



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Botucatu



FONTES DE NITROGÊNIO NA FOTOSSÍNTESE, PRODUÇÃO DE ALCALOIDES E VOLÁTEIS FOLIARES EM *Annona sylvatica* A. St.- Hil.

PATRICIA LUCIANA CARRIEL CORRÊA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP,
para obtenção do título de Mestre no
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas (Botânica), Área de concentração:
Botânica.



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

FONTES DE NITROGÊNIO NA FOTOSÍNTESE, PRODUÇÃO DE
ALCALOIDES E VOLÁTEIS FOLIARES EM *Annona sylvatica* A. St.-
Hil.

PATRICIA LUCIANA CARRIEL CORRÊA

ORIENTAÇÃO: PROF.^a DR.^a GISELA FERREIRA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP,
para obtenção do título de Mestre no
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas (Botânica), Área de concentração:
Botânica.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Corrêa, Patricia Luciana Carriel.

Fontes de nitrogênio na fotossíntese, produção de alcaloides e volateis foliares em *Annona sylvatica* A. St.- Hil. / Patricia Luciana Carriel Corrêa. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Gisela Ferreira

Capes: 20303009

1. Anonácea. 2. Nitratos. 3. Amônio. 4. Metabólitos. 5. Alcaloides. 6. Fotossíntese.

Palavras-chave: Amônio; Annonaceae; Metabólitos especializados; Nitrato.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar pelos caminhos que fizeram chegar até aqui.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu e ao Departamento de Botânica do IBB de Botucatu, pela disponibilização de sua infraestrutura para a realização deste projeto.

À Prof^ª Dr^ª Gisela Ferreira, pela orientação, amizade, carinho, compreensão, confiança, dedicação na realização do presente trabalho e por ser minha inspiração pessoal e profissional.

À Prof^ª Dr^ª Magali Ribeiro da Silva do Depto. Ciência Florestal - Faculdade de Ciências Agrônomicas - UNESP - Botucatu e a Maria Vitória Barros Sifuentes, por disponibilizarem as mudas de *Annona sylvatica* utilizadas neste trabalho.

À Prof^ª Dr^ª Carmen Silvia Fernandes Boaro, pelo apoio na elaboração e desenvolvimento do trabalho.

À Prof^ª Dr^ª Camila Kissman e Prof^ª Dr^ª Elizabeth Orika Ono, juntamente com a Prof^ª Dr^ª Carmen Silvia Fernandes Boaro, pelas correções e sugestões atribuídas no momento do exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Iván De la Cruz Chacón, por todo conhecimento transmitido com muita dedicação e entusiasmo.

À Prof^ª Marcia Ortiz Mayo Marques, por disponibilizar seu laboratório no Instituto Agrônomico de Campinas, viabilizando e auxiliando nas análises relacionadas aos compostos voláteis foliares.

Ao Felipe Giroto Campos, Marília Caixeta Sousa e Maria Aparecida Ribeiro Vieira por todo trabalho realizado em conjunto, pelo apoio na parte prática e intelectual, pela parceria e amizade, agradeço imensamente.

À Mariana de Fátima De Pieri Oliveira e Carolina Ovíde Mimi por cada momento que passamos juntas, muito obrigada por tudo.

Aos colegas de laboratório, por compartilhar tantos momentos especiais.

Aos funcionários do Departamento de Botânica do IBB de Botucatu, por todo auxílio necessário.

Aos meus queridos pais, Luiz Roberto Martinson Corrêa e Sandra Maria Carriel Corrêa, por todo apoio e encorajamento, pela participação na execução do experimento, por estarem sempre ao meu lado, acreditando e dando suporte para a realização dos meus sonhos.

À minha irmã Natalia Fernanda Carriel Corrêa, pela valorização e compartilhamento da mesma profissão, me fazendo sentir capaz de correr atrás dos meus objetivos.

Ao meu noivo Leonardo de Andrade Molina e ao meu filho Ícaro Corrêa Molina, por serem a motivação do meu sorriso diário e a razão para seguir em frente.

À toda minha família e amigos, por acreditarem em mim e valorizarem meu trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. CAPÍTULO I: Revisão bibliográfica.....	10
2.1 Família Annonaceae	10
2.1.1 <i>Annona sylvatica</i> A. St.-Hil.	11
2.2 Metabolismo vegetal	11
2.2.1 Metabolismo primário	13
<i>Metabolismo do nitrogênio</i>	13
<i>Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a</i>	14
2.2.2 Metabolismo especializado.....	15
<i>Alcaloides benzilisoquinolínicos</i>	15
<i>Compostos voláteis foliares</i>	18
3. CAPÍTULO II: Influência de NO ₃ ⁻ e NH ₄ ⁺ na fotossíntese, produção de alcaloides e voláteis foliares em <i>Annona sylvatica</i> A. St.-Hil	20
3.1 Resumo.....	20
3.2 Abstract	21
3.3 Introdução.....	22
3.4 Material e Métodos	23
<i>Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a</i>	25
<i>Extração e quantificação de alcaloides</i>	26
<i>Compostos voláteis foliares</i>	27
<i>Análises estatísticas</i>	28
3.5 Resultados	29
3.6 Discussão	40
3.7 Conclusões	43
3.8 Agradecimentos	43
3.9 Referências Bibliográficas	43
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DE TODA A DISSERTAÇÃO	47

RESUMO - Para o nitrogênio (N) ser utilizado pela planta para síntese de metabólitos vegetais ele deve estar disponível nas fontes nitrato (NO_3^-) ou amônio (NH_4^+). O NO_3^- demanda mais energia do que o NH_4^+ para ser assimilado e incorporado em esqueletos carbônicos por necessitar de agentes redutores. O metabolismo do N está relacionado ao metabolismo do carbono (C), pois o N necessita de esqueletos carbônicos para sua incorporação e a assimilação de CO_2 depende de um adequado suprimento de N para formação do aparato fotossintético. Além da relação entre N e C com o metabolismo primário, há relação também com o metabolismo especializado, envolvendo a síntese de compostos voláteis foliares formados por unidades de C e a síntese de alcaloides, que são compostos nitrogenados. Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi analisar como o NO_3^- e NH_4^+ influenciam na fotossíntese e se há alteração na produção de alcaloides e voláteis foliares em *Annona sylvatica* em função das diferentes fontes de N. Para tanto, foi realizado experimento em esquema fatorial 4x3, sendo 4 tratamentos [NH_4^+ , NO_3^- , $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ e sem o fornecimento de N (S/N)] e 3 épocas de coleta [30, 60 e 90 dias após o início do experimento (DAT)]. Foi observado que aos 90 DAT, as plantas que receberam NH_4^+ apresentaram maior taxa de assimilação líquida de CO_2 (A_{net}) que as plantas que receberam NO_3^- e que não receberam N; a eficiência de carboxilação da enzima rubisco (A_{net}/C_i) foi maior em plantas cultivadas com NH_4^+ ; a concentração interna de CO_2 na câmara subestomática (C_i) foi menor em plantas cultivadas com NH_4^+ em comparação com plantas cultivadas com $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ e sem N (S/N); o tratamento com NH_4^+ apresentou maior rendimento quântico efetivo do fotossistema II (ΦFSII) que o tratamento S/N; a maior concentração de alcaloides totais e liriodenina foi observada em plantas cultivadas com NH_4^+ . O NH_4^+ também teve efeito sobre o composto volátil foliar majoritário β -selineno, que apresentou menor porcentagem relativa e correlação negativa em comparação ao tratamento com NO_3^- aos 30 DAT. Portanto, pode-se concluir que o fornecimento diferenciado de fontes de N altera a fotossíntese, a produção de alcaloides e de compostos voláteis foliares.

Palavras-chave: Annonaceae; nitrato; amônio; metabólitos especializados.

ABSTRACT - For nitrogen (N) to be used by the plant for synthesis of plant metabolites it must be available through the sources nitrate (NO_3^-) or ammonium (NH_4^+). NO_3^- requires more energy than NH_4^+ to be assimilated and incorporated into carbon skeletons because it requires reducing agents. N metabolism is related to carbon (C) metabolism, since N requires carbonic skeletons for its incorporation and CO_2 assimilation depends on an adequate N supply for photosynthetic apparatus formation. In addition to the relationship between N and C with primary metabolism, there is also a

relationship with secondary metabolism, involving the synthesis of leaf volatiles compounds formed by units of C and the synthesis of alkaloids, which are nitrogen compounds. Thus, the objective of the present study was to analyze how NO_3^- and NH_4^+ influence gas exchange, and if there is alteration in the production of alkaloids and leaf volatiles in *Annona sylvatica*, due to the supply of different N sources. 90 days after the beginning of the treatments (DAT), the plants that received NH_4^+ presented higher rate of net CO_2 assimilation (A_{net}) than the plants that received NO_3^- and that did not receive N; the carboxylation efficiency of the rubisco enzyme (A_{net}/C_i) was higher in NH_4^+ plants; internal CO_2 concentration in the substomatic chamber (C_i) was lower in NH_4^+ plants compared to $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ plants and without N (S/N); NH_4^+ treatment showed higher effective quantum yield of photosystem II (ΦFSII) than S/N treatment. The highest concentration of total alkaloids and liriodenine was observed in plants grown with NH_4^+ . NH_4^+ also had an effect on the major leaf volatiles compound, β -selinene, where it had a lower relative percentage and negative correlation compared to treatment with NO_3^- at 30 DAT. Therefore, the differentiated supply of N sources alters gas exchange, alkaloid production and leaf volatiles compounds.

Keywords: Annonaceae; nitrate; ammonium; secondary metabolites.

1. INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é um macronutriente importante para a síntese de metabólitos vegetais, como aminoácidos, proteínas, clorofilas e compostos nitrogenados (MARSCHNER, 2012). Para ser utilizado pela planta na síntese de tais metabólitos o N deve estar disponível pelas fontes nitrato (NO_3^-) ou amônio (NH_4^+) (MUR et al., 2016). A assimilação de NO_3^- demanda mais energia do que a assimilação de NH_4^+ , uma vez que o NO_3^- absorvido necessita ser reduzido a nitrito (NO_2^-) e posteriormente a NH_4^+ para ser assimilado. O NH_4^+ não necessita de agentes redutores para sua assimilação por ser um íon oxidado, porém demanda esqueletos carbônicos para sua incorporação (BRITTO et al., 2002; MUR et al., 2016).

O metabolismo do N está interligado ao metabolismo do carbono (C) (FRITZ et al., 2006). O N compõe o aparato fotossintético, portanto a assimilação de CO_2 depende de adequado fornecimento de N; no entanto, esqueletos carbônicos são necessários para incorporação de N e consequente síntese de compostos nitrogenados, indicando assim competição entre o metabolismo do N e do C (FRITZ et al., 2006; NUNES-NESI et al., 2010).

A família Annonaceae, à qual pertence o gênero *Annona*, é conhecida por produzir metabólitos especializados como alcaloides e terpenos (constituintes dos óleos essenciais) (LOPES et al., 2014; ATTIQ et al, 2017). Tais metabólitos tem importância em âmbito medicinal e atuam como mecanismos de defesa das plantas (CHEN et al, 2013; DE LA CRUZ, 2011; FORMAGIO et al., 2013; FREEMAN et al, 2008).

O N está presente na estrutura dos alcaloides, que são moléculas alcalinas, derivadas de aminoácidos (EVANS et al, 2009; FACCHINI, 2001). Os alcaloides benzilisoquinolínicos (ABI's) são um dos metabólitos especializados mais encontrados na família Annonaceae (GONZÁLEZ-ESQUINCA et al., 2014; OROZCO-CASTILLO et al, 2016). Os ABI's incluem alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos, como a liriodenina, considerado um marcador quimiotaxonômico desta família (PHILLIPSON et al., 1985; GONZÁLEZ-ESQUINCA et al., 2014; PINHEIRO et al., 2009).

Os terpenos são compostos voláteis formados por unidades de isopreno (5C), podendo dar origem, por exemplo, a monoterpenos (10C) e sesquiterpenos (15C) (KANDI et al, 2015; ALCANTARA et al, 2017).

Existem estudos que relatam o efeito da variação na concentração de N para o gênero *Annona* em relação à síntese de alcaloides, como em *Annona diversifolia* (OROZCO-CASTILLO et al., 2016) e às trocas gasosas e compostos voláteis foliares, como em *Annona emarginata* (CAMPOS et al., 2019). Contudo, o efeito das diferentes fontes, NO_3^- e NH_4^+ , no metabolismo de *Annona* é tema ainda não discutido.

Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo analisar como o NH_4^+ , NO_3^- , $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ e a ausência de N influenciam na fotossíntese, analisando as trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, produção de alcaloides e voláteis foliares em *Annona sylvatica*, uma espécie nativa e endêmica do Brasil (MAAS et al., 2015) que é utilizada na medicina popular (GOMES et al., 2013; VENDRUSCULO et al., 2005) e apresenta propriedades anti-inflamatória, anticancerígena e inseticida (GONÇALVES et al., 2015; FORMAGIO et al., 2013; MIKOLAJCZAK et al., 1990).

2. CAPÍTULO I: Revisão bibliográfica

Nesta revisão serão apresentadas características da família Annonaceae, bem como sua relação com o metabolismo primário e especializado, com enfoque em nutrição mineral, trocas gasosas, alcaloides e voláteis foliares.

2.1 Família Annonaceae

A família Annonaceae é a maior família da ordem Magnoliales, possuindo cerca de 108 gêneros e 2.400 espécies, estando dividida em quatro subfamílias, Anaxagoreoideae, Annonoideae, Ambavioideae e Malmeoideae (CHATROU et al., 2012). Espécies da família Annonaceae são encontradas em todas as regiões do Brasil, tendo maior abundância no estado do Amazonas (MAAS et al., 2015).

Os gêneros *Annona*, *Duguetia*, *Guatteria* e *Xylopia* são os mais representativos da família Annonaceae no Brasil, pertencentes à subfamília Annonoideae (LOPES et al., 2014).

Espécies do gênero *Annona* são popularmente conhecidas por seus frutos comestíveis, como *A. muricata* L. (graviola), *A. squamosa* L. (fruta-do-conde), *A. cherimola* Mill. (cherimoia) e *Annona x atemoya* Mabb. (atemoaia). São também utilizadas na medicina popular, apresentando propriedades contra febre, reumatismo, infecções, doenças de pele, anti-inflamatórias, antiparasitárias e antidiarreia, dentre outras (RINALDI et al., 2017; RABELO, et al., 2015; EGYDIO-BRANDÃO et al, 2017).

A família Annonaceae é conhecida por produzir metabólitos especializados como alcaloides, flavonóides, triterpenos, diterpenos, esteróis, lignanas e acetogeninas (ATTIQ et al, 2017).

Foram relatados, aproximadamente, 500 alcaloides em 138 espécies de Annonaceae. Alcaloides do gênero *Annona* apresentam atividade biológica contra leishmaniose, doença de Chagas, malária, doença de Alzheimer, transtornos mentais e úlceras. Em *A. reticulata* L., por exemplo, foram encontrados os alcaloides annomontina, lanulinolisa, lysicamina e liriodenina (GONZÁLEZ-ESQUINCA et al., 2014; EGYDIO-BRANDÃO et al, 2017). Óleos essenciais de Annonaceae apresentam propriedades antimicrobianas, antiinflamatórias, citotóxicas, dentre outras. Os óleos têm como principais constituintes os terpenos espatulenol, óxido de cariofileno, germacreno D, germacreno B, biciclogermacreno, β -cariofileno e α -bergamoteno (ALCANTARA et al, 2017).

2.1.1 *Annona sylvatica* A. St.-Hil.

A espécie *Annona sylvatica*, vulgarmente conhecida como araticum-rugoso, embira e cortiça, é nativa e endêmica do Brasil, ocorrendo nas regiões nordeste, centro-oeste, sudeste e sul do país (GOMES et al., 2013; MAAS et al., 2015). Caracteriza-se por árvores de médio porte, copa densa, casca rugosa e acastanhada. Apresenta folhas simples, alternas, de coloração verde-escuras e flores amareladas, em forma de hélice. Possui infrutescências do tipo sincarpo, carnosas e amarelas quando maduras, contendo polpa doce e esbranquiçada apreciada para consumo *in natura*. Na medicina popular, suas sementes tem importância no combate a piolhos e suas folhas apresentam propriedades contra úlceras, febre, tosse, espasmos musculares e diarreia. (GOMES et al., 2013; VENDRUSCULO et al., 2005).

Em *A. sylvatica* foram identificados triglicerídeos (sementes), acetogeninas (sementes e frutos), alcaloides (sementes e ramos), lignanas (ramos), ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia longa (ramos e folhas), glicosídeos, flavonoides e terpenoides (folhas) (GONÇALVES et al., 2015; MIKOLAJCZAK et al., 1990). Óleos essenciais extraídos de folhas desta espécie apresentam atividades anti-inflamatória e anticancerígena (FORMAGIO et al., 2013).

Frutos de *A. sylvatica* apresentam compostos fenólicos, antioxidantes, carotenóides e vitamina C (PEREIRA et al., 2013). Em extratos de frutos secos foi encontrada Sylvaticin, uma acetogenina que apresenta propriedade citotóxica e inseticida (MIKOLAJCZAK et al., 1990).

2.2 Metabolismo vegetal

O metabolismo vegetal é dividido em primário e especializado. O metabolismo primário é responsável pela síntese de substâncias importantes para realização de funções vitais das plantas, como carboidratos, aminoácidos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (BUCHANAN et al., 2000).

Os metabólitos especializados são produzidos por vias derivadas do metabolismo primário; são substâncias formadas a partir de produtos da fotossíntese com funções relacionadas à ecologia e defesa das plantas. Diferentemente dos metabólitos primários, os metabólitos especializados não estão relacionados diretamente com processos de crescimento e desenvolvimento vegetal, mas desempenham papel importante na interação da planta com o ambiente, como na defesa das plantas contra predadores, patógenos e na interação das plantas com outros organismos, como polinizadores (SEIGLER, 1998; OKSMAN-CALDENTY et al, 2004; IRITI et al, 2009; BASSOLÉ et al., 2012; REZENDE et a., 2016).

Os metabólitos especializados podem ser divididos em três grupos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (TAIZ; ZEIGER, 2009). Os terpenos representam o maior grupo dos metabólitos especializados, formados pela junção de unidades de isopreno (5C), como monoterpenos (10C), sesquiterpenos (15C), diterpenos (20C), sesterterpenos (25C), triterpenos (30C) e tetraterpenos (40C) (KANDI et al, 2015). Tais metabólitos desempenham papel de defesa contra estresses bióticos e abióticos, estando relacionados também com atração de insetos polinizadores. No setor industrial podem ser utilizados em fragrâncias, especiarias, perfumaria e

cosméticos; apresentam atividades farmacológicas e biológicas de interesse para medicina e biotecnologia (SINGH et al, 2015).

Os compostos fenólicos são constituídos por um grupo fenol, um grupo hidroxila funcional e um anel aromático (TAIZ; ZEIGER, 2009). Os principais grupos de compostos fenólicos são fenóis simples, cumarinas, ligninas, lignanas, taninos, ácidos fenólicos e flavonóides. Tais compostos são sintetizados em resposta a pressões ecológicas e fisiológicas, como patógenos, parasitas, predadores, radiação ultravioleta, além de contribuir para as cores das plantas (DAI et al., 2010; KHODDAMI et al., 2013). Compostos fenólicos apresentam propriedades antioxidantes e efeito na prevenção de várias doenças associadas ao estresse oxidativo, como o câncer (DAI et al., 2010).

Os compostos nitrogenados, como os alcaloides, contém nitrogênio em sua estrutura e estão relacionados à defesa das plantas contra herbivoria, por exemplo. Apresentam também propriedades medicinais, como antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antitumoral, dentre outras (TAIZ; ZEIGER, 2009; EGYDIO-BRANDÃO et al., 2017; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ et al., 2017).

2.2.1 Metabolismo primário

O metabolismo primário é responsável pela síntese de substâncias que serão utilizadas pelo metabolismo especializado (OKSMAN-CALDENTEY et al, 2004). O nitrogênio é um nutriente que participa da síntese de aminoácidos, proteínas e outros metabólitos que serão utilizados para formação de metabólitos especializados encontrados na família Annonaceae (MARSCHNER, 2012; NUNES-NESI et al., 2010; ATTIQ et al, 2017).

Metabolismo do nitrogênio

O nitrogênio é um macronutriente que participa ativamente da síntese de compostos orgânicos, como aminoácidos, que são elementos essenciais para formação de proteínas, nucleotídeos, clorofilas e outros metabólitos e componentes celulares (MARSCHNER, 2012; NUNES-NESI et al., 2010).

Para ser utilizado pela planta o nitrogênio (N) deve estar disponível na forma de nitrato ou amônio (MUR et al., 2016). O nitrato (NO_3^-) absorvido pelas raízes é reduzido a nitrito (NO_2^-)

pela enzima nitrato redutase e por meio da nitrito redutase, este é reduzido a amônio (NH_4^+), para ser assimilado em um esqueleto carbônico pela planta. O NH_4^+ , não necessita de agentes redutores para redução, porém demanda esqueletos carbônicos para sua incorporação e por ele ser um íon oxidado sua disponibilização deve ser controlada (MUR et al., 2016; BRITTO et al., 2002). A assimilação de NO_3^- , que pode ocorrer nas raízes ou na parte aérea, é um processo que demanda mais energia do que a assimilação do NH_4^+ , uma vez que o NO_3^- passa por processos de redução (MUR et al., 2016).

A redução de NO_3^- a NO_2^- ocorre no citosol através da nitrato redutase, uma enzima composta por duas subunidades idênticas com três grupos prostéticos: flavina adenina dinucleotídeo (FAD), grupo heme (citocromo 557) e um cofator molibdênio-pterina (MoCo), que catalisam a transferência de dois elétrons de NAD(P)H para um íon NO_3^- (MILLER et al, 2004).

O NO_2^- originado pela redução do NO_3^- é transportado do citosol para os cloroplastos nas folhas, e para os plastídeos nas raízes. Em tais organelas o NO_2^- será reduzido a NH_4^+ pela nitrito redutase, uma enzima que possui dois centros *redox*, um siroheme e um centro ferro-enxofre, que catalisam a transferência de 6 elétrons da ferredoxina reduzida ou de um portador de elétrons do tipo ferredoxina para o NO_2^- , formando NH_4^+ (MILLER et al, 2004).

Altos níveis de NH_4^+ são tóxicos para as plantas. As células evitam essa toxicidade através da rápida conversão do NH_4^+ em aminoácido pela ação de diversas enzimas. A enzima glutamina sintase (GS) incorpora glutamato ao NH_4^+ , sintetizando glutamina. Níveis elevados de glutamina estimulam atividade da glutamato sintase (GOGAT - glutamina: 2-oxoglutarato aminotransferase) que transfere o grupo amina da glutamina para o 2-oxoglutarato, formando duas moléculas de glutamato. Uma vez assimilado em glutamina e glutamato, o N poderá ser incorporado em aminoácidos (TAIZ; ZEIGER, 2009; FOYER et al., 2011; BETTI et al, 2012) e posteriormente utilizado na síntese de alcaloides (FACCHINI, 2001) (Figura 1).

Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a

O metabolismo do carbono (C) e do nitrogênio (N) estão interligados, sendo o crescimento e desenvolvimento vegetal dependentes desta relação (FRITZ et al., 2006; NUNES-NESI et al., 2010). Grande quantidade de N é investida no aparato fotossintético (HIKOSAKA,

2004), como em enzimas do ciclo de Calvin, RuBPCase, transportadores de elétrons, ATP sintase, PEP carboxilase e clorofilas, portanto a assimilação de CO₂ através da fotossíntese e consequente produção de biomassa necessitam de um adequado suprimento de N. Por outro lado, esqueletos carbônicos são necessários para assimilação de N e síntese de metabólitos nitrogenados, como aminoácidos e nucleotídeos (HIKOSAKA, 2004; FRITZ et al., 2006; NUNES-NESI et al., 2010; KAUR et al., 2016; BASSI et al., 2018).

A deficiência de N pode causar alterações na alocação de C, afetando a fase bioquímica da fotossíntese, alterando a disponibilidade de esqueletos carbônicos utilizados na síntese de carboidratos e aminoácidos. Altos níveis de N, particularmente NO₃⁻, requerem agentes redutores para sua assimilação, competindo assim com a assimilação de CO₂ (CAMPOS et al., 2019).

A medição simultânea das trocas gasosas foliares e da fluorescência da clorofila *a* fornece um meio para determinar uma ampla gama de limitações bioquímicas e biofísicas da fotossíntese (LONG et al., 2003). A fluorescência da clorofila *a* também está associada à fotossíntese, uma vez que após a desexcitação de uma molécula de clorofila, a energia que não é destinada à fotoquímica ou à dissipação de calor é dissipada em forma de fluorescência (DEELL et al., 2003; FRACHEBOUD, 2004).

Em estudo realizado com *Catharanthus roseus*, plantas cultivadas com relação de NO₃⁻:NH₄⁺ = 1:3 apresentaram os menores níveis de taxa fotossintética, condutância estomática e taxa de transpiração quando comparados aos tratamentos com NO₃⁻: NH₄⁺ = 1:0 e NO₃⁻: NH₄⁺ = 1:1, sugerindo um efeito deletério pelo excesso de NH₄⁺ (GUO et al, 2012).

Plantas de pepino (*Cucumis sativus*) e arroz (*Oryza sativa*) foram cultivadas com dois tratamentos, um fornecendo NO₃⁻ e outro NH₄⁺. Plantas de pepino apresentaram menores valores na assimilação de CO₂ (A_{net}), condutância estomática (g_s), concentração interna de CO₂ (C_i) e taxa de transpiração (E) para o tratamento com NH₄⁺ em comparação ao tratamento com NO₃⁻ (ZHOU et al, 2011). Apresentaram também menores valores de Fv/Fm (eficiência fotoquímica máxima de FSII), Fv'/Fm', qP e ΦFSII para o tratamento com NH₄⁺ em comparação ao tratamento com NO₃⁻, sugerindo uma fotoinibição em plantas cultivadas com NH₄⁺ (ZHOU et al, 2011). Plantas de arroz não apresentaram diferenças significativas entre as fontes de N para análise das trocas gasosas e para os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (Fv/Fm, Fv'/Fm', qP e ΦFSII) (ZHOU et al., 2011).

Em estudo realizado com *Annona emarginata* cultivada com 1,87; 3,75; 5,62 e 7,5 mM N fornecido na forma de NO_3^- , plantas submetidas aos níveis intermediários de N (3,75 e 5,62 mM) apresentaram maiores taxa de assimilação de CO_2 (A_{net}), condutância estomática (g_s), taxa de transpiração (E) e eficiência de carboxilação (A_{net}/C_i) (CAMPOS et al, 2019).

2.2.1 Metabolismo especializado

Alcaloides benzilisoquinolínicos

Alcaloides são moléculas alcalinas produzidas pelo metabolismo especializado, com baixo peso molecular e se caracterizam pela presença de nitrogênio em sua estrutura. São derivados de produtos do metabolismo primário, como os aminoácidos fenilalanina, triptofano, ornitina, lisina e tirosina (EVANS et al, 2009; FACCHINI, 2001).

Um dos metabólitos especializados mais encontrados na família Annonaceae, são os alcaloides, em especial os benzilisoquinolínicos (ABI's). Os ABI's representam um grupo grande e diversificado de alcaloides que incluem alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos, como a lisicamina, aterospermidine e liriodenina (PHILLIPSON et al., 1985; GONZÁLEZ-ESQUINCA et al., 2014; OROZCO-CASTILLO et al, 2016).

Liriodenina é um alcaloide oxoaporfínico encontrado em 240 espécies de Annonaceae, podendo ser considerado um marcador quimiotaxonômico desta família (GONZÁLEZ-ESQUINCA et al., 2014; PINHEIRO et al., 2009). Foi isolada pela primeira vez em *Liriodendron tulipifera* L., e apresenta propriedades antimicrobiana, antitumoral, antiarritmia, antiplaquetária dentre outras (WARTHEN et al., 1969; CHEN et al, 2013). Em *A. diversifolia*, liriodenina apresentou atividade antifúngica, inibindo o crescimento de dois fungos fitopatogênicos, *Aspergillus glaucus* e *Rhizopus stolonifer* (DE LA CRUZ, 2011). Em *A. mucosa* foi observado atividade antileishmania do alcaloide liriodenina (DE LIMA et al., 2012). Em estudo realizado com *A. salzmannii*, liriodenina apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Candida dubliniensis* (COSTA et al., 2013). Liriodenina extraída de raízes de *A. reticulata* apresentou propriedade citotóxica contra células cancerígenas (SURESH et al., 2012).

Os ABI's derivam de duas moléculas de tirosina (BEAUDOIN et al, 2014). A biossíntese do aminoácido tirosina ocorre através da via do ácido chiquímico, a partir da conversão de fosfoenol piruvato (PEP) e 4-eritrose fosfato (E4P) em corismato. Em seguida, corismato é convertido em prefenato através da enzima corismato mutase (CM) e prefenato à arogenato pela enzima prefanato aminotransferase (PPA-AT), que tem função de incorporar o nitrogênio proveniente do glutamato para biossintetizar arogenato. O arogenato é reduzido através da enzima arogenato desidrogenase (ADH), formando tirosina (TZIN et al, 2012; TOHGE et al, 2013) (Figura 1).

A partir de duas moléculas de tirosina, através de diversas reações, são originados dopamina e 4-hidroxifenilacetaldeído (4-HPPA). A conversão de tirosina em dopamina ocorre pelas enzimas tirosina/dopamina descarboxilase (TYDC) e tirosina/tiramina 3-hidroxilase (3OHase) e a formação de 4-HPPA a partir da tirosina acontece através das enzimas tirosina aminotransferase (TyrAT) e 4-hidroxifenil piruvato descarboxilase (4HPPDC) (BEAUDOIN et al, 2014).

A condensação de dopamina e 4-HPPA dá origem a (S)-norcoclaurina através da enzima norcoclaurina sintase (NCS) (RAMAKRISHNA et al, 2018; BEAUDOIN et al, 2014). Em seguida, norcoclaurina é convertida em (S)-coclaurina pela enzima norcoclaurina-6-O-metiltransferase (6OMT). (S)-coclaurina é transformada em (S)-N-metilcoclaurina que será convertida em (S)-3'-hidroxi-N-metilcoclaurina e finalmente em reticulina através das enzimas coclaurina N-metiltransferase (CNMT), N-metilcoclaurina 3'-hidroxilase NMCH e 3'-hidroxil-N-metilcoclaurina 4'-O-metiltransferase (4'OMT), respectivamente (BEAUDOIN et al, 2014). O alcaloide reticulina é a base para diversificação estrutural dos ABI's. (HAGEL et al, 2013).

Em estudo realizado com *Catharanthus roseus* cultivadas com NO_3^- , NH_4^+ e $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ a diferentes concentrações de N (2,75; 5,5; 11; 22 and 32 mM N), a maior concentração de alcaloides totais e dos alcaloides vincristina e vimbastina foi observada em plantas tratadas com $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ a 11 mM N. Níveis mais baixos (2,75 e 5,5 mM N) e mais altos (32 mM N) apresentaram menor acúmulo de alcaloides, sugerindo que os níveis de N apresentam maior efeito na concentração de alcaloides do que as fontes de N (ABDOLZADEH et al, 2006).

Em *Atropa belladonna* foram testados três níveis de NO_3^- (15,8; 39,5 e 98,75 mM) e três níveis de NH_4^+ (8,2; 20,5 e 51,25 mM) sendo fornecidos através de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$. A produção de

alcaloides totais obtida com 15,8 mM de NO_3^- e 20,5 mM de NH_4^+ foi 1,2 - 1,4 vezes maior do que a obtida com 39,5 mM de NO_3^- e 20,5 mM de NH_4^+ , ou seja, houve maior produção de alcaloides com níveis de NH_4^+ mais elevados que os níveis de NO_3^- . Também foi observado um aumento na concentração dos alcaloides escopolamina e hiosciamina com o aumento dos níveis de NH_4^+ (BENSADDEK et al., 2001).

Em mudas de *Annona diversifolia* submetidas a diferentes níveis de N (0, 30 e 60 mM de N) fornecidas por $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$, a maior concentração de alcaloides totais, liriodenina, lisicamina e atherospermidina foi observada em plantas cultivadas com 30 mM N e a menor com 60 mM N, sugerindo que um alto suprimento de N excede a capacidade da planta de assimilá-lo por não haver esqueletos carbônicos suficientes (OROZCO-CASTILLO et al, 2016).

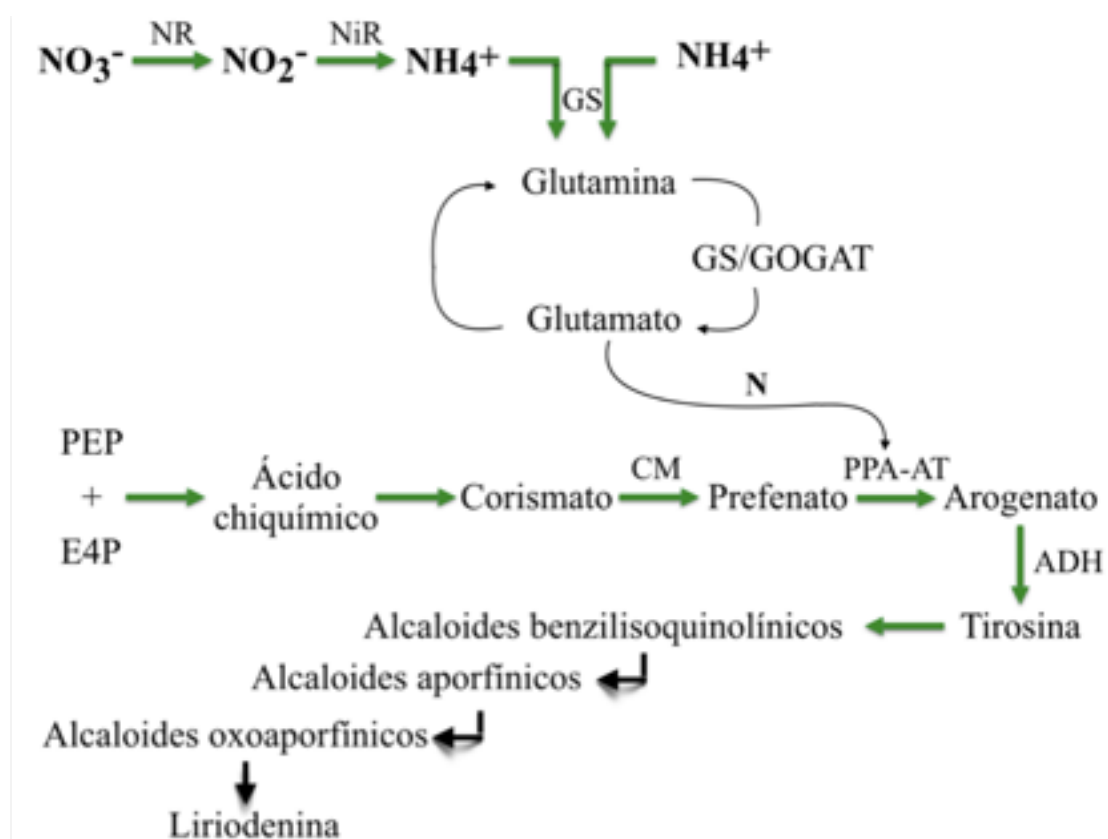


Figura 1: Incorporação de nitrogênio na biossíntese de tirosina, aminoácido precursor de alcaloides benzilisoquinolínicos, que originam alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos, como a liriodenina. Nitrato (NO_3^-), nitrato redutase (NR), nitrito (NO_2^-), nitrito redutase (NiR), amônio (NH_4^+), glutamina sintase (GS), glutamato sintase (GOGAT - glutamina: 2-oxoglutarato aminotransferase), fosfoenol piruvato (PEP), 4-eritrose fósforo (E4P), corismato mutase (CM), prefanato

aminotransferase (PPA-AT), arogenato desidrogenase (ADH) (TZIN et al, 2012; TOHGE et al, 2013; OROZCO-CASTILLO, 2016; PHILLIPSON et al., 1985).

Compostos voláteis foliares

Óleos essenciais são constituídos por compostos voláteis e aromáticos, produzidos pelo metabolismo especializado. São sintetizados por todos os órgãos da planta e armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (BAKKALI et al, 2008; BASSOLÉ et al., 2012). Em geral, os óleos essenciais são constituídos principalmente por monoterpenos (10C) e sesquiterpenos (15C), que são hidrocarbonetos formados pela junção de isoprenos (5C) (MOHAMED et al., 2010; KANDI et al, 2015). Compostos oxigenados derivados destes hidrocarbonetos incluem álcoois, aldeídos, ésteres, éteres, cetonas, fenóis e óxidos (MOHAMED et al., 2010).

Na natureza, os óleos essenciais são importantes na proteção das plantas contra bactérias, vírus, fungos, insetos e herbívoros. Podem atrair insetos para favorecer a dispersão de pólenes e sementes ou repelir outros insetos indesejáveis (BAKKALI et al, 2008). Os terpenos apresentam valor econômico, sendo utilizados em setores farmacêuticos, alimentícios, cosméticos, dentre outros (LIMA et al., 2016).

Óleos essenciais extraídos de folhas de *Annona Salzmanii* e *A. pickelii* apresentam atividade antioxidante, antimicrobiana, antitumoral e contra *Trypanosoma cruzi* (COSTA et al., 2011; COSTA et al., 2012). Em *A. foetida*, óleos essenciais apresentam atividades antimicrobiana e antileishmania (COSTA et al, 2009). Óleos extraídos de *A. vepretotum* apresentam propriedades antimicrobiana e contra *T. cruzi* (COSTA et al., 2012).

Em *Annona sylvatica* foram relatadas atividades anti-inflamatória e anticancerígenas dos seus óleos essenciais, que são compostos principalmente por sesquiterpenos como hinesol, Z-cariofileno, β -maalieno, γ -gurjuneno, silifiperfol-5-en-3-ol, ledol, cubecol-1-epi, *trans*-muurolo-3 e 5-dieno (FORMAGIO et al., 2013).

O nitrogênio (N) influencia na concentração de óleos essenciais, como observado em *Cymbopogon martinii* tratado com 0kg, 40kg e 80kg/ha de N, onde houve um aumento no rendimento dos óleos essenciais em 60,3% para o tratamento de 80kg/ha de N em comparação com

o 0kg de N (RAO, 2001). Em estudo feito com *Salvia sclarea*, foram utilizados os níveis 0g, 1,5g, 3g, 4,5g e 6g N/planta, onde o tratamento com 3g N/planta apresentou maior concentração de óleos essenciais (SHARMA et al., 2012). Em folhas de *A. emarginata* cultivadas em diferentes concentrações de NO_3^- (1,87 mM N, 3,75mM N, 5,62mM N e 7,5 mM N), foram identificadas 48 substâncias voláteis, sendo os índices mais elevados verificados nos tratamentos com baixo teor de nitrogênio (1,87 mM N e 3,75 mM N) (CAMPOS et al., 2019).

3. CAPÍTULO II: Influência de NO_3^- e NH_4^+ na fotossíntese, produção de alcaloides e voláteis foliares em *Annona sylvatica* A. St.-Hil.

3.1 RESUMO: O nitrogênio (N) é um macronutriente que atua no metabolismo primário e especializado das plantas, fazendo parte da síntese de moléculas como aminoácidos, proteínas, clorofilas e compostos nitrogenados. Existem estudos sobre a variação da concentração de N no metabolismo primário, nomeadamente nas trocas gasosas e no metabolismo especializado, como nos alcaloides e voláteis foliares em espécies do gênero *Annona*, porém não foram encontrados relatos sobre a variação das fontes de nitrogênio, NO_3^- e NH_4^+ em *Annona*. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi analisar como a variação das fontes de N influencia na fotossíntese, produção de alcaloides e compostos voláteis foliares em *Annona sylvatica*. As plantas foram submetidas a quatro tratamentos variando as fontes de N [NH_4^+ , NO_3^- , $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ e sem o fornecimento de N (S/N)]. Tal variação influenciou no metabolismo primário de *A. sylvatica*, onde após 90 dias do início dos tratamentos (DAT), o tratamento com NH_4^+ apresentou maior taxa de assimilação líquida de CO_2 (A_{net}) que os tratamentos com NO_3^- e S/N, maior eficiência de carboxilação da enzima rubisco (A_{net}/Ci) que os demais tratamentos, menor concentração interna de CO_2 na câmara subestomática (Ci) que os tratamentos com $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ e S/N e maior rendimento quântico efetivo do fotossistema II (ΦFSII) que o tratamento S/N. Há influência também no metabolismo especializado, pois aos 90 DAT plantas mantidas em tratamento com NH_4^+ apresentaram maiores concentrações de alcaloides totais e liriodenina que os demais tratamentos, sendo a liriodenina o alcaloide predominante no perfil de todos os tratamentos. Nos compostos voláteis foliares também foram identificadas influências da variação das fontes de N, onde o β -selineno apresentou maior porcentagem relativa e correlação positiva quando empregado o tratamento com NO_3^- comparado com NH_4^+ aos 30 DAT, e o (*E*)-cariofileno apresentou menor porcentagem relativa e correlação negativa com NO_3^- em comparação com o tratamento com NH_4^+ aos 30 DAT. Portanto, o fornecimento diferenciado de NO_3^- e NH_4^+ influencia na fotossíntese, produção de alcaloides e voláteis foliares em *A. sylvatica*.

Palavras-chave: Annonaceae; fontes de nitrogênio; metabolismo primário; metabolismo especializado.

3.2 ABSTRACT: Nitrogen (N) is a macronutrient present in the primary and secondary metabolism of plants, doing part of the synthesis of molecules such as amino acids, proteins,

chlorophylls and nitrogen compounds. For plants to be able to assimilate nitrogen it must be available in the form of NO_3^- or NH_4^+ , and NO_3^- requires more energy to assimilate than NH_4^+ , since NO_3^- needs reducing agents to be reduced to NO_2^- and subsequently NH_4^+ to finally be incorporated into a carbonic skeleton. NH_4^+ assimilation requires only carbonic skeletons for its incorporation, didn't requiring reducing agents. Nitrogen is associated with CO_2 assimilation through photosynthesis, consequently related to the synthesis of compounds consisting of carbon units, such as terpenes and present in the structure of nitrogen compounds, such as alkaloids. Exist studies about the variation of N concentration on primary metabolism, namely in gas exchange and secondary metabolism, such as alkaloids and leaf volatiles in *Annona* genus, but not exist reports about the variation of nitrogen sources, NO_3^- and NH_4^+ , in the metabolism of this genus. Thus, the objective of this work was to analyze how the variation of N sources influences gas exchange, production of alkaloid and leaf volatile compounds in *Annona sylvatica*. The plants were submitted to four treatments varying the sources of N (NO_3^- , NH_4^+ , $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ and S/N). Such variation influences the primary metabolism of *A. sylvatica*, where 90 days after the beginning of the treatments (DAT), the treatment with NH_4^+ presented higher rate of net CO_2 assimilation (A_{net}) than the treatments with NO_3^- and S / N, higher carboxylation efficiency of the rubisco enzyme (A_{net}/C_i) than the other treatments, lower internal CO_2 concentration in the substomatic chamber (C_i) than $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ + and S/N treatments and higher effective quantum yield of photosystem II (Φ_{FSII}) than the treatment S/N. The variation of the N sources also influence on secondary metabolism, since at 90 DAT the treatment with NH_4^+ presented higher concentration of total alkaloids and liriodenine than the other treatments, being liriodenine the predominant alkaloid in the profile of all treatments. In the leaf volatile compounds were also identified influences of the variation of N sources, where β -selinene presented higher relative percentage and positive correlation in treatment with NO_3^- compared with treatment with NH_4^+ at 30 DAT, and (E)-caryophyllene presented lower relative percentage and negative correlation in treatment with NO_3^- compared with treatment with NH_4^+ at 30 DAT. Therefore, the differentiated supply of NO_3^- and NH_4^+ influences gas exchange, alkaloid production and leaf volatiles in *A. sylvatica*.

Keywords: Annonaceae; nitrogen sources; primary metabolism; secondary metabolism.

3.3 INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) utilizado pelas plantas na síntese de produtos do metabolismo vegetal deve estar disponível na forma de nitrato (NO_3^-) ou amônio (NH_4^+) (MARSCHNER, 2012; MUR et al., 2016). Quando absorvido na forma de NO_3^- , tal íon necessita ser reduzido a nitrito (NO_2^-) e em seguida a NH_4^+ para ser assimilado. Se a absorção ocorre na forma de NH_4^+ , um íon já oxidado, não há necessidade de processos de redução, sendo o NH_4^+ absorvido e prontamente assimilado, demandando menos energia da planta do que a assimilação de NO_3^- (BRITTO et al., 2002; MUR et al., 2016).

Alguns estudos relatam o efeito da variação na concentração de N na produção de metabólitos especializados, como alcaloides, voláteis foliares e nas trocas gasosas em espécies do gênero *Annona* (CAMPOS et al, 2019; OROZCO-CASTILLO et al, 2016), porém pouco se sabe sobre o efeito das diferentes fontes de N, NO_3^- e NH_4^+ , em tais variáveis.

A espécie *Annona sylvatica* pertence a família Annonaceae que é produtora de metabólitos especializados como alcaloides e terpenos (LOPES et al., 2014; ATTIQ et al, 2017). Tais metabólitos atuam como mecanismos de defesa das plantas e apresentam propriedades medicinais (CHEN et al, 2013; DE LA CRUZ, 2011; FORMAGIO et al., 2013; FREEMAN et al, 2008).

Os alcaloides, em especial os benzilisoquinolínicos (ABI's), incluem alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos, como a liriodenina, considerado um marcador quimiotaxonômico da família Annonaceae (PHILLIPSON et al., 1985; GONZÁLEZ-ESQUINCA et al., 2014; PINHEIRO et al., 2009). Tal alcaloide apresenta atividades antitumoral, antifúngica, antileishmanial, antimicrobiana, dentre outras (SURESH et al., 2012; DE LA CRUZ, 2011; DE LIMA et al., 2012; COSTA et al., 2013),

Os terpenos constituem os óleos essenciais (compostos voláteis), sendo formados por unidades de isopreno (5C) (KANDI et al, 2015; ALCANTARA et al, 2017). Óleos essenciais extraídos de espécies de *Annona* apresentam atividades antitumoral, antioxidante, antimicrobiana, antileishmanial, anti-inflamatória, dentre outras (COSTA et al., 2011; COSTA et al., 2012; COSTA et al, 2009).

O N está presente na estrutura dos alcaloides e relacionado à síntese dos terpenos, uma vez que o metabolismo do N está associado ao do carbono (C) (FRITZ et al., 2006), pois a

assimilação de N requer esqueletos carbônicos e a assimilação de CO₂ através da fotossíntese necessita de um adequado o suprimento de N para formação do aparato fotossintético (FRITZ et al., 2006; NUNES-NESI et al., 2010).

Considerando a importância do N para a estrutura dos alcaloides, do C na síntese de terpenos e alcaloides, e da relação entre o metabolismo do N e do C, o presente trabalho tem como objetivo analisar como a variação das fontes de N influencia na fotossíntese, analisando as trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, produção de alcaloides e compostos voláteis foliares em *Annona sylvatica*.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Departamento de Botânica, do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu/SP, utilizando 180 mudas da espécie *Annona sylvatica* A.St.-Hil em cultivo hidropônico, fornecidas pelo Departamento de Ciência Florestal da Faculdade de Ciências Agrônomicas, UNESP, Campus de Botucatu/SP.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados em esquema fatorial 4x3, sendo quatro tratamentos variando as fontes de nitrogênio e três épocas de coleta (30, 60 e 90 dias após o início dos tratamentos), totalizando doze parcelas experimentais com cinco repetições de três plantas. As mudas, que anteriormente estavam sendo cultivadas em substrato, tiveram suas raízes lavadas em água corrente e foram transferidas para vasos de plástico com capacidade para seis litros de solução. Tais plantas foram inicialmente aclimatadas em solução nutritiva nº 2 de Hoagland e Arnon (1950) a 50% por 14 dias. Posteriormente, a solução nutritiva foi substituída por água deionizada, onde as plantas foram mantidas por 21 dias, de acordo com experimentos prévios (CAMPOS et al., 2019), para que todas estivessem nas mesmas condições nutricionais antes do início do experimento. Em seguida, as plantas foram colocadas em seus respectivos tratamentos, utilizando as soluções nutritivas nº 1 e nº 2 de Hoagland e Arnon com modificações, para fornecer apenas a fonte de nitrogênio desejada, sendo o primeiro tratamento com o fornecimento de NO₃⁻, o segundo com o fornecimento de NH₄⁺, o terceiro com o fornecimento de NO₃⁻:NH₄⁺ e o quarto sem o fornecimento de nenhuma fonte de N (S/N) (Tabela 1). As soluções foram constantemente oxigenadas e o volume completado com água deionizada para seis litros, sempre que necessário.

O pH e a condutividade elétrica das soluções foram monitorados durante o experimento. O pH foi mantido na faixa ideal para o desenvolvimento das plantas, entre 5,5 e 6,5 (NETO, 2015), sendo medido com pHmetro (pHep - HANNA). A condutividade elétrica foi mantida entre 1,5 - 2,5 mS cm⁻¹ (CARMELLO, 1992), medida através de um condutivímetro (PHTEK CD310).

Tratamentos	Sais	Solução estoque (g.L ⁻¹)	Solução nutritiva 50% (ml.L ⁻¹)
NO ₃ ⁻	Macronutrientes		
	(M) KH ₂ PO ₄	136,08	0,50
	(M) KNO ₃	101,10	2,50
	(M) Ca(NO ₃) ₂	236,16	2,50
	(M) Mg(SO ₄).7H ₂ O	246,50	1,00
	Micronutrientes (1)		
	H ₃ BO ₃	2,86	
	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22	0,50
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08	
	H ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0,02	
	Ferro (2)		
	EDTA Bissódico (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .2H ₂ O)	26,10	0,50
	FeSO ₄ .7H ₂ O	24,90	
	NH ₄ ⁺	Macronutrientes	
(0,5 M) K ₂ SO ₄		87,12	2,50
(M) MgSO ₄		120,36	1,00
(M) NH ₄ H ₂ PO ₄		115,03	0,50
(M) (NH ₄) ₂ SO ₄		132,14	3,50
(0,01 M) CaSO ₄		1,36	200,00
Micronutrientes			
			1
Ferro			
		2	

NO₃⁻:NH₄⁺	Macronutrientes		
	(M) NH ₄ H ₂ PO ₄	115,03	0,50
	(M) Ca(NO ₃) ₂	236,16	2,00
	(M) KNO ₃	101,10	3,00
	(M) Mg(SO ₄). 7H ₂ O	246,50	1,00
	Micronutrientes		1
	Ferro		2
S/N	Macronutrientes		
	(0,5 M) K ₂ SO ₄	87,12	2,50
	(M) Mg(SO ₄). 7H ₂ O	246,50	1,00
	(0,05 M) Ca(H ₂ PO ₄) ₂	234,05	5,00
	(0,01 M) CaSO ₄	1,36	100,00
	Micronutrientes		1
	Ferro		2

Tabela 1: Tratamentos com variação nas fontes de nitrogênio (nitrato (NO₃⁻), amônio (NH₄⁺), nitrato mais amônio (NO₃⁻:NH₄⁺) e sem nitrogênio (S/N)) onde as mudas de *Annona sylvatica* foram cultivadas.

Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a

Aos 30, 60 e 90 dias após o início dos tratamentos, as trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foram avaliadas simultaneamente, entre 09:00 e 11:00 horas da manhã, em folhas com o limbo totalmente expandido, utilizando equipamento de sistema aberto de fotossíntese com analisador de CO₂ e vapor d'água por radiação infravermelha (*Infra Red Gas Analyser* – IRGA, modelo GSF 3000 FL, Walz). Uma planta de cada repetição para cada tratamento foi avaliada, totalizando 60 plantas.

Para trocas gasosas foram avaliadas: taxa de assimilação líquida de CO₂ (A_{net} , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), taxa transpiratória (E , $\text{mmol vapor d'água m}^{-2}\text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e concentração interna de CO₂ na câmara subestomática (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$).

A eficiência do uso da água (EUA, $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$) foi calculada por meio da relação entre a taxa de assimilação líquida de CO₂ (A_{net} , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e a taxa transpiratória (E , $\text{mmol vapor d'água m}^{-2}\text{s}^{-1}$); a eficiência instantânea de carboxilação da enzima rubisco (A_{net}/C_i , $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{Pa}^{-1}$) foi calculada por meio da relação entre a taxa de assimilação líquida de CO₂ (A_{net} , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e a concentração de carbono interno na câmara sub-estomática (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$).

Para fluorescência da clorofila *a* foram avaliadas a fluorescência máxima (F_m'), rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v'/F_m'), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{FSII}), taxa de transporte de elétrons (ETR), dissipação fotoquímica (qP), fração de luz absorvida pela antena do fotossistema II que é dissipada como calor (D) e fração de energia de excitação não dissipada na antena que não pode ser utilizada na fotoquímica (Ex), calculadas de acordo com (DEMMIG-ADAMS et al., 1996).

Extração e Quantificação de alcaloides

Para obtenção do extrato de alcaloides foram utilizadas 5 repetições de 3 plantas para cada um dos 4 tratamentos (NO₃⁻, NH₄⁺, NO₃⁻:NH₄⁺ e S/N), totalizando 180 plantas. Os alcaloides foram extraídos das raízes das plantas pelo método ácido-base, utilizando clorofórmio (CHCl₃), ácido clorídrico (HCl) e carbonato de sódio (Na₂CO₃). A quantificação dos alcaloide totais foi realizada por espectrofotometria. O perfil de alcaloides e quantificação de liriodenina, considerado um marcador quimiotaxonômico da família Annonaceae (PINHEIRO et al., 2009), foi realizada por cromatografia líquida de alta performance (CLAE) (DE LA CRUZ; GONZÁLEZ, 2012).

As raízes foram secas à temperatura ambiente, maceradas em moinho de faca, pesadas em balança analítica e embebidas em solução saturada de Na₂CO₃ por 48 horas para iniciar a extração dos alcaloides do material vegetal, até cristalização.

Posteriormente, as amostras foram colocadas em CHCl₃ e submetidas à agitação por 2 horas. Em seguida, foram filtradas para obtenção da fase clorofórmica. Os alcaloides presentes nesta fase foram extraídos com HCl. Tal solução foi posteriormente baseificada até pH 9,5 com

Na_2CO_3 e submetida a nova extração com CHCl_3 , resultando no extrato final, contendo os alcaloides totais (Figura 2A). Após evaporação do solvente foi obtido o extrato de alcaloides totais cristalizado (Figura 2B).



A



B

Figura 2: Extratos de alcaloides totais em clorofórmio (A); Extrato de alcaloides totais cristalizados (B).

Taxa de mortalidade

Foi determinada a taxa de mortalidade de plantas, computando quantas plantas morreram em cada coleta para cada tratamento.

O experimento teve início com 180 plantas, sendo 5 repetições de 3 plantas para cada um dos 4 tratamentos e 3 épocas de coleta.

Em cada coleta foram registradas as plantas que haviam morrido e retiradas do experimento, não sendo utilizadas nas análises de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, quantificação de alcaloide e composição dos voláteis foliares.

Compostos voláteis foliares

Os compostos voláteis foliares foram extraídos de folhas secas submetidas aos tratamentos com nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+), nitrato mais amônio ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$) e sem nitrogênio (S/N), para determinação de seu perfil químico, no Laboratório de Fitoquímica do Instituto Agronômico de Campinas, em Campinas/SP. Foram utilizadas 3 repetições de 3 plantas para cada tratamento, totalizando 108 plantas.

Para cada amostra foi utilizado 0,05g de massa seca de folha colocada em frasco de vidro e adicionados 10 ml de água destilada. Tal frasco foi colocado em banho-maria durante 1 hora à temperatura de 90°C. Após esse período, o frasco foi retirado do banho-maria e a captura dos voláteis foi realizada por microextração em fase sólida em modo *headspace* (HS-SPME) com *SPME Fiber Assembly 75 um CarboxenTM – PDMS for Manual Holder-SUPELCO*, durante 30 minutos (Figura 3). Em seguida, a composição química dos voláteis foi determinada por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), em equipamento Shimadzu modelo QP-5000 dotado de coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) e gás de arraste Hélio (fluxo 1,0 mL min^{-1}).

Para a identificação das substâncias presentes nos voláteis foliares, os cromatogramas foram comparados ao banco de dados do sistema CG-EM (Nist. 62 Libr.), determinando o índice de retenção calculado (IRC), comparando os mesmos com a literatura (ADAMS, 2017).



Figura 3: Captura dos compostos voláteis foliares de *Annona sylvatica* por microextração em fase sólida em modo *headspace* (HS-SPME) com *SPME Fiber Assembly 75 um CarboxenTM – PDMS for Manual Holder-SUPELCO*.

Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) *Two way* e suas médias comparadas pelo teste Tukey em nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.5 RESULTADOS

Trocas gasosas

Plantas cultivadas sem nitrogênio (S/N) não apresentaram variação na taxa de assimilação líquida de CO₂ (A_{net}) ao longo do tempo, com as menores taxas em comparação aos demais tratamentos, principalmente aos 30 dias após o início dos tratamentos (DAT). Plantas cultivadas com NO₃⁻ apresentaram diminuição na A_{net} aos 90 DAT e plantas cultivadas com NH₄⁺ apresentaram aumento na A_{net} aos 90 DAT (Figura 4A).

Em relação à concentração interna de CO₂ na câmara subestomática (C_i), plantas submetidas aos tratamentos NO₃⁻, NO₃⁻:NH₄⁺ e S/N não apresentaram variação na C_i ao longo do tempo. Plantas tratadas com NH₄⁺ apresentaram declínio na C_i aos 90 DAT e plantas cultivadas S/N apresentaram elevada C_i (Figura 4B).

A eficiência do uso da água (EUA) não apresentou variação ao longo do tempo para as plantas mantidas nos tratamentos com NH₄⁺ e S/N. Aos 30 e 90 DAT os tratamentos não diferiram entre si. Nos 60 DAT, o tratamento com NO₃⁻ não foi diferente do tratamento com NO₃⁻: NH₄⁺ e as plantas apresentaram maior EUA que os tratamentos com NH₄⁺ e S/N (Figura 4C).

A eficiência instantânea de carboxilação da enzima rubisco (A_{net}/C_i) não apresentou variação nas plantas mantidas nos tratamentos com NO₃⁻:NH₄⁺ e S/N ao longo do tempo; a maior A_{net}/C_i foi observada quando empregado o tratamento com NH₄⁺ aos 90 DAT, correspondendo à alta A_{net} em plantas cultivadas com NH₄⁺ aos 90 DAT (Figura 4D).

A condutância estomática (g_s) e a taxa transpiratória (E) não apresentaram variação entre os tratamentos nem entre épocas de coleta (Figura 4E e 4F).

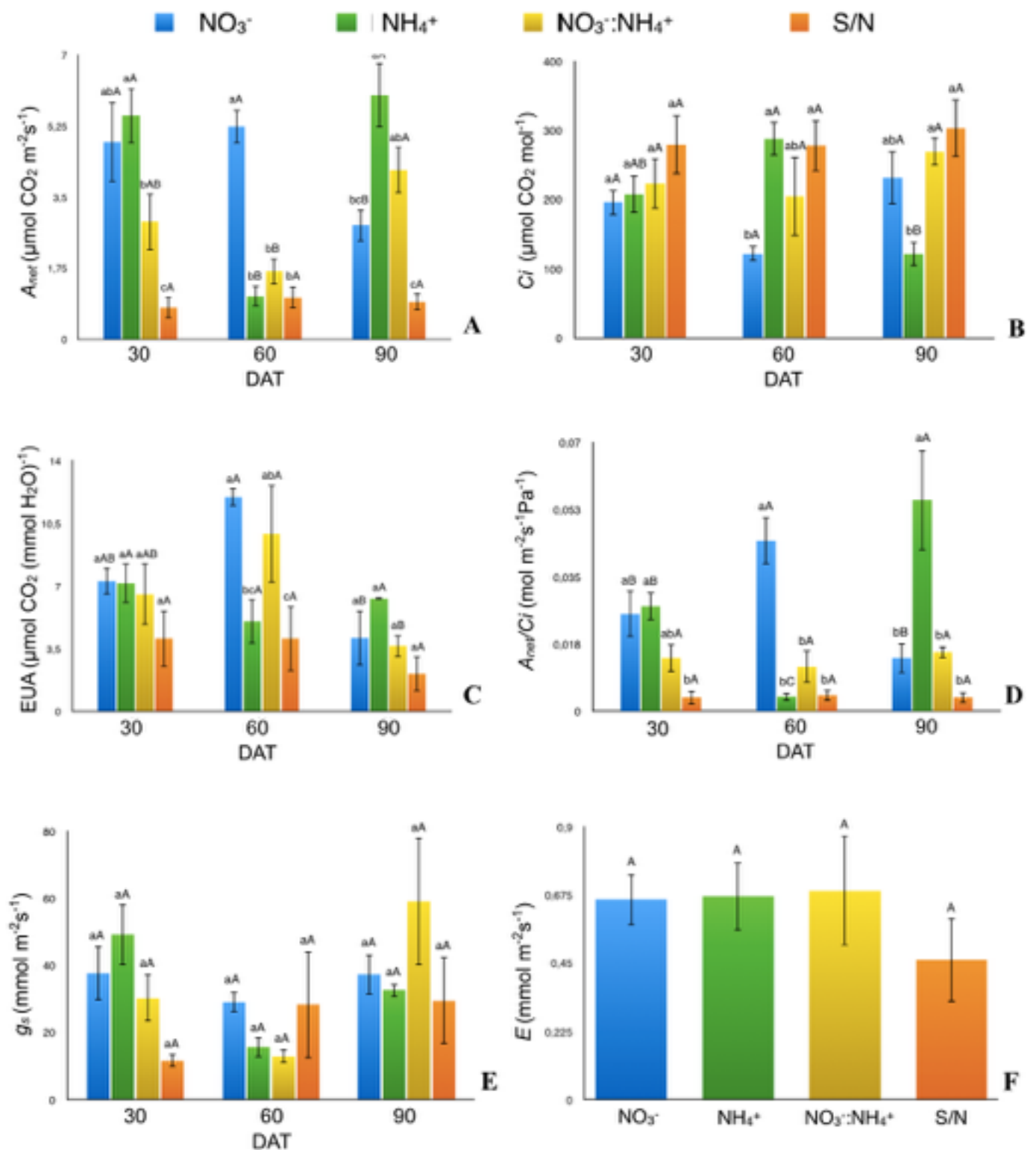
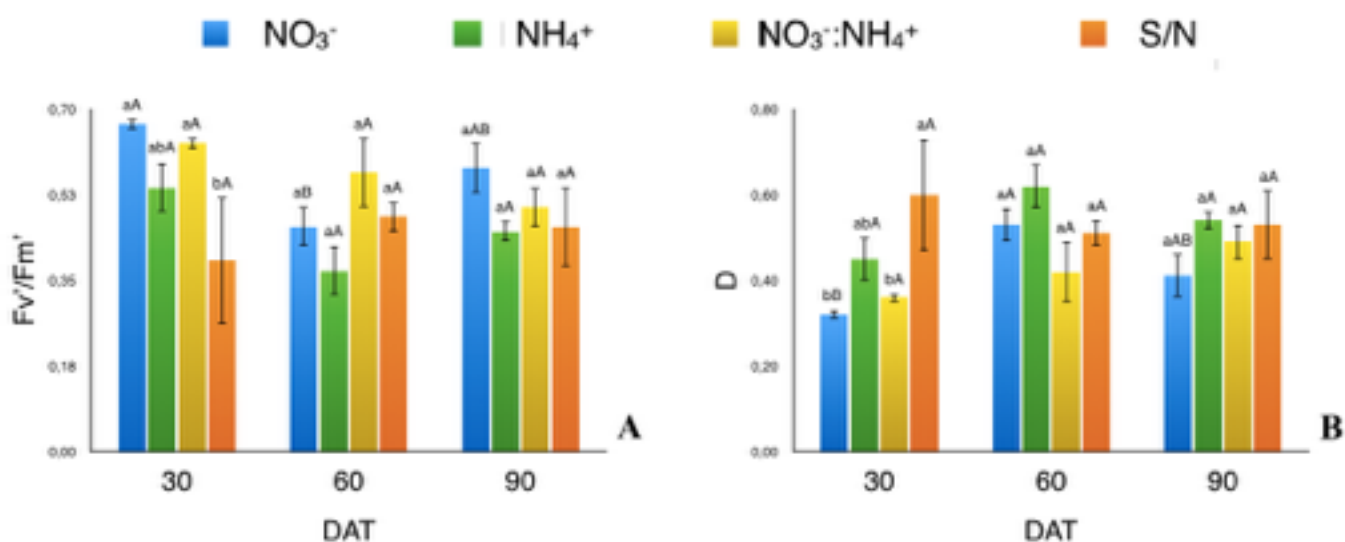


Figura 4: Trocas gasosas - Taxa de assimilação líquida de CO₂ (A_{net} , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (A); concentração interna de CO₂ na câmara subestomática (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ar) (B); eficiência do uso da água (EUA, $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$) (C); eficiência instantânea de carboxilação da enzima rubisco (A_{net}/C_i) (D); condutância estomática (g_s , $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (E); taxa transpiratória (E , mmol

$m^{-2}s^{-1}$) (**F**), determinadas aos 30, 60 e 90 dias após o início dos tratamentos (DAT) em plantas de *Annona sylvatica* cultivadas com o fornecimento de nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+), nitrato mais amônio ($NO_3^-:NH_4^+$) e sem fornecimento de nitrogênio (S/N). As letras minúsculas comparam os 4 tratamentos em uma mesma época de coleta; as letras maiúsculas comparam as épocas de coleta em cada tratamento.

Fluorescência da clorofila a

Plantas cultivadas sem fornecimento de nitrogênio (S/N) aos 30 DAT apresentaram baixo rendimento quântico potencial do fotossistema II (Fv'/Fm'), baixa taxa de transporte de elétrons (ETR), baixo rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Phi FSII$) e elevada dissipação de energia em forma de calor (D). Plantas cultivadas com NO_3^- aos 30 DAT apresentaram elevado Fv'/Fm' , elevado $\Phi FSII$ e baixa D . Plantas cultivadas com NH_4^+ apresentaram baixa fração de energia de excitação não dissipada na antena que não pode ser utilizada na fotoquímica (Ex) e elevada dissipação fotoquímica (qP), ETR e $\Phi FSII$ aos 90 DAT. Plantas cultivadas com $NO_3^-:NH_4^+$ aos 30 DAT apresentaram elevado Fv'/Fm' , baixa D e elevada Ex . O $\Phi FSII$ aos 90 DAT foi maior em plantas cultivadas com NH_4^+ e menor em plantas cultivadas S/N (Figura 5).



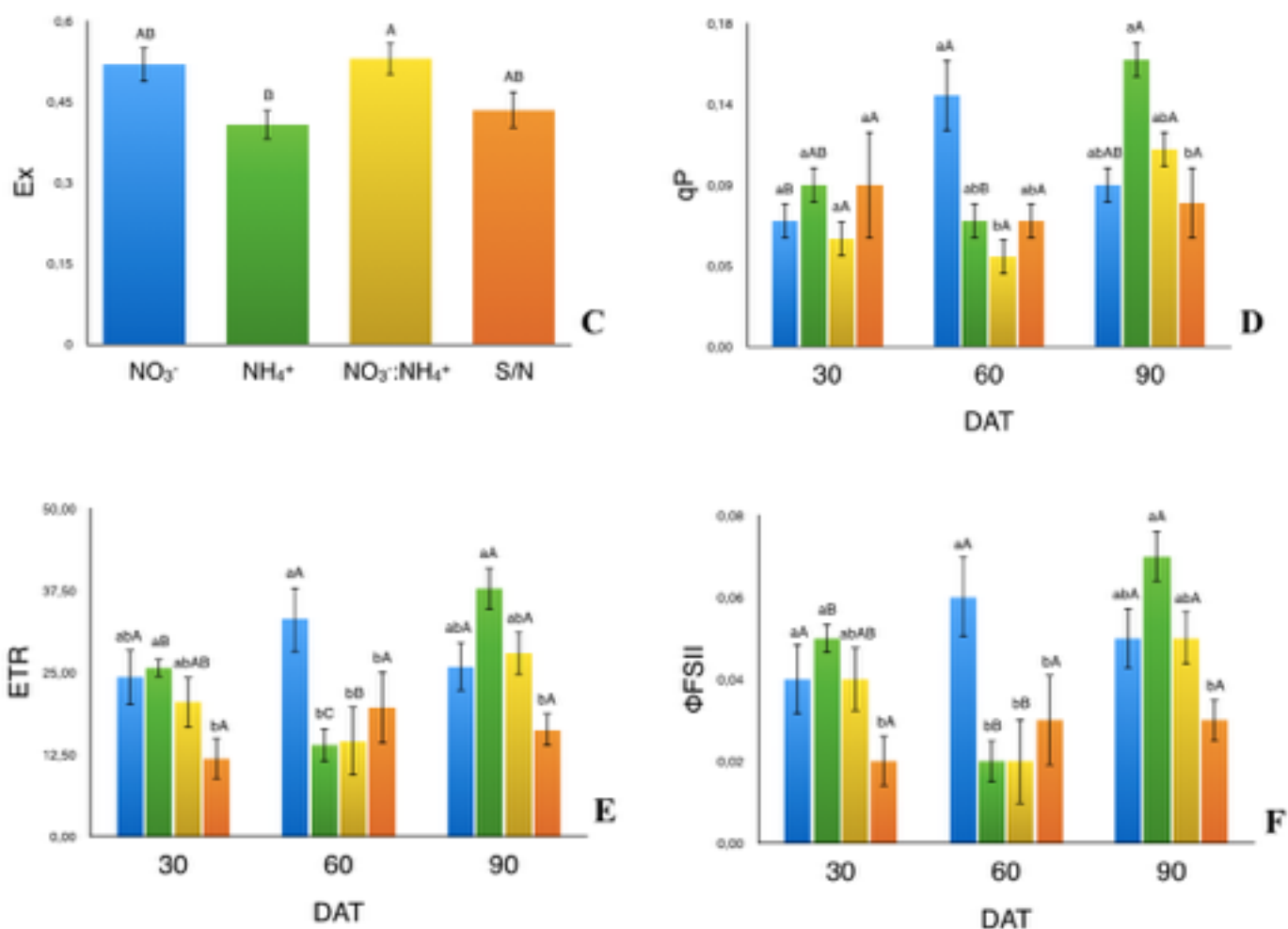
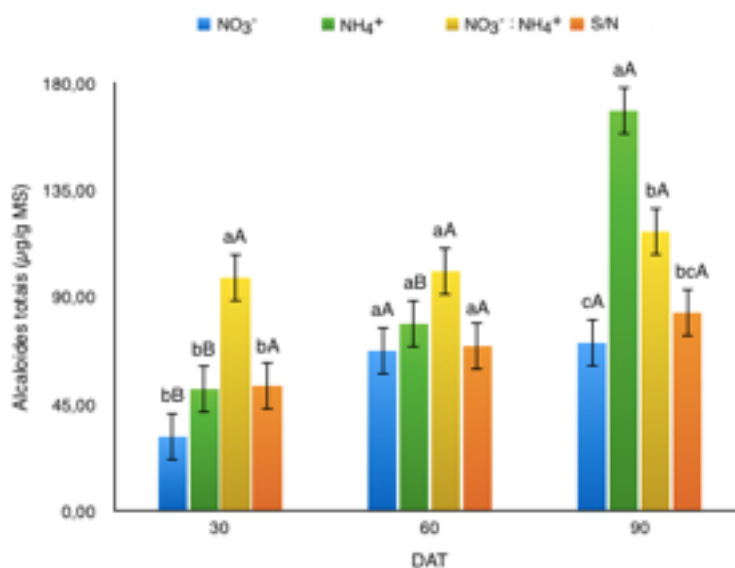


Figura 5: Fluorescência da clorofila *a* - Rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v'/F_m') (A), fração de luz absorvida pela antena do fotossistema II que é dissipada como calor (D) (B), fração de energia de excitação não dissipada na antena que não pode ser utilizada na fotoquímica (Ex) (C), dissipação fotoquímica (q_p) (D), taxa de transporte de elétrons (ETR) (E) e rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{FSII}) (F), determinadas aos 30, 60 e 90 dias após o início dos tratamentos (DAT) em plantas de *Annona sylvatica* cultivadas com o fornecimento de nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+), nitrato mais amônio ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$) e sem fornecimento de nitrogênio (S/N). As letras minúsculas comparam os 4 tratamentos em uma mesma época de coleta; as letras maiúsculas comparam as épocas de coleta em cada tratamento.

Produção de alcaloides totais

Plantas cultivadas com NH_4^+ apresentaram aumento na concentração de alcaloides, sendo o tratamento com maior concentração aos 90 DAT. A concentração de alcaloides totais em plantas cultivadas com $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ e S/N não apresentou variação ao longo do tempo; plantas cultivadas com NO_3^- mantiveram a concentração de alcaloides aos 60 e 90 dias após o início dos



tratamentos (DAT) (Figura 6).

Figura 6: Concentração de alcaloides totais ($\mu\text{g/g MS}$) determinada aos 30, 60 e 90 dias após o início dos tratamentos (DAT) em raízes de *Annona sylvatica* cultivadas com o fornecimento de nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+), nitrato mais amônio ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$) e sem fornecimento de nitrogênio (S/N). As letras minúsculas comparam os 4 tratamentos em uma mesma época de coleta; as letras maiúsculas comparam as épocas de coleta em cada tratamento.

Perfil de alcaloides

O perfil de alcaloides, analisado por Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAE) apresentou predomínio do alcaloide liriodenina (picos destacados em figura 7), sendo o alcaloide com maior concentração em todas as fontes de nitrogênio e também na ausência de nitrogênio. Observa-se que nos tratamentos contendo NH_4^+ houve aumento no número de alcaloides

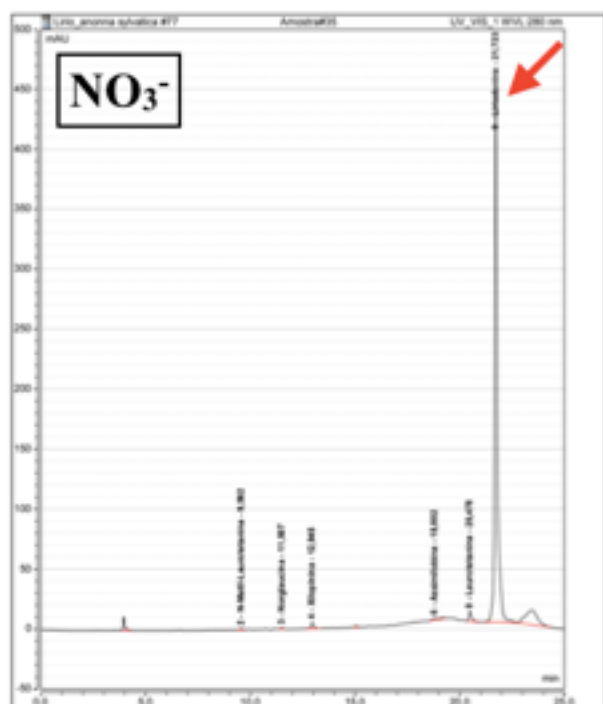
detectados. Os alcaloides xylopinina, assimilobina, laurotetaina, lanulinosina, norglaucina, N-Metil-laurotetaina e discretina também foram identificados, porém em concentrações inferiores a lirioidenina.

Em plantas cultivadas com o fornecimento de NO_3^- , o perfil de alcaloides mais frequente apresentou os alcaloides lirioidenina, assimilobina e laurotetaina (Figura 7A). Em plantas cultivadas com o fornecimento de NH_4^+ , o perfil de alcaloides mais frequente apresentou lirioidenina, xylopinina, assimilobina e laurotetaina (Figura 7B). Em plantas cultivadas com $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$, o perfil mais frequente apresentou lirioidenina, xylopinina, assimilobina, laurotetaina, lanulinosina, norglaucina e discretina (Figura 7C). Em plantas cultivadas S/N, o perfil mais frequente apresentou lirioidenina, xylopinina, assimilobina, laurotetaina e lanulinosina (Figura 7D).

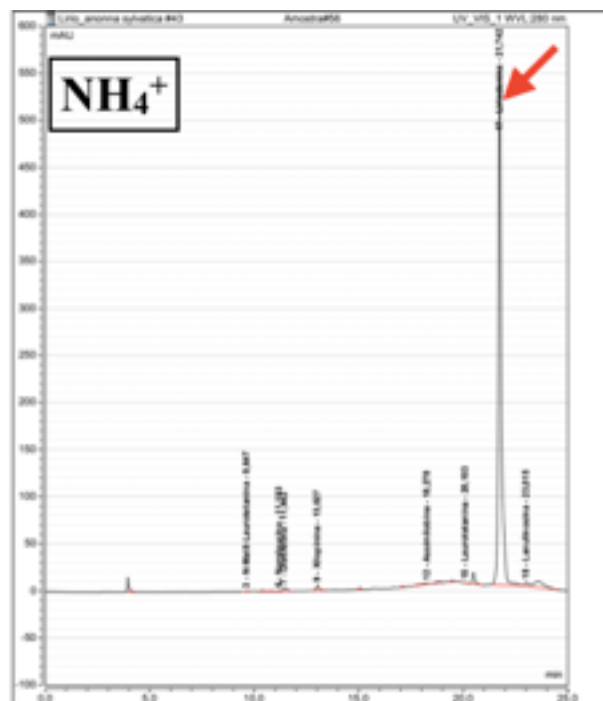
O alcaloide discretina foi identificado apenas em plantas cultivadas com a presença de NH_4^+ . O alcaloide N-Metil-laurotetaina e discretina não foram identificados em plantas cultivadas S/N (Tabela 2).

Fontes de N	Lirioidenina	Xylopinina	Assimilobina	Laurotetaina	Lanulinosina	Norglaucina	N-Metil-laurotetaina	Discretina
NO_3^-	X	X	X	X	X	X	X	
NH_4^+	X	X	X	X	X	X	X	X
$\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$	X	X	X	X	X	X	X	X
S/N	X	X	X	X	X	X		

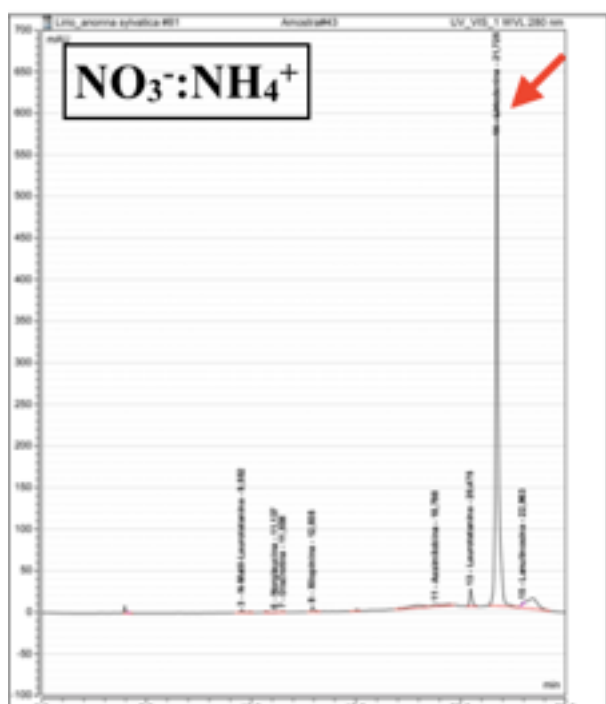
Tabela 2: Alcaloides identificados em raízes de *Annona sylvatica* cultivadas com o fornecimento de nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+), nitrato mais amônio ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$) e sem fornecimento de nitrogênio (S/N).



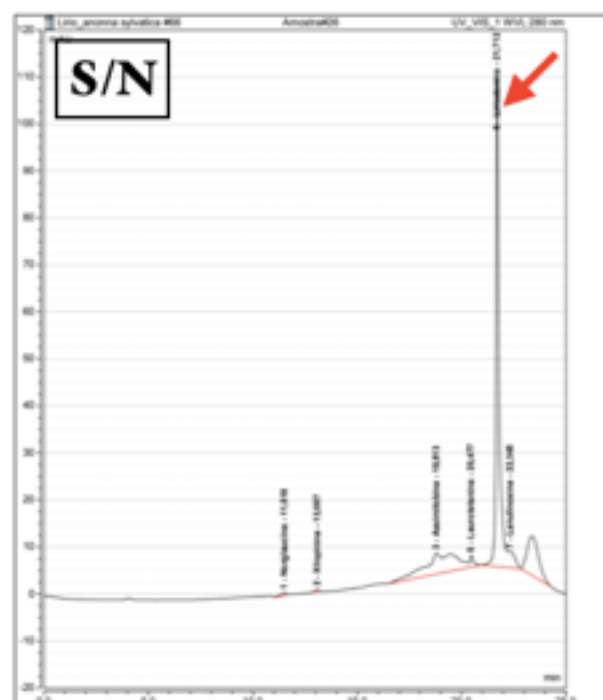
A



B



C



D

Figura 7: Perfil de alcaloides - Perfil de alcaloides extraídos de raízes de *Annona sylvatica* cultivadas com o fornecimento de nitrato (NO_3^-) (A), amônio (NH_4^+) (B), nitrato mais amônio ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$) (C) e sem fornecimento de nitrogênio (S/N) (D). Em destaque pico de liriodenina, predominante em todos os tratamentos.

Produção do alcaloide liriodenina

A concentração do alcaloide liriodenina em plantas cultivadas com NH_4^+ aumentou gradativamente ao longo do tempo, apresentando maior concentração aos 90 DAT. Aos 30 DAT a menor concentração foi observada em plantas tratadas com NO_3^- e aos 60 DAT os tratamentos NH_4^+ , $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ e S/N não variaram entre si. Aos 90 DAT, a maior concentração de liriodenina foi observada em plantas cultivadas com NH_4^+ e a menor concentração em plantas cultivadas com NO_3^- e S/N (Figura 8).

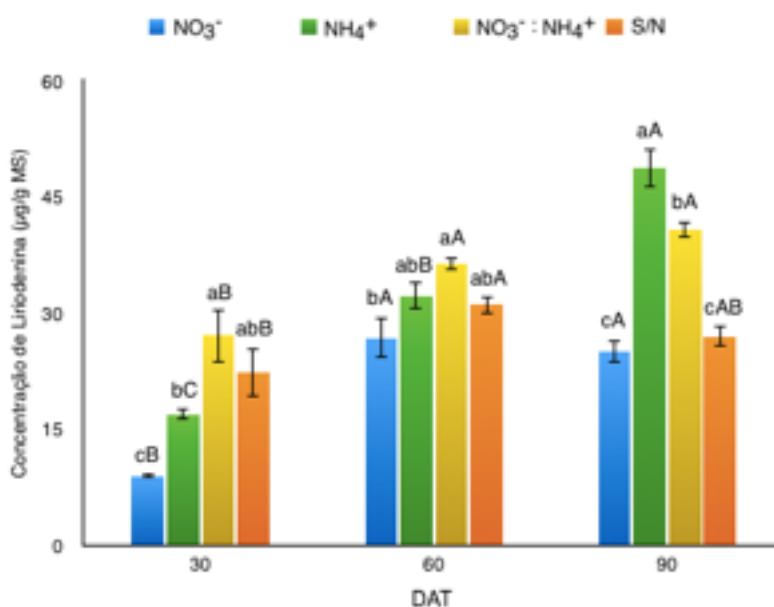


Figura 8: Concentração do alcaloide liriodenina ($\mu\text{g/g MS}$) determinada aos 30, 60 e 90 dias após o início dos tratamentos (DAT) em raízes de *Annona sylvatica* cultivadas com o fornecimento de nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+), nitrato mais amônio ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$) e sem fornecimento de nitrogênio (S/N). As letras minúsculas comparam os 4 tratamentos em uma mesma época de coleta; as letras maiúsculas comparam as épocas de coleta em cada tratamento.

Taxa de mortalidade

Aos 30 dias após o início dos tratamentos (DAT), apenas plantas cultivadas com NH_4^+ e S/N apresentaram maior mortalidade que os demais tratamentos. O tratamento com NH_4^+ apresentou diminuição na taxa de mortalidade ao longo do tempo, sendo a fonte de nitrogênio que mais causou morte das plantas aos 60 DAT (Tabela 3).

DAT	Taxa de mortalidade			
	NO_3^-	NH_4^+	$\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$	S/N
30	0 bA	1,4 aA	0 bA	1,2 aA
60	0,2 bA	1,2 aAB	0,2 bA	0,2 bB
90	0 bA	0,4 abB	0,6 abA	1,2 aA

Tabela 3: Taxa de mortalidade determinada aos 30, 60 e 90 dias após o início dos tratamentos (DAT) em plantas de *Annona sylvatica* cultivadas com o fornecimento de nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+), nitrato mais amônio ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$) e sem fornecimento de nitrogênio (S/N). As letras minúsculas comparam os 4 tratamentos em uma mesma época de coleta (linha); as letras maiúsculas comparam as épocas de coleta em cada tratamento (coluna).

Compostos voláteis foliares

Foram identificados 46 compostos voláteis extraídos das folhas de *Annona sylvatica* (Tabela 4), onde os majoritários foram o β -selineno (13,74 - 40,4%), α -tujeno (2,31 - 18,85%), (*E*)-cariofileno (3,23 - 14,64%), α -pineno (2,01 - 7,77%) e 2-*E*-hexanal (0,15 - 10%).

O mapa de calor indica a correlação positiva e negativa entre os compostos e os tratamentos (Figura 9) e está relacionado à porcentagem relativa dos compostos (Tabela 4). O β -selineno apresentou elevada porcentagem relativa e correlação positiva em plantas cultivadas com NO_3^- comparadas às plantas cultivadas com NH_4^+ aos 30 DAT (Figura 10), enquanto (*E*)-cariofileno apresentou menor porcentagem relativa e correlação negativa em plantas cultivadas com NO_3^- comparadas às plantas cultivadas com NH_4^+ aos 30 DAT (Figura 11). O α -tujeno apresentou maior

porcentagem relativa e correlação positiva aos 30 DAT em plantas cultivadas com NO_3^- e aos 60 DAT a porcentagem relativa e correlação positiva em plantas cultivadas com NO_3^- foi maior que em plantas cultivadas S/N (Figura 12). Para α -pineno, a maior porcentagem relativa e correlação positiva aos 90 DAT foi observada em plantas cultivadas com $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ em relação às cultivadas com NH_4^+ e S/N (Figura 13). O 2-*E*-hexanal apresentou aumento na porcentagem relativa em plantas cultivadas com NH_4^+ ao longo do tempo, sendo o tratamento com maior porcentagem relativa e correlação positiva de 2-*E*-hexanal aos 90 DAT (Figura 14).

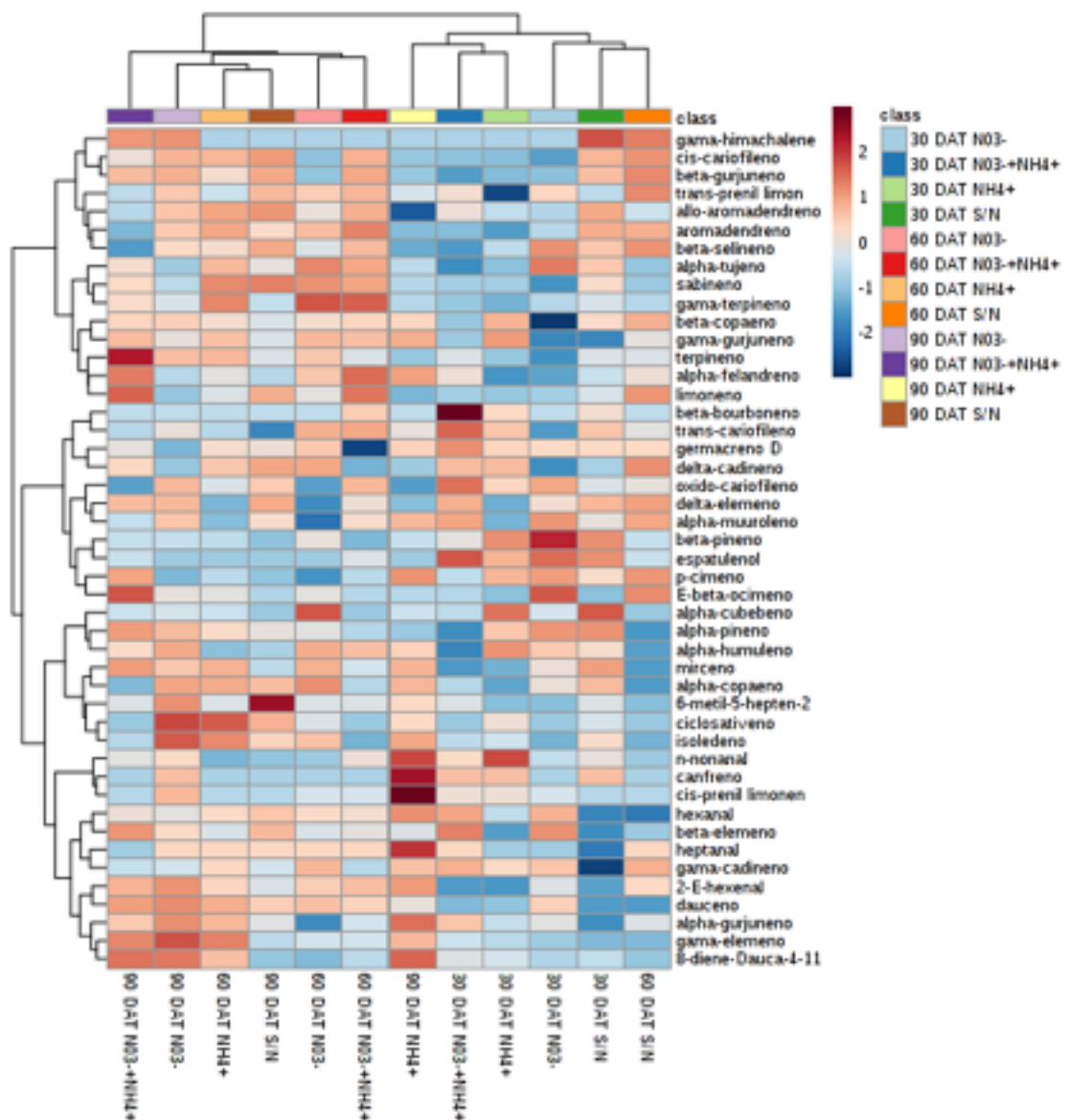


Figura 9: Mapa de calor indicando correlação positiva (vermelho) e negativa (azul) entre os compostos voláteis foliares extraídos de folhas de *Annona sylvatica* e os tratamentos com fornecimento de nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+), nitrato mais amônio ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$) e sem fornecimento de nitrogênio (S/N) aos 30, 60 e 90 dias após o início dos tratamentos (DAT).

Tratamentos	IRC	IRL	30 DAT			60 DAT			90 DAT				
			NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ :NH ₄ ⁺	S/N	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ :NH ₄ ⁺	S/N	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ :NH ₄ ⁺
hexanal	800	801	1,43	0,8	1,74	0,19	0,83 a	0,76 a	0,76 a	1,12 b	4,63 a	0,66 b	1,12 b
2-4-hexanal	849	855	1,72 a	0,15 b	0,18 b	0,26 b	2,07 ab	3,42 a	2,42 ab	1,53 b	10 a	3,01 b	3,17 b
heptanal	901	902	0,63	0,03	0,04	0,02	0,04	0,04	0,04	0,04	0,12	0,03	0,04
α-cujelero	925	930	18,85 a	3,37 b	2,31 b	8,32 b	16,87 a	9,96 ab	12,22 ab	3,78 b	2,43	5,83	7,13
α-pineno	930	939	7,77	5,67	2,86	7,73	6,18	4	4,2	2,01	5,31 ab	3,59 b	7,09 a
carfeno	944	954	0,02	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,32	0,02
sabineno	970	975	0,01	0,04	0,17	0,55	1,64 a	0,88 ab	1,27 a	0,11 b	0,14 b	0,11 b	0,66 ab
β-pineno	972	979	3,34 a	0,64 b	0,24 b	0,65 b	0,57	0,04	0,01	0,04	0,04	0,04	0,02
6-metil-5-hepten-2-ona	986	985	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,12	0,13	0,24
mirano	990	990	1,06 ab	0,46 bc	0,14 c	1,31 a	1,08	1,08	0,63	0,16	0,81	1,04	0,53
α-bulandreno	1002	1002	0,15	0,08	0,83	2,73	1,91 b	2,7 ab	6,31 a	2,28 b	2,87	6,1	5,58
terpineno	1014	1017	0,01	0,02	0,03	0,03	0,04	0,09	0,03	0,03	0,08	0,02	0,03
p-cimeno	1021	1024	0,94	0,67	0,26	0,74	0,19	0,72	0,6	1	0,38	1,03	0,85
limoneno	1025	1029	0,1	0,08	0,1	0,55	0,8	0,61	0,9	0,62	0,21 b	0,11 b	1,07 a
(E)-β-oclimeno	1047	1050	0,6 a	0,03 b	0,04 b	0,03 b	0,13	0,12	0,04	0,7	0,14 b	0,04 b	0,63 a
γ-terpineno	1056	1059	0,03	0,01	0,02	0,09	0,89 a	1 a	0,81 ab	0,03 b	0,1	0,03	0,2
α-ionanal	1102	1100	0,14	0,54	0,2	0,12	0,04	0,09	0,13	0,04	0,32	0,54	0,1
δ-elemeno	1334	1338	0,53	0,08	0,58	0,53	0,04 b	0,1 b	0,58 a	0,68 a	0,51 ab	0,13 b	0,61 a
α-cubebene	1346	1351	0,14	0,62	0,54	0,8	0,87 a	0,1 b	0,04 b	0,04 b	0,14	0,1	0,1
ciclooctatieno	1361	1371	0,04	0,34	0,18	0,53	0,14 b	0,58 a	0,04 b	0,04 b	0,69 a	0,66 a	0,04 b
isobudeno	1364	1376	0,04	0,34	0,18	0,53	0,8 a	0,78 a	0,04 b	0,04 b	1,39 a	1,19 a	0,62 ab
α-copaeno	1372	1376	2,65	4,59	3,35	4,32	6,1 a	4,87 a	1,56 b	1,66 b	5,13 a	4,45 a	2,37 b
diaceno	1376	1381	0,83	0,59	0,4	0,12	1,02 ab	1,3 a	0,75 b	0,12 c	2,06 ab	2,15 a	1,6 ab
β-bourboneno	1380	1388	0,04 b	0,2 b	1,4 a	0,13 b	0,04	0,04	0,3	0,04	0,04	0,04	0,04
β-elemeno	1380	1390	1,53	0,93	1,67	1,76	0,8 b	0,78 b	1,87 a	1,22 ab	0,99	0,81	1,52
Z-carofileno	1392	1408	0,04 b	0,09 b	0,1 b	0,6 a	0,1 b	0,61 a	0,64 a	0,93 a	0,63 a	0,13 b	0,56 a
α-gurjuneno	1395	1409	1,58	1,15	1,89	1,32	1,3 ab	1,74 a	1,26 ab	0,7 b	2,89 ab	3,88 a	1,46 b
(E)-carofileno	1414	1419	4,04 c	14,64 a	11,96 ab	6,51 bc	7,68 a	3,23 b	8,11 a	4,41 b	5,71	4,7	3,3
β-copaeno	1423	1432	0,04 b	1,3 a	1,13 a	0,76 ab	0,73	0,71	0,85	1,29	0,91	0,83	0,82
γ-elemeno	1430	1433	0,1 b	0,08 b	0,04 b	0,62 a	0,12 b	0,74 ab	0,86 a	1,28 a	0,76 a	0,15 b	0,64 a
aromadendreno	1434	1441	0,02	0,03	0,17	0,01	0,04 b	0,63 a	0,04 b	0,01 b	1,48 a	0,41 ab	0,59 ab
(E)-prenil limoneno	1439	1445	3,29 ab	1,64 c	2,25 bc	4,61 a	4,05 b	4,8 b	6,35 b	9,69 a	3,59 b	2,34 b	6,36 a
α-humuleno	1449	1454	0,83 a	0,12 b	0,7 a	0,85 a	0,91	0,97	1,11	1,56	0,94	1,06	0,85
(Z)-prenil limoneno	1454	1459	1,2 ab	2,07 a	1,6 ab	0,93 b	1,63 a	0,68 b	1,36 a	1,03 ab	1,73 a	1,1 ab	0,97 ab
(α)-aromadendreno	1456	1460	2,59	1,3	1,66	2,56	1,66 b	2,54 ab	2,43 ab	2,86 a	0,54	0,73	0,63
γ-gurjuneno	1472	1477	0,04 c	0,92 a	0,53 b	0,04 c	0,68	0,59	0,63	0,6	0,6	0,91	0,68
germacreno D	1476	1481	0,86	0,99	1,58	0,88	1,03 a	0,79 ab	0,41 b	0,85 ab	0,6	0,91	0,68
γ-himachaleno	1478	1482	0,04	0,04	0,04	0,17	0,04	0,04	0,04	0,12	0,11	0,04	0,1
β-selineno	1492	1490	40,4 a	18,61 c	24,72 bc	30,34 ab	21,94 b	25,79 b	32,62 ab	36,96 a	26,92 ab	13,74 b	24,84 ab
α-mouriceno	1496	1500	1,82	0,77	1,67	0,85	2,22	0,86	1,01	1,62	1,27	1,43	1,31
γ-cadineno	1509	1513	0,81 a	1,34 a	0,99 a	0,04 b	0,93	0,64	0,52	0,97	0,81	0,73	0,73
δ-cadineno	1519	1523	1,11 ab	1,61 a	1,63 a	0,83 b	1,93	1,53	1,46	2,01	1,61	1,66	1,41
β-diene-Dauca-(11)	1523	1531	0,39	0,18	0,26	0,1	0,09 b	0,6 a	0,08 b	0,04 b	0,69 a	0,86 a	0,73 a
espátuleno	1571	1577	0,89	0,66	1,15	0,59	0,04	0,04	0,33	0,1	0,04	0,04	0,1
óxido-carofileno	1571	1583	0,87	1,22	1,47	0,61	0,11	0,48	0,72	0,73	0,7 a	0,11 b	0,12 b
Total identificado			99,79	69,13	71,92	84,93	90,4	82,21	96,46	87,14	84,46	80,15	82,13
													89,45

Tabela 4: Porcentagem relativa dos compostos voláteis foliares identificados em plantas de *Annona sylvatica* cultivadas com nitrato (NO₃⁻), amônio (NH₄⁺), nitrato mais amônio (NO₃:NH₄⁺) e sem fornecimento de nitrogênio (S/N) aos 30, 60 e 90 dias após o início dos tratamentos (DAT). IRC - Índice de retenção calculado; IRL - Índice de retenção da literatura.

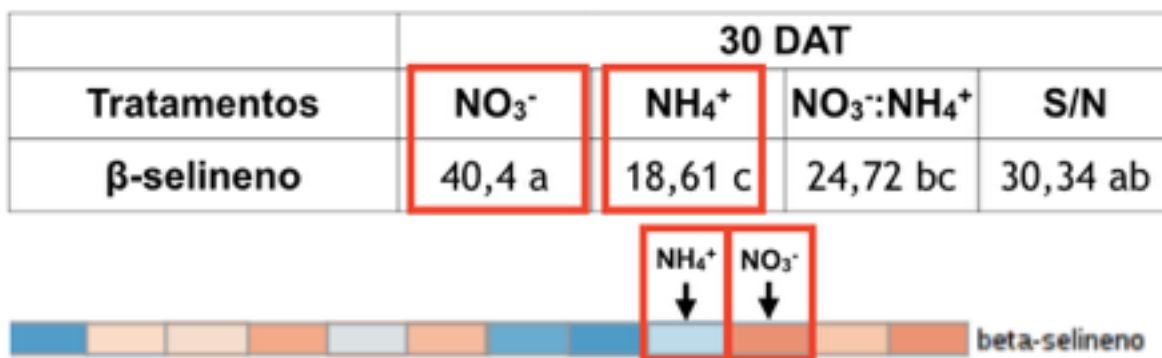


Figura 10: Porcentagem relativa e correlação positiva (vermelho) e negativa (azul) do composto volátil foliar β-selineno identificado em plantas de *A. sylvatica* cultivadas com nitrato (NO₃⁻), amônio (NH₄⁺), nitrato mais amônio (NO₃⁻:NH₄⁺) e sem fornecimento de nitrogênio (S/N) aos 30 dias após o início dos tratamentos (DAT).

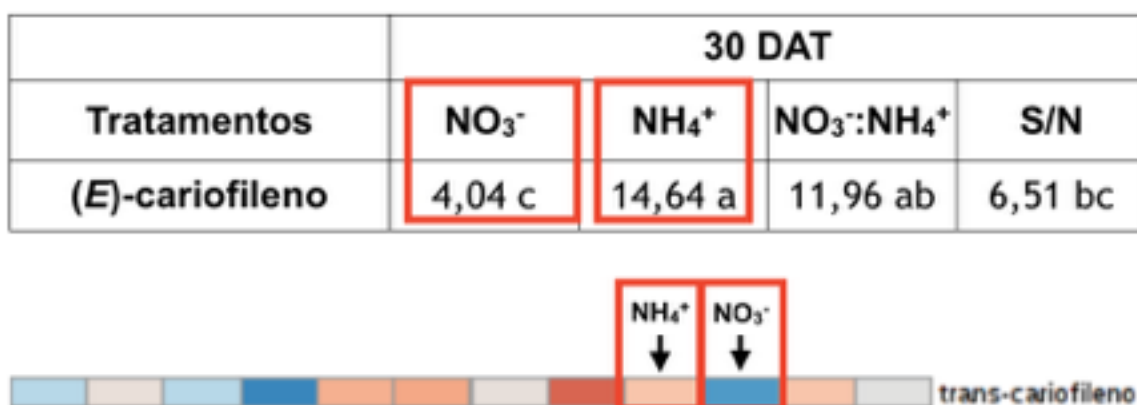


Figura 11: Porcentagem relativa e correlação positiva (vermelho) e negativa (azul) do composto volátil foliar (E)-cariofileno identificado em plantas de *A. sylvatica* cultivadas com nitrato (NO₃⁻), amônio (NH₄⁺), nitrato mais amônio (NO₃⁻:NH₄⁺) e sem fornecimento de nitrogênio (S/N) aos 30 dias após o início dos tratamentos (DAT).

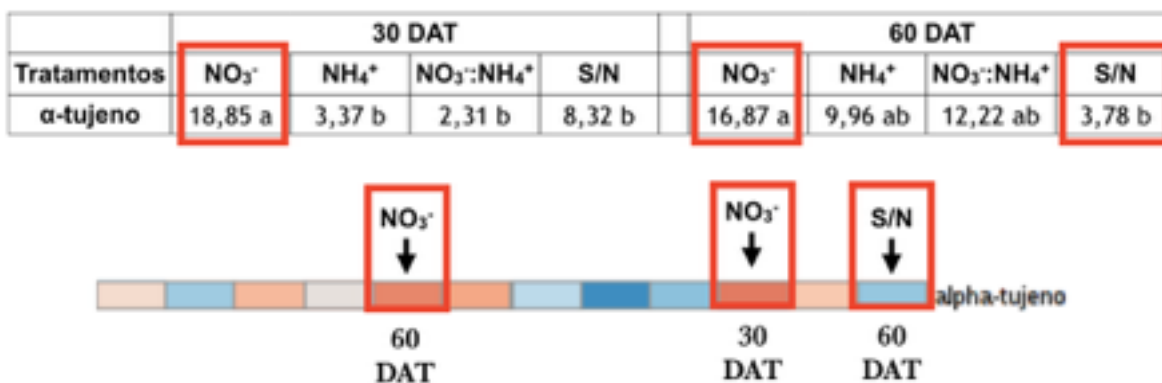


Figura 12: Porcentagem relativa e correlação positiva (vermelho) e negativa (azul) do composto volátil foliar α-tujeno identificado em plantas de *A. sylvatica* cultivadas com nitrato (NO₃⁻), amônio

(NH_4^+), nitrato mais amônio ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$) e sem fornecimento de nitrogênio (S/N) aos 30 e 60 dias após o início dos tratamentos (DAT).

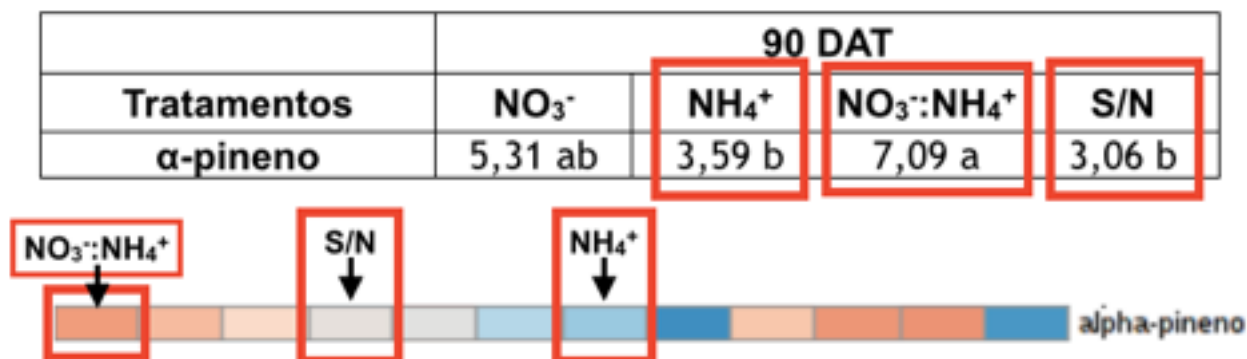


Figura 13: Porcentagem relativa e correlação positiva (vermelho) e negativa (azul) do composto volátil foliar α -pineno identificado em plantas de *A. sylvatica* cultivadas com nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+), nitrato mais amônio ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$) e sem fornecimento de nitrogênio (S/N) aos 90 dias após o início dos tratamentos (DAT).

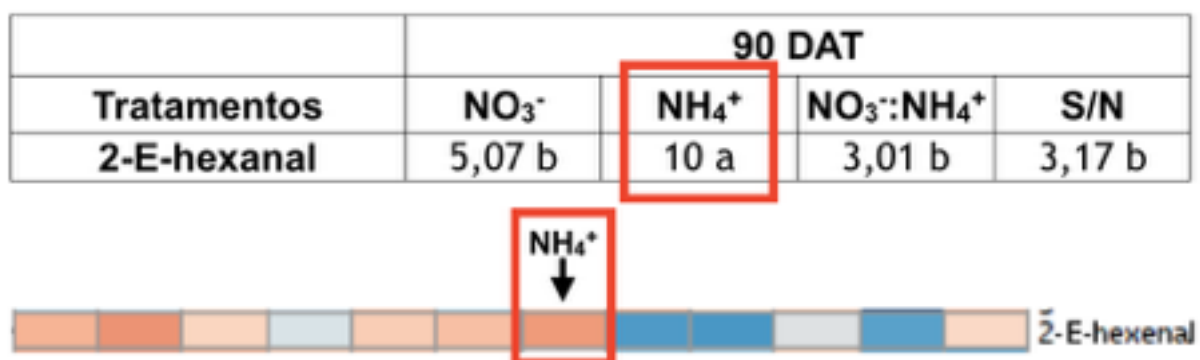


Figura 14: Porcentagem relativa e correlação positiva (vermelho) e negativa (azul) do composto volátil foliar 2-E-hexanal identificado em plantas de *A. sylvatica* cultivadas com nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+), nitrato mais amônio ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$) e sem fornecimento de nitrogênio (S/N) aos 90 dias após o início dos tratamentos (DAT).

De modo geral, observou-se que em *A. sylvatica* o fornecimento diferenciado de NO_3^- e NH_4^+ influencia nas trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, onde tratamento com NH_4^+ apresentou aos 90 dias após o início dos tratamentos (DAT) maior taxa de assimilação líquida de CO_2 (A_{net}) que os tratamentos com NO_3^- e S/N, maior eficiência de carboxilação da enzima rubisco

(A_{net}/C_i) que os demais tratamentos, menor concentração interna de CO_2 na câmara subestomática (C_i) que os tratamentos com $NO_3^-:NH_4^+$ e S/N e maior rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{FSII}) que o tratamento S/N.

As diferentes fontes de N também influenciam na concentração de alcaloide totais e liriodenina, onde aos 90 DAT o tratamento com NH_4^+ apresentou maior concentração de tais metabólitos que os demais tratamentos. No perfil de alcaloides, a liriodenina, que é um alcaloide considerado marcador quimiotaxonômico da família Annonaceae, foi predominante em todos os tratamentos (NO_3^- , NH_4^+ , $NO_3^-:NH_4^+$ e S/N); a discretina foi identificada apenas nos tratamentos contendo NH_4^+ (NH_4^+ e $NO_3^-:NH_4^+$) e N-Metil-laurotetaina e discretina não foram identificadas no tratamento S/N.

Em relação aos compostos voláteis foliares, os majoritários foram o β -selineno, α -tujeno, (*E*)-cariofileno, α -pineno e 2-*E*-hexanal.

3.6 DISCUSSÃO

O tratamento com NO_3^- proporcionou diminuição na taxa de assimilação líquida de CO_2 (A_{net}) dos 60 para os 90 dias após o início dos tratamentos (DAT). Tal diminuição na assimilação de C pode estar relacionada com a competição entre NO_3^- e CO_2 por agentes redutores (CAMPOS et al., 2019), uma vez que o NO_3^- utiliza elétrons provenientes do $NAD(P)H+H^+$ para ser reduzido a NO_2^- no citosol, e em seguida o NO_2^- é transportado para os cloroplastos onde será reduzido a NH_4^+ pela transferência de elétrons da ferredoxina (MILLER et al, 2004), dificultando o fluxo de elétrons e a produção de $NADPH+H^+$ para redução do C.

O fornecimento de N pelas fontes $NO_3^-:NH_4^+$ promoveu manutenção dos processos metabólicos, uma vez que as plantas de *A. sylvatica* apresentaram os parâmetros fotossintéticos e concentração de alcaloides totais constantes ao longo do tempo (BARON et al., 2013).

Plantas mantidas em tratamento sem o fornecimento de N, de modo geral, apresentaram baixa taxa fotossintética, uma vez que o N assimilado é utilizado para síntese da enzima ribulose-1,5-carboxilase/oxigenase, além de ser constituinte dos fotossistemas e da molécula de clorofila (LAWLOR et al., 1989).

O fornecimento de NH_4^+ promoveu aumento na assimilação de CO_2 (A_{net}) e elevada taxa fotoquímica no final do experimento, sendo observada pela dissipação fotoquímica (qP), taxa de transporte de elétrons (ETR) e rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{PSII}). Isso pode ser explicado pelo fato desse íon estar em sua forma reduzida, não competindo por agentes redutores com o metabolismo do C, permitindo o fluxo de elétrons do fotossistema para a produção de agentes redutores (NUNES-NESI et al., 2010). Foi observado também diminuição na concentração interna de CO_2 (C_i), uma vez que esqueletos carbônicos são necessários para assimilação de N e síntese de metabólitos nitrogenados, como alcaloides (NUNES-NESI et al., 2010).

A concentração de alcaloides totais aumentou gradualmente ao longo do tempo em plantas cultivadas com NH_4^+ , sendo o tratamento no qual as plantas mais produziram alcaloides ao final do experimento. O NH_4^+ é íon tóxico para as plantas (BRITTO et al., 2002), portanto seu fornecimento como única fonte de N causou estresse e maior mortalidade. Isso sugere que as plantas que sobreviveram até o final do experimento direcionaram o excesso de NH_4^+ para síntese de alcaloides, diminuindo assim sua toxicidade, permitindo a aclimação da fotossíntese, como observado nos resultados das variáveis relacionadas às trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, aumentando a concentração de alcaloides e evitando a mortalidade de tais plantas. De acordo com Marino et al. (2019), a síntese de compostos nitrogenados pelas plantas é uma estratégia para evitar o acúmulo excessivo de NH_4^+ no citosol, mantendo os níveis de NH_4^+ sob controle (MARINO et al., 2019).

O fornecimento de NH_4^+ aumentou a porcentagem relativa de 2-*E*-hexanal, um dos compostos voláteis majoritários encontrados em *A. sylvatica*. Tal dado sugere que esse tratamento direcionou recursos para rota do ácido linoleico, precursor do 2-*E*-hexanal. Esse composto é geralmente produzido em situações de estresse (DUDAREVA et al., 2013), podendo ser uma resposta da planta ao estresse causado pelo NH_4^+ .

Plantas mantidas no tratamento com NO_3^- aumentaram a porcentagem relativa de β -selineno e diminuíram a de (*E*)-cariofileno em *A. sylvatica*. Tais compostos compartilham a mesma rota biossintética, tendo como precursor o farnesil-difosfato (KANEHISA et al., 2000), portanto esse tratamento favoreceu a biossíntese de β -selineno. Tal composto possui propriedade antifúngica (DING et al., 2017) e como o fornecimento de NO_3^- levou ao incremento de β -selineno, a aplicação deste tratamento pode promover maior resistência à planta, resultado também observado em outros estudos onde aplicação de NO_3^- induziu mecanismos de defesa das plantas (MUR et al., 2016).

O fornecimento de NO_3^- também promoveu elevada porcentagem relativa de α -tujeno, composto que possui propriedade citotóxica (BLOWMAN et al., 2018), portanto o fornecimento de NO_3^- favoreceu o incremento de tal composto de interesse em *A. sylvatica*.

O fornecimento de N pelas fontes NO_3^- : NH_4^+ resultou em elevada porcentagem relativa de α -pineno, portanto esse tratamento pode ser utilizado para aumentar sua produção em *A. sylvatica*, o que pode ser interessante para a indústria, uma vez que esse composto possui propriedades antimicrobiana (LEITE et al., 2007), anti-inflamatória (KIM et al., 2015), citotóxicas (BLOWMAN et al., 2018). Outros compostos encontrados nesta espécie como ρ -cimeno, β -pineno, mirceno, limoneno, 6-metil-5-hepten-2-ona, espatulenol, α -humuleno também apresentam propriedades citotóxicas (BLOWMAN et al., 2018).

3.7 CONCLUSÃO

O fornecimento diferenciado de fontes de nitrogênio, NO_3^- e NH_4^+ , influencia no metabolismo primário e especializado da espécie *Annona sylvatica*, nomeadamente na fotossíntese, produção de alcaloide e de voláteis foliares.

3.8 AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos para realização do presente trabalho e a todas as pessoas e instituições envolvidas.

3.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Biology Department. Baylor University. Ed. 4.1, January 2017.

ALCANTARA, J. M.; LUCENA, J. M. V. M.; FACANALI, R.; MARQUES, M. O. M.; LIMA, M. P. Chemical Composition and Bactericidal Activity of the Essential Oils of Four Species of Annonaceae Growing in Brazilian Amazon. **Natural Product Communications**, 12, 619-622, February 2017.

ATTIQ, A.; JALIL, J.; HUSAIN, K. Annonaceae: Breaking the Wall of Inflammation. **Frontiers in Pharmacology**, 8, 752, October 2017.

BARON, B.; FERREIRA, G.; RODRIGUES, J. D.; BOARO, C. S. F.; MACEDO, A. C. Gas exchange, physiological indexes and inoic accumulation in *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer seedlings in nutrients solution. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 35, 361-376, June 2013.

BENSADDEK, L.; GILLET, F.; SAUCEDO, J. E. N.; FLINIAUX, M. The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. **Journal of Biotechnology**, 85, 35-40, January 2001.

BLOWMAN, K.; MAGALHÃES, M.; LEMOS, M. F. L.; CABRAL, C.; PIRES, I. M. Anticancer Properties of Essential Oils and Other Natural Products. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2018, 12, March 2018.

BRITTO, D. T.; KRONZUCKER, H. J. NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. **Journal of plant physiology**, 15, 567-584, 2002.

CAMPOS, F. G.; VIEIRA, M. A. R.; AMARO, A. C. E.; DE LA CRUZ CHACÓN, I.; MARQUES, M. O. M.; FERREIRA, G.; BOARO, C. S. F. Nitrogen in the defense system of *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer. **Plos One**, 14, June 2019.

CHEN, C.; WU, H.; CHAO, W.; LEE, C. Review on pharmacological activities of liriodenine. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 7, 067-1070, Maio 2013.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; SILVA, J. R. A.; MAIA, B. H. L. N. S.; DUARTE, M. C. T.; AMARAL, A. C. F.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). **Química Nova**, 32, 78-81, 2009.

COSTA, E. V.; DUTRA, L. M.; JESUS, H. C. R.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S.; SALVADOR, M. J.; CAVALCANTI, S. C. H.; SANTOS, R. L. C.; PRATA, A. P. N. Chemical Composition and Antioxidant, Antimicrobial, and Larvicidal Activities of the Essential Oils of *Annona salzmannii* and *A. pickelii* (Annonaceae). **Natural Product Communications**, 6, 907-912, June 2011.

COSTA, E. V.; DUTRA, L. M.; SALVADOR, M. J.; RIBEIRO, L. H. G.; GADELHA, F. R.; CARVALHO, J. E. Chemical composition of the essential oils of *Annona pickelii* and *Annona salzmannii* (Annonaceae), and their antitumour and trypanocidal activities. **Natural Product Research**, 27, 997-1001, May 2012.

COSTA, E. V.; CRUZ, E. O.; LOURENÇO, C. C.; MORAES, V. R. S.; NOGUEIRA, P. C. L.; SALVADOR, M. J. Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* A. DC. (Annonaceae). **Natural Product Research**, 27, 1002-1006, June 2013.

DE LA CRUZ CHACÓN, I.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; FEFER, P. G.; GARCIA, L. F. J. G. Liriodenine, Early Antimicrobial Defence in *Annona diversifolia*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, 66, 377 – 384, July 2011.

DE LA CRUZ CHACÓN, I.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. Liriodenine alkaloid in *Annona diversifolia* during early development. **Natural Product Research**, 26, 42–49, January 2012.

DE LIMA, J. P. S.; PINHEIRO, M. L. B.; SANTOS, A. M. G.; PEREIRA, J. L. S. SANTOS, D. M. F.; BARISON, A.; SILVA-JARDIM, I. COSTA, E. V. In Vitro Antileishmanial and Cytotoxic Activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). **Revista Virtual de Química**, 4, 692-702, November 2012.

DING, Y.; HUFFAKER, A.; KOLLNER, T. G.; WECKWERTH, P.; ROBERT, C. A. M.; SPENCER, J. L.; LIPKA, A. E.; SCHMELZ, E. A. Selinene Volatiles Are Essential Precursors for Maize Defense Promoting Fungal Pathogen Resistance. **Plant Physiology**, 175, 1455-1468, November 2017.

DUDAREVA, N.; KLEMPIEN, A.; MUHLEMANN, J. K.; KAPLAN, I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. **New phytologist**, 198, 16-32, 2013.

FORMAGIO, A. S. N.; VIEIRA, M. C.; SANTOS, L. A. C.; CARDOSO, C. A. L.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; SILVA, M. A.; KASSUYA, C. Composition and Evaluation of the Anti-Inflammatory and Anticancer Activities of the Essential Oil from *Annona sylvatica* A. St.-Hil. **Journal of Medicinal Food**, 16, 20–25, January 2013.

FREEMAN, B. C.; GWYN, A. B. An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. **The Plant Health Instructor**, 94, January 2008.

FRITZ, C.; PALACIOS-ROJAS, N.; FEIL, R.; STITT, M. Regulation of secondary metabolism by the carbon–nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. **The Plant Journal**, 46, 533-548, May 2006.

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**, 36, 001-016, February 2014.

GUO, X.; ZU, Y.; TANG, Z. Physiological responses of *Catharanthus roseus* to different nitrogen forms. **Acta Physiologiae Plantarum**, 34, 589-598, March 2012.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water: culture method for growing plants without soil. **Berkeley: California Agricultural Experiment Station**, 347, 1-32, 1950.

KANDI, S.; GODISHALA, V.; RAO, P.; RAMANA, K. V. Biomedical Significance of Terpenes: An Insight. **Biomedicine and Biotechnology**, 3, 8-10, March 2015.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.*, 28, 27-30, 2000.

KESZEI, A.; BRUBAKER, C. L.; CARTER, R.; KOLLNER, T.; DEGENHARDT, J.; FOLEY, W. J. Functional and evolutionary relationships between terpene synthases from Australian Myrtaceae. **Phytochemistry**, 71, 844-852, June 2010.

LAWLOR, D. W.; KONTTURI, M.; YOUNG, A. T. Photosynthesis by flag leaves of wheat in relation to protein, ribulose biphosphate carboxylase activity and nitrogen supply. **Journal of Experimental Botany**, 40, 43-52, January 1989.

LEITE, A. M.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; DINIZ, M. F. F. M.; TRAJANO, V. N.; MEDEIROS, I. A. Inhibitory effect of β -pinene, α -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 43, 121-126, March 2007.

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

MARSCHNER, P. Mineral nutrition of higher plants. Australia: School of Agriculture, Food and Wine, The University of Adelaide Australia, Ed. 3, p. 651, 2012.

MUR, L. A. J.; SIMPSON, C.; KUMARI, A.; GUPTA, A. K.; GUPTA, K. J. Moving nitrogen to the centre of plant defence against pathogens. **Annals of Botany**, 119, 703–709, September 2016.

NUNES-NESE, A.; FERNIE, A. R.; STITT, M. Metabolic and Signaling Aspects Underpinning the Regulation of Plant Carbon Nitrogen Interactions. **Molecular Plant**, 3, 973-996, November 2010.

OROZCO-CASTILLO, J. A.; CRUZ-ORTEGA, R.; MARTINEZ-VÁZQUEZ, M.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. Aporphine alkaloid contents increase with moderate nitrogen supply in *Annona diversifolia* Saff. (Annonaceae) seedlings during diurnal periods. **Natural Product Research**, 30, 2209-2214, October 2016.

PHILLIPSON J. D.; ROBERTS, M. F.; ZENK, M. H. The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids. *Proceedings in Life Sciences*, p. 81, 1985.

PINHEIRO, M. L. B.; XAVIER, C. M.; SOUZA, A. D. L.; RABELO, D. M.; BATISTA, C. L.; BATISTA, R. L.; COSTA, E. V.; CAMPOS, F. R.; BARISON, A.; VALDEZ, R. H.; UEDANAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V. Acanthoic Acid and other Constituents from the Stem of *Annona amazonica* (Annonaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 20, 1095-1102, January 2009.

SURESH, H. M.; SHIVAKUMAR, B.; SHIVAKUMAR, S. I. Cytotoxicity of Aporphine Alkaloids from the Roots of *Annona Reticulata* on Human Cancer Cell Lines. **International Journal of Plant Research**, 2, 57-60, May 2012.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando que o NH_4^+ , apesar de ser tóxico para as plantas, foi direcionado pela espécie *A. sylvatica* para produção de alcaloides, aumentando assim a concentração deste metabólito em suas raízes aos 90 dias após o início do experimento, estudos futuros podem determinar uma concentração adequada de NH_4^+ para o cultivo de tal espécie, diminuindo a taxa de mortalidade e otimizando a produção de alcaloides, em especial da liriodenina, alcaloide predominante em *A. sylvatica* que apresenta diversas propriedades medicinais e contra fitopatógenos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DE TODA A DISSERTAÇÃO

ABDOLZADEH, A.; HOSSEINIAN, F.; AGHDASI, M.; SADGIPOOR, H. Effects of Nitrogen Sources and Levels on Growth and Alkaloid Content of Periwinkle. **Asian Journal of Plant Sciences**, 5, 271–276, February 2006.

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Biology Department. Baylor University. Ed. 4.1, January 2017.

ALCANTARA, J. M.; LUCENA, J. M. V. M.; FACANALI, R.; MARQUES, M. O. M.; LIMA, M. P. Chemical Composition and Bactericidal Activity of the Essential Oils of Four Species of Annonaceae Growing in Brazilian Amazon. **Natural Product Communications**, 12, 619-622, February 2017.

ATTIQ, A.; JALIL, J.; HUSAIN, K. Annonaceae: Breaking the Wall of Inflammation. **Frontiers in Pharmacology**, 8, 752, October 2017.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, 46, 446-475, February 2008.

BARON, B.; FERREIRA, G.; RODRIGUES, J. D.; BOARO, C. S. F.; MACEDO, A. C. Gas exchange, physiological indexes and inoic accumulation in *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer seedlings in nutrients solution. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 35, 361-376, June 2013.

BASSI, D.; MENOSSI, M.; MATTIELLO, L. Nitrogen supply influences photosynthesis establishment along the sugarcane leaf. **Scientific Reports**, 8, 2327, February 2018.

BASSOLÉ, I. H.N.; JULIANI, H.R. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. **Molecules**, 17, 3989-4006, April 2012.

BEAUDOIN G. A. W.; FACCHINI P. J. Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. **Planta**, 240, 19-32, July 2014.

BENSADDEK, L.; GILLET, F.; SAUCEDO, J. E. N.; FLINIAUX, M. The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. **Journal of Biotechnology**, 85, 35-40, January 2001.

BETTI, M.; GARCIA-CALDERON, M.; PEREZ-DELGADO, C. M.; CREDALI, A.; ESTIVILL, G.; GALVAN, F.; VEGA, J. M.; MARQUEZ, A. J. Glutamine Synthetase in Legumes: Recent Advances in Enzyme Structure and Functional Genomics. **International Journal of Molecular Sciences**, 13, 7994-8024, June 2012.

BLOWMAN, K.; MAGALHÃES, M.; LEMOS, M. F. L.; CABRAL, C.; PIRES, I. M. Anticancer Properties of Essential Oils and Other Natural Products. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2018, 12, March 2018.

BRITTO, D. T.; KRONZUCKER, H. J. NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. **Journal of plant physiology**, 15, 567-584, 2002.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Ed. 2, p. 1250, August 2015.

CAMPOS, F. G.; VIEIRA, M. A. R.; AMARO, A. C. E.; DE LA CRUZ CHACÓN, I.; MARQUES, M. O. M.; FERREIRA, G.; BOARO, C. S. F. Nitrogen in the defense system of *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer. **Plos One**, 14, June 2019.

CHATROU, L. W.; PIRIE, M. D.; ERKENS R. H. J.; COUVREUR, T. L. P.; NEUBIG, K. M.; ABBOTT, J. R.; MOLS, J. B.; MAAS, J. W.; SAUNDERS, R. M. K.; CHASE, M. W. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 169, 5–40, 2012.

CHEN, C.; WU, H.; CHAO, W.; LEE, C. Review on pharmacological activities of liriodenine. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 7, 067-1070, Maio 2013.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; SILVA, J. R. A.; MAIA, B. H. L. N. S.; DUARTE, M. C. T.; AMARAL, A. C. F.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). **Química Nova**, 32, 78-81, 2009.

COSTA, E. V.; DUTRA, L. M.; JESUS, H. C. R.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S.; SALVADOR, M. J.; CAVALCANTI, S. C. H.; SANTOS, R. L. C.; PRATA, A. P. N. Chemical Composition and Antioxidant, Antimicrobial, and Larvicidal Activities of the Essential Oils of *Annona salzmannii* and *A. pickelii* (Annonaceae). **Natural Product Communications**, 6, 907-912, June 2011.

COSTA, E. V.; DUTRA, L. M.; SALVADOR, M. J.; RIBEIRO, L. H. G.; GADELHA, F. R.; CARVALHO, J. E. Chemical composition of the essential oils of *Annona pickelii* and *Annona salzmannii* (Annonaceae), and their antitumour and trypanocidal activities. **Natural Product Research**, 27, 997-1001, May 2012.

COSTA, E. V.; DUTRA, L. M.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S.; SALVADOR, M. J.; RIBEIRO, L. H. G.; GADELHA, F. R. Essential Oil from the Leaves of *Annona vepretorum*: Chemical Composition and Bioactivity. **Natural Product Communications**, 7, 265-266, February 2012.

COSTA, E. V.; CRUZ, E. O.; LOURENÇO, C. C.; MORAES, V. R. S.; NOGUEIRA, P. C. L.; SALVADOR, M. J. Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* A. DC. (Annonaceae). **Natural Product Research**, 27, 1002-1006, June 2013.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, 15, 7313-7352, October 2010.

DE LA CRUZ CHACÓN, I.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; FEFER, P. G.; GARCIA, L. F. J. G. Liriodenine, Early Antimicrobial Defence in *Annona diversifolia*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, 66, 377 – 384, July 2011.

DE LA CRUZ CHACÓN, I.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. Liriodenine alkaloid in *Annona diversifolia* during early development. **Natural Product Research**, 26, 42–49, January 2012.

DE LIMA, J. P. S.; PINHEIRO, M. L. B.; SANTOS, A. M. G.; PEREIRA, J. L. S. SANTOS, D. M. F.; BARISON, A.; SILVA-JARDIM, I. COSTA, E. V. In Vitro Antileishmanial and Cytotoxic Activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). **Revista Virtual de Química**, 4, 692-702, November 2012.

DEELL, J. R.; TOIVONEN, P. M. A. **Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology**, June 2003.

DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS W. W.; BARKER, D. H.; LOGAN, B. A.; BOWLING, D. R.; VERHOEVEN, A. S. Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. **Physiologia Plantarum**, 98, 253-264, October 1996.

DING, Y.; HUFFAKER, A.; KOLLNER, T. G.; WECKWERTH, P.; ROBERT, C. A. M.; SPENCER, J. L.; LIPKA, A. E.; SCHMELZ, E. A. Selenene Volatiles Are Essential Precursors for Maize Defense Promoting Fungal Pathogen Resistance. **Plant Physiology**, 175, 1455-1468, November 2017.

DUDAREVA, N.; KLEMPIEN, A.; MUHLEMANN, J. K.; KAPLAN, I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. **New phytologist**, 198, 16-32, 2013.

EGYDIO-BRANDÃO, A. P. M.; NOVAES, P.; SANTOS, D. Y. A. C. Alkaloids from *Annona*: Review from 2005 to 2016. **JSM Biochemistry e Molecular Biology**, 4, 1031, October 2017.

- EVANS, W. C. Trease And Evans Pharmacognosy. Ed. 16, p. 353-415, 2009.
- FACCHINI, P. J. Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, Cell Biology, Molecular Regulation, and Metabolic Engineering Applications. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 52, 29-66, June 2001.
- FORMAGIO, A. S. N.; VIEIRA, M. C.; SANTOS, L. A. C.; CARDOSO, C. A. L.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; SILVA, M. A.; KASSUYA, C. Composition and Evaluation of the Anti-Inflammatory and Anticancer Activities of the Essential Oil from *Annona sylvatica* A. St.-Hil. **Journal of Medicinal Food**, 16, 20–25, January 2013.
- FOYER, C. H.; NOCTOR G.; HODGES, M. Respiration and nitrogen assimilation: targeting mitochondria-associated metabolism as a means to enhance nitrogen use efficiency. **Journal of Experimental Botany**, 62, 1467-1482, February 2011.
- FRACHEBOUD, Y. Using Chlorophyll Fluorescence to Study Photosynthesis. **Institute of Plant Sciences**, Zurich 2004.
- FREEMAN, B. C.; GWYN, A. B. An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. **The Plant Health Instructor**, 94, January 2008.
- FRITZ, C.; PALACIOS-ROJAS, N.; FEIL, R.; STITT, M. Regulation of secondary metabolism by the carbon–nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. **The Plant Journal**, 46, 533-548, May 2006.
- GOMES, G. C.; CARDOSO, J. H.; FERRER, R. S.; RODRIGUES, P. R. F.; RODRIGUES, W. F. Árvores da Serra dos Tapes: Guia de Identificação com Informações Ecológicas, Econômicas e Culturais. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Clima Temperado. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013
- GONÇALVES, G. L. P.; RIBEIRO, L. P.; GIMENES, L.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; FORIM, M. R.; FERNANDES, J. B.; VENDRAMIM, J. D. Lethal and sublethal toxicities of *Annona sylvatica* (Magnoliales: Annonaceae) extracts to *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). **Florida Entomological Society**, 98, 921-928, September 2015.
- 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**, 36, 001-016, February 2014.

GUO, X.; ZU, Y.; TANG, Z. Physiological responses of *Catharanthus roseus* to different nitrogen forms. **Acta Physiologiae Plantarum**, 34, 589-598, March 2012.

HAGEL, J. M.; FACCHINI, P. J. Benzylisoquinoline Alkaloid Metabolism: A Century of Discovery and a Brave New World. **Plant Cell Physiology**, 54, 647–672, May 2013.

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

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water: culture method for growing plants without soil. **Berkeley: California Agricultural Experiment Station**, 347, 1-32, 1950.

IRITI, M.; FAORO, F. Chemical Diversity and Defence Metabolism: How Plants Cope with Pathogens and Ozone Pollution. **International Journal of Molecular Sciences**, 10, 3371-3399, July 2009.

KANDI, S.; GODISHALA, V.; RAO, P.; RAMANA, K. V. Biomedical Significance of Terpenes: An Insight. **Biomedicine and Biotechnology**, 3, 8-10, March 2015.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.*, 28, 27-30, 2000.

KAUR, B.; KAUR, G.; ASTHIR, B. Biochemical aspects of nitrogen use efficiency: An overview. **Journal of plant nutrition**, 40, 506-523, October 2016.

KESZEI, A.; BRUBAKER, C. L.; CARTER, R.; KOLLNER, T.; DEGENHARDT, J.; FOLEY, W. J. Functional and evolutionary relationships between terpene synthases from Australian Myrtaceae. **Phytochemistry**, 71, 844-852, June 2010.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. **Molecules**, 18, 2328-2375, February 2013.

KIM, D.; LEE, H.; JEON, Y.; HAN, Y.; KEE, J.; KIM, H.; SHIN, H.; KANG, J.; LEE, B. S.; KIM, S.; KIM, S.; PARK, S.; CHOI, B.; PARK, S.; UM, J.; HONG, S. Alpha-Pinene Exhibits Anti-Inflammatory Activity Through the Suppression of MAPKs and the NF- κ B Pathway in Mouse Peritoneal Macrophages. **The American Journal of Chinese Medicine**, 43, 731–742, June 2015.

- LAWLOR, D. W.; KONTTURI, M.; YOUNG, A. T. Photosynthesis by flag leaves of wheat in relation to protein, ribulose biphosphate carboxylase activity and nitrogen supply. **Journal of Experimental Botany**, 40, 43-52, January 1989.
- LEITE, A. M.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; DINIZ, M. F. F. M.; TRAJANO, V. N.; MEDEIROS, I. A. Inhibitory effect of α -pinene, β -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 43, 121-126, March 2007.
- LIMA, P. S. S.; LUCCHESI, A. M.; ARAÚJO-FILHO, H. G.; MENEZES, P. P.; ARAÚJO, A. A. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; QUINTANS, J. S. S. Inclusion of Terpenes in Cyclodextrins: Preparation, Characterization and Pharmacological Approaches. **Carbohydrate Polymers**, 20, 965-987, October 2016.
- LONG, S. P.; BERNACCHI, C. J. Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. **Journal of Experimental Botany**, 54, 2393-2401, November 2003.
- LOPES, J. C.; MELLO-SILVA, R. Diversidade e caracterização das Annonaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 36, 125-131, February 2014.
- MAAS, P.; LOBÃO, A.; RAINER, H. Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Rodriguésia**, 66, 1085-1113, 2015.
- MARSCHNER, P. Mineral nutrition of higher plants. Australia: School of Agriculture, Food and Wine, The University of Adelaide Australia, Ed. 3, p. 651, 2012.
- MIKOLAJCZAK, K. J.; MADRIGAL, R. V.; RUPPRECHT, J. K.; HUI, Y.-H.; LIU, Y.-M.; SMITH, D. L.; MCLAUGHIN, J. L. Sylvaticin: A new cytotoxic and insecticidal acetogenin from *Rollinia sylvatica* (Annonaceae). **Experientia**, 46, 324-327, March 1990.
- MILLER, A. J.; CRAMER, M. D. Root nitrogen acquisition and assimilation. **Plant and Soil**, 274, 1-36, March 2004.
- MOHAMED, A. A.; EL-EMARY, G. A.; ALI, H. F. Influence of Some Citrus Essential Oils on Cell Viability, Glutathione-S-Transferase and Lipid Peroxidation in *Ehrlich ascites Carcinoma* Cells. **Journal of American Science**, 6, 820-826, January 2010.
- MUR, L. A. J.; SIMPSON, C.; KUMARI, A.; GUPTA, A. K.; GUPTA, K. J. Moving nitrogen to the centre of plant defence against pathogens. **Annals of Botany**, 119, 703–709, September 2016.

NUNES-NESE, A.; FERNIE, A. R.; STITT, M. Metabolic and Signaling Aspects Underpinning the Regulation of Plant Carbon Nitrogen Interactions. **Molecular Plant**, 3, 973-996, November 2010.

OKSMAN-CALDENTEY, K.; INZÉ, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **TRENDS in Plant Science**, 9, 433-440, September 2004.

OROZCO-CASTILLO, J. A.; CRUZ-ORTEGA, R.; MARTINEZ-VÁZQUEZ, M.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. Aporphine alkaloid contents increase with moderate nitrogen supply in *Annona diversifolia* Saff. (Annonaceae) seedlings during diurnal periods. **Natural Product Research**, 30, 2209-2214, October 2016.

PEREIRA, M. C.; STEFFENS, R. S.; JABLONSKI, A.; HERTZ, P. F.; RIOS, A. O.; VIZZOTTO, M.; FLÔRES, S. H. Characterization, bioactive compounds and antioxidant potential of three Brazilian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, 29, 19-24, February 2013.

PHILLIPSON J. D.; ROBERTS, M. F.; ZENK, M. H. The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids. Proceedings in Life Sciences, p. 81, 1985.

PINHEIRO, M. L. B.; XAVIER, C. M.; SOUZA, A. D. L.; RABELO, D. M.; BATISTA, C. L.; BATISTA, R. L.; COSTA, E. V.; CAMPOS, F. R.; BARISON, A.; VALDEZ, R. H.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V. Acanthoic Acid and other Constituents from the Stem of *Annona amazonica* (Annonaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 20, 1095-1102, January 2009.

RABELO, S. V.; COSTA, E. V.; BARISON, A.; DUTRA, L. M.; NUNES, X. P.; TOMAZ, J. C.; OLIVEIRA, G. G.; LOPES, N. P.; SANTOS, M. F. C.; ALMEIDA, J. R. G. S. Alkaloids isolated from the leaves of atemoya (*Annona cherimola* × *Annona squamosa*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 25, 419-421, August 2015.

RAMAKRISHNA, A.; GILL, S. S. Metabolic Adaptations in Plants During Abiotic Stress. Ed. 1, September 2018.

RAO, B. R. R. Biomass and essential oil yields of rainfed palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. var. *motia* Burk.) supplied with different levels of organic manure and fertilizer nitrogen in semi-arid tropical climate. **Industrial Crops and Products**, 14, 171-178, November 2001.

REZENDE, F. M.; ROSADO, D.; MOREIRA, F. A.; CARVALHO, W. R. S. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. VI Botânica no Inverno 2016, p. 93-104, 2016.

- RINALDI, M. V. N.; DÍAZ, I. E. C.; SUFFREDINI, I. B.; MORENO, P. R. H. Alkaloids and biological activity of beribá (*Annona hypoglauca*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 27, 77-83, February 2017.
- SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, H.; MORQUECHO-CONTRERAS, A. Chemical Plant Defense Against Herbivores. *Herbivores*, p. 3-28, March 2017.
- SEIGLER, D. S. *Plant Secondary Metabolism*. Ed. 1, 1998.
- SHARMA, S.; KUMAR, R. Effect of nitrogen on growth, biomass and oil composition of clary sage (*Salvia sclarea* Linn.) under mid hills of north western Himalayas. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, 3, 79-83, March 2012.
- SINGH, B.; SHARMA, R. A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. **3 Biotech**, 5, 129-151, April 2015.
- SURESH, H. M.; SHIVAKUMAR, B.; SHIVAKUMAR, S. I. Cytotoxicity of Aporphine Alkaloids from the Roots of *Annona Reticulata* on Human Cancer Cell Lines. **International Journal of Plant Research**, 2, 57-60, May 2012.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Ed. 5, 2009.
- TOHGE, T.; WATANABE, M.; HOEFGEN, R.; FERNIE, A. R. Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. **Frontiers in Plant Science**, 4, 1-13, March 2013.
- TZIN, V.; GALILI, G.; AHARONI, A. Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis. **eLS**, August 2012.
- VENDRUSCULO, G. S.; SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A. Etnobotânica no Rio Grande do Sul: Análise comparativa entre o conhecimento original e atual sobre as plantas medicinais nativas. **Pesquisas, Botânica**, 56, 85-322, January 2005.
- WARTHEN, D.; GOODEN, E. L.; JACOBSON, M. Tumor Inhibitors: Liriodenine, a Cytotoxic Alkaloid from *Annona glabra*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 58, 637-638, May 1969.
- ZHOU, Y.; ZHANG, Y.; WANG, X.; CUI, J.; XIA, X.; SHI, K.; YU, J. Effects of nitrogen form on growth, CO₂ assimilation, chlorophyll fluorescence, and photosynthetic electron allocation in cucumber and rice plants. **Biomed & Biotechnol**, 12, 126-134, January 2011.