



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ

ESTUDO FITOQUÍMICO E INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES
ANTIMICRONIANA E INSETICIDA DE *Annona montana* (ANNONACEAE)

BRENNNA KÉSIA FERREIRA DA SILVA

Manaus/AM
Agosto, 2024

BRENNNA KÉSIA FERREIRA DA SILVA

ESTUDO FITOQUÍMICO E INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES
ANTIMICRONIANA E INSETICIDA DE *Annona montana* (ANNONACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal do Amazonas,
exigido para o título de Mestre em
Química, na Linha de Pesquisa:
Produtos Naturais e Biomoléculas.

Orientadora

Profa. Dra. Waldireny Rocha Gomes

Coorientador

Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen

Manaus/AM
Agosto, 2024

Ficha Catalográfica

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

S586e Silva, Brenna Késia Ferreira da
Estudo fitoquímico e investigação das propriedades
antimicrobiana e inseticida de *annona montana* (annonaceae) /
Brenna Késia Ferreira da Silva . 2024
93 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Waldireny Rocha Gomes
Coorientador: Hector Henrique Ferreira Koolen
Dissertação (Mestrado em Química de Prod. Naturais) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Metabólitos secundários. 2. Cromatografia. 3. Atividade
larvicida . 4. Alcaloides. I. Gomes, Waldireny Rocha. II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

ESTUDO FITOQUÍMICO E INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICRONIANA E INSETICIDA DE *Annona montana* (ANNONACEAE)

BRENNA KÉSIA FERREIRA DA SILVA

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestra em Química.

Aprovada em, 30 de agosto de 2024.

Documento assinado digitalmente
 **WALDIRENY ROCHA GOMES**
Data: 30/08/2024 19:13:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

WALDIRENY ROCHA GOMES (PPGQ/UFAM)
Presidente/Orientadora

Documento assinado digitalmente
 **EMMANOEL VILACA COSTA**
Data: 30/08/2024 18:00:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

EMMANOEL VILAÇA COSTA (PPGQ/UFAM)
Membro Interno

Documento assinado digitalmente
 **MARIA LÚCIA BELEM PINHEIRO**
Data: 30/08/2024 18:55:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

MARIA LÚCIA BELEM PINHEIRO (DQ/UFAM)
Membro Externo

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 30 de agosto de 2024.

DEDICATÓRIA

À minha primeira professora e mãe, Francisca, exemplo de resiliência, superação e amor incondicional. Obrigada por me ensinar o valor da vida, por me incentivar a caminhar sem medo, e por abdicar dos seus sonhos para que os meus se concretizassem.

Com todo meu amor e reconhecimento!

AGRADECIMENTOS

Meu mais sincero agradecimento a Deus, por sua infinita bondade, pela proteção e cuidado a cada passo dessa jornada.

À minha orientadora, querida professora Dra. Waldireny Rocha, manifesto a mais profunda gratidão por sua orientação impecável, suporte material, suporte emocional e por sua infinita paciência. Sua confiança em meu potencial me inspirou a dar o meu melhor e a superar os meus próprios limites. Agradeço por me levantar em meio ao caos, por ter me guiado nesse projeto, ajudando a aprimorar minhas habilidades e a me tornar uma pesquisadora mais completa.

Ao meu coorientador, querido professor Dr. Hector Koolen, meus sinceros agradecimentos pelas valiosas contribuições, por instigar-nos a dar sempre o melhor, pelo apoio constante. Suas sugestões construtivas foram essenciais para o desenvolvimento da minha pesquisa. Agradeço a oportunidade de aprender com você e por ter me ajudado a alcançar meus objetivos. Sem seu apoio esse projeto não teria se concretizado. Minha eterna gratidão!

Ao Dr. Felipe Moura do Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas – LABCEM-UFAM e ao Professor Dr. Marcos Machado e toda a equipe técnica do laboratório de Ressonância magnética nuclear – NMRLAB-UFAM.

A professora Dra. Adriana Dantas do Laboratório de pesquisa em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas – ICB-UFAM, e a professora Dra. Ana Cristina da Silva do Laboratório de Vetores de Malária e Dengue – INPA, expresso minha profunda gratidão pelo suporte e pela oportunidade de realizar experimentos de alta qualidade.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, meu muito obrigado pelo companheirismo e pela ajuda incondicional. Vocês tornaram essa jornada mais leve e enriquecedora. Compartilhar alegrias, desafios e aprendizados com vocês foi fundamental para o meu crescimento pessoal e profissional. Sou grata por tê-los em minha vida.

Às minhas irmãs, Chelle, Lu e Tally, Gi (*in memoriam*) meu muito obrigado pelo amor, carinho e amizade. Vocês sempre acreditaram em mim, mesmo quando eu duvidava. As palavras de apoio e incentivo me motivaram a seguir em frente, até nos momentos mais desafiadores. Vocês foram o meu maior suporte emocional nessa jornada. Obrigada por

secarem minhas lágrimas!

Agradeço à Universidade Federal do Amazonas – UFAM, como também ao programa de pós-graduação em Química – PPGQ pela oportunidade. E à Universidade Estadual do Amazonas – UEA pela acolhida, disponibilizando a infraestrutura para a execução desse projeto.

Aos órgãos de fomento (FINEP, CAPES e FAPEAM) meu muito obrigado pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

Por fim, agradeço à minha querida mãe, Francisca, por sua fé em mim. Seu amor incondicional, apoio constante e palavras de incentivo foram a base que me sustentou durante todo esse tempo. Você é a responsável por minha formação como pessoa e como pesquisadora. Mãe, você é a minha maior motivação!

A todos os demais envolvidos, meu mais profundo e sincero agradecimento!

RESUMO

Annona montana Macfad pertencente à família Annonaceae, popularmente conhecida como “araticum” ou “falsa graviola”. Tem sido utilizada por populações tradicionais como fitoterápico para o tratamento de diversas enfermidades. Metabólitos secundários isolados dessa espécie apresentam propriedades farmacológicas tais como a citotóxica, antiparasitária, larvicida e anticoagulante. Este trabalho objetiva o estudo fitoquímico e biológico da *A. montana*. Para isso, foram realizadas extrações com diferentes solventes (hexano, etanol e metanol) do cerne e das cascas. O extrato metanólico do cerne foi submetido ao tratamento ácido-base convencional. Do extrato etanólico das cascas do tronco foi feita partições líquido-líquido. Ambos foram submetidos ao processo de fracionamento cromatográfico utilizando diferentes fase estacionária e gradientes de eluentes de polaridade crescente, resultando no isolamento de dois alcaloides conhecidos. A fração alcaloídica do extrato metanólico resultou no isolamento do alcaloide com esqueleto oxoaporfínico conhecido como liriodenina. Da fração acetato de etila do extrato etanólico foi isolado o alcaloide de esqueleto pirimidino- β -carbolino denominado annonmontina. Para elucidação estrutural foram utilizadas as técnicas de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H e ^{13}C uni- e bidimensional) e Espectrometria de Massas (EM). Os extratos brutos, frações e substâncias isoladas foram submetidos a avaliação de atividade antimicrobiana e inseticida frente *Aedes aegypti*. Os resultados obtidos demonstraram que as frações alcaloídica e a neutra apresentaram significativa atividade antimicrobiana contra *Klebsiella pneumoniae*, formando halos translúcidos de inibição medindo entre 20 e 30 mm, respectivamente. Na avaliação da atividade larvicida, a fração neutra apresentou CL_{50} de 3,6 $\mu\text{g/mL}$ sendo capaz de matar 100% das larvas, após 48 h. A fração alcaloídica, CL_{50} de 7,9 $\mu\text{g/mL}$, com mortalidade de 90% das larvas nesse mesmo tempo. A annonmontina, um dos compostos isolados, mostrou-se eficaz na mortalidade de insetos adultos de *A. aegypti*.

Palavras-chaves: Metabólitos secundários; cromatografia; atividade larvicida; alcaloides.

ABSTRACT

The species *Annona montana* belongs to the Annonaceae family and is popularly known as “araticum” or “false soursop”. In the regions where it is endemic, it has been used as a phytotherapeutic agent for the treatment of various diseases. The observation of the close relationship between the ethnomedicinal use and the production of chemical compounds from species of this family motivated the isolation of secondary metabolites with pharmacological properties such as cytotoxic, antiparasitic, larvicidal and anticoagulant. Therefore, this work aims to study the phytochemical and biological properties of *A. montana*. For this purpose, extractions with different solvents (hexane, ethanol and methanol) were performed from the dried and ground trunk. The methanolic extract of the heartwood was subjected to conventional acid-base treatment. The ethanolic extract of the trunk bark was partitioned into liquids. Both were subjected to the chromatographic fractionation process using different stationary phases and eluent gradients of increasing polarity, resulting in the isolation of two known alkaloids. The alkaloid fraction of the methanolic extract resulted in the isolation of the alkaloid with oxoaporphinic skeleton called liriodenine. From the ethyl acetate fraction of the ethanolic extract, the alkaloid with pyrimidine- β -carboline skeleton called annonmontine was isolated. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (^1H and ^{13}C NMR, one- and two-dimensional) and Mass Spectrometry (MS) were used for structural elucidation. The crude extracts, fractions and isolated substances were subjected to evaluation of antimicrobial and insecticidal activity against *Aedes aegypti*. The results obtained demonstrated that the alkaloid and neutral fractions presented significant antimicrobial activity against *Klebsiella pneumoniae*, forming translucent inhibition halos measuring between 20 and 30 mm, respectively. In the evaluation of larvicidal activity, the neutral fraction presented a LC_{50} of 3.6 $\mu\text{g/mL}$, being capable of killing 100% of the larvae after 48 h. The alkaloid fraction, LC_{50} of 7.9 $\mu\text{g/mL}$, with mortality of 90% of the larvae in the same time. Annonmontin, one of the isolated compounds, proved to be effective in the mortality of adult insects of *A. aegypti*.

Keywords: Secondary metabolites; chromatography; larvicidal activity; alkaloids.

LISTA DE ABREVIATURAS, CÓDIGOS, SIGLAS E FÓRMULAS

APCI	Ionização Química à Pressão Atmosférica (do inglês “ <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> ”)
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CGEN	Conselho de gestão de patrimônio genético
CDCl ₃ -D	Clorofórmio deuterado
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMAM	Extrato metanólico de <i>A. montana</i>
FAAM	Fração alcaloídica de <i>A. montana</i>
FNAM	Fração neutra de <i>A. montana</i>
HDL-C	Lipoproteína de alta densidade (do inglês “ <i>high density lipoprotein</i> ”)
HUAM	Herbário da Universidade Federal do Amazonas
Cl ₅₀	Concentração inibitória em 50%
IT	Armadilha de íons (do inglês “ <i>ion trap</i> ”)
LABCEM	Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas
LC/MS	Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massa em Tandem (do inglês “ <i>Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry</i> ”)
MMA	Ministério do Meio Ambiente
EM	Espectrometria de Massas
EM/EM	Espectrometria de Massas sequencial
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
OMS	Organização Mundial da Saúde
RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (do inglês “ <i>Nuclear magnetic resonance</i> ”)
P.A.	Para análise
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do conhecimento

	tradicional associado
THF	Tetrahidrofurano
THP	Tetrahidropirano
TMS	Tetrametilsilano
TNF- α	Necrose Tumoral Alfa (do inglês “ <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> ”)
UEA	Universidade do Estado do Amazonas
UV	Espectroscopia na região do Ultravioleta
UFAM	Universidade Federal do Amazonas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição geográfica da família Annonaceae.....	16
Figura 2 – Estruturas dos principais alcaloide isoquinolínicos encontrados em Annonaceae.....	19
Figura 3 – Estruturas de acetogeninas Annonaceae.	21
Figura 4 – Algumas substâncias bioativas isoladas do gênero <i>Annona</i>	24
Figura 5 – Ilustração da espécie <i>A. montana</i>	25
Figura 6 – Acetogeninas isoladas de <i>A. montana</i>	30
Figura 7 – Estrutura de alcaloides isolados de <i>A. montana</i> ;	36
Figura 8 – Estrutura de outras classes de metabolitos secundários isolados de <i>A. montana</i>	39
Figura 9 – Exsicata de <i>A. montana</i>	49
Figura 10 – Fluxograma da preparação dos extratos	50
Figura 11 – Fluxograma da extração ácido-base do extrato EMAM	51
Figura 12 – Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato EEAM	52
Figura 13 – Procedimento utilizado para purificação da substância A3.3.	54
Figura 14 – Procedimento utilizado para purificação da substância FB3.	56
Figura 15 – Espectro de massas IT-MS da fração alcaloídica do caule de <i>A. montana</i>	59
Figura 16 – Proposta de fragmentação para os íons m/z 266, 280 e 282 ($[M+H]^+$).....	60
Figura 17 – Proposta de fragmentação para os íons m/z 330 ($[M+H]^+$) e m/z 286 ($[M+H]^+$)	61
Figura 18 – Alcaloides anotados da fração alcaloídica de <i>A. montana</i>	61
Figura 19 – Ampliação do espectro de HSQC (F2 6,74 - 6,30 ppm) da substância A3.3	65
Figura 20 – Ampliação do espectro de 1H (500,13 MHz) (7,60 – 6,40 ppm) substância A3.3	64
Figura 21 – Ampliação do espectro de 1H (500,13 MHz) de 8,9 – 7,4 ppm da substância A3.3	62
Figura 22 – Ampliação do espectro de 1H (500,13 MHz) 8,9 – 7,4 da substância A3.3.....	63
Figura 23 – Proposta de fragmentação da substância liriodenina.....	66
Figura 24 – Ampliação do espectro de 1H (500,13 MHz) de 8,5 – 7,2 ppm da substância FB3	68
Figura 25 – Ampliação do espectro de 1H (500,13 MHz) de 11,9 – 8,2 ppm da substância FB3	69
Figura 26 – Ampliação do espectro de 1H (500,13 MHz) de 11,9 – 8,2 ppm da substância FB3	70
Figura 27 – Ampliação do espectro de ^{13}C (125,76 MHz) da substância FB3	71
Figura 28 – Mapa de correlações HMBC (1H 500,13 MHz, ^{13}C 125,76 MHz) da substância FB3	71
Figura 29 – Representação das correlações HMBC (1H 500,13 MHz, ^{13}C 125,76 MHz) da substância FB3	72
Figura 30 – Representação das correlações HMBC (1H 500,13 MHz, ^{13}C 125,76 MHz) da substância A3.3.....	74
Figura 31 – Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de <i>A. montana</i> frente a <i>Escherichia Coli</i>	75

Figura 32 – Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de <i>A. montana</i> frente a <i>Candida albicans</i>	75
Figura 33 – Rastreamento da atividade larvicida dos extratos (400 µg/mL) de <i>A. montana</i> frente a <i>Aedes aegypti</i>	78
Figura 34 – Curva dose-resposta da atividade aduicida alcaloide annomontina isolado das cascas de <i>A. montana</i> frente a <i>Aedes aegypti</i>	80
Figura 35 – Curva da atividade aduicida (tempos x mortalidade) do alcaloide annomontina isolado das cascas de <i>A. montana</i> frente a <i>Aedes aegypti</i>	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Atividades biológicas de diferentes espécies do gênero <i>Annona</i>	23
Quadro 2 – Acetogeninas isoladas de diferentes partes de <i>A. montana</i> . ¹ CAS = <i>Chemical Abstract Services</i> ; ² Dados do <i>SciFinder</i>	27
Quadro 3 – Metodologias utilizadas no isolamento e purificação de acetogeninas de <i>A. montana</i>	34
Quadro 4 – Estrutura de alcaloides isolados de <i>A. montana</i> ; ¹ CAS = <i>Chemical Abstract Services</i> ; ² Dados do <i>SciFinder</i>	35
Quadro 5 – Metodologia utilizada para isolamento e purificação de alcaloide de <i>A. montana</i>	38
Quadro 6 – Estrutura de outras classes de metabolitos secundários isolados de <i>A. montana</i>	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Reunião do fracionamento cromatográfico da FAAM	53
Tabela 2 – Reunião do fracionamento cromatográfico da A3.	53
Tabela 3 – Reunião do fracionamento cromatográfico da FAAM	54
Tabela 4 – Reunião do fracionamento cromatográfico da FAAM	55
Tabela 5 – Reunião do fracionamento cromatográfico da F3.3B.	55
Tabela 6 – Dados espectroscópicos de RMN (¹ H 500,13 MHz, ¹³ C 125,76 MHz) ^a para a substância A3.3.	67
Tabela 7 - Dados espectroscópicos de RMN (¹ H 500,13 MHz, ¹³ C 125,76 MHz) ^a para a substância FB3.	72
Tabela 8 – Atividade larvicida dos extratos de <i>A. montana</i> frente <i>A. aegypti</i>	78
Tabela 9 – Atividade aduicida do alcaloide annomontina isolado das cascas de <i>A. montana</i> contra <i>A. aegypti</i>	80

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	Objetivo geral.....	15
2.2	Objetivos específicos.....	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	Considerações da família Annonaceae	16
3.2	Principais constituintes químicos da família Annonaceae e atividade biológica	18
3.3	Gênero <i>Annona</i>	22
3.4	A espécie <i>Annona montana</i> Macfad	25
3.4.1	Aspectos gerais.....	25
3.4.2	Metabólitos de <i>A. montana</i>	26
3.4.2.1	Acetogeninas	26
3.4.2.2	Isolamento e purificação de acetogeninas de <i>A. montana</i>	33
3.4.2.3	Alcaloides	35
3.4.2.4	Isolamento e purificação de alcaloides de <i>A. montana</i>	37
3.4.2.5	Outros compostos isolados	38
3.4.3	Atividades Biológica.....	39
3.4.3.1	Atividade citotóxica	39
3.4.3.2	Atividade hipoglicêmica e hipolipidêmica	41
3.4.3.3	Atividade anti-inflamatória	42
3.4.3.4	Atividade antiplaquetária.....	42
3.4.3.5	Atividade larvícida e inseticida	43
4	METODOLOGIA	48
4.1	Suporte para cromatografia	48
4.2	Demais equipamentos.....	48
4.3	Coleta.....	49
4.4	Preparação dos extratos.....	50
4.5	Obtenção da fração alcaloídica do extrato EMAM	51
4.6	Partição líquido-líquido do extrato EEAM	52
4.7	Fracionamento da fração alcaloídica (FAAM).....	52
4.8	Fracionamento do extrato acetato de etila (F3).....	54
4.9	Testes biológicos	56
4.9.1	Avaliação da atividade antimicrobiana.....	56
4.9.2	Avaliação da atividade inseticida frente <i>A. Aegypti</i>	57
4.9.2.1	Atividade larvícida	57
4.9.2.2	Atividade adulticida	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	59
5.1	Perfil químico por espectrometria de massa	59
5.2	Elucidação estrutural do da substância denominada A3.3.	62
5.3	Elucidação estrutural da substância denominada FB3	67
5.4	Atividades biológicas.....	73
5.4.1	Atividade antimicrobiana.....	73
5.5	Atividade larvícida.....	77
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	83
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

1 INTRODUÇÃO

As plantas são importantes para a vida terrestre, especialmente quando se trata da sobrevivência humana (Schenkel *et al.*, 2003; Schaal, 2019). São elas que fornecem o oxigênio para a respiração e alimentos que nutrem o corpo. Além disso, são fontes de matéria-prima para a produção de vestuário, habitação, utensílios domésticos, meios de transporte, e mais: são a principal fonte de substâncias responsáveis por restaurar a saúde humana (Schenkel *et al.*, 2003; Giulietti *et al.*, 2005; Schaal, 2019).

O progresso das antigas civilizações é repleto de demonstrações da habilidade em utilizar os recursos naturais para a prática da medicina e em diversas áreas. Na história do Brasil, por exemplo, a chegada dos colonizadores está diretamente ligada à busca por produtos naturais (as especiarias), as quais estimularam várias disputas por posse da nova terra entre diferentes povos europeus (Schelb, 2019). Durante esse período, o costume dos povos originários chamava a atenção dos invasores, principalmente na maneira como estes buscavam o alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas, explorando com maestria as propriedades medicinais das plantas (Da Silva *et al.*, 2020; Gómez-Rojas, 2021).

A importância medicinal dos metabólitos secundários originados de plantas é inquestionável, e está intimamente relacionada com as características físicas das moléculas. Essas descobertas revolucionaram a história, pois possibilitaram o tratamento ou a cura para muitas doenças graves como o câncer, a malária, a dengue, o Alzheimer e outras (Simões *et al.*, 2003).

Contudo, microrganismos patógenos têm se adaptado, tornando-se resistentes a muitos medicamentos. Um exemplo são as doenças causadas por fungos e bactérias, que a cada ano tornam-se mais resistentes e, portanto, mais difíceis de serem tratadas. As infecções microbianas estão entre as principais causas de morte relacionadas a doenças infecciosas em todo o mundo e possuem dados cada vez mais alarmantes (WHO, 2023).

A organização mundial da saúde (OMS) estima a mortalidade de mais 5,2 milhões de pessoas, em consequência de infecções bacterianas resistentes aos medicamentos nos próximos anos. Essa situação pode ser considerada uma “pandemia silenciosa”, uma vez que relatórios dessa organização indicam mais mortes por infecções microbianas resistentes do que por AIDS, e uma quantidade semelhante ao número de mortes por doenças crônicas não transmissíveis, como as diabetes (WHO, 2023).

As arboviroses também têm sido um desafio crescente para a saúde pública mundial. O mosquito *Aedes aegypti*, por exemplo, destaca-se como o principal vetor de dengue, febre amarela, zika e chikungunya, causando surtos epidêmicos há mais de um século. Em 2022, a região das américas registrou um número recorde de 2.811.433 casos, consolidando-se como o terceiro ano com o maior número de casos em toda a história (Brasil, 2023).

Dados epidemiológicos do Ministério da Saúde brasileiro indicam que, até setembro de 2023, foram notificados cerca de 1.530.940 casos prováveis e 946 óbitos por dengue no país. No estado do Amazonas, o mesmo período registrou 5.440 casos, representando um aumento significativo em relação aos 2.805 casos notificados em 2022. Essa situação tem tornado a busca por novas substâncias capazes de combater esses organismos, uma pauta de grande relevância em todo o mundo (Brasil, 2023). Entre as famílias do reino vegetal que se destacam na produção de metabólitos com potencial para produção de novos fármacos está a família Annonaceae (Leboeuf *et al.*, 1982a).

Comunidades tradicionais costumam utilizar espécies dessa família para o tratamento de uma série de doenças (Leboeuf *et al.*, 1982a). Além disso, nos últimos anos, estudos com metabólitos secundários isolados de espécies de Annonaceae demonstraram serem candidatos em potencial para a fabricação de fármacos, por apresentarem inúmeras atividades biológicas como antimicrobiana, larvicida (Bhardwaj *et al.*, 2019), antitumoral (Pedro *et al.*, 2013), antileishmania (Costa *et al.*, 2000), antifúngica (Méndez-chávez *et al.*, 2022), analgésica, antiinflamatória (Jamkhande *et al.*, 2015), inseticida (Hidalgo *et al.*, 2020) e antimalárica (Quílez *et al.*, 2018). Embora a família inclua diversas espécies com importância medicinal, um pouco mais 10%, têm sido investigadas, mostrando a necessidade de mais estudo com a família Annonaceae (Bhardwaj *et al.*, 2019).

Considerando que o uso de plantas medicinais tem acompanhado a evolução da humanidade através dos tempos, e hoje podem ser utilizadas como base para a formulação de medicamentos que impactam positivamente no tratamento de diversas doenças, justifica-se a pesquisa a ser realizada com a *Annona montana* Macfad., pois, atende a necessidade da descoberta de novas moléculas biativas, possibilita o entendimento dos efeitos biológicos dos metabólitos desta espécie em diferentes organismos vivos e contribui com o conhecimento químico da família e do gênero.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Contribuir com o conhecimento sobre espécies da flora amazônica através do estudo fitoquímico e biológico da família Annonaceae.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Analisar o perfil químico de *A. montana*;
- ✓ Realizar o isolamento de constituintes químicos presentes na espécie;
- ✓ Elucidar as estruturas dos metabólitos isolados dos extratos;
- ✓ Avaliar o potencial antimicrobiano e inseticida dos extratos brutos, frações e substâncias isoladas da espécie.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Considerações da família Annonaceae

Annonaceae é uma das maiores e mais importantes famílias da ordem das Magnoliales. São conhecidas por suas características físicas marcantes e por apresentarem um promissor potencial farmacológico.

As espécies dessa família possuem distribuição pantropical, ou seja, ocorrem em países de todas as regiões dos trópicos no globo terrestre (Chatrou *et al.*, 2012). Em pesquisas feitas por Doyle e colaboradores (2004) há indícios de que a família Annonaceae teve sua origem na América do Sul, quando os continentes ainda estavam unidos por placas tectônicas (Pangeia) e posteriormente, teve sua dispersão pela Ásia e demais continentes. Hoje, são encontradas nas Américas, Sudeste Asiático, Ilhas do Pacífico, Austrália, Índia, África e outras regiões, como pode ser visto na parte em destacada no mapa da Figura 1. Atualmente são catalogadas 2.400 espécies, organizadas em 107 gêneros (Gou *et al.*, 2017).

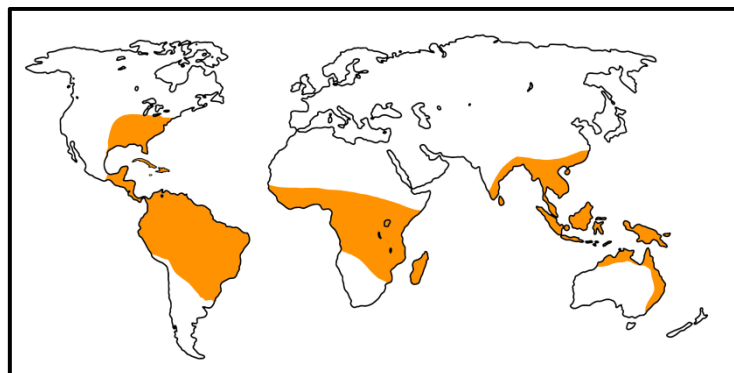


Figura 1 – Distribuição geográfica da família Annonaceae. **Fonte:** CHATROU *et al.*, 2012.

No Brasil, a família Annonaceae está presente nos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal. Estão registradas 32 gêneros e 385 espécies (Lobão *et al.*, 2020). Porém, ocorrem com maior representatividade na Amazônia e na Mata Atlântica (Di Stasi *et al.*, 2003). Dentre os gêneros descritos, os mais expressivos na flora brasileira são: *Annona*, *Xylopia* e *Guatteria* (Lopes e Mello-Silva, 2014).

Quanto às formas de vida, a família Annonaceae inclui espécies arbóreas, em menor quantidade arbustivas, lianas, trepadeiras e subarbustivas (Di Stasi *et al.*, 2003; Lobão *et al.*, 2020). São plantas de médio porte com cascas formadas por fibras longas e resistentes conhecidas popularmente como envira. Quando cortadas, as diversas partes

(caule, folhas ou ramos) liberam um odor cítrico forte facilitando a identificação. Suas folhas são alternas (folhas que ocorrem em um único nó, em pontos diferentes do ramo), e algumas dísticas (folhas que ocorrem em uma única fileira) (Mosca *et al.*, 2006).

É uma família com espécies que podem ser cultivadas, o que confere a estas uma importância significativa, pois, além de proporcionarem um maior conhecimento das espécies, ainda traz uma série de benefícios, sobretudo econômico (Mosca *et al.*, 2006).

No aspecto econômico, muitas espécies apresentam grande importância devido a produção de frutos comestíveis, que são muito apreciados pelo sabor e a facilidade de serem transformados em polpas, sucos e derivados (Di Stasi *et al.*, 2003). Dentre as espécies de anonáceas que produzem frutos comestíveis, as mais conhecidas são do gênero *Annona* (Mosca *et al.*, 2006).

Outras, são cultivadas para usos terapêuticos em diversas comunidades do mundo. A graviola (*Annona muricata*), por exemplo, na região amazônica, o suco dos frutos é utilizado como antitérmico, diurético e no combate a insônias leves e aftas. A infusão das folhas secas é usada contra insônias, dores de cabeça, emagrecedor, e contra cistite (Di Stasi *et al.*, 2003).

Algumas espécies de Annonaceae africanas têm uma ampla variedade de aplicações medicinais em comunidades locais. Entre as principais aplicações tradicionais incluem: O decocto das cascas de *A. senegalensis*, é utilizado para tratar febre, infecções respiratórias, convulsões e picadas de cobra; as sementes de *Xylopia aethiopica* são aplicadas para dores no peito, tosse e parasitas intestinais; A casca de *Duguetia staudtii* é empregada no tratamento da malária e problemas respiratórios. Diferentes partes destas plantas, como cascas, folhas, raízes, frutas e sementes, são utilizadas para tratar uma variedade de condições de saúde, como malária, diabetes, problemas intestinais, dores, infecções e inflamações (Rangel *et al.*, 2024).

Ademais, há outros usos popularmente divulgados. O uso da madeira, por exemplo, aplicado na fabricação de objetos e utensílios, as fibras são utilizadas na fabricação de cordas e os óleos na produção de cosméticos, sendo um dos mais conhecidos os derivados da espécie ylang-ylang (*Cananga odorata*) (Di Stasi *et al.*, 2003).

Outro uso importante, é o da espécie *Xylopia aromatica*, que em algumas

regiões é utilizada como condimento em substituição à Pimenta-do-reino (Di Stasi *et al.*, 2003). Há relatos do uso dessa família para obtenção de óleos comestíveis e fabricação de sabão, das sementes de algumas plantas, e na produção de álcool de madeira (Leboeuf *et al.*, 1982a).

Contudo, as anonáceas despertam o interesse científico devido à presença de uma diversidade de compostos químicos bioativos que essas plantas produzem.

3.2 Principais constituintes químicos da família Annonaceae e atividade biológica

Os estudos fitoquímicos com espécies da família Annonaceae reportam o isolamento de alcaloides, acetogeninas, terpenoides, compostos fenólicos (flavonoides, lignoides, catequina, taninos), saponinas, além de metabólitos presentes nos óleos essenciais. Entre essas, as principais classes de compostos bioativos produzidos são os alcaloides, terpenos e flavonoides. Esses metabólitos são associados a significativas atividades biológicas, tais como: citotóxica, pesticida, vermicida, antioxidante, antimicrobiana, antirreumática, antiviral, imunossupressora, antiemético, inibidora do apetite, neuroprotetora e antimalárica (Santos *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2011; Menezes *et al.*, 2021; Rangel *et al.*, 2024).

Segundo Leboeuf e colaboradores (1982a), alcaloides são a principal classe de metabólitos utilizados na caracterização da família Annonaceae. No entanto, também são definidos como substâncias naturais nitrogenadas, farmacologicamente ativas, comumente encontrados em Angiospermas (Simões *et al.*, 2003). Ao longo da história, esses compostos demonstram ampla utilidade em muitas civilizações. Devido suas estruturas complexas e atividades biológicas significativas, foram empregados como medicamentos, venenos e até porções mágicas em rituais religiosos e cerimônias tradicionais. São considerados os compostos orgânicos naturais mais antigos e estudados, conforme destaca Yang e colaboradores (2024).

Um estudo feito por Lúcio e colaboradores (2015), identificou 934 alcaloides presentes em 254 espécies de anonáceas, destes aproximadamente 800 alcaloides são oriundos do esqueleto isoquinolino. Os principais esqueletos alcaloídicos reportados são: isoquinolino simples (**1**), bisbenzisoquinolino (**2**), benziltetrahydroisoquinolino (**3**), bisbenziltetrahydroisoquinolino (**4**), protoberberino (**5**), tetrahydroprotoberberino (**6**);

aporfino (**7**), oxoaporfino (**8**), proaporfino (**9**) e fenantreno (**10**); (Leboeuf *et al.*, 1982b; Costa, 2009; Menezes *et al.*, 2021). A Figura 2 mostra os esqueletos de alguns dos alcaloides mais frequentes nesta família.

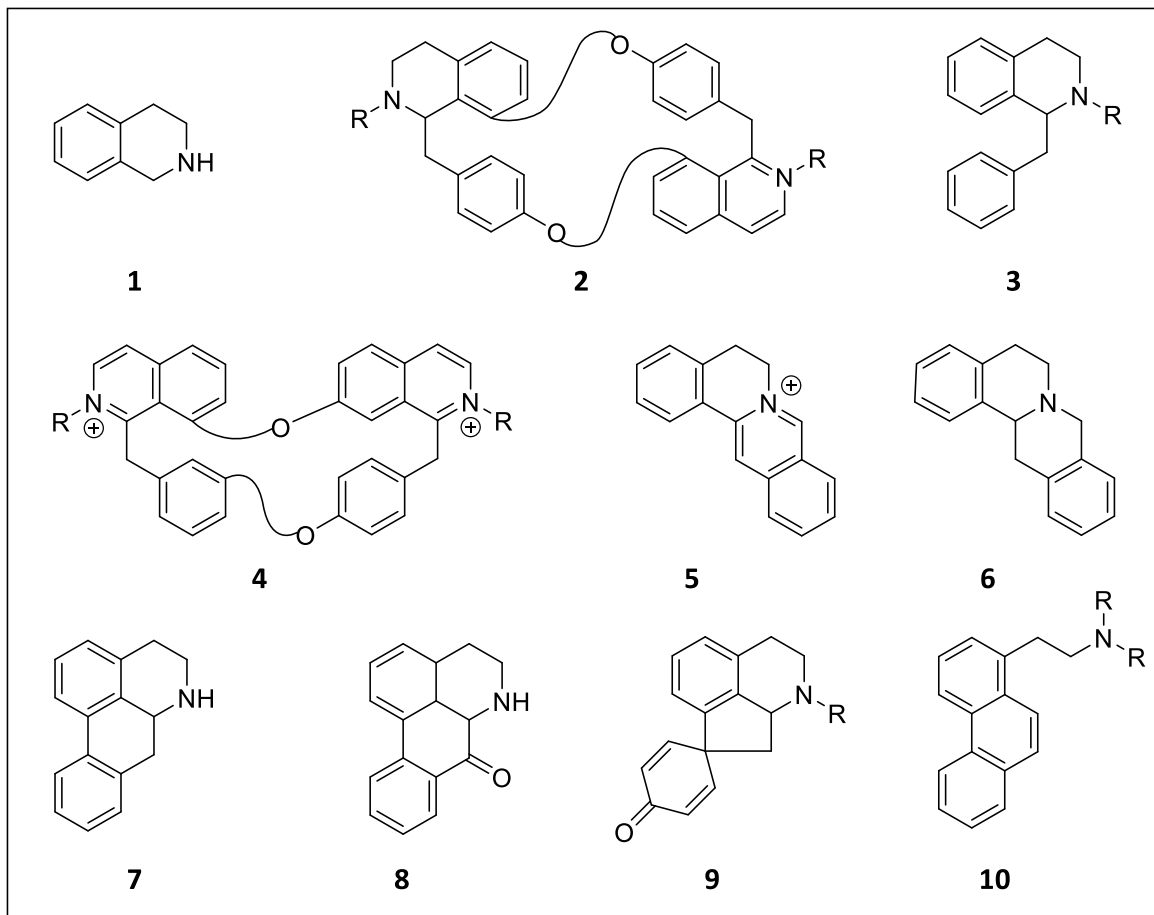


Figura 2 – Estruturas dos principais alcaloide isoquinolínicos encontrados na Annonaceae. **Fonte:** Adaptado de Costa (2009).

A segunda classe de metabólitos mais abundante em Annonaceae são os terpenos, sendo mais frequentes os monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos (Menezes *et al.*, 2021).

Outra classe que tem chamado atenção nessa família são as acetogeninas, principalmente por serem quase exclusivamente encontrados em Annonaceae. Esta é uma classe de metabólitos secundários oriundos da via do acetato, que tem ganhado destaque como metabólito anticancerígeno (Neske *et al.*, 2020).

Estruturalmente, esses compostos são caracterizados pela presença de uma cadeia alquílica longa, formada por uma combinação de ácidos graxos com uma unidade 2-

propanol. Apresentam grande variedade estrutural, com a combinações de anéis e de substituintes oxigenados (Bermejo *et al.*, 2005; Neske *et al.*, 2020).

Desde a primeira acetogenina isolada, uvaricina, uma substância com propriedades antitumoral extraída da *Uvaria acuminata* (Wang *et al.*, 2001; Rakotomanga *et al.*, 2004), mais de 600 outras foram descritas em Annonaceae (Neske *et al.*, 2020). Elas estão presentes em casca, cerne, raízes, folhas, mas especialmente, em sementes de espécies dessa família (Di stasi *et al.*, 2003; Neske *et al.*, 2020).

As acetogeninas apresentam propriedades tão diversas quanto suas estruturas químicas, incluindo atividades antitumoral, citotóxica, antimalárica, antimicrobiana, e, em alguns casos, antioxidante (Lima *et al.*, 2012; Yiallouris *et al.*, 2022; Ma *et al.*, 2022). Estudos sobre o mecanismo de ação de acetogeninas têm focado em sua citotoxicidade contra células cancerígenas humanas, demonstrando que esses policetídeos são inibidores do complexo I (NADH: ubiquinona oxidorreductase) na cadeia respiratória das células tumorais, processo que se relaciona com a morte celular através do bloqueio da produção de ATP (adenosina trifosfato) pelas células (Neske *et al.*, 2020).

Com o intuito de aprimorar a organização e clareza, a nova classificação propõe a categorização das acetogeninas de Annonaceae baseada na estrutura dos anéis centrais e terminais sendo: Mono- Tetrahydrofurano - Acetogeninas contendo apenas um anel de THF (**T-A e T-B**); Bis-THF adjacente são acetogeninas com dois anéis de THF em configuração adjacente (**T-C e T-E**). Bis-THF não adjacente são acetogeninas com dois anéis de THF em configuração não adjacente (**T-D e T-H**); Anel não-THF são acetogeninas sem anel de THF; **Tri-THF** - Acetogeninas com três anéis de THF (**T-F**); Acetogeninas não clássicas são acetogeninas que não se encaixam nas categorias anteriores, incluindo compostos com THP (tetrahidropirano), THF hidroxilados no anel e epóxi (**T-G₁, T-G₂, T-G₃, E-A, E-B e E-C**) (Bermejo *et al.*, 2005; Neske *et al.*, 2020).

A lactona terminal é classificada atendendo aos grupos substituintes e insaturações da cadeia: **L-B**: α -acetonil saturado γ -lactona; **L-B₂**: α -acetonil- α , β -insaturada- γ -lactona; **L-C**: γ -lactona saturada; **L-D**: γ -lactona- α , β -insaturada com 34- ou 36-OH; **L-E**: γ -hidroxi metil- γ -lactona saturada; **L-F**: β -metoxi- γ -metileno- α , β -insaturada- γ -butirolactona (Bermejo *et al.*, 2005). Na Figura 3, é possível visualizar a variedade estrutural

descritas para as acetogeninas, o que confere a elas as propriedades biológicas marcantes.

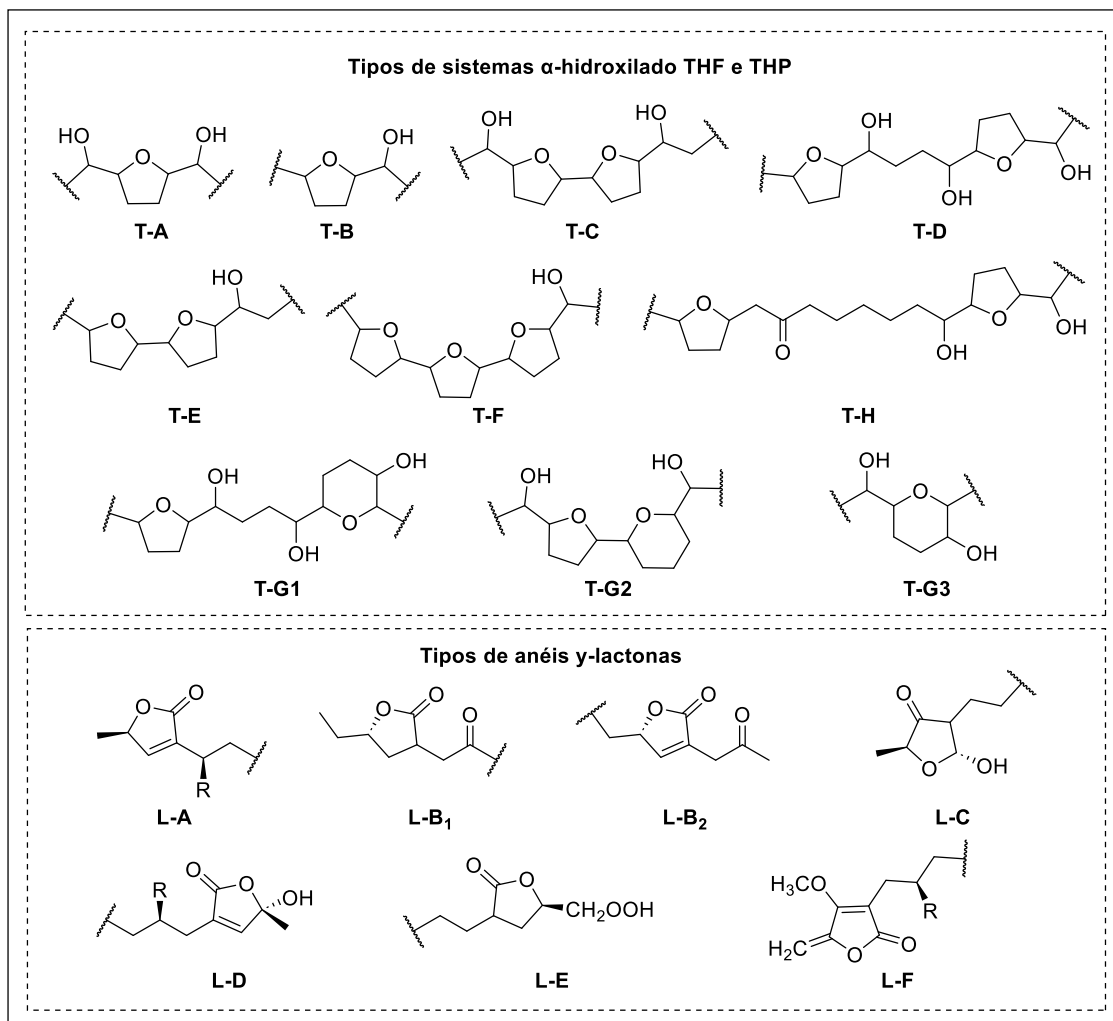


Figura 3 – Estruturas de acetogeninas Annonaceae. **Fonte:** Adaptado de Bermejo *et al.*, (2005).

A classificação relativa das acetogeninas é crucial para entender suas propriedades biológicas e mecanismos de ação, além de facilitar a identificação e estudo desses compostos naturais (Bermejo *et al.*, 2005).

Além de alcaloides, terpenos e acetogeninas, as anonáceas apresentam diversos outros metabólitos indispensáveis à adaptação e à sobrevivência desses vegetais. A grande maioria desses metabólitos possui propriedades bioativas benéficas aos seres humanos, como já mencionado anteriormente.

Dentre estes 107 gêneros da família Annonaceae, destaca-se o gênero *Annona*, nativo da América Central e das Índias Ocidentais, que inclui algumas espécies de grande importância socioeconômica na região amazônica.

3.3 Gênero *Annona*

Segundo Leboeuf e colaboradores (1982b), *Annona* é um dos gêneros mais expressivo da família Annonaceae, pois, apresentam muitas espécies, inclusive com valor econômico. São aproximadamente 107 espécies geograficamente distribuídas em torno dos trópicos. No Brasil, o gênero *Annona* é encontrado nos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal (Mendes-silva *et al.*, 2023).

Na Amazônia, espécies desse gênero são chamadas de “cargueira” em virtude de suas cascas fibrosas poderem ser utilizadas como suporte de carga. Outras espécies, podem ser utilizadas em projetos paisagísticos, por serem plantas vigorosas e elegantes, e ainda a madeira pode ser utilizada para diversos fins, como a produção de papel, a elaboração de brinquedos ou de ferramentas. Ademais, por apresentar madeira leve e flexível podem ser utilizadas na produção de ripas, miolos de porta, caixotes e painéis. Boias e rolhas também são fabricadas das cascas e raízes (Lorenzoni *et al.*, 2016).

Economicamente, o gênero *Annona* tem destaque devido o fornecimento de frutos comestíveis (Lorenzoni *et al.*, 2016). Estes podem ser consumidos *in natura*, mas frequentemente são utilizados na produção de sucos, doces e sorvetes (Diniz *et al.*, 2013). A gravioleira (*A. muricata*) é a espécie com maior potencial industrial, apresentando plantio em escala comercial (Dutra *et al.*, 2012b). Além desta, entre as espécies mais divulgadas, consumidas e cultivadas no Brasil estão a fruta do conde (*A. squamosa*), araticum (*A. crassiflora*), cherimoia (*A. cherimola*), atemoia (*A. cherimola* x *A. squamosa*) e o biribá (*A. mucosa*) (Dutra *et al.*, 2012a; Rebêlo, 2014).

Fora o destaque pela produção de frutos, as *Annonas* são popularmente conhecidas por suas propriedades terapêuticas. Todas as partes das árvores deste gênero, são vastamente utilizadas como medicamentos tradicionais contra uma série de doenças humanas, incluindo câncer, diarreia, febre, malária, reumatismo, erupções cutâneas e vermes, cistite, diabetes, dores de cabeça, insônia, picadas de cobra, disfunção erétil e infecções (Chen *et al.*, 2001; Fall *et al.*, 2003; Moghadamtousi *et al.*, 2015).

Entre as bioatividades de metabólitos que se destacam estão a do ácido ascórbico, flavonoides e polifenólicos isolados de *A. pickelii* e *A. salzmanii*, que apresentaram atividade antioxidantes, em testes feitos com radical DPPH (radical α , α -

diphenyl- β -picrilhidrazil). E, dos componentes de óleos essenciais obtidos das folhas de duas espécies *A. vepretorum* e *A. salzmännii*, que exibiram atividades antimicrobianas e larvicidas (Bhardwaj *et al.*, 2019). Ademais, os extratos das folhas de *A. squamosa* e *A. senegalensis* mostraram alta atividade antiplasmódica, assim como, o extrato da raiz de *A. senegalensis* que apresentou atividade antimalárica contra *Plasmodium falciparum* (Fall *et al.*, 2003).

Anaya-esparza e colaboradores (2020), fizeram uma revisão completa de bioatividade do gênero *Annona*, destacando diversas propriedades farmacológicas. Complementarmente, o Quadro 1 lista atividades biológicas reportadas de diferentes espécies desse gênero.

Quadro 1 – Atividades biológicas de diferentes espécies do gênero *Annona*.

Espécie estudada	Atividade biológica	Referências
<i>A. foetida</i>	Tripanocida	Costa <i>et al.</i> , 2011
<i>A. mucosa</i>	Antileishmania	Vila-nova <i>et al.</i> , 2011; Brígido <i>et al.</i> , 2020;
<i>A. crassiflora</i>	Antifúngica	Borges <i>et al.</i> , 2021; Méndez-chávez <i>et al.</i> , 2022;
<i>A. purpurea</i>	Antiprotozoário	Díaz-Godínez <i>et al.</i> , 2020;
<i>A. reticulata</i>	Antidiabética	Jamkhande e Wattamwar, 2015;
<i>A. squamosa</i> , <i>A. senegalensis</i>	Analgésico e antiinflamatório	Jamkhande e wattamwar, 2015;
<i>A. reticulata</i> <i>A. squamosa</i>	Contraceptiva	Pathak e Zaman, 2023;
<i>A. montana</i>	Inseticida	Hidalgo <i>et al.</i> , 2020
<i>A. atemoya</i>	Antialzheimer	Lim <i>et al.</i> , 2019
<i>A. salzamannii</i>	Citotóxica	Ribeiro <i>et al.</i> , 2021
<i>A. muricata</i>	Antimicrobiana	Cagnini <i>et al.</i> , 2021
<i>A. senegalensis</i>	Antioxidantes	Tamfu <i>et al.</i> , 2020

Estudos feitos por Costa e colaboradores (2006) com *A. foetida*, resultou no isolamento dos alcaloides, liriodenina (**11**), annomontina (**12**) e outros derivados, ambos com atividade antileishmania. Enquanto Liaw e colaboradores (2008) isolaram de sementes

de *A. squamosa* as acetogeninas citotóxica *cis*-annontemoina (**13**) e esquiadiolina A (**14**); Vega e colaboradores (2007), isolaram o kaempferol (**15**) e 6"-*O*-*p*-hidroxicinamoil- β -galactopiranosil-kaempferol (**16**) e outros dois flavonoides glicosilados, com atividade carcinogênica, das folhas de *A. dioica*.

Ademais, em outros estudos com espécies de *Annona* foram isolados, os diterpenos 4 α -hidroxi-17,19-*dinor-ent*-cauran-16-ona (**17**), ácido 4- β -hidroxi-16- β -H-18-*nor-ent*-cauran-17-oico (**18**) (Chen *et al.*, 2020); o ciclopeptídeo ciclosenegalin A (**19**) (Wélé *et al.*, 2002); e uma lignana furânica (**20**) (Dutra *et al.*, 2012). A Figura 4 mostra a estrutura química de cada um desses compostos, que representam a variedade estrutural dos metabólitos de *Annona*.

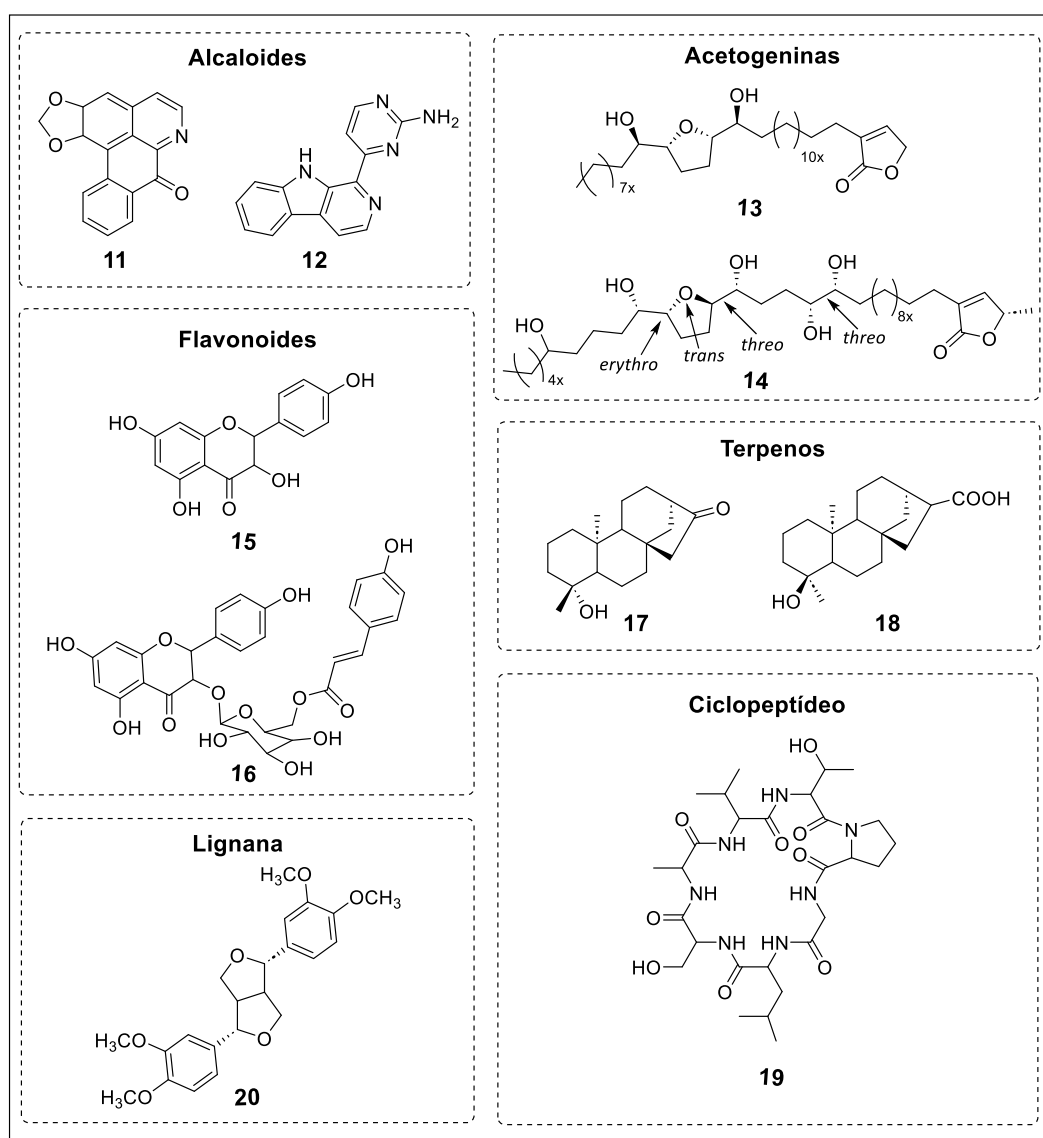


Figura 4 – Algumas substâncias bioativas isoladas do gênero *Annona*.

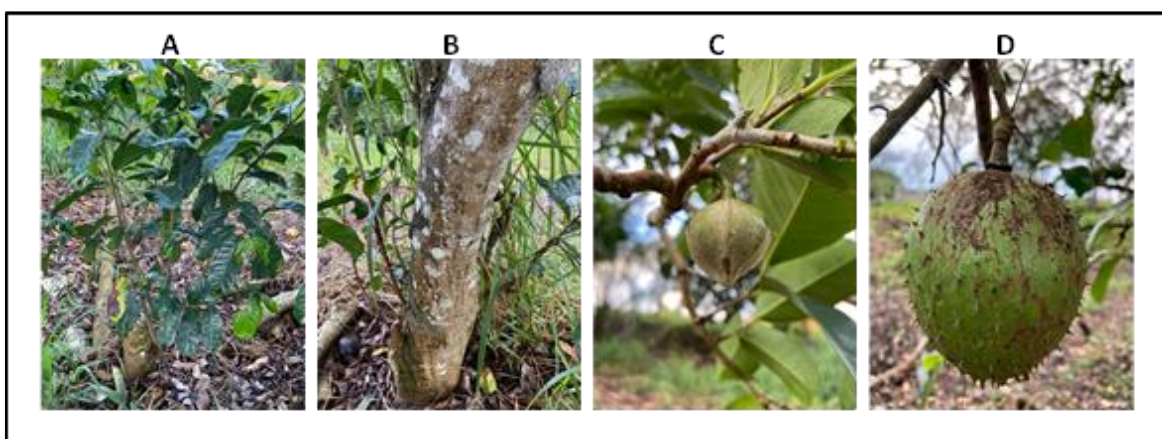
3.4 A espécie *Annona montana* Macfad

3.4.1 Aspectos gerais

Esta espécie é uma árvore nativa das Índias Ocidentais, florestas tropicais da América do Sul e Ásia Meridional. No Brasil, encontra-se distribuída principalmente pela Amazônia, Mata Atlântica e Pantanal, podendo ser cultivada em todo o país (Bailon-Moscoso *et al.*, 2016; Quílez *et al.*, 2018).

Recebe diversos nomes populares tais como falsa graviola, guanabana, araticum, araticum-cagão, graviola das montanhas, e jaca-podre. O epíteto específico “*montana*” pode ser traduzido como “vindo das montanhas” (Cavalcante, 1991; Liaw *et al.*, 2005; Barbalho *et al.*, 2012; Mendes-silva *et al.*, 2023).

É uma árvore com tronco quase sempre curto, e de cor castanho-claro, formando uma copa arredondada, ramificando-se desde a base. A raiz é pivotante, as folhas são perenes, as flores surgem dos galhos e troncos, e são grandes, triangulares e espessas (Cavalcante, 1991; Mendes-silva *et al.*, 2023). Os frutos são arredondados, com casca esverdeada, ácida e levemente amargos (Leboeuf *et al.*, 1982c). A polpa amarelada com várias sementes de coloração marrom (Barbalho *et al.*, 2012; Maas *et al.*, 2017). A Figura 5 ilustra as partes físicas dessa espécie.



Legenda: A- folhas; B-caule; C-flor; D-fruto.

Figura 5 – Ilustração da espécie *A. montana*. **Fonte:** arquivos pessoais.

As populações tradicionais costumam utilizá-la para o tratamento de picada de cobra, insônia, gripe, para acalmar os nervos, e comorbidades (diabetes, obesidade e diferentes tipos de câncer) (Leboeuf *et al.*, 1982c; Wang *et al.*, 2002; Quílez *et al.*, 2018).

Tal conhecimento, motivou as investigações fitoquímicas com *A. montana* resultando em importantes descobertas.

3.4.2 Metabólitos de *A. montana*

A espécie *A. montana*, conhecida por suas propriedades medicinais, se destaca por conter uma grande variedade substâncias químicas com diversas propriedades farmacológicas. A distribuição desses compostos varia entre as diferentes partes da planta, conferindo-lhe características importantes. Substâncias das classes das acetogeninas, alcaloides, quinonas e esteroides fazem parte da composição das folhas (Wu *et al.*, 1993); as sementes, por sua vez, contém acetogeninas, alcaloides e ciclopeptídeos (Liaw *et al.*, 2005; Chuang *et al.*, 2008); alcaloides também são encontrados nas raízes, e os frutos contêm uma série de compostos voláteis (Pino *et al.*, 2002).

3.4.2.1 Acetogeninas

As acetogeninas se destacam como os compostos majoritários em *A. montana*. Originadas na via do acetato a partir de ácidos graxos de cadeia longa insaturados, essas moléculas assumem um papel de destaque no combate ao câncer, como evidenciado por pesquisas recentes (Neske *et al.*, 2020).

Estruturalmente, as acetogeninas são caracterizadas pela presença de uma cadeia alquílica longa contendo entre 35 e 38 carbonos, formada a partir de uma combinação de ácidos graxos com uma unidade 2-propanol no carbono 2, que origina uma γ -lactona α , β -insaturada substituída por metil (Bermejo *et al.*, 2005; Neske *et al.*, 2020).

Com ampla variedade estrutural, em combinações de anéis tetrahydrofurando (THF) ou tetrahidropirano (THP) e epóxi (Neske *et al.*, 2020). A organização em grupos considera principalmente os tipos de sistema THF, os tipos de cadeia γ -lactona e a configuração relativa (Neske *et al.*, 2020). O Quadro 2 mostra as características estruturais das acetogeninas isoladas de *A. montana* e a Figura 6 (pág 30) apresenta suas estruturas.

Quadro 2 – Acetogeninas isoladas de diferentes partes de *A. montana*. ¹CAS = *Chemical Abstract Services*; ²Dados do *SciFinder*.

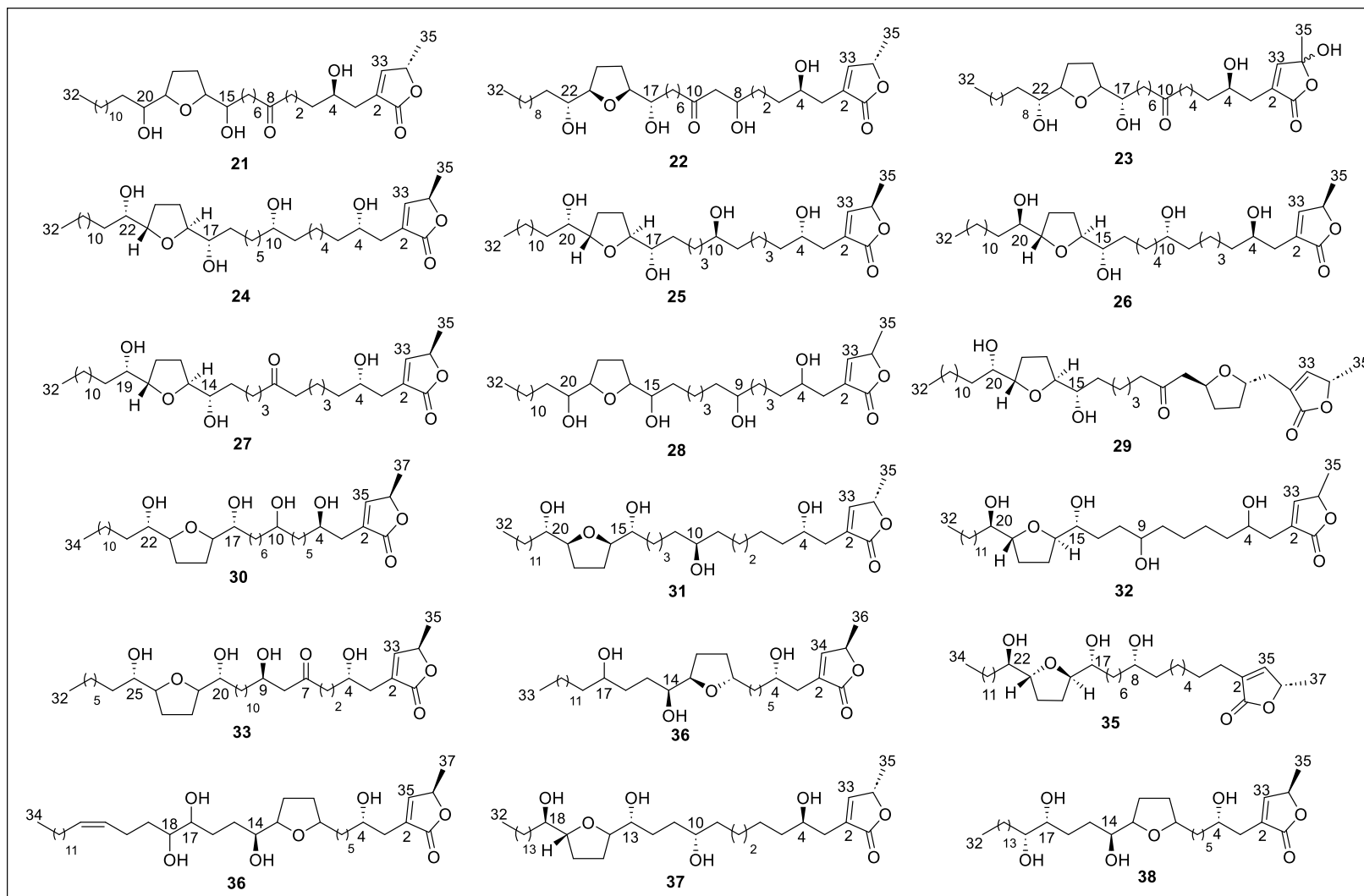
¹ CAS	Nome	Posição OH	Tipo de THF / Tipo de γ - lactona	Fórmula Molecular	Partes da Planta	² Estudos biológicos	Referências
287717-55-9	Anmontanina A (21)	4, 15, 21	T-A/L-A	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	Folhas	1	Mootoo <i>et al.</i> , 2000
287717-56-0	Anmontanina B (22)	4, 8, 17, 22	T-A/L-A	C ₃₅ H ₆₂ O ₈	Folhas	1	Mootoo <i>et al.</i> , 2000
287717-58-2	Anmontanina C (23)	4, 17, 22	T-A/L-D	C ₃₅ H ₆₂ O ₈	Folhas	1	Mootoo <i>et al.</i> , 2000
137550-92-6	Annontacina (24)	4, 10, 17,22	T-A/L-A	C ₃₇ H ₆₈ O ₇	Sementes	1	Jossang <i>et al.</i> , 1991; Liaw <i>et al.</i> , 2004
111035-65-5	(+)-annonancina (25)	4, 10, 15, 20	T-A/L-A	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes, folhas e galhos	155	Mootoo <i>et al.</i> , 2000; Wang <i>et al.</i> , 2002; Liaw <i>et al.</i> , 2004; 2005; Colom <i>et al.</i> , 2009;
130853-76-8	(-)-annonancina (26)	4, 10, 15, 20	T-A/L-A	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	2	Colom <i>et al.</i> , 2009;
123266-21-7	annonacinona (27)	4, 14, 19	T-A/L-A	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	Sementes, folhas e galhos	1	Jossang <i>et al.</i> , 1991; Liaw <i>et al.</i> , 2004; Colom <i>et al.</i> , 2009;
142488-56-0	annoreticuina (28)	4, 9, 15, 20	T-A/L-A	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	1	Liaw <i>et al.</i> , 2004;
2041585-23-1	Aromina A (29)	15, 20	T-D/L-A	C ₃₅ H ₆₀ O ₇	Folhas e galhos	1	Colom <i>et al.</i> , 2009;
422508-84-7	<i>cis</i> -annontacina (30)	4, 10, 17, 22	T-A/L-A	C ₃₇ H ₆₈ O ₇	Sementes	1	Jossang <i>et al.</i> , 1991; Liaw <i>et al.</i> , 2004 b;
172586-13-9	<i>cis</i> -annonancina (31)	4, 10, 15, 20	T-A/L-A	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes, folhas e galhos	1	Liaw <i>et al.</i> , 2004; Liaw <i>et al.</i> , 2005;
848129-63-5	<i>cis</i> -annonreticuina (32)	4, 9, 15, 20	T-A/L-A	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	1	Liaw <i>et al.</i> , 2004;
ND	<i>cis</i> -montacina (33)	4, 9, 20, 25	T-A/L-A	C ₃₅ H ₆₂ O ₈	Sementes	ND	Liaw <i>et al.</i> , 2004;
ND	densicomacina (34)	4, 14, 17	TB/LA	C ₃₆ H ₆₆ O ₆	Folhas e galhos	ND	Colom <i>et al.</i> , 2009;

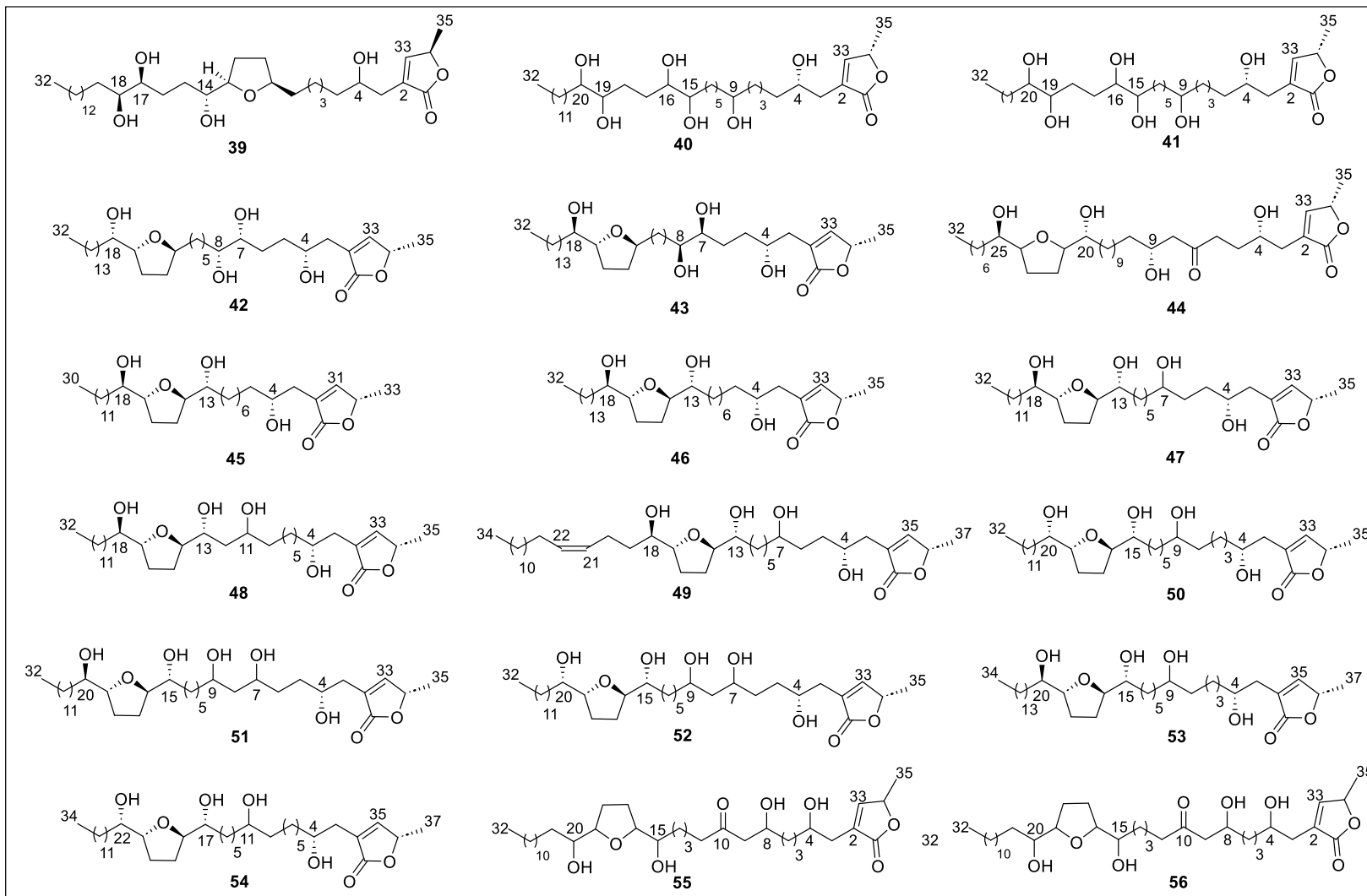
237762-43-5	4-deoxyannomontacina (35)	10, 17, 22	T-A/L-A	C ₃₇ H ₆₈ O ₆	Sementes	1	Liaw <i>et al.</i> , 2005;
145403-31-2	Gigantetronenina (36)	4,14, 17,18	T-B/L-A	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	Sementes, folhas e galhos	1	Liaw <i>et al.</i> , 2004; Colom <i>et al.</i> , 2009;
113817-64-4	Goniothalamicina (37)	4,10, 13, 18	T-A/L-A	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes, folhas e galhos	1	Liaw <i>et al.</i> , 2004;
160399-32-6	Gigantetrocina A (38)	4, 14, 17,18	T-B/L-A	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Folhas	1	Wang <i>et al.</i> , 2001;
153220-49-6	Gigantetrocin B (39)	4, 14, 17, 18	T-B/L-A	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Folhas	1	Wang <i>et al.</i> , 2001;
862892-76-0	(+)-Monhexocina (40)	4, 9, 15, 16	Linear	C ₃₅ H ₆₆ O ₈	Sementes	1	Liaw <i>et al.</i> , 2005;
863037-55-2	(-)-Monhexocina (41)	4, 9, 15, 16	Linear	C ₃₅ H ₆₆ O ₈	Sementes	1	Liaw <i>et al.</i> , 2005;
862815-03-0	Monlicina A (42)	4, 9, 8, 18	T-B/L-A	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	1	Liaw <i>et al.</i> , 2005;
862815-04-1	Monlicina B (43)	4, 9, 8, 18	T-B/L-A	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	1	Liaw <i>et al.</i> , 2005;
800392-74-9	Montacina (44)	4, 9, 20, 25	T-A/L-A	C ₃₅ H ₆₂ O ₈	Sementes	1	Liaw <i>et al.</i> , 2005;
848129-58-8	Montalicina A (45)	4, 13, 18	T-A/L-A	C ₃₃ H ₆₀ O ₆	Folhas	1	Liaw <i>et al.</i> , 2005;
848129-59-9	Montalicina B (46)	4, 13, 18	T-A/L-A	C ₃₅ H ₆₄ O ₆	Sementes	1	Liaw <i>et al.</i> , 2004;
848129-60-2	Montalicina C (47)	4, 7, 13, 18	T-A/L-A	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	1	Liaw <i>et al.</i> , 2004;
848129-61-3	Montalicina D (48)	4, 11, 13,18	T-A/L-A	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	1	Liaw <i>et al.</i> , 2004
848129-62-4	Montalicina E (49)	4, 7, 13, 18	T-A/L-A	C ₃₇ H ₆₆ O ₇	Sementes	1	Liaw <i>et al.</i> , 2004;
848129-64-6	Montalicina F (50)	4, 9, 15, 20	T-A/L-A	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	1	Liaw <i>et al.</i> , 2004;
862892-74-8	Montalicina G (51)	4,7, 9, 15,20	T-A/L-A	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	Sementes	1	Liaw <i>et al.</i> , 2005
862892-75-9	Montalicina H (52)	4,7, 9, 15,20	T-A/L-A	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	Sementes	1	Liaw <i>et al.</i> , 2005
848129-65-7	Montalicina I (53)	4, 9, 15, 20	T-A/L-A	C ₃₇ H ₆₈ O ₇	Sementes	1	Liaw <i>et al.</i> , 2004
848129-66-8	Montalicina J (54)	4, 11, 17, 22	T-A/L-A	C ₃₇ H ₆₈ O ₇	Sementes	1	Liaw <i>et al.</i> , 2004

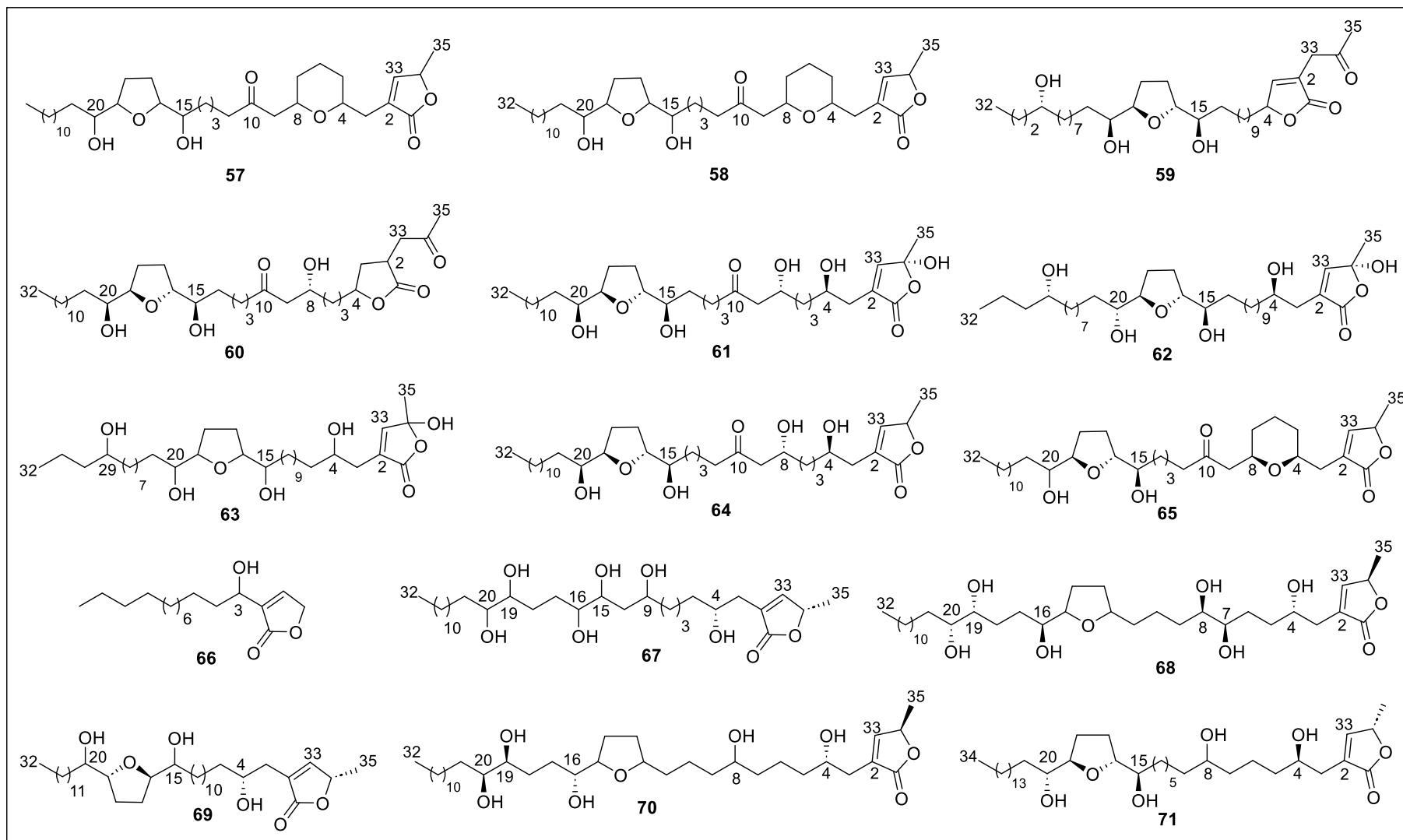
273199-66-9	Montanacina B (55)	4, 8, 15, 20	T-A/L-A	C ₃₅ H ₆₂ O ₈	Folhas	1	Wang <i>et al.</i> , 1999; 2000;
273199-67-0	Montanacina C (56)	4,8, 15, 20	T-A/L-A	C ₃₅ H ₆₂ O ₈	Folhas	1	Wang <i>et al.</i> , 1999; 2000;
273199-68-1	Montanacina D (57)	15, 20	T-A/L-G1	C ₃₅ H ₆₀ O ₇	Folhas	1	Wang <i>et al.</i> , 1999; 2000;
128741-23-1	Montanacina E (58)	15, 20	T-A/L-G1	C ₃₇ H ₆₈ O ₈	Folhas	4	Wang <i>et al.</i> , 1999; 2000;
ND	Montanacina F (59)	15, 20 e 29	T-A/L-B1	C ₃₅ H ₆₂ O ₇	Folhas	0	Wang <i>et al.</i> , 1999; 2000;
403656-91-7	Montanacina G (60)	10, 17, 22	T-A/L-B1	C ₃₅ H ₆₂ O ₈	Folhas	1	Wang <i>et al.</i> , 2001;
403656-92-8	Montanacina H (62)	4, 8, 15, 20	T-A/L-D	C ₃₅ H ₆₂ O ₉	Folhas	2	Wang <i>et al.</i> , 2001;
403656-93-9	Montanacina I (62)	4, 15, 20, 29	T-A/L-D	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	Folhas	1	Wang <i>et al.</i> , 2001;
403656-94-0	Montanacina J (63)	4, 15, 20, 29	T-A/L-D	C ₃₅ H ₆₄ O ₈	Folhas	1	Wang <i>et al.</i> , 2001;
ND	Montanacina L (64)	4, 8, 15, 20	T-A/L-A	C ₃₅ H ₆₂ O ₈	Folhas	ND	Hidalgo <i>et al.</i> , 2020;
ND	Montanacina K (65)	15, 20	T-A/L-A	C ₃₅ H ₆₂ O ₈	Folhas	ND	Hidalgo <i>et al.</i> , 2020;
134698-86-5	Muricatacina (66)	4	linear	C ₁₇ H ₃₂ O ₃	Sementes	18	Colom <i>et al.</i> , 2009;
167255-47-2	Murihexocina A (67)	4, 7, 8, 16, 19, 20	T-B/L-A	C ₃₅ H ₆₄ O ₉	Folhas e galhos	7	Colom <i>et al.</i> , 2009;
166990-05-2	Murihexocina B (68)	4, 7, 8, 16, 19, 20	T-B/L-A	C ₃₅ H ₆₄ O ₉	Folhas e galhos	6	Colom <i>et al.</i> , 2009;
129683-96-1	Murisolina (69)	4, 15, 20	T-A/L-A	C ₃₅ H ₆₄ O ₆	Sementes	28	Liaw <i>et al.</i> , 2005; Mootoo <i>et al.</i> , 2000;
ND	Tucupentol (70)	4, 8, 16, 19, 20	T-B/L-A	C ₃₅ H ₆₅ O ₈	Folhas e galhos	ND	Colom <i>et al.</i> , 2009;
155969-84-9	Xilopianina (71)	4, 8, 15, 20	T-A/L-A	C ₃₅ H ₆₄ O ₇	Sementes	3	Liaw <i>et al.</i> , 2004.

Legenda: ND= não descrito.

Figura 6 – Estrutura química de acetogeninas isoladas de *A. montana*







3.4.2.2 Isolamento e purificação de acetogeninas de *A. montana*

O isolamento e a caracterização dessas moléculas, etapa primordial na investigação de suas propriedades e conhecimento sobre os mecanismos de ação, envolvem uma diversidade de métodos cromatográficos.

A extração do material vegetal seco e pulverizado pode ser realizada por técnicas tradicionais como maceração, Soxhlet ou com ultrassom, utilizando como solventes polares metanol, etanol ou diclorometano. Complementarmente, o extrato bruto é particionado em solventes imiscíveis com polaridade crescente (Jossang *et al.*, 1991; Mototoo *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; Liaw *et al.*, 2004; Colom *et al.*, 2009; Hidalgo *et al.*, 2020).

O fracionamento dos extratos brutos costuma ser feito em coluna cromatográfica utilizando como adsorvente sílica gel ou/e Sephadex® L-20, seguida do uso combinado de técnicas cromatográficas para purificação, incluindo cromatografia flash, cromatografia em camada delgada preparativa e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Jossang *et al.*, 1991; Mototoo *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; Liaw *et al.*, 2004; Colom *et al.*, 2009; Hidalgo *et al.*, 2020).

Os sistemas de eluição, parte crucial para a obtenção das acetogeninas puras, combinam diferentes gradientes de solventes orgânicos, nos quais os mais utilizados são diclorometano e metanol por serem eficazes na eluição desses compostos (Colom *et al.*, 2009; Hidalgo *et al.*, 2020).

Para o monitoramento do processo de isolamento, o reagente de Kedde's (Hidalgo *et al.*, 2020) tem mostrado eficiência, mesmo não sendo específico para essa classe de compostos. A mistura de ácido 3,5-dinitrobenzóico e hidróxido de potássio em etanol reage facilmente com a γ -lactona- α,β -insaturada comum na estrutura das acetogeninas, indicada pela coloração rosa nas bandas de cromatografia em camada delgada analítica (Hidalgo *et al.*, 2020; Liaw *et al.*, 2004). O Quadro 2, detalha as metodologias mais utilizadas no processo de isolamento e purificação das acetogeninas de *A. montana* (Figura 6).

Quadro 3 – Metodologias utilizadas no isolamento e purificação de acetogeninas de *A. montana*.

Método utilizado	Sistema de eluição	Acetogeninas isoladas	Reveladores	Parte da planta	Referência
CC	CH ₂ Cl ₂ – MeOH (95:5; 90:10) CH ₂ Cl ₂ – MeOH-THF (85:10:5)	25, 24, 27 e 30	Reagente de Kedde e vanilina sulfúrica	Sementes	Jossang <i>et al.</i> , 1991.
Partição líquido-líquido CC CCD preparativa	CHCl ₃ – MeOH (gradiente) CH ₂ Cl ₂ – MeOH (gradiente) CH ₂ Cl ₂ – MeOH (24:1) × 2	21, 22, 23, 25 e 69	Luz UV, anisaldeído ou spray de água.	Folhas e sementes	Mototoo <i>et al.</i> , 2000.
CC Sephadex® LH-20 HPLC RP-18	CH ₂ Cl ₂ – MeOH (gradiente) MeOH (85% e 95%)	25, 31, 38, 39,55,56,57,58, 60, 61, 62 e 63	ND	Folhas	Wang <i>et al.</i> , 1999, 2000 e 2001.
CC Sephadex® LH-20 HPLC RP-18	CH ₂ Cl ₂ –MeOH (49:1; 19:1; 9:1) CH ₂ Cl ₂ – MeOH (gradiente) MeOH (85% e 95%)	25 e 59	ND	Folhas	Wang <i>et al.</i> , 2002.
CC HPLC (analítica e preparativa)	<i>n</i> -hexane-CHCl ₃ (2:1, 1:1, 1:2, 1:5, CHCl ₃) e CHCl ₃ -MeOH (100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1)	24, 25, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 40, 41,42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 69 e 71	Reagente de Dragendorff, Kedde ou H ₂ SO ₄ 50%	Sementes	Liaw <i>et al.</i> , 2004a e b; Liaw <i>et al.</i> , 2005.
CC HPLC (semi-preparativa)	Hexano-AcOEt (90:10; 70:30; 1:51; 30:70; 10:90)	25, 29, 27, 36, 34, 40, 41, 66, 67,68 e 70	ND	Folhas e galhos	Colom <i>et al.</i> , 2009.
CC HPLC (semi-preparativa)	Hexano-AcOEt (90:10; 70:30; 1:1; 30:70; 10:90) CHCl ₃ -AcOEt-MeOH	25, 27, 57, 51, 58, 64 e 65	Luz UV, reagente Kedde's	Folhas e galhos	Hidalgo <i>et al.</i> , 2020.

3.4.2.3 Alcaloides

Os alcaloides são a segunda classe de metabólitos abundantes em *A. montana*. Estes são uma vasta classe de metabólitos naturais nitrogenados originados de vias metabólicas mistas, farmacologicamente ativos, comumente encontrados em angiospermas, apresentando uma grande variedade estrutural e importância socioeconômicas (Leboeuf *et al.*, 1982).

Dentre os 19 alcaloides isolados dessa espécie seis possuem o esqueleto aporfínicos, dois oxoaporfínicos, três fenatrenos, dois tetrahydroisoquinolino, um tetraidroprotoberberínicos e quatro com o esqueleto pirimidino- β -carbolino. Sendo o último encontrado em três espécies do gênero: *A. montana* (Leboeuf *et al.*, 1982c) e *A. foetida* (Costa *et al.*, 2006) e em *A. purpurea* (Del Carmen Rejón-Orantes *et al.*, 2011). O Quadro 4, lista esses alcaloides juntamente com a quantidade de estudos biológicos publicados e Figura 7 (pág. 36) mostra a variedade estrutural.

Quadro 4 – Estrutura de alcaloides isolados de *A. montana*; ¹CAS = Chemical Abstract Services; ²Dados do SciFinder.

Alcaloides isolados	¹ CAS	Fórmula Molecular	Parte da Planta	² Estudos biológicos	Referência
AcetilMethoxiannomontina* (72)	ND	C ₁₈ H ₁₅ N ₅ O ₂	casca das raízes	ND	Leboeuf <i>et al.</i> , 1982c
Annomontina (73)	82504-00-5	C ₁₅ H ₁₁ N ₅	casca das raízes	19	Leboeuf <i>et al.</i> , 1982c
Annonaina (74)	1862-41-5	C ₁₇ H ₁₅ NO ₂	casca das raízes	290	Leboeuf <i>et al.</i> , 1982b
Annolatina (75)	149998-52-7	C ₁₉ H ₁₅ NO ₅	Folhas	1	Wu <i>et al.</i> , 1993; 1995
Annorelina (76)	149998-37-8	C ₁₉ H ₁₉ NO ₂	Folhas	5	Wu <i>et al.</i> , 1993;
Argentinina (77)	16625-57-3	C ₁₉ H ₂₁ NO ₂	Folhas	25	Wu <i>et al.</i> , 1993;
Argentinina acetato (78)	149172-61-2	C ₂₁ H ₂₃ NO ₃	Folhas	1	Wu <i>et al.</i> , 1993;
Asimilobina (79)	6871-21-2	C ₁₇ H ₁₇ NO ₂	casca das raízes	201	Leboeuf <i>et al.</i> , 1982b;
Aterosperminina (80)	5531-98-6	C ₂₀ H ₂₃ NO ₂	casca das raízes	32	Leboeuf <i>et al.</i> , 1982b;
Cocclaurina (81)	486-39-5	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	casca das raízes	276	Leboeuf <i>et al.</i> , 1982b;

Coreximina (82)	483-45-4	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	cascas das raízes	66	Leboeuf et al., 1982b;
Corituberina (83)	517-56-6	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	cascas das raízes	124	Chuang et al., 2008
Harmina (84)	442-51-3	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O	cascas das raízes	1984	Leboeuf et al., 1982a
Isoboldina (85)	3019-51-0	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	cascas das raízes	259	Leboeuf et al., 1982a
Liriodenina (86)	475-75-2	C ₁₇ H ₉ NO ₃	Folhas e cascas das raízes	600	Leboeuf et al., 1982b; Wu et al., 1993; 1995
Metoxiannomontina (87)	82504-01-6	C ₁₆ H ₁₃ N ₅ O	cascas das raízes	5	Leboeuf et al., 1982c
Reticulina (88)	485-19-8	C ₁₉ H ₂₃ NO ₄	cascas das raízes	618	Leboeuf et al., 1982a
Xilopina (89)	517-71-5	C ₁₈ H ₁₇ NO ₃	cascas das raízes	87	Leboeuf et al., 1982a

* Derivado sintético.

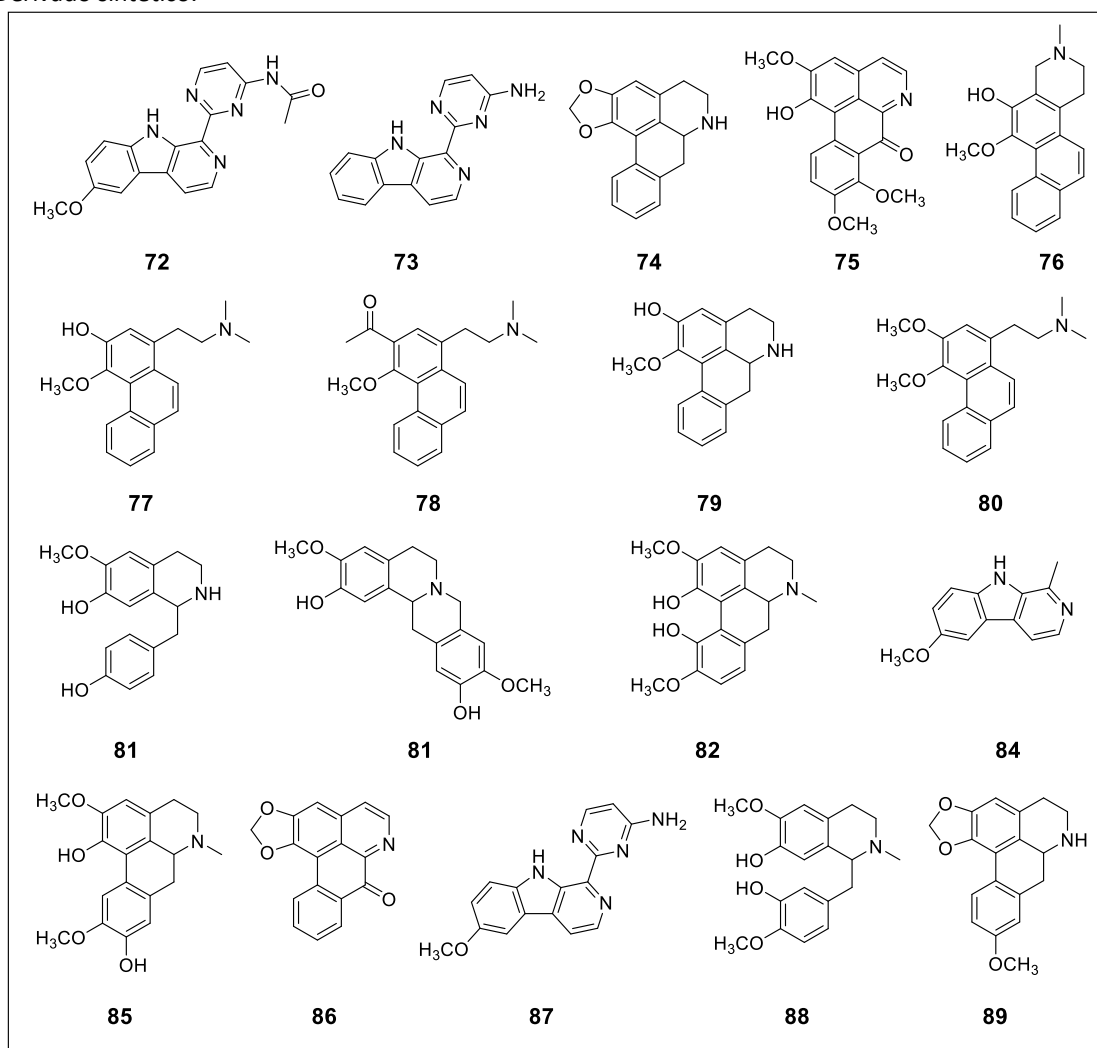


Figura 7 – Estrutura química de alcaloides isolados de *A. montana*.

3.4.2.4 Isolamento e purificação de alcaloides de *A. montana*

Para o isolamento de alcaloides de *A. montana*, o extrato bruto costuma ser preparado a partir do material vegetal seco e triturado, sendo extraído repetidamente por maceração estática a frio com metanol (Wu *et al.*, 1993; Chuang *et al.*, 2008). No entanto, a extração também vem sendo realizada com a percolação do material com clorofórmio (CHCl_3) para obtenção de metabolitos de interesse (Leboeuf *et al.*, 1982a).

A partir da suspensão dos extratos obtido, extrai-se os alcaloides separadamente em uma extração ácido-base de acordo com o procedimento clássico (Leboeuf *et al.*, 1982a e b).

Mas por vezes, a extração é feita solubilizando o extrato em MeOH-aquoso, e posteriormente particionada com solventes orgânicos em diferença polaridades (Wu *et al.*, 1993; Chuang *et al.*, 2008), formando camadas insolúveis na fase aquosa, intencionado separar substâncias de acordo com a afinidade com cada solventes (Chuang *et al.*, 2008)

O isolamento das bases biologicamente ativas dessa espécie de *Annona* é feito combinando diferentes técnicas de separação como a cristalização (Leboeuf *et al.*, 1982b), cromatografia em coluna aberta (alumina e/ou sílica gel), cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) e HPLC preparativa (fase reversa) (Leboeuf *et al.*, 1982; Wu *et al.*, 1993; Chuang *et al.*, 2008). Estes processos costumam ser monitorados com luz UV (254 e 365 nm), vapor de iodo, H_2SO_4 a 60% e o convencional reagente Dragendorff (Leboeuf *et al.*, 1982b e c; Wu *et al.*, 1993). O Quadro 5, lista a metodologia utilizada isolamento e purificação de alcaloide de *A. montana*.

Quadro 5 – Metodologia utilizada para isolamento e purificação de alcaloide de *A. montana*.

Método utilizado	Sistema de eluição	Alcaloides isolados	Reveladores	Parte da planta	Referência
Cristalização HPLC (fase reversa) CC com alumina e sílica gel CCDP	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (2:1) CHCl ₃ -MeOH CHCl ₃ -MeOH-NH ₄ OH 90:10:1 v/v Hex-CHCl ₃ -MeOH-NH ₄ OH 45:45:10:1 v/v	74, 77, 79, 80, 85, 86, 88, 89	UV (254 nm) Vapor de iodo Dragendorff	Cascas dos troncos e das raízes	Leboeuf <i>et al.</i> , 1982a
Cristalização CC com alumina	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (2:1)	72, 73, 81, 84, 87	ND	Cascas dos troncos e das raízes	Leboeuf <i>et al.</i> , 1982b
Partição líq.-líq. CC CCDP	CHCl ₃ -MeOH (10:1)	75, 76, 77, 86	UV (254 e 365 nm) H ₂ SO ₄ a 60%.	Folhas	Wu <i>et al.</i> , 1993
Partição líq.-líq. CC flash CC HPLC preparativa (fase reversa)	ND	83	ND	Sementes	Chuang <i>et al.</i> , 2008

3.4.2.5 Outros compostos isolados

Outros metabólitos secundários foram isolados de *A. montana* pertencentes a diferentes classes como as quinonas (**90 e 91**), antraquinonas (**92 e 93**) (Wu *et al.*, 1987), esteroides (**94**), amidas ácidas (**95, 96 e 97**), lignana (**98**), aldeído (**99**) (Wu *et al.*, 1994) e ciclopeptídeos (**100, 101, 102, 103 e 104**) (Chuang *et al.*, 2008). Muitos dos quais apresentam atividades biológicas importantes. A **figura 8** mostra a estrutura química desses compostos.

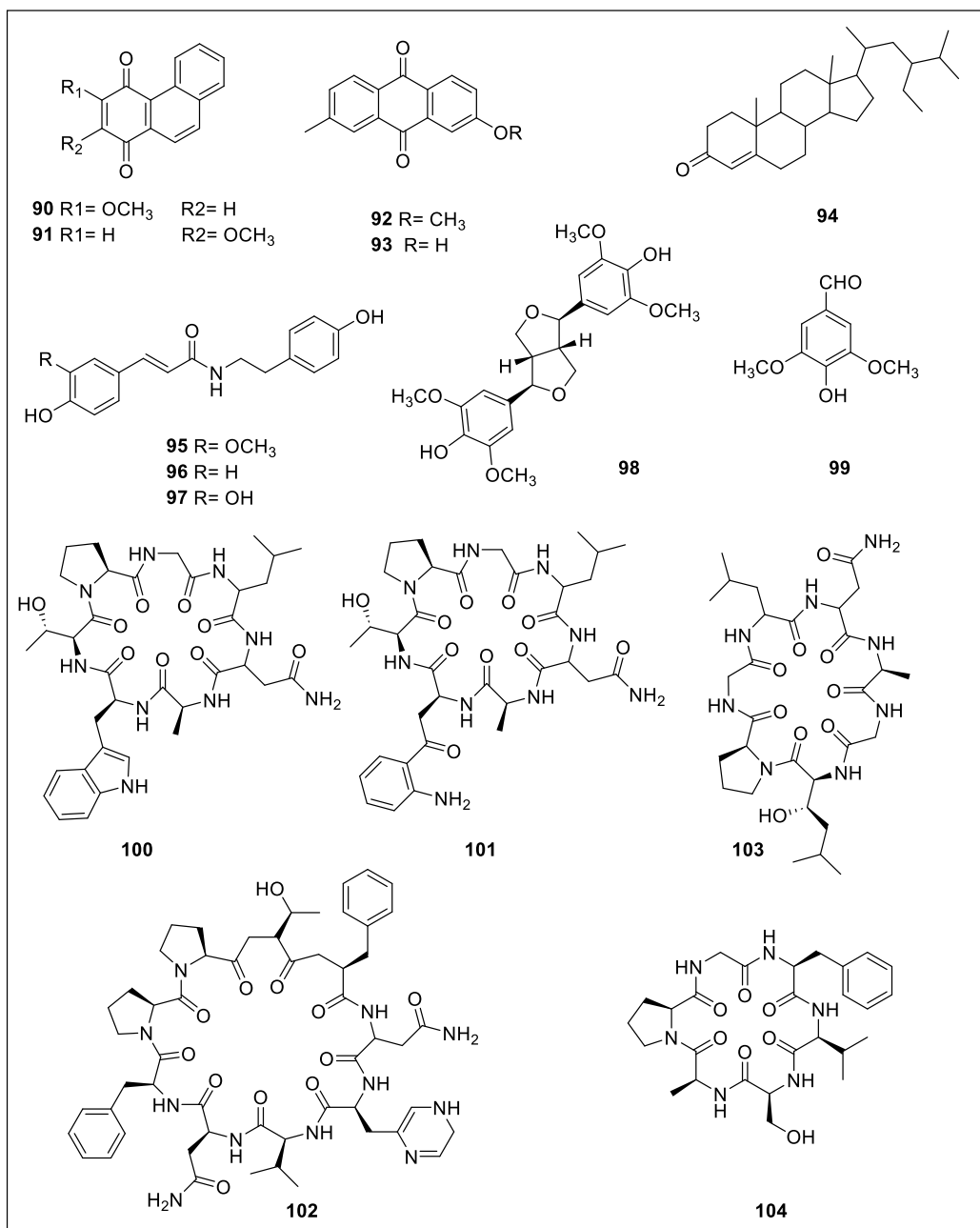


Figura 8– Estrutura de outras classes de metabolitos secundários isolados de *A. montana*.

3.4.3 Atividades Biológica

3.4.3.1 Atividade citotóxica

Acetogenina são os metabolitos de *A. montana* que se destacam pela atividade citotóxica. Como exemplo citamos annonacina (**25**), annonreticuina (**28**) e montanacina (**55**) (Wang *et al.*, 2001; Liaw *et al.*, 2004a).

As acetogeninas isoladas das folhas de *A. montana* exibiram potente atividade

em células carcinogênicas de pulmão de ratos. As moléculas avaliadas foram montanacina B (**55**), montanacina C (**56**), montanacina G (**60**), montanacina H (**62**), montanacina J (**63**), gigantetrocina A (**38**), gigantetrocina B (**39**) e cis-annonacina (**31**) (Wang *et al.*, 2001).

A annonacina apresentou a mais potente capacidade citotóxica nesta linhagem celular, sendo avaliadas através do ensaio colorimétrico com sulforhodamina B (SRB) que permitiu avaliar a capacidade dessas acetogeninas em inibir o crescimento das células tumorais (Wang *et al.*, 2001).

Complementarmente, Wang e colaboradores (2002), realizaram um experimento para avaliar a atividade antitumoral *in vivo* com células LLC implantadas subcutaneamente em camundongos. Confirmaram que a annonacina (**25**) é um potente citotóxico, apresentando um valor T/C de 57,9% a uma dose de 10 mg/kg quando comparado com o controle.

Compostos isolados das sementes também apresentam citotoxicidade contra várias linhagens de células tumorais humanas, incluindo A549 (pulmão), MCF-7 (mama), HCT-8 (íleo), SK-MEL-2 (melanoma), KB (nasofaríngea), KB-VIN (KB resistente à vincristina), U-87-MG (glioblastoma), CAKI (renal), PC-3 (próstata), 1A9 (ovário) e PTX10 (ovário com mutação no gene β -tubulina) (Liaw *et al.*, 2004).

As acetogeninas *cis*-montacina (**33**) e montacina (**44**) exibiram atividade citotóxica relevante em várias linhagens testadas, com valores de ED₅₀ variando de 0,11 a 20 µg/mL. Curiosamente, ao ser adicionado íons de cálcio (Ca²⁺) nos testes, aumentou a eficácia inibitória dos compostos, especialmente nas linhagens celulares da série 1A9 (Liaw *et al.*, 2004).

Com base nos resultados assume-se que as acetogeninas atuam como ionóforos, permitindo que íons Ca²⁺, atravessem as membranas celulares de forma mais eficiente nas células cancerígenas, induzindo dessa forma a morte celular (Liaw *et al.*, 2004).

Outro estudo das acetogeninas 4-deoxiannonomontacina (**35**), (+) -monhexocin (**40**), (-) -monhexocin (**41**), monlicina A (**42**), monlicina B (**43**), montalicina G (**51**), montalicina H (**52**), muricatacina (**66**) e murisolina (**69**), evidenciou que todos esses compostos possuem atividade citotóxica significativa contra células de hepatocarcinoma

humano (Hepg2). E além desta, a monlicina A (**42**) e monlicina B (**43**), também foram ativos contra células de câncer de ovário (1A9) (Liaw *et al.*, 2005).

Por fim, os autores concordam que o anel terminal α , β -insaturada da γ -lactona com um grupo hidroxila no carbono 4 parecem ser cruciais para a citotoxicidade desses compostos (Liaw *et al.*, 2005).

Estas pesquisas tiveram como parâmetro um estudo realizado por Wu e colaboradores (1993), onde testaram os alcaloides annoretine, argentinine, liriodenine e annolatine, isolados das folhas de *A. montana*. O ensaio utilizou cinco modelos celulares carcinogênicos, e foi provado que três desses compostos apresentaram a capacidade de inibir o crescimento destas células perigosas.

3.4.3.2 Atividade hipoglicêmica e hipolipidêmica

Os usos tradicionais da *A. montana* motivaram Barbalho e colaboradores (2012) a investigarem os efeitos do consumo dessa planta na saúde metabólica de ratos Wistar. No estudo *in vivo*, os ratos foram divididos em grupos, sendo tratados por 40 dias. O grupo teste consumiu suco da folha e da polpa da planta. O monitoramento foi realizado diariamente, e ao final do estudo, o perfil metabólico dos animais foi avaliado.

As principais mudanças observadas na saúde dos ratos, após o tratamento, foram a redução significativa nos níveis de glicose no sangue (glicemia), a diminuição nos níveis de triglicerídeos e colesterol total, o aumento nos valores de colesterol de alta densidade (HDL-C), conhecido como "colesterol bom", a redução no ganho de peso dos animais tratados em comparação com os grupos controle. Não foram observadas variações significativas nos níveis de enzimas hepáticas (AST e ALT) (Barbalho *et al.*, 2012).

Com base nas observações realizadas durante o estudo, os autores concluíram que o uso de *A. montana* pode ter efeitos benéficos na prevenção de diabetes mellitus e dislipidemia, contribuindo assim para a prevenção de doenças cardiovasculares. Pois, ajuda a remover o colesterol LDL ("colesterol ruim") do sangue, protegendo as artérias e auxiliando no controle do peso corporal. Além disso, é um tratamento que não causa danos ao fígado. E por fim, a espécie apresenta características promissoras que a tornam um candidato interessante para pesquisas sobre seu potencial terapêutico em doenças metabólicas (Barbalho *et al.*, 2012).

3.4.3.3 Atividade anti-inflamatória

Os ciclopeptídeos são pequenas moléculas compostas por aminoácidos ligados em um padrão cíclico e fazem parte de compostos bioativos da *A. montana*. Apresentam-se como bons candidatos para o uso terapêutico devido às suas propriedades anti-inflamatórias. Chuang e colaboradores (2008) investigaram o potencial terapêutico de ciclopeptídeos isolados de sementes de *A. montana*, especificamente ciclomontanina A (**100**), ciclomontanina C (**101**), ciclomontanina D (**103**) e anomuricata C (**104**).

Ao utilizar diferentes concentrações desses ciclopeptídeos, observou-se atividade antiinflamatória, com destaque para o composto ciclomontanina C (**101**). Essa atividade se deve à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6 (interleucina-6), mediada pela ligação desses compostos à proteína NF-KB (factor nuclear kappa B), impedindo a ativação dos genes responsáveis pela produção dessas citocinas (Chuang *et al.*, 2008).

Essa inibição reduz a resposta inflamatória desencadeada por agentes patogênicos, como bactérias, contribuindo para o controle de processos inflamatórios, que estão associados a diversas condições patológicas (Chuang *et al.*, 2008).

3.4.3.4 Atividade antiplaquetária

Entre os diversos usos etnomedicinais da *A. montana*, destaca-se o seu potencial para atenuar os efeitos de picada de cobras (Quílez *et al.*, 2018). Estudos científicos demonstraram que a planta possui propriedades anti-inflamatórias e analgésicas, que podem ajudar a aliviar a dor, o inchaço e outros sintomas da picada, além do efeito anticoagulante (Chuang *et al.*, 2001).

Um estudo *in vitro* com compostos isolados dos galhos dessa planta demonstrou significativa atividade antiplaquetária, corroborando com o uso tradicional. Os testes foram feitos com diferentes concentrações (300 μ M, 60 μ M e 15 μ M) de cinco isolados da planta, sendo três ácidos amídicos (*N-trans*-feruloiltiramina (**95**), *N-p*-coumaroiltiramina (**96**), *N-trans*-caffeoiltiramine(**97**)), uma lignana (siringaresinol (**98**)) e um aldeído aromático (siringaldeído (**99**)) (Wu *et al.*, 1994).

A agregação plaquetária é um mecanismo essencial na hemostasia, impedindo

o sangramento excessivo após lesões vasculares. Porém, quando desregulada, pode levar à formação de coágulos sanguíneos indesejáveis, associados a trombose, doenças cardiovasculares e outras condições patológicas (Hałucha *et al.*, 2021).

Os efeitos inibitórios da agregação plaquetária foram induzidos por diferentes agentes: trombina, ácido araquidônico, colágeno e PAF (fator ativador plaquetário). Nesse contexto, os compostos **95**, **96** e **97** demonstraram uma inibição significativa, mesmo nas menores concentrações. Os resultados foram expressos em porcentagens de inibição em relação ao padrão ácido acetilsalicílico (aspirina), um fármaco comumente utilizado como antiagregante plaquetário (Wu *et al.*, 1993).

3.4.3.5 Atividade larvícida e insetícida

As acetogeninas de *A. montana*, além de apresentarem atividade citotóxica, também apresentam atividade larvícida e insetícida. Um estudo realizado *in vivo* testou a toxicidade dessas moléculas contra a *Spodoptera frugiperda*, que é uma espécie de inseto praga pertencente à família Noctuidae, conhecida como lagarta-do-cartucho (Hidalgo *et al.*, 2020).

O teste larvícida foi feito com uma alíquota (100 µg por grama de dieta) das acetogeninas: montanacina-D (**57**), montanacina-E (**58**), montanacina-L (**64**) e montanacina-K (**65**) isoladas de folhas e galhos de *A. montana*, misturadas com a dieta larval. O processo alimentar foi acompanhado, comparando-o com a dieta controle, durante o desenvolvimento das larvas até sua emergência na fase adulta (Hidalgo *et al.*, 2020).

Além da taxa de mortalidade, foram avaliados os efeitos nutricionais para inferir o mecanismo de ação que leva à mortalidade, calculados os índices de consumo efetivo (ECI), a taxa de crescimento (GR) e o índice de eficiência na utilização (ECIT), com os valores expressos como uma razão de tratamento - controle (Hidalgo *et al.*, 2020).

À vista disso, a Montanacina-D (**57**) foi o composto que causou o efeito tóxico mais significativo, resultando em 40% de mortalidade em larvas de estágios iniciais. Em seguida, montanacina-K (**65**) também exibiu uma ação insetícida eficaz, causando 35% de mortalidade nas larvas. Ademais da mortalidade nas larvas, houve a malformações e redução de tamanho nos adultos sobreviventes, levando-os à morte antes da postura de

ovos. Esses resultados indicam que essas acetogeninas são compostos promissores como agentes inseticidas contra essa praga agrícola (Hidalgo *et al.*, 2020).

As acetogeninas *cis*-annonacina-10-one (**27**), densicomacina-1 (**34**), gigantetronenina (**36**), de folhas e galhos de *A. montana*, também são inseticidas naturais contra *S. frugiperda* (Blessing *et al.*, 2010).

Um estudo anterior, avaliou seis acetogeninas, dessa espécie de planta, mostrando que todas causaram 100% de mortalidade durante as fases larval ou pupal a 100 µg de tratamento por grama de dieta. Além disso, esses três compostos (**27**, **34** e **36**) mostraram efeitos antialimentares, reduzindo a alimentação das larvas em mais de 80% na mesma dose. E concentração letal média foi de (LC₅₀) foi < 10 µg/L (Blessing *et al.*, 2010).

As sementes de *A. montana* também produzem compostos com atividade larvicida. Extratos de hexano e etanol foram testados contra larvas de *Thrips tabaci* L. e *Artemia salina*. Os resultados da atividade contra *T. tabaci* L. mostraram que a mortalidade dependendo da concentração do extrato, onde o extrato polar resultou em uma mortalidade de 67,5% e o extrato não polar em uma mortalidade de 53,3% (Giraldo-Rivera *et al.*, 2021).

Os ensaios frente *A. salina* mostraram que a dose de 10 mg/L levou ao maior percentual de mortalidade das larvas maiores que 80%. A concentração letal média (LC₅₀) calculada após 24 horas para o extrato não polar foi de 3,58 mg/L e para o extrato polar foi de 3,22 mg/L. Isso indica que ambos os tipos de extratos foram altamente ativos (Giraldo-Rivera *et al.*, 2021).

O Quadro 6 resume os principais compostos bioativos isolados de *A. montana*.

Quadro 6 – Estrutura de outras classes de metabolitos secundários isolados de *A. montana*.

Compostos	Classe	Parte da planta	Bioatividade	Modelo	Resultados	Referência
Annoiretina	Alcaloide	Folhas	Citotóxica	<i>In vitro</i> : células RB, P-388, A-549 e HT-29.	LC ₅₀ =14,47 µg/mL	Wu <i>et al.</i> , 1993
Argetinina	Alcaloide	Folhas	Citotóxica	<i>In vitro</i> : RB, P-388, A-549 e HT-29.	LC ₅₀ =4,46 µg/mL	Wu <i>et al.</i> , 1993
Liriodenina	Alcaloide	Folhas	Citotóxica	<i>In vitro</i> : células RB, P-388, A-549 e HT-29.	LC ₅₀ =2,51 µg/mL	Wu <i>et al.</i> , 1993
<i>N-trans-feruloiltiramina</i>	Amida	Galhos	Agregação antiplaquetária e citotóxica	<i>In Vitro</i> : Células P-388	Antiplaquetária 85,1± 1,1% de inibição em 30 µM Citotoxicidade LC ₅₀ = 7,97 µg/mL	Wu <i>et al.</i> , 1994)
<i>N-p-coumaroiltiramine</i>	Amida	Galhos	Agregação antiplaquetária e Citotóxica	<i>In Vitro</i> : Células P-388	Antiplaquetária 85,7 ± 0,9 % de inibição em 30 µM Citotoxicidade LC ₅₀ = 2,26 µg/mL	Wu <i>et al.</i> , 1994
<i>N-trans-cafeioiltiramina</i>	Amida	Galhos	Agregação antiplaquetária e Citotóxica	<i>In Vitro</i> : Células P-388	Antiplaquetária 85,1 ± 2,2 % de inibição em 30 µM Citotoxicidade LC ₅₀ = 2,92 µg/mL	Wu <i>et al.</i> , 1993
Siringaresinol	Lignana	Galhos	Citotóxica	<i>In Vitro</i> : Citotoxicidade em P-388	Citotoxicidade LC ₅₀ = 0,67 µg/mL	Wu <i>et al.</i> , 1993
Sinrigaldeído	Aldeído	Galhos	Citotóxica	<i>In Vitro</i> : Citotoxicidade em P-388	Citotoxicidade ED ₅₀ = 3,28 µg/mL	Wu <i>et al.</i> , 1993
Montanacina B	Acetogenina	Folhas	Citotóxica	<i>In vitro</i> : células LLC	LC ₅₀ = 0,51 µg/mL	Wang <i>et al.</i> , 2001
Montanacina C	Acetogenina	Folhas	Citotóxica	<i>In vitro</i> : células LLC	LC ₅₀ = 0,074 µg/mL	Wang <i>et al.</i> , 2001

Montanacina H	Acetogenina	Folhas	Citotóxica	<i>In vitro</i> : células LLC	LC ₅₀ = 0,69 µg/mL	Wang <i>et al.</i> , 2001
Montanacina J	Acetogenina	Folhas	Citotóxica	<i>In vitro</i> : células LLC	LC ₅₀ = 0,73 µg/mL	Wang <i>et al.</i> , 2001
Gigantetrocina A	Acetogenina	Folhas	Citotóxica	<i>In vitro</i> : Células LLC	LC ₅₀ = 0,046 µg/mL	Wang <i>et al.</i> , 2001
Gigantetrocina B	Acetogenina	Folhas	Citotóxica	<i>In vitro</i> : células LLC	LC ₅₀ = 0,076 µg/mL	Wang <i>et al.</i> , 2001
Anonacina	Acetogenina	Folhas	Citotóxica	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> : células LLC	LC ₅₀ = 0,012 µg/mL Significativa atividade na concentração de 10 mg/kg	Wang <i>et al.</i> , 2001 Wang <i>et al.</i> , 2002
<i>cis</i> -annonacina	Acetogenina	Folhas	Citotóxica	<i>In vitro</i> : células LLC	LC ₅₀ = 0,043 µg/mL	Wang <i>et al.</i> , 2001
Montanacina F	Acetogenina	Folhas	Citotóxica	<i>In vitro</i> : células LLC	LC ₅₀ = 0,083 µg/mL	Wang, <i>et al.</i> , 2002
Montacina	Acetogenina	Sementes	Citotóxica	<i>In vitro</i> : Células A549 MCF-7, HCT-8, SK- MEL-2 e KB	LC ₅₀ = 10,0-16,6 µg/mL	Liaw <i>et al.</i> , 2004
<i>cis</i> -montacina	Acetogenina	Sementes	Citotóxica	<i>In vitro</i> : Células A549 MCF-7, HCT-8, SK- MEL-2 e KB	LC ₅₀ = 6,0-15,0 µg/mL	Liaw <i>et al.</i> , 2004
Montaliscina A	Acetogenina	Sementes	Citotóxica	<i>In vitro</i> : Células HepG2	LC ₅₀ = <0,01 µg/mL	Liaw <i>et al.</i> , 2004
Montaliscina B	Acetogenina	Sementes	Citotóxica	<i>In vitro</i> : Células HepG2	LC ₅₀ = 0,53 µg/mL	Liaw <i>et al.</i> , 2004
Montaliscina C	Acetogenina	Sementes	Citotóxica	<i>In vitro</i> : Células HepG2	LC ₅₀ = 0,022 µg/mL	Liaw <i>et al.</i> , 2004
Montaliscina D	Acetogenina	Sementes	Citotóxica	<i>In vitro</i> : Células HepG2	LC ₅₀ = 1,99 µg/mL	Liaw <i>et al.</i> , 2004
Montaliscina E	Acetogenina	Sementes	Citotóxica	<i>In vitro</i> : Células HepG2	LC ₅₀ = 0,13 µg/mL	Liaw <i>et al.</i> , 2004a
Montaliscina F	Acetogenina	Sementes	Citotóxica	<i>In vitro</i> : Células HepG2	LC ₅₀ = <0,01 µg/mL	Liaw <i>et al.</i> , 2004
Montaliscina I	Acetogenina	Sementes	Citotóxica	<i>In vitro</i> : Células HepG2	LC ₅₀ = 0,11 µg/mL	Liaw <i>et al.</i> , 2004

Montaliscina J	Acetogenina	Sementes	Citotóxica	<i>In vitro</i> : Células HepG2	LC ₅₀ = <0,01 µg/mL	Liaw <i>et al.</i> , 2004
<i>cis</i> -annonreticuina	Acetogenina	Sementes	Citotóxica	<i>In vitro</i> : Células HepG2	LC ₅₀ = 0,0024 µg/mL	Liaw <i>et al.</i> , 2004
Ciclomontanina A	Ciclopeptídeos	Sementes	Anti-inflamatória	<i>In vitro</i> : Células J774A	ND	Chuang <i>et al.</i> , 2008
Ciclomontanina B	Ciclopeptídeos	Sementes		<i>In vitro</i> : Células J774A	ND	Chuang <i>et al.</i> , 2008
Ciclomontanina C	Ciclopeptídeos	Sementes	Anti-inflamatória	<i>In vitro</i> Anti-inflamatória: Células J774A	ND	Chuang <i>et al.</i> , 2008
Ciclomontanina D	Ciclopeptídeos	Sementes	Anti-inflamatória	<i>In vitro</i> : Células J774A	ND	Chuang <i>et al.</i> , 2008
Annomuricata	Ciclopeptídeos	Sementes	Anti-inflamatória	<i>In vitro</i> : Células J774	ND	Chuang <i>et al.</i> , 2008

Legenda: **J774A** - modelo de células imunes; **HepG2** - carcinoma hepatocelular humano; **A-549** – Modelo de células pulmonares; **HT-29** -adenocarcinoma colorretal humano; **LLC** - Carcinoma de pulmão de ratos; **MCF-7** - Células mamárias; **HCT-8** - Células ileoceais; **SK-MEL-2** - Células melanoma; **KB** - Células carcinoma epidermóide nasofaríngeo; **P-388** - células de leucemia murina.

4 METODOLOGIA

4.1 Suporte para cromatografia

Para cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram empregadas cromatoplasas revestidas com sílica em gel 60 com indicador de fluorescência F₂₅₄ da marca Merk®. Capilar de vidro para a aplicação do analito. Cuba cromatográfica bipartida (Camag®) previamente saturada por 10 minutos, e mistura de solventes diclometano:metanol na proporção 95:5 v/v e hexano:clorofórmio:metanol:NH₄OH na proporção 45:45:10:1 v/v.

Como reveladores físicos foram utilizados exposição a lâmpada ultravioleta (Dist®) em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm), e como reveladores químicos Reagente de Dragendorff e Iodo sólido.

Para as colunas cromatográfica (CC) foram utilizadas sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm- 70 - 230 Mesh) da Neon®. Para a coluna cromatográfica, com sistema de pressão acoplado foi utilizado sílica gel C18 (Duo 100 Å 30 µm) para os compostos mais polares. Foram utilizadas colunas em Sephadex® LH-20.

Os solventes utilizados foram das Merck®, Hexis®, Baker®, Qhemis®, Vetec® e Aldrich®. E para obtenção dos espectros de RMN foram utilizados solventes Tédia®, Merck® e Aldrich®.

4.2 Equipamentos utilizados

Para obtenção dos espectros de massa foi utilizado um espectrômetro de massas, modelo LQC Fleet (Thermo Scientific®), operando com fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI) com analisador de massas do tipo armadilha de íons (IT). Utilizando injeção direta com interface electrospray, funcionando com um loop de 5 µL e um sistema de bombeamento com vazão de 25 µL/min. Experimentos foram realizados com uso do gás hélio para a obtenção de espectros de fragmentação EM/EM. As análises foram feitas no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas – LABCEM (UFAM). Os espectros foram processados utilizando o software Xcalibur (Thermo Scientific®) versão 3.0.63.

Para elucidação estrutural das substâncias isoladas foi utilizado o equipamento

de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) da Central Analítica da UFAM. Os espectros unidimensionais (^1H , ^{13}C e DEPT 135) e bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC) foram registrados em um aparelho Bruker Avance III HD 500 operando a 11,75 teslas, observando os núcleos 500,13 MHz para ^1H e 125,76 MHz para RMN de ^{13}C . O tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão de referência. Os dados foram processados pelo software MestReNova® versão 14.0.

Para os procedimentos de bancada utilizou-se uma bomba de vácuo Eco 260 (Biomec®), balança analítica e semi-analítica (Shimadzu®), autoclave vertical (Prismatec®), câmara de fluxo laminar e estufa incubadora para BOB (Tecnal®).

4.3 Coleta

O material vegetal foi coletado no Instituto Adventista Amazonas localizado na Am 010 Km 74 no município de Rio preto da Eva – Amazonas (coordenadas S2°70'02,0" e W59°73'23,3"). A identificação do espécime foi realizada pelos botânicos do Herbário da Universidade Federal do Amazonas - HUAM, no qual foi depositada uma exsicata sob o nº de registro 12330 (Figura 9). O acesso ao patrimônio genético da espécie vegetal envolvidos na presente pesquisa está regularizado por meio do cadastro A15125B na plataforma SISGEN do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) do Ministério do Meio Ambiente (MMA).



Figura 9 – Exsicata de *A. montana* depositada no herbário HUAM.

4.4 Preparação dos extratos

O cerne e cascas foram desidratados em estufa com circulação de ar (Mylabor®) à temperatura aproximada de 40 °C. Após a secagem completa, foram reduzidos a tamanhos menores e pulverizados em moinho de martelo (Tigre®). O material pulverizado (2 kg de cerne e 2,2 kg de cascas) foi submetido ao processo de maceração estática (extração a frio) assistida por banho ultrassônico por 20 minutos (Mylabor®) utilizando solventes orgânicos grau P.A.. Inicialmente o hexano foi utilizado com trocas a cada 72 h, para a remoção dos compostos desejáveis. Posteriormente o processo foi repetido com os solventes polares. Etanol para a extração das cascas e metanol para a extração do cerne.

Em cada fase da extração, a parte sólida foi separada por filtração comum e a parte líquida levada ao evaporador rotativo vertical à pressão reduzida com banho de aquecimento (Fisatom®) para evaporação total do solvente. Ao final, os extratos foram pesados em balança analítica (Shimadzu®), obtendo-se 0,997 g do extrato hexânico do caule que foi nomeado pelo código EHAM1 e 23 g do extrato hexânico das cascas nomeado de EHAM2; 133 g do extrato metanólico do cerne nomeado de EMAM e 150 g do extrato etanólico das cascas nomeado de EEAM. O material vegetal final (torta) foi descartado e os solventes utilizados foram recuperados. O fluxograma na Figura 10 resume o processo de extração.

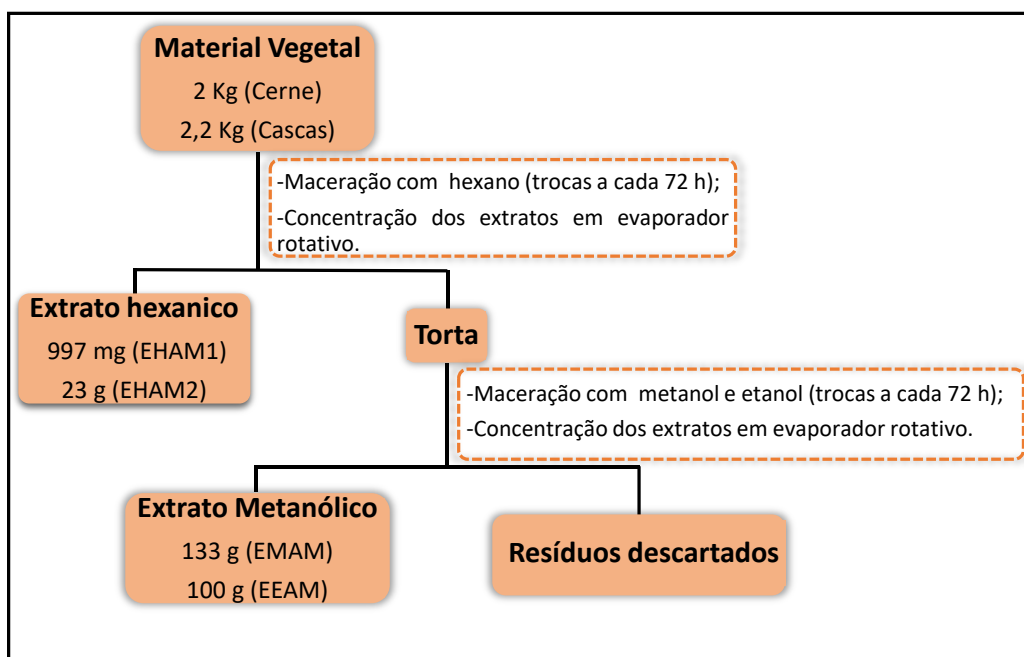


Figura 10 – Fluxograma da preparação dos extratos do caule de *A. montana*.

4.5 Obtenção da fração alcaloídica do extrato EMAM

Após confirmada a presença de alcaloides, através da utilização do reagente de Dragendorff em CCD, o extrato metanólico foi submetido à extração ácido-base pelo método descrito por Costa e colaboradores (2006). Em um béquer de 1000 mL o extrato foi solubilizado com 600 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) com o auxílio de banho ultrassônico seguido de sucessivas extrações com 300 mL de solução de ácido clorídrico 10% v/v (HCl), obtendo-se duas frações: a fração aquosa ácida – com a presença de alcaloides protonados (Parte A) e a fração neutra (Parte B). Utilizou-se um funil de separação de 1000 mL para particionar as fases.

À fração aquosa ácida (Parte A) foi adicionado gradativamente hidróxido de amônio concentrado (NH_4OH). O monitoramento foi feito utilizando papel tornassol, até atingir o pH 11. Novamente a fração foi transferida a um funil de separação e feitas partições com CH_2Cl_2 , resultando em duas novas frações: a fração alcaloídica (Parte C) e a fração aquosa básica (Parte D) que foi desprezada. A fração alcaloídica (FAAM) e a fração neutra (FNAM) foram mantidas em capela de ar circulante (Inconex®) para completa evaporação do solvente. O rendimento foi de 0,946 g da FAAM e 22,8 g para a FNAM. O Fluxograma na Figura 11 detalha.

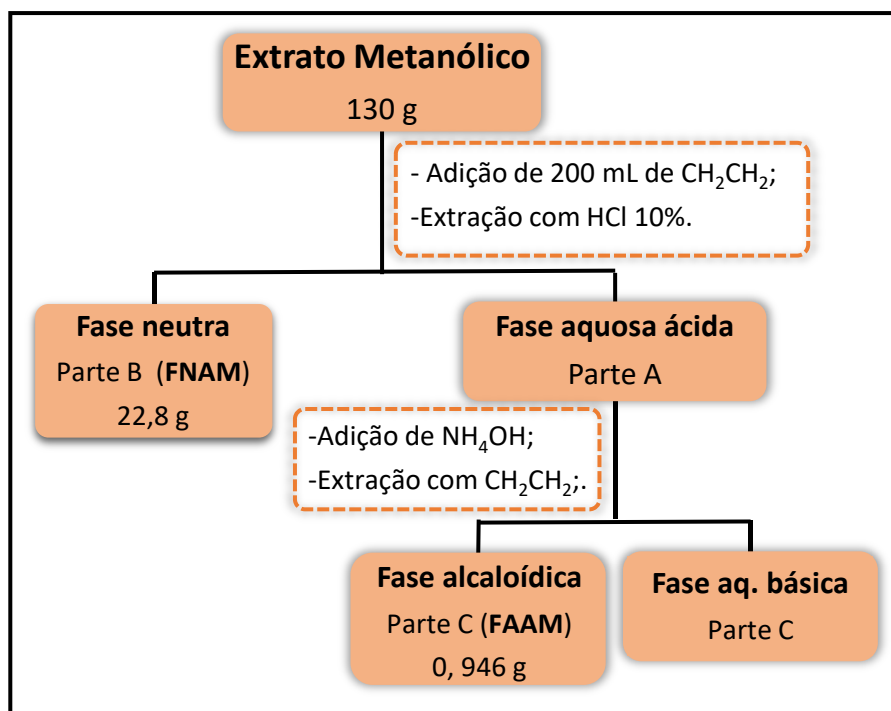


Figura 11 – Fluxograma da extração ácido-base do extrato EMAM.

4.6 Partição líquido-líquido do extrato EEAM

Uma alíquota de 10 g do extrato etanólico das cascas foi suspenso em metanol/água na proporção de 3:1 e submetido a partição líquido-líquido com hexano, acetato de etila e *n*-butanol. A figura 12 detalha o procedimento realizado.

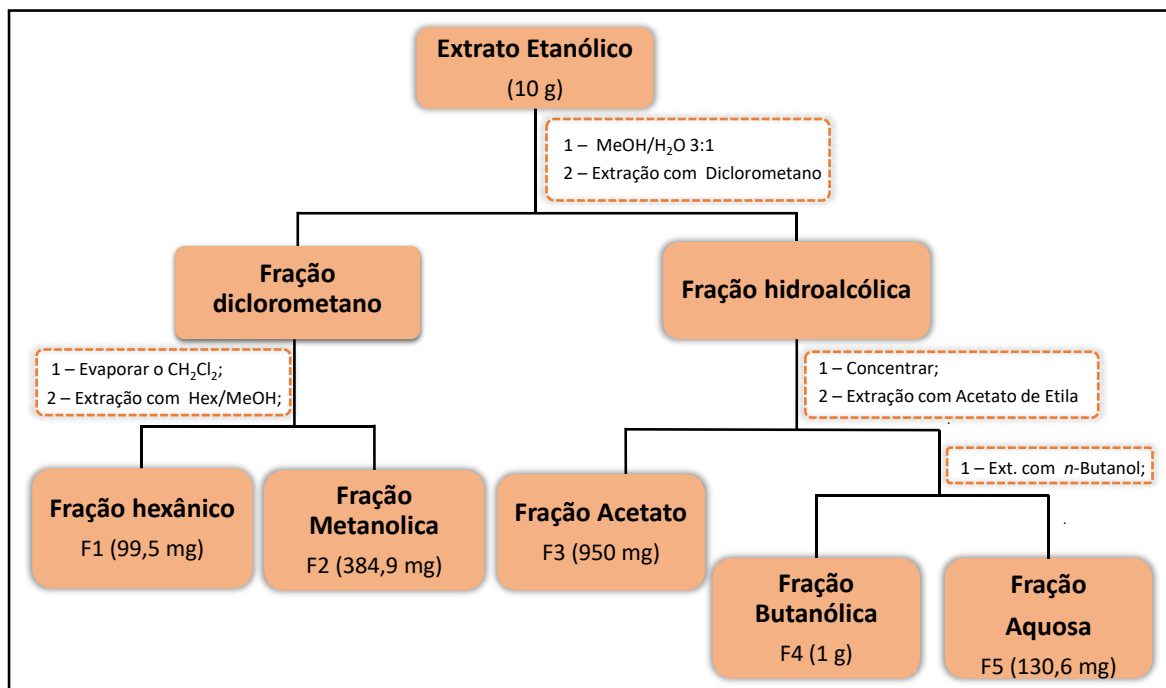


Figura 12 – Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato EEAM.

4.7 Fracionamento da fração alcaloídica (FAAM)

A fração alcaloídica obtida (800 mg) foi submetida ao fracionamento por meio de uma coluna cromatográfica C18 ($h \times \phi = 30 \times 4$ cm), eluída em sistema isocrático de MeOH/Água (8:2), utilizando a metodologia adaptada de Chuang e colaboradores (2008). Foram coletadas 27 frações com 50 mL cada. Subsequentemente à secagem, as frações resultantes foram submetidas a um processo de agrupamento, com base na similaridade de seus perfis químicos (R_f s iguais) mediante a análise em CCDA. Na análise, o eluente utilizado foi CHCl₃/CH₃OH na proporção 9,5:5 e 9:1 (v/v). O perfil químico das placas foi monitorado com Luz UV (254 e 365) e reagente de Dragendorff. Após o agrupamento obteve-se 5 frações (Tabela 1).

Tabela 1 – Reunião do fracionamento cromatográfico da **FAAM**.

Grupos de frações	Frações	Massa (mg)
A1	1 e 2	500
A2	3	25
A3	4-6	22,4
A4	7-15	23
A5	16-27	116

A fração **A3** foi recromatógrafas em CC de sílica gel ($h \times \phi = 20 \times 1$ cm), eluída num sistema em gradiente de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, sendo coletadas 24 frações com 10 mL cada. Após à secagem, as frações resultantes foram agrupadas com base na similaridade de seus perfis químicos (R_{f_s} iguais) mediante a análise em CCDA. A análise segue o mesmo procedimento citado anteriormente. Após o agrupamento obteve-se 8 frações (Tabela 2).

A fração 6 resultou em cristais em forma de agulhas na coloração amarelo e foi codificado como **A3.3**. a amostra foi preparada em clorofórmio-D e analisada por RMN.

Tabela 2 – Reunião do fracionamento cromatográfico da **A3**.

Grupos de frações	Frações	Massa (mg)
A3.1	1 e 2	1,5
A3.2	3-5	2,3
A3.3	6	3,5
A3.4	7 e 8	2,1
A3.5	9 e 10	4,5
A3.6	11-15	2
A3.7	16-20	1,7
A3.8	21-24	4,0

A Figura 13 apresenta um esquema ilustrativo detalhado do processo de isolamento e purificação.

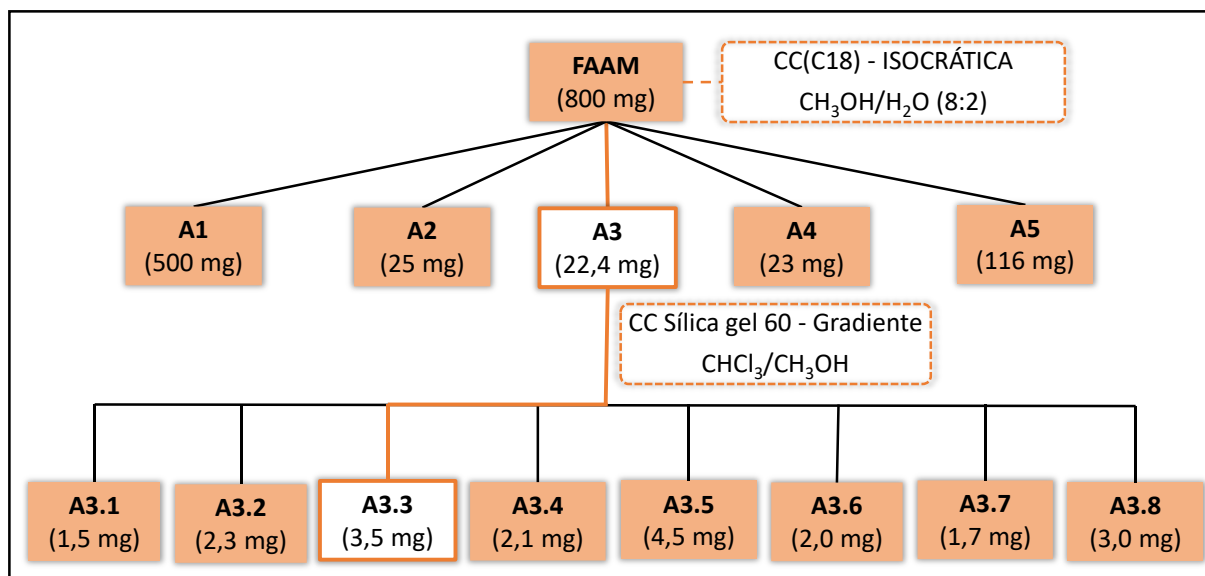


Figura 13 – Esquema do procedimento utilizado para purificação da substância **A3.3**.

4.8 Fracionamento do extrato acetato de etila (F3)

O extrato acetato de etila (950 mg) foi fracionado em CC com fase estacionária Sephadex® L-20 ($h \times \phi = 30 \times 3$ cm), eluída em sistema isocrático de CH_3OH (100%). Foram coletadas 20 frações com 40 mL cada. Após a secagem, as frações resultantes foram agrupadas segundo a similaridade de seus perfis químicos (R_f s iguais) mediante a análise em CCDA. Na análise, o eluente utilizado foi $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ na proporção 9,5:5 e 9:1 (v/v). O perfil químico das placas foi monitorado com luz UV (254 e 365 nm) e reagente de Dragendorff. Após o agrupamento obteve-se 5 frações (Tabela 3).

Tabela 3 – Reunião do fracionamento cromatográfico da **FAAM**.

Grupos de frações	Frações	Massa (mg)
F3.1	1-3	280
F3.2	4 e 5	327
F3.3	6-8	150
F3.4	9-17	51,3
F3.5	18-29	5,8

A fração **F3.3** (150 mg) obtida da CC de Sephadex® LH-20 foi submetida ao refracionamento por meio de uma CC (C18) ($h \times \phi = 30 \times 4$ cm), eluída em sistema isocrático de $\text{MeOH}/\text{Água}$ (8:2). Foram coletadas 20 frações com 30 mL cada. Subsequentemente à secagem, as frações resultantes foram submetidas a um processo de agrupamento, com base na similaridade de seus perfis químicos (R_f s iguais) mediante a análise em CCDA. O

mesmo procedimento citado anteriormente, foi utilizado para a análise cromatográfica. Após o agrupamento obteve-se 4 frações (Tabela 4).

Tabela 4 – Reunião do fracionamento cromatográfico da **FAAM**.

Grupos de frações	Frações	Massa (mg)
F3.3A	1 - 6	56,8
F3.3B	7 - 10	54,6
F3.3C	8 - 15	10
F3.3D	16 - 20	15,2

A fração **F3.3B** foi novamente fracionada em CC de sílica gel ($\phi \times h = 1 \times 20$), eluída num sistema em gradiente de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, sendo coletadas 60 frações com 10 mL cada. Após à secagem, as frações resultantes foram agrupadas com base na similaridade de seus perfis químicos (R_{fs} iguais) mediante a análise em CCDA. A análise segue o mesmo procedimento citado do item 4.7. Após o agrupamento obteve-se 8 frações (Tabela 5).

As frações 13 a 20 resultam em um sólido na coloração amarelo, foram reunidas e codificada como **FB3**. Uma alíquota dessa amostra foi preparada com clorofórmio-D e acetona-D para análise por RMN.

Tabela 5 – Reunião do fracionamento cromatográfico da **F3.3B**.

Grupos de frações	Frações	Massa (mg)
FB1	1 - 4	1,5
FB2	5 - 12	2,0
FB3	13 - 20	34
FB4	21 - 25	1,1
FB5	26 e 27	1,5
FB6	28 - 34	2,3
FB7	35 - 50	1,2
FB8	51 - 60	4,0

A Figura 14 apresenta um esquema detalhado do processo de isolamento e purificação.

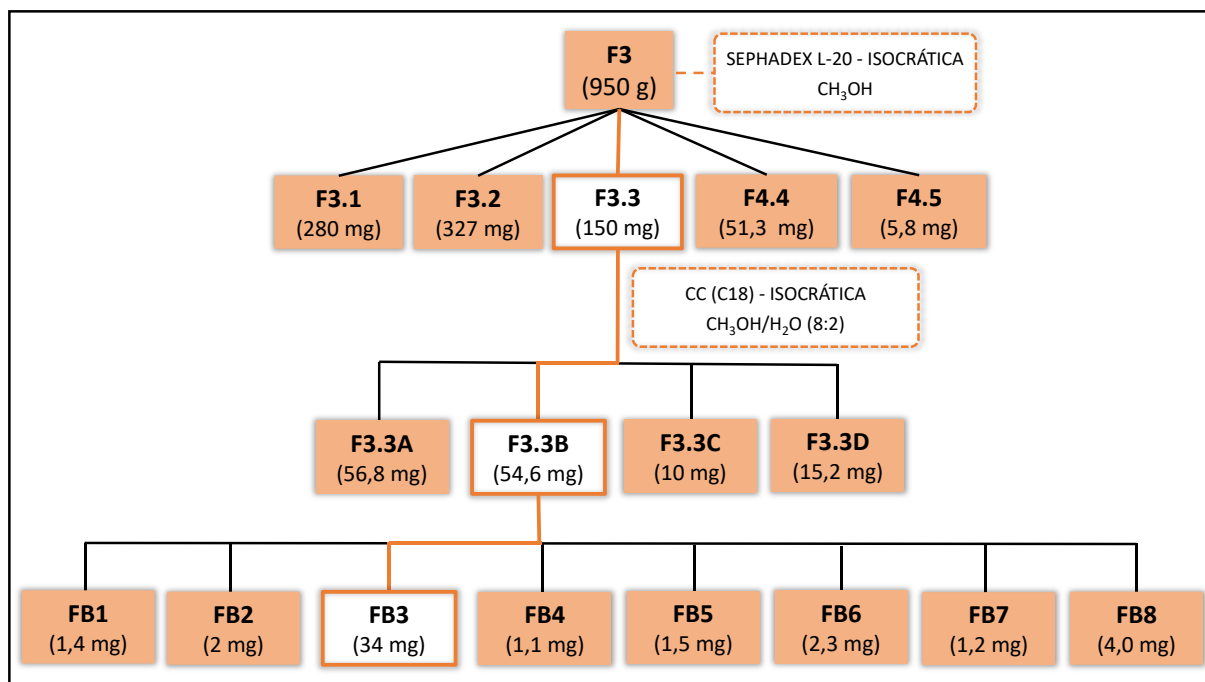


Figura 14 – Esquema do procedimento utilizado para purificação da substância **FB3**.

4.9 Testes biológicos

4.9.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para a avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana, foram utilizadas três cepas bacterianas sendo uma gram-positiva (+), a saber *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e duas cepas gram-negativas (-) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13899 e *Escherichia Coli* ATCC 11229, e uma cepa fúngica a *Candida albicans*. O teste foi realizado no Laboratório de pesquisa em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológica (ICB) da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, com a colaboração da professora Dra. Adriana Dantas Gonzaga de Freitas.

Utilizou-se o método de difusão em disco de ágar adaptado de Bauer *et al.*, (1966). O método consiste em adicionar um disco de papel embebido com a substância teste sobre a placa inoculada com o patógeno em estudo, em seguida mede-se o halo inibitório. O halo é uma zona clara formada ao redor do disco de papel, indicando a ação antimicrobiana dos extratos em estudo. Para isso, as placas de Petri foram previamente esterilizadas em autoclave, o meio de cultura vertido e deixado solidificar por 45 min. O meio utilizado foi o sintético Agar Mueller Hinton.

A suspensão do caldo de microrganismos foi inoculada uniformemente sobre

as placas com o auxílio de um swab estéril. Após a secagem do inóculo (3 a 5 min.), os discos de papel de filtro (5 mm) embebidos em 10 µL das oito diferentes concentrações (10 µg/mL a 250 µg/mL), triplicatas, dos extratos foram colocados, apertando suavemente, sobre o ágar com o auxílio de uma pinça estéril. Utilizou-se quatro diferentes concentrações dos extratos em cada placa. O controle negativo são os discos de papel umedecidos com DMSO e o controle positivo, com antibiótico tetraciclina (10 µg/mL). As placas foram mantidas sob refrigeração por 1 h, em seguida incubadas a 37 °C por 72 h.

Após a incubação, registrou-se as zonas de inibição, em milímetros, com o auxílio de um halômetro com luz refletida. Os dados foram analisados seguindo os padrões de desempenho para testes de suscetibilidade antimicrobiana, documento padronizador para esse teste, produzido pelo Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (CLSI, 2021).

4.9.2 Avaliação da atividade inseticida frente *A. Aegypti*

4.9.2.1 Atividade larvicida

Para o teste de toxicidade em larvas de *A. aegypti*, foi aplicado o protocolo da OMS com modificações (WHO, 2005). O teste foi realizado no Laboratório de Vetores de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), com a colaboração da professora Dra. Ana Cristina da Silva Pinto.

O teste de *screening* foi realizado na concentração de 400 µg/mL em triplicata com grupos de 10 larvas do mosquito vetor *A. aegypti* (selecionadas no terceiro estágio) em 20 mL de água destilada em temperatura de 24,7 °C e umidade de 80%. As amostras foram solubilizadas em DMSO. A atividade larvicida foi determinada pela percentagem de mortalidade observada após 24 h e 48 h de incubação. Os valores de CL₅₀ foram calculados a partir das diluições e análise de regressão log-probit (método estatístico usado para determinar a concentração letal (CL) de um larvicida). A validade do teste baseia-se na mortalidade do controle e na homogeneidade das larvas. Como controle negativo do teste utiliza-se DMSO e como controle positivo um produto larvicida padrão (espinosade). As substâncias que mataram acima de 40% das larvas, foram diluídas para realização da CL₅₀ e CL₉₀.

4.9.2.2 Atividade adulticida

A avaliação do potencial adulticida de substâncias foram realizadas sob condições controladas de temperatura 26 ± 2 °C e umidade de $80\% \pm 2$ °C. O bioensaio adulticida foi realizado por meio do teste de prova biológica de garrafa, seguindo a metodologia descrita por Brogdon e Chan (2010).

Na realização do teste foram utilizadas garrafas do tipo Schott com capacidade de 250 mL, previamente lavadas e autoclavadas por 40 minutos. Após este procedimento, as garrafas foram identificadas e etiquetadas conforme cada concentração a ser avaliada, nas quais foram testadas quatro concentrações de 1000, 500, 250 e 125 µg/mL. As concentrações foram preparadas a partir de 1 mg/mL da amostra solubilizada em acetona, sendo posteriormente utilizadas para impregnar a parede das garrafas, que foram deixadas deitadas e cobertas com papel toalha, por 24 h para evaporação do solvente. Cada concentração foi testada em triplicata e, em cada garrafa, foram introduzidas 15 fêmeas dos mosquitos adultos de *A. aegypti*, alimentadas 12 h antes do teste. Em cada bioensaio foram preparados dois grupos controles: um negativo e um positivo. No grupo controle negativo (em triplicata) foram impregnadas com 1 mL de acetona. O controle positivo foi utilizado o inseticida Cielo-ULV®, preconizado para as atividades de controle químico pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2023), nas concentrações de 31; 7,8; 1,9; 0,95; e 0,47 ng/mL. As leituras foram realizadas de 15 em 15 minutos até completar 90 minutos, sendo registrado o número de indivíduos mortos e sob o efeito *Knockdown* (imobilidade de movimentos), em cada concentração.

Os dados da mortalidade para adultos e larvas obtidos nos bioensaios de dose foram utilizados para determinação das concentrações letais medianas (CL₅₀ e CL₉₀), submetidos à análise Probit, com $p \leq 0,05$ (Finney, 1971), considerando o nível de significância de 95%, utilizando o programa estatístico Polo Plus 1.0 (LeOra Software, CA, EUA) por meio de regressão linear dose-resposta.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Perfil químico da fração alcaloídica do caule de *A. montana* por espectrometria de massa

Na análise do espectro de íons totais da fração alcaloídica do caule de *A. montana*, observou-se diversos picos referentes às substâncias protonadas com m/z par, indicando a presença de possíveis alcaloides, dos quais os mais intensos, foram m/z 330 ($[M+H]^+$) e m/z 266 ($[M+H]^+$) (Figura 15). Estes foram submetidos ao processo de fragmentação sequencial (EM/EM).

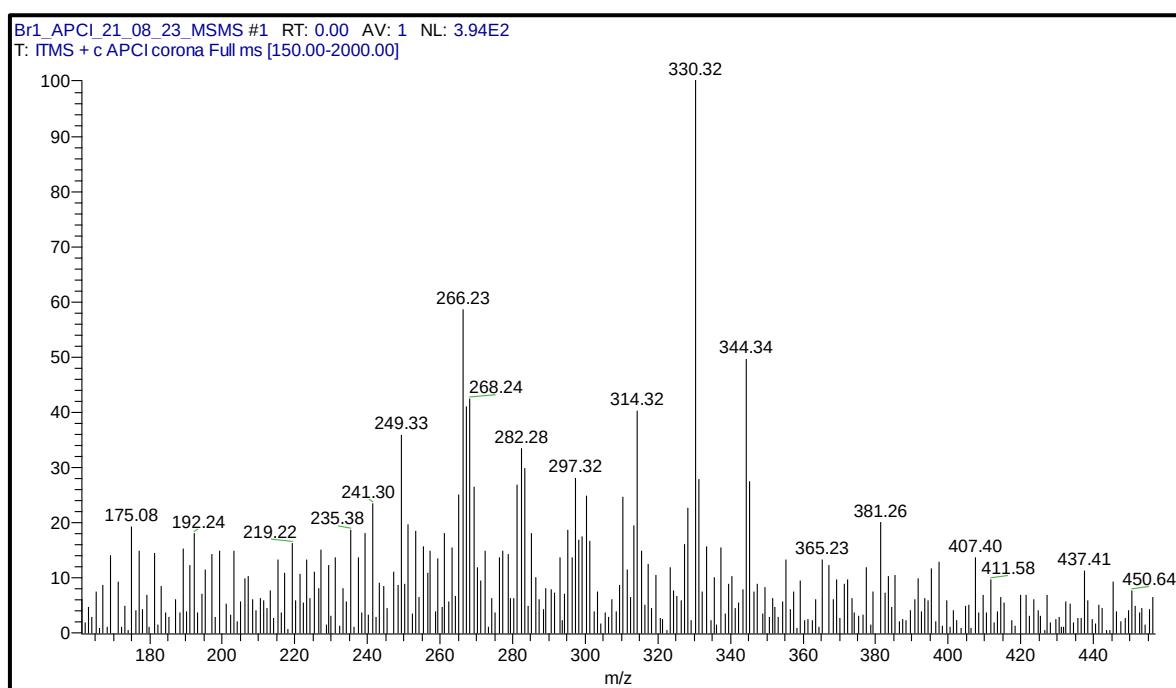


Figura 15 – Espectro de massas IT-MS da fração alcaloídica do caule de *A. montana*.

Os íons moleculares m/z 266 ($[M+H]^+$), m/z 280 ($[M+H]^+$), m/z 282 ($[M+H]^+$) e m/z 296 ($[M+H]^+$), apresentaram os fragmentos m/z 249, m/z 251, m/z 265, m/z 219 e m/z 191 quando analisado o espectro EM/EM. Estes fragmentos são coerentes com alcaloides de esqueleto aporfínico (Stévigny *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2020). Sendo a perda neutra de 17 Da (NH_3) e 31 Da (NH_2CH_3) a mais comum e essencial para determinar se o nitrogênio do grupo amina está ligado a um hidrogênio ou a um grupo metila. Esta ocorre pela clivagem heterolítica inicial do grupo amino mediante abertura do anel seguida da eliminação, o que possibilita a formação de um carbocátion primário estabilizado via conjugação π (Carnevale neto *et al.*, 2020).

A estabilização do carbocátion induz as perdas de 30 Da (CH_2O) ou 32 Da (CH_3OH) e a formação de um anel epóxi, evidenciando a presença/ausência da ponte metilenodioxí, a posterior perda de 28 Da (CO) confirmam tal afirmação. Juntando a isso, a perda de 15 Da ($\bullet\text{CH}_3$) ou 31 Da ($\bullet\text{OCH}_3$), evidenciam a presença do esqueleto aporfínico substituído. A Figura 14 traz a proposta de fragmentação detalhada com as principais perdas, sendo possível anotar os alcaloides aporfínicos *N*-metil assimilobina (**104**), nuciferina (**105**) anonaína (**106**) e seu derivado *N*-metil anonaina (**107**).

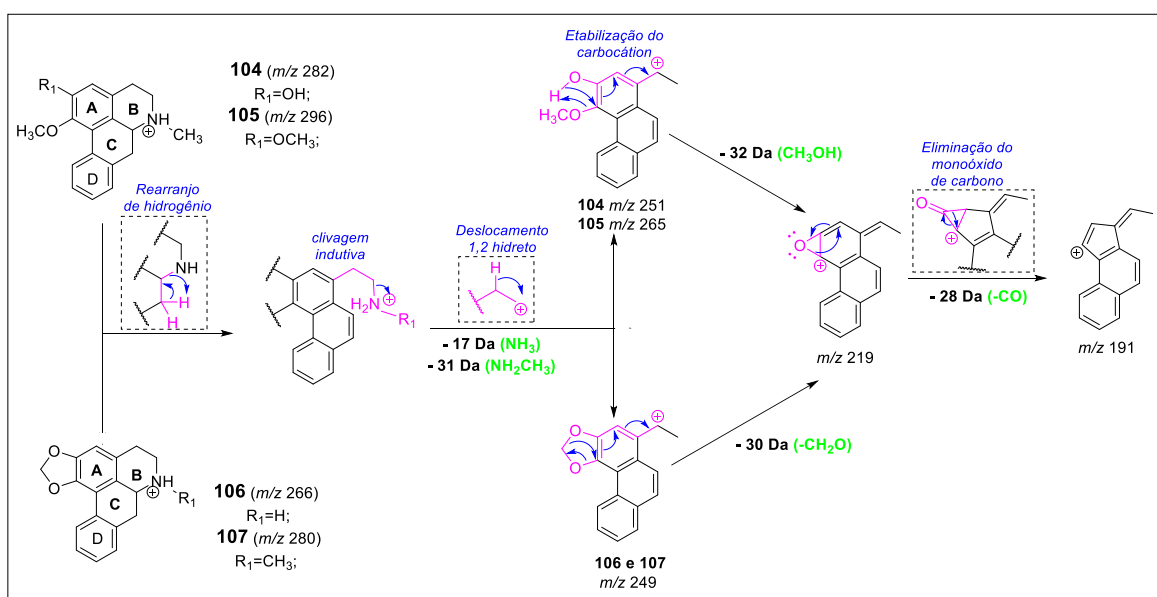


Figura 16 – Proposta de fragmentação para os íons m/z 266, 280 e 282 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). Fonte: Adaptado de Lima *et al.*, 2020.

Nos íons molecular m/z 286 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 300 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) e 330 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) a perda neutra de 17 Da (NH_3) e 31 Da (NH_2CH_3), é possível devido o rearranjo de hidrogênio com a formação de um anel de 5 membros e um carbocátion secundário no anel B indicando um esqueleto isoquinolínico. A presença do íon m/z 192 e 137 sugere que o anel A possui um grupo metoxila e hidroxila (OCH_3 e OH) adjacentes. A presença desses grupos oxigenados no anel C possibilitam a deslocalização dos elétrons induzindo a eliminação da fração tetradihidroisoquinolino e formação do íon m/z 107. Essas fragmentações são coerentes com os alcaloides de esqueleto benzilisoquinolino. A formação dos íons m/z 299 e m/z 269 corroboram com essa premissa. A Figura 14 detalha os arranjos e fragmentações estruturais, e possibilita sugerir a presença dos alcaloides coclaurina m/z 286 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) (**108**), *N*-metil coclaurina m/z 300 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) (**109**) e reticulina m/z 330 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) (**110**).

(Schmidt *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2020).

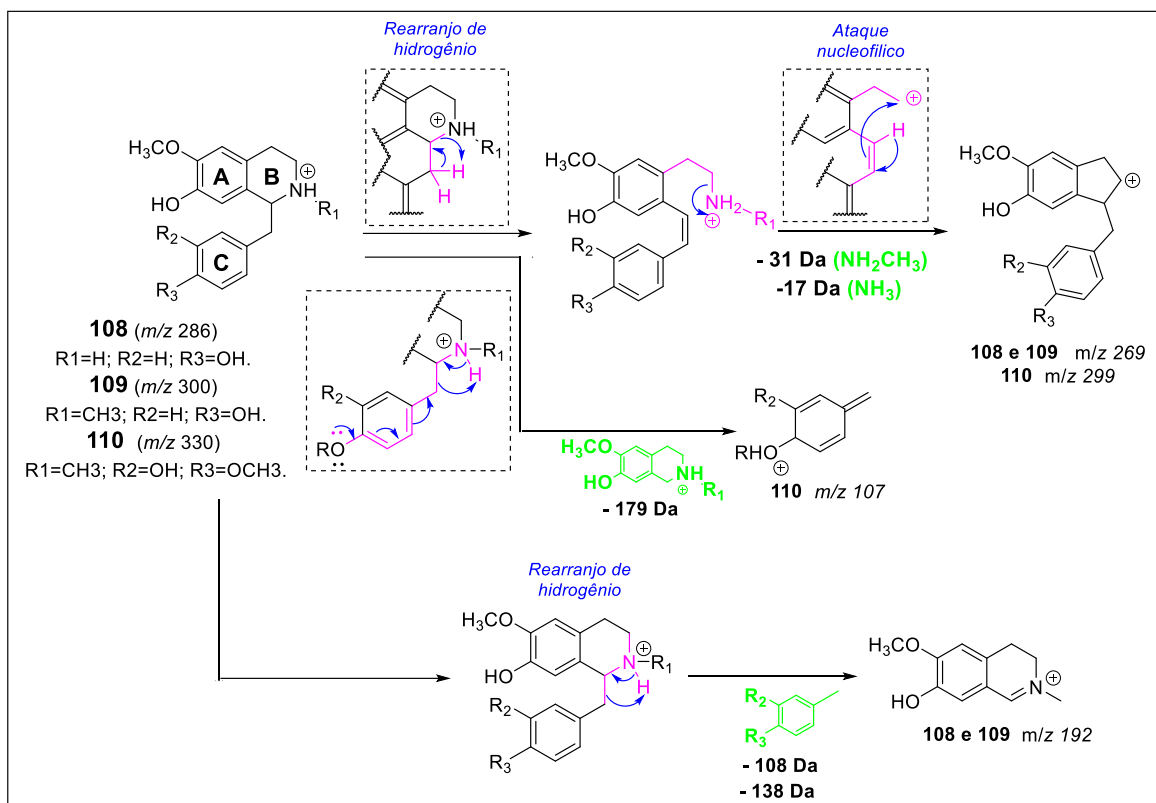


Figura 17 – Proposta de fragmentação para os íons *m/z* 330 ([M+H]⁺) e *m/z* 286 ([M+H]⁺) **Fonte:** Adaptado de Lima *et al.*, 2020.

Além destes analisou-se as características de fragmentações nos íons *m/z* 276 ([M+H]⁺), *m/z* 328 ([M+H]⁺) e *m/z* 342 ([M+H]⁺) que foram associados aos alcaloides liriodenina (**111**), stefalidina (**112**) e magnoflorina (**113**) respectivamente, sendo os dois últimos ainda não descritos para essa espécie.

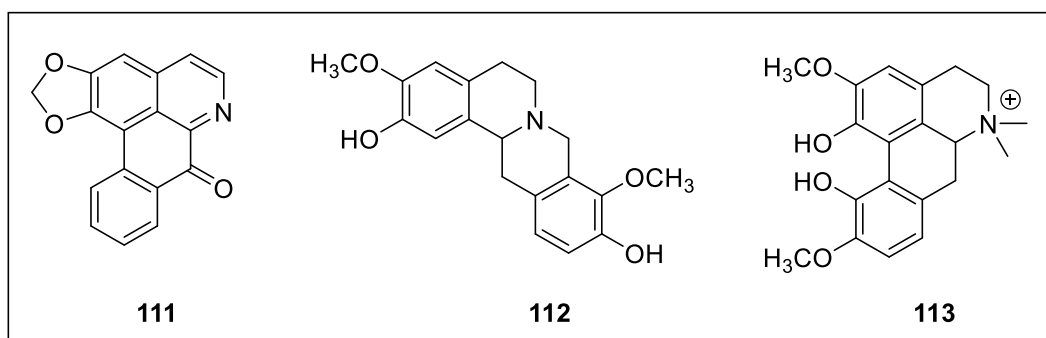


Figura 18 – Alcaloides anotados da fração alcaloídica de *A. montana*.

5.2 Elucidação estrutural do da substância denominada A3.3.

A substância **A3.3** apresentou-se como um sólido amarelo em forma de agulhas, testando positivo frente ao reagente Dragendorff.

Na análise do espectro de RMN ^1H observou-se a presença de sete sinais aromáticos com integração para um hidrogênio cada. O par de dubletos em δ 8,81 ($J = 5,2$ Hz) e 8,01 ($J = 5,2$ Hz), foram atribuídos a H-5 e H-4, respectivamente, sugerindo hidrogênios vizinhos coerente com um sistema piridínico (Figura 19).

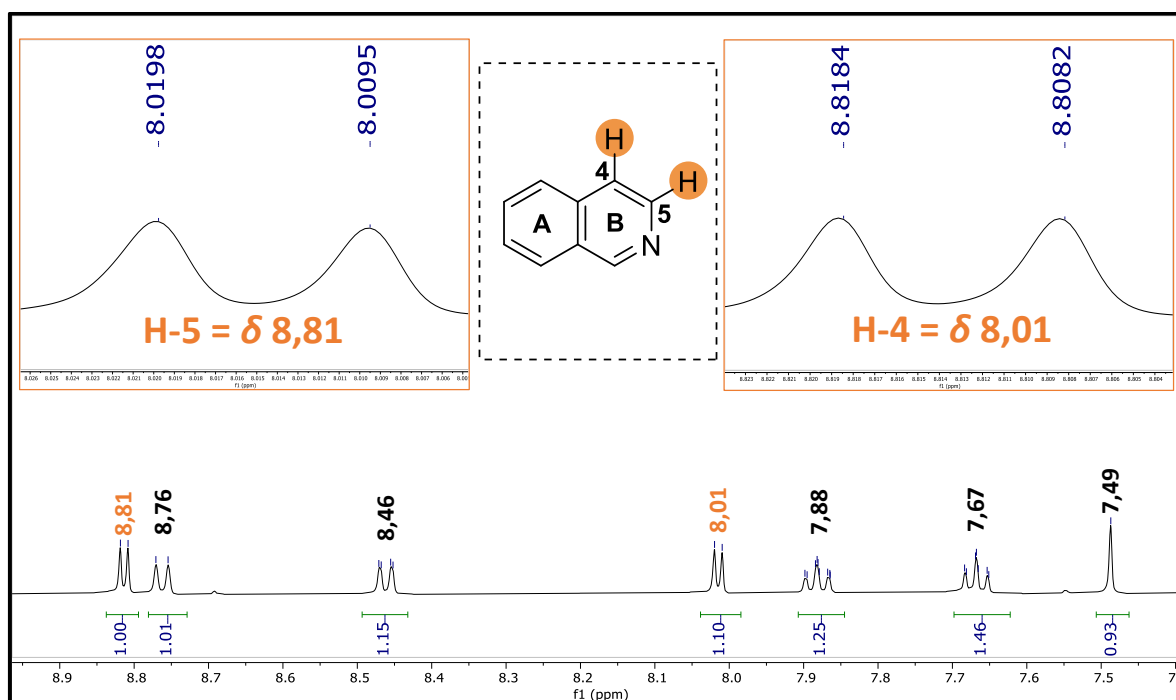


Figura 19 – Ampliação do espectro de ^1H (500,13 MHz) de 8,9 – 7,4 ppm da substância **A3.3**.

Outros quatro sinais em δ 8,76 (d , $J = 8,2$ Hz), δ 8,46 (dd , $J = 7,9$ e $1,6$ Hz), δ 7,88 (ddd , $J = 8,2$, $7,2$ e $1,6$ Hz) e δ 7,67 (ddd , $J = 7,9$, $7,3$ e $1,6$ Hz), foram atribuídos H-11, H-8, H-10 e H-9, respectivamente, com deslocamentos semelhantes a prótons de um anel D, de esqueleto aporfínico (Figura 20). As atribuições de H-4 e H-5 juntamente as correlações do espectro de Cosy (Tabela 6 – pág. 66) e dados da literatura (ORTIZ *et al.*, 2007; Costa, 2009; Costa *et al.*, 2011a) sustentam essa suposição.

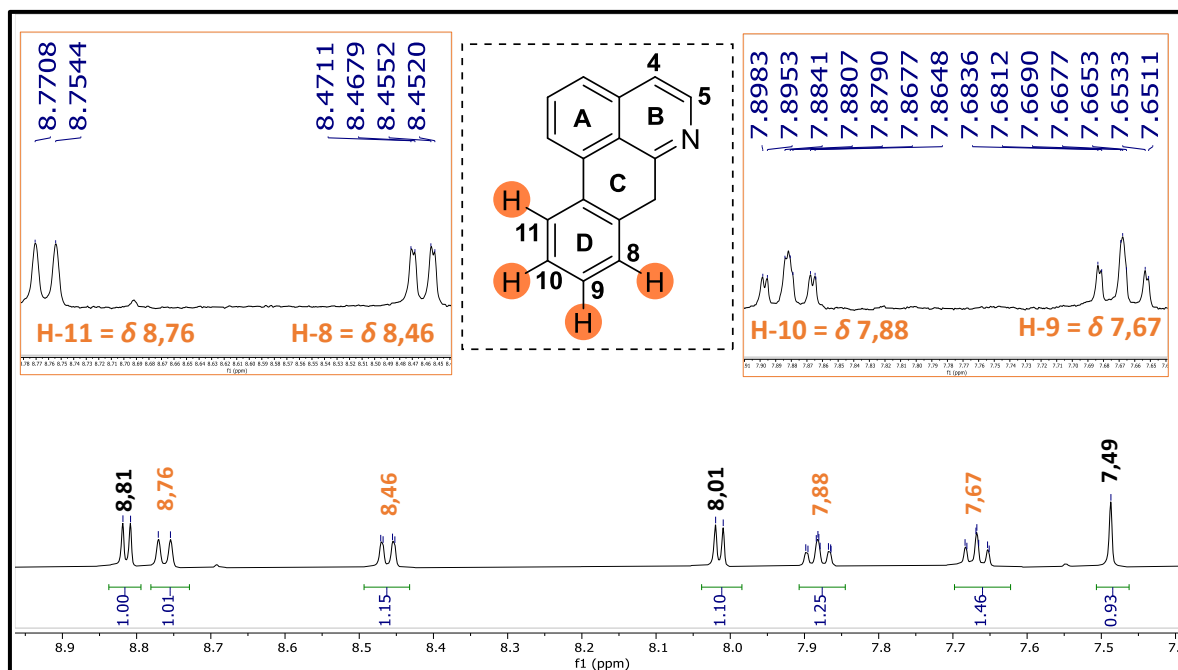


Figura 20 – Ampliação do espectro de ^1H (500,13 MHz) 8,9 – 7,4 da substância **A3.3**.

Um singlete em δ 6,56 (2H) correlacionado com o sinal do carbono em δ 103,40 no mapa de contorno HSQC (Tabela 6) sugere uma substituição, em C-1 e C-2, de um grupo metilenodióxi dissubstituído no anel A de um esqueleto isoquinolino. Outro singlete em δ 7,49 pode ser atribuído ao H-3 do mesmo anel (Figura 21), dando suporte a premissa anterior da presença do esqueleto aporfínico (ORTIZ *et al.*, 2007; Costa, 2009; Costa *et al.*, 2011a).

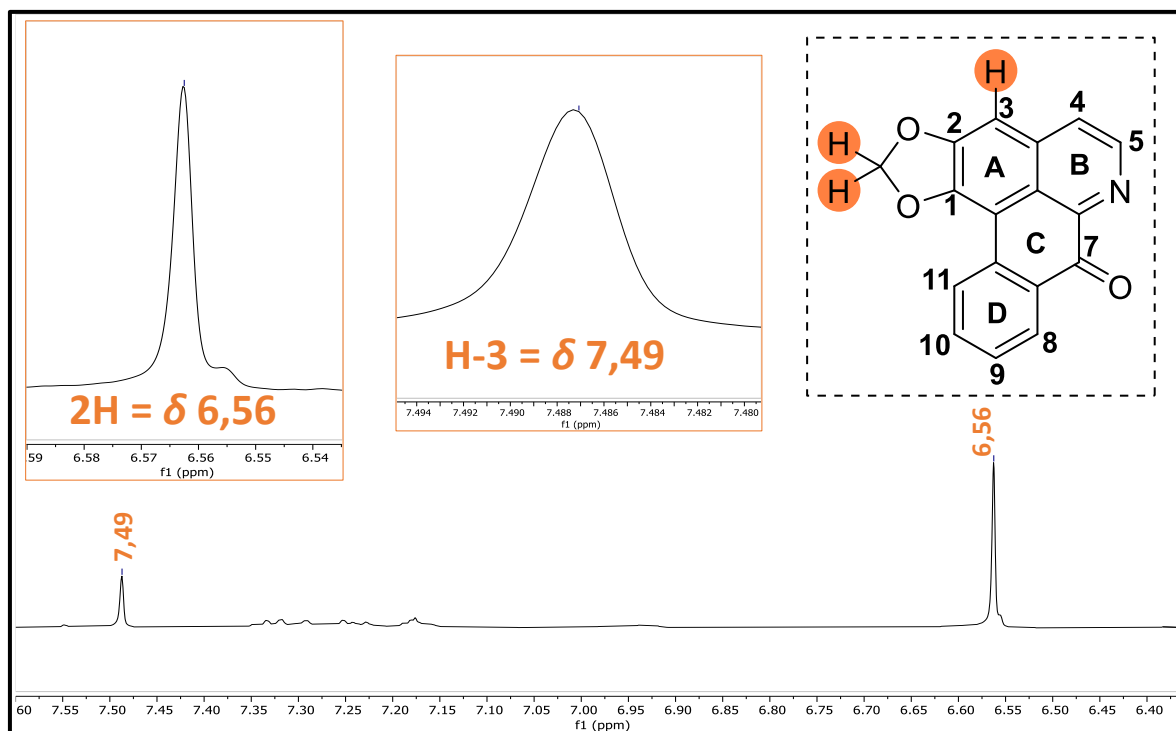


Figura 21 – Ampliação do espectro de ^1H (500,13 MHz) d (f1 7,60 – 6,40 ppm) substância **A3.3**.

No mapa de contorno HMBC (Figura 22) a posição do grupo metilenodióxi, pode ser confirmado com a correlação do seu sinal (δ 6,56) com os sinais dos carbonos em δ 147,90 e δ 151,60 a ^2J . A correlação do sinal atribuído ao H-3 (δ 7,49) com esses mesmos carbonos a ^3J (C-1) e ^2J (C-2), respectivamente, permitem a determinação correta da substituição pois confirma a posição dos carbonos (Figura 23).

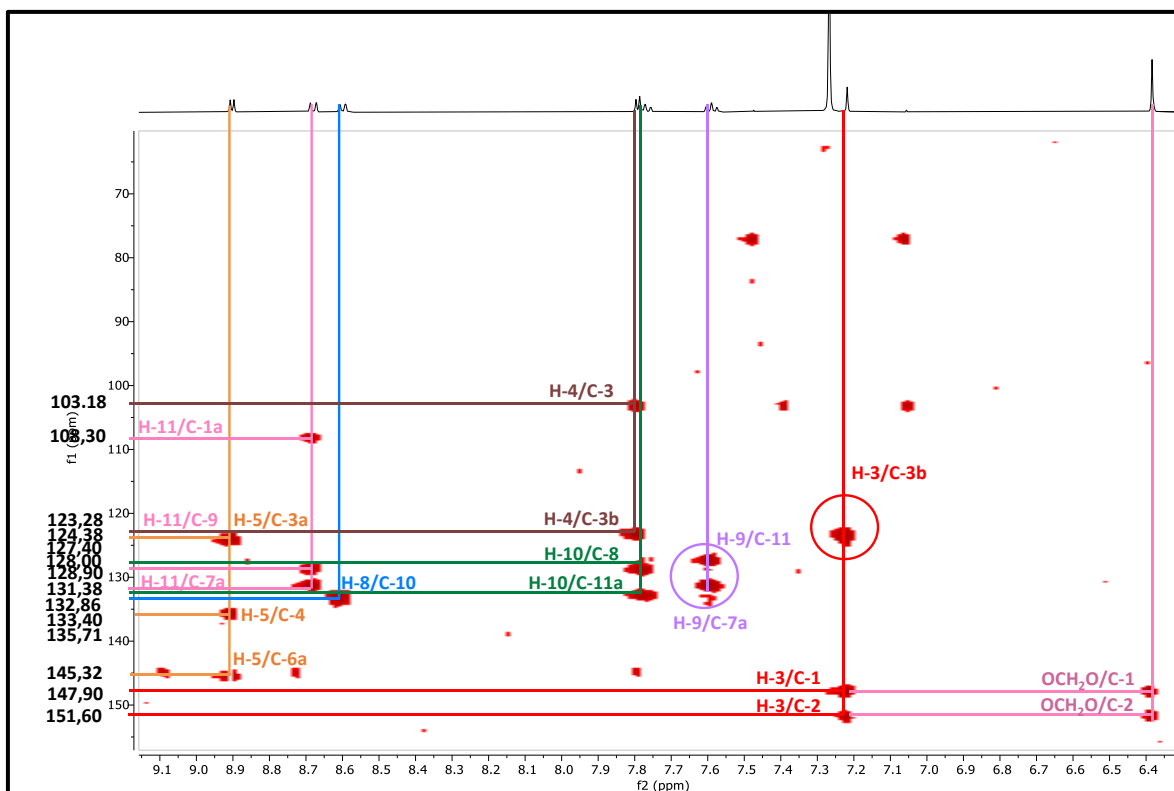


Figura 22 – Ampliação do mapa de contorno HMBC (F2 9,1 - 6,6 ppm) da substância **A3.3**.

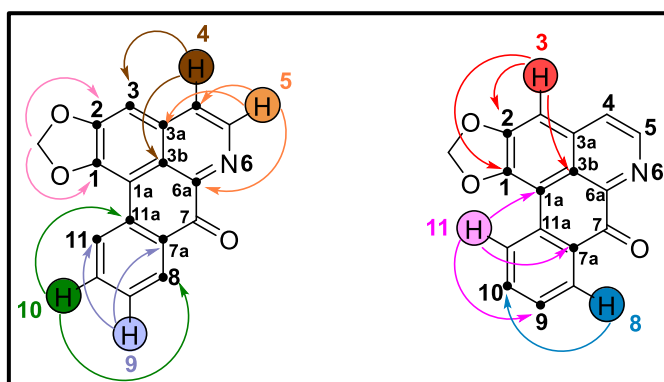


Figura 23 – Principais correlações do mapa de contorno HMBC (F2 6,74 - 6,30 ppm)

A análise do espectro EM/EM do composto (modo positivo), por injeção direta, apresentou um pico com m/z 276 ($[M+H]^+$), referente ao íon molecular protonado. Com a observação da perda de 28 Da e a formação do pico base em m/z 248, deduz a presença do grupo carbonila atribuída a posição 7 no anel C (Figura 24). Os íons m/z 218 e m/z 190 validam que estas fragmentações são coerentes com alcaloide de esqueleto oxoaporfínico. A presença do esqueleto apofínico foi ratificado com a perda neutra de 17 Da (NH_3). E o íon m/z 218 formado pela perda de 30 Da, confirma a presença da ponte metilindioxi no anel

A (Carnevale neto *et al.*, 2020).

A Figura 23 detalha os arranjos e fragmentações estruturais seguindo padrões já publicados na literatura (Stévigny *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2020; Carnevale neto *et al.*, 2020).

A fórmula molecular foi deduzida com os dados de RMN, confirmada a partir do espectro de massas e dados da literatura, sendo $C_{17}H_9NO_3$ (calculado 275,0582). Tais evidências químicas, permitiram elucidar o composto **A3.3** como sendo o alcaloide de esqueleto oxoaporfínico conhecido como liriodenina (**111**), isolado pela primeira vez por Taylor (1961). De acordo com Costa (2009) é um alcaloide considerado como marcador quimiotaxonômico do gênero *Annona*.

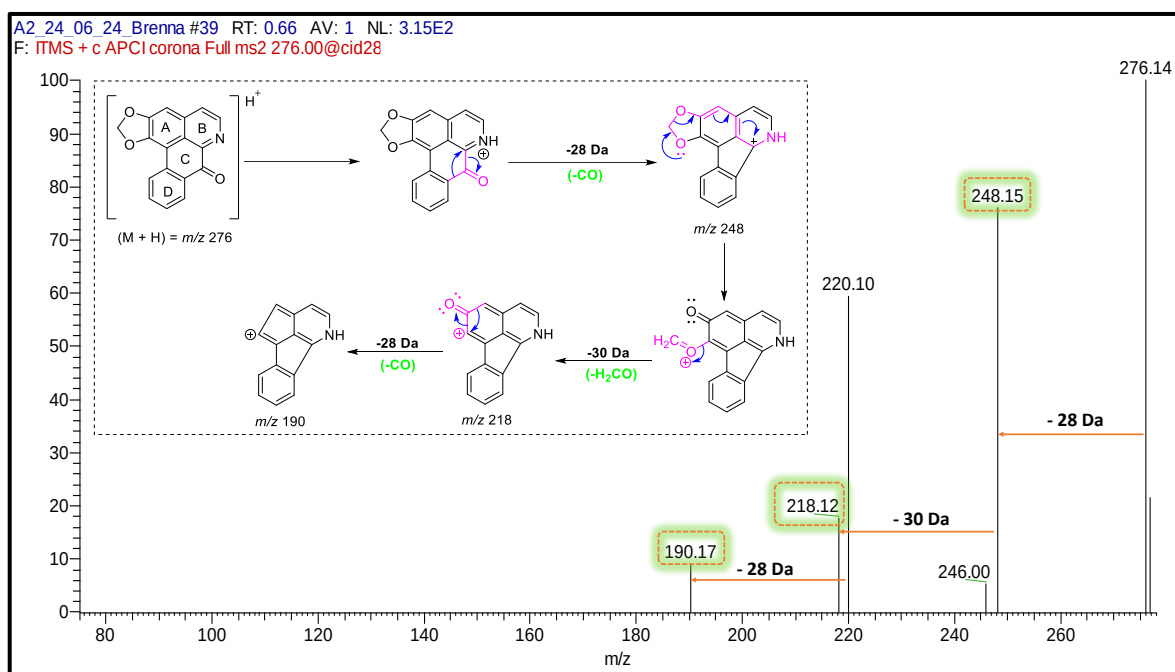


Figura 24 – Proposta de fragmentação da substância liriodenina.

Tabela 6 – Dados espectroscópicos de RMN (^1H 500,13 MHz, ^{13}C 125,76 MHz)^a para a substância A3.3.

Posição	(δ), ^{13}C ^b	(δ), ^{13}C ^c	δ ^1H (<i>mult.</i> , <i>J</i> em Hz)	δ ^1H (<i>mult.</i> , <i>J</i> em Hz) ^c	COSY	δ HMBC ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$) ^d
1	147,90, C	147,92				
1a	108,30, C	107,98				
2	151,60, C	151,65				
3	103,18, CH	103,20	7,49 (1H, s)	7,16 (1H, s)		147,90 (1); 151,60 (2); 123,28 (3b)
3a	135,71, C	135,73				
3b	123,28, C	123,16				
4	124,38, CH	124,33	8,01(1H , <i>d</i> , 5,2)	7,75 (1H, <i>d</i> , 5,2)	8,01	103,18 (3); 123,28 (3b);
5	144,6, CH	144,74	8,81 (1H, <i>d</i> , 5,2)	8,87 (1H, <i>d</i> , 5,2)	8,81	124,38 (4); 135,71 (3a); 145,32 (6a);
6a	145,33 C	145,31				
7	182,51, C ^c	182,51				
7a	131,38, C	131,25				
8	128,00, CH	128,81	8,46 (1H, <i>dd</i> , 7,9; 1,2)	8,57 (1H, <i>ddd</i> , 7,9, 1,4 e 0,5)	7,67	133,40 (10)
9	128,90, CH	128,56	7,67 (1H, <i>ddd</i> , 7,9; 7,3; 1,0)	7,56 (1H, <i>ddd</i> , 7,9, 7,4 e 1,0)	8,46	131,38 (7a); 127,40 (11)
10	133,40, CH	133,80	7,88 (1H, <i>ddd</i> , 8,2; 7,2; 1,2)	7,73 (1H, <i>ddd</i> , 8,1, 7,4 e 1,4)	8,76	128,00 (8); 132,86 (11a)
11	127,40, CH	127,32	8,76 (1H, <i>d</i> , 8,2)	8,61 (1H, <i>ddd</i> , 8,1, 1,0 e 0,5)	7,88	108,30 (1a); 131,38 (7a); 128,90 (9)
11a	132,86, C	132,87				
1-OCH₂O	103,40, CH	102,44	6,56 (2H, s)	6,37 (2H, s)		147,90(1); 151,60 (2)

Legenda: ^a Experimento utilizando o TMS como padrão interno. ^b dados obtidos dos espectros em 2D. ^c dados obtidos por Costa, (2009). ^d dados obtidos em CDCl₃-D.

5.3 Elucidação estrutural da substância denominada FB3

A substância **FB3** é um sólido amorfo de coloração amarelo, que testou positivo frente ao reagente dragendorff na análise em CCDA.

O espectro de ^1H , em Acetona-D (125,76 MHz) revelou a presença de oito sinais aromáticos, com integração para um hidrogênio cada, sendo quatro em δ 8,29 (*ddd*, J = 7,9, 1,3 e 0,7 Hz), δ 7,71 (*ddd*, J = 8,2, 1,8 e 0,9 Hz), δ 7,59 (*ddd*, J = 8,2, 7,0 e 1,2 Hz) e δ 7,30 (*ddd*, J = 7,9, 7,2 e 1,1 Hz), atribuídos como adjacentes em um grupo indol, respectivamente, a H-5, H-8, H-7 e H-6, (Figura 25).

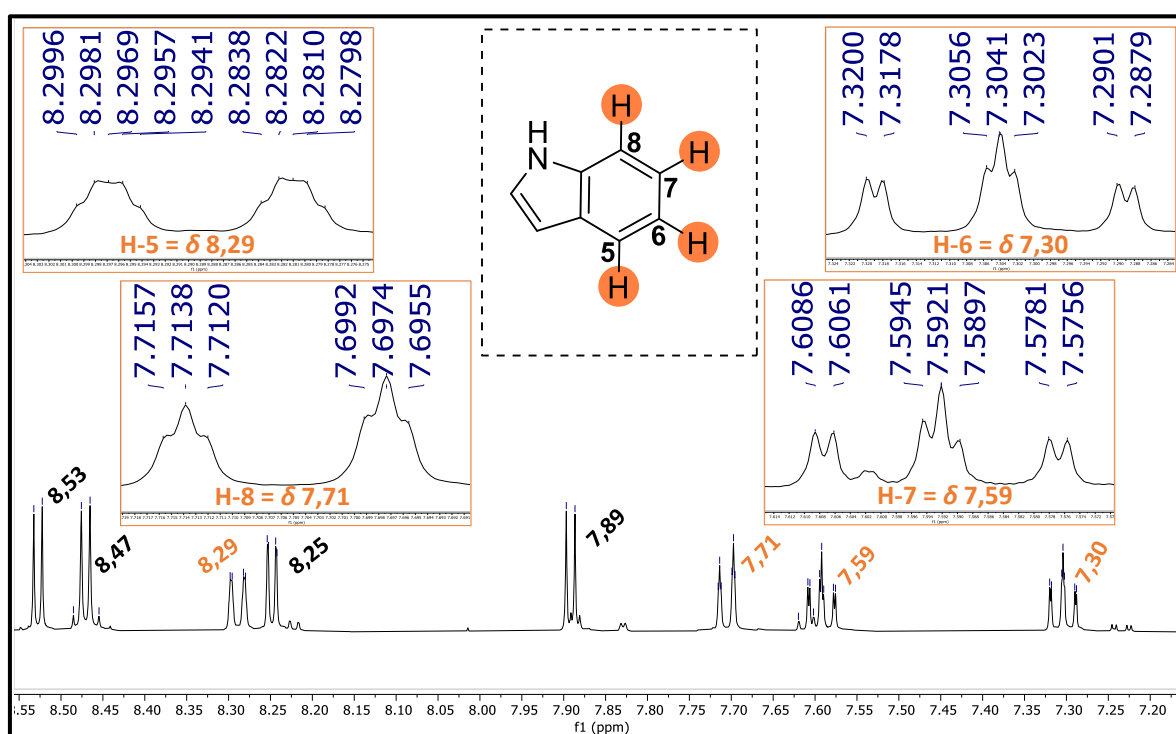


Figura 25 – Ampliação do espectro de ^1H (500,13 MHz) de 8,5 – 7,2 ppm da substância **FB3**.

A presença de 4 sinais carbono quaternário, no espectro de ^{13}C (Figura 27), em δ 142,0, δ 135,9, δ 131,4 e δ 121,6 coerentes as posições 1a, 4a, 5a e 8a, e o singlete de hidrogênio intercambiável em δ 11,79 sustentam a premissa anterior da presença do grupo indol (Figura 25). Mas, dois sinais de hidrogênios em δ 8,53 (*d*, J = 5,05 Hz), δ 8,25 (*dd*, J = 5,05 e 0,8 Hz), foram atribuídos a H-3 e H-4, respectivamente, sendo confirmados pelo experimento de COSY (Tabela 7), compondo um grupo harman (Figura 26).

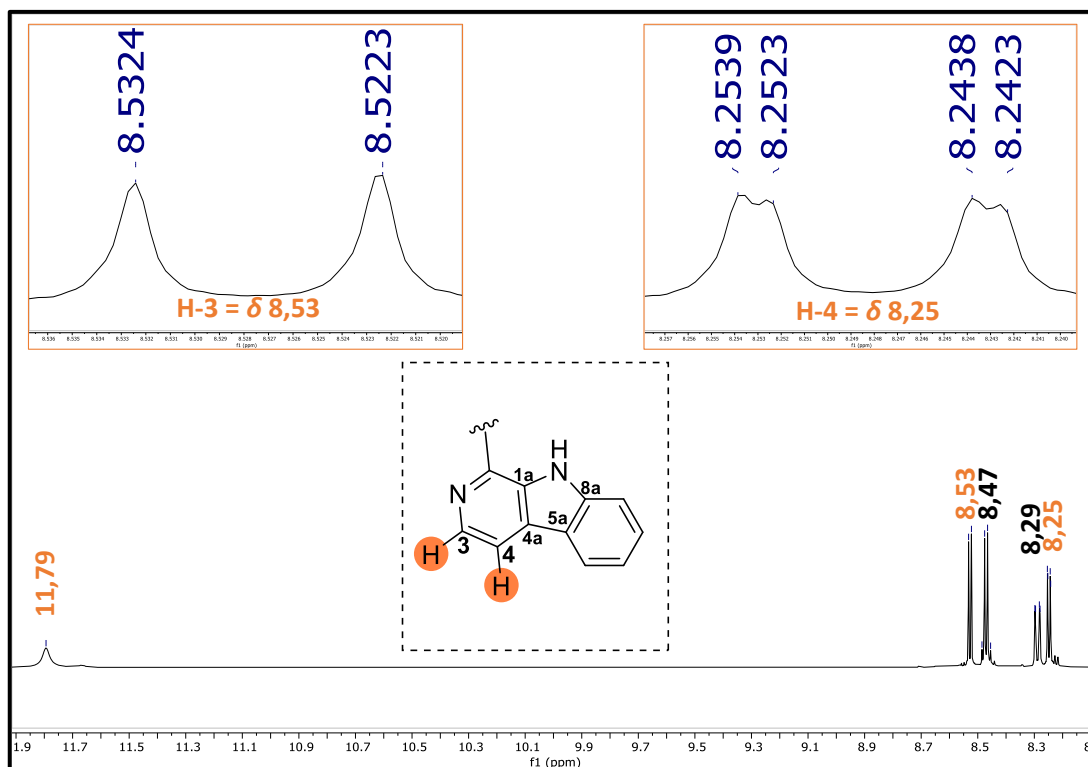


Figura 26 – Ampliação do espectro de ^1H (500,13 MHz) de 11,9 – 8,2 ppm da substância **FB3**.

Outros dois pares de sinais aromáticos em δ 8,47 (d , $J = 5,2$ Hz) e δ 7,89 (d , $J = 5,2$ Hz), conferidos aos H-6' e H-5', respectivamente (Figura 27) de uma unidade 2-aminopirimidina.

As evidências espectrométricas (Tabela 7) sugerem a conexão desta unidade harmina através do C-1 (δ 137,24) com C-4' (δ 166,53) (Figura 27) do grupo 2-aminopirimidina. O mapa de contorno HMBC (Figuras 29 e 30), traz essas evidências, pois é possível observar o sinal do H-5' (δ 7,89) correlacionando a 3J com o sinal de carbono em δ 137,24 atribuído a C-1, como também o H-6' (δ 8,47) a 2J com o sinal em δ 107,43 (C-5') e a 3J com o δ 166,53 atribuído a C-4' (Figura 29 e 30). A correlação de H-5' e H-6' também pode ser vista no mapa COSY (Tabela 7).

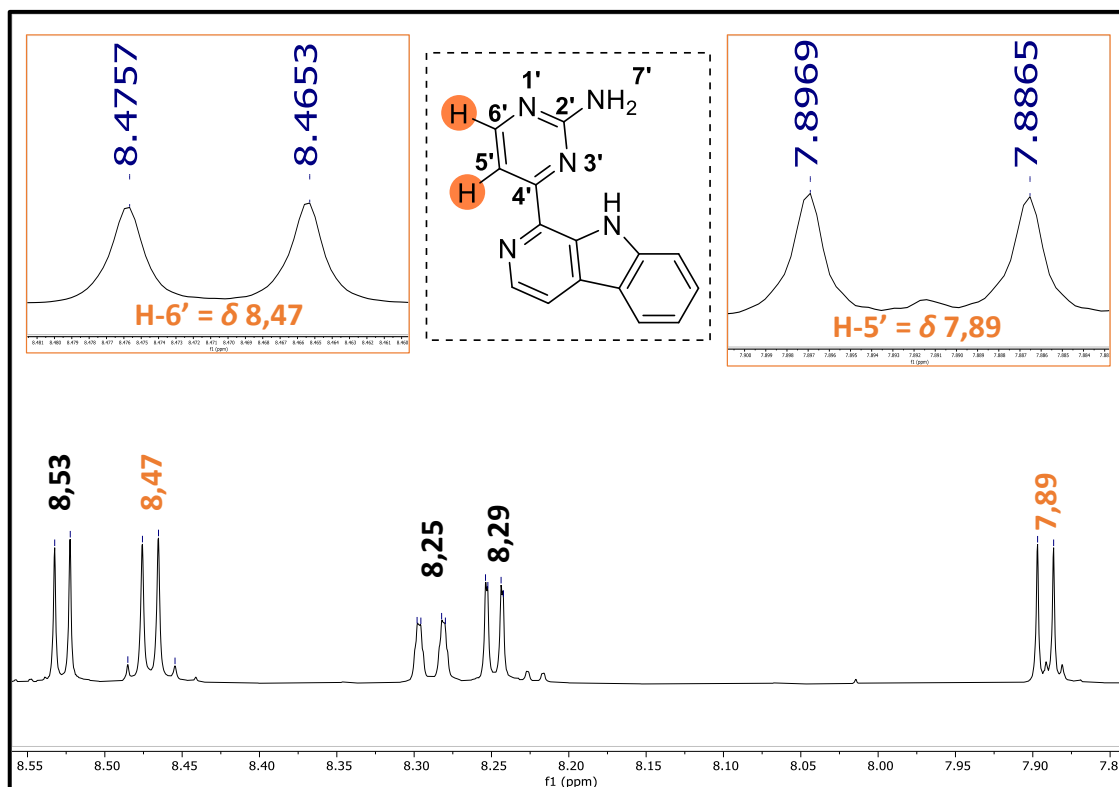


Figura 27 – Ampliação do espectro de ^1H (500,13 MHz) de 8,55 – 7,85 ppm da substância **FB3**.

A análise do mapa de contorno HMBC (Figuras 29 e 30), e comparações com os dados da literatura, permitiu a atribuição dos sinais sem ambiguidade. Pois, essas atribuições são bem consolidadas no trabalho publicado por Costa e colaboradores (2008).

O singlete integrando para 2H em δ 5,26 (Figura 26) pode ser observado apenas na análise feita utilizando como solvente a $\text{CDCl}_3\text{-D}$, sendo atribuído a posição 7'.

Neste caso, dois solventes foram utilizados com o objetivo de comparação, tendo em vista que, evidências científicas sugerem que o uso de $\text{CDCl}_3\text{-D}$ permite a supressão de sinais de H, fato não observado no experimento feito com Acetona-D (Costa *et al.*, 2008).

Além da quantidade de sinais de ^{13}C , a ausência de sinais de um carbono carbonílico, dois singletos em δ 2,30 e δ 12,80 e um singlete integrando para 3H, descartam a possibilidade do composto analisado ser um dos alcaloides derivados *N*-acetil-annomontina (**72**), metoxi-annomontina (**87**), isolados dessa espécie (Leboeuf *et al.*, 1982c).

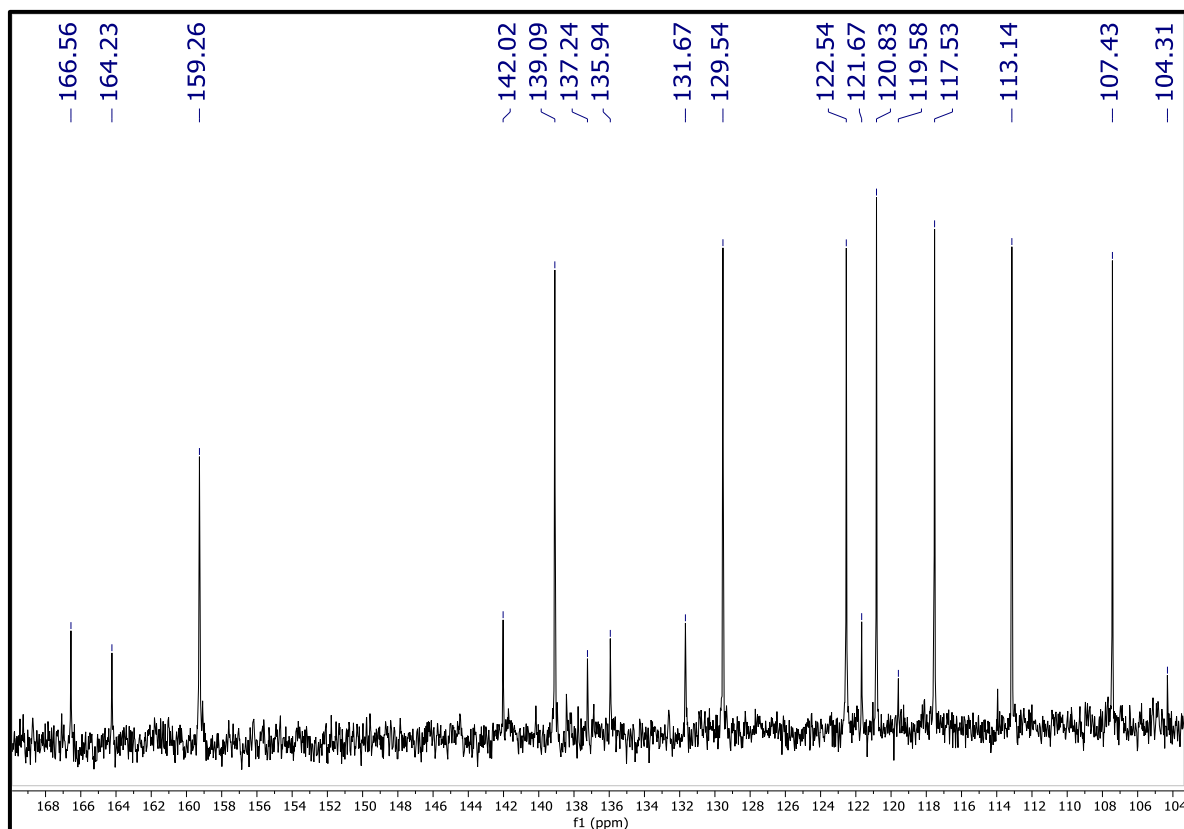


Figura 28 – Ampliação do espectro de ^{13}C (125,76 MHz) da substância FB3.

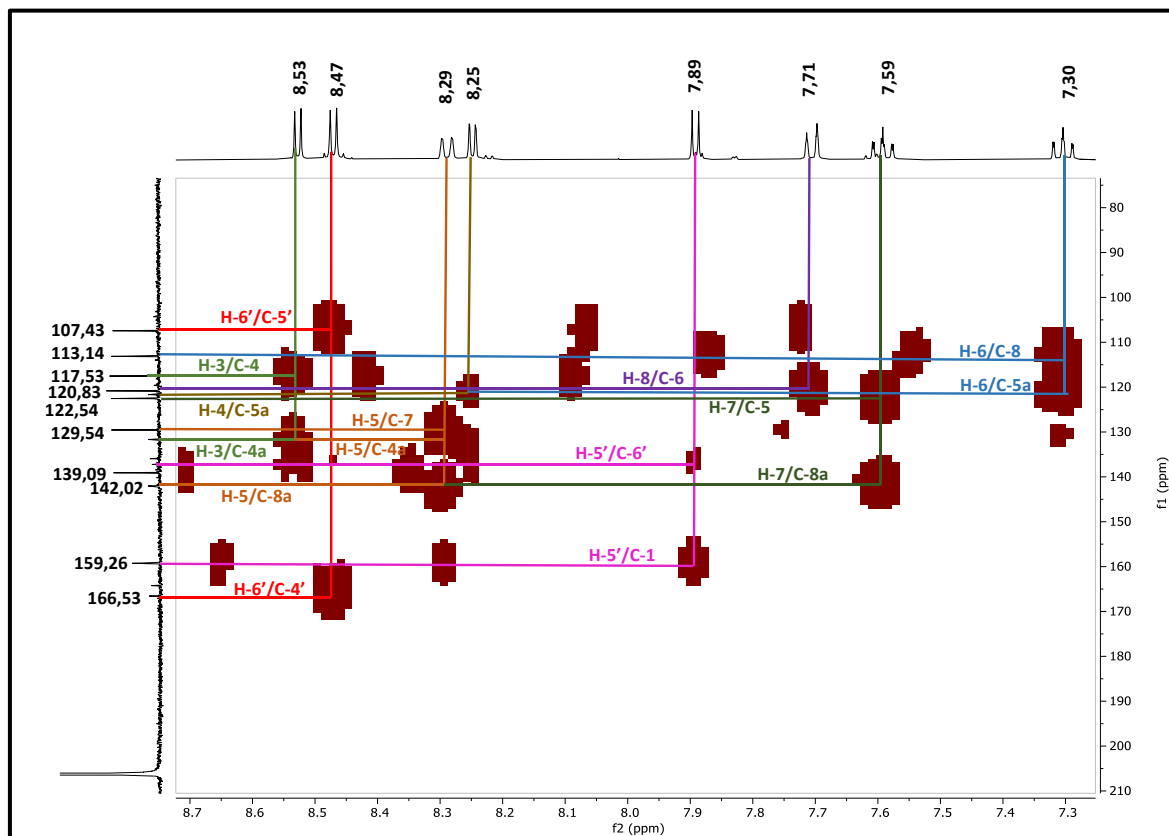


Figura 29 – Mapa de correlações HMBC (^1H 500,13 MHz, ^{13}C 125,76 MHz) da substância FB3.

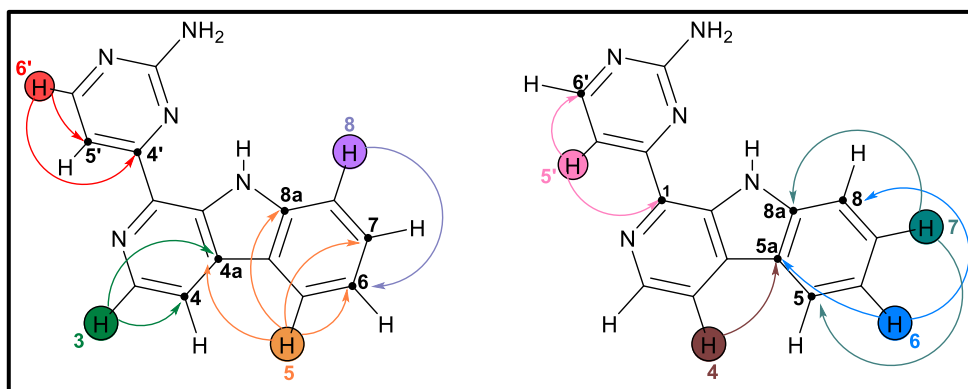


Figura 30 – Representação das correlações observadas no mapa de contorno HMBC (^1H 500,13 MHz, ^{13}C 125,76 MHz) da substância **FB3**.

Tais evidências dão suporte para elucidar o composto **FB3** como sendo o alcaloide com o esqueleto pirimidínico- β -carbolínico, annomontina (**73**), com fórmula moléculas $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}_5$ (calculado 261,10145). Isolado em apenas 3 espécies de *Annona* (Lebeouf *et al.*, 1982c; Costa *et al.*, 2006; Del Carmen Rejón-Orantes *et al.*, 2010).

Tabela 7 - Dados espectroscópicos de RMN (^1H 500,13 MHz, ^{13}C 125,76 MHz)^a para a substância **FB3**.

Posição	δ , ^{13}C	δ , ^{13}C _b	δ ^1H (mult., J em Hz)	δ ^1H (mult., J em Hz) ^b	COSY	δ HMBC (^1H – ^{13}C)
1	137,24, C	137,3				
2	N					
1a	135,94, C	136,4				
3	139,09, CH	138,9	8,53 (1H, d, 5,0)	8,53 (1H, d, 5,0)	8,25	117,52 (4) e 131,67 (4a)
4	117,53, CH	118,0	8,25 (1H, dd, 5,0; 0,8)	8,25 (1H, d, 5,0)	8,53	121,67 (5a)
4a	131,67, C	132,7				
5	122,54, CH	122,6	8,29 (1H, ddd, 7,9; 1,3; 0,8)	8,30 (1H, ddd 7,9; 1,2; 0,8)	7,30	120,83 (6), 129,54 (7), 131,67 (4a) e 142,02 (8a)
5a	121,67, C	121,8				
6	120,83, CH	121,2	7,30 (1H, ddd, 7,9; 7,2; 1,1)	7,31 (1H, ddd 7,9; 7,1; 1,0)	8,29	113,14 (8) e 121,67 (5a)
7	129,54, CH	130,1	7,59 (1H, ddd, 8,2; 7,2; 1,2)	7,60 (1H, ddd 8,3; 7,1; 1,2)		122,54 (5), 142,02 (8a)
8	113,14, CH	113,3	7,71 (1H, dt, 8,2; 1,1; 0,8)	7,70 (1H, ddd 8,3; 1,0; 0,8)		120,83 (6)
8a	142,02, C	142,8				

9	N		11,79 (1H, s)	11,81 (1H, s)		
2'	164,23, C	164,8				
4'	166,56, C	167,1				
5'	107,43, CH	107,4	7,89 (1H, d, 5,2)	7,88 (1H, d, 5,2)	8,47	137,24 (1) e 159,26 (6')
6'	159,26, CH	159,3	8,47 (1H, d, 5,2)	8,48 (1H, d 5,2)	7,89	107,43 (5') e 166,53 (4')
7'	N		5,26 (s, 2H) ^c	6,40 (2H, bs)		

^aExperimento utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados obtidos por Costa *et al.*, 2006; ^cDados referente aos espectros obtidos com CDCl₃-D. (δ) Deslocamento químico em ppm.

5.4 Atividades biológicas

5.4.1 Atividade antimicrobiana

Os resultados da avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana dos extratos e fração alcaloídica de *A. montana*, utilizando três cepas bacterianas e uma fúngica são mostrados nas Figuras 27, 28 e 29. A interpretação do teste considerou os pontos de corte utilizados para interpretar os resultados do teste de difusão em disco para determinar a suscetibilidade de microrganismos à tetraciclina (10 µg/mL). Sendo o microrganismo considerados susceptível quando os halos são ≥ 15 mm e resistente quando os halos são ≤ 11 mm (CLSI, 2021).

Frente a cepa gram-negativa *E. coli* os extratos testados não demonstraram ação inibitória, fato comprovado pela ausência de halo de inibição translúcidos ao redor do disco de papel impregnado com as amostras. No controle positivo (disco impregnado com tetraciclina) houve a formação de halos translúcidos, mostrando a suscetibilidade deste microrganismo ao antibiótico.

No teste feito com *Klebsiella pneumoniae*, a amostra FNAM foi a mais eficaz em impedir o crescimento desta bactéria. Os halos formados, nas maiores concentrações testadas (70, 100, 200 e 250 µg/mL), foram proporcionais em tamanho ao halo na amostra controle. A fração alcaloídica (FAAM) foi a segunda mais eficaz na ação contra esses microrganismos, com a formação de halos em torno de 20 mm para as maiores concentrações testadas. No extrato EHAMC os resultados foram semelhantes, no entanto, nas três menores concentrações não houve formação de halos translúcidos de inibição. Já no extrato EMAM formou-se halos com 50% do tamanho da amostra controle, mostrando

resistência do microrganismo (Figura 31).

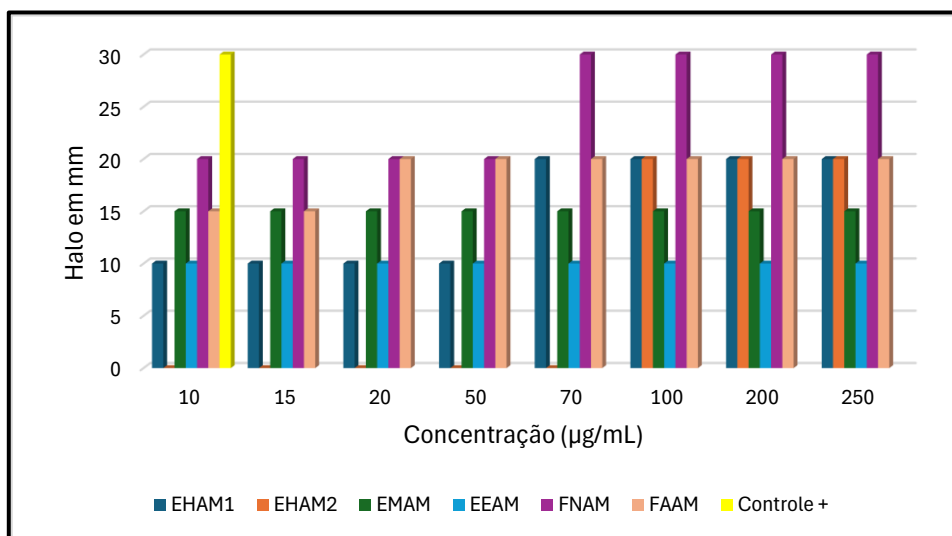


Figura 31 – Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de *A. montana* frente a *K. pneumoniae*.

Frente a bactéria gram-negativa *E. Coli* as amostras EHAM e FAAM apresentaram maior potencial de inibição em relação as demais amostras testadas. Contudo, halos proporcionais a amostra controle (20 mm) foram formados apenas nas quatro maiores concentrações testadas (70, 100, 200 e 250 µg/mL). Nas menores concentrações (10, 15, 20 e 50 µg/mL) dessas amostras os halos translúcidos foram 25% menores comparados com o controle positivo. Os extratos EHAMC, EMAM e FNAM apresentaram halos com 10 mm, representando 50% do crescimento desta bactéria na amostra controle, nestes casos a bactéria mostra ser resistente a ação dos extratos. O extrato etanólico (EEAM) demonstrou ser ineficaz na inibição do crescimento de *E. Coli* (Figura 31).

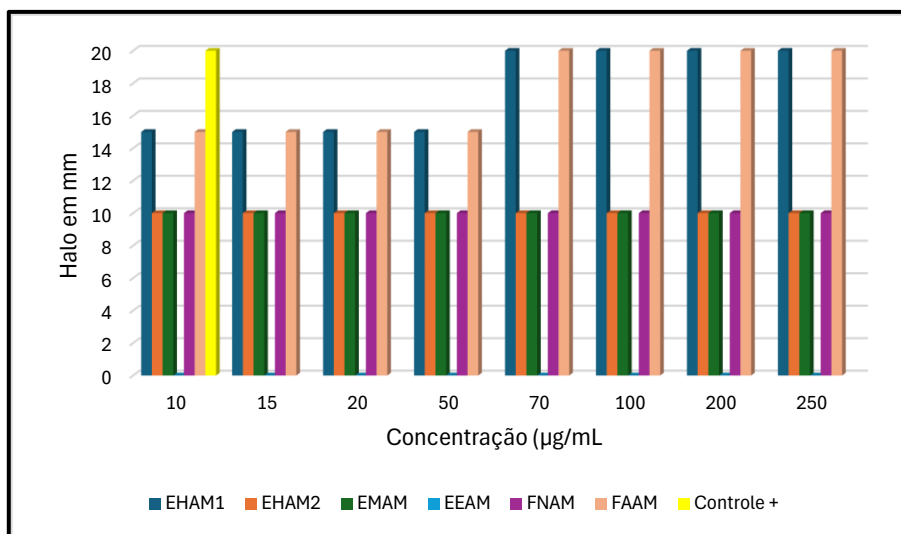


Figura 32 – Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de *A. montana* frente a *E. Coli*.

Tal qual o teste feito em *K. pneumoniae*, as frações FNAM e FAAM apresentaram os melhores resultados de inibição de crescimento para a cepa fúngica *C. albicans*. Todavia, quando comparados com a formação de halos na amostra controle (30 mm), o resultado da FAAM representou 50% da inibição de crescimento deste microorganismo (Halos com 15 mm) em todas as concentrações testadas. Aos extratos FNAM e EHAM o fungo demonstrou maior resistência, pois formaram halos de 10 mm. O extrato etanólico (EEAM) das cascas, também demonstrou ser ineficaz na inibição do crescimento de *C. albicans* (Figura 33).

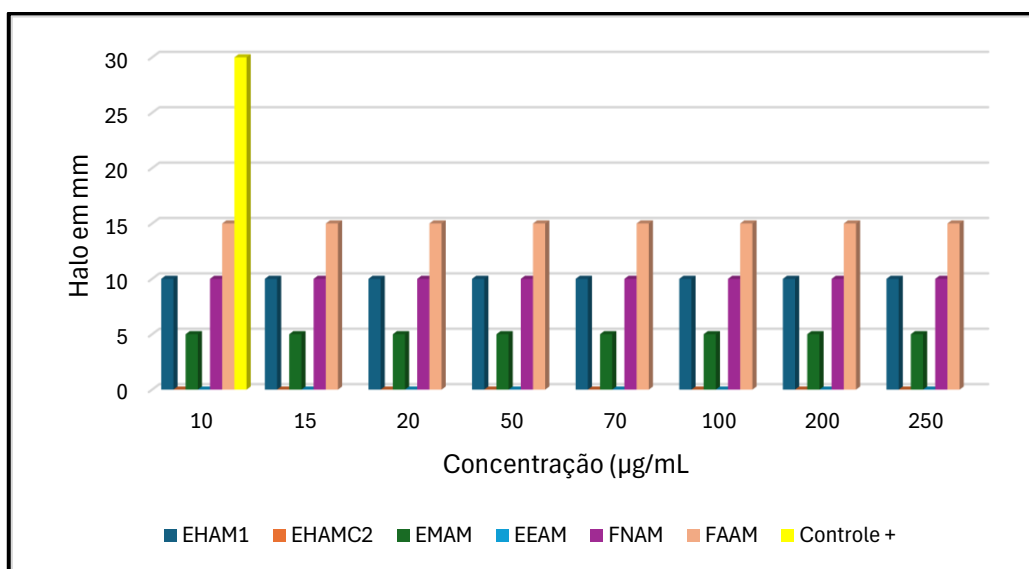


Figura 33 – Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de *A. montana* frente a *C. albicans*.

Ao comparar os resultados obtidos nota-se que não há um padrão de inibição

de crescimento dos microrganismos testados, mesmo considerando as maiores concentrações. Apesar disso, os testes mostram que *K. pneumoniae*, *E.coli* e *C. Albicans* são suscetíveis a ação de metabolitos presentes em diferentes extratos de *A. montana*.

Sabe-se que essa espécie produz metabólitos bioativos, como exposto na Sessão 3.4.3, sendo alguns destes tóxicos para diferentes organismos (Blessing *et al.*, 2010; Hidalgo *et al.*, 2020). Isso se deve a diversos fatores, como à inibição enzimática, o rompimento da parede celular ou a possíveis interações em proteínas envolvidas no metabolismo dos organismos (Blessing *et al.*, 2010).

Inclusive, o grupo de metabolitos acetogeninas, é conhecido pela ação direta no apoptose celular, através de atividade inibitória nas mitocôndrias (Rakotomanga *et al.*, 2004; Colom *et al.*, 2009). Dessa maneira, esses metabólitos podem ser responsáveis pela atividade antimicrobiana aqui apresenta.

López-Romero e colaboradores (2022) testaram a atividade antifúngica de acetogeninas isoladas das sementes de *A. muricata* contra três espécies de fungos: *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, e comprovaram a ação desses compostos sobre o crescimento dos microrganismos testados. Concluindo que, a inibição do crescimento fúngico foi maior em acetogeninas isoladas do que em extratos brutos. Um dos compostos testados foi a annonacina, acetogenina também produzida por *A. montana* (Colom *et al.*, 2009).

Todavia, a atividade antibacteriana também pode estar relacionada a presença de alcaloide, pois fungos e bactérias patógenos são suscetíveis a alguns alcaloides aporfinicos (Hufford *et al.*, 1980; Zhao *et al.*, 2024). A liriodenina, por exemplo, apresenta atividade antifúngica significativa contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Fusarium proliferatum*. Inclusive, no ensaio *in vitro*, os halos inibitórios formados com esse alcaloide foram maiores do que o controle positivo utilizado no teste (nistatina 10 µg/mL) (Zhao *et al.*, 2024).

De forma oposta a esses resultados, Cagnini e colaboradores (2021), na avaliação da atividade antimicrobiana de metabólitos presente em folhas de *A. muricata* pelo método de microdiluição em caldo contra 14 fungos e bactérias de origem alimentar, relacionam a bioatividade à presença de oleorresinas nas amostras, principalmente

fitoesteróis e γ -sitosterol. A mínima concentração inibitória (MIC) apresentada contra bactérias variou de 0,0025 a 0,010 mg/mL.

A atividade antimicrobiana de extratos de *A. montana* também podem estar relacionadas a presença de ciclopeptídeos que a planta produz. Chuang e colaboradores (2018) testaram, em modelo *in vitro*, comprovando a relação desses compostos com a redução da atividade anti-inflamatória causada por lipopolissacarídeo (LPS) que é um componente da membrana externa de bactérias gram-positivas.

Os dados apresentados são solidificados nas informações publicadas, visto que atividade antimicrobiana é frequentemente reportada para extratos de diferentes espécies desse gênero: *A. foetida* (Costa *et al.*, 2009), *A. emarginata* (Dolab *et al.*, 2018) e *A. muricata* (Cagnini *et al.*, 2021) são bons exemplos.

5.5 Atividade larvícida

O estudo da atividade larvícida e adultícida em insetos transmissores de arboviroses, é de grande interesse e relevância científica. Espécies da família Annonaceae tem sido estudada pela diversidade química dessas plantas, e seu potencial para o controle de vetores de doenças. As ações antimicrobianas, citotóxicas e larvicidas demonstradas por diversos membros da família contra diferentes patógenos, por exemplo, justifica esse interesse (Brígido *et al.*, 2020; Cagnini *et al.*, 2021; López-Romero *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2024).

Os testes de atividade larvícida realizados com extratos de *A. montana* revelaram que a fração FNAM apresentou a maior toxicidade para larvas de terceiro estágio, com mortalidade de 93% após 24 horas de exposição e de 100% após 48 horas. A fração FAAM também se mostrou promissora com mortalidade de 83% após 24 horas e 90% após 48 horas. O extrato EMAM, nas concentrações testadas, foi capaz de eliminar 83% das larvas de *A. aegypti* após 48 horas de exposição. Já os extratos EHAM2 e EEAM, assim como o sólido isolado **FB3** (200 μ g/mL), não demonstraram atividade larvícida significativa nas condições experimentais utilizadas. A Figura 34 mostra esses os resultados obtidos em forma de gráfico.

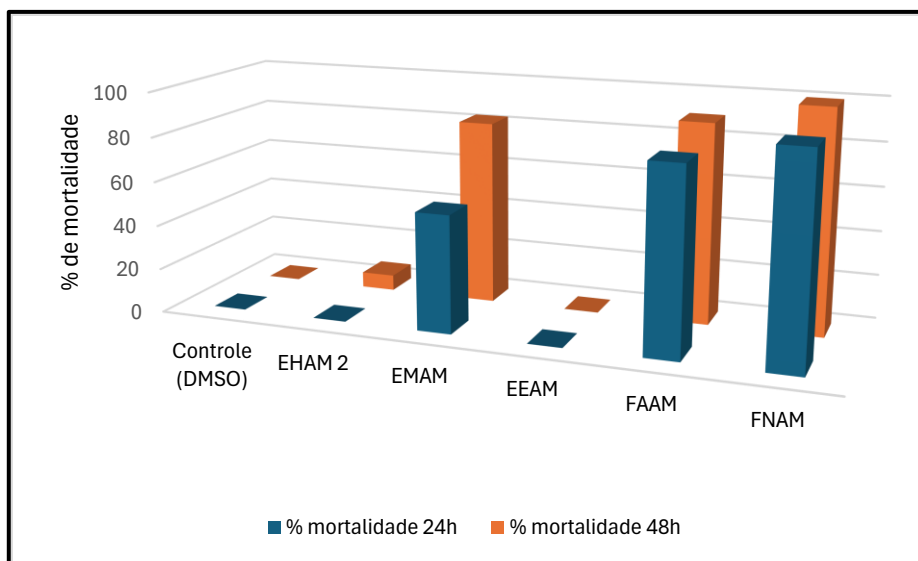


Figura 34 – Rastreamento da atividade larvicida dos extratos (400 µg/mL) de *A. montana* frente a *A. aegypti*.

No rastreamento inicial, os extratos foram testados na concentração de 400 µg/mL para identificar aquelas com maior potencial larvicida. As frações FNAM, FAAM e EMAM, que induziram mortalidade superior a 40%, foram selecionadas para determinação da concentração letal mediana (CL₅₀) e concentração letal para 90% dos indivíduos (CL₉₀) em uma série de concentrações diluídas (12,5 a 200 µg/mL) (Tabela 8). Os resultados indicaram que a fração FNAM apresentou a maior potência larvicida, com CL₅₀ de 3,6 µg/mL, seguida da FAAM (7,9 µg/mL). Mas, em relação à CL₉₀, a fração FAAM mostrou-se mais eficaz (31,6 µg/mL) do que a FNAM (37,3 µg/mL). Como controle positivo, o Espinosade apresentou CL₅₀ de 0,123 µg/mL. Todos os bioensaios tiveram duração de 24 h.

Tabela 8 – Atividade larvicida dos extratos de *A. montana* frente *A. aegypti*.

Amostras	CL ₅₀ ± DP	CL ₉₀ ± DP	χ ²
	(IC 95% LCL- UCL)	(IC 95% LCL- UCL)	
	24h	24h	
	(µg/mL)	(µg/mL)	
EMAM	345,2 ± 0,7 (238,0 - 668,6)	>1000	1,48
FAAM	7,9 ± 0,8 (2,1 - 12,5)	31,6 ± 0,6 (22,5 - 60,7)	0,68
FNAM	3,6 ± 0,5 (2,3 - 5,8)	37,3 ± 1,3 (16,8 - 283,9)	3,79
Espinosade ^a	0,123 ± 0,1 (0,113 - 0,134)	-	2,9

LC₅₀= Concentração letal para 50% das larvas, LC₉₀= Concentração letal para 90% das larvas, IC= intervalo de confiança de 95%. LCL= limite de confiança inferior, UCL= limite de confiança superior. X²= teste estatístico qui-quadrado. ^a= inseticida biológico recomendado para controle de larvas do mosquito *A. aegypti*.

Os dados apresentados endossam resultados já publicados, onde extratos e isolados de *A. montana* são tóxicas para larvas de diferentes organismos, tais como *T. tabaci* L., *A. salina* e *S. fugiperda* (Blessing *et al.*, 2010; Hidalgo *et al.*, 2020).

Os valores de toxicidade contra *A. aegypti* para a **FNAM** podem estar associados a presença do grupo de compostos acetogeninas. Pois, um estudo feito com 65 extratos etanólicos de 56 espécies de plantas, mostrou que 16 destes tiveram alta atividade larvicida contra *A. aegypti*. Entre os extratos mais potentes estavam os obtidos das sementes de *A. squamosa*, *A. cherimólia* e *A. muricata*, com valores de LC₅₀ variando de 25,02 a 84,92 ppm que são órgãos vegetais ricos no armazenamento desses compostos (Oliveros-Díaz *et al.*, 2022).

Outro estudo destaca a atividade tóxica de 85 acetogeninas, mesmo em baixas concentrações, frente a 30 espécies de insetos, incluindo pragas agrícolas e vetores de doenças. Os autores sugerem o potencial uso das acetogeninas como alternativas ecológicas, diante do fato que a atividade inseticida destes compostos, é comparável à de inseticidas comerciais. 48 acetogeninas foram documentadas, inclusive a annonacina e gigantetronenina acetogeninas isoladas *A. montana*. Mas a esquamocina, foi o destaque da atividade inseticida contra *A. aegypti*, sendo listada como a mais tóxica das amostras testadas, com CL₅₀ 16,0 µmol/mL (Durán-Ruiz *et al.*, 2024).

Em conformidade com esse estudo, Rodrigues e colaboradores constataam que as acetogeninas de *A. mucosa* têm potencial como agentes larvicidas para o controle de *A. aegypti* e *A. albopictus*. Ressaltam ainda que esses compostos são uma alternativa verde, pois, ao avaliaram a toxicidade em um organismo modelo, não encontram toxicidade significativa, sugerindo que esses compostos são seguros para o meio ambiente (Rodrigues *et al.*, 2021).

Considerando o modo de atuação, as acetogeninas podem agir tanto na inibição da respiração mitocondrial, quanto na formação de complexos quelantes com íons de cálcio (Ca²⁺) e magnésio (Mg²⁺), interrompendo a homeostase de cálcio intracelular (Zafra-Polo *et al.*, 1996; Durán-Ruiz *et al.*, 2024). Mas, estudos relatam que o principal mecanismo de ação, desses inseticidas naturais, é o poder de induzir a morte celular por autofagia ou desestabilizar a membrana mitocondrial com a desidratação causada ao redor

dos grupos fosfato que a constituem (War *et al.*, 2012). Em suma, esses compostos atuam como uma defesa química que compromete a nutrição e desenvolvimento dos insetos vetores de microorganismos patógenos.

Avaliou-se, além da atividade larvica, o potencial aduicida do composto **FB3** por meio de bioensaio de contato, utilizando mosquitos fêmeas adultas. Na concentração de 1000 µg/mL, após 90 minutos de exposição, o composto causou a morte de 67% dos insetos. A Figura 31 demonstra a curva dose-resposta, evidenciando uma relação inversamente proporcional entre a concentração do composto e a mortalidade, com um patamar de mortalidade de aproximadamente 14% nas menores concentrações testadas (125 e 250 µg/mL). A figura 35 mostra a curva dose-resposta da atividade aduicida do alcaloide annomontina isolado das cascas de *A. montana* frente a *A. aegypti*.

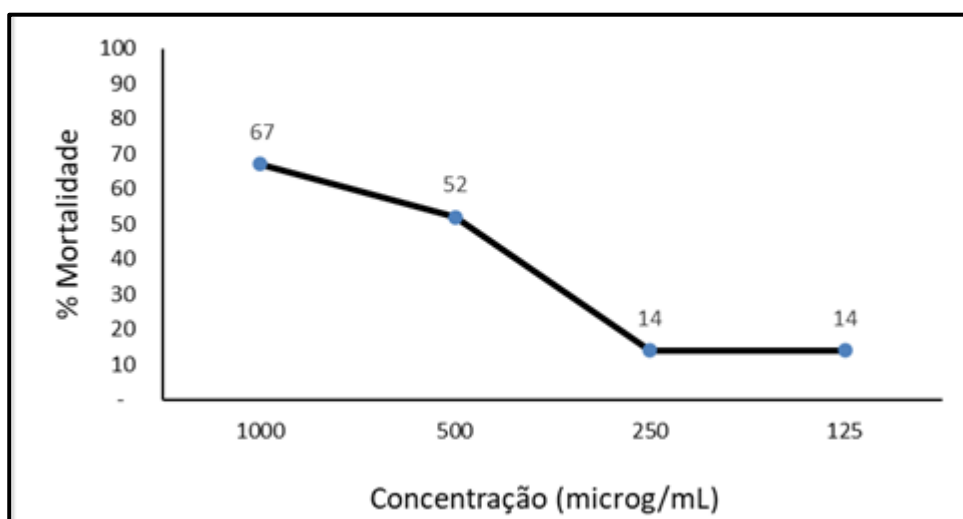


Figura 35 – Curva dose-resposta da atividade aduicida do alcaloide annomontina isolado das cascas de *A. montana* frente a *A. aegypti*.

Nas condições experimentais estabelecidas, a substância **FB3** apresentou uma concentração letal mediana (CL_{50}) de 609,5 µg/mL para larvas de terceiro estágio de *A. aegypti*. Embora tenha induzido mortalidade significativa nesses insetos, a comparação com o inseticida padrão utilizado como controle positivo (Tabela 9) indica que o composto **FB3** possui eficácia inseticida bastante inferior.

Tabela 9 – Atividade aduicida do alcaloide annomontina isolado das cascas de *A. montana* contra *A. aegypti*.

Amostras	% Mortalidade	$CL_{50} \pm DP$	χ^2
----------	---------------	------------------	----------

	(500 µg/mL)	(IC 95% LCL- UCL)	
FB3	52	609,5 ± 0,9 (384,5 – 1499,3)	3,37
Cielo^b	100	0,1 ± 1,0* (0,04 – 0,12)	2,46

LC₅₀= Concentração letal para 50% das larvas, LC₉₀= Concentração letal para 90% das larvas, IC= intervalo de confiança de 95%. LCL= limite de confiança inferior, UCL= limite de confiança superior. X²= teste estatístico qui-quadrado. ^b= inseticida recomendado para controle de mosquitos adultos. *= ng/mL.

A fim de investigar o efeito do tempo de exposição sobre a toxicidade do alcaloide contra mosquitos adultos, conduziram-se bioensaios em diferentes concentrações. Nas concentrações mais elevadas (1000 e 500 µg/mL), observou-se um aumento rápido na mortalidade nos primeiros 15 minutos, atingindo um pico de aproximadamente 30% de adultos mortos. No entanto, a mortalidade declinou significativamente nos minutos subsequentes, estabilizando-se em valores inferiores a 10%. Nas concentrações mais baixas (250 e 125 µg/mL), a mortalidade foi baixa nos primeiros 45 minutos, apresentando um leve aumento aos 60 minutos (7%) e retornando a zero após 75 minutos de exposição (Figura 36).

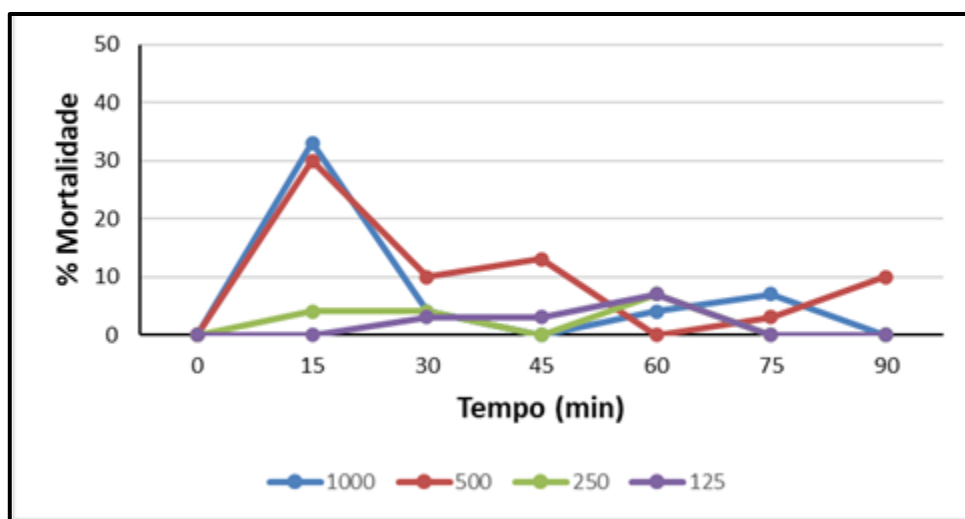


Figura 36 – Curva da atividade adulticida (tempos x mortalidade) do alcaloide annomontina isolado das cascas de *A. montana* frente a *A. aegypti*.

A morte dos insetos por ação do alcaloide pode estar relacionada ao modo absorção por meio do contato com o exoesqueleto de quitina do mosquito, o que pode ser tóxico e consequentemente, causar a morte (Spletozer *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2024).

Os adulticidas naturais atuam por meio de diversos mecanismos, dependendo

de sua composição química, podendo desregular o sistema nervoso dos insetos ou interferir em seu desenvolvimento e reprodução. A eficácia desses agentes está relacionada à capacidade de serem absorvidos através da cutícula ou exoesqueleto dos insetos, resultando em paralisia ou morte rápida. Além disso, alguns adulticidas possuem ação residual, permanecendo ativos após a aplicação, enquanto outros agem de forma rápida e transitória (Spletozer *et al.*, 2021).

Um ponto crucial a ser avaliado é impacto ambiental do uso de adulticidas, uma vez que podem afetar não apenas as populações de mosquitos, mas também a biodiversidade local fato que torna a busca de novos compostos adulticidas pauta de extrema relevância (Silva *et al.*, 2024).

A análise dos resultados obtidos nos bioensaios revela uma evidente correlação entre a concentração do alcaloide utilizado e a mortalidade dos mosquitos adultos em função do tempo de exposição. Esses resultados sugerem que a eficácia do alcaloide é dependente da concentração e do tempo de exposição. A escassez de dados da literatura sobre a atividade biológica de alcaloide contra *A. aegypti* adulto ressalta a importância de investigar as propriedades e a eficácia deste grupo, além de compreender os mecanismos de resistência e otimizar o uso de alcaloides no controle de populações de mosquitos.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O estudo fitoquímico da *A. montana*, mostrou que essa planta produz uma variedade de alcaloides, pois com a interpretação manual dos espectros de massas da fração alcaloídica, foi possível a anotação de quatro alcaloides com esqueleto aporfínicos (*N*-metil assimilobina, nuciferina, anonaina e seu derivado *N*-metil anonaina), três com esqueleto benzilisoquinolínico (coclaurina, *N*-metil coclaurina e reticulina), um oxoaporfínico (liriodenina), todos já isolados em diferentes partes dessa espécie. Um alcaloide com esqueleto tetraidroprotoberberínico (stefalidina) e um benzilisoquinolínico quaternário (magnoflorina) que foram anotados pela primeira vez em *A. montana*.

Utilizando as técnicas cromatográficas, isolou-se o alcaloide oxoaporfínico liriodenina da fração alcaloídica do extrato metanólico do cerne. Anteriormente, este composto havia sido isolado de extratos metanólicos de folhas e cascas de raízes da mesma espécie, por meio de CLAE e CCDP. A liriodenina é um alcaloide comum em diversas espécies deste gênero.

Além da liriodenina, isolou-se o alcaloide pirimidino- β -carbolino annonmontina. A estrutura incomum deste alcaloide foi descoberta da espécie, nos cascas das raízes, em 1982, sendo posteriormente identificado em outras três espécies do gênero *Annona*. Neste estudo, empregamos uma combinação inovadora de técnicas cromatográficas, por ser distinta das previamente descritas, para isolar esse alcaloide a partir de frações do extrato etanólico de cascas de *A. montana*.

O ensaio antimicrobiano *in vitro* revelou o potencial dos extratos e frações de *A. montana* em inibir o crescimento dos microrganismos avaliados. As frações neutras (FNAM) e alcaloídica (FAAM) foram as mais efetivas, tendo em vista que inibiram o crescimento de forma significativa de dois dos quatro patógenos testados. Até então, não havia relato da avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana desses extratos e fração alcaloídica frente *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. Coli* e *C. albicans*.

Ademais, na avaliação da atividade larvicida, a fração neutra apresentou CL₅₀ de 3,6 μ g/mL sendo capaz de matar 100% das larvas, após 48 h. A fração alcaloídica, CL₅₀ de 7,9 μ g/mL, com mortalidade de 90% das larvas nesse mesmo tempo. Essa espécie, pela primeira vez, mostrou ser fonte de compostos com atividade larvicida e adulticida frente a

A. aegypti.

O alcaloide annonmontina demonstrou efeitos aduictida relevantes em fêmeas adultas de *A. aegypti*. Sendo capaz de eliminar 52% desses insetos após 90 minutos de teste, mas esse resultado é notado em concentrações acima de 500 µg/mL da substância. Esta atividade ainda não havia sido relatada para este alcaloide annonmontina.

A identificação dos alcaloides e as atividades biológicas apresentadas aponta a *A. montana* como fonte de produtos naturais de grande importância. Estudos futuros devem se concentrar no isolamento de outros compostos para avaliação detalhados de sua segurança e eficácia inclusive em modelos *in vivo*.

A caracterização química da *A. montana* contribui significativamente para a quimiotaxonomia da família Annonaceae, uma vez que um dos compostos isolados e elucidados estruturalmente é marcador químico do gênero estudado. Além do mais, as contribuições são relevantes para o conhecimento da espécie.

Em suma, esta pesquisa fornece informação importantes sobre a composição química e o potencial biológico de *A. montana*. Os resultados corroboram com uso tradicional desta planta na medicina popular e destacam seu potencial para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos e inseticidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANAYA-ESPARZA, L.M.; GARCÍA-MAGANA, M. L.; DOMÍNGUEZ-AVILA, J. A.; M. YAHIA, E.M.; Norma J. SALAZAR-LOPEZ, N. J.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A.; MONTALVO-GONZALEZ, E. *Annonas*: Underutilized species as a potential source of bioactive compounds. *Food Research International*, v. 138, p. 109775, 2020.
- BAILON-MOSCOSO, N.; BENAVIDES, J. C. R.; ORELLANA, M. I. R.; Karla OJEDA, K.; GRANDA, G.; RATOVISKI, E. A.; OSTROSKY-WEGMAN, P. Cytotoxic and genotoxic effects of extracts from *Annona montana* M. fruit. *Food and Agricultural Immunology*, v. 27, n. 4, p. 559-569, 2016.
- BAUER, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C.; Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.
- BARBALHO S.; GOULART R.; FARINAZZI-MACHADO F. M.; SOUZA M., BUENO P. C. S.; GUIGUER E., ARAÚJO A.; GROPPA, M. *Annona* sp: Plants with multiple applications as alternative medicine - A review. *Current Bioactive Compounds*, v. 8, n. 3, p. 277-286, 2012.
- BERMEJO, A.; FIGADÈRE, B.; ZAFRA-POLO, M. C.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; 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.
- BHARDWAJ, R.; PAREEK, S.; SAGAR, N. A.; VYAS, N. Bioactive Compounds of *Annona*. *Bioactive Compounds in Underutilized Fruits and Nuts*, p. 37-62, 2020.
- BLESSING, Di T.; ÁLVAREZ C. L.; POPICH, S. O.; NESKE, A.; BARDÓN, A. Antifeedant and toxic effects of acetogenins from *Annona montana* on *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Pest Science*, v. 83, p. 307-310, 2010.
- BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 51 de 2022. *Bol Epidemiol*, v. 53, p. 1-14, 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53no24>>, acessado em 17 de janeiro de 2023.
- BRÍGIDO, H. P. C.; CORREA-BARBOSA, J.; DA SILVA-SILVA, J. V.; COSTA, E. V. S.; PERCÁRIO, S.; DOLABELA, M. F. Antileishmanial activity of *Annona* species (Annonaceae). *SN Applied Sciences*, v. 2, p. 1-8, 2020.
- BORGES, L. L. R.; GUIMARÃES, A. D. B.; MORAIS-COSTA, F.; DUARTE, E. R.; MARTINS, M.; CARELI, R. T. Efficacy of *Caryocar brasiliense* Camb. and *Annona crassiflora* Mart. leaves in the reduction of biotransferred *Escherichia coli* from *Lactuca sativa* L. leaves to polypropylene. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 17, p.120-124, 2021.
- BROGDON, W.; CHAN, A. Guidelines for evaluating insecticide resistance in vectors using the CDC bottle bioassay/methods in Anopheles research. CDC Atlanta USA: CDC Technical Report, v. 28, 2010.

CAGNINI, C. Z.; DIAS, A. B.; VILAS BOAS, M. R.; BATISTA, F. P. R.; FARIA, M.G.I.; GLAMOČLIJA, J.; GAZIM, Z. C. Antimicrobial activity of *Annona muricata* leaf oleoresin. *Natural Product Research*, v. 36, n. 18, p. 4781-4787, 2021.

CAVALCANTE, Paulo B. Frutas comestíveis da Amazônia. 5. ed. Belém: Edições CEJUP; CNPq: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1991, 23 p.

CARNEVALE NETO, F.; ANDREO, 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 DFT calculations. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 34, p. e8533, 2020.

CHATROU, L. W., PIRIE, M. D., ERKENS, R. H., COUVREUR, T. L., NEUBIG, K. M., ABBOTT, J. R., CHASE, M. W. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 169, n. 1, p. 5-40, 2012.

CHEN, C. Y.; CHANG F. R.; PAN. W. B.; WU, Y. C. Four alkaloids from *Annona cherimolia*. *Journal of Natural Products*, v. 56, n. 7, p. 753-757, 2001.

CHEN, Y. Y.; MA, C. Y.; WANG, M. L.; LU, J. H.; HU, P., CHEN, J. W.; CHEN, Y. Five new *ent*-kaurane diterpenes from *Annona squamosa* L. pericarps. *Natural Product Research*, v. 34, n. 15, p. 2243-2247, 2020.

CHUANG, P. H.; HSIEH, P. W.; YANG, Y. L.; HUA, K. F.; CHANG, F. R.; SHIEA, J.; WU, Y. C. Cyclopeptides with anti-inflammatory activity from seeds of *Annona montana*. *Journal of Natural Products*, v. 71, n. 8, p. 1365-1370, 2008.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 34a ed., 2021.

COLOM, O. A.; NESKE, A.; CHAHBOUNEB, N.; ZAFRA-POLOB, M. C.; BARDO, A. Tucupentol, a Novel Mono-tetrahydrofuranic Acetogenin from *Annona montana*, as a potent inhibitor of mitochondrial complex I. *Chemistry & Biodiversity*, v. 6, n. 3, p. 335-340, 2009.

COSTA, E. V. Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Guatteropsis blepharophylla*, *Guatteropsis friesiana* e *Guatteropsis hispida* (Annonaceae) – Tese (Doutorado) – Doutorado em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Ciências, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

COSTA, E. V.; MARQUES, F. D. A.; PINHEIRO, M. L. B.; BRAGA, R. M.; DELARMELENA, C.; DUARTE, M. C. T.; MAIA, B. H. 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, 2011a.

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.

COSTA, E. V., PINHEIRO, M. L. B., BARISON, A., CAMPOS, F. R., SALVADOR, M. J., MAIA, B. H. L., EBERLIN, M. N. Alkaloids from the bark of *Guatteria hispida* and their evaluation as

antioxidant and antimicrobial agents. *Journal of Natural Products*, v. 73, n. 6, p. 1180-1183, 2010.

COSTA E. V.; PINHEIRO M. L. B.; SOUZA A. D. L. D.; *et al.* Trypanocidal activity of oxoaporphine and pyrimidine- β -carboline alkaloids from the branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). *Molecules*, v. 16, n. 11, p. 9714-9720, 2011.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; XAVIER, C. M.; SILVA, J. R.; AMARAL, A. C. F.; SOUZA, A. D.; LEON, L. L. A Pyrimidine- β -carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity. *Journal of Natural Products*, v. 69, n. 2, p. 292-294, 2006.

DA SILVA G. J.; RODRIGUES, S. P. J.; MARTINS, D. R. Indígenas brasileiros e o uso das plantas: saber tradicional, cultura e etnociência. *Khronos*, n. 9, p. 163-182, 2020.

DEV, A. A.; JOSEPH, S. M. Anticancer potential of *Annona* genus: A detailed review. *Journal of the Indian Chemical Society*, v. 98, n. 12, p. 100231, 2021.

DEL CARMEN REJÓN-ORANTES, J.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; DE LA MORA, M. P.; ROLDAN, G. R.; CORTES, D. Annomontine, an alkaloid isolated from *Annona purpurea*, has anxiolytic-like effects in the elevated plus-maze. *Planta medica*, v. 77, n. 04, p. 322-327, 2011.

DÍAZ-GODÍNEZ, C.; ONTIVEROS-RODRÍGUEZ, J. C.; RÍOS-VALENCIA, D. G.; HERBERT-PUCHETA, J. E.; ZEPEDA-VALLEJO, L. G.; CARRERO, J. C. Anti-amoebic activity of leaf extracts and aporphine alkaloids obtained from *Annona purpurea*. *Planta Medica*, v. 86, n. 06, p. 425-433, 2020.

DINIZ, T. C.; ARAÚJO, C.S; SILVA, J.C. Phytochemical screening and central nervous system effects of ethanolic extract of *Annona vepretorum* (Annonaceae) in mice. *Journal of Medicinal Plant Research*, v. 7, p. 2729-2735, 2013.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2. Ed. São Paulo, Ed. UNESP, 2003.

DOLAB, J. G., LIMA, B., SPACZYNSKA, E., KOS, J., CANO, N. H., FERESIN, G., ENRIZ, R. D. The antimicrobial activity of *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer and most active isolated compounds against clinically important bacteria. *Molecules*, v. 23, n. 5, p. 1187, 2018.

DOYLE, J. A.; SAUQUET, H.; SCHARASCHKIN, T.; LE THOMAS, A. Phylogeny, molecular and fossil dating, and biogeographic history of Annonaceae and Myristicaceae (Magnoliales). *International Journal of Plant Sciences*, v. 165, n. S4, p. S55-S67, 2004.

DURÁN-RUIZ, C. A.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; DE-LA-CRUZ-CHACÓN, I. Annonaceous acetogenins: A comparative analysis of insecticidal activity. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 46, p. e-508, 2024.

DUTRA, S. M.; SALIMENA, F.R.G.; NETO, L. Annonaceae na Serra Negra, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia*, v. 63, p. 785-793, 2012a.

DUTRA, L. M.; COSTA, E. V.; DE SOUZA MORAES; V. R., DE LIMA NOGUEIRA; P. C., VENDRAMIN, M. E.; BARISON, A.; DO NASCIMENTO PRATA, A. P. Chemical constituents

from the leaves of *Annona pickelii* (Annonaceae). Biochemical Systematics and Ecology, v. 41, p. 115-118, 2012d.

FALL, D.; BADIANE, M.; BA, D.; LOISEAU, P.; BORIES, C.; GLEYE, C.; HOCQUEMILLER, R. A. Antiparasitic effect of *Senegalese* Annonaceae used in traditional medicine. Dakar Médical, v. 48, n. 2, p. 112-116, 2003.

FINNEY, D. J. Probit analysis, Cambridge University Press. Cambridge, UK, 1971.

GIULIETTI, A. M.; RAYMOND, M.; HARLEY, M. R.; QUEIROZ, L. R.; WANDERLEY, M. G.; BERG, D. V. C. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. Megadiversidade, v. 1, n. 1, 2005.

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, Phoenicantheae. Scientific Reports, v. 7, n. 1, p. 7323, 2017.

GÓMEZ-ROJAS, J. P. Historia de la anestesiología. Revista mexicana de anestesiología, v. 44, n. 4, p. 288-299, 2021.

HAŁUCHA, K.; RAK-PASIKOWSKA, A.; BIL-LULA, I. Protective role of platelets in myocardial infarction and ischemia/reperfusion injury. Cardiology Research and Practice, v. 2021, n. 1, p. 5545416, 2021.

HIDALGO, J. R.; GILABERT, M. CABEDO, N.; CORTES, D.; NESKE, A. Montanacin-L and montanacin-K two previously non-described acetogenins from *Annona montana* twigs and leaves. Phytochemistry Letters, v. 38, p. 78-83, 2020.

HUFFORD, C. D.; SHARMA, A. S.; OGUNTMEIN, B. O. Antibacterial and antifungal activity of liriodenine and related oxoaporphine alkaloids. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 69, n. 10, p. 1180-1183, 1980.

JAMKHANDE, P. G.; WATTAMWAR, A. S.; *Annona reticulata* Linn. (Bullock's heart): plant profile, phytochemistry and pharmacological properties. Journal of Traditional and Complementary Medicine, v. 5, n. 3, p. 144-152, 2015.

LEBOEUF, MICHEL CAVÉ, A.; FORGACS, P.; PROVOST, J.; CHIARONI, A.; RICHE, C. Alkaloids of the Annonaceae. Part 33. Annomontine and methoxyannomontine, two new pyrimidine- β -carboline-type alkaloids from *Annona montana*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, p. 1205-1208, 1982c.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; FORGACS, P.; TIBERGHEN, R.; PROVOST, J.; TOUCHB, A.; JACQUEMIN, H. Alcaloides des annonacées XL: Etude chimique et pharmacologique des alcaloïdes de l'*Annona montana*. Plantes Médicinales et Phytothérapie v. 3, p. 169-184, 1982a.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; TOHAMI, M. E.; PUSSET, J.; FORGACS, P.; PROVOST, J. Alkaloids of Annonaceae. XXXV. alkaloids of *Desmos tiebaghiensis*. Journal of Natural Products, v. 45, n. 5, p. 617-623, 1982b.

LIAW, C. C.; CHANG, F. R.; CHEN, S. L.; WU, C. C.; LEE, K. H.; WU, Y. C. Novel cytotoxic monotetrahydrofuranic Annonaceous acetogenins from *Annona montana*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 13, n. 15, p. 4767-4776, 2005.

LIAW, C. C.; CHANG, F. R.; WU, Y. C.; WANG, H. K.; NAKANISHI, Y.; BASTOW, K. F.; LEE, K. H. Montacin and cis-Montacin, Two New Cytotoxic Monotetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from *Annona montana*. Journal of Natural Products, v. 67, n. 11, p. 1804-1808, 2004.

LIAW, C. C.; YANG, Y. L.; CHEN, M.; CHANG, F. R.; CHEN, S. L.; WU, S. H.; WU, Y. C. Mono tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* as cytotoxic agents and calcium ion chelators. Journal of Natural Products, v. 71, n. 5, p. 764-771, 2008.

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* R. E Fr. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 31, p. 79-89, 2020.

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 Plantas Medicinais., Botucatu, v.14, n.4, p.629-634, 2012.

LIM, H. S.; KIM, Y. J.; SOHN, E., YOON, J.; KIM, B. Y.; JEONG, S. J. *Annona atemoya* leaf extract ameliorates cognitive impairment in amyloid- β injected Alzheimer's disease-like mouse model. Experimental Biology and Medicine, v. 244, n. 18, p. 1665-1679, 2019.

LOBÃO, A.Q.; LOPES, J.C.; ERKENS, R.H.J.; MENDES-SILVA, I.; PONTES PIRES, A.F.; SILVA, L.V.; OLIVEIRA, M.L.B.; JOHNSON, D.; MELLO-SILVA, R. (in memoriam). Annonaceae in Flora do BRASIL atualizado de 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro Disponível em: <<https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br>>, acessado em 28 de maio de 2023.

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

LÓPEZ-ROMERO, B. A.; LUNA-BÁECENAS, G.; GARCÍA-MAGANA, M. D. L.; ANAYA-ESPARZA, L. M.; ZEPEDA-VALLEJO, L. G.; LÓPEZ-GARCÍA, U. M.; MONTALVO-GONZÁLEZ, E. Extraction of Acetogenins Using thermosonication-assisted extraction from *Annona muricata* seeds and their antifungal activity. Molecules, v. 27, n. 18, p. 6045, 2022.

LORENZONI, R. M.; ROSADO, C. C.; BASTOS, T. B. Diversidade genética em espécies do gênero *Annona* L. (Annonaceae). Tópicos Especiais em Produção Vegetal VI, p. 145, 2016.

LUCIO, A. S. S. C.; ALMEIDA, J. R. G. S.; CUNHA, E. V. L.; TAVARES, J. F.; FILHO, J. M. B. Alkaloids of the Annonaceae: occurrence and a compilation of their biological activities. The Alkaloids: Chemistry and Biology, v. 74, p. 233-409, 2015.

MAAS, P. J. M.; RAINER, H.; LOBÃO, A. Q. Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil Rio de Janeiro. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2017.

MA, C.; LI, Y.; LU, J.; WANG.; LI, XIANG, CHEN, J.; CHEN, Y. JU, Wenzheng. Three new

cytotoxic annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. Natural Product Research, p. 1-5, 2022.

MENDES-SILVA, I.; LOPES, J.C.; SILVA, L.V.; BAZANTE, M.L.; Jardim Botânico do Rio de Janeiro. *Annona in Flora e Funga do Brasil*. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB110235>, acessado em 25 junho de 2023.

MÉNDEZ-CHÁVEZ, M.; LEDESMA-ESCOBAR, C. A.; HIDALGO-MORALES, M.; RODRÍGUEZ-JIMENES, G. D. C.; ROBLES-OLVERA, V. J. Antifungal activity screening of fractions from *Annona cherimola* Mill. leaf extract against *Fusarium oxysporum*. Archives of Microbiology, v. 204, n. 6, p. 330, 2022.

MENEZES, R.P; SESSIONS, Z.; MURATOV, E.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T. Secondary metabolites extracted from Annonaceae and chemotaxonomy study of terpenoids. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 32, p. 2061-2070, 2021.

MOOTOO, B. S.; ALI, A.; Ayub KHAN, A.; REYNOLDS, W. F.; MCLEAN, S. Three novel monotetrahydrofuran annonaceous Acetogenins from *Annona montana*. Journal of natural products, v. 63, n. 6, p. 807-811, 2000.

MOGHADAMTOUSI, S. Z.; FADAEINASAB, M.; NIKZAD, S.; MOHAN, G.; ALI, H. M.; KADIR, H. A. *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. Molecular Sciences, v. 16, n. 7, p. 15625-15658, 2015.

MOSCA, J. L.; CAVALCANTE, C. E. B.; DANTAS, T. M. Características botânicas das principais anonáceas e aspectos fisiológicos de maturação. Fortaleza: Embrapa agroindústria tropical, 2006.

NESKE, A.; HIDALGO, J. R.; CABEDO, N.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae family. Their potential biological applications. Phytochemistry, v. 174, p. 112332, 2020.

OLIVEROS-DIAZ, A. F.; PAJARO-GONZALEZ, Y.; CABRERA-BARRAZA, J.; HILL, C.; QUIÑONES-FLETCHER, W.; OLIVERO-VERBEL, J.; CASTILLO, F. D. Larvicidal activity of plant extracts from Colombian North Coast against *Aedes aegypti* L. mosquito larvae. Arabian Journal of Chemistry, v. 15, n. 12, p. 104365, 2022.

ORTIZ, A. A.; Suarez, L. E. C.; Patiño, G. S. Aporfinoides en hojas de *Oxandra longipetala* RE FR.(Annonaceae). Scientia et technica, v. 1, n. 33, 2007.

PATHAK, K.; ZAMAN, K. An overview on medicinally important plant - *Annona reticulata* Linn. Int Journal Pharmacogn Phytochem, v. 5, p. 299-30, 2023.

PEDRO, D. N.; CAUTAIN, B.; MELGUIZO, A.; VICENTE, F.; GENILLOUD, O.; PELÁEZ, F.; TORMO, J. R. Mitochondrial complex I inhibitors, acetogenins, induce HepG2 cell death through the induction of the complete apoptotic mitochondrial pathway. Journal of bioenergetics and biomembranes, v. 45, p. 153-164, 2013.

PINO, J. A.; MARBOT, R.; AGÜERO, J. Volatile components of wild soursop (*Annona montana* Macf.) fruit. Journal of Essential Oil Research, v. 14, n. 4, p. 257-258, 2002.

QUÍLEZ, M. A; FERNÁNDEZ-ARCHE, M. D.; GARCÍA-GIMÉNEZ, R. De la Puerta. Review: Potential therapeutic applications of the genus *Annona*: Local and traditional uses and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 225, p. 244-270, 2018.

RABÊLO, S. V. Fitoquímico e avaliação da atividade biológica de *Atemoia* (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*). Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais do Semiárido, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Brasil, 2014.

RANGEL, J.; LIBERAL, Â.; CATARINO, S.; COSTA, J. C.; ROMEIRAS, M. M.; FERNANDES, Â. Phytochemical and bioactive potentials of African Annonaceae species. *Food Chemistry*, p. 139048, 2024.

RAKOTOMANGA, M.; RAZAKANTOANINA, V.; RAYNAUD, S.; LOISEAU P. M.; HOCQUEMILLER, R. JAUREGUIBERRY, G. Antiplasmodial activity of acetogenins and inhibitory effect on *Plasmodium falciparum* adenylate translocase. *Journal of Chemotherapy*, v. 16, n. 4, p. 350-356, 2004.

RIBEIRO, J. C. L.; BRUGINSKI, E.; ZUCCOLOTTO, T.; SANTOS, A. D. D. C.; BOMFIM, L. M.; ROCHA, S. L. A.; CAMPOS, F. R. Chemical composition, larvicidal and cytotoxic activity of *Annona salzmannii* (Annonaceae) seed oil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 57, 2021.

RODRIGUES A. M.; DA SILVA, A. A.; DE FREITAS, J. C. C.; MARTINS, V. E. P.; FERREIRA, M. A. P.; FERREIRA, A. C. S.; DE MORAIS, S. M. Larvicidal activity of *Annona mucosa* Jacq. extract and main constituents rolliniastatin and rollinicin against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Industrial Crops and Products*, v. 169, p. 113678, 2021.

SANTOS, L.A.R.; PIMENTA, L.P.S.; BOAVENTURA, M. A. D. Acetogeninas de anonáceas bioativas isoladas das sementes de *Annona cornifolia* A. St - Hil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 9, p. 48-51, 2007.

SCHAAL, B. Plants and people: Our shared history and future. *Plants, People, Planet*, v. 1, n. 1, p. 14-19, 2019.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre, UFRGS, 2003.

SCHELB, I, G. Ensino de botânica na Fiocruz: proposta de guia de visitação e uso dos jardins como estratégia didática e investigativa para o ensino de biologia. Trabalho de Conclusão de Curso (Especializa o em Ensino em Bioc ncias e Saúde) - Instituto Oswaldo Cruz, Funda o Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

SCHMIDT, J.; RAITH, K.; BOETTCHER, C.; ZENK, M. H. Analysis of Benzylisoquinoline-Type Alkaloids by Electrospray Tandem Mass Spectrometry and Atmospheric Pressure Photoionization. *European Journal of Mass Spectrometry*, v. 11, p. 325–333, 2005.

SILVA, J. R. D. A.; OLIVEIRA, A. A. D.; FRANÇA, L. P.; DA CRUZ, J. D.; AMARAL, A. C. F. EXPLORING the larvicidal and adulticidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil from *Bocageopsis multiflora*. *Molecules*, v. 29, n. 10, p. 2240, 2024.

SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ed. Porto Alegre, Ed. da UFSC/Ed. da UFRGS, 2003.

SPLETOZER, A. G.; SANTOS, C. R. D.; SANCHES, L. A.; GARLET, J. Plantas Com Potencial Inseticida: Enfoque Em espécies amazônicas. *Ciência Florestal*, v. 31, n. 2, p. 974-97, 2021.

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, p. 523–528, 2004.

TAMFU, A.N.; CEYLAN, O.; FRU, G.C.; OZTURK, M.; DURU, M.E.; SHAHEEN, F. Antibiofilm, antiquorum sensing and antioxidant activity of secondary metabolites from seeds of *Annona senegalensis*, Persoon. *Microbial Pathogenesis*, v. 144, p. 104191, 2020.

TAYLOR, W. I. The structure and synthesis of liriodenine, a new type of isoquinoline alkaloid. *Tetrahedron*, v. 14, n. 1-2, p. 42-45, 1961.

VEGA, M. R. G.; ESTEVES-SOUZA, A.; VIEIRA, I. J. C.; MATHIAS, L.; BRAZFOLHO, R.; ECHEVARRIA, A. Flavonoids from *Annona dioica* leaves and their effects in ehrlich carcinoma cells, DNA-topoisomerase I and II. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, p. 1554-1559, 2007.

VILA-NOVA, N. S.; MORAIS, S. M. D.; FALCÃO, M. J. C.; MACHADO, L. K. A.; BEVILÁQUA, C. M. L.; COSTA, I. R. S.; ANDRADE JÚNIOR, H. F. D. Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two Annonacea species cultivated in Northeastern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, p. 567-571, 2011.

WANG, L. Q.; ZHAO, W. M.; QIN, G. W.; CHENG, K. F.; YANG, R. Z. Four novel annonaceous acetogenins from *Annona montana*. *Natural Product Letters*, v. 14, n. 2, p. 83-90, 1999.

WANG, L.; MIN, B.; Yan LI, Y.; NAKAMURA, N.; QIN, G.; Lib, C.; HATTORIA, M. Annonaceous acetogenins from the Leaves of *Annona Montana*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 10, n. 3, p. 561-565, 2002.

WANG, L; ZHAO, W.; QIN, G.; CHENG, K.; YANG, R. Four novel annonaceous acetogenins from *Annona montana*. *Natural Product Letters*, v. 14, n. 2, p. 83-90, 2001.

WAR, A.; PAULRAJ, M.; AHMAD, T.; BUHROO, A.; HUSSAIN, B.; IGNACIMUTHU, S.; SHARMA, H. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling & Behavior*, Austin, v.7, n.10, p.1306-20, 2012.

WÉLÉ, A.; ZHANG, Y.; CAUX, C.; BROUARD, J. P.; DUBOST, L.; GUETTE, C.; BODO, B. Isolation, and structure of cyclosenegalins A and B, novel cyclopeptides from the seeds of *Annona senegalensis*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, n. 23, p. 2712-2718, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. World Health Organization, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. A report on health. Atualizado de 2020. (WHO, Geneva). Disponível em: <<https://www.who.int/>>. Acessado em 25 setembro de 2023.

WU, Y. C; CHANG, G. Y.; DUH, C. Y.; WANG, S. K. Cytotoxic alkaloids of *Annona montana*. *Phytochemistry*, v. 33, n. 2, p. 497-500, 1993

YIALLOURIS, A.; PATRIKIOS, I.; JOHNSON, E. O.; SERETI, E.; DIMAS, K.; DE FORD, C., STEPHANOU, A. Annonacin promotes selective cancer cell death via NKA-dependent and SERCA-dependent pathways, *Cell Death Disease*, v. 9, n. 7, p. 764, 2018.

YANG, N.; GUO, J.; ZHANG, J.; GAO, S.; XIANG, Q.; WEN, J.; HUANG, Y.; RAO, C.; CHEN, Y. A toxicological review of alkaloids. *Drug and chemical toxicology*, p. 1-15, 2024.

ZAFRA-POLO, M.; GONZÁLEZ, M.; ESTORNELL, E.; SAHPAZ, S.; CORTÉS, D. Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. *Phytochemistry*, Oxford, v.42, n.2, p.253 71, 1996.

ZHAO, P.; YU, Z.; HUANG, J. P.; WANG, L.; HUANG, S. X.; & YANG, J. Four unreported aporphine alkaloids with antifungal activities from *Artabotrys hexapetalus*. *Fitoterapia*, v. 174, p. 105868, 2024.