBMBM**, **EBEDQ**, **EBMDQ**, **EBEFL**, **EBMFL**, **EBEGP** e **EBMGP** foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) 10% e a concentração inicial da amostra foi de 5 mg/mL no poço. As linhagens foram cultivadas previamente em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (HIMEDIA). As culturas microbianas foram, então, diluídas em meio de cultura conforme a escala de 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL).

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A determinação da atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar, pela técnica do poço, foi realizada conforme descrito por GROVE e RANDALL (1955), com modificações. Foi utilizado o meio de cultura Ágar Müeller Hinton (AMH)(HIMEDIA) para a realização dos testes. Como controles positivos foram utilizadas as drogas TIENAM (imipenem + cilastatina sódica) na concentração de 500 µg/mL. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, e então foi adicionado às placas uma solução corante de cloreto de trifetil tetrazólio (CTT) a 0,01% acrescido de 0,1% de ágar bacteriológico, ocorrendo uma reincubação por 30 minutos. Após a conversão de colaração na sobrecamada foi feita a medição dos halos de inibição.

#### 4.2.7 Ensaio da atividade antibacteriana pelo método de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios de atividade antibacteriana pelo método de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram realizados para as mesmas amostras e linhagens microbianas testadas no método de difusão em ágar. As amostras foram inicialmente solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) em solução aquosa a 10%, sendo que a concentração final nos poços foi de 2,5%. Oito concentrações foram avaliadas que variaram de 5 µg/mL a 0,039 µg/mL no poço.

As linhagens foram cultivadas previamente em caldo Brain Heart Infusion (BHI)(HIMEDIA). As culturas microbianas foram diluídas em meio de cultura conforme a escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL).

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os valores de CMI foram determinados utilizando o método de microdiluição em placa de 96 poços, de acordo com CLSI - Manual (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2012), com modificações. Cada orifício recebeu o inóculo bacteriano padronizado, as quais foram avaliadas em concentrações que variaram de 5 µg/mL a 0,039 µg/mL. Em seguida foram acrescidos 50 µL de Müeller Hinton Brother (MH)(HIMEDIA) em todos os 96 orifícios, sendo que nos primeiros orifícios, foram adicionados mais 50 µL do extrato, completando um volume de 100 µL, em seguida foi feita uma diluição 1:2, após foi retirado e descartado 50 µL.

Para completar um volume final de 100 µl/poço foi adicionado 20 µL de inóculo bacteriano, 30 µL de MH e, em seguida, as placas foram incubadas a 37° C por 24

horas, após foi adicionado 10 µL de resazurina a 0,01% e reincubada por 2 horas. Como controle negativo foi utilizado como solução aquosa o DMSO a 2,5% e o inoculo bacteriano foi utilizado como controle positivo. A droga controle TIENAM (imipenem + cilastatina sódica) foi testada nas mesmas concentrações das amostras teste. Em seguida as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A CIM foi definida como a menor concentração das amostras capaz de inibir o crescimento bacteriano indicado pela permanência da coloração azul da resazurina.

### 4.3 Análises Estatísticas

Através do teste *t* de Student para as atividades antioxidantes foi verificado que os experimentos realizados com cada extrato são, estatisticamente, equivalentes. A eficiência antiradicalar foi estabelecida utilizando a análise de regressão não linear no intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ) e os resultados foram expressos através do valor de  $CE_{50}$ , que representa a concentração da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais de DPPH. Para o teor de fenólicos totais foi utilizado ANOVA e as comparações múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%. Todas as análises estatísticas e a determinação dos valores de  $CE_{50}$  foram realizadas no software GraphPad Prism versão 8<sup>®</sup>. Enquanto que no ensaio da atividade anti-*Trypanosomacruzi in vitro* foi usado o teste ANOVA Tukey– sendo utilizado o teste de comparações múltiplas de Kramer para comparar o CI50 de OEs sobre o parasita.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudo químico das folhas de *B. multiflora*, *D. quitarenses*, *F. longifolia* e *G. punctata*

#### 5.1.1. Constituintes voláteis

Os **OEs** de *B. multiflora*, *D. quitarenses*, *F. longifolia* e *G. punctata* foram extraídos por hidrodestilação, tendo apresentado, respectivamente, os seguintes rendimentos: 0,12; 0,11; 0,18; 0,39%.

Há dificuldade em relatar o que ocorre no metabolismo vegetal em condições de campo, visto que não podemos controlar as inúmeras interações entre um organismo e seu ambiente. Segundo SCHINDLER *et al.* (2018), muitos fatores exercem influência tanto no rendimento, quanto na variabilidade da composição química dos **OEs**, como fatores ambientais, edáficos e climáticos, poluição atmosférica, bem como aqueles inerentes à própria planta, como ciclo vegetativo, idade e órgão vegetal.

Os **OEs** apresentaram coloração amarelada e odor característico e, após análise por CG-EM, levaram à identificação de 87 terpenoides, conforme a **Tabela 1**. Neste estudo foram identificados 23 constituintes para a espécie *B. multiflora*, 20 constituintes para a espécie *D. quitarensis*, 21 constituintes para a espécie *F. longifolia* e 23 constituintes para a espécie *G. punctata*, correspondendo a 79,3 – 97,3% da composição química dos **OEs**.

Embora haja diferenças qualitativas e quantitativas, os **OEs** das quatro espécies apresentaram em suas composições os compostos 4-heptanol (0,1 – 33,8%), pentanoato de etila (0,4 – 3,9%),  $\alpha$ -copaeno (0,9 -5,3%),  $\beta$ -elemeno (1,0 – 2,2%), (*E*)-cariofileno (0,4 -14,4%),  $\beta$ -selineno (0,4 – 19,3%),  $\alpha$ -selineno (1,3 -2,5%),  $\delta$ -cadineno (1,0 – 4,8%) e germacreno B (0,9 – 4,5%).

**Tabela 1** - Composição química dos óleos essenciais das folhas de *B. multiflora*, *D. quitarensis*, *F. longifolia* e *G. punctata* por CG-EM.

| Constituintes                                | RI <sup>a</sup> | RI <sup>b</sup> | <i>B.<br/>multiflora</i><br>[%] | <i>D.<br/>quitarensis</i><br>[%] | <i>F.<br/>longifolia</i><br>[%] | <i>G. punctata</i><br>[%] |
|----------------------------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| 4-Heptanol                                   | 888             | 889             | 0.2                             | 33.8                             | 0.1                             | 1.1                       |
| Etil-pentanoato                              | 900             | 901             | 3.9                             | 0.6                              | 0.7                             | 0.4                       |
| $\alpha$ -Thujeno                            | 928             | 930             | -                               | 18.4                             | 0.1                             | -                         |
| $\alpha$ -Pineno                             | 929             | 939             | -                               | -                                | -                               | 0.6                       |
| $\alpha$ -Fencheno                           | 947             | 952             | -                               | 0.8                              | -                               | -                         |
| Canfeno                                      | 949             | 954             | -                               | 0.7                              | -                               | -                         |
| $\beta$ -Pineno                              | 985             | 979             | -                               | 1.3                              | -                               | -                         |
| 6-Metil-5-hepten-<br>2-ano                   | 987             | 985             | 0.4                             | -                                | -                               | 1.3                       |
| <i>trans</i> -<br>óxidodihidroxi<br>Linalool | 989             | 993             | -                               | 2.5                              | -                               | -                         |
| <i>cis</i> -óxido linalool<br>(furanoide)    | 1074            | 1072            | 33.1                            | -                                | -                               | -                         |
| $\alpha$ -óxido pineno                       | 1098            | 1099            | 2.8                             | -                                | -                               | -                         |
| $\delta$ -Elemeno                            | 1339            | 1338            | 0.4                             | -                                | -                               | 0.5                       |
| $\alpha$ -Cubebeno                           | 1352            | 1348            | -                               | 0.6                              | 1.0                             | 0.7                       |
| dihidro-Eugenol                              | 1368            | 1369            | 0.6                             | -                                | -                               | -                         |
| $\alpha$ -Copaeno                            | 1373            | 1376            | 0.9                             | 5.3                              | 1.1                             | 2.6                       |
| $\beta$ -Patchouleno                         | 1377            | 1381            | 1.9                             | -                                | -                               | -                         |
| $\beta$ -Bourboneno                          | 1383            | 1388            | -                               | -                                | -                               | 0.7                       |
| $\beta$ -Elemeno                             | 1392            | 1390            | 1.2                             | 1.7                              | 2.2                             | 1.0                       |
| $\alpha$ -Gurjuneno                          | 1410            | 1409            | -                               | -                                | -                               | 1.2                       |
| ( <i>E</i> )-Cariofileno                     | 1416            | 1419            | 0.6                             | 14.4                             | 7.1                             | <b>8.4</b>                |

Continuação da Tabela 1-Composição química dos óleos essenciais das folhas de *B. multiflora*, *D. quitarensis*, *F. longifolia* e *G. punctata* por CG-EM.

|                                                |      |      |      |     |      |      |
|------------------------------------------------|------|------|------|-----|------|------|
| $\alpha$ -Humuleno                             | 1448 | 1454 | -    | 1.7 | 3.1  | 1.7  |
| <i>E</i> - $\beta$ -Farneseno                  | 1454 | 1456 | -    | -   | 1.8  | 1.6  |
| <i>allo</i> -<br>Aromadendreno                 | 1460 | 1460 | -    | -   | 1.1  | -    |
| <i>D</i> - Germacreno                          | 1474 | 1485 | -    | 6.3 | 1.4  | 19.8 |
| <i>cis</i> -Eudesma-6,11-<br>dieno             | 1475 | 1489 | -    | -   | 3.0  | -    |
| $\beta$ -Selineno                              | 1478 | 1490 | 0.8  | 0.4 | 19.3 | 1.8  |
| $\alpha$ -Vetispireno                          | 1482 | 1490 | -    | 0.3 | 3.9  | -    |
| $\delta$ -Selineno                             | 1488 | 1492 | 1.3  | -   | -    | -    |
| <i>cis</i> - $\beta$ -Guaieno                  | 1489 | 1493 | -    | 3.9 | 18.3 | 5.5  |
| Valenceno                                      | 1494 | 1496 | -    | -   | 1.8  | -    |
| $\alpha$ -Selineno                             | 1495 | 1498 | 2.5  | 1.3 | 2.3  | 2.0  |
| $\beta$ -Bisaboleno                            | 1506 | 1505 | 2.2  | -   | -    | -    |
| ( <i>Z</i> )- $\alpha$ -Bisaboleno             | 1509 | 1507 | -    | -   | 12.0 | -    |
| $\delta$ -Cadinene                             | 1516 | 1523 | 4.5  | 1.0 | 3.4  | 4.8  |
| ( <i>Z</i> )-Nerolidol                         | 1526 | 1532 | 1.5  | -   | -    | -    |
| 10- <i>epi</i> -Cubebol                        | 1528 | 1535 | 0.8  | -   | -    | -    |
| Hedycaryol                                     | 1543 | 1548 | -    | -   | -    | 1.8  |
| <i>B</i> - Germacreno                          | 1559 | 1561 | 2.1  | 0.9 | 2.8  | 4.5  |
| ( <i>E</i> )-Nerolidol                         | 1569 | 1563 | -    | -   | -    | 9.9  |
| Spathulenol                                    | 1576 | 1578 | -    | 1.4 | 2.0  | 4.7  |
| Óxido Cariofileno                              | 1587 | 1583 | -    | -   | -    | 2.7  |
| 1- <i>epi</i> -Cubenol                         | 1632 | 1628 | 16.6 | -   | -    | -    |
| Caryophylla-4(12),<br>8(13)-dien-5 $\beta$ -ol | 1640 | 1640 | 3.9  | -   | -    | -    |
| $\alpha$ -Cadinol                              | 1653 | 1654 | 1.1  | -   | -    | -    |

Continuação da Tabela 1-Composição química dos óleos essenciais das folhas de *B. multiflora*, *D. quitarensis*, *F. longifolia* e *G. punctata* por CG-EM.

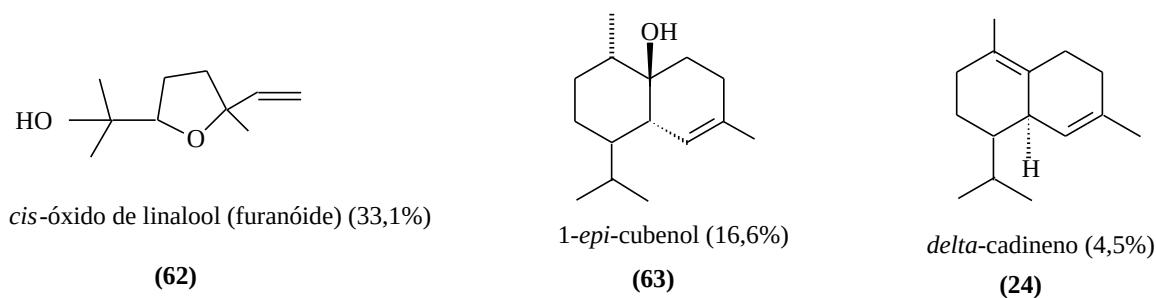
|                            |             |             |             |             |
|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Hidrocarbonetos oxigenados | 4.5         | 34.4        | 0.8         | 2.8         |
| Monoterpenos               | -           | 21.2        | 0.1         | 0.6         |
| Monoterpenos Oxigenados    | 36.5        | 2.5         | -           | -           |
| Sesquiterpenos             | 22.7        | 37.8        | 85.6        | 56.8        |
| Sesquiterpenos Oxigenados  | 23.9        | 1.4         | 2.0         | 19.1        |
| <b>Total identificados</b> | <b>87.6</b> | <b>97.3</b> | <b>88.5</b> | <b>79.3</b> |

<sup>a</sup> Índice de Retenção na Coluna Rxi-1MS; <sup>b</sup> Índice de Retenção na Coluna de acordo com Adams (2007)

#### 5.1.1.1 *Bocageopsis multiflora*

Para a *B. multiflora* verificaram-se 23 constituintes, sendo os monoterpenos oxigenados a classe majoritária presente na espécie, dentre os quais destacam-se o óxido *cis*-linalool (furanoide) (33,1%) (**62**), o 1-*epi*-cubenol (16,6%) (**63**) e o  $\delta$ -cadineno (4,5%) (**20**) (**Figura 21**). De acordo com o estudo realizado por OLIVEIRA *et al.* (2014) o  $\beta$ -bisaboleno (13,2%) (**16**) foi encontrado como constituinte majoritário quando a planta foi coletada na estação chuvosa, enquanto o espatulenol (16,2%) (**2**) foi o majoritário quando coletada na estação seca.

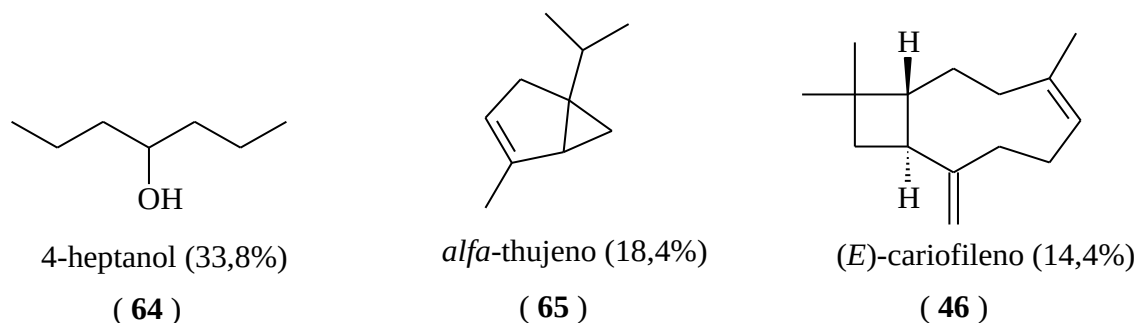
Estes mesmos constituintes foram identificados como constituintes majoritários no estudo de *B. multiflora* descrito por (ALCÂNTARA *et al.*, 2017). No presente estudo, a presença de  $\beta$ -bisaboleno (2,2%) e a ausência de espatulenol foram observadas, e essas diferenças podem estar relacionadas a fatores abióticos como temperatura, luminosidade, sazonalidade, estágio de desenvolvimento da planta, estação de coleta, hidratação e nutrição dentre outros fatores.

**Figura 21** - Constituintes voláteis majoritários do OE de *B. multiflora*

#### 5.1.1.2 *Duguetia quitarensis*

Para o OE *D. quitarensis* foram identificados 20 constituintes, sendo a predominância dos sesquiterpenos. Para essa espécie não foram encontrados na literatura, até o momento, estudos relacionados à composição química de constituintes voláteis e fixos, sendo reportado neste trabalho pela primeira vez.

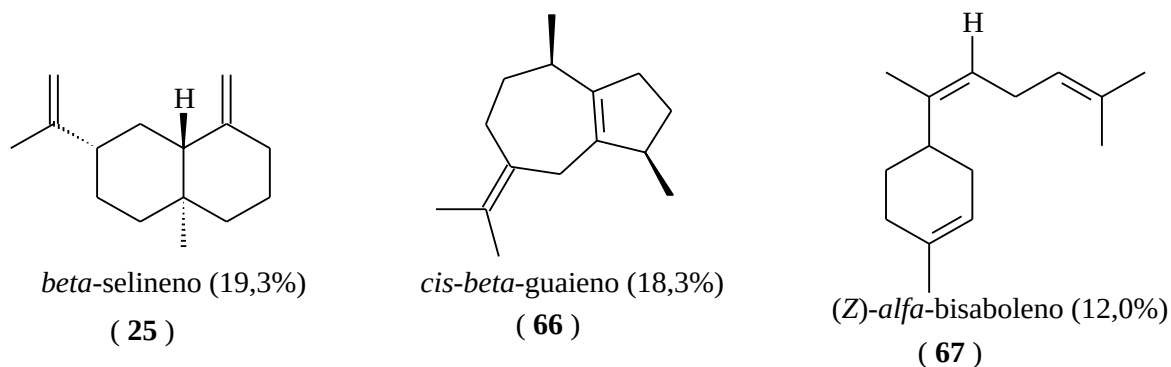
Os constituintes majoritários encontrados nesse trabalho foram o 4-heptanol **(64)** (33,8%),  $\alpha$ -tujeno (18,4%) **(65)** e (*E*)-cariofileno (14,4%) **(46)** (**Figura 22**).

**Figura 22** - Constituintes voláteis majoritários do OE de *D. quitarensis*

#### 5.1.1.3 *Fusaea longifolia*

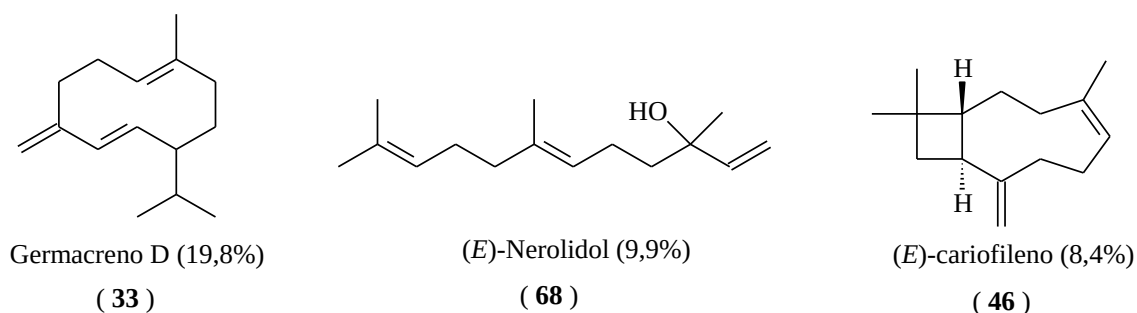
O OE de *F. longifolia*, apresentou 21 compostos, com a predominância dos sesquiterpenos, onde os principais constituintes foram  $\beta$ -selineno (19,3%) **(25)**, *cis*- $\beta$ -guaiano (18,3%) **(66)** e (*Z*)- $\alpha$ -bisaboleno (12,0%) **(67)** (**Figura 22**).

Um estudo prévio realizado por TAVARES *et al.* (2005) em que foram investigados os constituintes voláteis isolados do caule de *F. longifolia* relata que os principais constituintes desta espécie foram o  $\alpha$ -cadinol (12,5%) **(29)** e o espatulenol (12,0%) **(2)**, no entanto, somente o espatulenol foi identificado no nosso estudo. A diferença nos constituintes encontrados pode ser pelo fato que para o estudo de Tavares foi com caules finos, enquanto nesse estudo foi obtido das folhas da *F. longifolia*.

**Figura 22**-Constituintes voláteis majoritários do OE de *F. longifolia*

#### 5.1.1.4 *Guatteria punctata*

Os sesquiterpenos constituem o grupo predominante em *G. punctata*. Para a espécie não foi encontrado na literatura, até o momento, estudo relacionado à composição química de constituintes voláteis e fixos, sendo reportado neste trabalho pela primeira vez. Os constituintes majoritários para *G. punctata* foram germacreno D (19,8%) (**33**), (*E*)-nerolidol (9,9%) (**68**) e (*E*)-cariofileno (8,4%) (**46**) (**Figura 23**).

**Figura 23** - Constituintes voláteis majoritários do OE de *G. punctata*

A presença do sesquiterpeno (*E*)-cariofileno pôde ser observada no estudo prévio de *B. multiflora*, assim como nas folhas de *Duguetia furfuraceae*, *Duguetia gardneriana* e *Duguetia moricandiana* e nas folhas de *G. ferruginea* e *Guatteria pogonopus* DA SILVA ALMEIDA *et al.* (2010); FONTES *et al.* (2013); OLIVEIRA *et al.* (2014); SANTOS, 2014; VALTER *et al.* (2008), assim como em outros gêneros da família Annonaceae, por exemplo, nas folhas, galhos e caules de *Onychopetalum amazonicum*, *Annona squamosa* e nas folhas de *Xylopia frutescens* (FERRAZ *et al.*, 2013, DA SILVA *et al.*, 2013, VERMA RS *et al.*, 2016). A presença do composto (*E*)-cariofileno nas quatro espécies estudadas e, em outros gêneros desta família, sugere que este composto poderia ser considerado um marcador quimiotaxonômico da família Annonaceae.

### 5.1.2 Constituintes fixos

Os extratos brutos etanólico e metanólico das folhas de *B. multiflora*, *D. quitarensis*, *F. longifolia* e *G. punctata* foram preparados por processo de maceração à t.a., obtendo-se, respectivamente, os seguintes rendimentos: **EBFEBM** (12,5%); **EBFMBM** (11,5%); **EBFEDQ** (12%); **EBFMDQ** (14%); **EBFEFL** (11%); **EBFMFL** (14%); **EBFEGP** (13%) e **EBFMGP** (15%).

### 5.1.3 Triagem Fitoquímica

A análise química por via úmida dos extratos obtidos mostrou a presença de fenóis e taninos, alcaloides, esteroides e triterpenos. Os resultados estão mostrados na **Tabela 2**.

As análises realizadas nos extratos brutos etanólico e metanólico de *B. multiflora* (**EBFEBM** e **EBFMBM**) evidenciaram a presença de fenóis e taninos, enquanto o extrato **EBFEBM** mostrou resultado positivo para esteroides e triterpenos. **EBFEDQ** e **EBFMDQ** mostraram a presença de flavonoides e alcaloides que são metabólitos secundários característicos de espécies pertencentes a este gênero (CAROLLO *et al.*, 2006).

Os ensaios para os **EBFEFL** e **EBFMFL** mostraram a presença de fenóis, taninos, esteroides e triterpenos. A presença de alcalóides, muito comuns em espécies da família Annonaceae, não foi verificada nos extratos desta espécie e essa ausência foi corroborada através de análise dos extratos brutos por cromatografia em camada delgada analítica utilizando o reagente de Dragendorff como revelador. Os extratos alcoólicos da espécie *G. punctata* foram os que apresentaram maior diversidade de metabólitos secundários.

**Tabela 2** - Constituintes fitoquímicos dos extratos vegetais das espécies *B. multiflora*, *D. quitarensis*, *F. longifolia* e *G. punctata*

| Teste        | Fenóis e Taninos | Flavonoides | Alcaloides | Esteroides e triterpenos |
|--------------|------------------|-------------|------------|--------------------------|
| <b>EBEBM</b> | +                | -           | -          | +                        |
| <b>EBMBM</b> | +                | -           | -          | -                        |
| <b>EBEDQ</b> | -                | +           | +          | -                        |
| <b>EBMDQ</b> | -                | +           | +          | -                        |
| <b>EBEFL</b> | +                | -           | -          | +                        |
| <b>EBMFL</b> | +                | -           | -          | +                        |
| <b>EBEGP</b> | +                | -           | +          | +                        |
| <b>EBMGP</b> | +                | -           | +          | +                        |

#### 5.1.4 Determinação de fenóis totais (FT)

Quimicamente, os compostos fenólicos são um grupo de compostos naturais com características estruturais fenólicas. Trata-se de um termo coletivo para vários subgrupos de compostos fenólicos, levando à existência de uma nomenclatura variada, pois estes apresentam significativas diferenças estruturais (SILVEIRA,2013).

Este grande grupo é dividido em classes de acordo com o número de anéis fenólicos que possuem e das estruturas que ligam estes anéis entre si. Deste modo, distinguem-se cinco classes de fenóis: os ácidos fenólicos, flavonoides, lignanas, estilbenos e outros compostos fenólicos (NEVEU *et al.*, 2010).

O ensaio Folin-Ciocalteu SINGLETON *et al.* (1999) é um dos mais antigos métodos de quantificação de fenóis em uma amostra, portanto também conhecido como ensaio de fenóis totais. No que concerne à determinação dos fenóis totais, de uma forma geral, a mesma pode ser realizada pelos métodos espectrofotométricos de Folin-Ciocalteu ou do azul da Prússia modificado, que se baseiam em reações de oxidação-redução entre os compostos fenólicos e íons metálicos (SILVA *et al.*, 2010).

O método colorimétrico segundo Folin-Ciocalteu é o mais utilizado neste tipo de determinação, sendo o ensaio de fenóis totais por esse método, conveniente, simples e reprodutível.

Na **Tabela 3** são apresentados os teores de fenóis totais para os extratos brutos alcoólicos das espécies *B. multiflora*, *D. quitarensis*, *F. longifolia* e *G. punctata*.



**Tabela 3** - Teor de fenólicos totais (mg de AG/g de extrato) dos extratos brutos etanólico e metanólico das folhas das espécies *B. multiflora*, *D. quitarensis*, *F. longifolia* e *G. punctata*

| Extratos     | Fenóis Totais (mg EAG/g Extrato) |
|--------------|----------------------------------|
| <b>EBEBM</b> | 9,77±0,11 <sup>a</sup>           |
| <b>EBMBM</b> | 31,89±1,04 <sup>a</sup>          |
| <b>EBEDQ</b> | 28,45±0,07 <sup>b</sup>          |
| <b>EBMDQ</b> | 15,16±0,10 <sup>b</sup>          |
| <b>EBEFL</b> | 13,04±0,02 <sup>c</sup>          |
| <b>EBMFL</b> | 26,15±0,54 <sup>c</sup>          |
| <b>EBEGP</b> | 16,02±0,31 <sup>d</sup>          |
| <b>EBMGP</b> | 28,50±1,77 <sup>c,d</sup>        |

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 3); médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p < 0,05)

Todos os extratos avaliados apresentaram algum teor de compostos fenólicos (**FT**), que poderia estar relacionado com a atividade antioxidante (**AA**) que é apresentada no item 5.2.1. Entretanto, a análise dos dados não mostrou correlação direta entre **AA** e **FT**, o que pode ser explicado por duas razões:

1. Considerando a complexidade dos extratos, é possível que contenham substâncias que atuam sinérgica ou antagonicamente aos fenóis quando a **AA** é medida pelo método empregado;

2. Como sugerem os resultados para os **EBMBM** e **EBEBM** - enquanto o primeiro apresentou o maior teor de **FT** (31,89 ± 1,04 mgAG/g) e a maior **AA** (CE<sub>50</sub> = 4,2±0,75 mg/mL) de toda a série, o **EBEBM** apresentou o menor teor de **FT** (9,77±0,75 mgAG/g) e, no entanto, a segunda maior **AA** (11,±0,24 mg/mL). De toda a maneira a atividade antioxidante de um extrato não pode ser explicada apenas com base em seu teor de fenólicos totais, sendo necessária também, a caracterização da estrutura do composto ativo, em virtude de o grupo hidroxila presentes em outras classes de compostos favorecerem um resultado falso-positivo.

#### 5.1.5. Alcalóides de *D. quitarensis* e *G. punctata*

Em razão das espécies vegetais *D. quitarensis* e *G. punctata* terem apresentado resultados promissores nos ensaios biológicos preliminares com os **OEs** e pelo fato dos testes qualitativos apresentarem positividade para alcalóides, decidiu-se aprofundar os

estudos nessas espécies, por meio de análises por espectrometria de massas com a ESI-MS e LC/MS, com posterior interpretação manual dos espectros de MS/MS e LC/MS em comparação com a literatura de artigos consultados manualmente disponíveis no portal de periódicos da Capes, na qual a busca usada foi a fragmentação de alcaloides e dos íons moleculares encontrados nos espectros.

Para os experimentos de desreplicação que serão descritos abaixo, as folhas de *D. quitarenses* e *G. punctata*, previamente secas e trituradas, foram desengorduradas com hexano, seguido de extração com etanol e finalmente com metanol, produzindo desta forma os extratos metanólicos de *D. quitarenses* (**EMDq**) e de *G. punctata* (**EMGp**).

Sabe-se que os alcaloides possuem estrutura química diversa, porém devido a presença de nitrogênio, se ionizam melhor no modo positivo, onde se exploram propriedades como densidade de carga, potencial eletrostático entre outras, que auxiliam no melhor entendimento da ionização desta classe de metabólitos (STÉVIGNY, 2004). Assim, para as análises efetuadas nos **EMDq e EMGp** foram selecionados os espectros de massas no modo positivo.

A espectrometria de massas é uma técnica rápida e seletiva de análise para detecção, diferenciação e elucidação estrutural de produtos naturais em diferentes partes da planta, tais como folhas, flores THUNIG *et al.*, (2011) e sementes IFA *et al.* (2011), bem como de fungos JAEGER *et al.* (2013), atendendo requisitos de sensibilidade e especificidade.

Desreplicação (do inglês, *dereplication*, que significa “não replicar”) é um processo analítico de identificação *in situ* de substâncias em misturas complexas, através do uso de técnicas cromatográficas modernas aliadas a técnicas espectrométricas e espectroscópicas, com o objetivo de evitar o isolamento e a determinação estrutural de substâncias já conhecidas e assim permitir racionalizar as etapas de purificação e isolamento na busca por novas moléculas bioativas (KONISHI *et al.*, 2007; FUNARI *et al.*, 2013).

As técnicas de desreplicação incluem a utilização rotineira de técnicas cromatográficas hifenadas, as quais são poderosas ferramentas para a análise preliminar de extratos brutos. Dentre estas, aquelas que utilizam cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas são as mais comumente utilizadas.

Após análises, os íons com boa intensidade foram selecionados para obtenção da fragmentação, visando identificar íons característicos das classes presentes nos extratos.

A desreplicação dos compostos, principalmente alcaloides conhecidos, foi realizada pela interpretação manual dos espectros de MS/MS e comparação com artigos já publicados em periódicos.

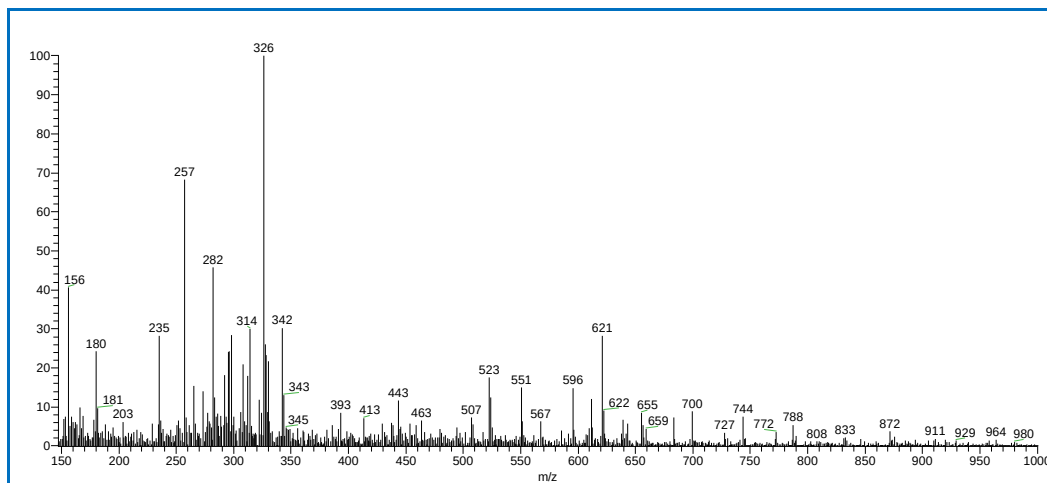
#### 5.1.6. Estudos de desreplicação do EMDq (ESI-MS)

O estudo de desreplicação empregando a ESI-MS e injeção direta foi utilizado para se obter o perfil químico do **EMDq** nos modos positivo e negativo. Ao se comparar os espectros de massas foi observado que no modo positivo houve uma maior variedade de íons e com boa intensidade.

Os experimentos de ESI(+)-MS/MS, onde as fragmentações observadas são típicas de unidades de alcalóides, sendo vários íons com valores de  $m/z$  par indicando substâncias nitrogenadas (alcalóide protonado), dos quais os de maior intensidade foram selecionados e submetidos à fragmentação em MS/MS.

Como mostrado abaixo (**Figura 24**) os espectros obtidos dos íons de  $m/z$  (282, 292, 314, 326 e 342), foram comparados com os dados da literatura (**Tabela 4**) e os padrões de fragmentação foram propostos baseados na fragmentação de alcalóides aporfínicos. O pico de  $m/z$  326  $[M+H]^+$  foi detectado com maior abundância relativa, demonstrando que a guatterina é o alcalóide majoritário no **EMDq**.

Calculos por DFT ( Density Functional Theory ) demonstram que, em qualquer situação, a protonação se dá no átomo de nitrogênio (até mesmo em imino compostos), levando em geral a íons *quasi*-moleculares intensos. Inicialmente ocorre a perda de  $NHRR'$ , levando a íons resultantes  $[M+H-NHRR']^+$  também bastante intensos (STÉVIGNY, 2004; QING, 2020)

**Figura 24** - Perfil LC-MS da amostra EMDq no modo positivo (+)

Na **Tabela 4** estão apresentados os fragmentos observados para cada  $[M+H]^+$ . Os padrões de fragmentação observados permitiram-nos sugerir tratarem-se de alcalóides aporfínicos, conforme será detalhado abaixo.

**Tabela 4** – Principais íons observados no EMDq por ESI-MS/MS no modo positivo e íons fragmentos observados a partir do íon precursor

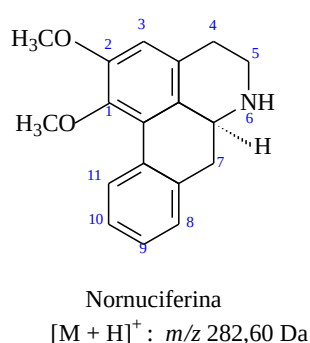
| COMPOSTOS                                              | $[M + H]^+$ | MS/MS              | REFERENCIAS                      |
|--------------------------------------------------------|-------------|--------------------|----------------------------------|
| Nornuciferina( <b>69</b> )<br>[281]                    | 282,60      | 265, 250, 235, 207 | (SILVA <i>et al.</i> , 2012)     |
| Guatterina( <b>70</b> )<br>$C_{19}H_{19}NO_4$<br>[325] | 326,36      | 308, 295, 265, 247 | --                               |
| Lisicamina( <b>71</b> )<br>[291]                       | 292,30      | 277, 260, 248, 220 | (DA SILVA, <i>et al.</i> , 2017) |
| Óxido de guatterina( <b>72</b> )<br>[341]              | 342,46      | 324, 295, 265      | (DE SOUZA, <i>et al.</i> , 2021) |
| Não identificado<br>[313]                              | 314,37      | 299, 265, 237, 193 | -                                |

Assim, foi possível anotar a estrutura para quatro dentre os cinco alcalóides majoritários do **EMDq** com sendo a nornuciferina (aporfínico), guatterina, (o óxido de

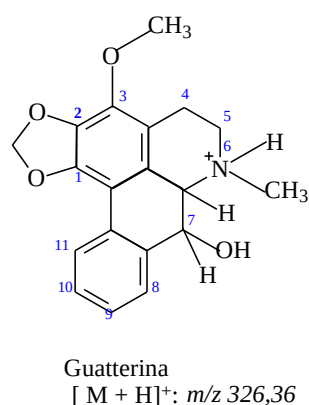
guatterina (*N*-etil-*N*-óxido) e a lisicamina (oxoaporfínico), respectivamente, conforme **Figura 25**.

Foram observadas ainda as fragmentações da molécula protonada em  $m/z$  314; no entanto, o perfil de fragmentação apresentado não possibilitou a sua identificação de acordo com dados da literatura, o que indica que pode ser composto que ainda não tenha sido identificado por esse método, ou mesmo composto inédito que precisa ser isolado e identificado por outras técnicas de cromatografia, como a espectroscopia de ressonância magnética nuclear que é uma poderosa ferramenta para a elucidação estrutural.

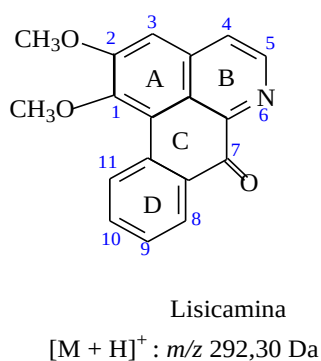
**Figura 25** - Alcaloides aporfínicos identificados no EMDq por ESI-MS/MS



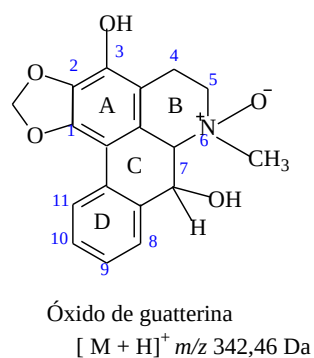
(69)



(70)



(71)



(72)

Para a anotação de alcaloides aporfínicos, a fragmentação inicial (MS/MS) é fundamental para identificar se ao nitrogênio do grupo amina estão ligados a hidrogênios ou grupamentos metila. Quando estão ligados a hidrogênios ocorre a perda de 17 Da relativo à perda de NH<sub>3</sub> (amônia) e quando há a presença de grupos metilaminos (CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>) ocorre a perda de 31 Da ou 45 Da (Me<sub>2</sub>NH).

No caso de alcaloides aporfínicos é comum a perda radicalar em  $MS^2$  de 31 Da ( $CH_3O^\bullet$ ) quando nos C-1 e C-2 estão ligados metoxilas e a perda de 32 Da (MeOH) quando em C-1 ou C-2 estão ligados grupos metoxila e hidroxila. O fragmento  $MS^2$  referente à perda neutra de 28 Da ocorre pela perda de CO em alcaloides aporfínicos que apresentam metoxilas e hidroxilas ligados em C-1 e C-2, enquanto para alcaloides que possuem metoxilas adjacentes em C-1 e C-2, o fragmento  $MS^2$  corresponde à perda de 15 Da, referente a um radical metila (CONCEIÇÃO *et al.*, 2020).

Para alcaloides aporfínicos contendo ponte metilenodióxi ligada no Anel A, o fragmento  $MS^2$  é observado pela perda de 30 Da referentes ao grupo  $CH_2O$  e o fragmento  $MS^2$  é resultante da perda de 28 Da referentes à perda de CO (SOARES, 2015). Para alcaloides do tipo *N*-metil-*N*-óxidos o fragmento em  $MS^2$  corresponde à perda de 47 Da referentes ao grupo ( $CH_3NHOH$ ). Essas perdas estão associadas à existência de grupos *N*-óxidos do anel B e também à presença de grupos OH em sistemas aporfínicos. A perda inicial de -47 Da é associada ao grupo  $NHOCH_3$  (PAZ, 2019).

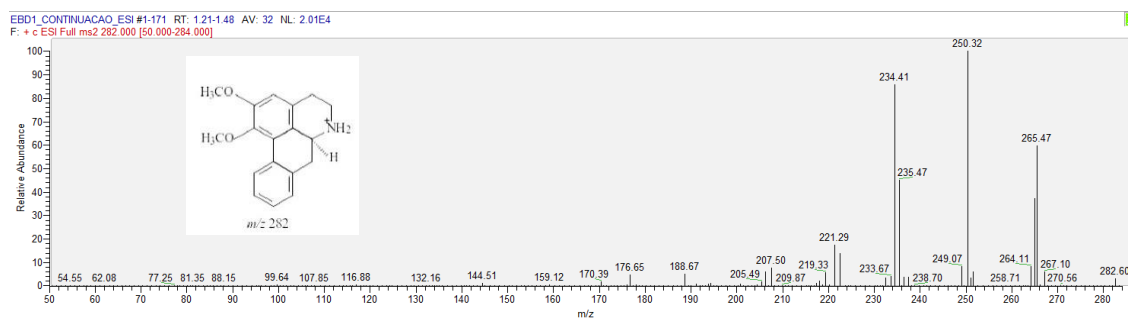
Diferentemente dos alcaloides aporfínicos em que há um padrão de fragmentação bem estabelecido e descrito na literatura, alcaloides da subclasse oxoaporfínicos podem ter fragmentações específicas de acordo com os grupos periféricos ligados no esqueleto isoquinolínico. SILVA *et al.* (2016), descrevem a fragmentação de uma série de padrões de oxoaporfínicos através da dissociação induzida por colisão (*do inglês, Collision Induced Dissociation – CID*), por espectrometria de massas eletrospray íon trap (ESI-IT/MS), buscando o conhecimento acerca da fragmentação dessa subclasse de alcalóides isoquinolínicos. Neste estudo, foi verificado que os alcalóides oxoaporfínicos quando analisados no modo positivo  $[M+H]^+$  apresentam dois possíveis sítios de protonação, ou seja, a protonação pode ocorrer no nitrogênio imínico e também no oxigênio da carbonila ligada em C-7.

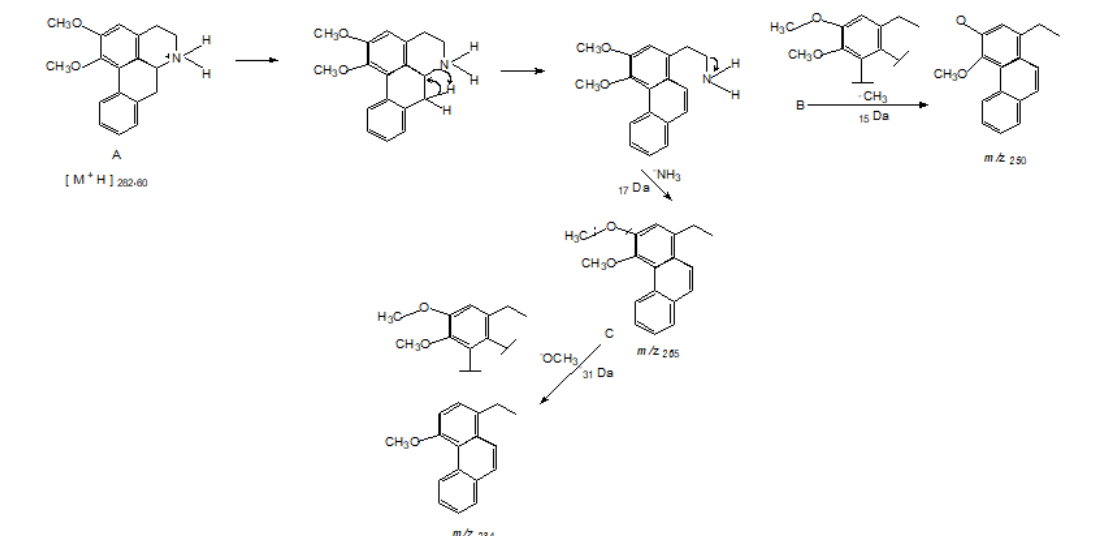
Entretanto, através de estudos teóricos (Teoria da Densidade Funcional) foi observado que do ponto de vista energético, a protonação é favorável que ocorra no nitrogênio imínico do anel B. Outra observação importante descrita neste trabalho é que os alcaloides oxoaporfínicos não possuem um padrão de fragmentação único e que a presença de substituintes periféricos, normalmente, metoxilas e pontes metilenodióxi, assim como as posições que se encontram ligados, são determinantes para o tipo de fragmentação (DUARTE, 2001)..

De acordo com este estudo, para a lisicamina (**70**),  $m/z$  292  $[M + H]^+$ , também encontrada no extrato da *D. quitarensis*, foi observada apenas uma fragmentação com MS/MS em  $m/z$  277 referente à perda radicalar de um grupo metil (15 Da) e que através do cálculo de energias eletrônicas corrigidas para as energias livres de Gibbs ( $\Delta G$ ) foi possível identificar a posição preferencial em que ocorre a perda da metila (C-1 ou C-2). O fragmento de íon com o radical colocado em C-1 mostrou ser energeticamente mais estável do que a outra possibilidade ( $\Delta G_{C-1} = 51,87 \text{ kcal mol}^{-1}$  e  $\Delta G_{C-2} = 63,78 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ). A explicação apresentada para essa observação é que a preferência pela posição C-1 pode estar relacionada à possibilidade de uma ligação de hidrogênio intramolecular com o hidrogênio H-11, o que estabiliza o íon formado, como na estrutura (**70**).

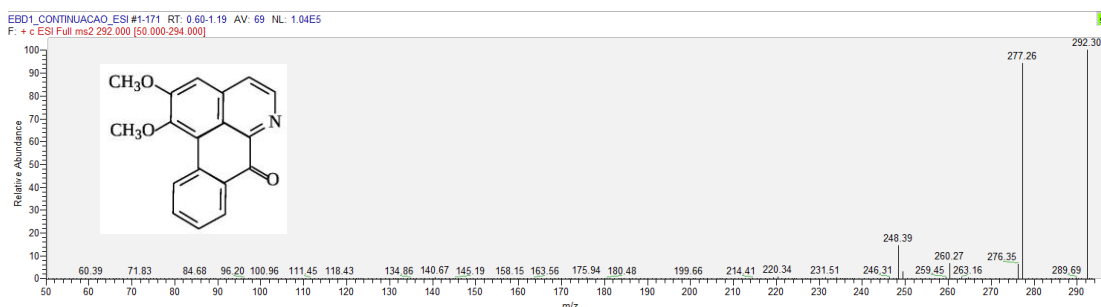
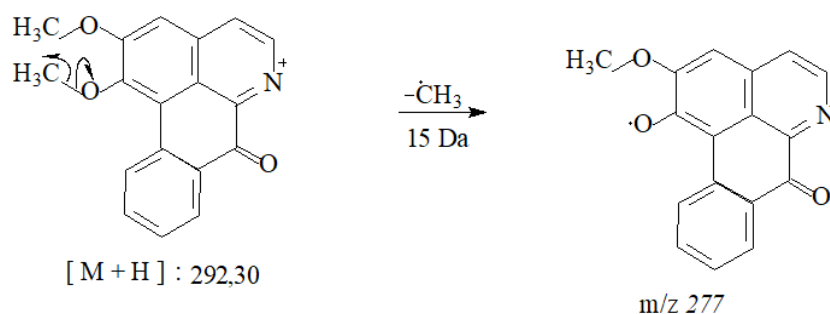
O íon com relação  $m/z$  282 ( $[M+H]^+$ ) (**Figura 26**) identificado como normuciferina (**69**), apresentou padrão de fragmentação com perdas iniciais de 17 Da e 30 Da (normuciferina:  $282 \rightarrow 265$ ,  $265 \rightarrow 235$ ), relativos à perda de amônia e  $\text{CH}_2\text{O}$  de 30 Da, ( $235 \rightarrow 207$ ) relativo a perda de 28 Da referente a perda de CO para a normuciferina (**69**) como o **esquema 10**.

**Figura 26** - Espectro de MS/MS (+) do íon  $m/z$  282 (normuciferina)



**Esquema 10** - Proposta de fragmentação do íon precursor da nornuciferina

espectro de massas dos íons totais do **EMDq** indicou também a presença do íon  $m/z$  292  $[M+H]^+$  (**Figura 27**) que foi identificado como lisicamina AVULA, *et al.* (2018), conforme demonstrado no **esquema 11**. RAJCA FERREIRA *et al.* (2017) identificou a lisicamina da espécie *G. latifolia*.

**Figura 27** - Espectro de MS/MS (+) do íon 292 (Lisicamina)**Esquema 11** - Proposta de fragmentação do íon molecular da Lisicamina

N

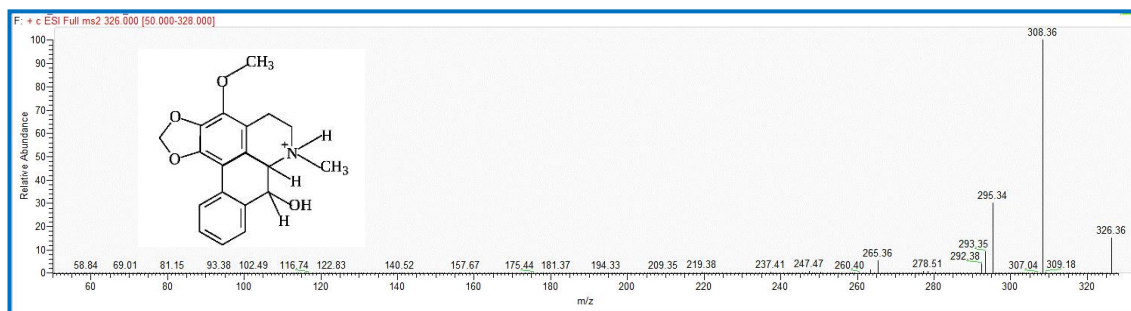
a análise de sua fragmentação observou-se o íon  $MS^2$  com  $m/z$  277, referente a perda



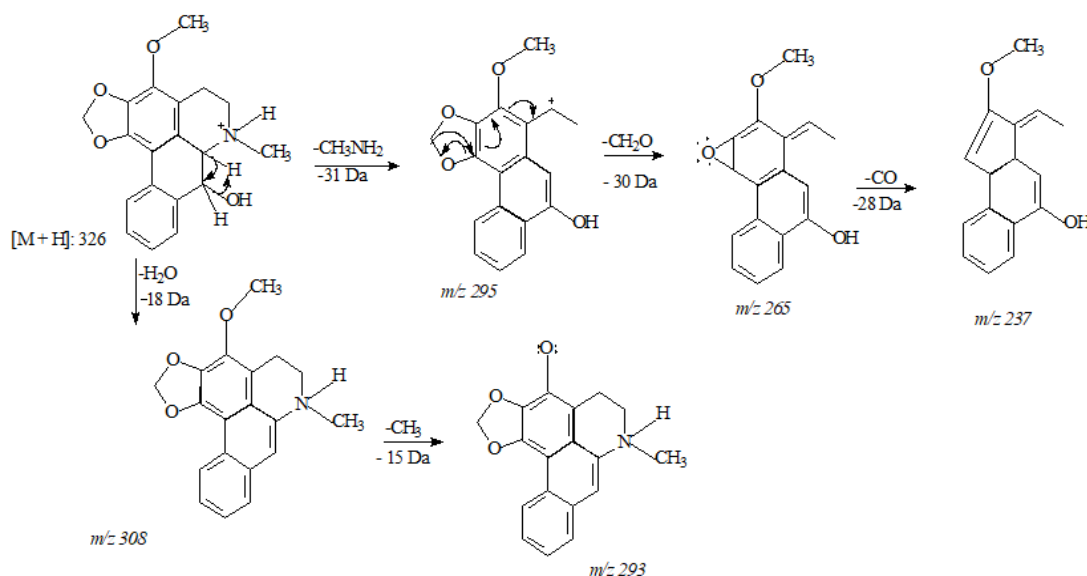
inicial de 15 Da do grupo metila ligado em C-1, conforme discutido por DA (SILVA *et al.*, 2017).

Para o íon precursor em  $m/z$  326 ( $[M+H]^+$ ) (**Figura 28**) a formação do íon produto com a perda neutra de 31 Da foi atribuída ao grupo metilamino ( $326 \rightarrow 295$ ) -  $CH_3NH_2$ , seguidos da saída do grupo  $-CH_2O$  30 Da ( $295 \rightarrow 265$ ), finalizando com 28 Da com a perda de CO ( $265 \rightarrow 237$ ). Com os fragmentos encontrados foi possível propor como sendo a guatterina utilizando a ESI-MS/MS. Baseado nos dados de (DE SOUZA, *et al.*, 2021) o qual identificou a *N*-óxido de guatterina, o que sugere a presença do precursor como sendo a guatterina, o qual possivelmente tenha sofrido uma oxidação no Anel B, sendo plausível a formação do *N*-óxido de guatterina produto da oxidação da guatterina.

**Figura 28** - Espectro de MS/MS (+) do íon 326 (guatterina)



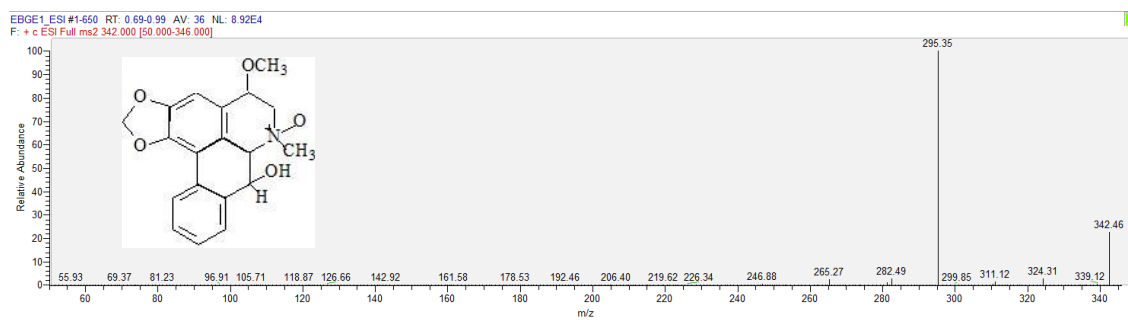
**Esquema 12** - Proposta de fragmentação do íon molecular da guatterina



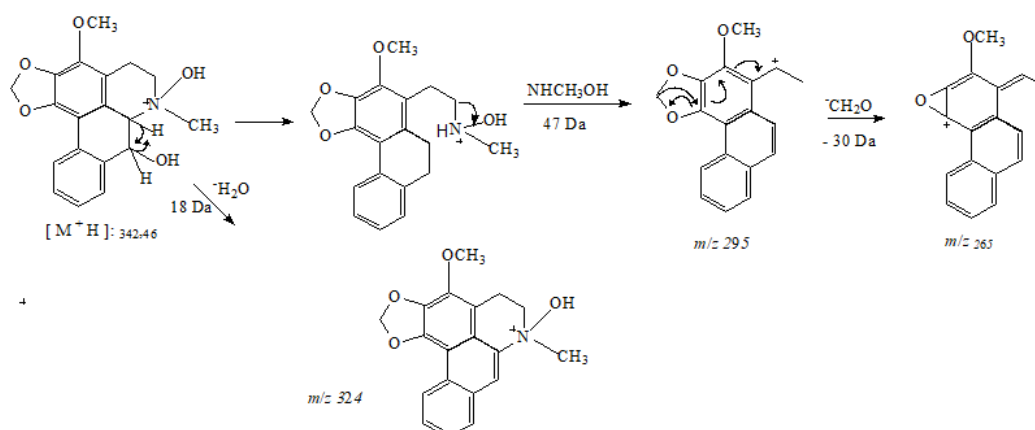
O espectro  $[M + H]^+$  referente ao íon precursor em  $m/z$  342 (**Figura 29**), identificado como o alcalóide do tipo aporfínico *N*-óxido de guatterina (72) **Figura 22**,

apresentou fragmento  $MS^2$  referente a perda de  $-(CH_3NHOH)$  47 Da ( $342 \rightarrow 295$ ), seguido da perda de  $CH_2O$  ( $295 \rightarrow 265$ ). Os dados obtidos são semelhantes aos da literatura (DE SOUZA *et al.*, 2021). A perda inicial de 47 Da está de acordo com uma estrutura de *N*-óxido metil aporfinico. Além disso, a perda subsequente de 30 Da é consistente com a presença de um grupo metilenodioxi no anel A.

**Figura 29** - Espectro de MS/MS (+) do íon 342 (N-óxido de guatterina)

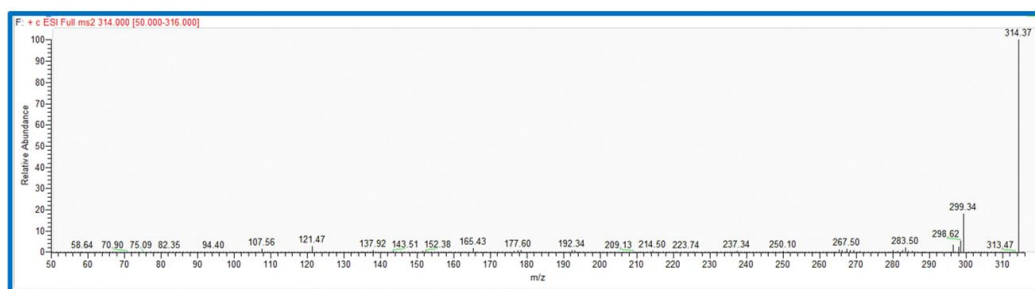


**Esquema 13** - Proposta de fragmentação da N-óxido de guatterina



Adaptado de DE SOUZA, *et al.*, 2020

Como mencionado anteriormente, o pico com  $m/z$  314 (**Figura 30**) não foi identificado pela ausência de dados na literatura. Pela fragmentação observada, pode-se prever que segue do íon precursor: ( $314 \rightarrow 299$ ) se referindo a perda de  $-CH_3$ , ( $299 \rightarrow 267$ ), ( $267 \rightarrow 237$ ) referente a  $-CH_2O$  e finalmente ( $237 \rightarrow 209$ ) uma perda de 28 Da, mesmo assim não possibilita montar a provável estrutura.

**Figura 30** - Espectro de MS/MS (+) do íon 314

#### 5.1.7 Estudos de desreplicação do EMGp (UHPLC-qTOF-MS/MS)

A fim de investigar o perfil alcaloídico da espécie *G. punctata*, o extrato bruto metanólico das folhas foi submetido a análise por UHPLC-qTOF-MS/MS. A partir dos dados espectrométricos obtidos, selecionou-se os principais íons para a fragmentação e dessa forma realizar a confirmação de suas estruturas por meio de comparação com dados da literatura. Os dados principais podem ser observados na **Tabela 5**.

**Tabela 5** - Propostas de Identificação dos metabólitos secundários do EMGp por HPLC-ESI-TOF-MS/MS

| Substâncias Propostas    | Fórmula para o íon                              | <i>m/z</i> medido | <i>m/z</i> teórico ( $\Delta$ /ppm) | Tempo de retenção/min | Referências Bibliográficas                |
|--------------------------|-------------------------------------------------|-------------------|-------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------|
| 4-hidroxi-N-metilprolina | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub>  | 146,0815          | 146,0812<br>(-2,1)                  | 0,7                   | (SCHMEDA-HIRSCHMANN <i>et al.</i> , 2020) |
| Picnarrina               | C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>2</sub> | 192,1019          | 192,1021<br>(-0,1)                  | 1,0                   | (AVULA <i>et al.</i> , 2018)              |
| Geovanina                | C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub> | 300,1230          | 300,1230<br>(0,0)                   | 1,6                   | (DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , 1987)        |
| Higenamina               | C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub> | 272,1279          | 272,1254<br>(-8,9)                  | 1,8                   | (WANG, <i>et al et al.</i> , 2020)        |
| N-metil-higenamina       | C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub> | 286,1438          | 286,1438<br>(-0,1)                  | 1,9                   | (LI <i>et al</i> , 2015)                  |
| Lotusina                 | C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub> | 314,1750          | 314,1589<br>(0,1)                   | 2,9                   | (LIN <i>et al.</i> , 2014)                |
| Oblongina                | C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub> | 314,1748          | 314,1751                            | 3,9                   | (BAJPAI, <i>et al.</i> ,                  |

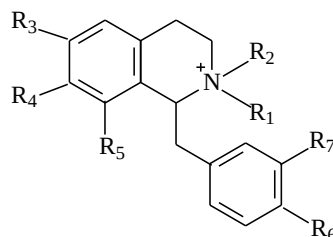
|                         |                                                 |          |          |     |                                       |
|-------------------------|-------------------------------------------------|----------|----------|-----|---------------------------------------|
|                         |                                                 |          | (0,8)    |     | 2016)                                 |
| Cocclaurina             | C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub> | 286,1435 | 286,1438 | 2,8 | (QING <i>et al.</i> , 2020)           |
|                         |                                                 |          | (0,8)    |     |                                       |
| Juzifina                | C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub> | 300,1589 | 300,1594 | 2,9 | (SHANGGUAN <i>et al.</i> , 2018)      |
|                         |                                                 |          | (0,9)    |     |                                       |
| Isobaldina              | C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub> | 328,1538 | 328,1543 | 3,2 | (LI <i>et al.</i> , 2015)             |
|                         |                                                 |          | (1,4)    |     |                                       |
| Anolobina               | C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>3</sub> | 282,1121 | 282,1119 | 3,3 | (CARNEVALE NETO <i>et al.</i> , 2020) |
|                         |                                                 |          | (1,3)    |     |                                       |
| Reticulina              | C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub> | 330,1700 | 330,1700 | 3,5 | (QING <i>et al.</i> , 2020)           |
|                         |                                                 |          | (-0,1)   |     |                                       |
| N-metil-cocclaurina     | C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub> | 300,1591 | 300,1594 | 4,0 | (SHANGGUAN <i>et al.</i> , 2018)      |
|                         |                                                 |          | (1,0)    |     |                                       |
| Nandigerina             | C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub> | 312,1230 | 312,1228 | 4,2 | (YAN, <i>et al.</i> 2013)             |
|                         |                                                 |          | (0,7)    |     |                                       |
| Norushinsunina          | C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>3</sub> | 282,1122 | 282,1125 | 4,9 | (LIMA <i>et al.</i> , 2020)           |
|                         |                                                 |          | (-0,1)   |     |                                       |
| Xylopina                | C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub> | 296,1280 | 296,181  | 5,0 | (CARNEVALE NETO <i>et al.</i> , 2020) |
|                         |                                                 |          | (0,5)    |     |                                       |
| N,o-dimetil-cocclaurina | C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub> | 314,1754 | 314,1751 | 5,4 | (LIMA, <i>et al.</i> , 2020)          |
|                         |                                                 |          | (0,4)    |     |                                       |
| Nornuciferina           | C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>2</sub> | 282,1487 | 282,1489 | 5,6 | (SILVA <i>et al.</i> , 2012)          |
|                         |                                                 |          | (0,4)    |     |                                       |
| Não identificado        | C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>4</sub> | 326,1395 | 326,1387 | 6,0 | -                                     |
|                         |                                                 |          | (-2,6)   |     |                                       |
| Óxido de guatterina     | C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>5</sub> | 342,1336 | 342,1336 | 6,6 | (DE SOUZA <i>et al.</i> , 2021)       |
|                         |                                                 |          | (0,0)    |     |                                       |
| Lanuginosina            | C <sub>18</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub> | 306,0756 | 306,0761 | 9,5 | (DANTAS <i>et al.</i> , 2020a)        |
|                         |                                                 |          | (1,3)    |     |                                       |

Para essas análises, os principais íons precursores observados no extrato foram fragmentados e os perfis de fragmentação foram confrontados com dados da literatura. A partir dos perfis de fragmentação obtidos foram sugeridos nove alcaloides do tipo **benzilisoquinólicos** (Figura 31 e Tabela 6), sete **aporfínicos** (Figura 32 e Tabela 7), um **oxoaporfínico** (Figura 33), um alcaloide **pirrolidínico** (Figura 34), um alcaloide simples **isoquinolínico** (Figura 35) e um do tipo **azaantracênico** (Figura 36), totalizando 20 alcaloides apresentados a seguir.

#### Alcalóides benzilisoquinolínicos

Semelhante aos alcaloides aporfínicos, os alcaloides de benzilisoquinolina possuem íons característicos, exibindo um comportamento de fragmentação bastante simples. A etapa inicial é a formação do íon correspondente à perda de nitrogênio como amônia ou metilamina, fazendo a abertura do anel B. Geralmentos os espectros apresentam perdas de massa comumente altas ( $m/z$  192 e  $m/z$  107) relacionados aos anéis A/B e C respectivamente (SCHMIDT *et al.*, 2005).

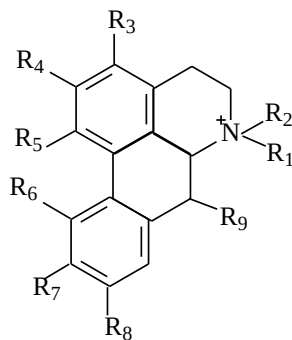
**Figura 31** - Alcaloides identificados no **EMGp**



**Tabela 6** - alcaloides benzisoquinolínicos das folhas *G. punctata* identificados por HPLC-ESI-TOF-MS/MS

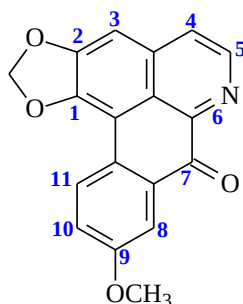
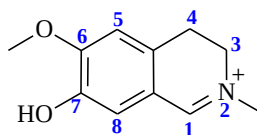
| [M+H] <sup>+</sup><br>Da | Compostos                                                                                                                                                                                                 |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 330,1700                 | Reticulina( <b>73</b> ): R <sub>1</sub> = -CH <sub>3</sub> ; R <sub>2</sub> =R <sub>5</sub> = H; R <sub>3</sub> =R <sub>6</sub> =H = OCH <sub>3</sub> ; R <sub>4</sub> = R <sub>7</sub> = -OH-            |
| 300,1591                 | <i>N</i> -metilcocclaurina( <b>74</b> ): R <sub>1</sub> =CH <sub>3</sub> ; R <sub>3</sub> =OCH <sub>3</sub> ; R <sub>4</sub> =R <sub>6</sub> =OH; R <sub>2</sub> =R <sub>5</sub> =R <sub>7</sub> =H       |
| 272,1279                 | Higenamina ( <b>75</b> ): R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> = R <sub>5</sub> =R <sub>7</sub> = H; R <sub>3</sub> =R <sub>4</sub> =R <sub>6</sub> = OH                                                        |
| 286,1438                 | <i>N</i> -metilhigenamina( <b>76</b> ): R <sub>1</sub> = -CH <sub>3</sub> R <sub>2</sub> = R <sub>5</sub> =R <sub>7</sub> =H; R <sub>3</sub> = R <sub>6</sub> = OH                                        |
| 286,1435                 | Cocclaurina( <b>77</b> ): R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =R <sub>5</sub> =R <sub>7</sub> =H; R <sub>3</sub> =OCH <sub>3</sub> ; R <sub>4</sub> =R <sub>6</sub> =OH                                        |
| 314,1754                 | <i>N,O</i> - dimetilcocclaurina( <b>78</b> ): R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> =R <sub>5</sub> =R <sub>7</sub> =H; R <sub>3</sub> =R <sub>6</sub> = -OCH <sub>3</sub> ; R <sub>4</sub> =OH |
| 300,1589                 | Jusifina( <b>79</b> ): R <sub>1</sub> =-CH <sub>3</sub> = R <sub>2</sub> =R <sub>3</sub> =R <sub>7</sub> =H; R <sub>4</sub> = -OCH <sub>3</sub> ; R <sub>5</sub> =R <sub>7</sub> =OH                      |
| 314,1750                 | Lotusina( <b>80</b> ): R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> = CH <sub>3</sub> ; R <sub>3</sub> =R <sub>5</sub> =R <sub>7</sub> =H= ; R <sub>4</sub> =OCH <sub>3</sub> ; R <sub>5</sub> =R <sub>6</sub> = OH     |
| 314,1748                 | Oblongina( <b>81</b> ): R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =CH <sub>3</sub> ; R <sub>3</sub> =R <sub>7</sub> =H; R <sub>4</sub> =-OCH <sub>3</sub> ; R <sub>5</sub> =R <sub>6</sub> =OH                       |

**Figura 32** - Alcaloides identificados no **EMGp**

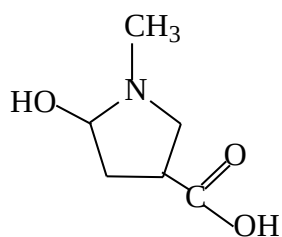


**Tabela 7** - alcaloides aporfinicos das folhas *G. punctata* identificados por HPLC-ESI-TOF-MS/MS

| $[M+H]^+$<br>Da | Compostos                                                                                                                              |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 282,1121        | Analobina <b>(82)</b> : $R_1=R_2= R_3=R_6= R_7=R_9=H$ ; $R_4=R_5= ^-OCH_2O^-$ ; $R_8=OH$                                               |
| 282,1122        | Norushinsunina <b>(83)</b> : $R_1=R_2=R_6=R_7=R_8=H$ ; $R_4=R_5= OCH_2O$ ; $R_9= OH$                                                   |
| 282.1122        | Nornuciferina <b>(69)</b> : $R_1=R_2= R_3=R_6= R_7=R_8=R_9=H$ ; $R_4= R_5= OCH_2O$                                                     |
| 296.1280        | Xilopina <b>(84)</b> : $R_1=R_2= R_3=R_6= R_7=R_9=H$ ; $R_8= OCH_3$ ; $R_4= R_5= OCH_2O$                                               |
| 312.1228        | Nandigerina <b>(85)</b> : $R_1=R_2= R_3=R_8=R_9=H$ ; $R_4= R_5= OCH_2O$ ; $R_6=OCH_3$ ; $R_7=OH$                                       |
| 328.1538        | Isoboldina <b>(86)</b> : $R_1=R_2= R_3=R_6=R_9=H$ ; $R_4= R_5= -OCH_2O-$ ; $R_7=OCH_3$ ; $R_8=OH$                                      |
| 342.1336        | <i>N</i> – óxido de guaterina <b>(72)</b> : $R_1= CH_3$ ; $R_2=O^-$ ; $R_3=OCH_3$ ; $R_4=R_5= -OCH_2O-$ ; $R_6= R_7=R_8=H$ ; $R_9= OH$ |

**Alcaloide Oxoaporfinico****Figura 33** - Alcaloides identificados no **EMGp****Lanuginosina**
 $[M + H]^+ : m/z \text{ 306,0756}$ 
**(87)****Alcaloide isoquinolinico****Figura 34** - Alcaloides identificados no **EMGp****Picnarrina**
 $[M + H]^+ : m/z \text{ 192,102 Da}$ 
**(88)****Alcaloide pirrolidinico**

**Figura 35** - Alcaloides identificados no **EMGp**



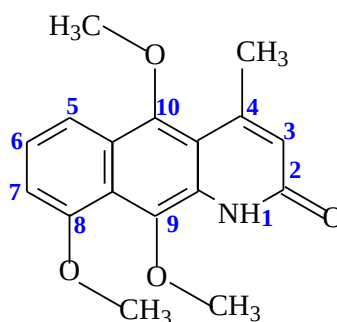
**4-hidroxi-metil-prolina**

$[M + H]^+$ :  $m/z$  146,0814 Da

(89)

### Alcaloide tipo azaantracênico

**Figura 36** - Alcaloides identificados no **EMGp**



**Geovanina**

$[M + H]^+$ : 300,1230 Da

(90)

O **EMGp** apresentou vários outros íons com massas e fragmentações semelhantes. As diferenças das estruturas estão relacionadas às posições de hidroxilação e metilação, como pode ser observado nas estruturas da reticulina e a *N*-metilcoclaurina. As diferenças consistem nas metilas ligadas ao nitrogênio e nas *O*-metilações do núcleo tetrahydroisoquinoliníco, além de diferentes posições de hidroxilação dos anéis benzílicos contendo substituições em *meta* e *para*. Portanto, para cada composto identificado seguem o mesmo padrão de fragmentação, sendo diferenciados de acordo com os grupos de saída fragmentados.

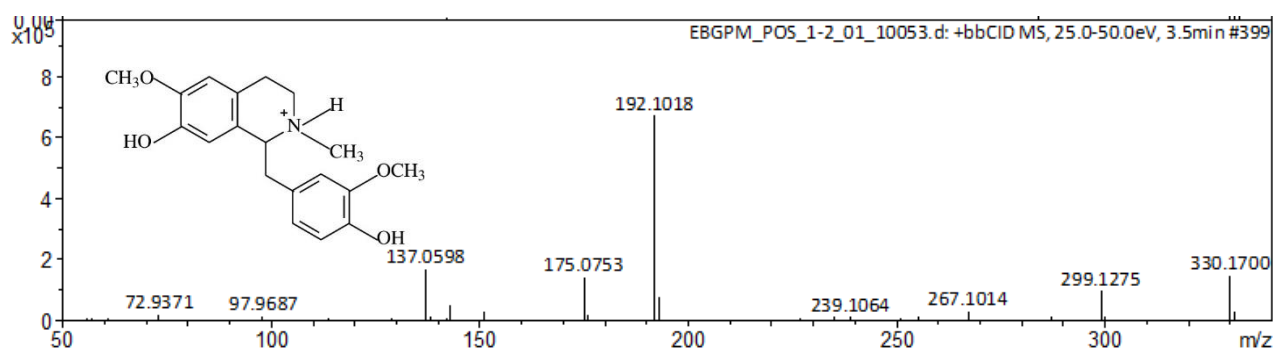
Nos espectros de massas dos íons precursores  $[M+H]^+$  com  $m/z$  330 ( $t_r$  = 3,5 min.) e  $m/z$  300 ( $t_r$  = 4,0 min.) fragmentações semelhantes foram observadas. Nos **esquemas 13 e 43** são apresentadas propostas de fragmentação para a reticulina e *N*-metilcoclaurina, que são típicas de alcaloides benzilisoquinolínicos. Foram observadas



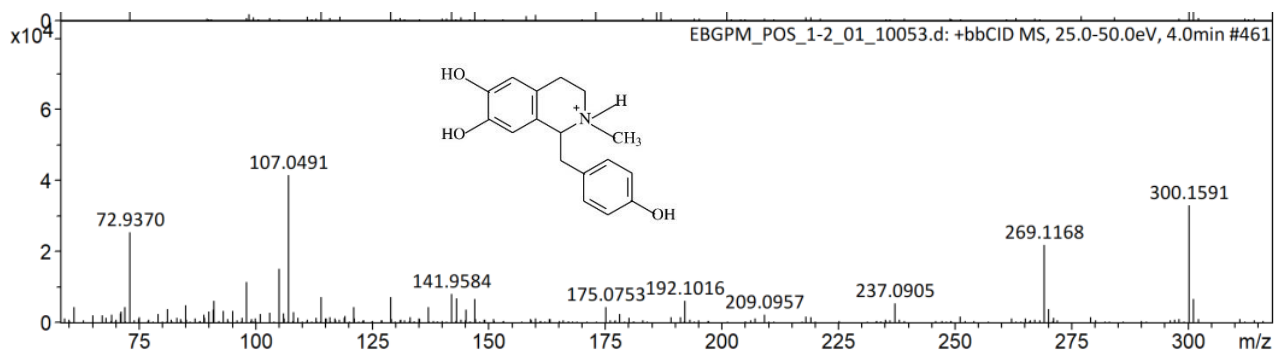
as fragmentações dos íons  $m/z$  330 ( $330 \rightarrow 299$ ,  $299 \rightarrow 267$  e  $267 \rightarrow 239$ ) e  $m/z$  300 ( $300 \rightarrow 269$ ,  $269 \rightarrow 237$  e  $237 \rightarrow 209$ ).

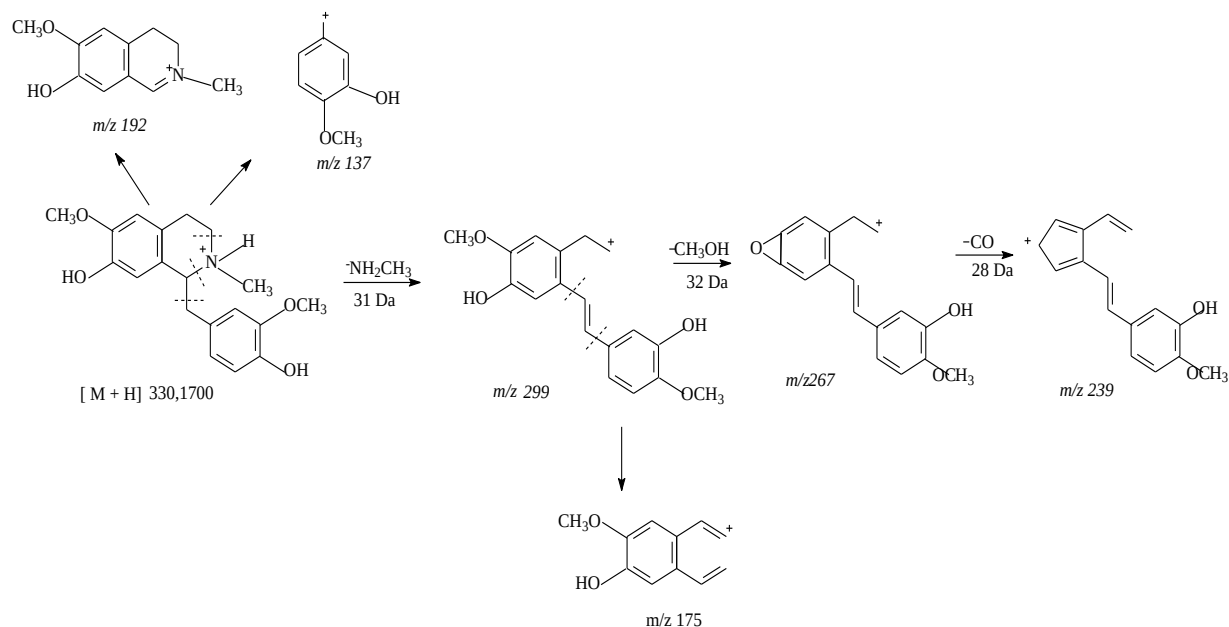
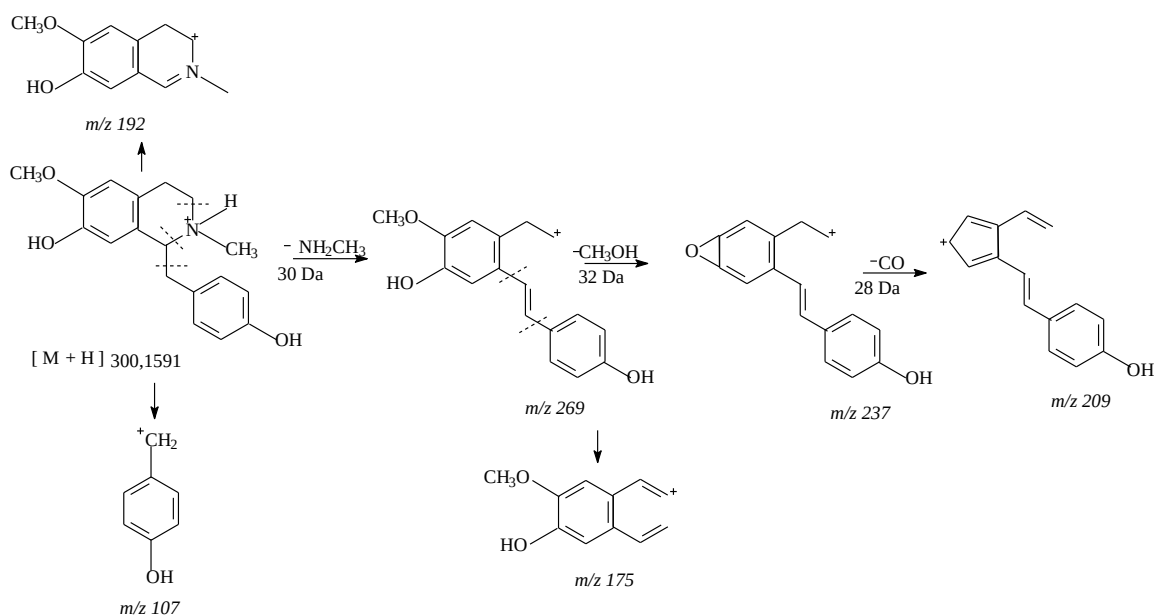
Para esses íons pode-se observar perdas iniciais de metilamina  $\text{CH}_3\text{NH}_2$  (-31Da), e, sequencialmente, a saída de grupos  $\text{CH}_3\text{OH}$  (-32Da) e  $-\text{CO}$  (-28Da) fragmentações semelhantes e condizentes com estruturas de alcaloides benzilisoquinólicos que contenham grupos metoxilas e hidroxilas ligadas no anel A. A comparação desses dados com os da literatura QING *et al.* (2020); SCHIMIDT *et al.* (2005), permitiu identificar essas substâncias como sendo a reticulina e a *N*-metilcoclaurina, respectivamente. Nas **Figuras 37 e 38** são apresentados os espectros MS/MS dos íons precursores protonados.

**Figura 37** - Espectro de massas de segunda ordem para a reticulina ( $m/z$  330)



**Figura 38** - Espectro LC-MS/MS para *N*-metilcoclaurina



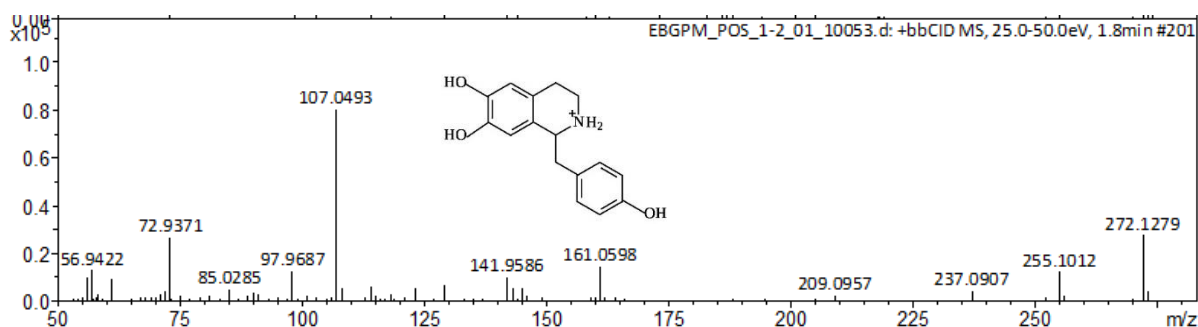
**Esquema 14** - Proposta de fragmentação para o íon 330,1700 observado em LC-MS/MS**Esquema 15** – Proposta de fragmentação para o íon 300,1591 observado em LC-MS/MS

No espectro de massas do íon precursor  $[M+H]^+$  com  $m/z$  272 ( $t_r = 1,8$  min.) (**Figura 39**) houve perda inicial de 17 Da corresponde a amônia ( $272 \rightarrow 255$ ) e, sequencialmente, a perda de água 18 Da ( $255 \rightarrow 237$ ) e 28 Da CO ( $237 \rightarrow 209$ ). A comparação dos fragmentos obtidos com os da literatura OKANO, SATO, KAGEYAMA (2017), permitiu identificar o composto como sendo a higenamina.

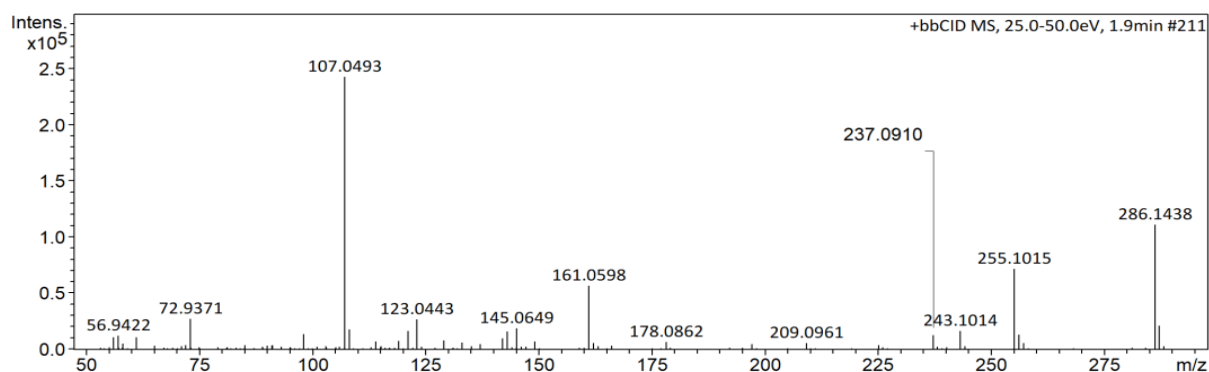
No espectro de massas do íon  $[M+H]^+$  com  $m/z$  286 ( $t_r = 1,9$  min.) ( $286 \rightarrow 255$ ,  $255 \rightarrow 237$ ) (**Figura 40**) foram observadas fragmentações relativas à perda do grupo metilamino (31 Da) e, sequencialmente, a perda de água (18 Da), não sendo possível

observar a perda de CO que é comum para essa classe de compostos. Os dados obtidos foram comparados aos da literatura (LI *et al.* 2018) sendo possível identificar esse composto como sendo a *N*-metilhigenamina.

**Figura 39** - Espectro LC-MS/MS para a higenamina

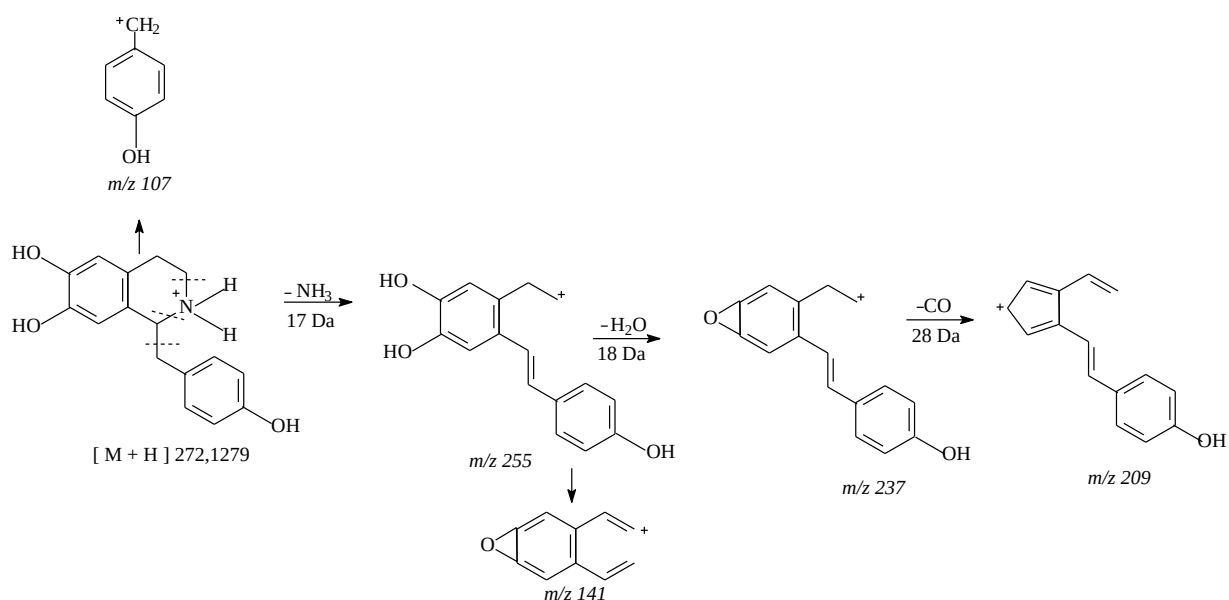


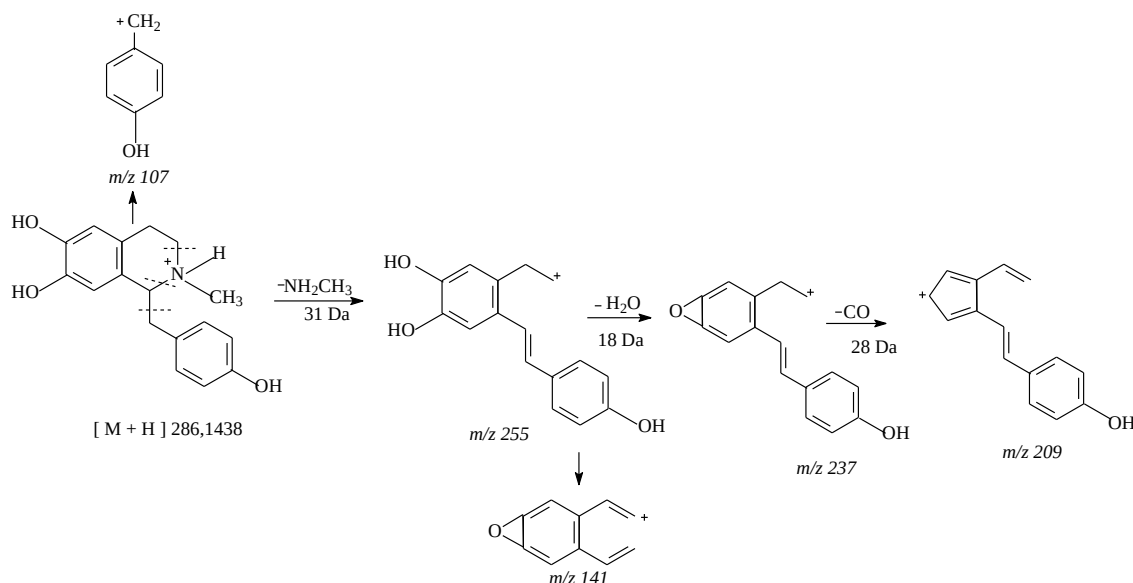
**Figura 40** - Espectro LC-MS/MS para a *N*-metilhigenamina



No **Esquema 15 e 16** estão as propostas de fragmentação dos alcaloides, e *N*-metilhigenamina e higenamina, respectivamente.

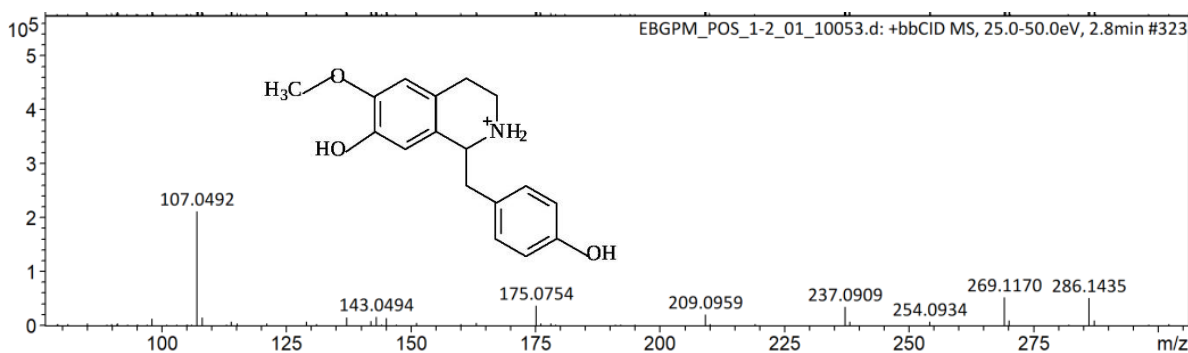
**Esquema 16** - Proposta de fragmentação para o íon 272,1279 observado em LC-MS/MS

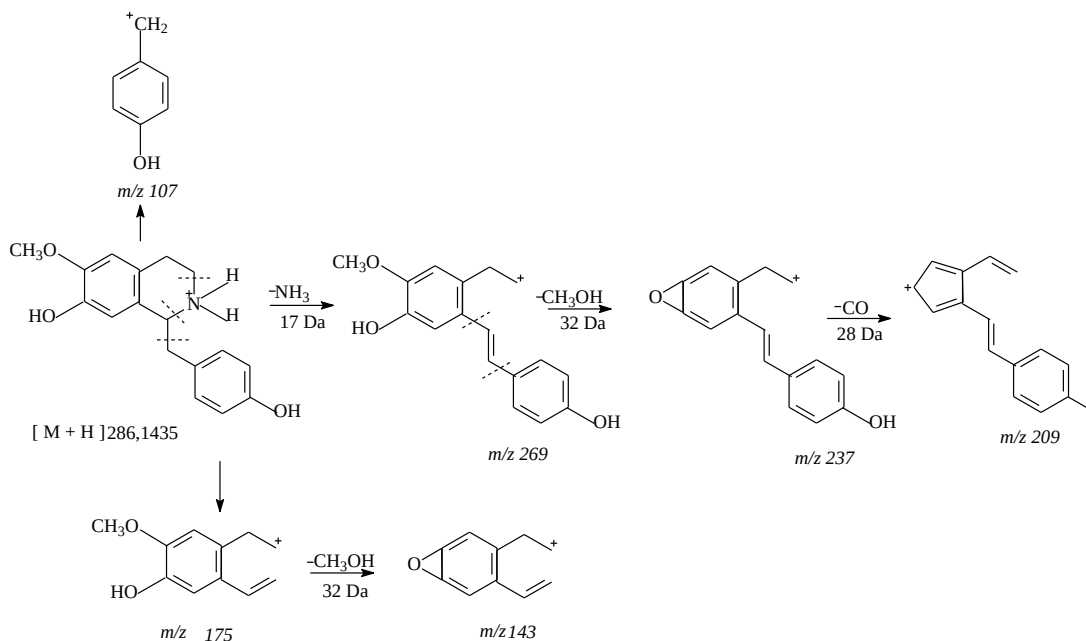


**Esquema 17** - Proposta de fragmentação para o íon 286,1438 observado em LC-MS/MS

O espectro de massas do íon  $[M+H]^+$  com  $m/z$  286 ( $t_r = 2,8$  min.) (**Figura 42**) apresentou fragmentações típicas de alcaloides benzilisoquinólicos e os fragmentos foram propostos. O fragmento inicial foi observado pela perda de amônia (17 Da) ( $286 \rightarrow 269$ ) e, sequencialmente, perda de  $CH_3OH$  (32 Da) ( $269 \rightarrow 237$ ) e (28 Da)  $CO$  ( $237 \rightarrow 209$ ). A ausência do fragmento de 31 Da e a presença do fragmento referente a perda de amônia nos levou a inferir que esse composto se trata de uma amina simples. Os dados quando comparados aos da literatura QING *et al.* (2020), permitiram identificar esse composto como sendo a coclaurina.

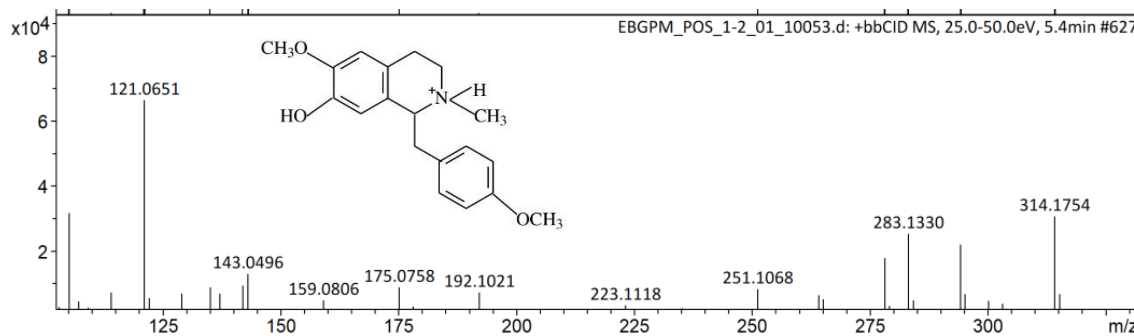
No **Esquema 18** estão demonstradas as possíveis fragmentações para os íons precursores  $m/z$  286.

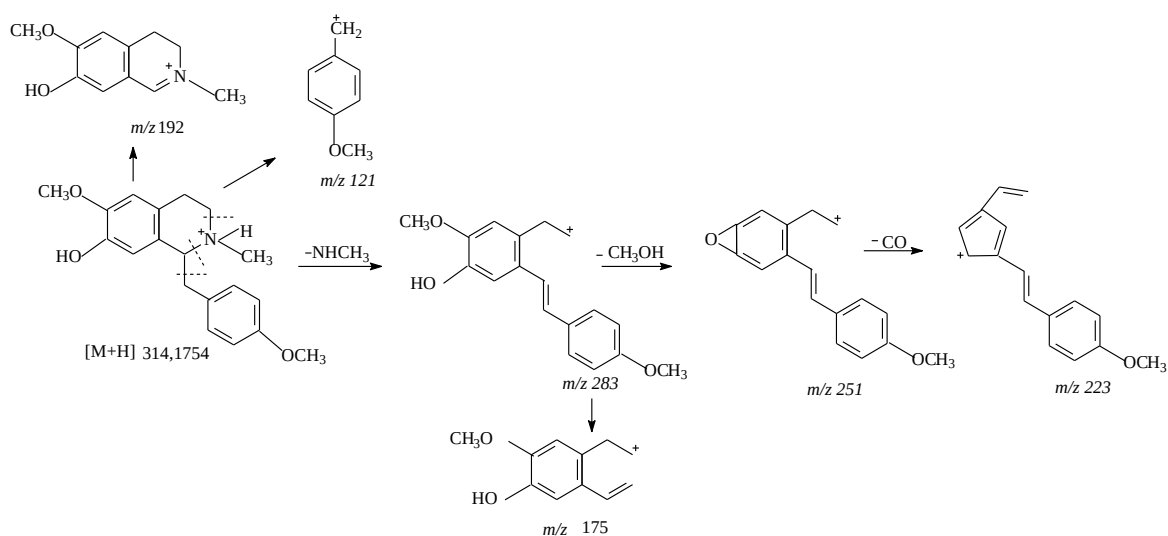
**Figura 41** - Espectro LC-MS/MS para a coclaurina

**Esquema 18** - Proposta de fragmentação para o íon 286,1435 observado em LC-MS/MS

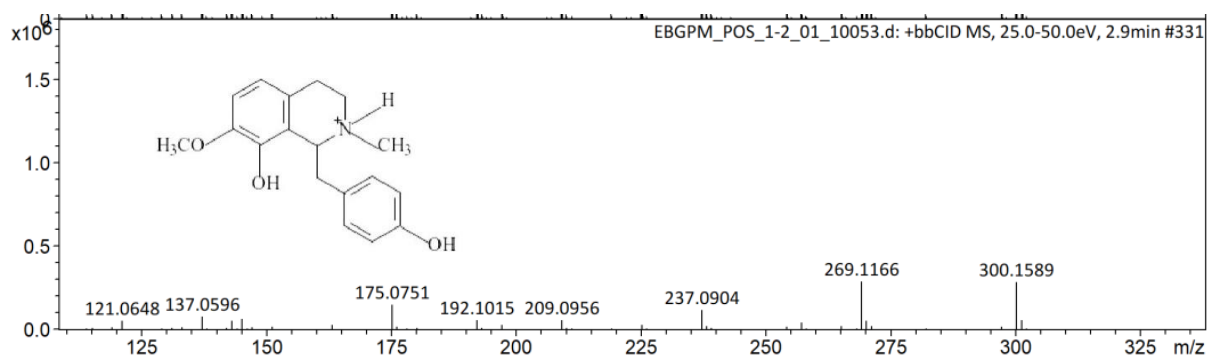
Um íon isobárico com  $m/z$  314 (**Figura 42**) foi observado. Este íon com tempo de retenção ( $t_r = 5,4$  min.) apresentou um padrão de fragmentação diferente dos outros dois. Inicialmente ocorreu a perda de metilamino 31 Da ( $314 \rightarrow 283$ ) e, sequencialmente, perdas de metanol 32 Da ( $283 \rightarrow 251$ ) e perda de 28 Da CO ( $251 \rightarrow 223$ ). A comparação destes fragmentos com fragmentos de íons com mesma massa descritos na literatura LIMA *et al.* (2020) permitiu identificar o composto como sendo a *N*-O-dimetilcoclaurina.

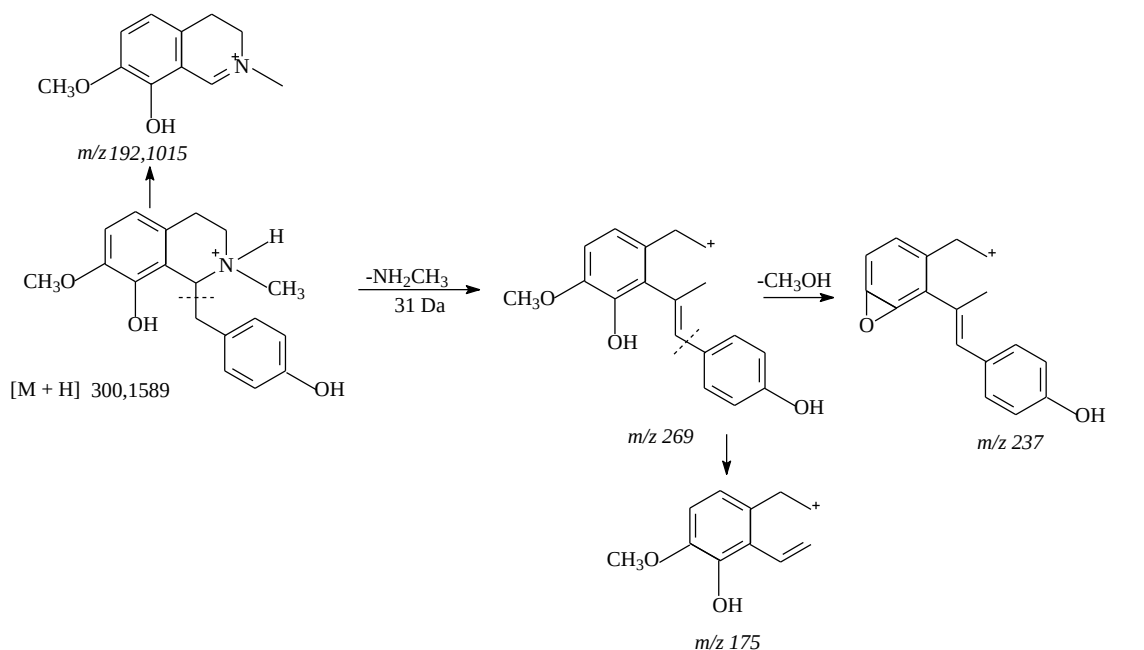
No **Esquema 19** estão demonstradas as possíveis fragmentações para os íons precursores  $m/z$  314.

**Figura 42** - Espectro LC-MS/MS para a *N*-O-dimetilcoclaurina

**Esquema 19** - Proposta de fragmentação para o íon 314,1754 observado em LC-MS/MS

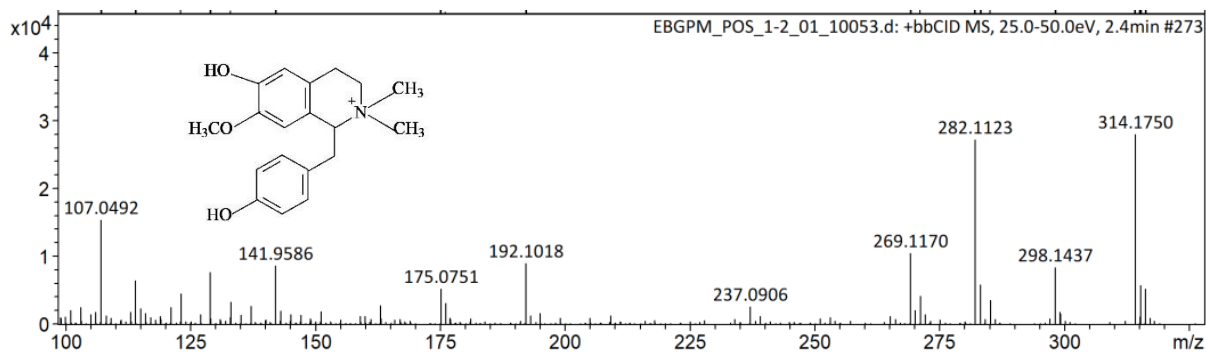
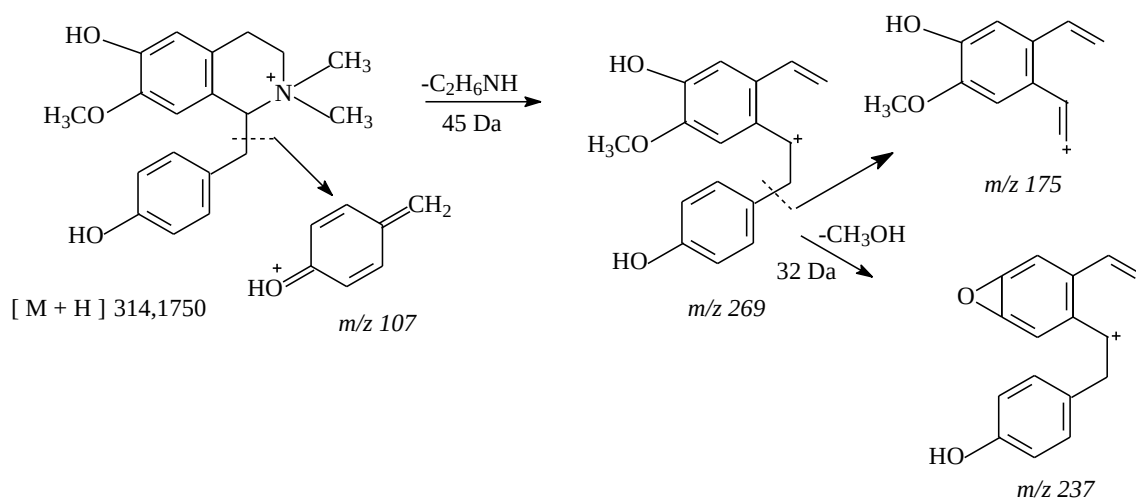
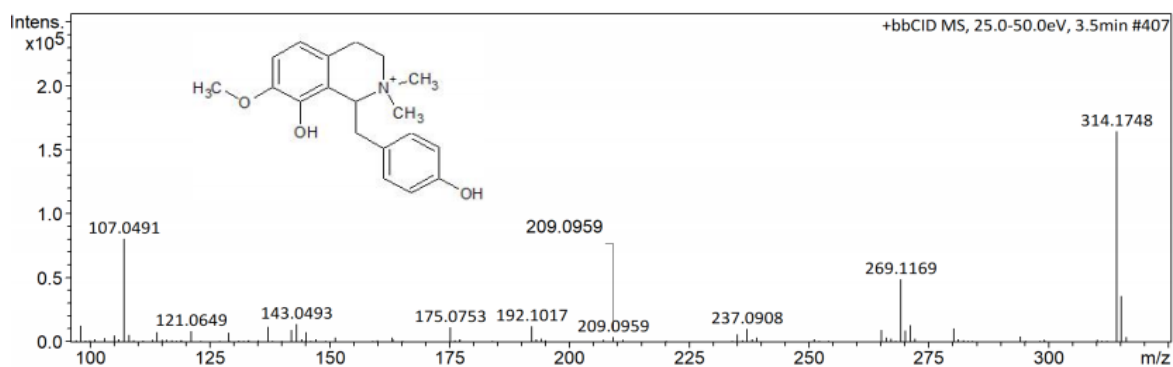
Para o tempo de retenção ( $t_r = 2,9$  min.) foi observado o espectro  $[M+H]^+$  com  $m/z$  300,1589 (**Figura 43**) o que pode, segundo SHANGGUAN *et al.* (2018), indicar os compostos identificados, como *N*-metilcoclaurina e/ou jusifina, ambos obtidos, anteriormente, de plantas do gênero *Stephania* (KASHIWABA *et al.*, 1997; SCHMIDT *et al.*, 2005). O padrão de fragmentação observado para este íon está de acordo com LI, *et al.*, (2016) e corresponde ao composto jusifina. Sua proposta de fragmentação está demonstrada no **Esquema 20**.

**Figura 43** - Espectro LC-MS/MS para a Jusifina

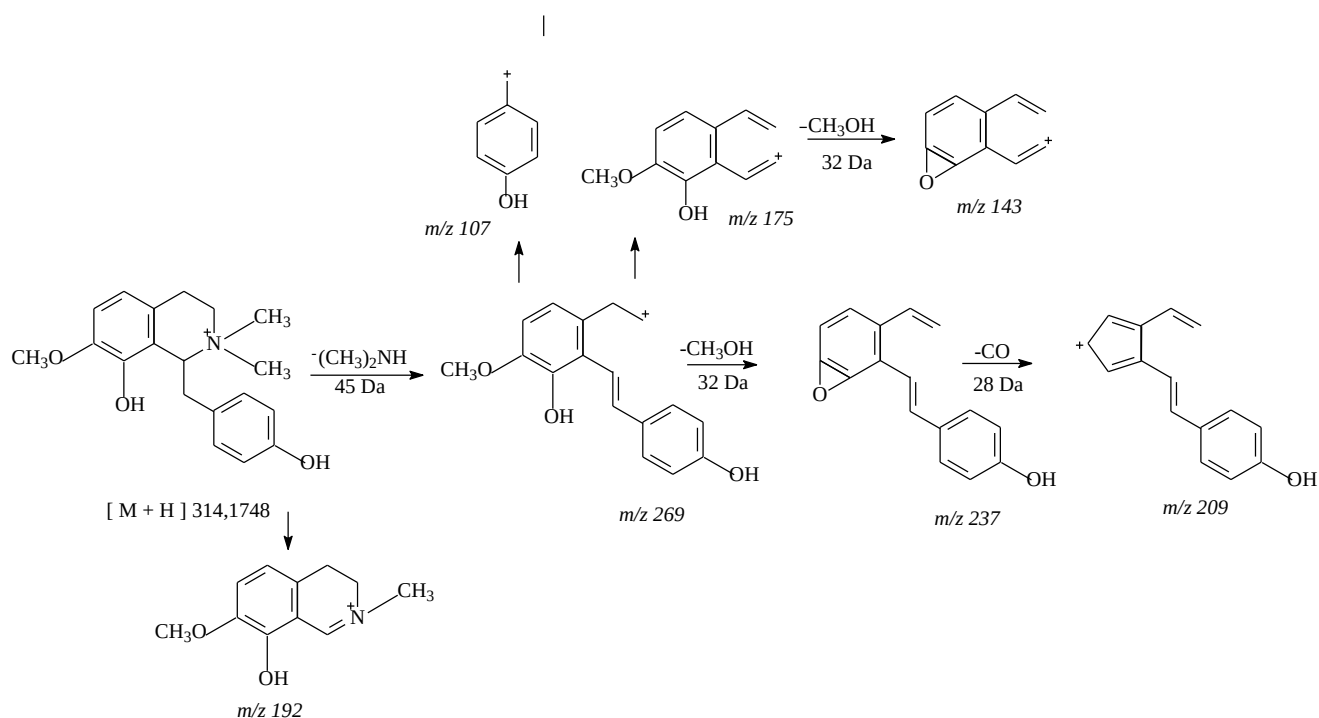
**Esquema 20** - Proposta de fragmentação para o íon 300,1589 observado em LC-MS/MS

Outros dois íons isobáricos com  $m/z$  314  $[\text{M}]^+$  foram obtidos nos tempos de retenção ( $t_r$  2,4 min.) (**Figura 44**), ( $t_r$  = 3,6 min.) (**Figura 45**). Os padrões de fragmentação semelhantes foram observados para esses compostos em que, inicialmente, houve a perda de 45 Da correspondente a saída de dimetilamino  $[\text{NH}(\text{CH}_3)_2]$  ( $314 \rightarrow 269$ ) seguido pela perda de 32 Da relativo à molécula de metanol ( $269 \rightarrow 237$ ) e, posteriormente, a perda de 28 Da correspondente a saída de CO ( $237 \rightarrow 209$ ). A perda inicial de 45 Da permitiu inferir que os compostos são aminas quaternárias.

O íon com  $m/z$  107, presente nos dois espectros, permitiu verificar a presença de uma hidroxila ligada em C-10 no anel C. O íon com  $m/z$  175 comum a ambos os espectros de fragmentação, permitiu confirmar a presença de uma hidroxila e uma metoxila ligada no anel A. Diante disso, foi possível inferir que os compostos, em questão, são isômeros constitucionais diferindo apenas nas posições em que o grupo metoxila e hidroxila encontram-se ligados no Anel A. Dessa forma, os padrões de fragmentação obtidos foram comparados aos dados descritos na literatura JIAO *et al.* (2018); SINGH *et al.* (2017) e identificados como lotusina e oblongina. A fragmentação da lotusina está baseada em (GUO *et al.*, 2019) e a oblongina está adaptada de acordo com (BAJPAI, *et al.*, 2016), os quais estão representados nos esquemas **21 e 22**.

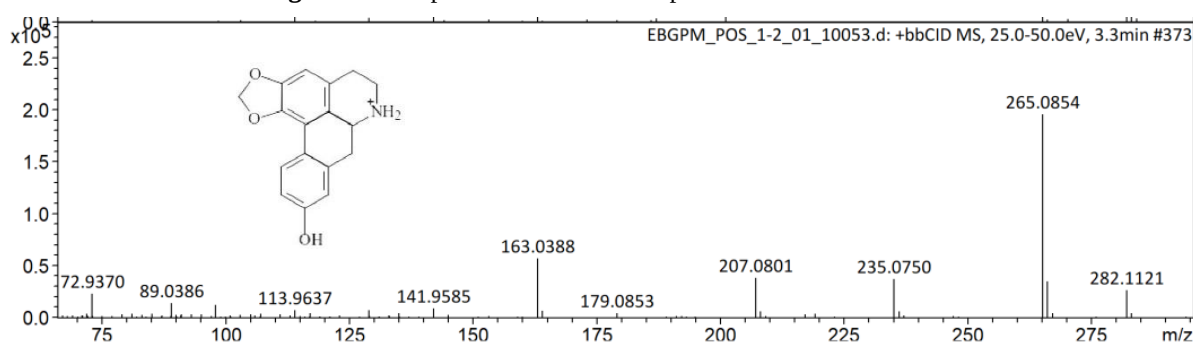
**Figura 44** - Espectro de LC-MS/MS para a lotusina**Esquema 21** - Proposta de fragmentação para o íon 314,1750 observado em LC-MS/MS**Figura 45** - Espectro de LC-MS/MS para a oblongina

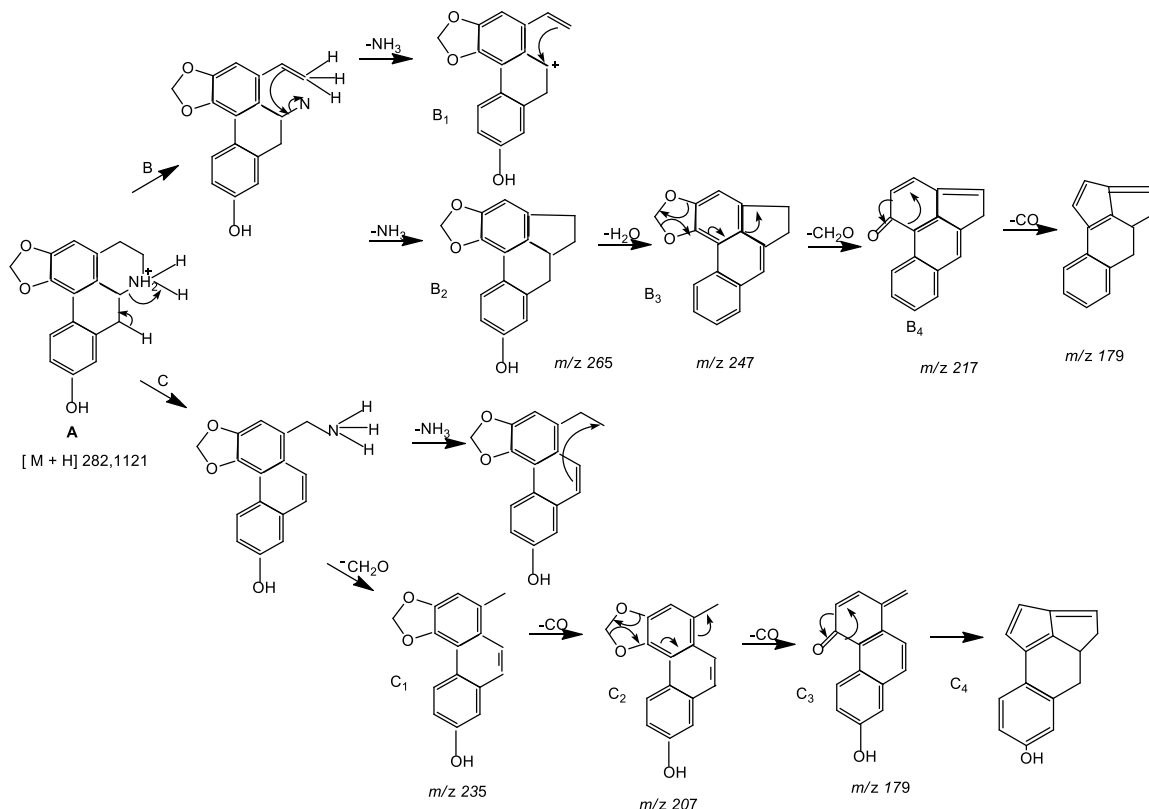


**Esquema 22** - Proposta de fragmentação para o íon 314,1748 observado em LC-MS/MS

### Alcalóides Aporfinicos.

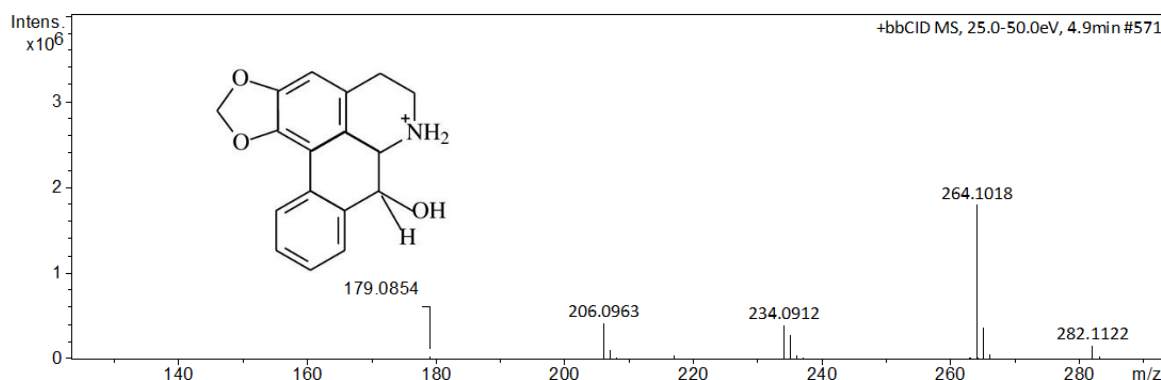
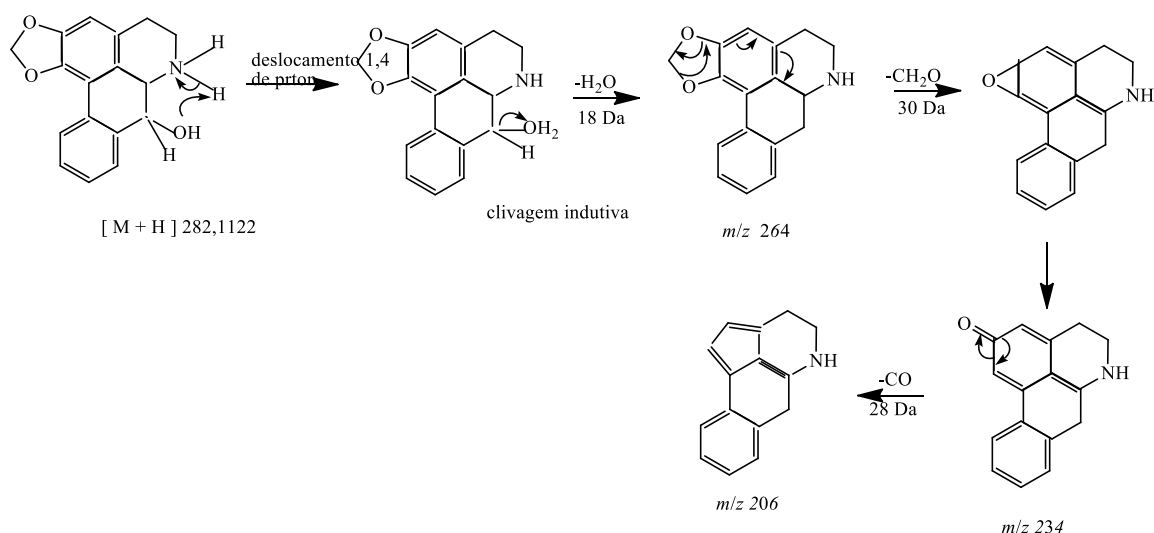
Foram observados dois espectros  $[M+H]^+$  de íons isobáricos com  $m/z$  282, nos tempos de retenção  $t_r=3,3$  min, 4,9 min e 5,6 min.. O primeiro íon (**Figura 46**) teve fragmentações referente a perda de 17 Da relativo a molécula de amônia (282  $\rightarrow$  265), seguido pela perda de 30 Da ( $CH_2O$ ) (265  $\rightarrow$  235) e, subsequente, perda de CO (235  $\rightarrow$  207). Os fragmentos observados foram comparados aos da literatura AVULA *et al.*, (2018) e foi identificado como o alcaloide aporfínico anolobina, os quais podem ser visto no **Esquema 23**.

**Figura 46** - Espectro de LC-MS/MS para a anolobina

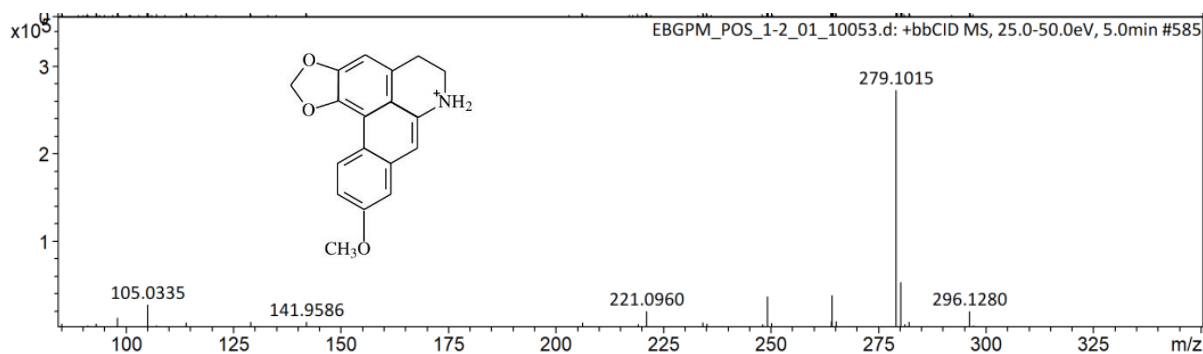
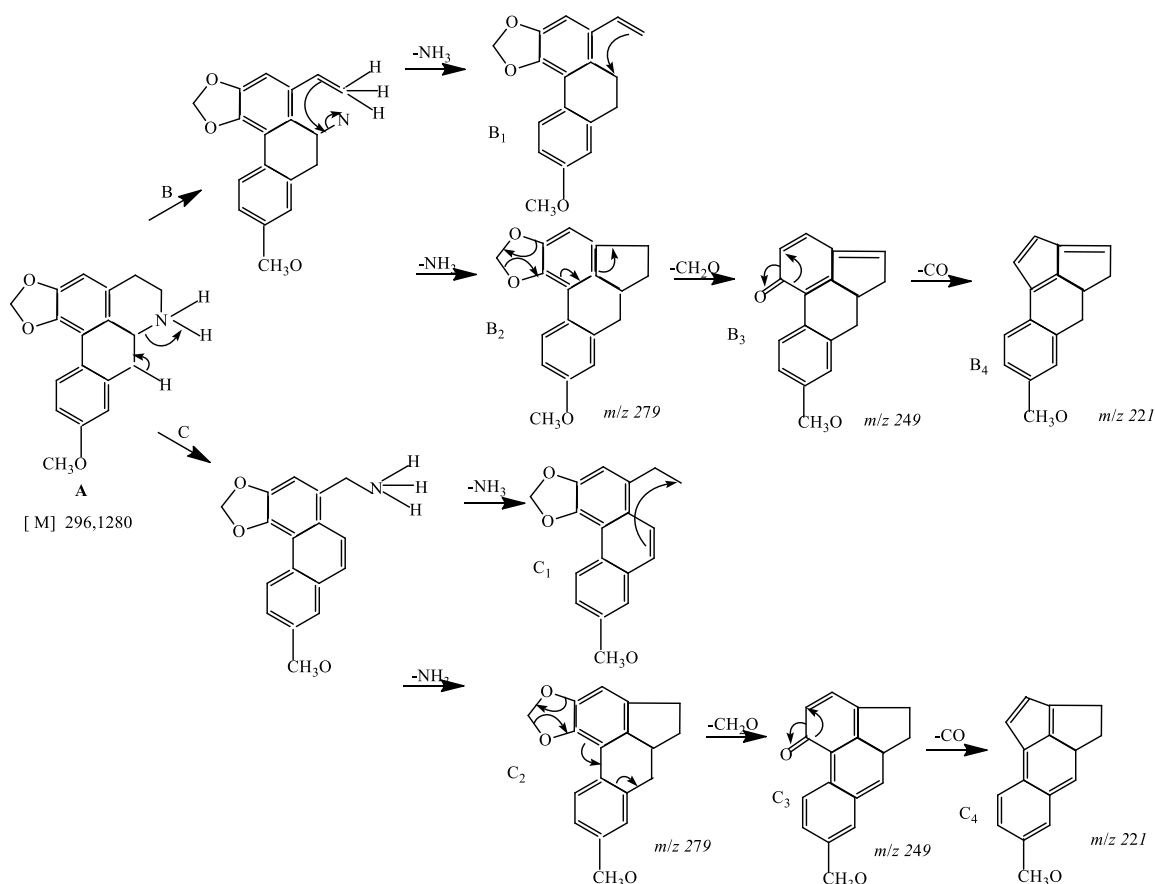
**Esquema 23** - Proposta de fragmentação para o 282,1121 observado em LC-MS/MS

Além do padrão de fragmentação característico para a anolobina, vários padrões de fragmentação comuns são observados para tipos de alcalóides aporfínicos que produzem fragmentos característicos, assim os fragmentos são modificados de acordo com os grupos ligados aos anéis A e B. Iniciando pelo nitrogênio que é o sítio de protonação mais favorecido porque a molécula protonada nessa posição tem a menor energia, de acordo com cálculos computacionais baseados na teoria do funcional da densidade, quando comparado aos sítios de protonação no oxigênio. Tal preferência é observada até mesmo para nitrogênios imínicos fazendo ou não parte de sistemas aromáticos (QING *et al.*, 2020).

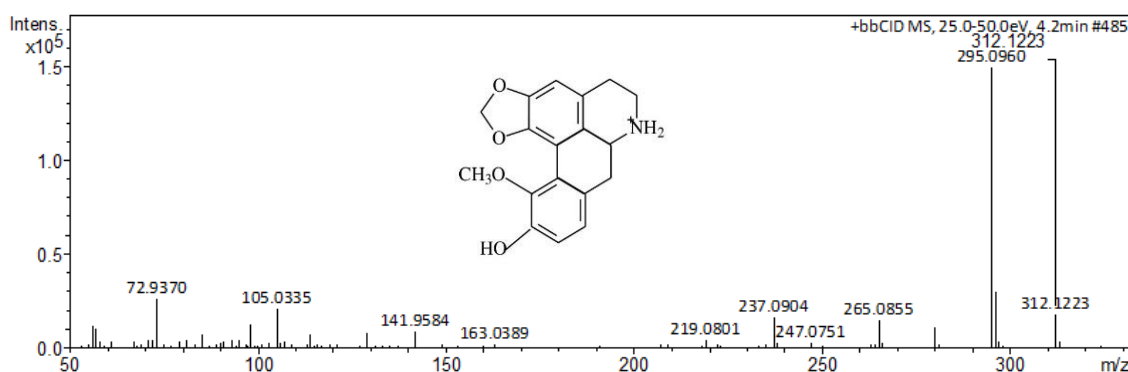
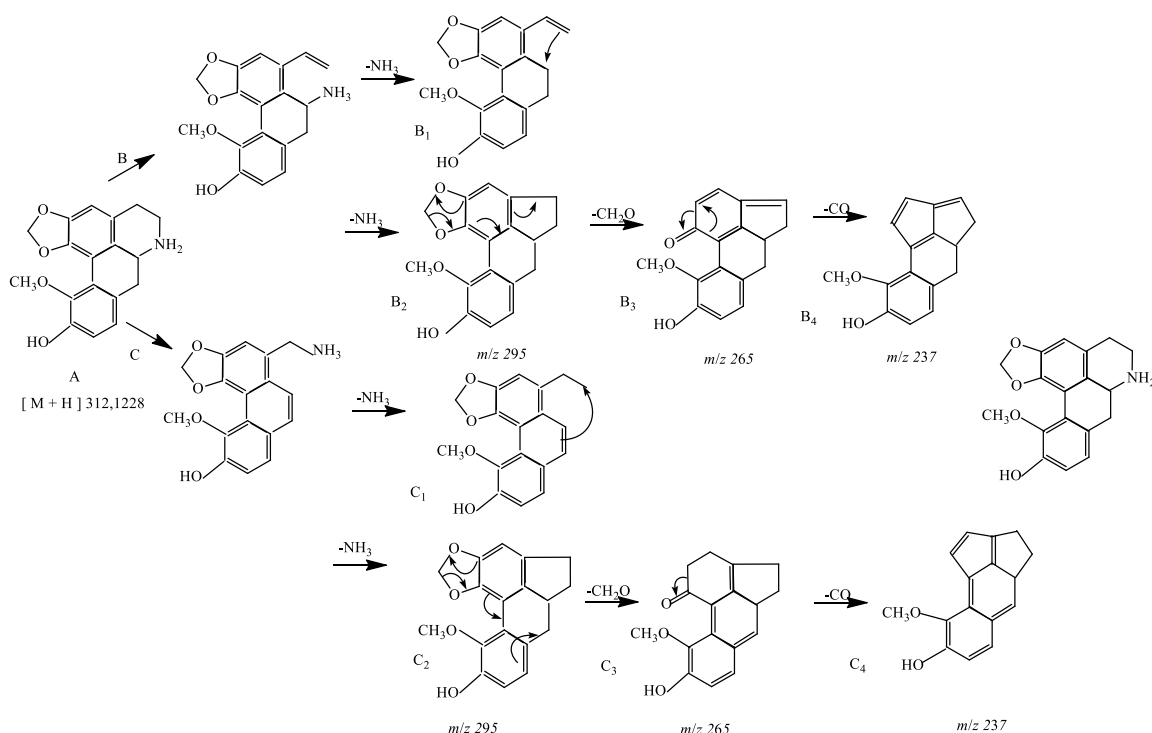
O segundo alcaloide isobárico em  $m/z$  282 (**Figura 47**) apresentou em seu espectro MS/MS uma perda inicial de 18 Da ( $-\text{H}_2\text{O}$ ) ( $m/z$  282  $\rightarrow$  264), seguido por perdas de 30 Da ( $-\text{CH}_2\text{O}$ ) ( $m/z$  264  $\rightarrow$  234) e 28 Da ( $-\text{CO}$ ) ( $m/z$  234  $\rightarrow$  206). A fragmentação está coerente com a do alcalóide aporfínico norushinsunina. Sendo que a confirmação desta substância foi realizada por meio de comparação do espectro de  $\text{MS}^2$  por SILVA *et al.* (2012) e LIMA *et al.* (2020), conforme **Esquema 24**.

**Figura 47** - Espectro de LC-MS/MS para a norushinsunina**Esquema 24** - Proposta de fragmentação para o íon 282,1122 observado em LC-MS/MS

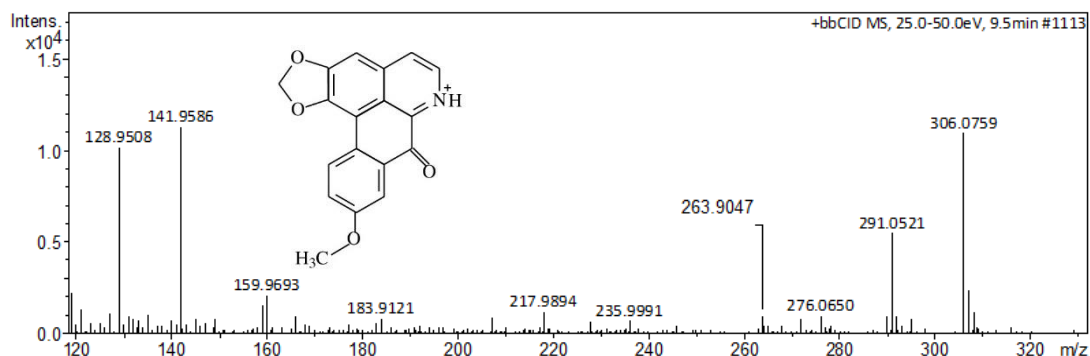
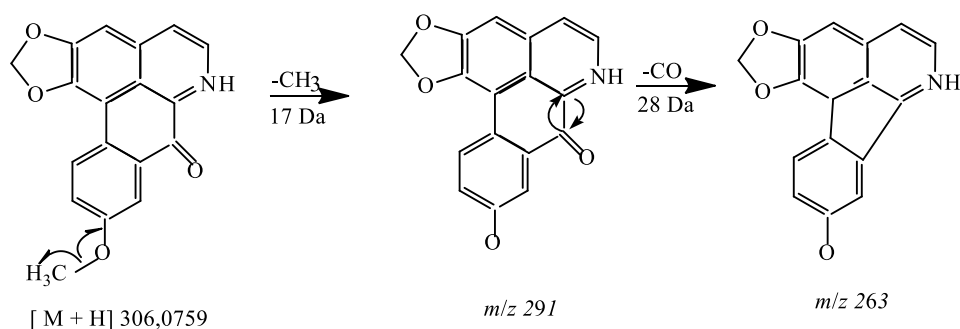
O espectro de massas  $[M+H]^+$  do íon com  $m/z$  296 no tempo de retenção  $t_r=5,0$  min (**Figura 48**) apresentou padrão de fragmentação típica de alcaloides aporfínicos. Inicialmente foi observado o fragmento referente a perda 17 Da de amônia ( $296 \rightarrow 279$ ) e, sequencialmente, perdas de 30 Da  $CH_2O$  ( $279 \rightarrow 249$ ) referente a ruptura da ponte metilenodióxi ligada no anel A e perda de 28 Da CO ( $249 \rightarrow 221$ ). As fragmentações observadas, conforme **Esquema 25**. Foram comparadas com as descritas na literatura CARNEVALE NETO *et al.* (2020) permitindo identificar o composto como sendo o alcaloide aporfínico xilopina comum em diversos gêneros da família Annonaceae.

**Figura 48** - Espectro LC-MS/MS para a xilopina**Esquema 25** - Proposta de fragmentação para o íon 296,1280 observado em LC-MS/MS

O íon  $[\text{M}+\text{H}]^+$  com  $m/z$  312 no tempo de retenção  $t_r = 4,2$  (**Figura 49**) apresentou fragmentações referentes a perda de 17 Da referente a amônia ( $312 \rightarrow 295$ ) e, sequencialmente, perda de 30 Da do grupo  $\text{CH}_2\text{O}$  ( $295 \rightarrow 265$ ) e perda de 28 Da referente a CO ( $265 \rightarrow 237$ ). Comparando as fragmentações obtidas com fragmentações para íons  $[\text{M}+\text{H}]^+$  de mesma massa na literatura, YAN *et al.* (2013), foi possível identificar o composto como sendo o alcaloide aporfínico nandigerina. A proposta de fragmentação está demonstrada no **Esquema 26**.

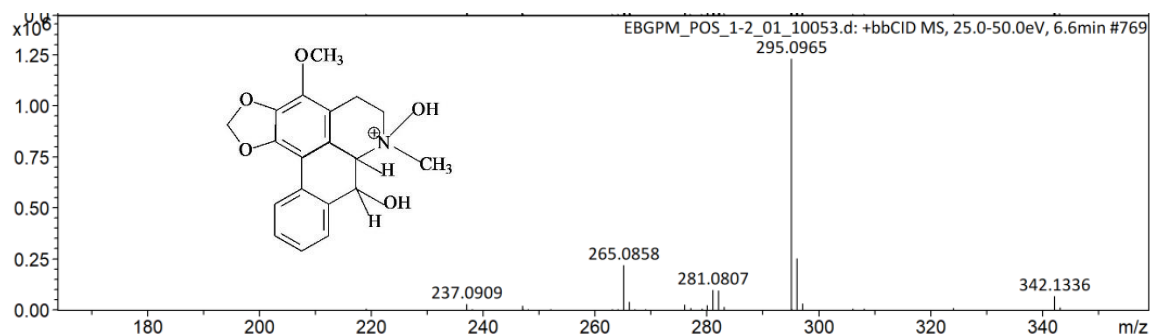
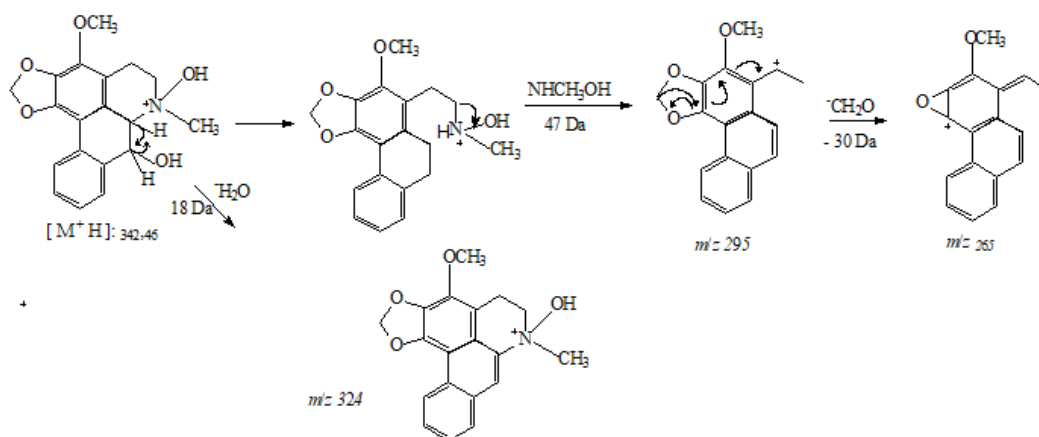
**Figura 49** - Espectro LC-MS/MS para a nandigerina.**Esquema 26** - Proposta de fragmentação para o íon 312,1223 observado em LC-MS/MS

No espectro de massas do íon  $[M+H]^+$  com  $m/z$  306 no tempo de retenção  $t_r=9,5\text{min}$  (**Figura 50**) foram observadas perdas sequenciais de -15Da referente a perda de metila e -28Da referente a perda de CO ligado em C-7, consistentes com o esqueleto oxoaporfínico. O alcaloide oxoaporfínico de massa molecular de  $C_{18}H_{12}NO_4$  foi identificado como sendo a lanuginosina, de acordo com (DANTAS *et al.*, 2020). O **Esquema 27** está a proposta de fragmentação para a lanuginosina de baseada com (DA SILVA, *et al.*, 2017).

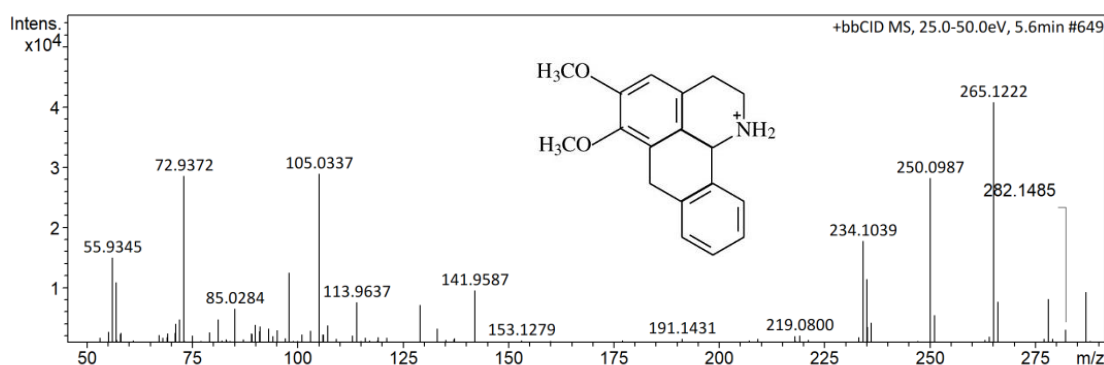
**Figura 50** - Espectro LC-MS/MS para a lanuginosina**Esquema 27** - Proposta de fragmentação para o íon 306,0759 observado em LC-MS/MS

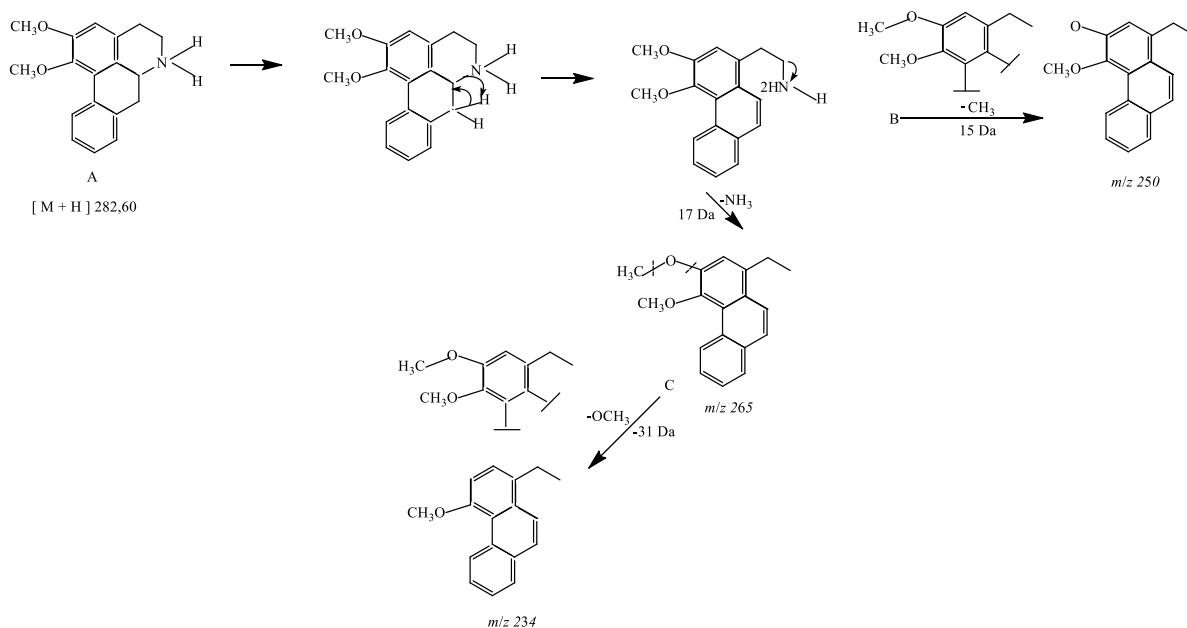
O espectro de massas do íon  $[M + H]^+$  com  $m/z$  342 (**Figura 51**) com o tempo de retenção de (6,6 min), já isolado de *D. quitarensis* apresentou fragmentações típicas para alcaloides do tipo *N*-metil-*N*-óxido guatterina.

Conforme comparação do trabalho de SOUZA *et al.* (2020), onde foram apresentados os fragmentos do espectro de massas do íon  $m/z$  342 com as perdas de 18 Da ( $-H_2O$ ) ( $m/z$  342  $\rightarrow$  324) e 47 Da ( $-NHOCH_3$ ) ( $m/z$  342  $\rightarrow$  295). A perda inicial de 47 Da está de acordo com uma estrutura de *N*- metil *N* - óxido aporfina. Além disso, a perda subsequente de 30 Da ( $CH_2O$ ) ( $m/z$  295  $\rightarrow$  265) é consistente com a presença de um grupo metilenodioxí no anel A. O **Esquema 27** apresenta a proposta de fragmentação para o íon  $m/z$  342, de acordo com De Souza *et al.* (2021).

**Figura 51** - Espectro LC-MS/MS para a N-óxido guatterina**Esquema 28**-Proposta de fragmentação para o íon 342,1336 observado em LC-MS/MS

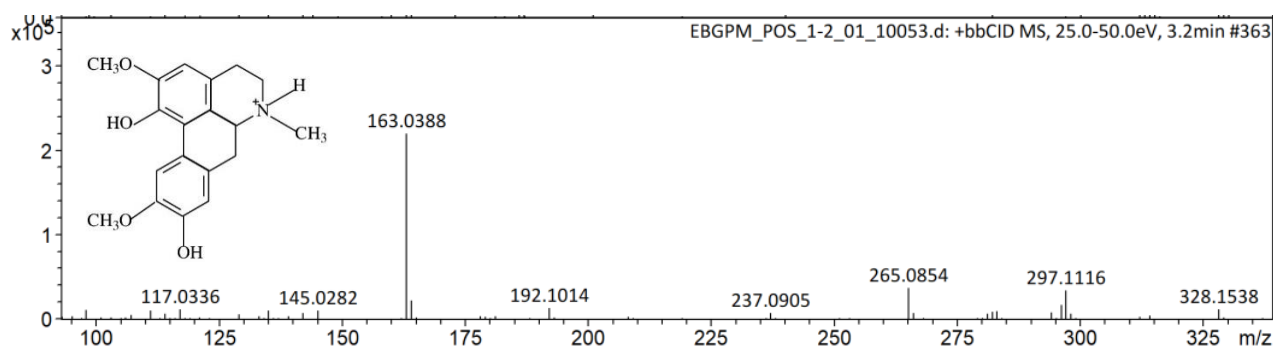
A molécula protonada em  $m/z$  282 no tempo de retenção  $t_r = 5,6$  min apresentada em seu espectro (**Figura 52**) perde subsequentes de 17, 15 e 15 Da. Portanto, a fragmentação do pico em  $m/z$  282 é consistente com o alcalóide aporfina nornuciferina, já identificado por (SOARES *et al.*, 2015; LUO *et al.* 2005, DENG *et al.*, 2016). A proposta de fragmentação para a nornuciferina, adaptada de Lima 2020, está no **Esquema 28**.

**Figura 52** -Espectro de LC-MS/MS para a nornuciferina

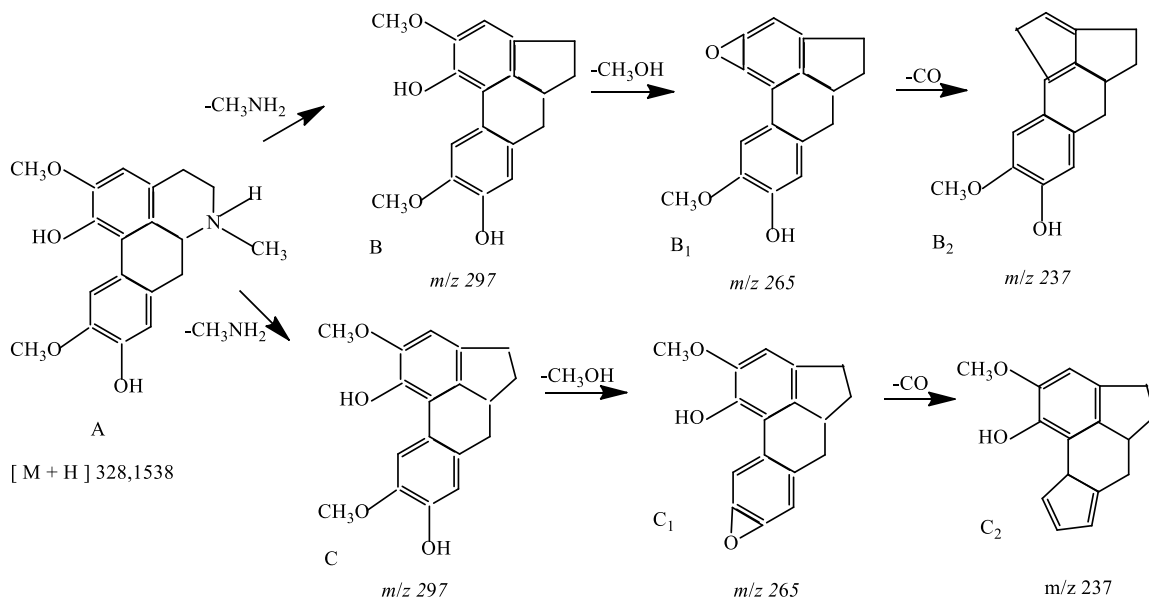
**Esquema 28** - Proposta de fragmentação para o íon 282,1485 observado em LC-MS/MS

No espectro de massas do  $[M+H]^+$   $m/z$  328 no tempo de retenção  $t_r = 3,2$  (**Figura 53**), foram observadas fragmentações referentes a perda de 31 Da do grupo metilamino ( $328 \rightarrow 297$ ), seguido pela perda de 32 Da da molécula de metanol ( $297 \rightarrow 265$ ) e, sequencialmente, perda de 28 Da do CO ( $265 \rightarrow 237$ ).

A comparação desses fragmentos, típicos de alcaloides isoquinolínicos, com alcaloides descritos na literatura YU LI *et al.* (2015) foi possível identificar este composto como sendo o alcaloide aporfínico isoboldina. A proposta de fragmentação para a isoboldina estão apresentadas no **Esquema 29**.

**Figura 53** - Espectro LC-MS/MS para a isoboldina

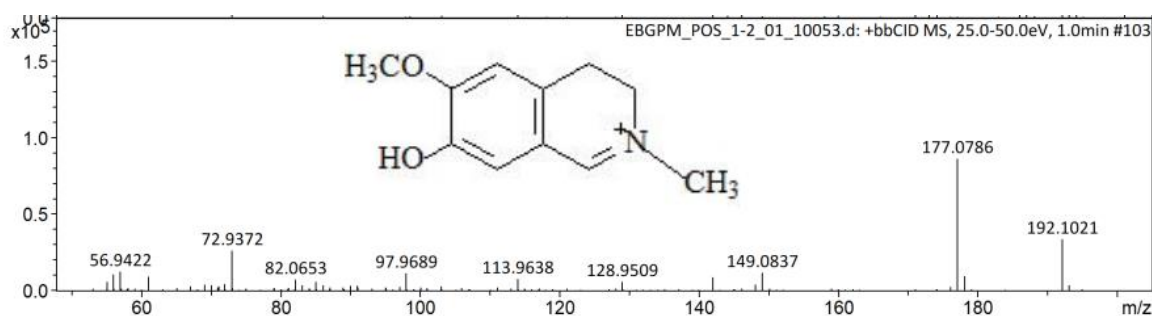


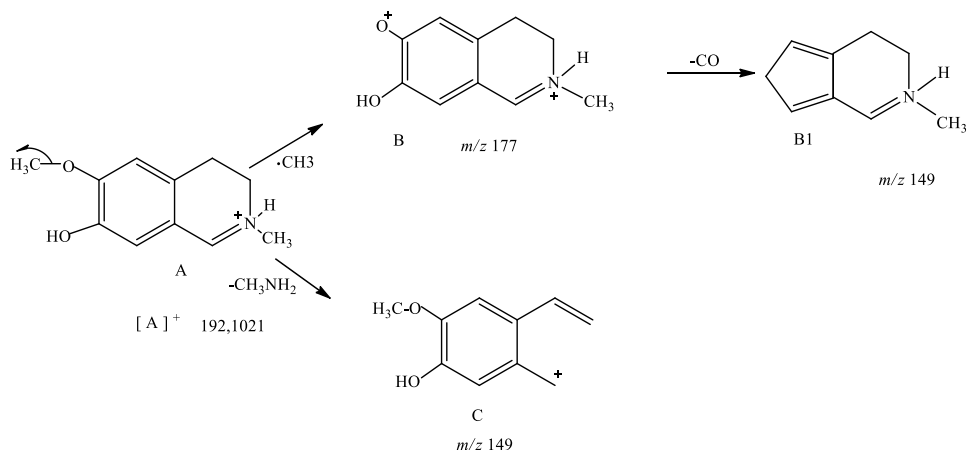
**Esquema 29** - Proposta de fragmentação para o íon 328,1538 observado em LC-MS/MS

### Outros alcaloides

O íon  $[\text{M} + \text{H}]^+$  com  $m/z$  192,1021 no tempo de retenção  $t_r = 1,0$  (**Figura 54**) está em concordância com a fragmentação da Picnarrina (AVULA *et al.*, 2018). A Picnarrina é um derivado simples dos alcaloides isoquinolinicos, pode ser definido como aquele que contém somente um núcleo isoquinolínico.

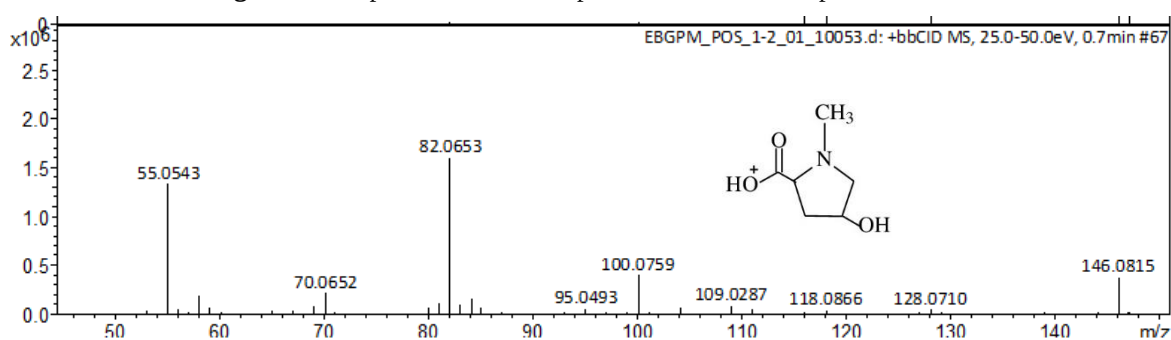
As principais fragmentações observadas são referentes a 15 Da, perda de metila ( $192 \rightarrow 177$ ) e 28 Da referente ao grupo  $\text{-C}_2\text{H}_4$  (etileno) ( $177 \rightarrow 149$ ), conforme a proposta de fragmentação no **Esquema 30**.

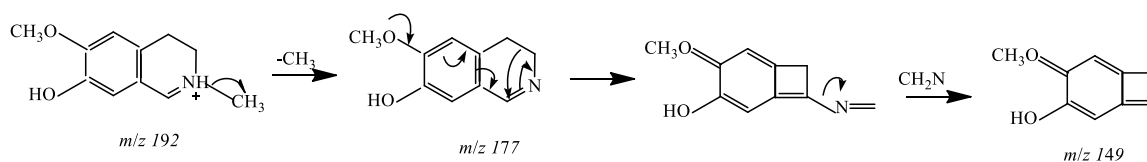
**Figura 54** - Espectro LC-MS/MS para a Picnarrina

**Esquema 30** - Proposta de fragmentação para o íon 192,1021 observado em LC-MS/MS

Dois alcaloides, um do tipo pirrolidínico (4-hidróxi-*N*-metilprolina) e a geovanina do tipo azaantracênico, foram identificados neste estudo. O íon  $[M + H]^+$  com  $m/z$  146 no tempo de retenção  $t_r = 0,7$  (**Figura 55**), produziu fragmentos relativos a de 18 Da perda de água ( $146 \rightarrow 128$ ), sequencialmente perda 28 Da referente ao CO ( $128 \rightarrow 100$ ) e, novamente, perda de 18 Da água ( $100 \rightarrow 82$ ).

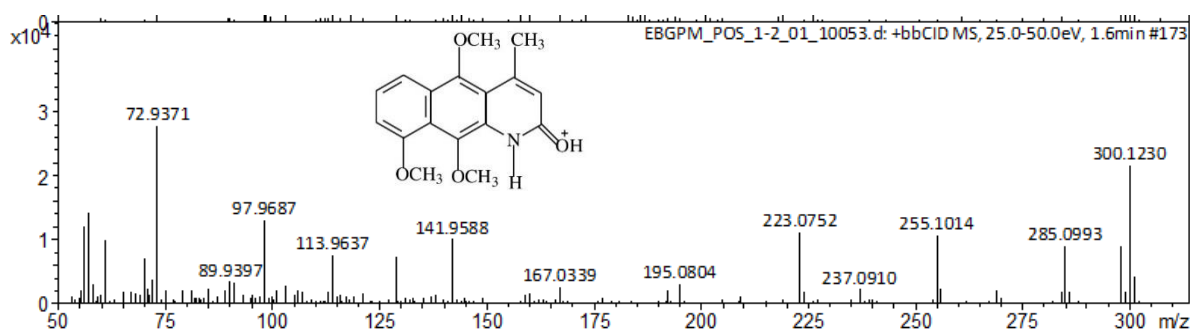
A comparação destes fragmentos com dados da literatura SERVILLO *et al.* (2016) para íons  $[M]^+$  de mesma massa e utilização da ferramenta gratuita CFM-ID (Modelo de identificação de fragmentação de metabolitos secundários) (<https://cfmid.wishartlab.com>) permitiu identificar o composto como sendo a 4-hidroxi-*N*-metilprolina, conforme **Esquema 31**.

**Figura 55** - Espectro LC-MS/MS para 4-hidróxi-*N*-metilprolina**Esquema 31** - Proposta de fragmentação para o íon 146,0815 observado em LC-MS/MS

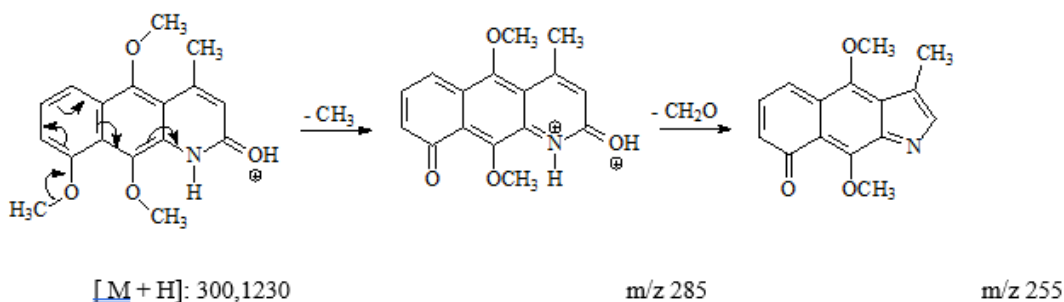


Para o alcaloide azaantracênico que apresentou no espectro do íon  $[M+H]^+$  com  $m/z\ 300$  no tempo de retenção  $t_r = 1,6$  (**Figura 56**) foram observados fragmentos  $MS^2$  relativos à perda de 15 Da ( $300 \rightarrow 285$ ) referente a perda de metila e perda de 30 Da ( $285 \rightarrow 255$ ) referente à ruptura do anel metilenodióxi. Estes fragmentos quando comparados aos da literatura, DE OLIVEIRA *et al.* (1987) foi identificado como a geovanina, conforme a fragmentação proposta no **Esquema 32**.

**Figura 56** - Espectro LC-MS/MS para geovanina



**Esquema 32** - Proposta de fragmentação para o íon 300,1230 observado em LS-MS/MS



A partir dos dados obtidos e análises correspondentes, observou-se que UHPLC-QTOF-MS apresentou maior poder de resolução e exatidão de massa, assim, foi mais adequado para determinação de vários íons precursores da composição da amostra.

Em comparação, o ESI-MS não foi capaz de identificar corretamente a composição elementar, apresentando poucos íons precursores, mas de toda forma foi

útil na realização de experimento de MS/MS, pois, conseguiu detectar sinais das massas moleculares correspondente vários fragmentos.

Usando a abordagem dos resultados fornecidos pelo analisador ESI-MS para *D. quitarensis* e o UHPLC-QTOF-MS para a *G. punctata*, foram identificados 4 alcaloides para a *D. quitarensis* todos do tipo aporfínico, portanto sendo considerada uma fonte promissora de aporfínicos *sensu stricto*, apresentando padrão de substituição preferencialmente nas posições C-1 e C-2, C6 e C7, sendo um deles derivado oxoaporfínico.

Para a *G. punctata* foi detectado um maior número de alcaloides, vinte alcaloides, derivados do esqueleto isoquinolínico apresentando padrão de substituição preferencialmente nas posições C-6 e C-7, e substituição no anel C, aporfínicos com substituições frequentes no anel A e D e dois de outras classes. Foi traçado o perfil químico da *D. quitarensis* por infusão direta e da *G. punctata* por LC-MS, com base em comparações descritas na literatura. Estes dados reforçam o significado quimiotaxonômico dos alcaloides isoquinolínicos e benzilisoquinolínicos para a família Annonaceae, em particularmente para os gêneros *Duguetia* e *Guatteria*.

Sabe-se que a análise por ESI-MS é bastante promissora, pois esse método pode ser útil para a obtenção de um perfil metabólico dos constituintes químicos presentes no extrato bruto e frações. Por outro lado, os dados obtidos precisam ser analisados com cautela, principalmente quando as análises são realizadas via infusão direta, devido aos problemas de supressão iônica de espécies que são mais facilmente ionizáveis mascarando a presença de espécies menos ionizáveis (SIQUEIRA, 2015).

Neste sentido, pode-se melhorar a segurança analítica com experimentos de LC-MS (modo positivo e negativo) ou até mesmo LC-MS/MS, com a separação cromatográfica das substâncias de modo a permitir a identificação estrutural de um maior número de metabólitos secundários. A técnica de LC-MS tem-se tornado uma ferramenta extremamente poderosa na análise de substâncias em misturas complexas. Como esperado, a análise de QTOF-MS também exibiu a presença de alcaloides isobáricos minoritários relacionados aos íons registrados por LC-MS.

No entanto, deve-se notar que a identificação de compostos isobáricos e minoritários na análise direta de LC-MS apresenta limitações e que a utilização da espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma alternativa valiosa para a resolução de compostos isobáricos.

A partir deste ponto de vista, essa estratégia pode ser muito interessante para o estudo de compostos químicos presentes em amostras complexas, mesmo que o foco não seja a descoberta de novas drogas. Assim, esse processo é considerado prévio para análise da amostra, antes dos processos clássicos de isolamento e identificação de compostos.

## 5.2 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

### 5.2.1 Avaliação da Atividade Antioxidante pelo método do DPPH (2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazil)

De maneira simples o radical livre é um átomo ou molécula que possui um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Isso o torna instável e altamente reativo, fazendo com que esteja sempre buscando capturar ou ceder elétrons das células à sua volta. Sob condições normais, os radicais livres são essenciais para o funcionamento do organismo. Os radicais livres são produzidos por modificações químicas de proteínas, lipídios, carboidratos e nucleotídeos, resultando em uma variedade de consequências biológicas, incluindo lesão tecidual, mutação, carcinogênese, comprometimento do sistema imunológico, qualidade de vida, doenças e morte celular (DE VASCONCELOS *et al.*, 2014).

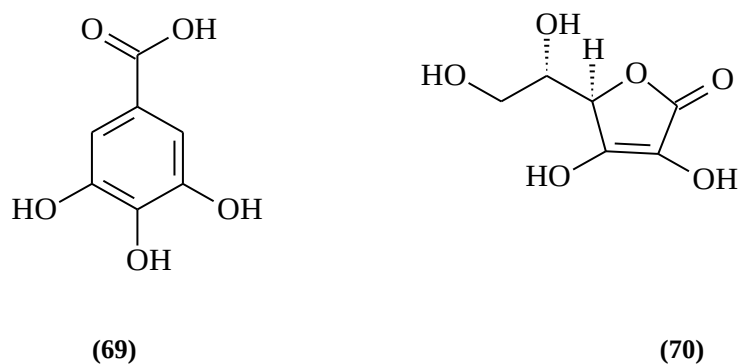
Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e frequentemente encontrados são os compostos fenólicos, tais como os flavonoides. Os compostos fenólicos são substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais, os quais são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução. Segundo TAIZ e ZEIGER (2004), os fenóis vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos: alguns são solúveis apenas em solventes orgânicos, outros são ácidos carboxílicos e glicosídeos solúveis em água e há ainda, aqueles que são grandes polímeros insolúveis. Dentre eles, destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos e ligninas. Esses compostos fenólicos possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Os polifenóis possuem ações antioxidantes e também são capazes de inibir enzimas digestivas, essas duas ações podem diminuir o risco de doenças cardiovasculares e câncer (FRANCO *et al.*, 2018). Além disso, os polifenóis isolados a

partir de várias fontes vegetais têm mostrado capacidade para inibir enzimas digestivas incluindo a lipase e  $\alpha$ -amilase, *in vitro*, e desempenhando um papel positivo no tratamento da obesidade (TAN, CHANG e ZHANG, 2017).

Esses compostos têm a capacidade de doar átomos de hidrogênio e, portanto, inibir as reações em cadeia provocadas pelos radicais livres. Existem duas categorias de antioxidantes, os de origem natural e os designados sintéticos (CHEUNG, CHEUNG, OOI, 2003). Os antioxidantes naturais com núcleo fenólico, como  $\alpha$ -tocoferol, quercetina, ácido gálico (69) e o ácido ascórbico (70) (antioxidantes naturais) (Figura 57) são os mais comuns.

**Figura 57** – Estruturas do ácido gálico (69) e do ácido ascórbico (70)



Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias e extratos; dentre os mais utilizados, destacam-se os métodos de sequestro dos radicais orgânicos 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfônico (ABTS) e 1,1-difenil-2-picrilhidrazina (DPPH), por serem relativamente simples, rápidos e de baixo custo.

As técnicas se baseiam em reações de transferência de elétrons, em que um composto antioxidante reduz um substrato oxidante (Pazinatto, 2008).

A quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente ( $CE_{50}$ ), também chamada de concentração inibitória ( $CI_{50}$ ). Quanto menor o valor de  $CE_{50}$  apresentado para a amostra, menor será a concentração da amostra necessária para reduzir 50% do radical livre DPPH. Ou seja, quanto maior o sequestro de DPPH por uma amostra, menor será a sua  $CE_{50}$  e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA *et al.*, 2007).

A avaliação preliminar qualitativa dos extratos brutos etanólico e metanólico revelando a presença de compostos fenólicos sugeriu a avaliação do potencial

antioxidante, conforme as **Tabelas 8 e 9**, pois de acordo com HASMIDA *et al.* (2014), a atividade antioxidante dos compostos fenólicos está relacionada com a presença dos grupos hidroxilas (-OH) e a dupla ligação entre os átomos de carbono (C=C), pois eles podem aumentar a captura de radicais dos compostos.

**Tabela 8** -Atividade antioxidante (%) dos extratos brutos etanólicos em diferentes concentrações (método DPPH).

| Concentração<br>( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) | EBEBM      | EBEDQ      | EBEFL      | EBEGP      | Ácido d <sup>a</sup> |
|-------------------------------------------|------------|------------|------------|------------|----------------------|
| 1                                         | 14,78±3,41 | 1,01±0,67  | 13,67±9,84 | 36,12±2,91 | 20,02±1,47           |
| 3                                         | 27,66±2,59 | 6,30±0,76  | 26,54±3,26 | 39,34±3,99 | 63,27±3,44           |
| 9                                         | 43,62±3,07 | 18,14±0,67 | 30,47±5,29 | 41,43±3,01 | 89,40±2,19           |
| 27                                        | 78,96±6,25 | 56,17±0,25 | 40,93±7,18 | 54,13±2,19 | 93,89±0,51           |
| 81                                        | 89,36±2,16 | 89,59±0,15 | 86,95±3,85 | 82,94±1,99 | 95,17±0,25           |
| 243                                       | 93,14±0,20 | 89,42±0,44 | 91,60±1,74 | 88,86±2,19 | 96,86±0,82           |
| CE 50                                     | 11,1±0,24  | 23,6±0,37  | 34,2±6,56  | 21,4±6,68  | 2,3±0,89             |

a. Ácido Ascórbico usado como controle positivo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n = 3) e reportados como a média ± Desvio Padrão.

**Tabela 9** - Atividade antioxidante (%) dos extratos brutos metanólicos em diferentes concentrações (método DPPH).

| Concentração<br>( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) | EBMBM      | EBMDQ      | EBMFL      | EBMGP      | Ácido ascorbico |
|-------------------------------------------|------------|------------|------------|------------|-----------------|
| 1                                         | 24,09±2,59 | 0,00±0,00  | 2,55±5,55  | 18,58±3,23 | 20,02±1,47      |
| 3                                         | 41,08±1,78 | 1,94±1,45  | 11,41±4,46 | 24,05±0,71 | 63,27±3,44      |
| 9                                         | 71,61±1,16 | 9,48±3,76  | 16,16±2,90 | 35,50±1,29 | 89,40±2,19      |
| 27                                        | 87,31±1,34 | 22,63±2,21 | 33,75±2,32 | 63,16±1,93 | 93,89±0,51      |
| 81                                        | 89,57±0,81 | 53,72±5,92 | 80,15±0,74 | 91,02±0,31 | 95,17±0,25      |
| 243                                       | 88,71±0,56 | 92,35±1,70 | 93,23±2,02 | 90,51±0,31 | 96,86±0,82      |
| CE 50                                     | 4,2±0,75   | 71,3±1,93  | 41,3±4,05  | 17,8±1,95  | 2,3±0,89        |

Ácido Ascórbico usado como controle positivo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n = 3) e reportados como a média ± Desvio Padrão

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) **Tabelas 8 e 9** correspondem ao percentual de DPPH sequestrado pelo antioxidante. As atividades antioxidantes dos extratos de plantas/ervas são frequentemente explicadas pelo conteúdo total de fenólicos e flavonoides (RAHMAN, BISWAS e KIRKHAM, 2006).

Estão disponíveis na literatura vários estudos que demonstram relação entre os teores de fenólicos totais e a atividade antioxidante (BIRUR *et al.*, 2015; NASEER *et al.*, 2015). Observa-se que vários fatores estão envolvidos no efeito antioxidante apresentado pelos fenólicos, tais como a estrutura química e composição dos fitoquímicos fenólicos bioativos, a posição e o número de hidroxilas presentes nas moléculas dos polifenóis, dentre outros (LEMOs JÚNIOR *et al.*, 2011). Além disso, compostos como flavonoides, que contêm grupos funcionais hidroxila, estão entre os principais responsáveis pelos efeitos antioxidantes das plantas (PEREIRA, 2009).

Os percentuais de atividade antioxidante dos extratos alcoólicos foram avaliados nas concentrações de 1, 3, 9, 27, 81 e 243  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e verificou-se que em todos os extratos o percentual de atividade antioxidante aumentou proporcionalmente com a concentração do extrato.

Analisando os resultados na concentração de 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  foi verificado que os extratos **EBMBM** ( $24,09 \pm 2,59$ ) e o extrato **EBEGP** ( $36,12 \pm 2,91$ ) apresentaram maior atividade antioxidante do que o ácido ascórbico utilizado como controle positivo. Nas demais concentrações nenhuma das amostras testadas foram mais ativas que o ácido ascórbico.

Esta elevada atividade sequestradora de radicais livres pode ser explicada pela presença de compostos fenólicos ( $31,89 \pm 1,04$  mg de AG/g de extrato) **EBMBM** e ( $28,50 \pm 1,77$ ) para **EBMGP** em maior concentração quando comparados aos outros extratos. A **Tabela 10** demonstra os resultados obtidos para a concentração efetiva 50% ( $\text{CE}_{50}$ ) dos extratos etanólicos e metanólicos das espécies estudadas.

**Tabela 10** - Concentração efetiva 50% para os extratos brutos etanólicos e metanólicos das folhas de *B. multiflora*, *D. quitarensis*, *Fusea longifolia* e *G. punctata*

| <b>Extratos: <math>\text{CE}_{50}</math> (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b> |                               |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| <b>EBEBM:</b> $11,1 \pm 0,24$                                                   | <b>EBMBM:</b> $4,2 \pm 0,75$  |
| <b>EBEDQ:</b> $23,6 \pm 0,37$                                                   | <b>EBMDQ:</b> $71,3 \pm 1,93$ |
| <b>EBEFL:</b> $34,2 \pm 6,56$                                                   | <b>EBMFL:</b> $41,3 \pm 4,05$ |
| <b>EBEGP:</b> $21,4 \pm 6,68$                                                   | <b>EBMGP:</b> $17,8 \pm 1,95$ |
| <b>A ascórbico:</b> $2,3 \pm 0,89$                                              | $2,3 \pm 0,89$                |



Através dos resultados obtidos foi possível verificar que os extratos alcoólicos de todas as espécies apresentaram algum grau de atividade antioxidante. A maior atividade apresentada, verificada através dos valores de  $CE_{50}$ , foi para o **EBMBM** ( $4,1 \pm 0,75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Essa atividade apresentou uma correlação direta com o teor de fenóis totais (**Tabela 3**) para a espécie ( $31,84 \pm 1,04 \text{ mg AG/g}$  de extrato).

Foi observado também que o **EBEBM** apresentou o menor teor de fenólicos ( $9,77 \pm 0,11 \text{ mg de AG/g}$  de extrato) entre as espécies (**Tabela 3**), no entanto, a atividade do extrato etanólico foi a maior dentre elas ( $CE_{50} 11,1 \pm 0,24 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Esta análise sugere que existe(m) alguma(s) substância(s) que contribui(em) particularmente e mais efetivamente para a ação sequestradora de radicais livres no extrato da *B. multiflora* (SOUSA *et al.*, 2007).

Contudo, é interessante ressaltar que é necessária a caracterização da estrutura do composto fenólico para melhor entender esses resultados, pois sua ação antioxidante está diretamente relacionada com sua estrutura química, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor.

#### 5.2.2 Atividade *Anti-Trypanosoma cruzi* e Índice de Seletividade(IS)

Os **OEs** de diversas espécies de Annonaceae, como *Annona verpetorum*, (COSTA *et al.*, 2012), *Annona pickelii* e *Annona salzmännii* (COSTA *et al.*, 2013) foram eficientes contra formas epimastigotas de *T. cruzi*, com  $CI_{50}$  de  $31,9 \mu\text{g/mL}$  para *A. verpetorum*. Também já se demonstrou que o OE de *Xylopia frutescens* e *Xylopia laevigata* tem eficiência contra tripomastigotas de *T. cruzi*, em concentrações não citotóxicas para macrófagos murinos (SILVA *et al.*, 2013).

Para cada **OE** estudado nesse trabalho foram determinados os valores de concentração inibitória 50% ( $CI_{50}$ ) frente a formas tripomastigotas e amastigotas do parasita, simultaneamente, seguido da comparação dos valores com o controle positivo, o benznidazol.

Foram determinados os valores de citotoxicidade destes compostos frente às células L929 de mamíferos, bem como definidos seus respectivos **IS**, conforme apresentado na **Tabela 11**. O parâmetro utilizado para estimar a inibição do crescimento foi a  $CI_{50}$ , o qual corresponde à concentração da droga capaz de inibir em 50 % a proliferação dos parasitas, calculado para cada um dos óleos testados após 48 horas de tratamento.

**Tabela 11** - Concentração inibitória 50% (CI<sub>50</sub>) para a atividade anti – *T. cruzi* *in vitro*, citotoxicidade e índice de seletividade dos OEs

| OE                    | CI <sub>50</sub> sobre o<br>parasita <sup>1</sup><br>(µg.mL <sup>-1</sup> ) | CI <sub>50</sub> sobre as<br>células <sup>2</sup><br>(µg.mL <sup>-1</sup> ) | Índice de<br>Seletividade <sup>3</sup> |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| <i>B. multiflora</i>  | 0,46 ± 0,07                                                                 | 1,36 ± 0,61                                                                 | 2,9                                    |
| <i>D. quitarensis</i> | 0,26 ± 0,06                                                                 | 0,54 ± 0,11                                                                 | 2,1                                    |
| <i>F. longifolia</i>  | 0,3 ± 0,11                                                                  | 0,93 ± 0,09                                                                 | 3,1                                    |
| <i>G. punctata</i>    | 0,029 ± 0,014                                                               | 0,93 ± 0,007                                                                | 32                                     |
| Benznidazol           | 1                                                                           | 625                                                                         | 625                                    |

<sup>1</sup> Concentração do OE que reduz em 50% o crescimento parasitário <sup>2</sup> Concentração do OE que induz 50% de morte celular (L929) <sup>3</sup> IC<sub>50</sub> do OE sobre as células dividido pelo IC<sub>50</sub> do composto sobre o parasita.

Plantas medicinais fornecem uma série de compostos com comprovadas atividades biológicas contra vários parasitas. Dentre os produtos naturais, os OEs de plantas medicinais são alternativas promissoras, por possuírem compostos que podem ser utilizados como protótipos para a síntese de novos agentes quimioterápicos contra diversas patologias, devido às características singulares de seus constituintes, os quais são moléculas pequenas e lipofílicas capazes de interagir e/ou atravessar a membrana exercendo seus efeitos em alvos intracelulares essenciais para a sobrevivência dos parasitas (DHIFI *et al.*, 2016).

Conforme consta na **Tabela 11**, os OEs foram avaliados *in vitro* contra formas tripomastigotas e amastigotas intracelulares da cepa Tulahuen de *T. cruzi*, transfectada para expressar a enzima  $\beta$ -galactosidase de *E. coli* (ROMANHA *et al.*, 2010). A metodologia empregada avalia simultaneamente a atividade sobre tripomastigotas, as formas que estão presentes no sangue, e formas amastigotas intracelulares, presentes nos tecidos do hospedeiro vertebrado durante as fases aguda e crônica da doença (COELHO *et al.*, 2019).

Esta metodologia está de acordo com as diretrizes proposta pelo Programa Integrado de Doença de Chagas (PIDC) da Fiocruz e a Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi) (ROMANHA *et al.*, 2010). Benznidazol foi usado como controle positivo contra *T. cruzi* e a citotoxicidade foi determinada em células de mamíferos L929. Todas as amostras dos OEs apresentaram menor IS que o benznidazol.

De acordo com as diretrizes sugeridas pela Fiocruz e o DNDi, somente as amostras com IS igual ou superior a 50, considerados altamente seletivos, são recomendadas para testes *in vivo* (ROMANHA *et al.*, 2010).

Os **OEs** das quatro espécies vegetais foram ativos contra o *T. cruzi*, sendo o **OE** de *G. punctata* o mais ativo ( $CI_{50} = 0,029 \pm 0,014 \mu\text{g/mL}$ ), o que corresponde a uma atividade 34 vezes superior à do benznidazol ( $1 \mu\text{g/mL}$ ), além disso, foi a amostra que apresentou melhor índice de seletividade ( $IS = 32$ ). O que mostra que o **OE** da *G. punctata* apresentou boa atividade contra o *T. cruzi*, maior que o benzonidazol, e menor efeito da droga sobre a célula hospedeira, entre todos os **OEs** testados *in vitro*. Entretanto, segundo as diretrizes do DNDi, por apresentar  $IS < 50\%$ , esse **OE** (*G. punctata*), assim como nenhum dos outros **OEs** estudados nesse trabalho, é recomendado para ensaios *in vivo*, limitando bastante a sua utilidade como tripanocida.

Particularmente, a forte atividade apresentada para o **OE** de *G. punctata* pode ser atribuído à presença do (*E*)-cariofileno (8,4%), germacreno D (19,8%) e ao (*E*) nerolidol (9,9%) presente somente na *G. punctata*. Sendo que o (*E*)-cariofileno (14,4%) e o germacreno D (6,3%) estão presentes também na espécie *D. quitarensis* em concentrações diferentes resultando na segunda melhor atividade entre elas. Pode-se atribuir que a atividade contra tripanossomatídeos se deva principalmente à sua composição de terpenos.

Para CARNEIRO *et al.* (2017) os terpenos são responsáveis pelo caráter hidrofóbico dos **OEs**, permitindo sua difusão através da membrana celular do parasita e afetando as vias metabólicas intracelulares e organelas. SOBREIRA *et al.* (2014), afirmou em seu estudo que os **OEs** que apresentam terpenos, atuam na célula microbiana, provocando alterações na membrana celular, levando a perda de vários componentes celulares, ocasionando, assim, a morte da célula. Além disso, esse estudo atribuiu essa desestruturação da membrana as características lipofílicas dos terpenos.

Estudos publicados mostram que os **OEs** com altas concentrações desses compostos apresentam propriedades antiprotozoárias, especialmente contra *T. cruzi* (SILVA *et al.*, 2013). No entanto, a influência de interações sinérgicas entre os constituintes do **OE** sobre a atividade apresentada deve ser considerada, uma vez que, em outras espécies estes dois constituintes foram encontrados em diferentes concentrações, resultando em boas atividades.

### 5.2.3 Atividade Antibacteriana dos OEs através da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

As plantas medicinais apresentam inúmeros compostos ativos que as tornam importantes para o desenvolvimento de novas drogas (REINECKEN, *et al.*, 2018). Compostos que podem apresentar elevado potencial antimicrobiano e também compostos que sirvam de protótipos para a síntese de novos agentes.

Existem inúmeros fármacos antimicrobianos disponíveis para a comercialização, atualmente. Algumas classes são mais utilizadas e possuem maior número de representantes no comércio. As principais classes de antimicrobianos conhecidas e utilizadas na prática clínica são os  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos), aminoglicosídeos, tetraciclina, fenicóis, quinolonas, fluorquinolonas, sulfonamidas, macrolídeos, lincosamidas, glicopeptídeos, oxazolidinonas, cloranfenicol, estreptograminas, glicilciclina, gemifloxacina, daptomicina e as polimixinas (ANVISA, 2017; GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Extratos e frações da *Guatteria citriodora*, mostraram-se inativos frente às bactérias *Gram*-negativas e ativos contra três cepas de bactérias *Gram*-positivas RABELO *et al.*, (2014). Outra espécie muito estudada da família Annonaceae é a *Annona glabra* L., que quando testado o óleo obtido da semente apresentou bons resultados principalmente para as bactérias *Gram* positivas (LARANJEIRA, 2016).

A atividade antibacteriana dos OEs das quatro espécies estudadas nesse trabalho foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo e os resultados são apresentados na **Tabela 12**. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos através da CIM em  $\mu\text{g/mL}$ , que de acordo com ALIGIANNIS *et al.* (2001) apresentam a seguinte classificação: CIM até 500  $\mu\text{g/mL}$  são inibidores potentes; CIM entre 600 e 1500  $\mu\text{g/mL}$  são inibidores moderados; CIM acima de 1600  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  são inibidores fracos. Os valores da CIM encontrados para os OEs estudados nesse trabalho (4,68 e 37,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), classificam-nos, portanto, na categoria de fortes inibidores.

**Tabela 12** - Atividade antibacteriana, in vitro, dos **OEs** de *B. multiflora*, *D. quitarenses*, *F. longifolia* e *G. punctata*

| OEs                   | Concentração Inibitória Mínima (CIM) [ $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ] |                                   |                                |                                 |                   |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------|
|                       | <i>E. coli</i> <sup>a</sup><br>(EHEC)                          | <i>P. aeruginosa</i> <sup>b</sup> | <i>S. sumulan</i> <sup>c</sup> | <i>S. pyogenes</i> <sup>d</sup> | MRSA <sup>e</sup> |
| <i>B. multiflora</i>  | 4.68                                                           | 4.68                              | 4.68                           | 4.68                            | 4.68              |
| <i>D. quitarensis</i> | -                                                              | -                                 | 37.5                           | 37.5                            | -                 |
| <i>F. longifolia</i>  | -                                                              | 37,5                              | 37,5                           | -                               | 37.5              |
| <i>G. punctata</i>    | -                                                              | -                                 | 4.68                           | 4.68                            | -                 |
| TIENAM <sup>f</sup>   | 1.17                                                           | 2.34                              | 0.58                           | 0.58                            | 4.68              |

Onde: **a.** *E. coli* enterohemorrágica - EHEC(CDC-EDL933-171-0157:H3); **b.** *P. aeruginosa* (ATCC 29336); **c.** *S. sumulans* (ATCC 25175); **d.** *S. pyogenis* (ATCC 19615); **e.** *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (ATCC 33591); **f.** Controle positivo.

Entre as amostras testadas, o **OE** de *B. multiflora* mostrou a melhor atividade antibacteriana pois foi ativo contra cepas *Gram*-negativas e *Gram*-positivas com valores de CIM de  $4,68 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . O **OE** de *D. quitarensis* foi ativo contra os microrganismos *Gram*-positivos *S. mutans* e *S. pyogenes* com CIM de  $37,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A bactéria *S. mutans* é considerada uma das principais agentes causadoras de cárie dentária e também pode ser uma fonte de endocardite infecciosa (BANAS, 2004). *S. pyogenes* é responsável por uma gama diversificada de manifestações, de infecções leves da pele/tecidos moles, faringite a doenças mais graves, como a bacteremia, celulite, sepse puerperal, meningite, pneumonia e fascíte necrosante (LAMAGNI *et al.*, 2008).

O **OE** de *F. longifolia* foi ativo contra a bactéria *Gram*-negativa *P. aeruginosa* e também contra as bactérias *Gram*-positivas *S. mutans* e *S. aureus* resistente à MRSA, ambos com valores de CIM de  $37,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A bactéria *P. aeruginosa* é responsável por várias infecções, como septicemia, infecções do trato urinário e pneumonia grave, especialmente em pacientes com deficiência imunológica. A bactéria MRSA é responsável pela síndrome do choque tóxico, infecção de ferida no pós-operatório e intoxicação alimentar (GUNES *et al.*, 2016).

O **OE** de *G. punctata* foi ativo contra os microrganismos *S. mutans* e *S. pyogenes* com CIM de  $4,68 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . *E. coli* enterohemorrágica foi susceptível apenas ao **OE** de *B. multiflora* com CIM de  $4,68 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . *E. coli* está presente no intestino humano e causa infecções do trato urinário inferior, diarreia e septicemia (GUNES *et*

*al.*, 2016). Entre os microrganismos testados, verificou-se que *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) foi a mais resistente aos **OEs**.

Segundo ANDRADE *et al.* (2012), as bactérias *Gram*-negativas são menos sensíveis a **OEs** do que as bactérias *Gram*-positivas e uma explicação para isso é que bactérias *Gram*-negativas têm uma parede celular mais fina que é envolvida por outra membrana externa, portanto possuem duas membranas, a externa difere da interna e contém moléculas de lipopolissacarídeos. Isso que difere a eficácia nas atividades biológicas em contato com os **OEs**.

Atualmente, a resistência bacteriana aos antibióticos é cada vez mais preocupante, principalmente quando se trata de bactérias *Gram*-negativas, uma vez que há maior disseminação do que bactérias *Gram*-positivas (GOMES *et al.*, 2014). Diante disso, destacamos os excelentes resultados de atividade antibacteriana apresentada pelos **OEs** de *B. multiflora* e *F. longifolia* contra bactérias *Gram*-negativas.

#### 5.2.4 Avaliação da atividade antibacteriana dos Extratos Brutos pelo método de Difusão em Ágar (Técnica do Poço) e Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os extratos brutos etanólicos e metanólicos das folhas das espécies estudadas foram avaliados quanto às suas atividades antibacterianas por dois métodos distintos: método de difusão em Ágar – técnica do poço e através da CIM. Através do ensaio de atividade antibacteriana pelo método de difusão em Ágar – técnica do poço foi verificado que todos extratos foram inativos frente aos microrganismos testados (**Tabela 13**).

Os ensaios realizados expressos através da CIM mostraram que os extratos não foram ativos frente às bactérias *Gram*-negativas testadas. No entanto, os **EBMBM** e **EBEBM** e o **EBMDQ** foram ativos frente à bactéria *S. aureus* (CIM = 5 mg.mL<sup>-1</sup>). Já com relação à bactéria *Gram*-positiva *S. sumulans* observou-se que apenas os **EBMBM** e **EBMDQ** foram ativos com valores de CIM de 2,5 e 5 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

**Tabela 13** - Atividade antibacteriana dos extratos etanólicos e metanólicos de *B. multiflora*, *D. quitarensis*, *F. longifolia* e *G. punctata* pelos métodos de Difusão em Ágar e Concentração Inibitória Mínima (CIM)

| Amostra       | <i>E. colienterohemorrágica</i><br>(EHEC) |                | <i>P. aeruginosa</i> |                | <i>S. entérica subsp.</i><br><i>Typhimurium</i> |                | <i>S. aureus</i> |                | <i>S. sumulans</i> |                |
|---------------|-------------------------------------------|----------------|----------------------|----------------|-------------------------------------------------|----------------|------------------|----------------|--------------------|----------------|
|               | Dif. (mm)                                 | CIM<br>(mg/mL) | Dif. (mm)            | CIM<br>(mg/mL) | Dif. (mm)                                       | CIM<br>(mg/mL) | Dif. (mm)        | CIM<br>(mg/mL) | Dif. (mm)          | CIM<br>(mg/mL) |
| <b>EBEBM</b>  | -                                         | -              | -                    | -              | -                                               | -              | -                | 5              | -                  | -              |
| <b>EBMBM</b>  | -                                         | -              | -                    | -              | -                                               | -              | -                | 5              | -                  | 2,5            |
| <b>EBEDQ</b>  | -                                         | -              | -                    | -              | -                                               | -              | -                | -              | -                  | -              |
| <b>EBMDQ</b>  | -                                         | -              | -                    | -              | -                                               | -              | -                | 5              | -                  | 5              |
| <b>EBEFL</b>  | -                                         | -              | -                    | -              | -                                               | -              | -                | -              | -                  | -              |
| <b>EBMFL</b>  | -                                         | -              | -                    | -              | -                                               | -              | -                | -              | -                  | -              |
| <b>EBEGP</b>  | -                                         | -              | -                    | -              | -                                               | -              | -                | -              | -                  | -              |
| <b>EBMGP</b>  | -                                         | -              | -                    | -              | -                                               | -              | -                | -              | -                  | -              |
| <b>TIENAM</b> | 33,66±0,57                                | 0,00117        | 29,33±0,57           | 0,00117        | 34,33±0,57                                      | 0,00117        | 35,66±0,57       | 0,00468        | 36,66±0,57         | 0,00468        |

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Espécimes de *B. multiflora*, *D. quitarensis*, *F. longifolia* e *G. punctata* foram coletadas, e tiveram sua taxonomia ratificada pelo Herbário da UNIR, onde as amostras-testemunho estão depositadas.

Através do processo de hidrodestilação, foram obtidos os **OEs** das folhas das quatro espécies, com rendimentos variando de 0,12-0,39%. Foram preparados também os extratos brutos etanólico e metanólico das folhas das espécies acima, os quais foram submetidos a testes químicos e farmacológicos.

O estudo da composição química dos **OEs** de *B. multiflora*, *D. quitarensis*, *F. longifolia* e *G. punctata* por GC-MS e sua quantificação por CG-FID, apresentando 87 terpenóides como constituintes majoritários, correspondendo a 79,3-97,5% da composição química dos **OEs**. Os seguintes compostos foram identificados, em quantidades variáveis, em todas as amostras: 4-heptanol (0,1 – 33,8%), pentanoato de etila (0,4 – 3,9%),  $\alpha$ -copaeno (0,9 -5,3%),  $\beta$ -elemeno (1,0 – 2,2%), (*E*)-cariofileno (0,4 - 14,4%),  $\beta$ -selineno (0,4 – 19,3%),  $\alpha$ -selineno (1,3 -2,5%),  $\delta$ -cadineno (1,0 – 4,8%) e germacreno B (0,9 – 4,5%).

Os **OEs** mostraram forte atividade antibacteriana contra os microrganismos testados, especialmente para *S. mutans* em que todos os **OEs** foram ativos. Todos os **OEs** apresentaram atividade tripanocida contra as formas amastigota e tripomastigota de *T. cruzi*, com **OE** de *G. punctata* sendo 34 vezes mais ativo que o benznidazol. Entretanto, o melhor índice de seletividade obtido para os **OEs** foi 32, abaixo do valor mínimo recomendado (**IS** = 50) pelo DNDi para que se prossiga com ensaios *in vivo*.

Para a atividade antibacteriana *in vitro*, foram realizados ensaios frente aos microrganismos Gram-negativos: *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Pseudomonas aeruginosa* e Gram-positivos: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus* resistente à metilina, determinando-se a CIM, pelo método da diluição em caldo. Todos os **OEs** mostraram potente inibição, destacando-se o **OE** de *B. multiflora*, por ter sido ativo em todos os microrganismos ensaiados (4,68 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>).

Foram preparados os extratos brutos etanólico e metanólico de *B. multiflora*, *D. quitarensis*, *F. longifolia* e *G. punctata*, respectivamente, **EBEBM**, **EBMBM**, **EBEDQ**, **EBMDQ**, **EBEFL**, **EBMFL**, **EBEGP** e **EBMGP**, com rendimentos variando de 11 a 15%. A triagem fitoquímica preliminar demonstrou a presença de fenóis e taninos para todos os extratos, exceto os **EBMDQ** e **EBEDQ**, os quais foram os únicos a testarem



positivo para flavonóides e alcaloides. A presença de terpenóides foi constatada em todos os extratos, exceto **EBMBM**, **EBEDQ** e **EBMDQ**.

O **EBMBM** apresentou o maior teor de **FT** ( $31,89 \pm 1,04$  mgAG/g) e a maior **AA** ( $CE_{50} = 4,2 \pm 0,75$   $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Entretanto, não foi possível estabelecer uma correlação entre **AA** e **FT**, considerando todos os extratos analisados.

Nenhum dos extratos se mostrou promissor quanto à atividade antibacteriana frente a nenhuma das linhagens testadas nesse estudo, pelos métodos de difusão em Ágar – técnica do poço e da CIM.

Foi possível identificar, por meio de ESI-MS e LC/MS, quatro alcaloides do tipo aporfinicos no **EMDq** e vinte alcaloides **EMGp**, sendo nove do tipo benzilisoquinolinico, sete aporfínico, um oxoaporfínico, um isoquinoliníco, um pirrolidinico e um azaantracênico. Destaca-se ainda que a abundância de alcaloides, com predominância para os aporfinícos e benzilisoquinolícos, observada nesse trabalho, está em acordo com o descrito na literatura para Annonacea.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, RP *Identificação dos componentes do óleo essencial por cromatografia gasosa / espectrometria de massa* (Vol. 456). Carol Stream, IL: Allured publishing corporation. 2007. ISBN 978-1-932633-11-4.

AFROZ, N., HOQ, M. A., JAHAN, S., ISLAM, M. M., AHMED, F., SHAHID-UD-DAULA, A. F. M., HASANUZZAMAN, M. Methanol soluble fraction of fruits of *Annona muricata* possesses significant antidiarrheal activities. *Heliyon*, v. 6, n. 1, p. e03112, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03112>

AKENDENGUE, B., NGOU-MILAMA, E., ROBLLOT, F., LAURENS, A., HOCQUEMILLER, R., GRELLIER, P., *et al.* Antiplasmodial activity of *Uvaria klaineana*. *Planta medica*, v. 68, n. 2, p. 167-169. 2002. DOI: [10.1055 / s-2002-20245](https://doi.org/10.1055/s-2002-20245)

ALARCÓN, J. G. S.; PEIXOTO, A. L. Florística e fitossociologia de um trecho de um hectare de floresta de terra firme, em Caracaraí, Roraima, Brasil. *Bol Mus Para Emílio Goeldi, sér. Ciências Naturais*, v. 2, n. 2, p. 33-60, 2007

ALCÂNTARA, J. M., DE LUCENA, J. M. V., FACANALI, R., MARQUES, M. O. M., DA PAZ LIMA, M. Chemical composition and bactericidal activity of the essential oils of four species of Annonaceae growing in Brazilian Amazon. *Natural product communications*. Vol. 12 Nº. 4 p. 619 – 622. 2017. PMID: 30520609.

ALENCAR, D. C. *Estudo químico e biológico de Xylopia excellens e Xylopia benthamii (Annonaceae)* 2015. Tese (Doutorado em Química de Produtos Naturais). Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, 2015.

ALIGIANNIS, N., KALPOUTZAKIS, E., CHINO, I. B., MITAKOU, S., GIKAS, E., TSARBOPOULOS, A. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of five taxa of Sideritis from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001. DOI:[10.1021/jf001018w](https://doi.org/10.1021/jf001018w)

ALMEIDA, J. O. R. Avaliação de efeitos comportamentais do extrato de *Guatteria punctata* em camundongos. In *V SEMANA ACADÊMICA DE SINOP*. (2018, October).

ALMEIDA, J. R. G. S., DE LIMA, J. T., DE OLIVEIRA, H. R., DE OLIVEIRA, M. R., MEIRA, P. R. M., LÚCIO, A. S. S. C., QUINTANS JUNIOR, L. J. Antinociceptive activity of discretamine isolated from *Duguetia moricandiana*. *Natural Product Research*, v. 25, n. 20, p. 1908-1915. 2011. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.491227>

ALVAREZ-GONZALEZ, I., GARCÍA-AGUIRRE, K. K., MARTINO-ROARO, L., ZEPEDA-VALLEJO, G., MADRIGAL-BUJADAR, E. Anticarcinogenic and genotoxic effects produced by acetogenins isolated from *Annona muricata*. *Toxicology Letters*, (180), S228. 2008. [https://doi 10.1016/j.toxlet.2008.06.027](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.06.027)

ALVES, D. S., COSTA, V. A., MACHADO, A. R., OLIVEIRA, D. F., & CARVALHO, G. A. *Duguetia lanceolata* A. St.-Hil. Stem bark produces phenylpropanoids lethal to *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Crop Protection*, 127, 104965. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104965>

AMMANN, Stefan. *Etnobotânica de árvores e palmeiras em três comunidades ribeirinhas do Rio Jauaperi, na divisa entre Roraima e Amazonas*. Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2014.

ANVISA. Antimicrobianos: bases teóricas e uso clínico. Brasília: Anvisa, 2017. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/conceitos.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm). Acesso em: 2 mar. 2020.

ATANASOV, A.G., ZOTCHEV, S.B., DIRSCH, V.M. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* **20**, 200–216 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>

ATTIQ, A., JALIL, J., HUSAIN, K. Annonaceae: breaking the wall of inflammation. *Frontiers in pharmacology*, v. 8, p. 752, 2017. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00752>

AUBLET, J. B. C. F. - 1775. *Paloue guianensis* Aubl. In: *Histoire des plantes de la Guiane Française*, Publicado em: *Contr. U.S. Natl. Herb.* 18: 65 (1914) <https://www.gbif.org/pt/species/3158137>

ÁVALOS, G.A.; PÉREZ-URRIA, C.E. Metabolismo secundário de plantas. [Metabolismo vegetal secundário]. *Reduca (Biología)*, Ser. Fisiol. Veg. v. 2, p.119–145. 2009, ISSN: 1989-3620

AVULA, B., BAE, J. Y., MAJRASHI, T., WU, T. Y., WANG, Y. H., WANG, M., KHAN, I. A. Targeted and non-targeted analysis of annonaceous alkaloids and acetogenins from *Asimina* and *Annona* species using UHPLC-QToF-MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 159, p. 548-566, 2018. doi: 10.1016 / j.jpba.2018.07.030

BAJPAI, V., SINGH, A., CHANDRA, P., NEGI, MPS, KUMAR, N., & KUMAR, B. Análise de variações fitoquímicas em caules dióicos de *Tinospora cordifolia* usando HPLC/QTOF MS/MS e UPLC/QqQLIT-MS/MS. *Phytochemical Analysis* v. 27, n. 2, p. 92-99, 2016. DOI 10.1002/pca.2601

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475. 2008 <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

BANAS, JEFFREY A. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front Biosci*, v. 9, n. 10, p. 1267-77, 2004. doi: 10.2741 / 1305.

BARBOSA, W. L. R., QUINARD, E., TAVARES, I. C. C., PINTO, L. N., OLIVEIRA, F. Q., OLIVEIRA, R. M. Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais (Edição Revisada). *Revista Científica da UFPA*, 4. 2004.

BARROS, F. M. C. D., ZAMBARDA, E. D. O., HEINZMANN, B. M., MALLMANN, C. A. Seasonal variability and terpenoid biosynthesis of the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). *Química Nova*, v. 32, n. 4, p. 861-867, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000400007>

BARTRAM, S., JUX, A., GLEIXNER, G., BOLAND, W. Dynamic pathway allocation in early terpenoid biosynthesis of stress-induced lima bean leaves. *Phytochemistry*, n. 67 v. 15, p. 1661-1672. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.02.004>

BAY, M.; OLIVEIRA, J.V.S.; JUNIOR, P.A.S.; MURTA, S.M.F.; SANTOS, A.R.; BASTOS, I.S.; ORLANDI, P.P.; JUNIOR, P.T.S. In vitro trypanocidal and antibacterial activities of essential oils from four species of the family Annonaceae. *Chem. Biodivers.* 2019, 16, 11. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900359>

BAY, M., DOS SANTOS, A. R., BAY HURTADO, F., DOS SANTOS BASTOS, I., Puccinelli Orlandi, P., & Teixeira de Sousa Jr., P. (2020). ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA in vitro DE EXTRATOS VEGETAIS DA FAMÍLIA ANNONACEAE. *South American Journal of Basic Education, Technical and Technological*, 7(2), 128–144. Recuperado de <https://periodicos.ufac.br/index.php/SAJEBTT/article/view/3661>

BERMEJO, A., FIGADÈRE, B., ZAFRA-POLO, M. C., BARRACHINA, I., ESTORNELL., CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Natural product reports*, v. 22, n. 2, p. 269-303, 2005. <https://doi.org/10.1039/b500186m>

BFG – The Brazil Flora Group Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia* v. 66: p. 1085-1113, 2015. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201566411>

BORGES, A. R., DE ALBUQUERQUE AIRES, J. R., HIGINO, T. M. M., DE MEDEIROS, M. D. G. F., CITÓ, A. M. D. G. L., LOPES, J. A. D., *et al.* Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. *Experimental Parasitology*, v. 132, n. 2, p. 123-128, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.06.003>.

BOYOM F.F, NGOUANA V, ZOLLO P.H, MENUT C, BESSIERE J.M, GUT J, ROSENTHAL P.J. Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. *Phytochemistry*. v. 64, n. 7, p. 1269-1275, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.08.004>. PMID: 14599525.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 148 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde)

BRASTIANOS HC, STURGEON CM, ROBERGE M, ANDERSEN RJ. Inhibition of the G2 DNA damage checkpoint by oliveroline isolated from *Duguetia odorata*. *J Nat Prod*. v. 70, n. 2, p. 287-288, 2007. <https://doi.org/10.1021/np060285e>. PMID: 17315964.

BRUGINSKI, ESTEVAN R. D. Identificação de alcaloides e acetogeninas diretamente em tecidos de folhas e sementes de *Annona rugulosa* (Annonaceae) por DESI-MSI / Estevan R. D. Bruginski Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Curitiba, 2016.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of natural products*, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004. <https://doi.org/10.1021/np040106y>

BYNG, JAMES W.; CHASE, M. W.; CHRISTENHUSZ, M. J. M.; FAY, M. F.; JUDD, W. S.; SOLTIS, D. E.; MABBERLEY, D. J.; SENNIKOV, A. N.; SOLTIS, P. S.; STEVENS, P. F. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 181, n. 1, p. 1–20, 2016. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>

CABRAL, C.; PITA, J. R. Ciclo de Exposições: Temas de Saúde, Farmácia e Sociedade. Catálogo. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 63, n. 10, p. 1368-1371, 2015.

CARLSON EE. Natural products as chemical probes. *ACS chemical biology*. 2010 Jul 16;5(7):639-53. <https://doi.org/10.1021/cb100105c>

CARNEVALE NETO, F., ANDRÉO, M. A., RAFTERY, D., LOPES, J. L. C., LOPES, N. P., CASTRO-GAMBOA, I., VESSECCHI, R). Characterization of aporphine alkaloids by electrospray ionization tandem mass spectrometry and density functional theory calculations. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 34, p. e8533, 2020. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170617>

CAROLLO, C. A., HELLMANN-CAROLLO, A. R., SIQUEIRA, J. M. D., ALBUQUERQUE, S. Alkaloids and a flavonoid from aerial parts (leaves and twigs) of *Duguetia furfuracea*-Annonaceae. *Journal of the Chilean Chemical Society*, v. 51, n. 2, p. 837-841, 2006. [https://doi.org/10.4067 / S0717-97072006000200001](https://doi.org/10.4067/S0717-97072006000200001)

CAVÉ, A., FIGADÈRE, B., LAURENS, A., CORTES, D. Acetogenins from annonaceae. *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, p. 81-288. 1997. [https://doi.org/10.1007 / 978-3-7091-6551-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6551-5_2)

CERCATO, L. M. *Effect of aqueous extract of bark of Hancornia speciosa Gomes (Mangabeira) on obesity induced in mice*. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, Aracaju. 2015.

CHASE, M. W., CHRISTENHUSZ, M. J. M., FAY, M. F., BYNG, J. W., JUDD, W. S., SOLTIS, D. E., STEVENS, P. F. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 1-20. 2016. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>

CHATROU, L. W. Changing genera: systematic studies in Neotropical and West African Annonaceae. Veranderende genera: systematische studies in Neotropische en Westafrikaanse Annonaceae. *Utrecht University*. 1998.

CHEUNG, L.M., CHEUNG, P.C.K. E OOI, V.E.C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*, v.80, p.249-255, 2003. DOI: 10.1016 / S0308-8146 (02) 00419-3

COLMAN-SAIZARBITORIA, T., MONTILLA, L., RODRIGUEZ, M., CASTILLO, A., HASEGAWA, M. Ximarginatina: um novo inibidor da acetogenina do transporte de elétrons mitocondrial de *Xylopia emarginata* Mart., Annonaceae. *Revista Brasileira de*

*Farmacognosia*, v. 19, p. 871-875. 2009. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000600013>

CONCEIÇÃO, R. S., REIS, I. M. A., CERQUEIRA, A. P. M., PEREZ, C. J., DOS SANTOS JUNIOR, M. C., BRANCO, A., IFA, D. R., BOTURA, M. B. Rapid Structural Characterization of benzylisoquinoline and aporphine alkaloids from *Ocotea spixiana* acaricide extract by HPTLC-DESI-MS<sup>n</sup>. *Phytochemical Analysis*. v. 31, n. 6, p. 711-721, 2020. DOI: 10.1002/pca.2935

COSTA, E. V., PINHEIRO, M. L. B., SILVA, J. R. D. A., MAIA, B. H. L. D. N. S., DUARTE, M. C. T., AMARAL, A. C. F., LEON, L. L. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). *Química Nova*, v. 32, p. 78-81, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000100015>

COSTA, E.V. Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Guatteriaopsis blepharophylla*, *Guatteriaopsis friesiana* e *Guatteriaopsis hispida* (Annonaceae). 2009. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual do Paraná. Instituto de Química, Curitiba (PR), 2009.

COSTA, E. V., MARQUES, F. D. A., PINHEIRO, M. L. B., BRAGA, R. M., DELARMELINA, C., DUARTE, M. C. T., *et al.* Chemical constituents isolated from the bark of *Guatteria blepharophylla* (Annonaceae) and their antiproliferative and antimicrobial activities. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, p. 1111-1117. 2011. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532011000600016>

COSTA E. V, DUTRA LM, NOGUEIRA PC, MORAES VR, SALVADOR MJ, RIBEIRO LH, GADELHA FR. Essential oil from the leaves of *Annona vepretorum*: chemical composition and bioactivity. *Nat Prod Commun*. v. 7 n. 2, p. 265 – 266. 2012. doi:10.1177/1934578x1200700240

COSTA E. V., DUTRA LM, SALVADOR MJ, RIBEIRO LH, GADELHA FR, DE CARVALHO JE. CHEMICAL Composition of the essential oils of *Annona pickelii* and *Annona salzmännii* (Annonaceae), and their antitumour and trypanocidal activities. *Nat Prod Res*. v. 27, n. 11, p. 997-1001, 2013. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.686913>

COSTA, E. V., CRUZ, P. E. O. D., PINHEIRO, M. L. B., MARQUES, F. A., RUIZ, A. L. T., MARCHETTI, G. M., MAIA, B. H. L. Aporphine and tetrahydroprotoberberine alkaloids from the leaves of *Guatteria friesiana* (Annonaceae) and their cytotoxic activities. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 24, n. 5, p. 788-796. 2013 <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20130103>

COSTA, EMMANOEL VILAÇA, MARIA LÚCIA BELÉM PINHEIRO, AFONSO DUARTE LEÃO DE SOUZA, ANDERSSON BARISON, FRANCINETE RAMOS CAMPOS, RODRIGO HINOJOSA VALDEZ, TÂNIA UEDA-NAKAMURA, BENEDITO PRADO DIAS FILHO, AND CELSO VATARU NAKAMURA. "Trypanocidal Activity of Oxoaporphine and Pyrimidine- $\beta$ -Carboline Alkaloids from the Branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae)" *Molecules* 16, nº. 11: 9714-9720. 2011 <https://doi.org/10.3390/molecules16119714>

COSTA, R. A., BARROS, G. D. A., DA SILVA, J. N., OLIVEIRA, K. M., BEZERRA, D. P., SOARES, M. B., *et al.* Experimental and theoretical study on spectral features, reactivity, solvation, topoisomerase I inhibition and in vitro cytotoxicity in human HepG2 cells of guadiscine and guadiscidine aporphine alkaloids. *Journal of Molecular Structure*, v. 1229, p. 1-14, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129844>.

COSTA, R. A., BARROS, G. D. A., DA SILVA, J. N., OLIVEIRA, K. M., BEZERRA, D. P., SOARES, M. B., COSTA, E. V. Experimental and theoretical study on spectral features, reactivity, solvation, topoisomerase I inhibition and in vitro cytotoxicity in human HepG2 cells of guadiscine and guadiscidine aporphine alkaloids. *Journal of Molecular Structure*, 1229, 129844. v. 1229, p. 129844, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129844>

COSTA, R. A., BARROS, G. D. A., DA SILVA, J. N., OLIVEIRA, K. M., BEZERRA, D. P., SOARES, M. B., & COSTA, E. V. Experimental and theoretical study on spectral features, reactivity, solvation, topoisomerase I inhibition and in vitro cytotoxicity in human HepG2 cells of guadiscine and guadiscidine aporphine alkaloids. *Journal of Molecular Structure*, v. 1229, p. 129844, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129844>

COSTA, R. G., DA ANUNCIAÇÃO, T. A., ARAUJO, M. D. S., SOUZA, C. A., DIAS, R. B., SALES, C. B., ... BEZERRA, D. P. In vitro and in vivo growth inhibition of human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells by *Guatteria megalophylla* Diels (Annonaceae) leaf essential oil. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 122, p. 109713, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109713>

COSTA, V. C. D. O., TAVARES, J. F., QUEIROGA, C. S., CASTELLO-BRANCO, M. V., DINIZ, M. F., DE LIMA, C. U. G., *et al.* Constituintes químicos das folhas de *Rollinia leptopetala* RE Fries. *Química Nova*, v. 35, p. 138-142. 2012. [http://static.sites.s bq.org.br/quimicanova.s bq.org.br/pdf/Vol35No1\\_138\\_24AR11204.pdf](http://static.sites.s bq.org.br/quimicanova.s bq.org.br/pdf/Vol35No1_138_24AR11204.pdf)

COSTA, VICENTE C. O., TAVARES, JOSEAN F., AGRA, MARIA F., FALCÃO-SILVA, VIVYANNE S., FACANALI, ROSELAINE, VIEIRA, MARIA APARECIDA R., MARQUES, MÁRCIA ORTIZ M., SIQUEIRA-JÚNIOR, JOSÉ P., & SILVA, MARCELO SOBRAL DA. Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2), 245-248. 2008 <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200019>

CUNHA, LÍVIA MELO ARRUDA. *Estudo Fitoquímico e Biológico de Duguetia riparia (Annonaceae)*. 2009. 156 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009

DA CUNHA, A. P., NOGUEIRA, M. T., & ROQUE, O. R. *Plantas aromáticas e óleos essenciais: composição e aplicações* 1ª. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal. 2012. ISBN: 9789723114508

DA SILVA ALMEIDA, J. R. G., FACANALI, R., VIEIRA, M. A. R., MARQUES, M. O. M., LÚCIO, A. S. S. C., DE OLIVEIRA LIMA, BARBOSA-FILHO, J. M. Composition and antimicrobial activity of the leaf essential oils of *Duguetia gardneriana*

Mart. and *Duguetia moricandiana* Mart. (Annonaceae). *Journal of essential oil research*, v. 22, n. 3, p. 275-278, 2010. <https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700323>

Da SILVA, D. B., TULLI, E. C. D. O., MILITÃO, G. C. G., COSTA-LOTUFO, L. V., PESSOA, C., DE MORAES, M. O., DE SIQUEIRA, J. M. The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *Duguetia furfuracea*. *Phytomedicine*, v. 16, n. 11, p. 1059-1063, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.03.019>

Da SILVA, F. M., BATAGLION, G. A., DE ALMEIDA, R. A., HEERDT, G., SOUSA, I. L., DA SILVA FILHO, F. A., KOOLEN, H. H. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2016.12.004>

DA SILVA, Felipe MA et al. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2016.12.004>

DA SILVA, FM, BATAGLION, GA, DE ALMEIDA, RA, HEERDT, G., SOUSA, IL, DA SILVA FILHO, FA, ... & KOOLEN, HH da Silva, F. M., Bataglioni, G. A., de Almeida, R. A., Heerdt, G., Sousa, I. L., da Silva Filho, F. A., ... & Koolen, H. H. (2017). 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*, 418, 30-36.. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2016.12.004>

Da SILVA, T. B., MENEZES, L. R. A., SAMPAIO, M. F. C., MEIRA, C. S., GUIMARÃES, E. T., SOARES, M. B. P., COSTA, E. V. Chemical composition and anti-Trypanosoma cruzi activity of essential oils obtained from leaves of *Xylopia frutescens* and *X. laevigata* (Annonaceae). *Natural product communications*, v. 8, n. 3, p. 403 - 406, 2013. <https://doi.org/10.1177/1934578X1300800332>

DAHMER, Janice. *Cyclopeptides alkaloids of species Discaria americana gilles and hooker: stereochemistry and antimicrobial activity*. 2013. 158 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

DANTAS, E. P., MONTEIRO, J., MEDEIROS, L. S. D., ROMANELLI, M. M., AMARAL, M., TEMPONE, A. G., SARTORELLI, P. Desreplication of Aporphine Alkaloids by UHPLC-HR-ESI-MS/MS and NMR from *Duguetia lanceolata* St.-Hil (Annonaceae) and Antiparasitic Activity Evaluation. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 31, p. 1908-1916, 2020. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20200089>

DE LIMA, B. R., DA SILVA, F. M., SOARES, E. R., DE ALMEIDA, R. A., DA SILVA FILHO, F. A., PEREIRA JUNIOR, R. C., PINHEIRO, M. L. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Onychopetalum amazonicum* RE Fr. *Natural product research*, v. 30, n. 20, p. 2356-2359, 2016. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1163691>



DE OLIVEIRA, A. B., DE OLIVEIRA, G. G., CARAZZA, F., MAIA, J. G. S. Geovanine, a new azaanthracene alkaloid from *Annona ambotay* aubl. *Phytochemistry*, v. 26, n. 9, p. 2650-2651, 1987

DE SIQUEIRA, J. M., MÜLLER, L., CAROLLO, C. A., SILVA GARCEZ, W. A. L. M. I. R., DIAMANTINO BOAVENTURA, M. A., NASCIMENTO, E. A. Aromadendrane sesquiterpenoids from the essential oil of leaves of *Duguetia glabriuscula*-Annonaceae. *Journal of the Chilean Chemical Society*, v. 48, n. 4, p. 89-93, 2003. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072003000400014>.

DE SOUSA, O. V., DEL-VECHIO-VIEIRA, G., SANTOS, B. C. S., YAMAMOTO, C. E. H., DE MATOS ARAUJO, A. L. U. S., DE ARAUJO, A. D. L. A. E., ALVES, M. S. In-vivo and vitro bioactivities of the essential oil of *Duguetia lanceolata* branches. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 10, n. 14, pág. 298-310, 2016. DOI: 10.5897 / AJPP2015.4497.

DE SOUSA, S. R., FIGUEIREDO, F. C., DA COSTA NETO, V. P., LIMA, L. K. F., SOUSA, E. S., JÚNIOR, J. R. S., NUNES, L. C. C.). Óleo fixo de *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae) e suas atividades anticolinesterásica, antimicrobiana e antifúngica. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 7, p. 1-10, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16736>

De SOUZA ARAÚJO, M., DA SILVA, F. M. A., KOOLEN, H. H. F., e COSTA, E. V. Isoquinoline-derived alkaloids from the bark of *Guatteria olivacea* (Annonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 92, p. 104-105, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2020.104105>

DE SOUZA, A. V. M. S. Atividade anti-inflamatória do extrato, de frações e do alcalóide dicentrinona obtidos de *Duguetia furfuracea* (St. Hil) em camundongos. Dissertação Universidade Federal da Grande Dourados – Ciências da Saúde. 2013.

DE SOUZA, C. A., NARDELLIA, V. B., PAZA, W. H., PINHEIRO, M. L. B., RODRIGUES, A. C. B. D. C., BOMFIM, L. M., E COSTA, E. V. Asarone-derived Phenylpropanoids and isoquinoline-derived alkaloids from the bark of *Duguetia pycnastera* (Annonaceae) and their cytotoxicities. *Química Nova*, v. 43, p. 1397-1403, 2021. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170617>

DE SOUZA, C. A., NARDELLIA, V. B., PAZA, W. H., PINHEIRO, M. L. B., RODRIGUES, A. C. B. D. C., BOMFIM, L. M., ... e COSTA, E. V. Asarone-derived Phenylpropanoids and isoquinoline-derived alkaloids from the bark of *Duguetia pycnastera* (Annonaceae) and their cytotoxicities. *Química Nova*, v. 15, p. 1-7 2020. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170617>

DE VASCONCELOS, T. B., CARDOSO, A. R. N. R., JOSINO, J. B., MACENA, R. H. M., & BASTOS, V. P. D. Radicais livres e antioxidantes: proteção ou perigo? *Journal of Health Sciences*, v. 16, n. 3, p. 213-219, 2014.

DENG, X., ZHU, L., FANG, T., VIMOLMANGKANG, S., YANG, D., OGUTU, C., HAN, Y. Analysis of isoquinoline alkaloid composition and wound-induced variation in *Nelumbo* using HPLC-MS/MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 64, n. 5, p. 1130-1136, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b06099>

DEWICK, P. M. Secondary Metabolism: The Building Blocks and Construction Mechanisms. In: *Medicinal Natural Products*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltda, p. 7–34 2001.

DEWICK, P, M. “*Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach*”. Third Edition, Jhon Willey & sons Ltd, England 3ª Edição, p. 7-38. 2009. ISBN online: 9780470742761. DOI: 10.1002 / 9780470742761

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. Ed. UNESP, São Paulo, p. 605, 2002. ISBN: 9788571394117

DORMAN, H. J. D., PELTOKETO, A., HILTUNEN, R., TIKKANEN, M. J. Characterization of the antioxidant properties of deodourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*, London, v. 83, n. 2, p. 255-262, Nov. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00088-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00088-8)

DOS SANTOS AR, VAZ NP. Isoquinoline Alkaloids and Chemotaxonomy. Em: Ramawat K. (eds) *Biodiversity and Chemotaxonomy. Desenvolvimento Sustentável e Biodiversidade*, vol 24. *Springer*, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-30746-2\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-30746-2_8) 2019. CONFERIR O ANO FALTOU O ANO

DOS SANTOS, A. M. G. Estudo fitoquímico e avaliação de atividade inseticida de *Rollinia mucosa*. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). 32ª *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química* 2009

DOS SANTOS, A. R., PIRES, C., MARQUES, F. A., LOBÃO, A. Q., & MAIA, B. H. L. Isoquinoline alkaloids isolated from three *Guatteria* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 73, p. 1-2, 2017. <https://doi.org/10.1016 / j.bse.2017.05.002>

DUTRA, L. M., COSTA, E. V., DE SOUZA MORAES, V. R., DE LIMA NOGUEIRA, P. C., VENDRAMIN, M. E., BARISON, A., *et al.* Chemical constituents from the leaves of *Annona pickelii* (Annonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 41, p. 115-118, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2011.12.011>

ERKENS, R. H., CHATROU, L. W., KOEK-NOORMAN, J., MAAS, J. W., & MAAS, P. J. Classification of a large and widespread genus of Neotropical trees, *Guatteria* (Annonaceae) and its three satellite genera *Guatterietta*, *Guatteropsis* and *Heteropetalum*. *Taxon*, v. 56, n. 3, p. 757-774, 2007. <https://doi.org/10.2307/25065859>

FAGUNDES, F. A., OLIVEIRA, L. B. D., CUNHA, L. C., VALADARES, M. C. *Annona coriacea* induz efeito genotóxico em camundongos. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 2 n. 1, p. 24-29, 2005. <https://doi.org/10.5216/ref.v2i1.1944>

FANG, X. P., RIESER, M. J., GU, Z. M., ZHAO, G. X., MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: an updated review. *Phytochemical Analysis*, v. 4, n. 1, p. 27-48. 1993 <https://doi.org/10.1002/pca.2800040108>

FERNANDES LIMA, C. N., FRANCELINO VALERO, T., FIGUEIREDO LEITE, N., BATISTA ALENCAR, L. B., FERREIRA MATIAS, E. F., REGINA KERNTOPF, M., MELO COUTINHO, H. D. Acción protectora de *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Saff.

contra la toxicidad por cloruro de mercurio en *Escherichia coli*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, v. 19, n. 3, p. 179-188, 2014. ISSN 1028-4796

FERRAZ, R. P., CARDOSO, G. M., DA SILVA, T. B., FONTES, J. E. D. N., PRATA, A. P. D. N., CARVALHO, A. A., & BEZERRA, D. P. Antitumour properties of the leaf essential oil of *Xylopia frutescens* Aubl. (Annonaceae). *Food chemistry*, v. 141, n. 1, p. 196-200, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.114>

FERREIRA, C., PASSOS, C. L. A., SOARES, D. C., COSTA, K. P., REZENDE, M. J. C., LOBÃO, A. Q., SARAIVA, E. M. Leishmanicidal activity of the alkaloid-rich fraction from *Guatteria latifolia*. *Experimental parasitology*, v. 172, p. 51-60, 2017. <https://doi: 10.1016/j.exppara.2016.12.014>

FLORA DO BRASIL 2020 (em construção) Annonaceae In Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB110219>. Acesso em: 12 setembro 2019.

FLORES, Y.. Árboles nativos de la Región Ucayali. *Estación Experimental Agraria Pucallpa*. Perú. --375 - Impreso en Marzo del 2018.

FONTES, J. E. N., J. E., FERRAZ, R. P., BRITTO, A. C., CARVALHO, A. A., MORAES, M. O., PESSOA, C., BEZERRA, D. P. Antitumor effect of the essential oil from leaves of *Guatteria pogonopus* (Annonaceae). *Chemistry & biodiversity*, 10(4), v. 10, n. 4, p. 722-729, 2013. <https://doi: 10.1002 / cbdv.201200304>.

FOURNIER, G., LEBOEUF, M., CAVÉ, A. Annonaceae essential oils: a review. *Journal of essential oil Research*, v. 11, n. 2, p. 131-142, 1999. <https://doi.org/10.1080/10412905.1999.9701092>

FRANCO, R. R., DA SILVA CARVALHO, D., DE MOURA, F. B. R., JUSTINO, A. B., SILVA, H. C. G., PEIXOTO, L. G., ESPINDOLA, F. S. Antioxidant and anti-glycation capacities of some medicinal plants and their potential inhibitory against digestive enzymes related to type 2 diabetes mellitus. *Journal of ethnopharmacology*, v. 215, p. 140-146, 2018 <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.12.032>

FRAUSIN, GINA *et al.* Plants of the Annonaceae traditionally used as antimalarials: a review. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 36, p. 315-337, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452014000500038>

FUENTES MEDINA, LEANDRO LUIS. *Química del género Duguetia* (Annonaceae). Montevideo. Facultad de Ciencias Básicas, 2020. <https://repositorio.unicordoba.edu.co/handle/ucordoba/3894>. Acesso 21 Oct. 2021

FUMAGALI, E., GONÇALVES, R. A. C., MACHADO, M. D. F. P. S., VIDOTI, G. J., OLIVEIRA, A. J. B. D. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 28, n. 5, p. 905-912, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400022>

GOMES FERREIRA, J. A. Estudo da atividade biológica de líquidos iônicos baseados em bis-piridínios em bactérias *Gram-positivas* e *Gram-negativas*. 2015. Tese de

Doutorado. Ciências Químicas e das Biomoléculas, Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto do Instituto Politécnico do Porto.

GONÇALVES, G. L. P., DE CÁSSIA DOMINGUES, V., DO PRADO RIBEIRO, L., FERNANDES, J. B., DAS GRACAS FERNANDES, M. D. F., FORIM, M. R., VENDRAMIM, J. D. Compounds from *Duguetia lanceolata* St.-Hil.(Annonaceae) bioactive against *Zabrotes subfasciatus* (boheman)(Coleoptera: Chrysomelidae: bruchinae). *Industrial crops and products*, v. 97, p. 360-367, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.032>

GONTIJO, D. C., NASCIMENTO, M. F. A. D., BRANDÃO, G. C., OLIVEIRA, A. B. D. Phytochemistry and antiplasmodial activity of *Xylopia sericea* leaves. *Natural product research*, v. 34, n. 24, p. 3526-3530, 2020. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1577838>

GROVE, DONALD COOPER; RANDALL, WILLIAM A. Assay methods of antibiotics: a laboratory manual. *Medical Encyclopedia*, 1955. PMCID: PMC2501078

GUIMARÃES, D. O., MOMESSO, L. D. S., PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, 33(3), 667-679. v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000300035>

GUNES, H., GULEN, D., MUTLU, R., GUMUS, A., TAS, T., TOPKAYA, A. E. Antibacterial effects of curcumin: an in vitro minimum inhibitory concentration study. *Toxicology and industrial health*, v. 32, n. 2, p. 246-250, 2016. doi: 10.1177 / 0748233713498458.

GUO, GONG GUO, *et al.*, Três novos alcalóides de *Xylopia vielana* e suas atividades anti-inflamatórias. *Fitoterapia*. Volume 127, p 96-100 junho de 2018a

GUO, K., TONG, C., FU, Q., XU, J., SHI, S., E XIAO, Y. Identificação de lignanas menores, alcalóides e glicosídeos fenilpropanóides em *Magnolia officinalis* por HPLC–DAD–QTOF-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 170, p. 153-160. (2019). . <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.03.044>

GUO, R., WANG, T., ZHOU, G., XU, M., YU, X., ZHANG, X., WANG, Z. Botany, phytochemistry, pharmacology and toxicity of *Strychnos nux-vomica* L.: a review. *The American journal of Chinese medicine*, v. 46, n. 01, p. 1-23, 2018b. <https://doi.org/10.1142/S0192415X18500015>

GUO, X., TANG, C. C., THOMAS, D. C., COUVREUR, T. L., SAUNDERS, R. M. A mega-phylogeny of the Annonaceae: taxonomic placement of five enigmatic genera and support for a new tribe, Phoeniciantheae. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07252-2>.

HASMIDA, M. N., NUR SYUKRIAH, A. R., LIZA, M. S., MOHD AZIZI, C. Y. Effect of different extraction techniques on total phenolic content and antioxidant activity of *Quercus infectoria* galls. *International Food Research Journal*, v. 21, n. 3, 2014

HENRIQUES AT, KERBER VA, MORENO PRH. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis: UFSC/UFRGS; 1999.

HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P.R.H. Alcalóides: Generalidades e aspectos básicos. In In: C.M.O. Simões et al. (eds.). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, Porto Alegre, capítulo 29, Florianópolis, 2004

HUONG, D. T., LUONG, D. V., THAO, T. T. P., & SUNG, T. V. A new flavone and cytotoxic activity of flavonoid constituents isolated from *Miliusa balansae* (Annonaceae). *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 60, n. 8, p. 627-629, 2005. <https://doi.org/10.1002/chin.200550192>

HUSEIN, C. C. *Alcaloides das raízes de Xylopia langsdorffiana st-hil & tul. (Annonaceae)*. 91 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016

ISHOLA, I. O., AWODELE, O., OLUSAYERO, A. M., OCHIENG, C. O. Mechanisms of analgesic and anti-inflammatory properties of *Annona muricata* Linn.(Annonaceae) fruit extract in rodents. *Journal of medicinal food*, v. 17, n. 12, p. 1375-1382, 2014. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0088>.

IZUMI, E., MORELLO, L. G., UEDA-NAKAMURA, T., YAMADA-OGATTA, S. F., DIAS FILHO, B. P., CORTEZ, D. A. G., & NAKAMURA, C. V. *Trypanosoma cruzi*: antiprotozoal activity of parthenolide obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip.(Asteraceae, Compositae) against epimastigote and amastigote forms. *Experimental Parasitology*, v. 118, n. 3, p. 324-330, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.08.015>

JIAO, Q. S., XU, L. L., ZHANG, J. Y., WANG, Z. J., JIANG, Y. Y., LIU, B. Rapid characterization and identification of non-diterpenoid constituents in *Tinospora sinensis* by HPLC-LTQ-orbitrap MSn. *Molecules*, v. 23, n. 2, p. 274, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23020274>

KANDIMALLA, R., DASH, S., KALITA, S., CHOUDHURY, B., MALAMPATI, S., DEVI, R., KOTOKY, J. Bioactive fraction of *Annona reticulata* bark (or) *Ziziphus jujuba* root bark along with insulin attenuates painful diabetic neuropathy through inhibiting NF- $\kappa$ B inflammatory cascade. *Frontiers in cellular neuroscience*, v. 11, p. 73, 2017. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00073>. 017.

KASHIWABA, N., MOROOKA, S., KIMURA, M., MURAKOSHI, Y., ONO, M., TODA, J., SANO, T. Alkaloidal constituents of the tubers of *Stephania cepharantha* cultivated in Japan: structure of 3, 4-dehydrocycleanine, a new bisbenzylisoquinoline alkaloid. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, v. 45, n. 3, p. 470-475, 1997. <https://doi.org/10.1248/cpb.45.470>

KOEHN FE, CARTER GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*. 2005 Mar;4(3):206-20. PubMed PMID: 15729362.

KRAUSE, J., & TOBIN, G. Discovery, Development, and Regulation of Natural Products. In (Ed.), Using Old Solutions to New Problems - Natural Drug Discovery in the 21st Century. *IntechOpen*. 2013 <https://doi.org/10.5772/56424>

LAMAGNI, T. L., NEAL, S., KESHISHIAN, C., ALHADDAD, N., GEORGE, R., DUCKWORTH, G., et al. Severe *Streptococcus pyogenes* infections, United Kingdom, 2003–2004. *Emerging infectious diseases*, v. 14, n. 2, p. 202, 2008. doi: [10.3201 / eid1402.070888](https://doi.org/10.3201/eid1402.070888)

LARANJEIRA, A. G. D. A. Perfil químico, atividade antioxidante e atividade biológica do óleo das sementes de *Annona glabra* L.(ANNONACEAE). Dissertação Universidade Federal de Roraima-RR. 2016

LEBOEUF, M., CAVÉ, A., BHAUMIK, P. K., MUKHERJEE, B., MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, v. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1980. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)85046-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)85046-1)

LEKPHROM, R., KANOKMEDHAKUL, K., SCHEVENELS, F., KANOKMEDHAKUL, S.. Antimalarial polyoxygenated cyclohexene derivatives from the roots of *Uvaria cherrevensis*. *Fitoterapia*, v. 127, p. 420-424, 2018. [https://doi: 10.1016 / j.fitote.2018.01.018](https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.01.018).

LI, Y., ZENG, R. J., CHEN, J. Z., WU, Y. B., CHOU, G. X., GAO, Y., ... & JIA, L. Pharmacokinetics and metabolism study of isoboldine, a major bioactive component from *Radix Linderae* in male rats by UPLC–MS/MS. *Journal of ethnopharmacology*, v. 171, p. 154-160, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.05.042>

LIMA, B. R. D. *Prospecção de inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) em espécies do gênero Onychopetalum (Annonaceae) para o tratamento da doença de Alzheimer*. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) Universidade Federal do Amazonas. 2019

LIMA, B. R. D., SILVA, F., SOARES, E. R., ALMEIDA, R. A. D., SILVA-FILHO, F. A. D., BARISON, A., PINHEIRO, M. L. B. (Integrative Approach Based on Leaf Spray Mass Spectrometry, HPLC-DAD-MS/MS, and NMR for Comprehensive Characterization of Isoquinoline-Derived Alkaloids in Leaves of *Onychopetalum amazonicum* RE Fr. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 31, 79-89. v. 31, p. 79-89, 2020. DOI: [10.21577 / 0103-5053.20190125](https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190125)

LIMA, J. M., LEME, G. M., COSTA, E. V., CASS, Q. B. LC-HRMS and acetylcholinesterase affinity assay as a workflow for profiling alkaloids in *Annona salzmannii* extract. *Journal of Chromatography B*, v. 1164, p. 122493, 2021. DOI: [10.1016 / j.jchromb.2020.122493](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122493)

LIMA, L. A. R. S., LOPES, M. T. P., CUNHA, M. M., PIMENTA, L. P. S., BOAVENTURA, M. A. D. Avaliação da atividade citotóxica das sementes de *Annona cornifolia* A. St.-Hil.(Annonaceae). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. v. 14, n. 4, p. 629-634, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000400009>.

LIMA, LUCIANA SANTOS, LÚCIA BOAVENTURA, MARIA. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. *Food Chemistry*. 2010. 122. 1129-1138. [10.1016/j.foodchem.2010.03.100](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.100).

LIN, Z., YANG, R., GUAN, Z., CHEN, A., LI, W. Ultra-performance LC separation and quadrupole time-of-flight MS identification of major alkaloids in *Plumula Nelumbinis*. *Phytochemical Analysis*, v. 25, n. 6, p. 485-494, 2014. DOI 10.1002/pca.2517

LIN, ZONGTAO ET AL. LIN, Z., YANG, R., GUAN, Z., CHEN, A., & LI, W. Ultra-performance LC separation and quadrupole time-of-flight MS identification of major alkaloids in *Plumula Nelumbinis*. *Phytochemical Analysis*, 25(6), 485-494. 2014. DOI 10.1002/pca.2517

LOBÃO, ADRIANA QUINTELLA; MELLO-SILVA, RENATO DE; FORZZA, RAFAELA CAMPOSTRINI. Guatteria (Annonaceae) of the brazilian atlantic forest. *Rodriguésia*, v. 63, p. 1039-1064, 2012. <https://doi.org/10.1590/S2175-78602012000400018>

LOPES, J. D. C.; MELLO-SILVA, R. Diversity and characterization of Annonaceae from Brazil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(SPE1), v. 36, n. SPE1, p. 125-131, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452014000500015>

LÚCIO, A. S. S. C. Alcaloides de annonacea: ocorrência e compilação de suas atividades biológicas e avaliação fitoquímica e biológica de *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith (Annonaceae). Tese Universidade Federal da Paraíba-UFPB. 2015.

LÚCIO, A. S. S. C., DA SILVA ALMEIDA, J. R. G., DA-CUNHA, E. V. L., TAVARES, J. F., BARBOSA FILHO, J. M. Alkaloids of the Annonaceae: occurrence and a compilation of their biological activities. *The alkaloids: chemistry and biology*, v. 74, p. 233-409, 2015 <https://doi.org/10.1016/bs.alal.2014.09.002>.

LÚCIO, Ana Silvia Suassuna Carneiro. *Alcaloides de annonacea: ocorrência e compilação de suas atividades biológicas e avaliação fitoquímica e biológica de Anaxagorea dolichocarpa Sprague & Sandwith (Annonaceae)*. 302 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)- Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

LUO, X., CHEN, B., LIU, J. e YAO, S. Simultaneous analysis of N-nornuciferine, O-nornuciferine, nuciferine, and roemerine in leaves of *Nelumbo nucifera* Gaertn by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection–electrospray mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 538, n. 1-2, p. 129-133, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.01.066>.

MAAS, P. J. M.; RAINER, H.; LOBÃO, A. Q. Annonaceae. In: REFLORA. *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.

MAAS, P. J. M.; WESTRA, L. Y.; VERMEER, M. Revision of the neotropical genera *Bocageopsis*, *Onychopetalum*, and *Unonopsis* (Annonaceae). *Blumea: Biodiversity*,

*Evolution and Biogeography of Plants*, Leiden, v. 52, n. 3, p. 413-554, 2007. [https://doi: 10.3767 / 000651907X608909](https://doi.org/10.3767/000651907X608909)

MAHIOU, V., ROBLOT, F., FOURNET, A., HOCQUEMILLER, R. Bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Guatteria boliviana* (Annonaceae). *Phytochemistry*, v. 54, n. 7, pág. 709-716, 2000. [https://doi: 10.1016 / s0031-9422 \(00\) 00178-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00178-3).

MAIA, J. G. S., ANDRADE, E. H. A., CARREIRA, L. M. M., OLIVEIRA, J., ARAÚJO, J. S. Essential oils of the Amazon *Guatteria* and *Guatteriopsis* species. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 20, n. 5, p. 478-480, 2005. <https://doi.org/10.1002/ffj.1500>

MAJRASHI, T. A., ZULFIQAR, F., CHITTIBOYINA, A. G., ALI, Z., e KHAN, I. A. Isoquinoline alkaloids from *Asimina triloba*. *Natural product research*, v. 33, n. 19, p. 2823-2829, 2019. [doi.org/10.1080/14786419.2018.1504045](https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1504045)

MAJRASHI, TAGHREED ALI, "Chemical And Biological Evaluations Of *Asimina Triloba* And *Rollinia Mucosa*. Electronic Theses and Dissertations. 1815. 2020 <https://egrove.olemiss.edu/etd/1815>

MCKERROW, J. H. Recognition of the role of Natural Products as drugs to treat neglected tropical diseases by the 2015 Nobel prize in physiology or medicine. *Natural product reports*, v. 32, n. 12, p. 1610-1611, 2015. [https:// doi: 10.1039 / c5np90043c](https://doi.org/10.1039/c5np90043c)

MEIRA, C. S., MENEZES, L. R., DOS SANTOS, T. B., MACEDO, T. S., FONTES, J. E., COSTA, E. V., .. SOARES, M. B. Chemical composition and antiparasitic activity of essential oils from leaves of *Guatteria friesiana* and *Guatteria pogonopus* (Annonaceae). *Journal of essential oil research*, v. 29, n. 2, p. 156-162, 2017.156-162.2017. <https://doi.org/10.1080/10412905.2016.1210041>

MIGUEL, O. G.; MONTUCCHIO, D. P.; SANTOS, A. R. S. DOS; DIAS, J. DE F. G.; MIGUEL, M. D.; ZANIN, S. M. W.; MELO, C. F. DE; ZANIN, P. Identificação da propriedade antinoceptiva (analgésica) do alcaloide aporfínico S- (+) -dicentrina e usos do mesmo Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Brasil, 2016.

MONTEIRO, Á. B., DE SOUZA RODRIGUES, C. K., DO NASCIMENTO, E. P., DOS SANTOS SALES, V., DE ARAÚJO DELMONDES, G., DA COSTA, M. H. N., *et al.* Anxiolytic and antidepressant-like effects of *Annona coriacea* (Mart.) and caffeic acid in mice. *Food and Chemical Toxicology*, v. 136, p. 111049, 2020. [https://doi: 10.1016 / j.fct.2019.111049](https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.111049)

MONTRUCCHIO, Deise Prehs *et al.* *Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato e do alcaloide s-(+)-dicentrina extraído de frutos de Ocotea puberula (lauraceae)*. 2012. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria. 2012

MORALES, RAFAEL LAURINDO. Atividade antiviral de extratos de diferentes espécies de anonácea E. Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde, Sinop-UFMT-2019



MUHAMMAD, I., DUNBAR, D. C., TAKAMATSU, S., WALKER, L. A., CLARK, A. M. Antimalarial, cytotoxic, and antifungal alkaloids from *Duguetia hadrantha*. *Journal of natural products*, v. 64, n. 5, p. 559-562, 2001. <https://doi.org/10.1021/np000436s>

MUÑOZ, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G.; CALLAPA, J.; BERGERON, S.; ROJAS, I.; BRAVO, J. A.; BALDERRAMA, L.; ORTIZ, B.; GIMENEZ, A.; DEHARO, E. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 69, p. 127–137, 2000. [https://doi.org/10.1016 / S0378-8741 \(99\) 00148-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00148-8)

NACZK, M., SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.059>.

NAHARA, LUTFUN SARKER, SATYAJIT D. Medicinal natural products—An introduction Annual Reports in Medicinal Chemistry. 2020. <https://doi.org/10.1016/bs.armc.2020.02.008>

NARDELLI, V. B., DE SOUZA, C. A. S., DA SILVA CHAAR, J., KOOLEN, H. H. F., DA SILVA, F. M. A., & COSTA, E. V. Isoquinoline-derived alkaloids and one terpene lactone from the leaves of *Duguetia pycnastera* (Annonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 94, p. 104206, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2020.104206>

NETO, F. C., ANDRÉO, M. A., RAFTERY, D., LOPES, J. L. C., LOPES, N. P., CASTRO-GAMBOA, I., MAIA, B. H. L. N. S., COSTA, E. V., VESSECCHI, R. Characterization of aporphine alkaloids by electrospray ionization tandem mass spectrometry and density functional theory calculations. *Rapid Communications Mass Spectrometry*, v. 34, p. e8533, 2020 DOI: 10.1002/rcm.8533

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M.; SNADER, Kenneth M. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural product reports*, v. 17, n. 3, p. 215-234, 2000. [https://doi: 10.1039 / a902202c](https://doi.org/10.1039/a902202c).

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>

NGOUONPE, A. W., MBOBDA, A. S. W., HAPPI, G. M., MBIANTCHA, M., TATUEDOM, O. K., ALI, M. S., KOUAM, S. F. Natural products from the medicinal plant *Duguetia staudtii* (Annonaceae). *Biochemical systematics and ecology*, v. 83, p. 22-25, 2019. [https://doi: 10.1016 / j.bse.2018.12.015](https://doi.org/10.1016/j.bse.2018.12.015)

NHIEM, N. X., TUONG, N. T., KY, P. T., SUBEDI, L., PARK, S. J., NGOC, T. M.; KIM, S. H. Chemical Components from *Phaeanthus vietnamensis* and Their Inhibitory NO Production in BV 2 Cells. *Chemistry & biodiversity*, v. 14, n. 8, p. e1700013, 2017. [https://doi: 10.1002 / cbdv.201700013](https://doi.org/10.1002/cbdv.201700013).

OKANO, M., SATO, M., KAGEYAMA, S. Determination of higenamine and coclaurine levels in human urine after the administration of a throat lozenge containing *Nandina domestica* fruit. *Drug testing and analysis*, v. 9, n. 11-12, p. 1788-1793, 2017 <https://doi.org/10.1002/dta.2258>

OLIVEIRA, E. S., AMARAL, A. C. F., LIMA, E. S., SILVA, J. R. D. A. Chemical composition and biological activities of *Bocageopsis multiflora* essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, v. 26, n. 3, p. 161-165, 2014. <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.840809>

OLIVEIRA, Rodolfo Nascimento de. *Estudo fitoquímico e investigação da atividade citotóxica das cascas do caule de Duguetia surinamensis (Annonaceae)*. 125 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2017.

OUSSALAH, M., CAILLET, S., SAUCIER, L., LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food control*, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007. . <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.11.009>

PAREDES, A., HASEGAWA, M., PRIETO, F., MENDEZ, J., RODRIGUEZ, M., RODRIGUEZ-ORTEGA, M. Biological activity of *Guatteria cardoniana* fractions. *Journal of ethnopharmacology*, v. 78, n. 2-3, p. 129-132, 2001. [https://doi: 10.1016 / s0378-8741 \(01\) 00315-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00315-4)

PATRIDGE, E., GAREISS, P., KINCH, M. S., HOYER, D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug discovery today*, v. 21, n. 2, p. 204-207, 2016. [https://doi: 10.1016 / j.drudis.2015.01.009](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.01.009).

PAZ, W. H., DE OLIVEIRA, R. N., HEERDT, G., ANGOLINI, C. F., S. DE MEDEIROS, L., SILVA, V. R., KOOLEN, H. H.. Structure-based molecular networking for the target discovery of oxahomoaporphine and 8-oxohomoaporphine alkaloids from *Duguetia surinamensis*. *Journal of natural products*, v. 82, n. 8, p. 2220-2228, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00287>

PELLETIER, S.W., *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, Volume 11 - 1st Edition. Print Book & E-Book. 1996. ISBN 9780080427973, 9780080527000.

PÉREZ, E., SÁEZ, J., BLAIR, S., FRANCK, X., FIGADÈRE, B. Isoquinoline alkaloids from *Duguetia vallicola* stem bark with antiplasmodial activity. *Letters in Organic Chemistry*, v. 1, n. 1, p. 102-104, 2004. <https://doi.org/10.2174/1570178043488743>

PHILLIPSON, J. DAVID; ANDERSON, LINDA A. Ethnopharmacology and western medicine. *Journal of ethnopharmacology*, v. 25, n. 1, p. 61-72, 1989. doi: 10.1016/0378-8741(89)90045-7.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000. [https://doi: 10.1021 / np9904509](https://doi.org/10.1021/np9904509)

PINHO, FRANCISCA VALÉRIA SOARES DE ARAÚJO *et al.* Phytochemical composition, antifungal and antioxidant activity of *Duguetia furfuracea* A. St.-Hill. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2016. 2016. doi: 10.1155 / 2016/7821051

QING, Z., XU, Y., YU, L., LIU, J., HUANG, X., TANG, Z., ZENG, J. Investigation of fragmentation behaviours of isoquinoline alkaloids by mass spectrometry combined with

computational chemistry. *Scientific reports* v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57406-7>

QUINTANS, DE SS J., SOARES, B. M., FERRAZ, R. P., OLIVEIRA, A. C., DA SILVA, T. B., MENEZES, L. R., BEZERRA, D. P.). Chemical constituents and anticancer effects of the essential oil from leaves of *Xylopia laevigata*. *Planta medica*, v. 29, n. 02, p. 123-130, 2013. DOI: 10.1055 / s-0032-1328091

RABELO, D. D. M., PINHEIRO, M. L., BARISON, A., SALOMÉ, K. S., COSTA, E. V., SILVA, F. M., BASTOS, I. D. S. Isoquinoline alkaloids and investigation of the antibacterial and antiplasmodial activities of *Guatteria citriodora* (Annonaceae). *Química Nova*, v. 37, n. 9, p. 1453-1458, 2014. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140233>

RAHMAN, I., BISWAS, S. K., KIRKHAM, P. A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical pharmacology*, v. 72, n. 11, p. 1439-1452, 2006. 72(11), 1439-1452. DOI:10.1016/j.bcp.2006.07.004

RAHMAN, I., BISWAS, S. K., KIRKHAM, P. A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical pharmacology*, v. 72, n. 11, p. 1439-1452, 2006. 72(11), 1439-1452. DOI:10.1016/j.bcp.2006.07.004

RAJCA FERREIRA, A. K., LOURENÇO, F. R., YOUNG, M. C. M., LIMA, M. E. L., CORDEIRO, I., SUFFREDINI, I. B., MORENO, P. R. H. CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *GUATTERIA ELLIPTICA* RE FRIES (ANNONACEAE) essential oils. *Journal of Essential oil Research*, v. 30, n. 1, p. 69-76, 2018. <https://doi.org/10.1080/10412905.2017.1371086>

RAJKUMAR, SANKARAN; JEBANESAN, ARULSAM. Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena dentata* (Willd) M. Roam.(Rutaceae) against the chikungunya vector, *Aedes aegypti* Linn.(Diptera: Culicidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, v. 13, n. 2, p. 107-109, 2010. DOI: [10.1016 / j.aspen.2010.02.001](https://doi.org/10.1016/j.aspen.2010.02.001)

REINECKEN, J., MENDES, A., MARQUES, A., & BENNEMANN, R. M. Plantas medicinais potencialmente hipolipidêmicas. *Enciclopédia Biosfera*, 15(28). 2018. DOI: 10.18677/EnciBio\_2018B102

RIOS E PASTORE - Plantas da Amazônia : 450 espécies de uso geral / Mary Naves da Silva Rios, Floriano Pastore Jr., organizadores. -- Brasília : Universidade de Brasília, Biblioteca Central, 2011. ISBN 978-85-64593-02-2

RODRIGUES, A. C. B., BOMFIM, L. M., NEVES, S. P., MENEZES, L. R., DIAS, R. B., SOARES, M. B., ... BEZERRA, D. P. Antitumor properties of the essential oil from the leaves of *Duguetia gardneriana*. *Planta medica*, 81(10), 798-803. v. 81, n. 10, p. 798-803, 2015. DOI: 10.1055 / s-0035-1546130

RODRIGUES, ACB, BOMFIM, LM, NEVES, SP, MENEZES, LR, DIAS, RB, SOARES, MB, BEZERRA, DP Propriedades antitumorais do óleo essencial das folhas de *Duguetia gardneriana*. *Planta medica*, v. 81, n. 10, pág. 798-803, 2015. DOI: 10.1055/s-0035-1546130.

RODRIGUES, V. E. G., & CARVALHO, D. D. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande–Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 25, n. 1, p. 102-123, 2001.

RODRIGUEZ, M., HASEGAWA, M., MENDEZ, J., PEREIRA, G., ARVELO, F. Bioactive oxoaporphine alkaloids from *Guatteria calva*. *Fitoterapia (Milano)*, v. 70, n. 1, p. 74-76, 1999. [https:// doi:10.1016/s0367-326x\(98\)00011-2](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(98)00011-2)

ROUHI AM. Moving Beyond Natural Products. *Chem. Eng. News*. 2003 October 13, pp. 77-91b.

Rouhi AM. Rediscovering Natural Products. *Chem. Eng. News*. 2003 October 13, pp. 104-7a.

SALES JUNIOR, P. A., ZANI, C. L., DE SIQUEIRA, E. P., KOHLHOFF, M., MARQUES, F. R., CALDEIRA, A. S. P., ... ALVES, T. M. A. (2021). Trypanocidal trixikingolides from *Trixis vauthieri*. *Natural product research*, v. 35, n. 16, p. 2691-2699, 2021. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1663510>

SANGALLI, A., VIEIRA, M. C., HEREDIA, N. A. Z. Levantamento e caracterização de plantas nativas com propriedades medicinais em fragmentos florestais e de cerrado de Dourados-MS, numa visão etnobotânica. In: *I Latin-American Symposium on the Production of Medicinal, Aromatic and Condiments Plants* v. 32, n. 2, p. 651-658, 2008. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.569.28>

SANTI, M. M., SANCHES, F. S., SILVA, J. F. M., SANTOS, P. M. L. Determinação do perfil fitoquímico de extrato com atividade antioxidante da espécie medicinal *Cordia verbenacea* DC. por HPLC-DAD. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 16, p. 256-261, 2014.. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722014000200014>

SANTOS DO, R. C., DE SOUZA, A. V., ANDRADE-SILVA, M., KASSUYA, C. A. L., CARDOSO, C. A. L., DO CARMO VIEIRA, M., FORMAGIO, A. S. N. Antioxidant, anti-rheumatic and anti-inflammatory investigation of extract and dicentrinone from *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Benth. & Hook. f. *Journal of ethnopharmacology*, v. 211, p. 9-16, 2018.. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.09.019>

SANTOS M.R.A.; LIMA M.R., OLIVEIRA C.L.L.G. Medicinal plants used in Rondônia, Western Amazon, Brazil. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.16, n.3, supl. I, p.707-720, 2014.

SANTOS, Alessandra Taís dos. Efeito do extrato de *Guatteria punctata* (Aubl.) R.A.Howard sobre os parâmetros cognitivos e comportamentais em camundongos. 2019. 58f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Enfermagem) – Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências da Saúde, Sinop, 2019.

SANTOS, M. D. F. C., FONTES, J. E. N., DUTRA, L. M., BOMFIM, L. M., COSTA, C. O., MORAES, V. R., COSTA, E. V. Alkaloids from leaves of *Guatteria pogonopus* (Annonaceae) and their cytotoxicities. *Química Nova*, v. 41, p. 884-890, 2018. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170258>.

SATO, T.; KIGAWA, A.; TAKAGI, R.; ADACHI, T.; HOSHINO, T. Biosynthesis of a novel cyclic C35-terpene via the cyclisation of a Z-type C35-polyprenyl diphosphate

obtained from a nonpathogenic *Mycobacterium* species. *Organic & biomolecular chemistry*, 6(20), 3788–3794. 2008.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G., BURGOS-EDWARDS, A., JIMÉNEZ-ASPEE, F., MIERES-CASTRO, D., THEODULOZ, C., PORMETTER, L., VALDEZ, S. (Iridoids and Amino Acid Derivatives from the Paraguayan Crude Drug *Adenocalymma marginatum* (ysypó hû). *Molecules*, v. 25, n. 1, p. 180, 2020. DOI: 10.3390 / molecules25010180

SCHMIDT, J., RATH, K., BOETTCHER, C., ZENK, M. H. Analysis of benzyloisoquinoline-type alkaloids by electrospray tandem mass spectrometry and atmospheric pressure photoionization. *European Journal of Mass Spectrometry*. v. 11, n. 3, p. 325-333, 2005. doi: 10.1255/ejms.745.

SCHINDLER, BIANCA; SILVA, DANIELA THOMAS DA; HEINZMANN, BERTA MARIA. EFFECT OF SEASONALITY ON THE ESSENTIAL OIL YIELD OF *Piper gaudichaudian m* KUNTH. *Ciência Florestal*, v. 28, n. 1, p. 263-273, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509831581>

SERVILLO, L., GIOVANE, A., CASALE, R., BALESTRIERI, M. L., CAUTELA, D., PAOLUCCI, M., E CASTALDO, D. Betaines and related ammonium compounds in chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Food chemistry*, 196, 1301-1309. v. 196, p. 1301-1309, 2016. doi: 10.1016 / j.foodchem.2015.10.070.

SHANGGUAN, Y., HE, J., KANG, Y., WANG, Y., YANG, P., GUO, J., HUANG, J. Structural Characterisation of Alkaloids in Leaves and Roots of *Stephania kwangsiensis* by LC-QTOF-MS. *Phytochemical analysis*, v. 29, n. 1, p. 101-111, 2018. DOI 10.1002/pca.2718

SHIRWAIKAR, A., RAJENDRAN, K., KUMAR, C. D., BODLA, R. Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Annona squamosa* in streptozotocin–nicotinamide type 2 diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*, v. 91, n. 1, p. 171-175, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.12.017>.

SILVA TB, MENEZES LR, SAMPAIO MF, MEIRA CS, GUIMARÃES ET, SOARES MB, PRATA AP, NOGUEIRA PC, COSTA EV, Chemical composition and anti *Trypanosoma cruzi* activity of essential oils obtained from leaves of *Xylopia frutescens* and *Xylopia laevigata* (Annonaceae). *Nat Prod Commun*, 8:403-6, 2013. <https://doi.org/10.1177/1934578X1300800332>

SILVA, D. B. D., MATOS, M. D. F. C., NAKASHITA, S. T., MISU, C. K., YOSHIDA, N. C., CAROLLO, C. A., ... & SIQUEIRA, J. M. D. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxaporfínicos obtidos de Annonaceae. *Química Nova*, v. 30, p. 1809-1812, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000800004>

SILVA, D. B. D., TULLI, E. C. D. O., GRASSI, R. F., FABRI, J. R., SIQUEIRA, J. M. D., GARCEZ, W. S. Alkaloids of skins of subterrene stem from *Duguetia furfuracea*-Annonaceae. 29ª *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. 2006.

SILVA, D. B. D., TULLI, E. C., GARCEZ, W. S., NASCIMENTO, E. A., SIQUEIRA, J. M. D. Chemical constituents of the underground stem bark of *Duguetia furfuracea*

(Annonaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, p. 1560-1565, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532007000800017>

SILVA, D. B.; TULLI, E. C. O.; MILITÃO, G. C. G.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; MORAES, M. O. DE; ALBUQUERQUE, S.; SIQUEIRA, J. M. DE. The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *Duguetia furfuracea*. *Phytomedicine*, v. 16, p. 1059–1063, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.03.019>

SILVA, F. M. A. D. Contribuição ao estudo fitoquímico e quimiotaxonômico do gênero *Unonopsis* da região Amazônica. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Federal do -UFAM. Amazonas. 2016

SILVA, F. M. A. D., KOOLEN, H. H. F., ALMEIDA, R. A. D., SOUZA, A. D. L. D., PINHEIRO, M. L. B., COSTA, E. V. Desreplicação de alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos de *Unonopsis guatterioides* por ESI-IT-MS. *Química Nova*, v. 35, p. 944-947, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000500015>

SILVA, F. M. A. D., KOOLEN, H. H. F., ALMEIDA, R. A. D., SOUZA, A. D. L. D., PINHEIRO, M. L. B., & COSTA, E. V. Desreplicação de alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos de *Unonopsis guatterioides* por ESI-IT-MS. *Química Nova*, v. 35, p. 944-947, 2012..DOI: 10.1590/S0100-40422012000500015

SILVA, I. M. *Flora de Rondônia, Brasil : Malmeeae (Annonaceae)* / Ingrid Mendes Silva. – Rio de Janeiro. Dissertação (mestrado) – Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro / Escola Nacional de Botânica Tropical, 2020.

SILVA, R. M. D., FIORATTI, C. A. G., SILVA, G. B., CARDOSO, C. A. L., MIRANDA, L. O., MAUAD, M., e MUSSURY, R. M. Antibiose do extrato foliar de *Duguetia furfuracea* sobre *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). FICHA CATALOGRÁFICA, 52. 2017.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/Editora da UFSC, 2001.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., DE MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Artmed Editora. 2017 ISBN: 978-85-8271-359-4

SINGH, A., BAJPAI, V., KUMAR, S., RAWAT, A. K. S., KUMAR, B. Analysis of isoquinoline alkaloids from *Mahonia leschenaultia* and *Mahonia napaulensis* roots using UHPLC-Orbitrap-MSn and UHPLC-QqQLIT-MS/MS. *Journal of pharmaceutical analysis*, v. 7, n. 2, p. 77-86, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2016.10.002>

SIQUEIRA, C. A. T., SERAIN, A. F., PASCOAL, A. C. R. F., ANDREAZZA, N. L., DE LOURENÇO, C. C., GÓIS RUIZ, A. L. T., ... SALVADOR, M. J. Bioactivity and chemical composition of the essential oil from the leaves of *Guatteria australis* A. St.-Hil. *Natural product research*, v. 29, n. 20, p. 1966-1969, 2015. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1015017>

SOARES, E. R. *Estudo fitoquímico e atividade biológica de Bocageopsis pleiosperma Maas (Annonaceae)*. Dissertação (mestrado em Química de Produtos Naturais. Universidade Federal do Amazonas- UFAM. 2014

SOARES, E. R., DA SILVA, F. M., DE ALMEIDA, R. A., DE LIMA, B. R., DA SILVA FILHO, F. A., BARISON, A., DE SOUZA, A. D. Direct infusion ESI-IT-MSn alkaloid profile and isolation of tetrahydroharman and other alkaloids from *Bocageopsis pleiosperma* maas (Annonaceae). *Phytochemical analysis*, v. 26, n. 5, p. 339-345, 2015. [https://doi: 10.1002 / pca.2568](https://doi.org/10.1002/pca.2568).

SOARES, E. R., DE ALMEIDA, R. A., DE LIMA, B. R., MAFRA, H. R., DE SOUZA LEAO, L. Q., MACIEL, J. B., . PINHEIRO, M. L. B. A new flavonoid glycoside and other compounds from the leaves of *Bocageopsis canescens* (Benth.) RE Fr. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 85, p. 76-78, 2019. [https://doi: 10.1016 / j.bse.2019.05.007](https://doi.org/10.1016/j.bse.2019.05.007)

SOLANKI, J., MANDALIYA, V., GEORRGE, J. J. Medicinal Properties of *Annona muricata* Extracts in Various Disease. *Recent Trends in Science and Technology*. p. 126-133, 2020. DOI: 10.6084 / m9.figshare.13491129

SOUSA, C. M. D. M., SILVA, H. R., AYRES, M. C. C., COSTA, C. L. S. D., ARAÚJO, D. S., CAVALCANTE, L. C. D., CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química nova*, v. 30, p. 351-355. v. 30, p. 351-355, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021>

SOUSA, O. V., DEL-VECHIO-VIEIRA, G., ALVES, M. S., ARAÚJO, A. A., PINTO, M. A., AMARAL, M. P., e KAPLAN, M. A. Chemical composition and biological activities of the essential oils from *Duguetia lanceolata*. St. Hil. barks. *Molecules*, v. 17, n. 9, p. 11056-11066, 2012. doi: 10.3390 / moléculas170911056.

SOUZA, A. D. Atividade Anti-inflamatória do Extrato, de Frações e do Alcaloide Dicentrinona, obtidos de *Duguetia furfuracea* (St. Hil) em Camundongos. Dourados, Dissertação de Mestrado Universidade Federal da Grande Dourados Mato Grosso do Sul . 2013.

SOUZA, Alcilene Dias de et al. *Isolamento de Alcaloides e atividades biológicas de espécies de Lauraceae da Amazônia*. 2014. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas.

STÉVIGNY, C., JIWAN, J. L. H., ROZENBERG, R., DE HOFFMANN, E., & QUETIN-LECLERCQ, J. Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, v. 18, n. 5, p. 523-528, 2004. DOI: 10.1002/rcm.1343

TADIC, D.; WANNIGAMA, G. P.; CASSELS, B. K.; CAVÉ, A. Alkaloids of *Alphonsea sclerocarpa*. *Journal of Natural Products*, v.50, p. 518-519, 1987. [https://doi.org/ 10.1021 / np50051a036](https://doi.org/10.1021/np50051a036)

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 719 .2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 719 .2004.

TAMFU, A. N., TAGATSING FOTSING, M., TALLA, E., JABEEN, A., MBAFOR TANYI, J., SHAHEEN, F. Bioactive constituents from seeds of *Annona senegalensis* Persoon (Annonaceae). *Natural product research*, v. 35, n. 10, p. 1746-1751, 2021 <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1634713>

TAN, Y., CHANG, S. K., ZHANG, Y. Comparison of  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and lipase inhibitory activity of the phenolic substances in two black legumes of different genera. *Food chemistry*, v. 214, p. 259-268, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.100>

TAVARES, J. F., BARBOSA, F., JOSE, M., SILVA, M. S. D., CUNHA, E. V. L. D. Alkaloids and volatile constituents from the stem of *Fusaea longifolia* (Aubl.) Saff. (Annonaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 15(2): 115-118, Abr./Jun. 2005

TEMPONE, A. G., BORBOREMA, S. T., DE ANDRADE JR, H. F., DE AMORIM GUALDA, N. C., YOGI, A., CARVALHO, C. S., FISCHER, D. C. H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. *Phytomedicine*, v. 12, n. 5, p. 382-390, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.10.007>

TORRES, D. D. S., PEREIRA, E. C., SAMPAIO, P. A., DE SOUZA, N. A., FERRAZ, C. A., OLIVEIRA, A. P. D., ROLIM, L. A. Influence of extraction process on flavonoid content from *cnidoscolus quercifolius* pohl (euphorbiaceae) and antioxidant activity. *Química Nova*, Vol. 41, No. 7, 743-747, 2018. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170236>

TSABANG, N., FOKOU, P. V. T., TCHOKOUAHA, L. R. Y., NOGUEM, B., BAKARNGA-VIA, I., NGUEPI, M. S. D.; *et al.* Ethnopharmacological survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four areas of Cameroon. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 139, n. 1, p. 171-180, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.10.035>

VALTER, J. L., ALENCAR, K., SARTORI, Â. L., NASCIMENTO, E. A., CHANG, R., DE MORAIS, S. A., SIQUEIRA, J. M. D. Variação química no óleo essencial das folhas de seis indivíduos de *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, p. 373-378, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000300011>

VAN ANDEL, T. R. Non-Timber Forest Products of the North-west District of Guyana: Part II (Tropenbos-Guyana Series 8b). *Georgetown: Tropenbos-Guyana Programme*. Guiana. 2000. ISBN: 90-393-2536-7

VELIKOVA M, BANKOVA V, TSVETKOVA I, KUJUMGIEV A, Marcucci MC. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. *Fitoterapia*. 2000 Dec;71(6):693-6. doi: 10.1016/s0367-326x(00)00213-6. PMID: 11077178.

VIEIRA HS, TAKAHASHI JA, BOAVENTURA MA. Novel derivatives of ent-17,19-dihydroxy-16 $\beta$ H-kaurane obtained by biotransformation with *Verticillium lecanii*. *J Agric Food Chem*. 2002 Jun 19;50(13):3704-7. doi: 10.1021/jf020009f. PMID: 12059146.



VILLAR, A.; MARES, M.; RIOS, J. L.; CORTES, D. Alkaloids from *Annona cherimolia* leaves. *Journal of Natural Products*, v. 48, n. 1, p. 151-152, 1985. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.006>

WANG, R., XIONG, X., YANG, M., HE, S., XU, X. A pharmacokinetics study of orally administered higenamine in rats using LC–MS/MS for doping control analysis. *Drug testing and analysis*, v. 12, n. 4, p. 485-495, 2020. <https://doi.org/10.1002/dta.2756>

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*, 18(7), 7739-7750. v. 18, n. 7, p. 7739-7750, 2013. doi:10.3390/molecules18077739

ZHAO, Y., WANG, M., SUN, L., JIANG, X., ZHAO, M., ZHAO, C. Rapid characterization of the chemical constituents of Sanhua decoction by UHPLC coupled with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *RSC Advances*, v. 10, n. 44, p. 26109-26119, 2020. DOI:10.1039/D0RA02264K.

## PRODUÇÃO CIENTÍFICA

### A – Artigos publicados como autora– 2019/2020

BAY, M.; OLIVEIRA, J.V.S.; JUNIOR, P.A.S.; MURTA, S.M.F.; SANTOS, A.R.; BASTOS, I.S.; ORLANDI, P.P.; JUNIOR, P.T.S. In vitro trypanocidal and antibacterial activities of essential oils from four species of the family Annonaceae. *Chem. Biodivers.* 2019, 16, 11. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900359>

BAY, M., DOS SANTOS, A. R., BAY HURTADO, F., DOS SANTOS BASTOS, I., Puccinelli Orlandi, P., & Teixeira de Sousa Jr., P. (2020). ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA in vitro DE EXTRATOS VEGETAIS DA FAMÍLIA ANNONACEAE. *South American Journal of Basic Education, Technical and Technological*, 7(2), 128–144. Recuperado de <https://periodicos.ufac.br/index.php/SAJEETT/article/view/3661>