

# CICLO CIRCADIANO E AUXINA NA MODULAÇÃO DA SÍNTESE DE ALCALOIDES EM *Annona emarginata* H.

RAINER

**Bruna Cavinatti Martin**

Defesa apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Interunidades entre o Instituto de Biociências do câmpus de Botucatu e Instituto de Biociências câmpus Rio Claro.

**BOTUCATU – SP**

**2022**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

CICLO CIRCADIANO E AUXINA NA MODULAÇÃO DA  
SÍNTESE DE ALCALOIDES EM *Annona emarginata* H.

RAINER

**Doutoranda: Bruna Cavinatti Martin**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gisela Ferreira**

Defesa apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Interunidades entre o Instituto de Biociências do câmpus de Botucatu e Instituto de Biociências câmpus Rio Claro.

**BOTUCATU – SP**

**2022**

M379c      Martin, Bruna Cavinatti  
Ciclo circadiano e auxina na modulação da síntese de alcaloides em  
*Annona emarginata* H. Rainer / Bruna Cavinatti Martin. -- Botucatu,  
2022  
84 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),  
Instituto de Biociências, Botucatu  
Orientadora: Gisela Ferreira

1. metabolismo especializado. 2. metabolismo primário. 3.  
hormônios vegetais. 4. fotossíntese. I. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil CAPES pela concessão de bolsa de doutorado - Código de Financiamento 001.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica) e aos funcionários da Seção de Pós-graduação, pelo auxílio no decorrer do curso.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gisela Ferreira pela orientação na execução desse trabalho, por toda troca e aprendizado durante esse arduo caminho.

Aos colegas de laboratório Dr<sup>a</sup> Ana Beatriz Marques Honório, Ms. Gustavo Cabral da Silva, Dr. Felipe Giroto Campos e Dr. Fabrício Custódio de Moura Gonçalves, por todo auxílio possível na execução das análises do trabalho.

Aos amigos que fiz em Botucatu que tornaram minha caminhada um pouco mais leve.

Ao meu psiquiatra Dr Lucas Valente Giustra, sem o qual, jamais teria chegado ao final dessa jornada.

Ao meu marido Caio Pagliarini Colombo por todo cuidado, toda parceria e todos os puxões de orelha para me fazer entender que eu precisava cumprir sim com o trabalho que me propus a fazer, mas que ao mesmo tempo, a vida vai muito além disso.

Aos meus filhos caninos, Weed e Raul, que foram minha razão de viver e minha companhia durante o doutorado em meio a uma pandemia.

Aos meus amados pais, Tania Cavinatti Martin e Antonio Martin Filho, por sempre serem meu chão e meu ar em todos os desafios da vida, inclusive nesse. Obrigada por não me deixarem desistir.

À Deus, por ter me mantido em pé e colocado pessoas em meu caminho que me auxiliaram para a conclusão desse trabalho.

## SUMÁRIO

Resumo	7
Abstract	9
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b>	10
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	12
2.1 Metabolismo especializado em Annonaceae	12
2.1.1 Alcaloides em Annonaceae	13
2.1.2 Fatores ambientais que afetam a produção de alcaloides	14
2.2 Auxinas e o metabolismo primário e especializado	16
2.2.1 Auxinas e o metabolismo primário	18
2.2.2 Auxinas e o metabolismo especializado	19
REFERÊNCIAS	21
<b>3. CAPÍTULO 1: Impacto do ciclo circadiano na produção de alcaloides em mudas de <i>Annona emarginata</i> ‘Terra-Fria’</b>	28
Resumo	28
Abstract	29
3.1 Introdução	30
3.2 Material e Método	31
3.2.1 Obtenção de material vegetal e delineamento experimental	31
3.2.2 Alcaloides	31
3.2.3 Nitrato redutase	32
3.2.4 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i>	32
3.2.5 Extração e quantificação de açúcares	33
3.2.6 Atividade antioxidante	33
3.2.7 Análise dos dados	34
3.3 Resultados e Discussão	34
3.4 Conclusão	43
REFERÊNCIAS	43
<b>4. CAPÍTULO 2: Modulação da síntese de alcaloides pela ação de ácido indolilacético em mudas de <i>Annona emarginata</i> (Schltdl) H. Rainer</b>	49
Resumo	49
Abstract	51
4.1 INTRODUÇÃO	52

4.2 MATERIAL E MÉTODOS	55
4.2.1 Obtenção de material vegetal e delineamento experimental	55
4.2.2 Aplicação do ácido indolilacético e seu inibidor de transporte TIBA	56
4.2.3 Alcaloides	56
4.2.4 Quantificação de ácido indolilacético	57
4.2.5 Nitrato Redutase	57
4.2.6 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i>	57
4.2.7 Açúcares e amido	58
4.2.8 Atividade antioxidante e espécies reativas de oxigênio	58
4.2.9 Análise dos dados	58
4.3 RESULTADOS	59
4.4 DISCUSSÃO	74
4.5 CONCLUSÃO	79
<b>REFERÊNCIAS</b>	79

## Resumo

As plantas da família Annonaceae são conhecidas por produzirem diversos metabolitos especializados, dentre eles os alcaloides destacam-se por sua variedade e funções biológicas de interesse farmacológico e agrônomico. A espécie *Annona emarginata* é nativa e muito utilizada como porta enxerto de espécies comerciais de *Annona* como a atemóia, além de ser utilizada na recuperação de áreas biodegradadas e possuir ampla variedade de alcaloides. É sabido que os alcaloides podem sofrer alterações em sua concentração ou composição de acordo com o ambiente, e que além disso, tais substâncias compartilham parte da sua rota de síntese com o ácido indolilacético (IAA). Assim, o objetivo desse trabalho foi verificar as possíveis alterações da síntese de alcaloides em *Annona emarginata* dentro de um ciclo circadiano, bem como se a aplicação de IAA modifica a síntese de alcaloides. Além disso, buscamos avaliar possíveis alterações no metabolismo primário das mudas, que pudessem estar relacionadas com as mudanças nos alcaloides. Visando avaliar variações no conteúdo de alcaloides no ciclo circadiano um primeiro experimento foi instalado e com relação à aplicação de IAA e a síntese de alcaloides um segundo experimento foi realizado. Em ambos os experimentos analisamos alcaloides totais e liriodenina, presença e ausência de alcaloides específicos, atividade da nitrato redutase, trocas gasosas, fluorescência da clorofila a, açúcares e amido, enzimas antioxidantes, peróxido de hidrogênio e lipoperoxidação. Nossos resultados mostraram que em *Annona emarginata* existe uma relação entre metabolismo primário e especializado, causando alterações na concentração de alcaloides totais, liriodenina e na presença e ausência de alcaloides específicos em folhas e raízes. Concluímos com o primeiro experimento que o melhor horário de coleta visando extrair maior concentração desses compostos é às 02h00 nas raízes. Quanto ao segundo experimento, verificamos que a aplicação de IAA também causou alterações pontuais no metabolismo primário que resultaram em redução da síntese de alcaloides, além de causar alterações na presença e ausência de alcaloides em raízes de mudas de *Annona emarginata*, o que foi possível detectar com a inibição do transporte de auxina.

Palavras-chave: Metabolismo especializado; Metabolismo primário; Hormônios vegetais; Fotossíntese

## Abstract

Plants of the Annonaceae family are known to produce several specialized metabolites, among which the alkaloids stand out for their variety and biological functions of pharmacological and agronomic interest. The species *Annona emarginata* is native and widely used as a rootstock for commercial species of *Annona* such as atemoya, in addition to being used in the recovery of biodegradable areas and having a wide variety of alkaloids. It is known that alkaloids can change their concentration or composition according to the environment, and that, in addition, such substances share part of their synthesis route with indolylacetic acid (IAA). Thus, the objective of this work was to verify the possible alterations in the synthesis of alkaloids in *Annona emarginata* within a circadian cycle, as well as whether the application of IAA modifies the synthesis of alkaloids. In addition, we sought to evaluate possible changes in the primary metabolism of seedlings, which could be related to changes in alkaloids. Aiming to evaluate variations in the alkaloid content in the circadian cycle, a first experiment was installed and in relation to the application of IAA and the synthesis of alkaloids, a second experiment was carried out. In both experiments we analyzed total alkaloids and liriodenine, presence and absence of specific alkaloids, nitrate reductase activity, gas exchange, fluorescence chlorophyll, sugars and starch, antioxidant enzymes, hydrogen peroxide and lipid peroxidation. Our results showed that in *Annona emarginata* there is a relationship between primary and specialized metabolism, causing changes in the concentration of total alkaloids, liriodenine and in the presence and absence of specific alkaloids in leaves and roots. We concluded with the first experiment that the best time of collection to extract the highest concentration of these compounds is at 2:00 am in the roots. As for the second experiment, we found that the application of IAA also caused specific changes in the primary metabolism that resulted in a reduction in the synthesis of alkaloids, in addition to causing changes in the presence and absence of alkaloids in the roots of *Annona emarginata* seedlings, which was possible to detect by inhibiting auxin transport.

Keywords: Specialized metabolism; Primary metabolism; plant hormones; Photosynthesis

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O metabolismo das plantas é dividido em primário e especializado. O metabolismo primário consiste em uma série de processos fundamentais, como a fotossíntese e a respiração, a fim de assegurar o crescimento e desenvolvimento da planta, sendo encontrado em todo reino vegetal (VERPOORTE, 2000). O metabolismo especializado, se utiliza dos produtos do metabolismo primário como precursores de seus compostos, que vão garantir a sobrevivência do vegetal, atuando especialmente na interação entre a planta e o ambiente (KUTCHAN et al., 2015; PICHERSKY; LEWINSON, 2011; VERPOORTE, 2000). Os metabólitos especializados são restritos a determinadas espécies e/ou órgãos e são divididos em três grandes grupos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (STEVENSON; NICOLSON; WRIGHT, 2017).

Os alcaloides, alvo desta pesquisa, fazem parte da classe dos compostos nitrogenados, sendo metabólitos de grande importância quando se trata de adaptação e sobrevivência das plantas a fatores bióticos e abióticos estressantes (ataques de patógenos e radiação UV, por exemplo), além de serem reserva de nitrogênio (JANSEN et al., 1998; SIMÕES et al., 1998; SIMÕES et al., 2007; SIMÕES et al., 2016).

Na família Annonaceae estão documentados mais de 900 alcaloides, sendo que os mais abundantes são os benzilisoquinolínicos (ABI) derivados da tirosina e fenilalanina (LÚCIO et al., 2015). Em *A. diversifolia*, os ABIs são produzidos desde etapas iniciais da germinação, onde a liriodenina atua como sistema de defesa ao inibir o crescimento de *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus glaucus*, fungos que degradam desde sementes (DE LA CRUZ CHACÓN et al., 2011; DE LA CRUZ CHACÓN; GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2012) até plantas adultas (GONZÁLEZ-ESQUINCA et al., 2014). Desta forma, a liriodenina é um alcaloide benzilisoquinolínico bastante encontrado em espécies dessa família sendo considerado marcador quimiotaxonômico. Além disso, a liriodenina possui importantes atividades biológicas como ação antifúngica, antibactericida, antiprotzoaria, capaz de inibir o crescimento de vários fitopatógenos (DE LA CRUZ CHACÓN et al., 2011).

A produção de alcaloides varia em função de estágio de desenvolvimento do vegetal (HOFT et al., 1996; WILLIAMS; ELLIS, 1989), de condições ambientais (HOFT et al., 1996; BRISKE; CAMP, 1982; ELGORASHI et al., 2002; ROCCA-PEREZ et al., 2004) e de reguladores vegetais, como as auxinas (PALEG et al., 1959; SOUSA et al., 2019; SILVA et al., 2021).

Com relação ao ambiente, estudos demonstram alterações no conteúdo de alcaloides de acordo com a sazonalidade, variações nas condições de luminosidade, temperatura e disponibilidade de água (VERMA e SKULA et al., 2015; YANG et al., 2018). O cultivo de *Trachyspermum ammi* em região de escassez hídrica aumenta o teor de clorofila e fenólicos totais e reduz a altura das plantas, massa fresca e seca da erva, o que influencia seu sistema de defesa (AZHAR et al., 2011). Castro-Moreno et al. (2013) verificaram que em *Annona lutescens* houve redução na concentração de liriodenina nas raízes na estação seca. As elevadas temperaturas também afetam a produção de metabólitos especializados fazendo com que o fotossistema II apresente diminuição da eficiência fotoquímica causando aumento do estresse nas plantas (JOCHUM et al., 2007). No entanto até o momento não foi observado como o ciclo circadiano impacta a produção de alcaloides em *Annona* sp.

Metabólitos especializados e hormônios compartilham parte de rotas metabólicas, o que sugere que hormônios poderão desempenhar papel na biossíntese de alcaloides. A rota do ácido chiquímico dá origem a produtos especializados nitrogenados como os alcaloides e compostos fenólicos, além do grupo hormonal das auxinas (LJUNG, 2013; MAEDA; DUDAREVA, 2012). Além disso, sabe-se que os hormônios possuem efeitos no crescimento das plantas, morfogênese e metabolismo primário reconhecidos há mais de um século (ALAM; NAEEM; IDREES, 2012). O fato de os hormônios estarem relacionados ao metabolismo primário e especializado das plantas sugere estudos que ao investigarem o papel de hormônios na síntese de metabólitos especializados, considere suas relações também com o metabolismo primário (OLIVOTO et al., 2017), o que ainda é pouco elucidado em Annonaceae.

A espécie *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer escolhida para este estudo é nativa do continente sul-americano, encontrada na Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai, Peru e Uruguai (MAAS et al., 2001). No Brasil possui importância na recuperação de áreas degradadas e é utilizada como porta-enxerto para espécies comerciais como a atemoia (*Annona x atemoya* Mabb.) e a fruta-do-conde (*A. squamosa* L.) (BETTIOL NETO et al., 2006; KAVATI, 2013) devido à sua rusticidade, tolerância a patógenos causadores da broca-do-colmo (KAVATI, 2013), podridão de raízes e colo (TOKUNAGA, 2005) e tolerância ao déficit hídrico severo (MANTOAN et al., 2016). Nesta espécie há relatos da presença de liriodenina, anonaina, reticulina e asimilobina em raízes e caules de plantas adultas (LÚCIO et al., 2015).

Desta forma, considerando-se a importância dos alcaloides da família Annonaceae (DE LA CRUZ CHACÓN; GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2012), os fatores que afetam sua produção e os efeitos da auxina nos processos metabólicos dos vegetais, esse trabalho tem por objetivos avaliar como a flutuação ambiental ao longo do dia (ciclo circadiano) impacta a produção de alcaloides e como a auxina IAA (ácido indol-3- acético) modula as variações entre o metabolismo primário e a biossíntese de alcaloides em plantas jovens de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer), morfotipo ‘Terra-fria’.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Metabolismo especializado em Annonaceae**

Os metabólitos especializados são moléculas envolvidas nas respostas de interação entre a planta e o ambiente (LAURSEN et al., 2015) além disso, representam uma importante fonte de fármacos ativos (BOURGAUD et al., 2001). A classificação dos metabólitos especializados se dá de acordo com sua estrutura química, atualmente estão divididos em três grandes grupos, terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (HARBONE et al., 1999). Estima-se que o número de metabólitos especializados ultrapasse 200.000. Os alcaloides são o segundo grupo com maior número de substâncias identificadas que superam 20.000, perdendo apenas para o grupo dos terpenos com mais de 30.000 substâncias identificadas (MATSUURA et al., 2018).

Diferente do metabolismo primário que está presente em todas as plantas, os produtos do metabolismo especializado são encontrados em grupos específicos de organismos. Os metabólitos apresentam inúmeras atividades biológicas fundamentais para sobrevivência do vegetal e estão envolvidos na relação entre a planta e o meio, sejam relações bióticas ou abióticas como adaptações às mudanças climáticas, a comunicação entre as plantas, alelopatia, defesa a ataques de patógenos e herbívoros e atração de polinizadores (LAURSEN; MØLLER; BASSARD, 2015). Tais substâncias podem ainda atuar como uma característica quimiofenética, que vai explorar a composição bioquímica dos metabólitos especializados de determinados táxons de plantas (ZIDORN, 2019) podendo ser utilizadas como marcadores químicos, devido à forma como estão agrupados em famílias, gêneros e espécies (DEWICK, 2002).

As espécies da família Annonaceae apresentam produção de diversos metabólitos especializados de interesse (SURESH; SHIVAKUMAR; SHIVAKUMAR, 2012), que além de serem afetados pela variação ambiental também podem variar nos diferentes

estádios fenológicos (CARVALHO et al., 2007 GOBBO-NETO; LOPES 2007; YANG et al., 2018). Dentre os metabólitos mais estudados na família, destacam-se os alcaloides com suas importantes funções biológicas (DE LA CRUZ CHACÓN; GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2012; LÚCIO et al., 2015).

### **2.1.1 Alcaloides em Annonaceae**

Os alcaloides são metabólitos especializados da classe dos compostos nitrogenados que apresentam baixo peso molecular, grande variedade de estruturas químicas e muitas funções biológicas, sendo abundantemente encontrado em um elevado número de espécies, diferindo entre elas na concentração ou mesmo nas diferentes substâncias encontradas. Até hoje foram descobertas cerca de 20.000 substâncias que apresentam em sua composição um ou mais átomos de nitrogênio, formando aminas primárias, secundárias ou terciárias (DEWICK, 2002; DE LA CRUZ CHACÓN et al., 2012).

Na família Annonaceae há registro de mais de 900 alcaloides, sendo os benzilisoquinolínicos os mais abundantes (LÚCIO et al., 2015). Muitos dos alcaloides possuem propriedades analgésicas, dopaminérgicas, antimicrobianas e narcóticas (GONZÁLEZ-ESQUINCA et al., 2014). Derivados dos benzilisoquinolínicos, os alcaloides aporfínicos são produzidos principalmente por angiospermas basais. Foram registrados 801 alcaloides aporfínicos, dentre eles 232 são produzidos por espécies da família Annonaceae, o que demonstra a grande diversidade metabólica e importância biológica da família (GONZÁLEZ-ESQUINCA et al., 2014).

Dentre os principais alcaloides relatados estão annonafina, assimilobina, discretina, lanulinosina, laurotetanina, liriodenina, n-metil laurotetanina, norglaucina, norpredicentina, oxoglaucina, reticulina, xilopina e xilopinina (DE LA CRUZ CHACÓN et al., 2012; MIMI et al., 2021), muitos com importantes atividades biológicas registradas (LÚCIO et al., 2015).

A liriodenina é o alcaloide mais abundante na família e apresenta atividade antimicrobiana, antitumoral e antiplaquetária (CHEN et al, 2013). É considerada um marcador quimiotaxonômico por ser um alcaloide oxoaporfínico encontrado em 240 espécies da família Annonaceae (PINHEIRO et al., 2009; GONZÁLEZ-ESQUINCA et al., 2014). Estudos demonstram que nas raízes parece desempenhar um papel no desenvolvimento de resistência a condições de seca. Nas sementes sua presença é detectada antes mesmo da germinação podendo agir como eficiente fungicida (DE LA

CRUZ et al., 2011; SOUSA et al., 2019). Outra função potencial da liriodenina é armazenamento de nitrogênio (OROZCO et al., 2009).

Os alcaloides podem ser utilizados como marcadores quimiotaxonômicos, Pereira et al. (2007) utilizaram alcaloides indólicos para classificação de espécies do gênero *Aspidosperma*. Máximo et al. (2006) utilizaram os alcaloides quinolizidínicos como marcadores para o gênero *Ulex L.* Em Mimi et al. (2021) os alcaloides foram estudados a fim de verificar diferenças entre duas variedades de *Annona emarginata*, var. *Araticum-mirim* e var. *Araticum-de-terra-fria*, o que resultou na classificação em dois morfotipos, Terra-fria e Mirim. Para o gênero *Annona* os alcaloides conhecidos como marcadores quimiotaxonômicos são liriodenina, anonaina e reticulina pois estão presentes em grande parte das espécies do gênero de forma abundante (LEBOEUF et al., 1982).

### **2.1.2 Fatores ambientais que afetam a produção de alcaloides**

A variedade bem como a quantidade de metabólitos especializados de uma planta, são alterados de acordo com as condições do ambiente (VERMA e SKULA, 2015). Tais alterações podem ocorrer dentro do ciclo circadiano, onde as principais variáveis são luz e temperatura. Com relação a luz, sabe-se que tanto o fotoperíodo, como a intensidade, a direção e a qualidade podem interferir na síntese desses metabólitos (YANG et al., 2018). Quanto à temperatura Silva et al., (2022) observaram que temperaturas mais elevadas (30°C) em sementes aumentam a produção de alcaloides durante a germinação e desenvolvimento inicial de *Annona x atemoya* Mabb. cv. Mudas 'Gefner'. Em sementes de *Cataranthus roseus* apenas duas horas de aumento de temperatura elevam o conteúdo de alcaloides (GUO et al., 2007), bem como em cultivares de *Lupinus angustifolius* têm sua concentração de alcaloides aumentada quando cultivadas em temperaturas mais elevadas (JANSEN et al., 2009).

As plantas sintetizam enorme variedade de metabólitos especializados e estudos demonstram que mudanças no ambiente como variação sazonal, e as variáveis como luminosidade e/ ou disponibilidade de água, podem interferir na síntese de alcaloides (CASTRO-MORENO et al., 2013; DOUGLAS et al., 2010), entretanto, mudanças compreendidas dentro do ritmo circadiano, ainda não foram discutidas e relacionadas à síntese de alcaloides em anonáceas. O ritmo ou ciclo circadiano é um ciclo biológico de aproximadamente 24 horas, específico para cada indivíduo (BUJDOSO e DAVIS,

2013). Os ritmos circadianos colocam os organismos em vantagem seletiva no que diz respeito à evolução, permitindo aos organismos antecipar e se preparem para mudanças ambientais regulares, tais como as estações do ano (MAS, 2005).

As mudanças características e drásticas entre as estações seca e chuvosa sugere uma implicação ecológica adicional para a produção de alcaloides por plantas como *A. diversifolia* e *A. lutescens*. Essas mudanças ambientais induzem alterações fisiológicas que vão resultar em produtos diferentes do metabolismo. Foi observado aumento exponencial no teor de liriodenina das raízes durante a fase mais severa da seca (CASTRO-MORENO et al., 2013). Honório et al. (2021) também verificaram que a seca estimulou a síntese de alcaloides totais e liriodenina sem reduzir o metabolismo primário. Entretanto, os estudos que relacionam as variáveis ambientais com os alcaloides são controversos, por exemplo, Evans et al. (1996) observaram incremento de alcaloides na luz, enquanto Hoft et al. (1996) verificaram uma redução na concentração de alcaloides na luz e um aumento quando na sombra.

Wu et al. (1996) avaliaram a variação sazonal de alcaloides em *Murraya euchrestifolia* em função das estações do ano em Taiwan, mostrando que tal fator nem sempre afeta a produção de alcaloides; por exemplo, o alcaloide girinimbina é encontrado em todas as estações, enquanto bis-7-hidroxicirinimbina-A e bis-7-hidroxicirinimbina-B são encontrados apenas no inverno, no outono são encontrados murrayaminas I, J, K, M e N, e por fim murrayazolidina, murrayazolinina e murrayaminas D, F, G e H foram descobertos na primavera. Da mesma forma, na erva *Hydrastis canadensis* (Ranunculaceae), os alcaloides berberina e hidrastina não apresentam variações significativas no verão, entretanto no inverno o conteúdo de tais alcaloides reduziu drasticamente (DOUGLAS et al. 2010). Em *Taxus brevifolia*, Vance et al. (1994) e, em *Taxus baccata*, Hook et al. (1999) relataram variação sazonal nos níveis de alcaloides, que de forma geral, houve incremento de alcaloides nas épocas de maior temperatura.

As concentrações de alcaloides também variam em função da ontogenia, sendo portanto, produção organo-específicas. Em *Psicotria umbellata* (PARANHOS et al. 2009) todos os órgãos contêm concentrações variadas de alcalóide indol psicolatina que é encontrado mais abundantemente nas flores. No entanto, esta distribuição não muda com as estações do ano. Mimi et al. (2021) encontraram diferenças nos alcaloides entre os morfotipos Araticum-de-terra-fria e Araticum-mirim, ambas da espécie *Annona emarginata*, independente da região e época de coleta, sendo o primeiro relato na

literatura da caracterização das diferenças entre as duas variedades de *Annona emarginata* utilizando-se quimiofenética.

## **2.2 Auxinas e o metabolismo primário e especializado**

O desenvolvimento das plantas depende da organização, localização e manutenção dos meristemas, e isso envolve vários mecanismos de regulação, incluindo a sinalização hormonal (BOHN-COURSEAU, 2010). Hormônios vegetais têm efeitos biológicos reconhecidos há mais de um século e está bem estabelecido que esses compostos atuam na regulação e coordenação do crescimento das plantas, morfogênese e metabolismo (ALAM et al., 2012; OLIVOTO et al., 2017). Em geral os hormônios são sintetizados em tecidos específicos e controlam o desenvolvimento das plantas por meio de variados efeitos fisiológicos, sendo que esses efeitos podem variar de acordo com a espécie, fatores ambientais, concentração, fase de desenvolvimento e fase da planta (FERREIRA; TROJAN, 2015). Tais substâncias são naturais, e quando sintéticas são denominadas reguladores vegetais e esses reguladores podem ser aplicadas diretamente no vegetal, seja em folhas, frutos ou sementes (CAMPOS; ONO; RODRIGUES, 2009).

As auxinas (Ax) fazem parte do primeiro grupo de hormônios vegetais identificados e foi a partir dela que estudos sobre a expansão celular tiveram seu início (VIEIRA et al., 2010). Além disso, regulam os tropismos, dominância apical, iniciação da raiz, diferenciação do tecido vascular e desenvolvimento de frutos (SRIVASTAVA, 2002; BAJGUZ; PIOTROWSKA, 2009). A principal auxina identificada nas plantas é o ácido indol-3- acético (IAA), produzido nos meristemas, primórdios foliares, tecidos vasculares jovens e órgãos reprodutivos (BOHN-COURSEAU, 2010). O IAA foi extraído e identificado por Went em 1926 em um teste de curvatura do coleóptilo em plantas de aveia, comprovando a hipótese de Darwin em 1880 de que há curvatura em direção à luz proporcional à quantidade desse hormônio (FAGAN et al., 2015).

Sabe-se que além do IAA, existem mais auxinas endógenas como o ácido 4-cloroindolacético, ácido indolbutírico e o ácido fenilacético, sendo este último mais abundante nos vegetais mas entretanto é menos ativo. Essas substâncias têm em comum a função de expansão e alongamento celular, conhecido por crescimento ácido das auxinas e por essa razão são muito utilizadas em culturas de tecidos para enraizamento (FERREIRA; TROJAN, 2015).

A síntese das auxinas ocorre principalmente nos tecidos meristemáticos de órgãos aéreos e têm seu transporte a partir do meristema apical em direção às raízes, porém segundo Ljung et al. (2005), os meristemas das raízes também sintetizam auxina entretanto permanecem dependentes da auxina advinda das folhas e por essa razão é necessário que se deixe folhas nas estacas para iniciação de raízes (ROSA et al., 2017). Sua degradação pode ocorrer por meio de foto-oxidação ou por meio da enzima IAA oxidase, a fim de fazer a manutenção dos níveis endógenos do hormônio (RODRIGUES; LEITE, 2004). Também ocorre a inativação das auxinas por meio de conjugação com outras moléculas (SALISBURY; ROSS, 2012). Sabe-se que fatores exógenos são capazes de influenciar na síntese de auxinas, por exemplo, a presença de luz nas raízes pode reduzir a concentração de IAA ao ponto de inibir o crescimento de tal órgão (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

Os efeitos da aplicação exógena das auxinas variam conforme a concentração utilizada, sendo que, em baixas concentrações, promovem o crescimento, enquanto, em altas concentrações, podem causar fitotoxidez (GROSSMANN et al., 1996). A auxina sintética mais estudada na agricultura é o ácido indolibutírico, principalmente no que diz respeito a enraizamento de estacas (FACHINELO et al., 2005; DUTRA et al., 2012), entretanto existem outros reguladores vegetais sintéticos desse grupo, como o próprio Ácido Indol -3 Acético (IAA), ácido a-naftalenoacético (ANA), ácido 2,4-diclofenóxiacético (2,4 -D), ácido 2,4,5-tricloro fenoxiacético (2,4,5-T – Agente laranja), ácido 2-metoxi-3,6-diclorobenzóico (Dicamba) e o ácido 4-amino-3, 5,5-tricloropicolínico (Picloram) (MERCIER, 2004). Além disso, a aplicação da auxina leva ao aumento da síntese de auxina endógena, que conseqüentemente pode gerar maior competição com os alcaloides por substrato (triptofano) (ONO et al., 1998; EPSTEIN e LAVE, 1983).

Além das auxinas, existem substâncias antiauxininas, que consistem em compostos semelhantes estruturalmente às auxinas, que vão competir com as auxinas pelo mesmo receptor, como é o caso do TIBA (ácido 2,3,5-triidobenzóico) e das morfactinas (FAGAN et al., 2015). O TIBA atua se ligando ao complexo protéico pin-shaped inflorescences-PIN que é o receptor de ácido indolilacético na membrana, inibindo o transporte da maior parte da auxina produzida (SANTANA et al., 1970), bloqueando a saída desse regulador vegetal da célula, ocasionando acúmulo de auxina intracelular (KŘEČEK et al., 2009), tal acúmulo de auxina pode resultar em alterações na síntese de alcaloides.

Em relação à ação das auxinas, observa-se efeitos tanto no metabolismo primário (SINGH et al., 2015; JOSHI, SKULA, SKULA, 2011; BLUM e al., 2009; KELLEY e RIECHERS, 2007) como especializado (SOUSA et al., 2022; GODJIN et al., 1992).

### **2.2.1. Auxinas e o metabolismo primário**

Estudos foram realizados relacionando o metabolismo primário com a ação dos reguladores, em relação às trocas gasosas, sendo reportado que a aplicação de reguladores vegetais, como auxinas, aumentam a assimilação e a biomassa (JOSHI; SHUKLA; SHUKLA, 2011). Czerpak et al. (2004) também verificaram um aumento na taxa fotossintética líquida com aplicação de NAA, IAA e PAA em *Wolffia arrhiza*. Em contrapartida, Sousa et al. (2022) verificaram que tanto a aplicação de ácido indolibutírico (ácido 2,3,5 triiodobenzóico), resultaram em decréscimo na assimilação e na eficiência de carboxilação.

Quanto à relação entre as auxinas e a enzima nitrato redutase, Joshi, Skula, Skula (2011) verificaram que houve um aumento na atividade da nitrato redutase com a aplicação de auxinas, o que também foi observado por Ali et al., (2007) em grão de bico e amendoim. Lea et al. (1997) sugerem que a atividade da nitrato redutase é a principal etapa limitante na assimilação de nitrato e na produção de aminoácidos. O nitrato pode interferir no metabolismo primário, e se a disponibilidade for alta ou baixa influenciará o metabolismo especializado e o sistema de defesa. Assim, concentrações adequadas podem causar a produção de moléculas sinalizadoras que permitem que as plantas se aclimatem e superem o estresse gerado pela falta de nitrogênio. Quando a disponibilidade é baixa, o direcionamento de recursos para a produção de metabólitos especializados também pode auxiliar na defesa da planta (CAMPOS et al., 2019).

Kelley e Riechers (2007) após aplicarem IAA em plântulas de milho e feijão, com o objetivo de verificar se a auxina causaria estresse nas plantas, verificaram ausência de estresse. Tal resposta foi justificada pelo fato de não ocorrer redução de Fv/Fm em níveis inferiores a 0,83 o que significaria danos fotoinibitórios. Joshi, Skula, Skula (2011) também verificaram aumento na eficiência fotossintética e no teor de clorofila em pinhão manso após aplicarem IAA e NAA.

Cato e Castro (2006) verificaram redução na altura de plantas de soja após aplicação do inibidor de transporte de auxina TIBA, sem que houvesse prejuízo de produção. Kumar et al. (2005) notaram inibição no número de brotos e raízes quando aplicado TIBA. Por outro lado, algumas vezes o TIBA pode agir como indutor da taxa

de proliferação de brotos em rosas, pois nesse caso pode ter inibido o transporte polar bloqueando a saída de auxina das células e não sua entrada (SINGH; SYAMAL, 2000).

Ainda em relação a alterações no metabolismo primário em resposta à auxinas, Ono et al. (1998) verificaram que com a aplicação de IBA e NAA houve um incremento nos teores de açúcares totais e açúcares redutores. Tais autores ainda verificaram que as mudanças no conteúdo de açúcares, também dependiam do ambiente, visto que observaram que os açúcares totais aumentaram ainda mais na primavera, e os redutores tiveram maior aumento nas estações de outono e inverno. Um alto grau de conectividade entre o metabolismo primário e especializado se dá através da disponibilidade de carbono, nitrogênio e energia advindos do metabolismo primário para síntese de metabólitos especializados, sendo assim, a disponibilidade desses blocos de construção afeta muito a concentração de um metabólito especializado (DUDAREVA et al., 2013; JAN et al., 2021).

Com relação ao metabolismo enzimático, Moncousin e Gaspar (1983) verificaram que quando foi aplicado NAA houve grande aumento na atividade da peroxidase. Quando há muita atividade enzimática, provavelmente a planta está sob estresse e esses dois fatores combinados, podem levar à produção de metabólitos especializados que chegam como defesa ao fator estressante, como é o caso dos alcaloides (SIMÕES et al., 2007; SIMÕES et al., 2016; LAURSEN et al., 2015; STEVENSON, NICOLSON e WRIGTH, 2017)

### **2.2.2 Auxinas e metabolismo especializado**

Em relação ao metabolismo especializado, sabe-se que os hormônios compartilham parte de rotas metabólicas, o que sugere que eles podem competir por substrato. Dessa forma a aplicação de reguladores vegetais pode alterar a síntese de alcaloides, óleos essenciais e outras substâncias no metabolismo especializado. Por exemplo, a rota do ácido chiquímico dá origem a produtos especializados nitrogenados como os alcaloides e compostos fenólicos, além dos grupos hormonais das auxinas e salicilatos (MAEDA; DUDAREVA, 2012; LJUNG, 2013).

A relação entre auxinas e alcaloides tem sido demonstrada em alguns trabalhos. Em *Cinchona ledgeriana* a produção de alcaloides indólicos foi estimulada pelo ácido 2,4-diclorofenoxiacético (HARKES et al., 1985). Em folhas de *Balanites aegyptiaca* a síntese de alcaloides, saponina e de tanino nas plantas também foi aumentada

significativamente com a utilização de 2000ppm de ácido indolilacético (MOSTAFA; ABOU ALHAM, 2011). Em *Catharanthus roseus* a aplicação foliar de ácido indolilacético (AIA), na concentração de 150 e 200 ppm, proporcionou aumento na biomassa e a produção do alcaloide indólico vincristina (MUTHULAKSHMI; PANDIYARAJAN, 2013). Em cultura de células de *Daucus carota* e *C. roseus*, as auxinas ácido 1-naftalenoacético, ácido indolacético e ácido 2,4-diclorofenoxiacético) apresentaram efeito negativo na síntese de alcaloides indólicos, por estimular a proliferação celular enquanto reprimiu a expressão de genes TDC e STR envolvidos na biossíntese de alcaloides, sendo que o nível desses transcritos aumentou em meio sem o fitormônio (GODDIJN et al., 1992; PASQUALI et al., 1992). O teor de nicotina de *Nicotiana tabacum* foi reduzido pela adição de ácido 3-indol acético ou ácido 2,4-diclorofenoxiacético à solução nutritiva (YASUMATSU; 1967). Hasegawall (1937) demonstrou que a nicotina é produzida nas raízes de plantas de tabaco e encontrou um paralelismo próximo entre o crescimento da raiz e o rendimento de nicotina, sendo que a redução do crescimento radicular causado pelo tratamento com IAA resultou na diminuição da produção de nicotina.

Estudos que relacionam a interação entre alcaloides e reguladores vegetais em plantas da família Annonaceae, foram publicados por Silva et al. (2021) que verificaram que o uso de giberelina (GA<sub>3</sub>) em sementes de *Annona x atemoya* Mabb. cv. ‘Gefner’ não estimula a produção de alcaloides e por Sousa et al. (2019), onde o tratamento de sementes de *Annona cacans* ocasionou incremento nos alcaloides totais e liriodenina nos estágios iniciais de desenvolvimento dessa espécie. Entretanto, estudos nessa família, envolvendo auxinas e alcaloides em mudas não foram encontrados. Sousa et al. (2022) verificaram que o ácido indolbutírico e o ácido salicílico causaram incremento nos alcaloides totais, porém o ácido abscísico e o metil jasmonato não tiveram efeito.

De acordo com o exposto, considerando-se a importância dos alcaloides da família Annonaceae, visto que são os metabólitos especializados vastamente estudados na família devido às suas inúmeras funções biológicas (DE LA CRUZ CHACÓN; GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2012; LÚCIO et al., 2015) e os fatores que podem alterar sua produção, o presente trabalho teve como objetivos avaliar como a flutuação ambiental ao longo do dia (ciclo circadiano) impacta a produção de alcaloides e como a auxina IAA (ácido indol-3-acético) modula as variações entre o metabolismo primário e a biossíntese de alcaloides em plantas jovens de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer), morfotipo ‘Terra-fria’.

## Referências

- ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas, Brasília: Embrapa SPI/ Embrapa CNPH, 1998, p. 261-296.
- BAJGUZ, A.; PIOTROWSKA, A. Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry*, v. 70, n. 8, p. 957-969, 2009.
- BOHN-COURSEAU, I. Auxin: A major regulator of organogenesis. *Comptes Rendus Biologies*, v. 333, n. 4, p. 290-296, 2010.
- BOURGAUD, F., GRAVOT, A., MILESI, S., GONTIER, E. (2001). Produção de metabólitos secundários vegetais: uma perspectiva histórica. *Plant science*, 161 (5), 839-851.
- BRISKE, D. D.; CAMP, B. J.; *Weed Science*. 30, 106, 1982.
- BUJDOSO, N. AND DAVIS, S. J. 2013. Mathematical modeling of an oscillating gene circuit to unravel the circadian clock network of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 4:3.
- CAMPOS, M. F.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Desenvolvimento da parte aérea de plantas de soja em função de reguladores vegetais. *Revista Ceres*, v. 56, n. 1, p. 74-79, 2009.
- CAMPOS, F. G.; VIEIRA, M. A. R.; AMARO, A. C. E.; DELACRUZCHACÓN, I.; MARQUES, M. O. M.; FERREIRA, G.; BOARO, C. S. F. Nitrogen in the defense system of *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer. *PLOS ONE*, v. 14, n. 6, p. e0217930, 6 jun. 2019
- CASTRO-MORENO, M. TINOCO-OJANGURÉN, C. L., DEL ROCIO CRUZ-ORTEGA, M., & GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. Influence of seasonal variation on the phenology and lirioidenine content of *Annona lutescens* (Annonaceae). *Journal of Plant Research*. 126(4): 529–537, 2013.
- CATO, S. C.; CASTRO, P. R. D. C. Redução da altura de plantas de soja causada pelo ácido 2, 3, 5-triidobenzóico. *Ciência Rural*, 36, 981-984, 2006.
- DA SILVA, G. C., HONÓRIO, A. B. M., MARTIN, B. C., CAMPOS, F. G., & FERREIRA, G. Compostos bioativos de sementes de *annona* x *atemoya*

mabb. 'gefner' durante o processo de embebição em ga3. *Revista Multidisciplinar em Saúde*, 2(3), 11-11, 2021.

DE LA CRUZ, C. I.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. Liriodenine alkaloid in *Annona diversifolia* during early development. *Natural product research*, v. 26, n. 2, p. 42–49, 2012.

DE LA CRUZ, C. I.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; GUEVARA, F. P.; JÍMENEZ, G. L. F. Liriodenine, early antimicrobial defence in *Annona diversifolia*. *Zeitschrift für Naturforschung*, v. 66, n. Table I, p. 377–384, 2011.

DOUGLAS, J. A., FOLLETT, J. M., PARMENTER, G. A., SANSOM, C. E., PERRY, N. B., & LITTLER, R. A. Seasonal variation of biomass and bioactive alkaloid content of goldenseal, *Hydrastis canadensis*. *Fitoterapia*, 81(7), 925-928, 2010.

DUTRA, T. R.; GRAZZIOTTI, P. H.; SANTANA, R. C.; MASSAD, M. D. Desenvolvimento inicial de mudas de copaíba sob diferentes níveis de sombreamento e substratos. *Revista Ciência Agronômica*, v. 43, n. 2, p. 321-329, 2012. FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTGAL, J. C. Propagação de plantas frutíferas. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2005, 221 p.

ELGORASHI, E. E.; DREWES, S. E.; STADEN, J. V.; *Fitoterapia*. 73, 490, 2002.

EVANS, W. C.; Trease and Evans' Pharmacognosy, 14th ed., WB Saunders

FACCHINI, P.J. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual review of plant biology*, v. 52, n. 1, p. 29-66, 2001.

FAIRBAIRN, J. W.; SUWAL, P. N.; *Phytochemistry*, 1, 38, 1961.

FERREIRA, B. Z.; TROJAN, D. G. Hormônios de plantas: uma prospecção sobre suas descobertas e aplicações. *Techno Eng*, Ponta Grossa, v. 1, n. 11, p. 1-48, 2015.

FLOSS, E. L. Fisiologia das plantas cultivadas: o estudo que está por trás do que se vê. 5.ed. Passo fundo: Editora da Universidade de Passo Fundo, 2011, 734 p.

FRAENKEL, G.S. The raison d'etre of secondary plant substances. *Science*, p. 1466-1470, 1959.

FRISCHKNECHT, P. M.; BATTIG, M.; BAUMANN, T. W.; *Phytochemistry*, 26, 707, 1987.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química nova*, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

- GODDIJN, O. J. M.; DE KAM, R. J.; ZANETTI, A.; SCHILPEROORT, R. A.; HOGE, J. H. C. Auxin rapidly down-regulates transcription of the tryptophan decarboxylase gene from *Catharanthus roseus*. *Plant Molecular Biology*, v. 18, n. 6, p. 1113–1120, 1992.
- GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; DE-LA-CRUZ-CHACÓN, I.; CASTRO-MORENO, M.; OROZCO-CASTILLO, J. A.; RILEY-SALDAÑA, C. A. Alkaloids and acetogenins in Annonaceae development: biological considerations. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 36, n. spe1, p. 01–16, 2014. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-29452014000500001&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452014000500001&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>.
- GROSSMANN, K. et al. Induction of abscisic acid is a common effect of auxin herbicides in susceptible plants. *Journal of Plant Physiology*, v. 149, n. 3–4, p. 475–478, 1996.
- GUO, X. R., YANG, L., YU, J. H., TANG, Z. H., & ZU, Y. G. 2007. Alkaloid variations in *Catharanthus roseus* seedlings treated by different temperatures in short term and long term. *Journal of Forestry Research*, 18(4), 313-315.
- HARBONE, I. B. 1999. baxter, H., “The Hand Book to flavonoid pigments “.
- HARKES, P. A. A.; KRIJBOLDER, L.; LIBBENGA, K. R.; WIJNSMA, R.; NSENGIYAREMGE, T.; VERPOORTE, R. Influence of various media constituents on the growth of *Cinchona ledgeriana* tissue cultures and the production of alkaloids and anthraquinones therein. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 4, n. 3, p. 199–214, 1985.
- HIRATA, K.; ASADA, M.; YATANI, E.; MIYAMOTO, K.; MIURA, Y.; *Planta Med.*
- HOFT M, VERPOORTE R, BECK E. Growth and alkaloid contents in leaves of *Tabernaemontana pachysiphon* Stapf (Apocynaceae) as influenced by light intensity, water and nutrient supply. *Oecologia* 107:160–169, 1996.
- HÖFT, M.; VERPOORTE, R.; Beck, E.; *Planta Med.* 1998, 64, 148.
- HOOK, I.; POUPAT, C.; AHOND, A.; GUÉNARD, D.; GUÉRITTE, F.; ADELIN, M. T.; WANG, X. P.; DEMPSEY, D.; BREUILLET, S.; POTIER, P.; *Phytochemistry*. 52, 1041, 1999.
- ITENOV, K.; MØLGAARD, P.; NYMAN, U.; *Phytochemistry* 1999, 52, 1229.
- JANSEN, G., JÜRGENS, HU, & ORDON, F. 2009. Efeitos da temperatura no teor de alcaloides de sementes de cultivares de *Lupinus angustifolius*. *Jornal de agronomia e ciência da colheita*, 195 (3), 172-177.

JOSHI, G.; SHUKLA, A.; SHUKLA, A. Synergistic response of auxin and ethylene on physiology of *Jatropha curcas* L. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 23, n. 1, p. 66–77, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00344-011-9230-z>>.

KAVATI R. 2013. Porta-enxertos em anonáceas. In: Anonáceas: propagação e produção de mudas.

KERBAUY, G.B. *Fisiologia Vegetal*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 431 p. A produção do Conhecimento nas Ciências Agrárias e Ambientais Capítulo 14.

KOEPPE, D. E.; ROHRBAUGH, L. M.; RICE, E. L.; WENDER, S. H.; *Physiol.*

KUMAR R, AGARWAL P, PAREEK A, TYAGI AK, SHARMA AK. Genomic survey, gene expression, and interaction analysis suggest diverse roles of ARF and Aux/IAA proteins in *Solanaceae*. *Plant Mol Biol Rep* 33:1552–157, 2015.

KUTCHAN, T. M.; GERSHENZON, J.; MOLLER, B.; DAVID, R.; GANG, D. R. Natural Products. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; GONES, R. (Ed.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. 2. ed. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2015. p. 1132–1221.

LAURSEN, T.; MØLLER, B. L.; BASSARD, J. E. 2015. Plasticity of specialized metabolism as mediated by dynamic metabolons. *Trends in Plant Science*, v. 20, n. 1, p. 20– 32.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the annonaceae. *Phytochemistry*, v. 21, n. 12, p. 2783–2813, 1982.

LJUNG, K. 2013. Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, v. 140, n. 5, p. 943-950.

LJUNG, K.; HULL, A. K.; CELENZA, J.; YAMADA, M.; ESTELLE, M.; NORMANLY, J.; SANDBERG, G. Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell*, v. 17, n. 4, p. 1090- 1104, 2005.

LÚCIO, A. S. S. C.; ALMEIDA, J. R. G. da S.; DA-CUNHA, E. V. L.; TAVARES, J. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Alkaloids of the Annonaceae: Occurrence and a Compilation of Their Biological Activities. In: *Alkaloids: Chemistry and Biology*. [s.l: s.n.]74p. 233–409, 2015.

MAAS, P. J. M.; KAMER, H. M. De; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R. De; RAINER, H. Annonaceae from Central-eastern Brazil. *Rodriguésia*, v. 52, n. 80, p. 65–98, 2001.

MAEDA, H.; DUDAREVA, N. The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in

MANTOAN, L. P. B.; ROLIM DE ALMEIDA, L. F.; MACEDO, A. C.; FERREIRA, G.; BOARO, C. S. F. Photosynthetic adjustment after rehydration in *Annona emarginata*. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 38, n. 6, p. 157, 30 jun. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11738-016-2171-1>>.

MAS, P. (2005). Circadian clock signaling in *Arabidopsis thaliana*: from gene expression to physiology and development. *The International Journal of Developmental Biology*, 49(5-6):491– 500.

MÁXIMO, P. et al. (2006) Chemotaxonomy of Portuguese *Ulex*: Quinolizidine alkaloids as taxonomical markers. *Phytochemistry*, v. 67, n. 17, p. 1943–1949.

MERCIER, H. Auxinas. In: KERBAUY, G. B. (ed.) *Fisiologia Vegetal*. São Paulo: Editora Guanabara Koogan S.A, 2004. p. 217-249.

MIMI, C.O., DE-LA-CRUZ-CHACÓN, I., CAIXETA SOUSA, M., APARECIDA RIBEIRO VIEIRA, M., ORTIZ MAYO MARQUES, M., FERREIRA, G., & SILVIA FERNANDES BOARO, C. (2021). Chemophenetics as a Tool for Distinguishing Morphotypes of *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer. *Chemistry & Biodiversity*, 18(10), e2100544.

MOSTAFA, G. G.; ABOU ALHAM, M. F. Effect of Gibberellic Acid and Indole 3-acetic Acid on Improving Growth and Accumulation of Phytochemical Composition in *Balanites aegyptiaca* Plants. *American Journal of Plant Physiology*, v. 6, n. 1, p. 36–43, 1 jan. 2011. Disponível em: <<http://www.scialert.net/abstract/?doi=ajpp.2011.36.43>>.

MUTHULAKSHMI, S.; PANDIYARAJAN, V. Influence of IAA on the vincristine content of *Catharanthus roseus* ( L ). G . Don . *Asian Journal of Plant Science and Research*, v. 3, n. 4, p. 81–87, 2013.

OLIVOTO, T.; NARDINO, M.; CARVALHO, I. R.; FOLLMANN, D. N.; SZARESKI, V. J.; FERRARI, M.; PELEGRIN, A. J. de; SOUZA, V. Q. de. 2017. Plant secondary metabolites and its dynamical systems of induction in response to environmental factors: A review. *African Journal of Agricultural Research*, v. 12, n. 2, p. 71–84, 2017. Disponível em: <<http://academicjournals.org/journal/AJAR/article-abstract/0F0007062355>>p. 943–950. Disponível em: <<http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.086363>>.

ONO, E.O., RODRIGUES, J.D.; DE PINHO, S.Z. Efeito de auxinas e boro no enraizamento de estacas caulinares de Kiwi retiradas em diferentes épocas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 33 (2), 221-223, 1998.

PASQUALI, G.; GODDIJN, O. J. M.; DE WAAL, A.; VERPOORTE, R.; SCHILPEROORT, R. A.; HOGE, J. H. C.; MEMELINK, J. Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus roseus* by auxin and elicitors. *Plant Molecular Biology*, v. 18, n. 6, p. 1121–1131, 1992.

PEREIRA, M. DE M., JÁCOME, R., ALCÂNTARA, A.F. DE C., ALVES, R.B., RASLAN, D.S., 2007. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *aspidosperma* (Apocynaceae). *Quim Nov.* 30, 970–983.

PICHERSKY, E.; LEWINSOHN, E. Convergent Evolution in Plant Specialized Metabolism. *Annual Review of Plant Biology*, v. 62, n. 1, p. 549–566, 2011. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-arplant-042110-103814>>.

Plants. *Annual Review of Plant Biology*, v. 63, n. 1, p. 73–105, 2012. Disponível em: <>.

RAMAWAT, K. G., MÉRILLON, J. M. (Eds.). 2013. *Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes* p. 1541-2662.

ROBINSON, T.; *Science* 1974, 184, 430.

ROCA-PÉREZ, L.; BOLUDA, R.; GAVIDIA, I.; PÉREZ-BERMÚDEZ, P.; *Phytochemistry*. 65, 1869, 2004.

RODRIGUES, T. J. D.; LEITE, I. C., *Fisiologia vegetal: hormônios das plantas*. Jaboticabal: Funep, 2004, 78 p.

ROSA, G. G. R; ZANANDREA, I; MAYER, N. A; BIANCHI, V. J. Propagação de porta-enxerto de *Prunus* spp. por estaquia: efeito do genótipo, do estágio de desenvolvimento do ramo e tipo de estaca. *Revista Ceres*, Viçosa, v. 64, n. 1, p. 90-97, 2017.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. *Fisiologia de plantas*. 4.ed. São Paulo: Cengage Learning, 2012, 776 p.

SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMANN G. 2007. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto Alegre: Ufrgs. 1104P.

SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMANN G. 2016. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Artmed Editora.

SINGH BRAR, H. et al. Girdling and grapevine leafroll associated viruses affect berry weight, colour development and accumulation of anthocyanins in ‘Crimson Seedless’ grapes during maturation and ripening. *Plant Science*, v. 175, n. 6, p. 885-897, 2008.

SOUSA MC, BRONZATTO AC, GONZÁLEZ-ESQUINCA AR, CAMPOS FG, DALANHOL SJ, BOARO CSF, MARTINS AL, DA SILVA ALMEIDA JRG, COSTA EV, DE-LA-CRUZ-CHACÓN I, FERREIRA G. The production of alkaloids in *Annona cacans* seedlings is affected by the application of GA4+7 + 6-Benzyladenine. *Biochemical Systematics and Ecology*. 84(April): 47–51, 2019.

SRIVASTAVA, L. M. Auxins. In: SRIVASTAVA, L. M. (Ed.). *Plant Growth and Development*. San Diego: Academic Press, cap.6, p.155-169, 2002.

STEVENSON, P. C.; NICOLSON, S. W.; WRIGHT, G. A. Plant secondary metabolites in nectar: impacts on pollinators and ecological functions. *Functional Ecology*, v. 31, n. 1, p. 65–75, 2017.

VANCE, N. C.; KELSEY, R. G.; SABIN, T. E.; *Phytochemistry*. 36, 1241, 1994

VERMA, N., SHUKLA, S. 2015. Impacto de vários fatores responsáveis pela flutuação nos metabólitos secundários das plantas. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* , 2 (4), 105-113.

VERPOORTE, R. Secondary Metabolism. In: *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2000. p. 1–29.

WALLAART TE, PRAS N, BEEKMAN AC, QUAX WJ. Seasonal variation of artemisinin and its biosynthetic precursors in plants of *Artemisia annua* of different geographical origin: Proof for the existence of chemotypes. *Planta Médica*. 66(1): 57–62, 2000.

WINK, M. Quinolizidine alkaloids: biochemistry, metabolism, and function in plants and cell suspension cultures. *Planta medica*, v. 53, n. 06, p. 509-514, 1987.

WU, T. S., WANG, M. L., & WU, P. L. 1996. Seasonal variations of carbazole alkaloids in *Murraya euchrestifolia*. *Phytochemistry*, 43(4), 785-789.

YASUMATSU, N. Studies on the chemical regulation of alkaloid biosynthesis in Tobacco plants. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 31, n. 12, 1441-1447, 1967.

ZIDORN, C., 2019. Plant chemophenetics – A new term for plant chemosystematics/plant chemotaxonomy in the macro-molecular era. *Phytochemistry* 163, 147–148.

### 3. Capítulo 1 - Artigo

#### **Impacto do ciclo circadiano na produção de alcaloides em mudas de *Annona emarginata* 'Terra-Fria'**

**Resumo** - *Annona emarginata* apresenta uma grande variedade de alcaloides com funções biológicas. Embora existam muitos estudos envolvendo alcaloides na família Annonaceae, nenhum deles avaliou variações na concentração dos alcaloides ao longo do dia e possíveis relações com o metabolismo primário. Visando avaliar essa variação, este experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições por parcela, com seis tratamentos (02h00, 06h00, 10h00, 14h00, 18h00 e 22h00). Foram analisados alcaloides totais e lirioidenina, trocas gasosas, fluorescência da clorofila a, enzimas antioxidantes, peróxido de hidrogênio, lipoperoxidação, açúcares solúveis totais, açúcares redutores, sacarose, trealose, amido e nitrato redutase. Nossos resultados mostraram que em *Annona emarginata* existe uma relação entre metabolismo primário e especializado, causando alterações na concentração de alcaloides totais, lirioidenina e na presença e ausência de alcaloides específicos em folhas e raízes. Concluímos que o melhor horário de coleta visando extrair maior concentração desses compostos é às 02h00 nas raízes.

**Palavras-chave:** Annonaceae, metabólito especializado, compostos nitrogenados

## **Abstract**

Impact of the circadian cycle on alkaloid production in *Annona emarginata* 'Terra-Fria' seedlings

Abstract - *Annona emarginata* presents a wide variety of alkaloids with biological functions. Although there are many studies involving alkaloids in the Annonaceae family, none of them evaluated variations in the concentration of alkaloids throughout the day and possible relationships with primary metabolism. In order to evaluate this variation, this experiment was installed in a completely randomized design with 4 replications per plot, with six treatments (02h00, 06h00, 10h00, 14h00, 18h00 and 22h00). Total alkaloids and liriodenine, gas exchange, fluorescence chlorophyll, antioxidant enzymes, hydrogen peroxide, lipid peroxidation, total soluble sugars, reducing sugars, sucrose, trehalose, starch and nitrate reductase were analyzed. Our results showed that in *Annona emarginata* there is a relationship between primary and specialized metabolism, causing changes in the concentration of total alkaloids, liriodenine and in the presence and absence of specific alkaloids in leaves and roots. We concluded that the best time of collection to extract greater concentration of these compounds is at 2:00 am in the roots.

Keywords: Annonaceae, specialized metabolite, nitrogen compounds

### 3.1. Introdução

O metabolismo especializado compartilha precursores com vias metabólicas primárias (WASTERACK, 2017). Assim, a concentração e perfil dos metabólitos especializados depende da disponibilidade de compostos oriundos do metabolismo primário (DUDAREVA, 2013).

Os alcaloides, compostos nitrogenados, são metabólitos especializados importantes na adaptação e sobrevivência do vegetal a diversos fatores bióticos e abióticos, como herbivoria, variações de temperatura, luminosidade, disponibilidade hídrica e sazonalidade. Tais metabólitos ainda constituem uma reserva de nitrogênio e atuam na defesa do vegetal, inclusive na proteção aos raios UV (JANSEN et al., 1998; SIMÕES et al., 2007; SIMÕES et al., 2016).

A espécie *Annona emarginata*, oriunda da mata atlântica, apresenta tolerância ao déficit hídrico severo, às podridões de raiz e colo e às brocas que atacam o colo das plantas, o que a faz excelente porta-enxerto para espécies comerciais como a atemoia (*Annona x atemoya* Mabb.) (TOKUNAGA, 2000; KAVATI, 2013; MANTOAN et al., 2016). Nessa espécie são encontrados alcaloides como a liriodenina, anonaina, reticulina e assimilobina em raízes e caules de plantas adultas, compostos que apresentam atividade bactericida, antifúngica, citotóxica e antiprotozoária (DE LA CRUZ et al, 2011; CHEN et al., 2013; LI et al., 2013; LÚCIO et al., 2015), que talvez tenham papel nas tolerâncias acima citadas. Apesar de muitos estudos envolverem alcaloides na família Annonaceae, não foram avaliadas variações na concentração dos alcaloides ao longo do dia bem como suas relações com o metabolismo primário.

Nesse sentido, a bioprospecção por moléculas de interesse apresenta registros desde 400 anos a.C (ROBINSON, 1974), época em que coletores de ervas orientavam para a coleta de algumas raízes à noite, outras antes do nascer do sol e outras durante o dia. Estas observações estão totalmente relacionadas à necessidade de entender como funciona a síntese dos metabólitos especializados de interesse ao longo do dia, uma vez que sua concentração pode variar por conta de diversos fatores, dentre os quais a luz, temperatura e disponibilidade hídrica (GOBBO-NETO, 2007).

Desta forma, este estudo tem por objetivo elucidar a variação da concentração de alcaloides durante o ciclo circadiano em *Annona emarginata* e sua relação com o metabolismo primário. Tendo em vista que o ritmo ou ciclo circadiano é um ciclo biológico de aproximadamente 24 horas, com suas variações principalmente de luz e temperatura, específico para cada indivíduo (BUJDOSO e DAVIS, 2013), tais achados

podem orientar o horário mais adequado para a coleta do material vegetal com maior concentração de alcaloides para bioprospecção e seu aproveitamento em biotecnologia de produtos.

### **3.2 Material e método**

#### **3.2.1 Obtenção do material vegetal e delineamento experimental**

O experimento foi realizado no Departamento de Biodiversidade e Bioestatística do Instituto de Biociências da Unesp Botucatu, sob as coordenadas de 48 ° 24'35 '' W de longitude e 22 ° 49'10 '' S de latitude e 800 m acima do nível do mar. As mudas de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer (exsicata depositada no herbário BOTU "Herbário Irina Delanova Gemtchujnicov", da Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, com o código 33118) foram obtidas junto à Coordenadoria de Desenvolvimento Rural Sustentável - CDRS de São Bento do Sapucaí e mantidas em casa de vegetação, onde as temperaturas, da folha e do ar, variaram de 19°C a 31°C, e a umidade relativa variou entre 43 e 67 % UR. Os tratamentos foram constituídos pelos horários de coleta das amostras (02h00, 06h00, 10h00, 14h00, 18h00, 22h00), com quatro repetições de uma planta por parcela. As plantas, com sete meses, foram mantidas nas sacolas originais do viveiro de origem com substrato, sendo irrigadas diariamente com água e semanalmente com solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) a 50% (BARON et al., 2013) por 21 dias.

#### **3.2.2 Alcaloides**

Para realizar a extração dos alcaloides as amostras de folhas e raízes foram secas em estufa de ventilação forçada, à temperatura constante de 40°C até atingir massa seca constante, e o método de extração foi ácido-base. O conteúdo total de alcaloides foi determinado em espectrofotômetro de UV-visível a 254 nm. Utilizou-se a liriodenina para elaboração da curva padrão ( $y = 0,0881x - 0,0112$ ,  $R^2 = 0,9949$ ), visto que, é um dos alcaloides mais distribuídos entre as espécies da família Annonaceae (DE LA CRUZ & GONZÁLEZ- ESQUINCA, 2012). Foi realizado o perfil e a quantificação de liriodenina nas amostras através de um Cromatógrafo líquido de alta eficiência (UHPLCfocused ThermoFisher-Scientific) com bomba gradiente e detector UVVIS com o uso de coluna de fase reversa C18 (150 x 4,6mm e diâmetro de partícula de 5µm). A fase móvel foi água (com ácido trifluoácetico pH 3,5) e metanol na proporção

de 30:70, com velocidade de fluxo de 1mm/min. em temperatura de 30°C. A detecção foi realizada em UV a 280 nm. Para a quantificação da lirioidenina foi realizada curva de calibração mediante a análise de série de soluções estoque ( $y=0,3658x + 1,114$ ;  $R^2 = 0,9992$ ) (adaptado de DE-LA-CRUZ-CHACÓN & GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2012).

### 3.2.3 Nitrato Redutase

A determinação da atividade da enzima nitrato redutase se baseia na produção de  $\text{NO}_2^-$  durante a incubação de corte de folhas em presença de  $\text{NO}_3^-$  de acordo com a metodologia proposta por MULDER et. al. (1969).

### 3.2.4 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a

As avaliações de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foram realizadas em todos os horários de coleta, sendo que a noite foi utilizada apenas a iluminação do IRGA visto que não havia luz ambiente, na terceira ou quarta folhas totalmente expandidas em todas as repetições, utilizando-se equipamento de sistema aberto de fotossíntese com analisador de  $\text{CO}_2$  e vapor d'água por radiação infravermelha (Infra Red Gas Analyser – IRGA, modelo GSF 3000, Walz). Para as trocas gasosas foram analisadas as seguintes variáveis: taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), taxa transpiratória ( $E$  vapor d'água  $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e concentração interna de  $\text{CO}_2$  na câmara subestomática ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), adotando-se as condições naturais de luminosidade médias (DFFFA) de cada momento de avaliação (0, 20, 860, 870, 50 e 0  $\text{PAR}_i$ , respectivamente) incidentes no interior do ambiente de cultivo. A partir destes dados foi possível calcular a eficiência de carboxilação da enzima ribulose 1, 5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) ( $A/C_i$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} / \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), determinada pela relação entre a taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  e a concentração interna de  $\text{CO}_2$  nas folhas.

Quanto à fluorescência da clorofila *a*, foram analisadas as seguintes variáveis: rendimento quântico potencial do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ), taxa de transporte de elétrons (ETR), “quenching” ou coeficiente de extinção fotoquímico ( $q_P$ ) (DEMMIG-ADAMS et al., 2008).

### **3.2.5 Extração e quantificação de açúcares**

Os açúcares solúveis totais foram extraídos do material foliar e radicular obtidos em cada momento de coleta, nas cinco repetições, de acordo com Garcia et al. (2006) e para determinar a concentração de açúcares solúveis totais foi realizada de acordo com Morris (1948). O amido foi extraído de acordo com Clegg (1956) e quantificado segundo Yemm e Folkes (1954). Para os açúcares redutores, utilizou-se a metodologia estabelecida por Miller (1959) e para a sacarose, a metodologia determinada por Passos (1996).

### **3.2.6 Atividade antioxidante**

Foram coletadas amostras de folhas e raízes das quatro repetições em cada horário de coleta. As amostras foram imersas imediatamente em nitrogênio líquido e posteriormente maceradas em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -20°C. Pesou-se aproximadamente 300 mg de cada amostra, as quais foram homogeneizadas com 4ml de tampão fosfato de potássio a 1M e pH 6,8, suplementado com 200mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP), centrifugado a 10000g por minuto a 4°C, e o sobrenadante, ou seja, o extrato enzimático, foi armazenado em eppendorfs em freezer -20°C (KAR & MISHRA, 1976). Para a determinação da atividade específica das enzimas antioxidantes foi necessário avaliar a concentração de proteínas utilizando a metodologia de Bradford, (1976), que consiste na leitura, em espectrofotômetro a 595nm, após 15 minutos da reação entre o extrato enzimático e o reativo de Bradford. A quantidade de proteína solúvel total é calculada a partir de uma equação de reta da curva de caseína.

Para determinar a atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) seguiu-se a metodologia proposta por Peixoto et al (1999), onde o sistema de reação foi composto por 50µL de extrato enzimático e 950µL de tampão fosfato de sódio a 0,5 molar pH 7,0 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5 mmol L<sup>-1</sup>. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 240nm e utilizou-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo a atividade expressa em nmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumido por min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> proteína.

Utilizou-se a metodologia proposta por Teisseire & Guy (2000) para determinar a atividade da enzima peroxidase (POD, EC. 1.11.1.7). O sistema de reação foi composto por 30µL de extrato enzimático diluído na proporção de 1:10 em tampão de extração, tampão fosfato de potássio 50mmol L<sup>-1</sup>pH 6,5; pirogalol 20mmolL<sup>-1</sup> e peróxido de hidrogênio 5 mmol L<sup>-1</sup>, com tempo de reação de 5 minutos em temperatura

ambiente. A formação de purpurogalina foi medida em espectrofotômetro UV-visível a 430nm e seu coeficiente de extinção molar ( $2,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) foi usado para calcular a atividade da catalase, expressa em  $\mu\text{mol}$  de purpurogalina  $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína.

Para verificação atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), foi utilizada a técnica de Beauchamp & Fridovich (1971). O sistema de reação é constituído por 50 $\mu\text{L}$  de extrato enzimático e tampão fosfato 50mM pH 7,8 com metionina, NBT, EDTA e riboflavina. A Atividade da SOD é expressa em U/mg proteína, onde U é a quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição da redução do NBT.

O conteúdo de peróxido de hidrogênio foi determinado pelo método de Alexieva et al. (2001), onde pesou-se 100mg de cada amostra, adionou-se ácido tricloroacético 0,1%, centrifugou-se a 12000G por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado na reação composta por 0,5ml de extrato, 0,5 ml de tampão fosfato 0,1M pH 7,0 e 2,0ml de iodeto de potássio a 1M, tal reação deve ficar no escuro por uma hora e então realizar a leitura em espectrofotômetro a 390nm. A concentração de peróxido de hidrogênio é calculada a partir de uma curva padrão de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e os valores são expressos em  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$  de massa seca.

A peroxidação de lipídeos estimada pela concentração de malondialdeído (MDA) ( $\text{nmol TBARS g}^{-1}$ ), foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Heath & Paker (1968). Pesou-se 300mg de material vegetal macerado e congelado, que foi homogeneizado com 5ml de solução contendo ácido tiobarbitúrico 0,25% e ácido tricloroacético 10%.

### **3.2.7 Análise dos dados**

As médias dos resultados obtidos foram submetidas à análise de variância, homogeneidade e normalidade dos dados que quando significativos foram submetidas ao teste Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software SigmaPlot 12.5.

## **3.3 Resultados e discussão**

A produção de alcaloides totais e liriodenina foi alterada ao longo do dia, o que confirma a influência do ciclo circadiano no metabolismo de alcaloides de *Annona emarginata*. Trabalhos realizados com alcaloides em Annonaceae (CASTRO-MORENO, 2013; RILEY SALDAÑA et al., 2017; SOUZA et al., 2019; DE LA CRUZ-

CHACÓN et al., 2019) não registram o horário de coleta das amostras e consequentemente não é possível comparar a concentração produzida ao longo do dia neste estudo com os autores acima citados (CASTRO-MORENO, 2013; RILEY SALDAÑA et al., 2017; SOUZA et al., 2019; DE LA CRUZ-CHACÓN et al., 2019). Sendo assim, este trabalho é pioneiro na avaliação da variação circadiana da produção de alcaloides em Annonaceae, podendo auxiliar na definição do melhor momento de coleta de alcaloides e da liriodenina.

Neste trabalho as raízes são os órgãos de maior produção de alcaloides e de liriodenina (tabela 1), conforme já observado em espécies desta família (DE LA CRUZ-CHACÓN et al., 2019) e espécie (MIMI et al., 2021).

Tabela 1: Concentração de alcaloides totais e liriodenina ( $\mu\text{g g}^{-1}$  massa seca) em folhas e raízes de plantas jovens de *Annona emarginata* e atividade da nitrato redutase nas folhas ( $\mu\text{g N-NO}_2 \text{ g de massa fresca}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), em diferentes horários do ciclo circadiano.

Horário Coleta/ t°C	Alcaloides totais ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )		Liriodenina ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )		Nitrato Redutase
	Folhas	Raízes	Folhas	Raízes	Folhas
02:00 / 19°C	37.98 Bb* <sup>1</sup>	139.99 Aa	0 Bb	25.95 Aa	0.05125 B
06:00 / 19°C	43.82 ABa	28.49 Bb	0 Bb	14.97 Ba	0.05750 AB
10:00 / 28°C	50.46 ABa	40.85 Bb	4.51 Ab	8.62 Ca	0.11750 A
14:00 / 31°C	62.41 Aa	49.33 Bb	0 Bb	6.79 Ca	0.08975 AB
18:00 / 25°C	44.05 ABb	55.62 Bb	3.82 Ab	20.26 ABa	0.08775 AB
22:00 / 21°C	45.27 ABb	56.76 Bb	4.09 Ab	24.85 Aa	0.05375 B
	p:0,0001 f:23,339	p:0,0001 f:10,281	p:0,0001 f:12,338	p:0,0002 f:15,621	p:0,0001 f:30,642

\*<sup>1</sup>Médias na coluna seguidas pela mesma letra maiúscula e médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha dentro da mesma variável, não apresentam diferença significativa entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Durante o ciclo circadiano verificamos que as maiores concentrações de alcaloides totais foram observadas nas raízes na ausência de luz e temperaturas mais baixas (as 02h00 e 19°C) e as maiores concentrações de liriodenina foram detectadas

com temperaturas entre 19°C e 21°C também na ausência de luz (02h00 e 22h00 respectivamente) nas raízes. O incremento de alcaloides em raízes em períodos de menor luminosidade também foi observado por Hüther et al. (2018) em plantas de *Carapichia ipecacuanha*. Esses resultados confirmam que as respostas à variação de temperatura e luz estão intrinsecamente ligadas à regulação do relógio circadiano (PANTER et al., 2019).

Nas folhas as concentrações de alcaloides revelam resultado distinto das raízes, sem um padrão de resposta definido, uma vez que a maior concentração de alcaloides totais é observada com maior temperatura, na presença de luz (31°C às 14h00), diferindo do que observamos com 19°C no escuro (02h00). A liriodenina é encontrada em baixas concentrações nas folhas ao longo do dia, não sendo detectada às 02h00, 06h00 e 14h00. Esses resultados diferem daqueles observados por Wallaart et al. (2000) que verificaram maiores produções do alcaloide artemisina nas folhas de *Artemisia annua* com temperaturas mínimas (geada noturna) e redução da concentração de artemisina nas temperaturas mais elevadas. A produção de alcaloides nas folhas também pode estar relacionada com a luz para ativação de enzimas ou transcrição de genes que participam da síntese desses compostos (CREUS et al., 2003; HENRIQUES et al., 2004). No entanto, Hoft et al. (1996) e Rossa et al. (2017) observaram incremento de alcaloides em folhas em menor luminosidade, o que ocorreu neste experimento com alcaloides totais e liriodenina em raízes.

Além do conteúdo de alcaloides totais e liriodenina, também verificamos a presença de alguns alcaloides. Vimos que alguns alcaloides ocorrem em horários e órgãos específicos enquanto outros aparecem em ambos os órgãos em todos os horários de coleta, conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2. Presença (x) ou não detecção (-) de assimilobina, discretina, lanulinosina, laurotetanina, liriodenina, N-Metillaurotetanina, norglaucina, norpredicentina, oxoglaucina, reticulina, xilopina e xilopinina em raízes e folhas de *Annona emarginata*.

	02:00	06:00	10:00	14:00	18:00	22:00
Folhas						
Assimilobina	-	-	X	X	-	-
Discretina	-	-	-	-	-	-

Lanulinosina	X	X	X	X	X	X
Laurotetanina	-	X	X	X	-	X
Liriodenina	X	X	X	X	X	X
N-Metil Laurotetanina	X	X	X	X	X	X
Norglaucina	-	-	-	-	-	-
Norpredicentina	X	-	-	-	-	-
Oxoglaucina	-	-	-	-	-	-
Reticulina	X	-	X	-	-	-
Xilopina	-	X	X	X	-	X
Xilopinina	X	X	X	X	X	X
Raízes						
Assimilobina	-	X	X	X	X	-
Discretina	-	-	-	-	X	-
Lanulinosina	X	X	X	X	X	X
Laurotetanina	X	X	X	X	X	X
Liriodenina	X	X	X	X	X	X
N-Metil Laurotetanina	X	X	X	X	X	X
Norglaucina	-	-	-	X	-	-
Norpredicentina	X	X	X	X	X	X
Oxoglaucina	-	-	-	-	-	-
Reticulina	-	-	-	-	-	-
Xilopina	X	X	X	X	X	X
Xilopinina	-	X	X	X	-	X

A letra X significa presença e o símbolo “-“ significa não detectado.

Entre os alcaloides analisados (tabela 2), alguns foram encontrados exclusivamente em raízes, como a norglaucina às 14h00 e a discretina às 18h00. Nas folhas verificamos a reticulina encontrada às 02h00 e 10h00. Por outro lado, os alcaloides lanuginosina, liriodenina e N-metil laurotetatina puderam ser identificados em ambos os órgãos, em todos os momentos, sugerindo que são os alcaloides mais presentes na espécie. Assimilobina, norpredicentina, xilopina, xilopinina e alcalóides laurotetanina também são encontrados em raízes e folhas, mas em momentos específicos. No entanto, a oxoglaucina não foi identificada nas amostras.

Os alcaloides escolhidos para análise já foram identificados em outras espécies de Annonaceae (LÚCIO et al., 2015) e algumas até em *Annona emarginata* (DE LA CRUZ-CHACÓN et al., 2011). Além disso, alcaloides como a liriodenina tiveram sua atividade biológica confirmada, como ação antifúngica, antiprotozoária e antibacteriana (DE LA CRUZ-CHACÓN ET AL., 2011; DE LA CRUZ-CHACÓN e GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2012). No entanto, não há registros sobre a flutuação diária desses alcaloides, o que destaca a novidade do presente estudo.

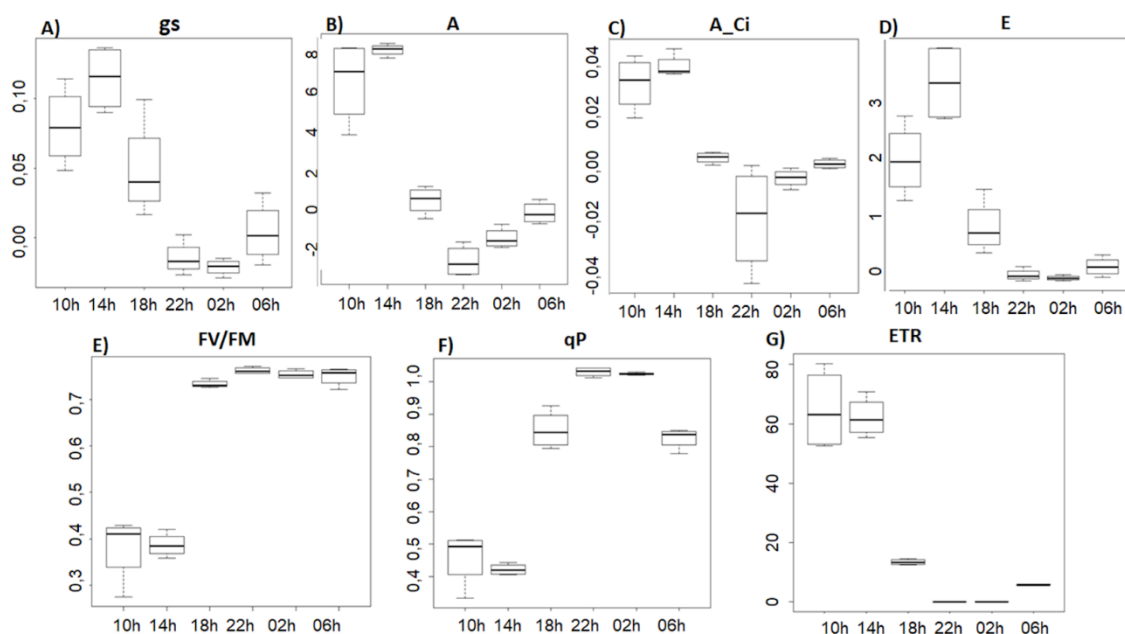
Essa variação dos alcaloides durante o ciclo circadiano pode estar relacionada à atividade da enzima nitrato redutase que atua na fixação do nitrogênio, componente essencial da molécula do alcaloide. (YANEVA et al., 2000; MENGEL E KIRKBY, 2001). Os resultados da atividade desta enzima, com maior pico às 10h00, indicam que ela estava fixando maior quantidade de nitrogênio para a síntese de alcaloides nas folhas, que atinge a maior concentração às 14h00 (Tabela 2). Na fase escura, sem atividade de nitrato redutase, a menor concentração de liriodenina e alcaloides totais é observada nas folhas (principalmente às 02h00), e o poder redutor para síntese de alcaloides vem da oxidação de compostos orgânicos, fornecendo N para maior síntese de alcaloides à noite nas raízes (HIPKIN et al., 1984; VINCENTZ et al., 1993).

A atividade da enzima nitrato redutase às 10h está relacionada ao metabolismo de N e C (FRITZ et al., 2006), com maior atividade quando há maior fixação de N, utilizado tanto para produção de alcaloides (MENGEL e KIRKBY, 2001) como na composição do aparelho fotossintético e síntese de esqueletos de carbono (DODD et al., 2005; PAULA NETO et al., 2009; NUNES-NESSI et al., 2010; CAMPOS et al., 2014; KAUR et al., 2017). Os esqueletos de carbono da fotossíntese são utilizados na assimilação e fixação de nitrogênio e demandam energia química na forma de ATP e NADPH+ para a síntese de compostos como proteínas e aminoácidos, necessários na rota de síntese de alcaloides (HIKOSAKA et al., 2004; NUNES-NESSI et al., 2010 e BASSI et al., 2018).

Além disso, às 10h00 e 14h00, houve maior taxa de transporte de elétrons (ETR) (figura 1), que pode ter sido utilizada para reduzir nitrato e produzir alcaloides nas folhas (maiores concentrações em alcaloides totais às 14h00). Menores valores de eficiência do fotossistema II (Fv/Fm) e supressão fotoquímica (qP) (figura 1) indicam que a intensidade de radiação neste momento não causou fotoinibição dos fotossistemas (GAUSLAA E SOLHAUG, 2000). Os maiores valores de assimilação (A), condutância estomática (gs), eficiência de Rubisco (A/ci) e taxa de transpiração (E) reforçam que a

fotossíntese é naturalmente afetada pelo ciclo circadiano (YOUNGSUNG et al., 2017), assim como a síntese de alcaloides totais.

Figura 1: Trocas gasosas e fluorescência em função das horas durante o ciclo circadiano em *Annona emarginata*.



Trocas gasosas: A) taxa de condutância estomática (gs) ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); B) taxa de assimilação (A) ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); C) eficiência de carboxilação (A/Ci) ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1} / \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); D) taxa de transpiração (E) ( $\text{mmol de vapor d'água m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).  
Fluorescência: E) rendimento efetivo do fotossistema II (FV/FM); F) “quenching” coeficiente de extinção fotoquímico (qp); G) Taxa de transporte de elétrons (ETR).

A relação entre metabolismo primário e especializado no ciclo circadiano também é confirmada pela produção de açúcares ao longo do dia, com maiores concentrações de açúcares totais e amido nas folhas sendo observadas às 10h00. O pico de açúcares redutores às 14h00 (Tabela 2) nos remete ao fato de maior disponibilidade de esqueletos de carbono e energia para a síntese de compostos como aminoácidos, necessários para a rota de síntese de alcaloides (Hikosaka et al., 2004; Nunes-Nessi et al., 2010), justificando a maior produção de alcaloides nas folhas às 14h00.

Tabela 2. Açúcares totais, amido, sacarose, açúcares redutores e trealose (ug/g) analisados em folhas e raízes de mudas jovens de *Annona emarginata* em cada horário de coleta.

Horário	Açúcares Totais	Amido	Sacarose	Açúcares Redutores	Trealose
Coleta	Folhas				
02h00	196,4 C* <sup>1</sup>	10,6 B	56,63 A	0,065BC	6,47 B
06h00	283,1 AB	11,3AB	56,97 A	0,057 C	6,75 B
10h00	320,7 A	12,4 A	57,01 A	0,067BC	9,85 B
14h00	280,9 B	10,7 B	56,14 A	0,081 A	0,00 B
18h00	267,4 B	10,8 B	55,00 A	0,061 C	36,18 A
22h00	246,6 B	11,4 AB	53,70 A	0,074 B	40,11 A
	p:0,0001** f:15,271	p:0,0001** f:21,455	p:0,0005* f:35,662	p:0,0001** f:18,612	p:0,0002** f:20,851
	Raízes				
02h00	58,8 A	1,53 A	38,02 C	0,031 C	1,01 A
06h00	48,5 AB	0,76 D	55,75 A	0,051 A	0,87 AB
10h00	60,1 A	1,35 B	56,58 A	0,042 AB	1,15 A
14h00	58,3 A	1,47 A	56,77 A	0,046 AB	0,99 A
18h00	38,5 B	0,82 C	41,33 B	0,042AB	0,94 AB
22h00	40,5 B	1,06BC	40,85 B	0,037 B	0,56 B
	p:0,0002** f:23,003	p:0,0001** f:11,667	p:0,0002** f:18,942	p:0,0001** f:20,648	p:0,0002** f:23,383

\*<sup>1</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ao mesmo tempo em que a maior concentração de alcaloides totais ocorre nas folhas às 14h00, associada a uma maior redução de amido e trealose (indicando gasto energético), nas raízes há maior concentração de amido, trealose e sacarose (embora em concentrações mais baixas do que nas folhas) e baixas concentrações de alcaloides totais e liriodenina. A partir desse momento, observa-se diminuição de amido, sacarose e trealose nas raízes (com valores menores às 18h00 e 22h00), o que pode indicar consumo de energia para a síntese de alcaloides totais e liriodenina, resultando em maiores concentrações às 02h00, quando a sacarose tem um valor mais baixo enquanto o amido e a trealose se acumulam novamente.

Assim, a conversão de amido em sacarose para fornecer esqueletos de carbono para síntese orgânica relatada por Hikosaka et al. (2004); Gibon et al. (2006); Graf et al. (2010); Nunes-Nessi et al. (2010); Martins et al. (2013) e Locke et al (2018), ocorre de forma diferente em folhas e raízes de *Annona emarginata* para a síntese de alcalóides durante o ciclo circadiano. Seiki et al. (2017) também sugerem que a taxa máxima de degradação do amido pode ser definida pelo relógio circadiano e pela trealose, pois quando há redução da trealose, pode ocorrer degradação do amido (Viana, 2021), assim

como o contrário é verdadeiro, o aumento da concentração de trealose pode inibir a degradação do amido (Martins et al., 2013).

Fernandez et al (2010) demonstram que a trealose pode estar relacionada ao controle do estresse biótico e abiótico, porém, o acúmulo de trealose pode reduzir a sinalização de ERO e afetar a resposta de defesa da planta. Nesta pesquisa, em momentos em que há maior formação de espécies reativas de oxigênio, foi possível observar que a trealose pode ter auxiliado nas reações antioxidantes, preservando membranas e biomoléculas, conforme estudos anteriores (CROWE, 2007; MILLER et al., 2008). Afinal, no horário de maior produção de alcaloides nas raízes (às 02h00), o nível de peróxido de hidrogênio estava alto, mas não houve variação significativa na atividade enzimática (Tabelas 3 e 4). Também naquele momento havia baixa concentração de lipoperóxidos (tabela 4), levando a crer que a trealose elevada estava realmente ajudando a preservar as membranas.

Com relação à atividade das enzimas nas reações antioxidantes, verificou-se que a catalase, apesar de ser responsável pela inativação do peróxido de hidrogênio gerado na fotorrespiração (IGAMBERDIEV e LEA, 2002), permaneceu constante em todos os momentos de coleta em ambos os órgãos. No entanto, a superóxido dismutase (SOD), que é considerada a primeira linha de defesa contra ERO, apresentou maior atividade nos momentos de coleta seguindo as maiores concentrações de alcaloides em folhas e raízes, sugerindo seu papel no controle de ERO gerados na síntese de alcaloides. A variação da atividade da POD em folhas e raízes não ajuda a explicar as concentrações de alcaloides encontradas.

O peróxido de hidrogênio, considerado um mensageiro secundário para os sinais gerados por espécies reativas de oxigênio, atua como regulador em processos fisiológicos como fotossíntese e fotorrespiração (GILL e TUTEJA, 2010). Ao regular a fotossíntese, o peróxido de hidrogênio regula a disponibilidade de esqueletos de carbono para assimilação de N e síntese de alcaloides (NUNES-NESSI et al., 2010). Essas observações estão de acordo com as maiores concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em momentos de maior produção de alcaloides neste estudo. Huang et al. (2016) observaram uma relação entre o perfil antioxidante e a síntese de compostos no metabolismo especializado no momento das principais reações redox, como aquelas envolvidas na produção de alcaloides. A indução da formação de espécies reativas de oxigênio é a resposta inicial de defesa das plantas e ocorre em interação com o ciclo

circadiano (BRODY, 2019; ZHANG et al., 2019), pois segundo Griebel e Zeier (2008) a planta tem sua defesa reduzida ao entardecer quando comparada ao amanhecer.

Tabela 3. Atividades das enzimas superóxido dismutase (U SOD mg<sup>-1</sup> g massa fresca<sup>-1</sup>), catalase (μKat μg protein<sup>-1</sup>) e peroxidase (μKat μg protein<sup>-1</sup>) em diferentes órgãos em cada horário de coleta

Horário coleta	Folhas		POD
	SOD	CAT	
02h00	1,93 C* <sup>1</sup>	0,8 E <sup>-05</sup> A	1,99 A
06h00	2,35 BC	1,3E <sup>-05</sup> A	1,62 B
10h00	2,72 BC	0,8 E <sup>-05</sup> A	1,97 A
14h00	3,24 B	0,8 E <sup>-05</sup> A	1,88 A
18h00	6,67 A	1,1E <sup>-05</sup> A	2,07 A
22h00	1,92 C	1,1E <sup>-05</sup> A	1,95 A
	p:0,0001** f:22,019	p:0,0005* f:30,118	p:0,0005* f:20,342
Raízes			
02h00	0,07 D	1,7E <sup>-05</sup> A	0,68 B
06h00	0,25 A	1,6E <sup>-05</sup> A	0,70 A
10h00	0,17 B	1,5E <sup>-05</sup> A	0,69 AB
14h00	0,13 C	1,5E <sup>-05</sup> A	0,68 B
18h00	0,09 D	1,6E <sup>-05</sup> A	0,68 B
22h00	0,08 D	1,5E <sup>-05</sup> A	0,69 AB
	p:0,0003** f:11,019	p:0,0005* f:40,387	p:0,0001** f:21,542

\*<sup>1</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4. Concentração de lipoperóxido (nmol TBARS g<sup>-1</sup>) e peróxido de hidrogênio (μM/mg) nos diferentes órgãos em cada horário de coleta

Horário coleta	Lipoperóxido (nmol TBARS g <sup>-1</sup> )		Peróxido de hidrogênio (μM/mg)	
	Folha	Raiz	Folha	Raiz
02h00	19485,1 D* <sup>1</sup>	18,02 C	6.85 A	17.32 A
06h00	16686,7 E	26,49 A	6.84 A	12.58 A
10h00	7782,5 F	21,17 BC	6.93 A	12.83 A
14h00	32401,8 B	21,02 BC	6.86 A	14.63 A
18h00	35535,5 A	21,66 BC	6.14 B	2.66 B
22h00	30170,9 C	21,96 B	6.59 AB	2.20 B
	p:0,0002	p:0,0001	p:0,0001	p:0,0002

---

f:8,021	f:10,218	f:20,552	f:27,626
---------	----------	----------	----------

---

\*<sup>1</sup>As médias seguidas pelas mesmas letras na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Desta forma, este é o primeiro trabalho a avaliar a variação da produção de alcaloides totais e liriodenina em Annonaceae durante o ciclo circadiano, visando a interpretação de aspectos fisiológicos que poderá auxiliar a definição do momento de coleta, com foco na bioprospecção e biotecnologia, conforme sugerem alguns estudos (WARTHEN et al., 1969; CHEN et al, 2013). A pesquisa demonstrou que o ciclo circadiano influencia a relação da produção de alcaloides com o metabolismo primário em *Annona emarginata*.

### 3.4 Conclusão

O estudo demonstrou que há variação na concentração de alcaloides totais e de liriodenina em função do ciclo circadiano em plantas jovens de *Annona emarginata*, ficando clara a relação entre o metabolismo primário e a produção de alcaloides. Concluímos que o melhor horário para coleta de material visando maior concentração de alcaloides totais e liriodenina,, foi as 02h00, nas raízes.

### Referências

- ALEXIEVA, V., SERGIEV, I., MAPELLI, S., & KARANOV, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment*, 24(12), 1337-1344.
- BARON, D.; FERREIRA, G.; RODRIGUES, J.D.; BOARO, C.S.F.; MACEDO, A.C. Gas exchange, physiological indexes and ionic accumulation in *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer seedlings in nutrients solution. *Revista Brasileira de Fruticultura* (Impresso), v. 35, p. 361-376, 2013.
- BASSI, D.; MENOSSI, M.; MATTIELLO, L. (2018) Nitrogen supply influences photosynthesis establishment along the sugarcane leaf. *Scientific Reports*, 8, 2327.
- BEAUCHAMP, C., & FRIDOVICH, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 44(1), 276-287.
- BRADFORD, MM (1976). Um método rápido e sensível para a quantificação de quantidades de microgramas de proteína utilizando o princípio da ligação proteína-corante. *Bioquímica analítica*, 72 (1-2), 248-254.

- CASTRO-MORENO, M. et al. (2013) Influence of seasonal variation on the phenology and liriodenine content of *Annona lutescens* (Annonaceae). *Journal of Plant Research*, [S. l.], v. 126, n. 4, p. 529–537.
- CHEN, C.-Y.; WU, H.-M.; CHAO, W.-Y.; LEE, C.-H. (2013) Review on pharmacological activities of liriodenine. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 7, n. 18, p. 1067–1070.
- CREUS, J. A. (2003). Fisiología y metabolismo vegetal, bases de la actividad de las plantas sobre los seres vivos. Cambios producidos por agentes abióticos. *Natura Medicatrix: Revista médica para el estudio y difusión de las medicinas alternativas*, 21(6), 336-341
- CROWE, JH (2007). Trehalose como “acompanhante químico”. Aspectos moleculares da resposta ao estresse: acompanhantes, membranas e redes, 143-158.
- DE LA CRUZ, C. I.; GONZÁLEZ, E. A. R.; GUEVARA, F. P.; JÍMENEZ, G. L. F. (2011) Liriodenine, early antimicrobial defence in *Annona diversifolia*. *Zeitschrift für Naturforschung*, v. 66, p. 377–384.
- DE LA CRUZ, C. I.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. (2012) Liriodenine alkaloid in *Annona diversifolia* during early development. *Natural product research*, v. 26, n. 2, p. 42–49.
- DEMMIG-ADAMS, B., EBBERT, V., ZARTER, CR, & ADAMS, WW (2008). Características e emprego dependente da espécie de dissipação térmica flexível versus sustentada e fotoinibição. Em *Fotoproteção, fotoinibição, regulação gênica e meio ambiente* (pp. 39-48). Springer, Dordrecht.
- DODD, A.N.; SALATHIA, N.; HALL, A.; KÉVEI, E.; TÓTH, R.; NAGY, F., HIBBERD, J.M.; MILLAR, A.J. E WEBB, A.A.R. (2005) Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science* 309(5734): 630 – 633.
- DUDAREVA, N.; KLEMPIEN, A.; MUHLEMANN, J. K.; KAPLAN, I. (2013) Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New phytologist*, 198, 16-32.
- FRITZ, C.; PALACIOS-ROJAS, N.; FEIL, R.; STITT, M. (2006) Regulation of secondary metabolism by the carbon–nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *The Plant Journal*, 46, 533-548.

- GAUSLAA, Y., & SOLHAUG, K. (2000). Danos de alta intensidade luminosa ao foliose Lichen Lobaria Pulmonaria dentro da floresta natural: a aplicabilidade dos métodos de fluorescência com clorofila. *The Lichenologist*, 32 (3), 271-289.
- GILL, SS, & TUTEJA, N. (2010). Espécies reativas de oxigênio e maquinaria antioxidante na tolerância ao estresse abiótico em plantas cultivadas. *Plant fisiologia e bioquímica*, 48 (12), 909-930.
- GRAF A, SCHLERETH A, STITT M, SMITH AM. (2010). Circadian control of carbohydrate availability for growth in Arabidopsis plants at night. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(20):9458–9463. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914299107>
- HEATH, RL, & PACKER, L. (1968). Fotoperoxidação em cloroplastos isolados: I. Cinética e estequiometria da peroxidação de ácidos graxos. *Arquivos de bioquímica e biofísica*, 125 (1), 189-198.
- HIKOSAKA, K. (2004). Interspecific difference in the photosynthesis–nitrogen relationship: patterns, physiological causes, and ecological importance. *Journal of Plant Research*, 117, 481-494.
- HIPKIN, C.R.; AL CHARBI, A.; ROBERTSON, K.P. (1984) Studies on nitrate reductase in British angiosperm. II- variation in nitrate reductase activity in natural populations. *New Phytologist*, v.97, p. 641-651.
- HOFT M, VERPOORTE R, BECK E (1996) Growth and alkaloid contents in leaves of *Tabernaemontana pachysiphon* Stapf (Apocynaceae) as influenced by light intensity, water and nutrient supply. *Oecologia* 107:160–169.
- HUANG, S.; AKEN, O. V.; CHWARZLÄNDER, M.; BELT, K.; MILLAR, A. H. (2016) The roles of mitochondrial reactive oxygen species in cellular signaling and stress response in plants. *Plant Physiology*, 171 (3): 1551-1559.
- IGAMBERDIEV, AU, & LEA, PJ (2002) O papel dos peroxissomos na integração do metabolismo e da diversidade evolutiva dos organismos fotossintéticos. *Phytochemistry* , 60 (7), 651-674.
- JANSEN, M.A., V. GABA Y B.M. GREENBERG. (1998) Higher plants and UV-B radiation: Balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Science* 3: 131-135.

- KAR, M., & MISHRA, D. (1976). Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant physiology*, 57(2), 315-319.
- KAUR, B.; KAUR, G.; ASTHIR, B. (2016) Biochemical aspects of nitrogen use efficiency: An overview. *Journal of plant nutrition*, 40, 506-523.
- KAVATI, R. Porta-enxertos em anonáceas. In: Anonáceas: propagação e produção de mudas. FERREIRA, G.; KAVATI, R.; BOARO, C.S.F.; BORTOLUCCI, T.; LEONEL, S. (Editores). Botucatu, FEPAF, p. 111-123, 2013.
- LÚCIO, A. S. S. C.; ALMEIDA, J. R. G. da S.; DA-CUNHA, E. V. L.; TAVARES, J. F.; BARBOSA FILHO, J. M. (2015). Alkaloids of the Annonaceae: Occurrence and a Compilation of Their Biological Activities. In: *Alkaloids: Chemistry and Biology*. [s.l.: s.n.]74p. 233–409.
- MANTOAN, L. P. B.; ROLIM DE ALMEIDA, L. F.; MACEDO, A. C.; FERREIRA, G.; BOARO, C. S. F. (2016) Photosynthetic adjustment after rehydration in *Annona emerginata*. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 38, n. 6, p. 157.
- MARTINS, M.C.M., HEJAZI, M., FETTKE, J. et al. (2013) Feedback inhibition of starch degradation in *Arabidopsis* leaves mediated by trehalose 6-phosphate. *Plant Physiol.* 163, 1142–1163.
- MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. (2001) Principles of plant nutrition. 5th ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 849p.
- MILLER, G., SHULAEV, V., & MITTLER, R. (2008). Sinalização reativa de oxigênio e estresse abiótico. *Physiologia plantarum*, 133 (3), 481-489.
- NUNES-NESSI, A.; FERNIE, A. R.; STITT, M. (2010) Metabolic and Signaling Aspects Underpinning the Regulation of Plant Carbon Nitrogen Interactions. *Molecular Plant*, 3, 973-996.
- PEIXOTO, PHP, CAMBRAIA, J., SANT'ANNA, R., MOSQUIM, PR, & Moreira, MA (1999). Efeitos do alumínio na peroxidação lipídica e na atividade de enzimas do metabolismo oxidativo em sorgo. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 11 (3), 137-143.
- RALPHS MH, MANNERS GD, GARDNER DR (1998) Influence of light and photosynthesis on alkaloid concentration in larkspur. *J Chem Ecol* 24:167–182.
- RILEY-SALDAÑA, C. A.; CRUZ-ORTEGA, M. D. R.; MARTÍNEZ VÁZQUEZ, M.; DE-LA-CRUZ-CHACÓN, I.; CASTRO-MORENO, M.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A.

R. (2017) Acetogenins and alkaloids during the initial development of *Annona muricata* L. (Annonaceae). *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 72, n. 11–12, p. 497–506.

SEIKI, M.; OHARA, T.; HEARN, T.J.; FRANK, A.; DA SILVA, V.C.H.; CALDANA, C.; SATAKE, A. (2017). O ajuste do oscilador circadiano de *Arabidopsis* pela sinalização do açúcar dita a regulação do metabolismo do amido. *Scientific Reports*, 7, 8305.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. (2007) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto Alegre: Ufrgs. 1104p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. (2016) *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Artmed Editora.

SOUSA, M. C.; BRONZATTO, A. C.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; CAMPOS, F. G.; DALANHOL, S. J.; BOARO, C. S. F.; MARTINS, A. L.; DA SILVA ALMEIDA, J. R. G.; COSTA, E. V.; DE-LA-CRUZ-CHACÓN, I.; FERREIRA, G. (2019) The production of alkaloids in *Annona cacans* seedlings is affected by the application of GA4+7 + 6-Benzyladenine. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 84, n. April, p. 47–51.

TEISSEIRE, H., & GUY, V. (2000). Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). *Plant science*, 153(1), 65-72.

TOKUNAGA, T. (2000) *A cultura da atemoia*. Campinas: CATI. 80p. (Boletim Técnico, 233).

VIANA, A. J. C. (2014). O fator de transcrição bZIP AtbZIP63 interage com o relógio circadiano e afeta a degradação do amido impactando o crescimento e o desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana*.

VINCENTZ, M.; MOUREAUX, T.; LEYDECKER, M.T. (1993) Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *The Plant Journal*, v.3, p.313-324.

WALLAART, T. E et al. (2000) Seasonal variation of artemisinin and its biosynthetic precursors in plants of *Artemisia annua* of different geographical origin: Proof for the existence of chemotypes. *Planta Médica*, [S. l.], v. 66, n. 1, p. 57–62.

WARTHEN D, GOODEN EL, JACOBSON M. (1969) Tumor inhibitors: lirioidenine, a cytotoxic alkaloid from *Annona glabra*. *J Pharmacology Science*. 58(5):637-8.

WASTERNAK, C. (2017) A plant's balance of growth and defense – revisited. *New Phytologist*, v. 215, n. 4, p. 1291–1294.

YANEVA, I. A.; BAYDANOVA, V. D.; VUNKOVA-RADEVA, R. V. (2000) Nitrate reductase activation state in leaves of molybdenum-deficient winter wheat. *Journal of Plant Physiology*, v.157, p.495-501.

#### 4. Capítulo 2 – Artigo

##### **Modulação da síntese de alcaloides pela ação de ácido indolilacético em mudas de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer.**

##### **Resumo**

A família Annonaceae apresenta uma ampla variedade de alcaloides com conhecidas funções biológicas de interesse agrônomo e farmacêutico principalmente. *Annona emarginata* é uma espécie nativa que possui grande número de alcaloides. A rota de síntese dos alcaloides é compartilhada com as auxinas, podendo competir por substrato cuja síntese adequada depende do ótimo funcionamento do metabolismo primário. Por essa razão, esse experimento foi instalado com o objetivo de avaliar como o ácido indolilacético (IAA) altera a produção de alcaloides e o metabolismo primário, o que poderá ser importante ferramenta para otimizar a produção em larga escala de alcaloides de *Annona emarginata*. O delineamento empregado foi inteiramente casualizado, em um fatorial 3 X 5 com primeiro fator sendo os reguladores (controle, aplicação de ácido indolilacético (IAA), [10<sup>-6</sup>M] e ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA) [10<sup>-6</sup>M] e o segundo fator os cinco momentos de coleta 12, 36, 84, 156 e 324 horas após aplicação dos tratamentos. Para cada momento de coleta foram analisadas as seguintes variáveis: quantificação de alcaloides totais, liriodenina e presença de alcaloides específicos, atividade da enzima nitrato redutase, variáveis de trocas gasosas, fluorescência, catalase, peroxidase e superóxido desmutase, açúcares e amido. A aplicação de auxina causou alterações na transpiração, aumento na atividade das enzimas catalase e peroxidase e de lipoperóxidos em raízes, local de maior produção de alcaloides em Annonaceae, evidenciando que o sistema antioxidante foi capaz de reduzir o estresse, reduzindo também a síntese de alcaloides. Com a aplicação do IAA observamos em raízes, o aparecimento da xilopina e da discretina e quando o tiba foi aplicado não se observa assimilobina e oxoglucina, mas sim a xilopina. Conclui-se que a aplicação do ácido indolilacético provoca alterações no metabolismo primário que resultam em decréscimo na concentração de

alcaloides totais e liriodenina em raízes de mudas de *Annona emarginata*, o que foi possível detectar com a inibição do transporte de auxina.

**Palavras-chave:** Annonaceae, IAA, TIBA, reguladores vegetais, compostos nitrogenados do metabolismo especializado.

## **Modulation of alkaloid synthesis by the action of indolylacetic acid on *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer seedlings.**

### **Abstract**

The Annonaceae family has a wide variety of alkaloids with known biological functions of agronomic and pharmaceutical interest mainly. *Annona emarginata* is a native species that has a large number of alkaloids. The route of synthesis of alkaloids is shared with auxins, and may compete for substrate whose adequate synthesis depends on the optimal functioning of primary metabolism. For this reason, this experiment was installed with the objective of evaluating how indolylacetic acid (IAA) alters alkaloid production and primary metabolism, which could be an important tool to optimize the large-scale production of *Annona emarginata* alkaloids. The design used was completely randomized, in a 3 X 5 factorial with the first factor being the regulators (control, application of indolylacetic acid (IAA), [10-6M] and 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) [10- 6M] and the second factor the five collection moments 12, 36, 84, 156 and 324 hours after application of the treatments. For each collection moment, the following variables were analyzed: quantification of total alkaloids, liriodenine and presence of specific alkaloids, activity of the enzyme nitrate reductase, variables of gas exchange, fluorescence, catalase, peroxidase and superoxide dismutase, sugars and starch. The application of auxin caused alterations in transpiration, increase in the activity of catalase and peroxidase enzymes and of lipoperoxides in roots, the site of greatest production of alkaloids in Annonaceae, showing that the antioxidant system was able to reduce stress, also reducing the synthesis of alkaloids. xylopine and discretin and when tiba was applied, assimilation and oxoglaucine were not observed, but xylopine. It is concluded that the application of indolylacetic acid causes changes in primary metabolism that result in a decrease in the concentration of total alkaloids and liriodenine in roots of *Annona emarginata* seedlings, which it was possible to detect with the inhibition of auxin transport.

**Keywords:** Annonaceae, IAA, TIBA, plant regulators, nitrogen compounds of specialized metabolism.

#### 4.1 Introdução

O metabolismo especializado é específico para diversos grupos de espécies e dependente de condições do meio (FAIRBAIRN; SUWAL, 1961; KOEPPE et al., 1970; ROBINSON, 1974; HIRATA et al., 1993; BRISKE; CAMP, 1982; EVANS et al., 1996; HOFT et al., 1996; HOFT et al., 1998; ITENOV et al., 1999; WALLART et al., 2000; ELGORASHI et al., 2002; ROCA-PÉREZ et al., 2004; GOBBO-NETO; LOPES, 2007) e se relaciona diretamente ao metabolismo primário, que é comum a todos os vegetais e fornece o material necessário para que o especializado se desenvolva (KUTCHAN et al., 2015; PICHERSKY; LEWINSOHN, 2011; VERPOORTE, 2000).

As auxinas, assim como outros hormônios vegetais, estão associadas com a regulação do crescimento e desenvolvimento, mas também com a defesa das plantas (KOORNNEEF; PIETERSE, 2008; HUOT et al., 2014). Além de provocarem alterações no metabolismo primário (TSUCHIYA et al., 1999; JUNG, 2004; SOUZA, 2020), podem aumentar a síntese de metabólitos especializados (MURCIA et al., 2017; GONÇALVES; ROMANO, 2013; JAMWAL; BHATTACHARYA; PURI, 2018; PARMOON et al., 2018). O ácido indolilacético (AIA), na concentração de 150 e 200 ppm, aplicado em plantas de vinca (*Catharanthus roseus*) proporcionou aumento na biomassa e na produção do alcaloide vincristina (MUTHULAKSHMI; PANDIYARAJAN, 2013).

Os alcaloides e o IAA compartilham a mesma rota de síntese, a do ácido chiquímico, principalmente a via do triptofano (LJUNG, 2013; MAEDA; DUDAREVA, 2012), que origina os alcaloides indólicos (WATERMAN, 1985), concorrendo, portanto, por substrato. Deste modo, a aplicação de auxinas pode interferir na síntese desses metabólitos especializados aumentando a concentração de alcaloides como observado por Souza et al. (2022) após aplicação de ácido indolbutírico, e segundo Singh et al. (2015) pode estar relacionado ao aumento da concentração interna de CO<sub>2</sub>, tendo em vista que houve maior concentração de alcaloides totais, vincristina e vimblastina quando houve maior concentração de CO<sub>2</sub>, evidenciando as relações entre o metabolismo primário, no caso as trocas gasosas, e a síntese dos especializados. Por outro lado, sabe-se que a aplicação de IAA em *Catharanthus roseus* resultou em controle da biossíntese de alcaloide através da regulação negativa do gene envolvido na conversão do triptofano em triptamina que é a primeira etapa da via de síntese dos alcaloides, reduzindo portanto, a concentração do alcaloide indol terpenoide (Goddjin et al., 1992).

Os alcaloides se destacam dentro dos metabólitos especializados encontrados em Annonaceae, sendo que os mais abundantes na família são os benzilisoquinolínicos oriundos dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, entretanto já foram reportados alcaloides indólicos derivados do triptofano (WATERMAN, 1985; LÚCIO et al., 2015). Foram documentados 934 alcaloides na família, distribuídos em 254 espécies (Lúcio et al., 2015). Dentre as espécies do gênero *Annona* destaca-se a *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer variedade ‘Terra-Fria’ com grande número de alcaloides identificados. A espécie é nativa do continente sul-americano (MAAS et al., 2001) e no Brasil possui importância na recuperação de áreas degradadas e economicamente na fruticultura onde é utilizado como porta-enxerto para a espécie comercial atemoia (*Annona x atemoya* Mabb.).

Muitos alcaloides já foram identificados em raízes e caules de plantas adultas de *Annona emarginata* (LÚCIO et al., 2015; MIMI et al., 2021, SILVA et al., 2022; SOUSA et al., 2022) como a liriodenina, anonaina, reticulina e assimilobina. Alguns desses alcaloides são de interesse farmacológico por possuírem ação antifúngica, bactericida, antiprotozoária, citotóxica, analgésica, antiplaquetária (MOHARAM et al., 2010; DE LA CRUZ et al., 2011a; CHIU et al., 2012; CHEN et al., 2013; LI et al., 2013; EGYDIO-BRANDÃO; NOVAES; SANTOS, 2017).

De la Cruz-Chacón e González-Esquinca (2015) relatam ainda efeito de alcaloides extraídos de Annonaceae com interesse na agricultura por sua comprovada ação no controle de vasta lista de fungos fitopatogênicos. Além disso, a liriodenina é considerada um marcador quimiotaxônomico por ser encontrada em 240 espécies da família Annonaceae (PINHEIRO et al., 2009; GONZÁLEZ-ESQUINCA et al., 2014). Deste modo, a elevada diversidade de alcaloides sugere a importância dessas moléculas nitrogenadas para plantas da família, uma vez que há intenso investimento dos recursos fotossintéticos para sua biossíntese (GONZÁLEZ-ESQUINCA et al., 2014).

As relações entre o metabolismo primário e a aplicação de reguladores vegetais foi demonstrada em muitos trabalhos. Com relação às auxinas IAA e NAA, Joshi, Skula, Skula (2011) observaram aumento no teor de clorofila, aumentando significativamente a eficiência fotossintética além de verificarem um aumento na taxa de fluorescência, de condutância estomática e aumento da atividade de carboxilação das células de mesófilo. Czerpack et al. (2004) também observaram aumento na taxa fotossintética líquida ao aplicar IAA em *Wolfia arrhiza*. Em relação às trocas gasosas, foi reportado que a aplicação de auxinas, pode aumentar a assimilação e a biomassa

(JOSHI; SHUKLA; SHUKLA, 2011), porém Souza (2020) verificou que a aplicação de ácido indolilbutírico, resultou em decréscimo na assimilação e na eficiência de carboxilação. Kumar et al. (2005) notaram uma inibição no número de brotos e raízes quando o transporte de ácido indolilacético foi inibido com TIBA. Por outro lado, algumas vezes quando há inibição do transporte de auxina pode ocorrer indução da taxa de proliferação de brotos em rosas, pois ao bloquear o transporte de auxina na região de aplicação pode proporcionar um acúmulo do regulador no local (SINGH; SYAMAL, 2000).

Ainda em relação ao metabolismo primário Ono et al. (1998) verificaram que a aplicação de NAA e IBA, aumentaram tanto a concentração de açúcares redutores bem como de açúcares totais, entretanto a quantidade de triptofano foi reduzida, indicando que tenha sido usado para síntese de mais auxinas, tendo em vista que ao aplicar um regulador, podemos induzir a produção interna desse regulador, como confirmado por Epstein e Lave (1983) que ao aplicarem IBA nas raízes, perceberam um aumento na concentração de IAA. Moncousin e Gaspar (1983) verificaram que com a aplicação de NAA em *Cynara scolymus* L. resultou em um acentuado incremento na atividade da peroxidase, devido ao fato de que são responsáveis pelo catabolismo da auxina in vivo. Fernandes-Marcos et al. (2011) observaram que os níveis de peróxido de hidrogênio da planta podem alterar o transporte de auxina direta ou indiretamente, além disso também notaram que altos níveis de nitrato reduzem o transporte de auxina, sendo assim a fixação de N pela atuação da enzima nitrato redutase pode interferir no transporte das auxinas, evidenciando a ligação entre o metabolismo primário e especializado.

Em espécies da família Annonaceae foram desenvolvidos estudos, isoladamente, como a fotossíntese em *Annona emarginata* (BARON et al., 2018; MANTOAN et al., 2016; DELANHOL et al., 2018), trocas gasosas associadas à aplicação de reguladores vegetais em atemóia variedade Tompson (VEROTTI et al., 2019), síntese de alcaloides em *Annona emarginata* (DE LA CRUZ et al., 2011; RILEY-SALDAÑA et al., 2017; SOUSA et al., 2019, MIMI et al., 2021; SILVA et al., 2021), no entanto, o efeito da aplicação de reguladores vegetais como a auxina IAA no metabolismo primário e especializado necessitam ser melhor compreendidos em Annonaceae.

Os estudos que mostram a interação entre reguladores e síntese de alcaloides na família Annonaceae foram publicados por Sousa et al. (2019), onde o tratamento de sementes de *Annona cacans* com giberilina (GA<sub>3</sub>) ocasionou incremento nos alcaloides

totais e liriodenina nos estádios iniciais de desenvolvimento dessa espécie, e por Silva et al. (2021) que verificaram que o uso de giberelina (GA<sub>3</sub>) em sementes de *Annona x atemoya* Mabb. cv. 'Gefner' não estimula a produção de alcaloides. Sousa et al. (2022) verificaram alterações no metabolismo de *Annona emarginata* com a aplicação de reguladores (IBA, CK, ABA e MeJa)

Considerando-se que dentro da família Annonaceae os alcaloides são substâncias que merecem destaque por serem moléculas com variada ação biológica (DE LA CRUZ et al, 2011; CHEN et al., 2013; LI et al., 2013; LÚCIO et al., 2015), e que as auxinas compartilham a rota de síntese com os alcaloides podendo competir por substrato oriundo do metabolismo primário (MAEDA; DUDAREVA, 2012; LJUNG, 2013), este estudo tem por objetivo avaliar como o ácido indolilacético (IAA) altera a produção de alcaloides e o metabolismo primário, o que poderá ser importante ferramenta para otimizar a produção em larga escala de alcaloides de *Annona emarginata*, o que representa importante avanço na bioprospecção de moléculas de interesse.

## **4.2 Material e métodos**

### **4.2.1 Obtenção do material vegetal e delineamento experimental**

O experimento foi realizado no departamento de Biodiversidade e Bioestatística do Instituto de Biociências da Unesp Botucatu, sob as coordenadas de 48 ° 24'35 ' ' W de longitude e 22 ° 49'10 ' ' S de latitude, com altitude de 800m acima do nível do mar. As mudas de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer foram obtidas junto a Coordenadoria de Desenvolvimento Rural Sustentável - CDRS de São Bento do Sapucaí (SP) e mantidas em casa de vegetação, onde as temperaturas, da folha e do ar, variaram de 24°C a 29°C, e a umidade relativa variou entre 45 e 62 % UR, exceto 156h após aplicação, onde era de 13 % UR. Foi realizado o experimento em DIC com fatorial de 3x5 e 5 repetições de uma planta. Os tratamentos foram constituídos por controle, aplicação de ácido indolilacético [10<sup>-6</sup> M] e aplicação de ácido 2,3,5- triiodobenzóico [10<sup>-6</sup> M] (inibidor de transporte do IAA- TIBA) em cinco tempos de coleta das amostras 12h, 36h, 84h, 156h e 324 h após a última aplicação dos reguladores vegetais. Foram realizadas três aplicações foliares com 48 horas de intervalo entre elas. As mudas com 1,5 anos, foram mantidas nas sacolas originais do viveiro de origem e irrigadas diariamente com água e semanalmente com solução nutritiva de Hoagland a 50% pelo período de dez meses.

#### **4.2.2 Aplicação do ácido indolilacético e seu inibidor de transporte TIBA**

A aplicação dos reguladores vegetais foi realizada via foliar com auxílio de pulverizador costal de gás carbônico pressurizado, com bico do tipo leque, com pressão de 276 bar. Como agente espalhante foi utilizado o adesivo não iônico Haiten, na proporção de 1ml/10L de calda conforme indicado pelo fabricante, usado inclusive com a água no tratamento controle.

#### **4.2.3 Alcaloides**

Para extração dos alcaloides as amostras de folhas e raízes (1,5g), de todas as cinco repetições e os cinco momentos de coleta 12h, 36h, 84h, 156h e 324 h após aplicação dos tratamentos, foram secas em estufa de ventilação forçada, a temperatura constante de 40°C até atingir massa seca constante, posteriormente foram maceradas e utilizamos 1,5g de amostra por repetição. Seguiu-se método de extração ácido-base, onde o material vegetal foi umedecido com solução saturada de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) e deixado secar à temperatura ambiente. Os alcaloides foram extraídos com clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) por agitação constante durante 2 horas e então foram filtrados. As fases de CHCl<sub>3</sub> foram extraídas em uma solução de ácido clorídrico (HCl) 1 M e depois foram alcalinizadas a pH 9,5 com uma solução saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. A solução alcalina foi então reextraída com CHCl<sub>3</sub> e evaporada a temperatura ambiente para obter alcalóides totais. O conteúdo total de alcaloides foi determinado em espectrofotômetro de UV-visível a 254 nm. Utilizou-se a liriodenina mediante curva de calibração 1-100mg mL<sup>-1</sup> para elaboração da curva padrão ( $y = 0,0881x - 0,0112$ ,  $R^2 = 0,9949$ ), visto que, é um dos alcaloides mais distribuídos entre as espécies da família Annonaceae (DE LA CRUZ CHACÓN; GONZÁLEZ- ESQUINCA, 2012).

Foi realizada a quantificação de liriodenina e detecção de alcaloides nas amostras com uso dos padrões de assimilobina, discretina, lanulinosina, laurotetanina, liriodenina, N-metillaurotetanina, norglaucina, norpredicentina, oxoglaucina, reticulina, xilopina e xilopinina, com o emprego de Cromatógrafo líquido de alta eficiência (UHPLCfocused ThermoFisher-Scientific) com bomba gradiente e detector UVVIS com o uso de coluna de fase reversa C18 (150 x 4,6mm e diâmetro de partícula de 5µm). A fase móvel foi água (com ácido trifluoácetico pH 3,5) e metanol na proporção de 30:70, com velocidade de fluxo de 1mm/min. em temperatura de 30°C. A detecção foi realizada em UV a 280 nm. Para a quantificação da liriodenina foi realizada curva de

calibração 1-100mg mL<sup>-1</sup> mediante a análise de série de soluções estoque ( $y=0,3658x + 1,114$ ;  $R^2 = 0,9992$ ) (adaptado de DE LA CRUZ & GONZÁLEZ- ESQUINCA, 2012).

#### **4.2.4 Quantificação de ácido indolilacético**

A quantificação endógena de ácido indolilacético foi realizada com as amostras da coleta de 156 horas após a aplicação dos tratamentos (7º dia), momento com maior diferença na concentração de alcaloides entre os tratamentos em ambos os órgãos. As amostras com 1,5g foram coletadas, congeladas e maceradas em nitrogênio líquido imediatamente após coleta, e armazenadas em freezer -20°C até o momento da análise onde utilizou-se quatro repetições por amostra. As análises foram feitas no laboratório Junior Modesto na cidade de Botucatu por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (LC-MS/MS). As áreas foram determinadas e comparadas com curvas padrão conhecidas. Os resultados foram expressos em mg Kg<sup>-1</sup> de massa fresca.

#### **4.2.5 Nitrato Redutase**

A atividade da enzima nitrato redutase foi determinada segundo metodologia proposta por Mulder et al. (1969) que se baseia na produção de NO<sup>2-</sup> durante a incubação de 1g de corte de folhas em presença de NO<sup>3-</sup>. Tal análise é realizada em duplicata.

#### **4.2.6 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a**

As avaliações foram realizadas as 12h, 36h, 156h e 324h após a última aplicação dos reguladores vegetais, as 08h00, na terceira ou quarta folhas totalmente expandidas em cinco repetições por tratamento, exceto as 84 horas após a aplicação dos tratamentos, pois estava chovendo, não permitindo um bom funcionamento do equipamento. Utilizou-se equipamento de sistema aberto de fotossíntese com analisador de CO<sub>2</sub> e vapor d'água por radiação infravermelha (Infra Red Gas Analyser – IRGA, modelo GSF 3000, Walz). As variáveis de trocas gasosas analisadas foram a taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), taxa transpiratória (E vapor d'água  $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), condutância estomática (gs,  $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e concentração interna de CO<sub>2</sub> na câmara subestomática (C<sub>i</sub>,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), adotando-se as condições naturais de luminosidade médias (DFFFA) de cada momento de avaliação incidentes no interior do ambiente de cultivo, em média 867 PAR  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . A partir destes dados foi possível

calcular a eficiência de carboxilação (A/Ci) ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}/\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Com relação à fluorescência analisamos o rendimento quântico potencial do fotossistema II (Fv/Fm), a taxa de transporte de elétrons (ETR) e o coeficiente de extinção fotoquímico (qP) (DEMMIG-ADAMS et al., 2008).

#### **4.2.7 Açúcares e amido**

Os açúcares solúveis totais foram extraídos do material foliar (100 mg) e radicular (100 mg) obtidos em cada momento de coleta, nas cinco repetições, de acordo com Garcia et al. (2006) e para determinar a concentração de açúcares solúveis totais foi realizada de acordo com Morris (1948). O amido foi extraído de acordo com Clegg (1956) e quantificado segundo Yemm e Folkes (1954). Para os açúcares redutores, utilizou-se a metodologia estabelecida por Miller (1959) e para a sacarose, a metodologia determinada por Passos (1996).

#### **4.2.8 Atividade antioxidante e espécies reativas de oxigênio**

Amostras de folhas e raízes (100 mg) das cinco repetições em cada horário de coleta, foram imersas imediatamente em nitrogênio líquido e posteriormente maceradas em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido e armazenadas em freezer  $-20^\circ\text{C}$ . Para obtenção do extrato enzimático seguiu-se a metodologia proposta por Kar e Misshra (1976). Para a determinação da atividade específica das enzimas antioxidantes foi necessário avaliar a concentração de proteínas utilizando a metodologia de Bradford (1976). A atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi determinada segundo Peixoto et al (1999), da peroxidase (POD, EC. 1.11.1.7) de acordo com Teisseire e Guy (2000) e da superóxido desmutase (SOD, EC 1.15.1.1), foi utilizada a técnica de Beauchamp e Fridovich (1971).

Quanto às espécies reativas de oxigênio, o conteúdo de peróxido de hidrogênio foi determinado pelo método de Alexieva et al. (2001) e a peroxidação de lipídeos foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Heath e Paker (1968).

#### **4.2.9 Análise dos dados**

Os resultados foram submetidos à análise de variância *Two way* ANOVA utilizando o software SigmaPlot (Versão 12.5, Chicago, IL, EUA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% ( $p < 0,05$ ) (COSTA, 2003).

### 4.3 Resultados

Os dados permitem inferir que a aplicação da auxina IAA modulou a produção de alcaloides. Além disso, a compreensão de como o metabolismo especializado se relacionou com o primário nas plantas de *Annona emarginata* a partir dos tratamentos foi evidenciada com os resultados da atividade da nitrato redutase, fotossíntese, variações nas concentração de açúcares e atividade de enzimas antioxidantes.

Após a aplicação do ácido indolilacético (IAA) houve aumento da concentração endógena de IAA (tabela 2) e redução da concentração de alcaloides totais, principalmente nas folhas (tabela 3). Quando o transporte do ácido indolilacético foi inibido com o uso do TIBA, se observou menor concentração interna do IAA (tabela 2) e maior concentração de alcaloides totais, às 36h, 156h e 324h em folhas e às 36h e 156h em raízes, após a aplicação do produto, confirmando o efeito do ácido indolilacético na redução na produção dos alcaloides (tabela 3).

Tabela 2. Concentração endógena de ácido indolilacético em raízes e folhas de *Annona emarginata* após a aplicação de IAA e TIBA.

Tratamento	Raiz	Folha
Controle	0,05 ± 0,007 c* <sup>1</sup>	0 b
IAA	0,128 ± 0,03 a	0,28 ± 0,04 a
TIBA	0,07 ± 0,023 b	0,03 ± 0,005 a

Tratamentos p: 0,0001\*\*; f: 16,569

\*<sup>1</sup>Os resultados são apresentados média ± desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não apresentam diferença significativa entre si pelo teste Tukey

Tabela 3. Concentração de alcaloides totais (ug g<sup>-1</sup> massa seca) em folhas e raízes de *Annona emarginata* em cada tratamento (Controle, IAA e TIBA), nos diferentes horários de coleta (12h, 36h, 84h, 156h e 324h após aplicação dos tratamentos).

Alcaloides totais
(ug g <sup>-1</sup> de massa seca)

	12h	36h	84h	156h	324h
<b>Folhas</b>					
Controle	2,69±0,23Cb* <sup>1</sup>	9,49±1,46Aa	5,81±0,72Bb	3,12±0,8Cb	0,917±0,31Dc
IAA	3,19±0,94Aab	2,83±0,21Ac	0,90±0,08Bc	3,22±0,77Ab	2,32±0,43Ab
TIBA	4,31±1,63Ba	7,43±1,97Bb	9,67±2,01ABa	10,99±2,17Aa	11,55±3,04Aa
Tratamentos p: 0,0001; f: 68,219; Horas: p 0,0001; f: 37,935; Tratamentos*horas p:0,0001; f: 74,589					
<b>Raízes</b>					
Controle	66,07±2,78Aa	66,62±3,27Aab	76,87±4,11Aa	78,91±3,65Ab	77,44±4,27Aab
IAA	55,43±3,05Aa	37,73±2,55Bb	72,39±4,14Aa	57,18±2,87Ac	68,16±3,32Ab
TIBA	71,02±3,67Ba	70,83±2,81Ba	74,69±5,66Ba	108,03±9,12Aa	91,50±6,96ABa
Tratamentos p: 0,0001; f: 28,246 Horas: p 0,0001; f: 10,394 Tratamentos*horas p:0,0002; f: 3,455					

\*<sup>1</sup>Os resultados são apresentados média ± desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não apresentam diferença significativa entre si pelo teste Tukey.

O IAA também provocou redução significativa na concentração do alcaloide lirioidenina nas raízes da *A. emarginata*, o que foi detectado às 84h, 156h e 324h após a aplicação do regulador. O efeito negativo foi revertido quando se empregou o inibidor da auxina (TIBA), confirmando o papel do IAA na redução da concentração deste alcaloide nas raízes (tabela 4). Com relação ao conteúdo de lirioidenina nas folhas, não foram detectadas variações significativas entre os tratamentos.

Tabela 4. Concentração de lirioidenina (ug g<sup>-1</sup> massa seca) nas raízes de *Annona emarginata* em cada tratamento (Controle, IAA e TIBA), nos diferentes horários de coleta (12h, 36h, 84h, 156h e 324h após aplicação dos tratamentos).

	Lirioidenina (ug g <sup>-1</sup> )				
	12h	36h	84h	156h	324h
Controle	6,60±0,73Ba* <sup>1</sup>	5,58±0,68Bb	14,22±4,23Aa	12,47±3,66Ab	14,95±6,23Aa
IAA	8,36±2,76Aa	8,05±3,55Ab	0 Cc	0 Cc	4,21±0,9Bc
Tiba	0 Cb	15,25±8,12Aa	5,25±1,27Bb	17,84±9,34Aa	7,91±2,51Bb

Tratamentos p: 0,0001\*\*; f: 80,142    Horas: p 0,0002\*\*; f: 20,051    Tratamentos\*horas p:0,0001\*\*; f: 51,241

\*<sup>1</sup>Os resultados são apresentados média ± desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não apresentam diferença significativa entre si pelo teste Tukey.

A aplicação do IAA provocou alterações na presença e ausência dos alcaloides investigados de *Annona emarginata*, principalmente nas folhas (tabela 5). Entretanto no grupo controle nas folhas não foi possível identificar a presença de nenhum dos alcaloides investigados, provavelmente por estarem em quantidades muito pequenas para serem detectados.

Quando foi aplicado AIA nas folhas aparecem os alcaloides lanuginosina, lirioidenina e a xilopina e quando inibimos o transporte de IAA desaparece a xilopina e aparece a N-metil laurotetanina. Entretanto no grupo controle não foi possível detectar a presença dos alcaloides avaliados.

Com relação às raízes, verificamos que com a aplicação do IAA a xilopina e a discretina passam a serem encontradas enquanto a oxoglucina e a reticulina deixam de ser verificadas. Quando inibimos o transporte de auxina nas raízes deixamos de verificar assimilobina e discretina nas amostras.

Tabela 5. Presença e ausência de alcaloides em folhas e raízes de *Annona emarginata* após aplicação dos tratamentos (Controle, IAA, TIBA) em cinco momentos de coleta (12h, 36h, 84h, 156h e 324h após aplicação dos tratamentos).

FOLHAS				
	Lanuginosina	Lirioidenina	N-Metil laurotetanina	Xilopina
	IAA			
12h	-	-	-	-
36h	-	x	-	x
84h	x	x	-	-
156h	x	x	-	-

324h	-				-				--			-
TIBA												
12h	-				-				-			-
36h	x				x				x			-
84h	x				x				-			-
156h	x				x				x			-
324h	-				-				-			-
RAÍZES												
	ASS	DIS	LAN	LAU	LIR	N- M	NRG	NRP	OXO	RET	XLP	XLN
Controle												
12h	-	-	x	-	x	x	x	-	-	x	-	-
36h	x	-	x	x	x	x	x	x	x	x	-	x
84h	x	-	x	x	x	x	x	x	-	x	-	x
156h	-	-	x	x	x	x	x	-	-	x	-	x
324h	-	-	x	x	x	x	x	x	-	x	-	x
IAA												
12h	-	-	x	-	x	x	x	-	-	-	-	x
36h	-	-	x	x	x	x	x	x	-	-	x	x
84h	-	-	x	-	x	x	x	-	-	-	x	-
156h	x	x	x	x	x	x	x	-	-	-	-	x
324h	-	-	x	-	x	x	x	-	-	-	x	-
TIBA												
12h	-	-	x	-	x	x	x	-	-	-	-	-

36h	-	-	x	x	x	x	x	-	-	-	x	x
84h	-	-	x	-	x	x	x	-	-	-	x	-
156h	-	-	x	x	x	x	x	-	-	-	x	x
324h	-	-	x	x	x	x	x	x	-	-	x	-

Presença (x) ou não detecção (-) de assimilobina (ASS), discretina (DIS), lanulinosina (LAN), laurotetanina (LAU), liriodenina (LIR), N-Metillaurotetanina (N-M), norglaucina (NRG), norpredicentina (NRP), oxoglaucina (OXO), reticulina (RET), xilopina (XLP) e xilopinina (XLN) em raízes e folhas de *Annona emarginata* após aplicação dos tratamentos.

Os alcaloides são substâncias nitrogenadas, portanto estão relacionados com necessidade de assimilação de nitrogênio para sua síntese, o que pode estar associado a ação da enzima nitrato redutase (MENGEL; KIRKBY, 2001). No final do período de análise (324h) se observa redução na atividade da nitrato redutase nas folhas com a inibição do transporte da auxina, o que coincide com a maior produção de alcaloides em raízes e folhas (tabela 6), entretanto as 84 horas quando também há redução da atividade da enzima, não verificamos alterações no conteúdo de alcaloides. Verificamos ainda que às 156 e 324 horas, quando se observa maior concentração de alcaloides, tanto em folhas como em raízes com a inibição do transporte de auxina, foram observadas as menores atividades da nitrato redutase em relação ao controle.

Tabela 6. Atividade da enzima nitrato redutase em folhas de *Annona emarginata* em cada horário de coleta após aplicação dos tratamentos

<b>Nitrato redutase</b>	<b>12h</b>	<b>36h</b>	<b>84h</b>	<b>156h</b>	<b>324h</b>
Controle	0,058±0,008Bab* <sup>1</sup>	0,047±0,012Ba	0,031±0,006Cb	0,065±0,009ABa	0,075±0,004Aa
IAA	0,055±0,002Ab	0,035±0,007Ba	0,059±0,024Aa	0,033±0,006Bb	0,069±0,01Aa
TIBA	0,072±0,008Aa	0,044±0,005Ba	0,044±0,004Bb	0,044±0,005Bb	0,052±0,006Bb
Tratamentos p: 0,0001**; f: 20,293    Horas: p 0,0001**; f: 20,424 — Tratamentos*horas p:0,0002**; f: 10,668					

\*<sup>1</sup>Os resultados são apresentados média  $\pm$  desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não apresentam diferença significativa entre si pelo teste Tukey.

Em relação variáveis de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* analisadas, foram observadas apenas diferenças pontuais, sendo que para as variáveis rendimento quântico potencial do fotossistema II ( $F_v'/F_m'$ ), rendimento quântico específico do PSII (yield), dissipação fotoquímica (qP), taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> [A<sub>net</sub>] e condutância estomática (g<sub>s</sub>) não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, entre os períodos de avaliação e nem na interação entre os fatores (tabela 6).

Quando aplicado o inibidor do transporte de IAA verificou-se que as 12h, 156h e 324h houve redução na transpiração quando comparado às plantas que receberam IAA, diferindo do controle somente as 324h. As 12 horas também se verificou redução da assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, na condutância estomática e no rendimento quântico potencial do fotossistema II nas plantas cujo transporte havia sido inibido em relação àquelas que receberam IAA (tabela 7). Desta forma, alguns momentos nos quais ocorreram reduções da transpiração coincidem com a maior produção de alcaloides totais (156h e 324h) em raízes e folhas e liriodenina em raízes (156h), o que também coincide com respostas da nitrato redutase especialmente a redução da atividade às 324h, em plantas que tiveram seu transporte de auxina inibido. A redução da transpiração provocada pelo inibidor da auxina pode ter favorecido o acúmulo de nitrogênio nas raízes e a produção de alcaloides, em comparação com as plantas que receberam a auxina.

A ausência de variações significativas na maioria das variáveis fotossintéticas permite inferir que não houve dano ao aparato fotossintético devido a aplicação dos tratamentos.

Tabela 7. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* avaliadas após aplicação dos tratamento: rendimento quântico potencial do fotossistema II ( $F_v'/F_m'$ ), rendimento quântico específico do PSII (yield), dissipação fotoquímica (qP), transpiração (mmol water vapor  $m^{-2} s^{-1}$ ), taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> [A<sub>net</sub>] ( $\mu mol CO_2 m^{-2} s^{-1}$ ) condutância estomática (g<sub>s</sub>) ( $mol m^{-2} s^{-1}$ ).

Tratamentos	Fv/Fm	Yield	qP	Transpiração	Anet	Gs
<b>12h</b>						
Controle	0,423±0,089AB* <sup>1</sup>	0,063±0,008A	0,156±0,021A	0,794±0,102AB	6,01±1,97AB	34,9±5,9AB
IAA	0,467±0,076A	0,081±0,13A	0,1790,067A	1,281±0,121A	8,62±2,01A	60,8±4,3A
TIBA	0,317±0,059B	0,067±0,007A	0,2090,055A	0,587±0,097B	3,99±1,02B	24,2±4,6B
	p:0,0001 f:22,019	p:0,0001 f:30,118	p:0,0001 f:20,342	p:0,0002 f:25,556	p:0,0001 f:20,488	p:0,0002 f:10,733
<b>36h</b>						
Controle	0,434±0,88A	0,083±0,01A	0,194±0,032A	1,040±0,2A	8,28±2,97A	46,2±6A
IAA	0,365±0,37A	0,084±0,008A	0,225±0,027A	0,872±0,186A	7,94±2,03AB	39,5±5,1A
TIBA	0,358±0,69A	0,064±0,005A	0,187±0,054A	0,577±0,099A	5,24±0,82B	24,6±4,5A
	p:0,0001 f:13,441	p:0,0003 f:23,643	p:0,0002 f:24,559	p:0,0005 f:31,497	p:0,0001 f:22,362	p:0,0005 f:25,461
<b>156h</b>						
Controle	0,509±0,48A	0,177±0,025A	0,352±0,087A	1,622±0,182AB	6,49±1,8A	63,7±4,8A
IAA	0,500±0,67A	0,180±0,068A	0,366±0,075A	1,819±0,177A	7,00±1,81A	72,5±7,1A
TIBA	0,444±0,55A	0,183±0,045A	0,411±0,054A	1,259±0,098B	6,78±2A	49,1±6,7A
	p: 0,0001 f:10,231	p: 0,0001 f:20,226	p: 0,0005 f:26,768	p: 0,0002 f:10,211	p: 0,0005 f:20,389	p: 0,0001 f:42,435
<b>324h</b>						
Controle	0,450 ± 0,066A	0,068±0,012A	0,159±0,054A	0,903±0,134A	7,59±2,26A	55,9±5,4A
IAA	0,474 ± 0,78A	0,081±0,009A	0,172±0,047A	1,008±0,122A	9,24±3,23A	59,9±4,9A
TIBA	0,418 ± 0,098A	0,071±0,023A	0,171±0,074A	0,694±0,078B	6,56±1,87A	45,6±4,3A
	p: 0,0005 f:21,367	p:0,0001 f:13,793	p: 0,0002 f:10,245	p: 0,0001 f:18,742	p: 0,0003 f:30,277	p:0,0003 f:61,223

\*<sup>1</sup>Os resultados são apresentados média ± desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não apresentam diferença significativa entre si pelo teste Tukey.

Como parte das respostas do metabolismo primário ao tratamento com IAA foi observado aumento da concentração açúcares totais nas folhas às 36h e redução nas raízes, e quando o transporte da auxina foi inibido, se observou às 156 horas redução dos açúcares totais nas folhas e aumento nas raízes, o que coincidiu, neste momento, com as maiores concentrações de alcaloides totais em raízes e folhas. Este aumento da concentração de açúcares totais nas raízes pode indicar que houve maior translocação para este órgão, local de maior síntese de alcaloides (tabela 8).

Em relação a sacarose nas folhas observa-se que a inibição do transporte da IAA provocou redução na concentração de sacarose nas folhas em todos os horários de coleta, tanto em relação a aplicação do IAA como em relação ao controle. No entanto, nas raízes as menores concentrações de sacarose foram pontuais em relação a inibição do transporte de IAA e o controle (12h e 36h) (tabela 8).

Ao contrário do observado com a sacarose nas folhas, não há padrão de respostas quanto a redução da concentração de açúcares redutores em plantas com inibição do transporte de IAA, o que se verifica é redução pontual às 84h e aumento da concentração às 324h (quando comparado às plantas que receberam IAA, mas sem diferir do controle). No entanto, foi possível observar que o inibidor da auxina provocou redução nas concentrações de açúcares redutores em todos os períodos de avaliação nas raízes (tabela 8).

A concentração de amido nas folhas às 84h e 156h foi elevada após a aplicação de IAA nas folhas em comparação com plantas nas quais houve inibição do transporte da auxina e o controle. Nos demais momentos (12h, 36h e 324h) a inibição do transporte de auxina levou a redução da concentração de amido nas folhas. Nas raízes, a concentração de amido foi maior nas plantas tratadas com IAA apenas as 156 horas ( $14,23 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  FW), quando comparada às plantas tratadas com o inibidor ( $9,41 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  FW). (tabela 8). Este menor valor pode estar relacionado ao aumento de açúcares totais às 156h e também à síntese de alcaloides, uma vez que há posterior redução de amido, açúcares totais e redutores nas raízes entre 156 e 324h, e aumento da concentração de alcaloides. Deste modo, os menores valores de açúcares encontrados nas raízes coincidem, de modo geral, com os períodos de maiores concentrações de alcaloides, especialmente nas raízes, o que pode indicar que os açúcares foram utilizados como fonte de energia e/ou maior disponibilidade de esqueletos carbônicos para a síntese de alcaloides.

Tabela 8. Concentração de açúcares totais ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  FW), amido ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  FW), açúcares redutores ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  FW) e sacarose ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  FW) em folhas e raízes de *Annona emarginata* após aplicação dos tratamentos com reguladores vegetais em cada horário de coleta.

Açúcares totais – Folha					
Tratamentos	12h	36h	84h	156h	324h
Controle	1268,9±322,1 Aa* <sup>1</sup>	1305,3±245,2Ab	1307,5±245,5Aa	1356,1±343,8Aa	1468,7±321,5Aa
IAA	1272,1±298,3Ba	1830,5±356,6Aa	1411,8±365,4Ba	1431,5±278,9Ba	1383,0±289,2Ba
TIBA	1191,3±336,5Ba	1279,5±254,7ABb	1486,2±321,3Aa	1206,5±311,4Bb	1568,7±231,2Aa
Tratamentos p: 0,0001**; f: 31,223    Horas: p 0,0002**; f: 23,112 Tratamentos*horas p:0,0002**; f: 12,675					
Amido - Folha					
Tratamentos	12h	36h	84h	156h	324h
Controle	39,3±5,3Aba	43,4±6,1Aa	24,6±2,1Bb	35,4±5,1ABb	46,4±4,8Aa
IAA	31,6±4,6Bb	29,5±4,2Bb	46,2±4,7Aa	47,4±6,2Aa	22,5±3,7Cc
TIBA	22,1±3,7Cc	19,2±2,6Cc	28,4±2,9Bb	37,2±3,3Ab	31,3±3,9Bb
Tratamentos p: 0,0003**; f: 27,373    Horas: p 0,0001**; f: 10,555 Tratamentos*horas p:0,0002**; f: 18,874					
Açúcares Redutores - Folha					
Tratamentos	12h	36h	84h	156h	324h
Controle	1,15±0,06Aa	0,92±0,07Bb	0,94±0,08Ba	0,82±0,1Ba	0,79±0,05Bab
IAA	0,75±0,02Bb	1,06±0,12Aa	1,05±0,09Aa	0,77±0,08Ba	0,71±0,07Bb
TIBA	0,84±0,03Ab	0,84±0,05Ab	0,79±0,03Ab	0,85±0,06Aa	0,91±0,1Aa
Tratamentos p: 0,0001**; f: 13,923    Horas: p 0,0001**; f: 23,786 Tratamentos*horas p:0,0003**; f: 12,856					

Sacarose Folha					
Tratamentos	12h	36h	84h	156h	324h
Controle	33,57±4,3Aa	34,82±3,8Aa	34,31±4,5Aa	35,46±3,1Aa	33,59±2,9Aa
IAA	33,71±3,9Aa	33,33±3,2Aa	33,11±5,1 Aa	34,70±4,2Aa	33,41±3,5Aa
TIBA	29,12±2,8Ab	29,48±2,4Ab	29,26±1,9Ab	29,75±3Ab	30,47±2,6Ab

Tratamentos p: 0,0005\*; f: 30,293    Horas: p 0,0005\*; f: 34,784    Tratamentos\*horas p:0,0002\*\*; f: 9,544

Açúcares totais - Raiz					
Tratamentos	12h	36h	84h	156h	324h
Controle	269,8±32,1Cb	466,6±52Aa	333,7±37,8B	377,0±44,5B	362,7±47,6Ba
			a	b	
IAA	355,8±21,7Aa	349,7±39,7A	304,9±40,5A	379,3±39,1A	356,5±36,7A
		b	a	b	a
TIBA	305,2±45Bab	426,1±65,2A	360,3±32,7B	478,3±58,9A	354,6±34,1A
		Ba	a	a	Ba

Tratamentos p: 0,0001\*\*; f: 21,994    Horas: p 0,0001\*\*; f: 10,027  
Tratamentos\*horas p:0,0005\*; f: 32,455

Amido - Raiz					
Tratamentos	12h	36h	84h	156h	324h
Controle	7,61±3,5Aa	9,71±5,2Ab	7,43±3,7Aa	9,23±3,6Ab	8,78±2,8Aa
IAA	7,78±4,1Ba	14,87±6,1Aa	7,94±3,2Ba	14,23±5,7Aa	8,36±3,1Ba
TIBA	8,29±3,9Ba	13,49±5,9Aa	9,03±4,1Ba	9,41±4,3Bb	6,62±2,2Ca

Tratamentos p: 0,0002\*\*; f: 40,332    Horas: p 0,0001\*\*; f: 22,498  
Tratamentos\*horas p:0,0003\*\*; f: 12,277

Açúcares Redutores - Raiz					
Tratamentos	12h	36h	84h	156h	324h

Controle	0,772±0,12Ab	0,780±0,14A	0,712±0,23A	0,728±0,21A	0,692±0,14A
		b	b	c	b
IAA	1,191±0,2Aa	1,159±0,21A	1,085±0,3AB	1,165±0,32A	1,06±0,22Ba
		Ba	a	Ba	
TIBA	0,531±0,16Bc	0,538±0,1Bc	0,598±0,19B	0,834±0,31A	0,582±0,29Bc
			c	b	

Tratamentos p: 0,0002\*\*; f: 25,356    Horas: p 0,0001\*\*; f: 17,644

Tratamentos\*horas p:0,0001\*\*; f: 21,768

Sacarose - Raiz					
Tratamentos	12h	36h	84h	156h	324h
Controle	25,7±4,2Ba	29,1±2,9Aa	26,7±3,7ABa	26,7±4ABa	24,0±2,8Ba
IAA	26,6±4,8Aa	27,2±2,9Aab	27,1±2,8Aa	26,6±3,5Aa	25,4±2,2Aa
TIBA	23,1±3,9Bb	25,3±3,2AB	25,0±3,1ABa	26,3±5,1Aa	25,5±3Aba
		b			

Tratamentos p: 0,0001\*\*; f: 32,3    Horas: p 0,0001\*\*; f: 14,566    Tratamentos\*horas  
p:0,0002\*\*; f: 19,712

\*<sup>1</sup>Os resultados são apresentados média ± desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não apresentam diferença significativa entre si pelo teste Tukey.

Durante todo o processo metabólico do vegetal, seja na atividade fotossintética, no metabolismo do açúcar ou síntese de alcaloides, há geração de espécies reativas de oxigênio, bem como enzimas responsáveis pelo seu controle, e neste contexto foi possível detectar as variações nas concentrações de peróxido de hidrogênio, lipoperóxido e na atividade enzimática em função da aplicação dos tratamentos.

Com relação à geração das espécies reativas de oxigênio nas folhas, notamos incremento de lipoperóxido quando inibimos o transporte de auxina a partir de 36 horas, em cada um dos momentos de avaliação, mesmo com a redução do lipoperóxido em função deste tratamento ao longo do tempo. Nas raízes a aplicação de IAA causou aumento no lipoperóxido logo a partir das 12 horas após aplicação dos tratamentos, com

drástica redução às 324h (6,40), com valores menores em relação a inibição do transporte (10,23) e ao controle (8,80).

O peróxido de hidrogênio nas folhas não apresentou diferenças significativas em relação ao controle, e nas raízes o IAA provocou aumento nas concentrações de peróxido de hidrogênio em todos os momentos de avaliação, tanto em relação ao uso de seu inibidor como em relação a testemunha (tabela 8).

Quanto a atividade das enzimas verificou-se que a aplicação do ácido indolilacético resultou no aumento da atividade da catalase (CAT) somente nas raízes (local de maior concentração de alcaloides) em relação a inibição do transporte da auxina às 12h, 84h, 156 e 324h, sem, contudo, diferirem do controle.

Com relação à superóxido desmutase (SOD) os tratamentos provocaram redução na atividade da enzima em folhas e aumento nas raízes, exceto às 84h e 324h. Às 84h houve maior atividade em função da aplicação de IAA (77,8) em relação às plantas que receberam o inibidor do transporte (65,3) e ao controle (40,3). E às 324h o IAA também provocou maior atividade da SOD (76,5) diferindo apenas do controle (48,7).

Em relação a atividade da enzima peroxidase (POD), nas folhas somente foi possível detectar alteração entre os tratamentos às 324h, com maior atividade causada pela aplicação da IAA, sem, contudo, haver diferença em relação ao controle. Entretanto nas raízes ambos os tratamentos provocaram da atividade da POD em relação ao controle, exceto às 36h quando somente o tratamento com IAA provocou aumento da atividade e às 324h, quando o tratamento com inibição do transporte de IAA provocou o maior aumento (4,379) tanto em relação ao IAA (1,163), como ao controle (0,739), como em relação aos demais períodos de avaliação (12h, 36h, 84h, 156h), semelhante ao que aconteceu com a SOD (tabela 9).

Tabela 9. Análise das enzimas antioxidantes: peroxidase (POD -  $\mu\text{mol prupurogallin min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ ), catalase (CAT -  $\mu\text{Kat } \mu\text{g}^{-1} \text{protein}$ ) e superóxido desmutase (SOD -  $\text{U}/\mu\text{g prote\i na}$ ) e espécies reativas de oxigênio: peróxido de hidrogênio ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{MF}$ ) e lipoperóxido ( $\text{nmol g}^{-1} \text{MF}$ ) em folhas e raízes de *Annona emarginata*, após aplicação dos tratamentos com reguladores em cada horário de coleta.

Peróxido de hidrogênio - Folha					
Tratamentos	12h	36h	84h	156h	324h

Controle	1,39±0,29Aa	1,37±0,4Aa	1,24±0,3Aab	1,19±0,2Aa	1,16±0,2Aa
	*1				
IAA	1,21±0,3Aa	1,26±0,3Aa	1,30±0,3Aa	1,04±0,3Aa	1,08±0,3Aa
TIBA	1,28±0,35Aa	1,19±0,4ABa	1,03±0,2ABb	1,02±0,2ABa	0,97±0,25Ba
Tratamentos p: 0,0003**; f: 27,322    Horas: p 0,0005*; f: 13,224					
Tratamentos*horas p:0,0001**; f: 35,887					

#### Lipoperóxido - Folha

Tratamentos	12h	36h	84h	156h	324h
Controle	11,4±4,5Aa	14,1±5,6Ab	9,9±3ABb	8,6±2,7Bb	8,3±3,2Bb
IAA	10,7±3,9Aa	12,7±4,3Ab	12,1±4,2Ab	10,5±3Aab	10,4±3,8Ab
TIBA	12,6±5Ca	22,8±5,8Aa	17,8±5,1Ba	12,7±3,5Ca	13,7±4,2Ca
Tratamentos p: 0,0001**; f: 9,934    Horas: p 0,0001**; f: 18,998					
Tratamentos*horas p:0,0002**; f: 30,609					

#### Superóxido dismutase - Folha

Tratamentos	12h	36h	84h	156h	324h
Controle	176,0±21Ba	217,0±32,1B	490,6±27,8A	155,7±13,6B	119,3±17,5B
		a	a	a	a
IAA	0,42±0,12Ab	0,16±0,007A	0,12±0,003A	0,06±0,002A	0,05±0,001A
		b	b	b	b
TIBA	0,05±0,007A	0,04±0,001A	0,04±0,009A	0,04±0,002A	0,03±0,001Ab
	b	b	b	b	
Tratamentos p: 0,0001**; f: 45,233    Horas: p 0,0003**; f: 31,724					
Tratamentos*horas p:0,0002**; f: 20,776					

#### Catalase - Folha

Tratamentos	12h	36h	84h	156h	324h
Controle	0,0031±0,001 Aa	0,0026±0,001 Aa	0,0028±0,000 8Aa	0,0011±0,000 1Aa	0,0028±0,001 2Aa
IAA	0,0014±0,000	0,0014±0,001	0,0009±0,000	0,0008±0,000	0,0025±0,000

	7Aa	Aa	2Aa	2Aa	9Aa
TIBA	0,0025±0,001	0,0013±0,001	0,0022±0,001	0,0012±0,000	0,0019±0,000
	Aa	Aa	Aa	4Aa	7Aa

Tratamentos p: 0,0005\*; f: 10,903    Horas: p 0,0001\*\*; f: 27,774  
 Tratamentos\*horas p:0,0003\*\*; f: 12,356

Peroxidase – Folha

Tratamentos	12h	36h	84h	156h	324h
Controle	0,420±0,13B	0,499±0,2AB	0,275±0,012	0,307±0,15B	1,460±0,4Aa
	a	a	Ba	a	b
IAA	0,149±0,05B	0,870±0,34B	0,798±0,3Ba	0,525±0,24B	2,008±0,6Aa
	a	a		a	
TIBA	0,301±0,23A	0,373±0,21A	0,595±0,22A	0,335±0,11A	0,831±0,3Ab
	a	a	a	a	

Tratamentos p: 0,0001\*\*; f: 30,093    Horas: p 0,0001\*\*; f: 10,677  
 Tratamentos\*horas p:0,0002\*\*; f: 21,589

Peróxido de hidrogênio - Raiz

Tratamentos	12h	36h	84h	156h	324h
Controle	0,120±0,03A	0,134±0,24A	0,143±0,23A	0,138±0,06A	0,152±0,024
	b	b	b	b	Ab
IAA	0,218±0,07A	0,230±0,56A	0,417±0,49A	0,252±0,4Aa	0,174±0,05A
	a	a	a		a
TIBA	0,088±0,02A	0,139±0,45A	0,090±0,02A	0,090±0,002	0,084±0,019
	b	b	b	Ab	Ab

Tratamentos p: 0,0002\*\*; f: 21,134    Horas: p 0,0001\*\*; f: 29,624  
 Tratamentos\*horas p:0,0002\*\*; f: 19,728

Lipoperóxido – Raiz

Tratamentos	12h	36h	84h	156h	324h
Controle	6,33±2Bb	11,33±3,1Ab	9,44±3,1Ab	9,45±3,2Ac	8,80±3Aa

IAA	10,78±3,2Ca	19,43±5Ba	12,37±4Ca	27,60±7,1Aa	6,40±1,7Db
TIBA	7,72±2,2Bb	8,97±2,9Bc	8,93±2,5Bb	24,04±7Ab	10,23±4,1Ba

Tratamentos p: 0,0001\*\*; f: 18,293 Horas: p 0,0001\*\*; f: 14,576

Tratamentos\*horas p:0,0002\*\*; f: 24,255

#### Superóxido dismutase - Raiz

Tratamentos	12h	36h	84h	156h	324h
Controle	39,8±6,2Ab	44,3±6,1Ab	40,3±5,3Ac	48,0±6Ab	48,7±5,8Ab
IAA	63,6±8Ba	76,1±8,9Aa	77,8±7,2Aa	76,9±8,2Aa	76,5±8,6Aa
TIBA	61,4±8,5Ba	68,7±7,5Ba	65,3±7,1Bb	80,8±7,9Aa	71,8±8,1Aba

Tratamentos p: 0,0001\*\*; f: 10,444 Horas: p 0,0001\*\*; f: 20,411

Tratamentos\*horas p:0,0001\*\*; f: 5,981

#### Catalase – Raiz

Tratamentos	12h	36h	84h	156h	324h
Controle	0,00125±0,00 007Aab	0,0010±0,000 2Bab	0,0014±0,000 3Aab	0,0011±0,000 5Aab	0,0021±0,000 6Aab
IAA	0,00249±0,00 12Aa	0,0050±0,001 Aa	0,0026±0,000 9Aa	0,0024±0,000 8Aa	0,0029±0,000 9Aa
TIBA	0,00209±0,00 11Ab	0,0015±0,000 3Aab	0,0029±0,000 2Ab	0,0015±0,000 3Ab	0,0010±0,000 2Ab

Tratamentos p: 0,0001\*\*; f: 12,379 Horas: p 0,0005\*; f: 22,824

Tratamentos\*horas p:0,0001\*\*; f: 15,227

#### Peroxidase - Raiz

Tratamentos	12h	36h	84h	156h	324h
Controle	0,222±0,13A b	0,558±0,2Ab	0,481±0,023 Ab	0,518±0,16A b	0,739±0,27A c
IAA	0,847±0,24B a	1,439±0,4Aa	1,210±0,48A Ba	1,149±0,45A Ba	1,163±0,5Ab

TIBA	1,024±0,42B	0,840±0,03B	1,225±0,5Ba	1,108±0,43B	4,379±1,1Aa
	a	b		a	

---

Tratamentos p: 0,0001\*\*; f: 30,233    Horas: p 0,0001\*\*; f: 10,665

Tratamentos\*horas p:0,0002\*\*; f: 10,801

---

\*<sup>1</sup>Os resultados são apresentados média ± desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não apresentam diferença significativa entre si pelo teste Tukey.

## 4.4 DISCUSSÃO

**4.4.1 Alcaloide totais e liriodenina** - As maiores concentrações de alcaloides totais encontrados em raízes de *Annona emarginata* em relação às folhas confirma o que tem sido observado nesta e em outras espécies do gênero, comprovando ser produção organo-específica com maiores concentrações em raízes (DE LA CRUZ-CHACÓN et al., 2019 MIMI et al., 2021; CORREA et al., 2022).

Da mesma forma que observado neste experimento, os reguladores vegetais têm demonstrado modular a síntese de alcaloides em diversas espécies do gênero *Annona*. Souza et al (2019) verificaram que após embebição das sementes de *Annona cacans* em dissolução contendo GA<sub>4+7</sub> + 6-Benziladenina as raízes das plântulas dobraram o conteúdo de alcaloides totais e liriodenina, e nas folhas cotiledonares a quantidade de alcaloides totais diminuiu e a concentração de liriodenina não foi alterada. Silva et al. (2021) também verificaram alterações nos alcaloides durante a germinação e em plântulas de *Annona x atemoya* Mabb. cv. 'Gefner', com redução na concentração de alcaloides totais após tratamento das sementes com GA<sub>3</sub> usado para a superação da dormência. Nestes trabalhos a modulação foi em relação ao incremento e também à redução de alcaloides, o que se justifica em função dos diferentes reguladores empregados, estádios de desenvolvimento e espécies.

Em relação ao efeito do IAA os resultados deste experimento demonstraram de modo geral, redução da concentração de alcaloides totais e liriodenina quando comparados com resultados das plantas que receberam o inibidor de transporte de auxina (TIBA). Ao ser empregado, o inibidor permitiu aumento das concentrações tanto de alcaloides totais como de liriodenina. Estes resultados diferem dos obtidos por Souza et al. (2022) que observaram aumento significativo de alcaloides com o uso da auxina

AIB também em *A. emarginata*. De forma semelhante, mas com espécies de outros gêneros Mostafa & Abou Alham (2011) verificaram que em folhas de *Balanites aegyptiaca* a síntese de alcaloides aumentou com a utilização de diferentes concentrações de IAA. Em *Catharanthus roseus* a aplicação foliar de ácido indolilacético (IAA), proporcionou aumento na produção do alcaloide indólico vincristina (MUTHULAKSHMI; PANDIYARAJAN, 2013).

Assim como observado em nosso experimento com *Annona emarginata*, Godjin et al. (1992) e Pasquali et al. (1992) também detectaram efeito negativo na concentração de alcaloides indólicos na cultura de células de *Daucus carota* e *C. Roseus* com a aplicação das auxinas ácido 1-naftalenoacético (NAA), ácido indolilacético (IAA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Godjin et al. (1992) e Pasquali et al. (1992) justificaram os resultados devido a menor transcrição do gene da triptofano descarboxilase que participa da rota de biossíntese de alcaloides através da via do triptofano, que também dá origem ao IAA, sendo que o nível desses transcritos aumentou em meio sem as auxinas testadas (IAA, NAA e 2,4-D).

O fato de o ácido indolilacético compartilhar a rota do triptofano na produção de alcaloides (MAEDA; DUDAREVA, 2012; LJUNG, 2013) pode justificar a menor concentração de alcaloides quando há maior concentração de auxina, o que parece confirmar os resultados quando o inibidor do transporte de auxina é aplicado. O TIBA atua competindo com o IAA pelo sítio de ligação, portanto, uma vez que as moléculas TIBA estejam ligadas ao receptor, o transporte da maior parte da auxina produzida é interrompido (SANTANA et al., 1970). Para inibir o transporte polar da auxina, o TIBA age bloqueando a saída desse regulador da célula, devido a sua ligação aos transportadores de efluxo (complexo protéico pin-shaped inflorescences-PIN), ocasionando acúmulo de auxina intracelular (KŘEČEK et al., 2009). Tendo em vista que a auxina regula para baixo a transcrição do gene triptofano descarboxilase (GODJIN et al., 1992), ou seja, menos triptofano é sintetizado, e que além disso a aplicação de auxina exógena, leva ao aumento da síntese da endógena (EPSTEIN e LAVE, 1983) e portanto maior competição entre as auxinas e os alcaloides por substrato (triptofano), o que pode ter resultado nas alterações da síntese de alcaloides. Ono et al. (1998) verificaram após aplicação de auxinas (IAA, NAA e IBA), que houve uma redução no conteúdo de triptofano, usado para maior produção de IAA. Sendo assim, quando aplicamos o IAA nas mudas de *Annona emarginata*, podemos inferir que o triptofano foi mais utilizado para síntese de ácido indolilacético, do que para síntese de

alcaloides, reduzindo portanto a concentração de alcaloides totais em raízes e folhas, bem como redução da liriodenina em raízes.

**4.4.2 Nitrato redutase** - Além da importância do compartilhamento da rota de síntese com o IAA através do triptofano, os alcaloides como moléculas nitrogenadas do metabolismo especializado, necessitam para sua síntese a disponibilidade de moléculas de nitrogênio, o que também está relacionado com a atividade da enzima nitrato redutase, uma vez que é a primeira enzima a catalisar a reação de nitrato a nitrito no citosol durante o processo de assimilação do nitrato em compostos orgânicos (Ali et al., 2007; Joshi, Skula, Skula, 2011). Os átomos de nitrogênio dos alcaloides são advindos de aminoácidos, sendo que na maior parte dos casos os alcaloides mantêm em sua estrutura o esqueleto carbônico do aminoácido precursor, e dentre os precursores, o triptofano é o aminoácido que está efetivamente envolvido na biossíntese de alcaloides e de auxina. (Dewick, 2000; Maeda e Dudareva, 2012). Neste contexto, pode-se inferir que houve variação da atividade da nitrato redutase devido a aplicação de auxina ou seu inibidor de transporte. No entanto, não é possível determinar o quanto foi destinado para a síntese de alcaloides (MENGEL & KIRKGY, 2001), ou para o aparato fotossintético (DODD et al., 2005; NUNES-NESSI et al, 2010), ou outros processos metabólicos. O que se evidencia é que mesmo com os menores valores da atividade da nitrato, especialmente às 156h e 324h, se obteve as maiores concentrações de alcaloides nas raízes, o que sugere o uso de precursores assimilados anteriormente.

Chamizo-Ampudia et al. (2017) verificaram que o alcaloide flavopereirina inibiu a atividade da nitrato redutase, o que sugere que nesse trabalho, com *Annona emarginata*, há possibilidade de que algum alcaloide detectado quando o transporte de auxina foi inibido (xilopina ou N-metil laurotetanina) possa ter reduzido a atividade da enzima nos momentos de maior síntese de alcaloides (156h e 324h).

**4.4.3 Trocas gasosas e eficiência da clorofila *a*** – O efeito da auxina observado de modo pontual as 12h no incremento da assimilação (Anet) e condutância estomática (Gs) encontra respaldo em trabalhos de diversos autores quanto à relação entre o ácido indolilacético e o teor de clorofila associados ao aumento da eficiência fotossintética (Czepak et al., 1997, 2002, 2004; Joshi, Shukla, Shukla, 2011), aumento da assimilação de CO<sub>2</sub> e da biomassa (Joshi, Shukla, Shukla, 2011). Além disso, hormônios como a auxina e a citocinina inibem o fechamento estomático induzido pelo ABA (Tanaka et al., 2006).

Em contrapartida, Sousa et al. (2022) verificaram também em *A. emarginata* que a aplicação da auxina IBA (ácido indolibutírico) resultou em decréscimo na assimilação de CO<sub>2</sub> que culminou em redução na eficiência de carboxilação da Rubisco, o que não foi observado neste experimento.

A redução da transpiração com o uso do inibidor de auxina, observada principalmente às 156h e 324h, pode ser explicada pela redução da ação da auxina, que tem função de diferenciação dos vasos do xilema como na manutenção da funcionalidade dos vasos (Jacobs, 1952; Drazeta, et al., 2004), sendo assim a inibição de seu transporte pode ter resultado em redução de sua ação com alterações na transpiração.

Esta redução da transpiração com a inibição da auxina pode ter sido benéfica a síntese de alcaloides por um possível acúmulo de nitrogênio nas raízes (BLOOM et al., 2010). O nitrogênio absorvido pelas raízes (ex. nitrato NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) pode ter sido reduzido neste órgão e ao contrário de ser translocado para a parte aérea pode ter permanecido nas raízes pela diminuição do fluxo da transpiração, o que está de acordo com Miller et al. (2007). Durante o processo de assimilação, a fim de evitar a toxicidade do amônio gerado a partir da assimilação do nitrato, as células convertem amônio em aminoácidos (LAM et al., 1996). Desta forma, os aminoácidos formados, como a tirosina e o triptofano, poderão dar origem a síntese de alcaloides, o que parece ter ocorrido neste experimento. Além disso, a menor atividade da nitrato redutase nas folhas, especialmente as 324h reforça esta hipótese, uma vez que a menor atividade pode ter ocorrido devido ao menor recebimento de nitrogênio das raízes para a assimilação e também por translocação em momento anterior para as raízes o que encontra suporte em Miller et al. (2007). Outro aspecto a ser futuramente explorado é o fato de existirem espécies com maior assimilação de nitrato em parte aérea e outras em raízes. Neste contexto, a maior disponibilidade de nitrogênio nas raízes favoreceu a produção de alcaloides que encontra sua maior síntese neste órgão (DE LA CRUZ-CHACÓN et al., 2012; MIMI et al., 2021)

**4.4.4 Açúcares e amido** – As variações nos níveis de carboidratos, principalmente as reduções nas concentrações quando se observa as maiores concentrações de alcaloides (156 e 324h) com a inibição do transporte de auxina, estão relacionadas a maior disponibilidade de esqueletos carbônicos e energia para síntese de compostos como aminoácidos e consequentemente os alcaloides, conforme sugerido por

HIKOSAKA et al., 2004 e NUNES-NESSI et al., 2010. As maiores concentrações de açúcares redutores que foram observadas com a aplicação de IAA coincidem com relatos de Ono et al. (1998) que verificaram aumento nas concentrações de açúcares totais e redutores com aplicação das auxinas NAA e IBA.

Quando inibimos o transporte de auxina observamos que houve uma redução dos açúcares, utilizados para maior síntese de alcaloides, o que corrobora com Dudareva et al. (2013) quando afirmam que a biossíntese dos metabolitos especializados depende da disponibilidade de carbono (C), nitrogênio (N) e energia fornecida pelo metabolismo primário, e como consequência, a disponibilidade desses blocos de construção afeta a concentração de metabolitos especializados, demonstrando um alto grau de conectividade entre os metabolismos primário e especializado .

**4.4.5 Espécies reativas de oxigênio e atividade enzimática** - para evitar o efeito de espécies reativas de oxigênio geradas pelo metabolismo primário, pode ocorrer aumento da atividade enzimática, gerando um acúmulo de aminoácidos e produção de alcaloides, com aumento da reserva de nitrogênio, conforme proposto por Ghorbanpour e Hatami (2013), o que ocorre principalmente nas raízes de Annonaceae. Nesse contexto, observou-se incremento na atividade da SOD e redução dos valores de lipoperóxido e portanto, menores danos de membrana. Desta forma, o menor estresse resultou em menor produção de alcaloides. Quando o transporte de auxina foi inibido, houve aumento da atividade da SOD, e aumento na concentração de lipoperóxido, mostrando que o estresse foi maior, o que levou a maior concentração de alcaloides. Estes resultados encontram suporte em relatos de Barbosa et al. (2014), de que o aumento do estresse resulta em maior dano de membrana, devido a maior produção de  $H_2O_2$  e maior atuação da POD.

Em resumo pode-se relatar que a aplicação de IAA, após causar alterações pontuais na fotossíntese e conseqüentemente na produção de açúcares, resultou em alterações no metabolismo antioxidante, que pode estar relacionado com a defesa da planta e portanto, provocado alterações na concentração de alcaloides totais, lirioidenina e outros alcaloides analisados, principalmente em raízes de mudas de *Annona emarginata*. E quando o transporte foi inibido, observamos um incremento na concentração de alcaloides totais tanto em folhas como em raízes, e incremento de lirioidenina em relação ao tratamento com IAA, porém em menor quantidade em relação ao controle. No metabolismo primário a inibição do transporte de auxina causou

reduções na transpiração e nos açúcares e amido nos momentos de maior síntese de alcaloides (156h e 324h).

#### **4.5 Conclusão**

A aplicação do ácido indolilacético provoca alterações no metabolismo primário que resultam em decréscimo na concentração de alcaloides totais e liriodenina em raízes de mudas de *Annona emarginata*, o que foi possível confirmar com a inibição do transporte de auxina. Com a inibição do transporte de auxina, nos momentos em que verificamos maior concentração de alcaloides totais tanto em raízes como em folhas, houve redução na transpiração e no teor de carboidratos. A auxina IAA altera as relações entre presença e ausência de alcaloides. Nas folhas após aplicação de IAA foi possível detectar lanuginosina, liriodenina e xilopina, e quando seu transporte é inibido, desaparece a xilopina e surge a N-metil laurotetanina. Nas raízes a IAA promove o aparecimento de discretina e xilopina, enquanto a oxoglauca não é detectada, e quando o transporte da auxina é inibido, não se observa assimilobina e oxoglauca, mas sim a xilopina.

#### **Referências**

- ALEXIEVA V, SERGIEV I, MAPELLI S, KARANOV E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment*. 24(12): 1337-1344, 2001.
- BARON, D.; AMARO, A. C. E.; CAMPOS, F. G.; FERREIRA, G. Leaf gas exchanges responses of atemoya scion grafted onto *Annona* rootstocks. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, v. 30, n. 3, p. 203–213, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40626-018-0115-4>>.
- BEAUCHAMP C, FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*. 44(1):276-287, 1971.
- BRADFORD, M.M. 1976. Um método rápido e sensível para a quantificação de quantidades de microgramas de proteína utilizando o princípio da ligação proteína-corante. *Bioquímica analítica*. 72 (1-2): 248-254, 1976.
- BRISKE, D. D.; CAMP, B. J.; *Weed Science*. 30, 106, 1982.

CATO, S. C.; CASTRO, P. R. D. C. Redução da altura de plantas de soja causada pelo ácido 2, 3, 5-triiodobenzóico. *Ciência Rural*, 36, 981-984, 2006.

CHEN C-Y, WU H-M, CHAO W-Y, LEE C-H. Review on pharmacological activities of liriodenine. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 7(18): 1067–1070, 2013.

CLEGG, K. M. The application of the anthrone reagent to the estimation of starch in cereals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 7, n. 1, p. 40-44, 1956.

DA SILVA, G. C., HONÓRIO, A. B. M., MARTIN, B. C., CAMPOS, F. G., & FERREIRA, G. Compostos bioativos de sementes de annona x atemoya mabb. 'gefner' durante o processo de embebição em ga3. *Revista Multidisciplinar em Saúde*, 2(3), 11-11, 2021.

DE LA CRUZ, C. I.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. Liriodenine alkaloid in *Annona diversifolia* during early development. *Natural product research*, v. 26, n. 2, p. 42–49, 2012.

DE LA CRUZ, C. I.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; GUEVARA, F. P.; JÍMENEZ, G. L. F. Liriodenine, early antimicrobial defence in *Annona diversifolia*. *Zeitschrift für Naturforschung*, v. 66, n. Table I, p. 377–384, 2011.

DELANHOL, S. J.; MANTOAN, L. P. B.; AMARO, A. C. E.; FERREIRA, G. Gas exchange in *Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. RAINER subjected to salt stress and application of plant growth regulator. *Scientia Agraria Paranaensis*, v. 17, n. 1, p. 67 70, 2018.

DEMMIG-ADAMS B, EBBERT V, ZARTER CR, ADAMS WW. Características e emprego dependente da espécie de dissipação térmica flexível versus sustentada e fotoinibição. Em *Fotoproteção, fotoinibição, regulação gênica e meio ambiente*. Springer, Dordrecht. 39-48, 2008.

DODD AN, SALATHIA N, HALL A, KÉVEI E, TÓTH R, NAGY F, HIBBERD JM, MILLAR AJE, WEBB AAR. Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science*. 309(5734): 630 – 633, 2005.

EGYDIO-BRANDÃO, A.P.M.; NOVAES, P.; SANTOS, D. Y. A. C. Alkaloids from *Annona*: Review from 2005 to 2016. *JSM Biochem Mol Biol*, v. 4, n. 3, p. 1031, 2017.

ELGORASHI, E. E.; DREWES, S. E.; STADEN, J. V.; *Fitoterapia*. 73, 490, 2002.

EVANS, W. C.; Trease and Evans' Pharmacognosy, 14th ed., WB Saunders

FAIRBAIRN, J. W.; SUWAL, P. N.; *Phytochemistry* , 1, 38, 1961.

GARCIA, I. S. et al. Changes in soluble carbohydrates during storage of *Caesalpinia echinata* LAM. (Brazilwood) seeds, an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Journal of Biology*, v. 66, n. 2b, p. 739-45, 2006.

GELDNER, N., FRIML, J., STIERHOF, Y. D., JÜRGENS, G., & PALME, K. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, 413(6854), 425-428, 2001.

GHORBANPOUR, M.; HATAMI, M.; KHAVAZI, K. Role of plant growth promoting rhizobacteria on antioxidant enzyme activities and tropane alkaloid production of *Hyoscyamus niger* under water deficit stress. *Turkish Journal of Biology*, v. 37, n. 3, p. 350-360, 2013.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química nova*, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GODDIJN, O. J. M.; DE KAM, R. J.; ZANETTI, A.; SCHILPEROORT, R. A.; HOGE, J. H. C. Auxin rapidly down-regulates transcription of the tryptophan decarboxylase gene from *Catharanthus roseus*. *Plant Molecular Biology*, v. 18, n. 6, p. 1113–1120, 1992.

GONÇALVES, S.; ROMANO, A. In vitro culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. *Biotechnology advances*, v. 31, n. 2, p. 166-174, 2013.

HEATH RL, PACKER L. Fotoperoxidação em cloroplastos isolados: I. Cinética e estequiometria da peroxidação de ácidos graxos. *Arquivos de bioquímica e biofísica*. 125 (1): 189-198, 1968.

HIKOSAKA, K. Interspecific difference in the photosynthesis–nitrogen relationship: patterns, physiological causes, and ecological importance. *Journal of Plant Research*, 117: 481-494, 2004.

HIRATA, K.; ASADA, M.; YATANI, E.; MIYAMOTO, K.; MIURA, Y.; *Planta Med.*

HOFT M, VERPOORTE R, BECK E. Growth and alkaloid contents in leaves of *Tabernaemontana pachysiphon* Stapf (Apocynaceae) as influenced by light intensity, water and nutrient supply. *Oecologia* 107:160–169, 1996.

HÖFT, M.; VERPOORTE, R.; Beck, E.; *Planta Med.* 1998, 64, 148.

HUOT, B.; YAO, J.; MONTGOMERY, B. L.; HE, S. Y. Growth–Defense Tradeoffs in Plants: A Balancing Act to Optimize Fitness. *Molecular Plant*, v. 7, n. 8, p. 1267–1287, ago. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/mp/ssu049>>.

ITENOV, K.; MØLGAARD, P.; NYMAN, U.; *Phytochemistry* 1999, 52, 1229.

JAMWAL, K.; BHATTACHARYA, S.; PURI, S. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, v. 9, n. June 2017, p. 26–38, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.12.003>>.

JOSHI, G.; SHUKLA, A.; SHUKLA, A. Synergistic response of auxin and ethylene on physiology of *Jatropha curcas* L. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 23, n. 1, p. 66–77, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00344-011-9230-z>>.

JUNG, S. Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 42, n. 3, p. 225–231, mar. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S098194280400004X>>.

KAR M, MISHRA D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant physiology*. 57(2):315-319, 1976.

KOEPPE, D. E.; ROHRBAUGH, L. M.; RICE, E. L.; WENDER, S. H.; *Physiol.*

KOORNNEEF, A.; PIETERSE, C.M.J. Cross talk in defense signaling. *Plant physiology*, v. 146, n. 3, p. 839-844, 2008.

KUMAR R, AGARWAL P, PAREEK A, TYAGI AK, SHARMA AK. Genomic survey, gene expression, and interaction analysis suggest diverse roles of ARF and Aux/IAA proteins in *Solanaceae*. *Plant Mol Biol Rep* 33:1552–157, 2015.

KUTCHAN, T. M.; GERSHENZON, J.; MOLLER, B.; DAVID, R.; GANG, D. R. Natural Products. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; GONES, R. (Ed.).

Biochemistry and Molecular Biology of Plants. 2. ed. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2015. p. 1132–1221.

LI, H.-T.; WU, H.-M.; CHEN, H.-L.; LIU, C.-M.; CHEN, C.-Y. The Pharmacological Activities of (-)-Anonaine. *Molecules*, v. 18, n. 7, p. 8257–8263, 12 jul. 2013. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/18/7/8257>>.

LJUNG, K. Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, v. 140, n. 5, p. 943–950, 2013. Disponível em: <<http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.086363>>.

LÚCIO, A. S. S. C.; ALMEIDA, J. R. G. da S.; DA-CUNHA, E. V. L.; TAVARES, J. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Alkaloids of the Annonaceae: Occurrence and a Compilation of Their Biological Activities. In: *Alkaloids: Chemistry and Biology*. [s.l: s.n.]74p. 233–409, 2015.

MAAS, P. J. M.; KAMER, H. M. De; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R. De; RAINER, H. Annonaceae from Central-eastern Brazil. *Rodriguésia*, v. 52, n. 80, p. 65–98, 2001.

MAEDA, H.; DUDAREVA, N. The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, v. 63, n. 1, p. 73–105, 2012. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-arplant-042811-105439>>.

MANTOAN, L. P. B.; ROLIM DE ALMEIDA, L. F.; MACEDO, A. C.; FERREIRA, G.; BOARO, C. S. F. Photosynthetic adjustment after rehydration in *Annona emarginata*. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 38, n. 6, p. 157, 30 jun. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11738-016-2171-1>>.

MENGEL K, KIRKBY E.A. Principles of plant nutrition. 5th ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 849p. 2001.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MIMI, C.O., DE-LA-CRUZ-CHACÓN, I., CAIXETA SOUSA, M., APARECIDA RIBEIRO VIEIRA, M., ORTIZ MAYO MARQUES, M., FERREIRA, G., & SILVIA FERNANDES BOARO, C. (2021). Chemophenetics as a Tool for Distinguishing Morphotypes of *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer. *Chemistry & Biodiversity*, 18(10), e2100544.

MORRIS, D. L. Quantitative Determination of Carbohydrates With Dreywood's Anthrone Reagent. *Science*, v. 107, n. 2775, p. 254-255, 1948.

MOSTAFA, G. G.; ABOU ALHAM, M. F. Effect of Gibberellic Acid and Indole 3-acetic Acid on Improving Growth and Accumulation of Phytochemical Composition in *Balanites aegyptiaca* Plants. *American Journal of Plant Physiology*, v. 6, n. 1, p. 36–43, 1 jan. 2011. Disponível em: <<http://www.scialert.net/abstract/?doi=ajpp.2011.36.43>>.

MURCIA, G.; FONTANA, A.; PONTIN, M.; BARALDI, R.; BERTAZZA, G.; PICCOLI, P. N. ABA and GA3 regulate the synthesis of primary and secondary metabolites related to alleviation from biotic and abiotic stresses in grapevine. *Phytochemistry*, v. 135, p. 34–52, mar. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942216302734>>.

MUTHULAKSHMI, S.; PANDIYARAJAN, V. Influence of IAA on the vincristine content of *Catharanthus roseus* ( L ). G . Don . *Asian Journal of Plant Science and Research*, v. 3, n. 4, p. 81–87, 2013.

NUNES-NESSI A, FERNIE AR, STITT M. Metabolic and Signaling Aspects Underpinning the Regulation of Plant Carbon Nitrogen Interactions. *Molecular Plant*. 3: 973-996, 2010.

PARMOON, G., EBADI, A., JAHANBAKHS, S., HASHEMI, M., & MOOSAVI, S. A. Effect of exogenous application of several plant growth regulators on photosynthetic pigments of fennel plants. *Notulae Scientia Biologicae*, 10(4), 508-515, 2018.

PASQUALI, G.; GODDIJN, O. J. M.; DE WAAL, A.; VERPOORTE, R.; SCHILPEROORT, R. A.; HOGE, J. H. C.; MEMELINK, J. Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus roseus* by auxin and elicitors. *Plant Molecular Biology*, v. 18, n. 6, p. 1121–1131, 1992.

PEIXOTO PHP, CAMBRAIA J., SANT'ANNA R., MOSQUIM PR, MOREIRA, MA. Efeitos do alumínio na peroxidação lipídica e na atividade de enzimas do metabolismo oxidativo em sorgo. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 11 (3): 137-143, 1999.

PICHERSKY, E.; LEWINSOHN, E. Convergent Evolution in Plant Specialized Metabolism. *Annual Review of Plant Biology*, v. 62, n. 1, p. 549–566, 2011. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-arplant-042110-103814>>.

Plant. 1970, 23, 258.

RILEY-SALDAÑA CA, CRUZ-ORTEGA MDR, MARTÍNEZ VÁZQUEZ M, DE-LA-CRUZ-CHACÓN I, CASTRO-MORENO M, GONZÁLEZ-ESQUINCA AR. Acetogenins and alkaloids during the initial development of *Annona muricata* L. (Annonaceae). *Zeitschrift für Naturforschung C*. 72(11–12): 497–506, 2017.

ROBINSON, T.; *Science* 1974, 184, 430.

ROCA-PÉREZ, L.; BOLUDA, R.; GAVIDIA, I.; PÉREZ-BERMÚDEZ, P.; *Phytochemistry*. 65, 1869, 2004.

SINGH A, PANDEY B, KUMARI S, AGRAWAL M. 2015. Nitrogen availability modulates CO<sub>2</sub>-induced responses of *Catharanthus roseus*: Biomass allocation, carbohydrates and alkaloids profile. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* 2:160-167.

SINGH BRAR, H. et al. Girdling and grapevine leafroll associated viruses affect berry weight, colour development and accumulation of anthocyanins in ‘Crimson Seedless’ grapes during maturation and ripening. *Plant Science*, v. 175, n. 6, p. 885-897, 2008.

SOUSA MC, BRONZATTO AC, GONZÁLEZ-ESQUINCA AR, CAMPOS FG, DALANHOL SJ, BOARO CSF, MARTINS AL, DA SILVA ALMEIDA JRG, COSTA EV, DE-LA-CRUZ-CHACÓN I, FERREIRA G. The production of alkaloids in *Annona cacans* seedlings is affected by the application of GA<sub>4+7</sub> + 6-Benzyladenine. *Biochemical Systematics and Ecology*. 84(April): 47–51, 2019.

TEISSEIRE H, GUY V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). *Plant science*. 153(1): 65-72, 2000.

TSUCHIYA, T.; OHTA, H.; OKAWA, K.; IWAMATSU, A.; SHIMADA, H.; MASUDA, T.; TAKAMIYA, K. -i. Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: Finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 96, n. 26, p. 15362–15367, 21 dez. 1999. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.96.26.15362>>.

VEROTTI, T. do P.; OLIVEIRA, C. G. de; SOUZA PARREIRAS, N. de; GONÇALVES, F. C. M.; CORRÊA, C. V.; FERREIRA, G.; CAMPOS, F. G.; BOARO, C. S. F. Vegetal regulators increase the quality of atemoya fruits and recover the photosynthetic metabolism of stressed plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 41, n. 9, p. 1–8, 2019. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0217930>>.

VERPOORTE, R. Secondary Metabolism. In: *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2000. p. 1–29.

WALLAART TE, PRAS N, BEEKMAN AC, QUAX WJ. Seasonal variation of artemisinin and its biosynthetic precursors in plants of *Artemisia annua* of different geographical origin: Proof for the existence of chemotypes. *Planta Médica*. 66(1): 57–62, 2000.

YEMM, E. W.; FOLKES, B. F. The regulation of respiration during the assimilation of nitrogen in *Torulopsis utilis*. *Biochemical Journal*, v. 57, n. 3, p. 495, 1954.