



---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL  
(INTERUNIDADES)**

---

**MODULAÇÃO DA BIOSÍNTESE DE ALCALOIDES E DE  
COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS FOLIARES EM  
*Annona* INDUZIDAS POR DIFERENTES AUXINAS**

**CAROLINA OVILE MIMI**

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Instituto de Biociências – Câmpus de Botucatu/Rio Claro  
Seção Técnica de Pós-Graduação



---

## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL (INTERUNIDADES)

---

# MODULAÇÃO DA BIOSÍNTESE DE ALCALOIDES E DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS FOLIARES EM *Annona* INDUZIDAS POR DIFERENTES AUXINAS

CAROLINA OVILE MIMI

PROFA. DRA. GISELA FERREIRA

Orientadora

PROF. DR. IVÁN DE LA CRUZ CHACÓN

Coorientador

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

BOTUCATU – SP  
2026

M662m Mimi, Carolina Oville  
Modulação da biossíntese de alcaloides e de compostos orgânicos voláteis foliares em *Annona* induzidas por diferentes auxinas. / Carolina Oville Mimi.  
-- Botucatu, 2026  
139 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu  
Orientadora: Gisela Ferreira  
Coorientador: Iván De-la-Cruz-Chácon

1. Annonaceae. 2. Metabolismo especializado. 3. Reguladores vegetais. 4. Inibidores do transporte de auxina. 5. Bioprospecção. I. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE CAROLINA OVILE MIMI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL, DO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 20 de janeiro de 2026, às 14h, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de CAROLINA OVILE MIMI, intitulada "Modulação da biossíntese de alcaloides e de compostos orgânicos voláteis foliares em *Annona* induzidas por diferentes auxinas". A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> GISELA FERREIRA (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Biodiversidade e Bioestatística / UNESP / Câmpus de Botucatu - IBB, Dr.<sup>a</sup> MÁRCIA ORTIZ MAYO MARQUES (Participação Virtual) do(a) Centro de Pesquisa de Recursos Genéticos Vegetais / Instituto Agrônômico de Campinas, Dr. ABEL REBOUÇAS SÃO JOSÉ (Participação Virtual) do(a) Departamento de Fitotecnia e Zootecnia / UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA, Prof. Dr. EURICO EDUARDO PINTO DE LEMOS (Participação Virtual) do(a) Centro de de Engenharias e Ciências Agrárias / Universidade Federal de Alagoas - UFAL, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> MARILIA CAIXETA SOUSA (Participação Virtual) do(a) Centro Universitário Leonardo da Vinci / UNIASSELVI, Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final **APROVADA**. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Documento assinado digitalmente  
GISELA FERREIRA  
Data: 20/01/2026 21:12:55-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> GISELA FERREIRA



### *Agradecimentos*

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de auxílio financeiro para o desenvolvimento deste doutorado – Processo nº 140073/2022-1;

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gisela Ferreira, pela excelente orientação, pelos ensinamentos e pelo apoio fundamental ao meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Iván De la Cruz Chacón, pelo apoio essencial desde o início, pelas precisas correções e pela generosa partilha de conhecimento, decisivas para este trabalho.

Agradeço aos docentes, técnicos e funcionários do Setor de Botânica do Departamento de Biodiversidade e Bioestatística (IBB-UNESP), assim como a todos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal Interunidades (Botucatu-Rio Claro) e da Seção Técnica de Pós-Graduação, pelo conhecimento compartilhado e pelo indispensável suporte prestado ao longo destes quatro anos.

Agradeço à Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marcia Ortiz Mayo Marques (Instituto Agrônômico de Campinas), ao Prof. Dr. Leandro Wang Hantao (Instituto de Química – UNICAMP) e ao Paulo Henrique Furlan pela disponibilização de equipamentos e pelo indispensável auxílio nas análises de compostos voláteis foliares.

Agradeço igualmente ao Prof. Dr. Felipe Moura Araujo da Silva (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) e aos funcionários do Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) pela disponibilização de equipamentos e pelo suporte técnico nas análises de alcaloides.

Agradeço aos meus colegas e amigos do Laboratório de Germinação (DBB-IBB-UNESP) pelas longas horas de trabalho em bancada, pelo auxílio fundamental nos experimentos e, não menos importante, pela parceria e pelos momentos de descontração;

Meu mais profundo agradecimento à minha família, alicerce de toda a minha caminhada. Aos meus pais, Mara Lúcia Ovíle e Alex Mimi (*in memoriam*), agradeço pelos valores, pelo carinho, pela confiança inabalável e pela compreensão durante minhas ausências. Ao meu companheiro de vida, Mario Ribeiro Galvão Neto, por estar ao meu lado em cada passo, compartilhando as alegrias e apoiando-me nos momentos difíceis. Seu apoio, direto e indireto, foi decisivo para que eu concluísse este doutorado. À minha irmã, Jéssica, e a toda a minha família, pelo carinho e incentivo constante.



MIMI, C. O. **Modulação da biossíntese de alcaloides e de compostos orgânicos voláteis foliares em *Annona* induzidas por diferentes auxinas.** 2026. 139 p. Defesa de Tese de Doutorado – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2026.

**Resumo.** As espécies do gênero *Annona* (Annonaceae) possuem relevância ecológica e econômica, destacando-se por sua notável quimiodiversidade. As espécies de *Annona* sintetizam uma variedade de metabólitos especializados, como alcaloides e compostos orgânicos voláteis (COVs), cujas atividades biológicas já comprovadas despertam o interesse das indústrias farmacêutica, cosmética e agroquímica. Nesse contexto, compreender os fatores que modulam a biossíntese desses compostos torna-se uma etapa crucial para estudos de bioprospecção. Dentre esses fatores, os reguladores vegetais, como as auxinas, tem demonstrado efeitos de modulação da síntese de metabólitos especializados em diferentes espécies, podendo exercer efeitos positivos ou negativos, constituindo, portanto, ferramenta promissora tanto para elucidar os mecanismos de síntese do metabolismo especializado quanto para a bioprospecção de moléculas bioativas. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar quantitativamente e qualitativamente o impacto de diferentes auxinas (ácido indolacético - AIA, ácido indolbutírico – AIB e ácido naftalenoacético - ANA) e dos seus inibidores de transporte (ácido 2,3,5-Triiodobenzoico - TIBA e ácido 1-N-naftilphtalâmico – NPA) na síntese de alcaloides e COVs foliares de espécies de *Annona*. Os alcaloides foram analisados em raízes e folhas, enquanto os COVs foram avaliados exclusivamente no tecido foliar. Para isso, empregou-se: extração e quantificação espectrofotométrica (UV-Vis) de alcaloides totais; análise do perfil alcaloídico por espectrometria de massa de ionização direta (DI-MS); e identificação dos voláteis foliares por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS). Auxinas e seus inibidores de transporte modularam o metabolismo especializado em *Annona*, afetando tanto a biossíntese de alcaloides quanto a de voláteis foliares. Em *A. emarginata*, *A. atemoya* e *A. crassiflora*, houve aumento dos alcaloides totais e modificação do seu perfil. O volatiloma foliar também foi alterado nessas espécies e em *A. neoinsignis*. Tais achados elucidam mecanismos de regulação metabólica em resposta as auxinas e destacam o potencial dessas espécies para a bioprospecção, conforme observado com a anotação de alcaloides inéditos para as espécies estudadas.

**Palavras-chave:** Annonaceae, metabolismo especializado, reguladores vegetais, inibidores do transporte de auxina, bioprospecção.



MIMI, C. O. **Modulation of alkaloid biosynthesis and leaf volatile organic compounds in *Annona* induced by different auxins.** 2026. 139 p. PhD Thesis Defense – Institute of Biosciences of Botucatu, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2026.

**Abstract.** Species of the genus *Annona* (Annonaceae) are ecologically and economically significant, standing out due to their remarkable chemodiversity. They synthesize a variety of specialized metabolites, such as alkaloids and volatile organic compounds (VOCs), whose proven biological activities attract interest from the pharmaceutical, cosmetic, and agrochemical industries. In this context, understanding the factors that modulate the biosynthesis of these compounds becomes a crucial step for bioprospecting studies. Among these factors, plant growth regulators, such as auxins, have been shown to modulate the synthesis of specialized metabolites across different species, exerting either positive or negative effects. Consequently, they constitute a promising tool for both elucidating the mechanisms of specialized metabolism and for the bioprospecting of bioactive molecules. Therefore, this study evaluated the quantitative and qualitative impact of different auxins (indoleacetic acid – IAA, indolebutyric acid – IBA, and naphthaleneacetic acid – NAA) and their transport inhibitors (2,3,5-triiodobenzoic acid – TIBA and N-1-naphthylphthalamic acid – NPA) on the synthesis of leaf alkaloids and volatile organic compounds (VOCs) in *Annona* species. Alkaloids were analyzed in roots and leaves, while VOCs were assessed exclusively in foliar tissue. For this purpose, the following techniques were employed: extraction of total alkaloids via acid-base partitioning, followed by UV-vis spectrophotometric quantification; analysis of the alkaloid profile by direct infusion mass spectrometry (DI-MS); and identification of leaf volatiles by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). Auxins and their transport inhibitors modulated specialized metabolism in *Annona*, affecting both alkaloid and foliar volatile biosynthesis. In *A. emarginata*, *A. atemoya*, and *A. crassiflora*, total alkaloid content increased and their profile was altered. The leaf volatilome was also modified in these species and in *A. neoinsignis*. These findings elucidate metabolic regulation mechanisms in response to auxins and highlight the potential of these species for bioprospecting, as evidenced by the annotation of novel alkaloids in the studied species.

**Keywords:** Annonaceae, specialized metabolism, plant regulators, auxin transport inhibitors, bioprospecting.



## LISTA DE FIGURAS

### Introdução Geral

**Figura 1.** Ocorrência das espécies-alvo desse estudo, nativas e cultivadas, do gênero *Annona* no Brasil: *Annona emarginata* (A), *Annona crassiflora* (B), *Annona neoinsignis* (C) e *Annona atemoya* (D) (Lemos, 2014; Mendes-Silva et al., 2025).....17

### Capítulo I

**Figure 1.** Alkaloids identified in roots and leaves of ungrafted *Annona emarginata* and *A. emarginata* grafted with *Annona atemoya* treated with IAA, IBA and NAA.....36

**Figure 2.** Principal component analysis (PCA) of alkaloids identified in the roots of ungrafted *Annona emarginata* (UAE) and *A. emarginata* grafted with *Annona atemoya* (GAE) treated with IAA, IBA and NAA in three collection times (8, 14 and 20 DAT) analyzed by APCI-MS.....38

**Figure 3.** Hierarchical cluster analysis (HCA) of alkaloids identified in the roots of ungrafted *Annona emarginata* (UAE) and *A. emarginata* grafted with *Annona atemoya* (GAE) treated with IAA, IBA and NAA in three collection times (8, 14 and 20 DAT) analyzed by APCI-MS.....39

**Figure 4.** Principal component analysis (PCA) of alkaloids identified in the leaves of ungrafted *Annona emarginata* (UAE) and *Annona atemoya* grafted onto *Annona emarginata* (GAT) treated with IAA, IBA and NAA in three collection times (8, 14 and 20 DAT) analyzed by APCI-MS.....40

**Figure 5.** Hierarchical cluster analysis (HCA) of alkaloids identified in the leaves of ungrafted *Annona emarginata* (UAE) and *Annona atemoya* grafted onto *Annona emarginata* (GAT) treated with IAA, IBA and NAA at three collection times (8, 14 and 20 DAT) analyzed by APCI-MS.....40

### Supplementary Materials – Capítulo I

**Figure S1.** APCI-MS<sup>n</sup> spectrum (positive mode) of ion *m/z* 266 (Anonaine).....58

**Figure S2.** APCI-MS<sup>n</sup> spectrum (positive mode) of ion *m/z* 268 (Asimilobine).....58

**Figure S3.** APCI-MS<sup>n</sup> spectrum (positive mode) of ion *m/z* 276 (Liriodenine).....58

**Figure S4.** APCI-MS<sup>n</sup> spectrum (positive mode) of ion *m/z* 280 (*N*-methylanonaine).....59

**Figure S5.** APCI-MS<sup>n</sup> spectrum (positive mode) of ion *m/z* 282 (Nornuciferine).....59

**Figure S6.** APCI-MS<sup>n</sup> spectrum (positive mode) of ion *m/z* 292 (Lysicamine).....59

**Figure S7.** APCI-MS<sup>n</sup> spectrum (positive mode) of ion *m/z* 294 (*N*-formyl-anonaine).....60

**Figure S8.** APCI-MS<sup>n</sup> spectrum (positive mode) of ion *m/z* 296 (xylopine).....60



<b>Figure S9.</b> APCI-MS <sup>n</sup> spectrum (positive mode) of ion <i>m/z</i> 298 (stepharine).....	60
<b>Figure S10.</b> APCI-MS <sup>n</sup> spectrum (positive mode) of ion <i>m/z</i> 300 (4'-O-methylcoclaurine).....	61
<b>Figure S11.</b> APCI-MS <sup>n</sup> spectrum (positive mode) of ion <i>m/z</i> 306 (lanuginosine or oxoxylopine).....	61
<b>Figure S12.</b> APCI-MS <sup>n</sup> spectrum (positive mode) of ion <i>m/z</i> 314 (N,O-dimethylcoclaurine).....	61
<b>Figure S13.</b> APCI-MS <sup>n</sup> spectrum (positive mode) of ion <i>m/z</i> 324 (7-hydroxy-7-methyl-N-formyl-anonaine).....	62
<b>Figure S14.</b> APCI-MS <sup>n</sup> spectrum (positive mode) of ion <i>m/z</i> 326 (Nornantenine).....	62
<b>Figure S15.</b> APCI-MS <sup>n</sup> spectrum (positive mode) of ion <i>m/z</i> 328 (boldine and stepholidine).....	62
<b>Figure S16.</b> APCI-MS <sup>n</sup> spectrum (positive mode) of ion <i>m/z</i> 330 (Reticuline).....	63
<b>Figure S17.</b> APCI-MS <sup>n</sup> spectrum (positive mode) of ion <i>m/z</i> 338 (Subsessiline).....	63
<b>Figure S18.</b> APCI-MS <sup>n</sup> spectrum (positive mode) of ion <i>m/z</i> 356 (xylopinine).....	63
<b>Figure S19.</b> APCI-MS <sup>n</sup> spectrum (positive mode) of total alkaloid extract from the root of ungrafted <i>Annona emarginata</i> without auxin supply (control) at 8 (A), 14 (B) and 20 (C) days after the beginning of the treatments (DAT).....	64
<b>Figure S20.</b> APCI-MS <sup>n</sup> spectrum (positive mode) of total alkaloid extract from the root of ungrafted <i>Annona emarginata</i> treated with IAA at 8 (A), 14 (B) and 20 (C) DAT.....	65
<b>Figure S21.</b> APCI-MS <sup>n</sup> spectrum (positive mode) of total alkaloid extract from the root of ungrafted <i>Annona emarginata</i> treated with IBA at 8 (A), 14 (B) and 20 (C) DAT.....	66
<b>Figure S22.</b> APCI-MS <sup>n</sup> spectrum (positive mode) of total alkaloid extract from the root of ungrafted <i>Annona emarginata</i> treated with NAA at 8 (A), 14 (B) and 20 (C) DAT.....	67
<b>Figure S23.</b> APCI-MS <sup>n</sup> spectrum (positive mode) of total alkaloid extract from the root of <i>Annona emarginata</i> grafted with <i>Annona atemoya</i> without auxin supply (control) at 8 (A), 14 (B) and 20 (C) DAT.....	68
<b>Figure S24.</b> APCI-MS <sup>n</sup> spectrum (positive mode) of total alkaloid extract from the root of <i>Annona emarginata</i> grafted with <i>Annona atemoya</i> treated with IAA at 8 (A), 14 (B) and 20 (C) DAT.....	69
<b>Figure S25.</b> APCI-MS <sup>n</sup> spectrum (positive mode) of total alkaloid extract from the root of <i>Annona emarginata</i> grafted with <i>Annona atemoya</i> treated with IBA at 8 (A), 14 (B) and 20 (C) DAT.....	70
<b>Figure S26.</b> APCI-MS <sup>n</sup> spectrum (positive mode) of total alkaloid extract from the root of <i>Annona emarginata</i> grafted with <i>Annona atemoya</i> treated with NAA at 8 (A), 14 (B) and 20 (C) DAT.....	70



(C) DAT.....71

**Figure S27.** APCI-MS<sup>n</sup> spectrum (positive mode) of total alkaloid extract from the leaves of ungrafted *Annona emarginata* without auxin supply (control) at 8 (A), 14 (B) and 20 (C) DAT.....72

**Figure S28.** APCI-MS<sup>n</sup> spectrum (positive mode) of total alkaloid extract from the leaves of ungrafted *Annona emarginata* treated with IAA at 8 (A), 14 (B) and 20 (C) DAT.....73

**Figure S29.** APCI-MS<sup>n</sup> spectrum (positive mode) of total alkaloid extract from the leaves of ungrafted *Annona emarginata* treated with IBA at 8 (A), 14 (B) and 20 (C) DAT.....74

**Figure S30.** APCI-MS<sup>n</sup> spectrum (positive mode) of total alkaloid extract from the leaves of ungrafted *Annona emarginata* treated with NAA at 8 (A), 14 (B) and 20 (C) DAT.....75

**Figure S31.** APCI-MS<sup>n</sup> spectrum (positive mode) of total alkaloid extract from the leaves of *Annona atemoya* (grafted plants) without auxin supply (control) at 8 (A), 14 (B) and 20 (C) DAT.....76

**Figure S32.** APCI-MS<sup>n</sup> spectrum (positive mode) of total alkaloid extract from the leaves of *Annona atemoya* (grafted plants) treated with IAA at 8 (A), 14 (B) and 20 (C) DAT.....77

**Figure S33.** APCI-MS<sup>n</sup> spectrum (positive mode) of total alkaloid extract from the leaves of *Annona atemoya* (grafted plants) treated with IBA at 8 (A), 14 (B) and 20 (C) DAT.....78

**Figure S34.** APCI-MS<sup>n</sup> spectrum (positive mode) of total alkaloid extract from the leaves of *Annona atemoya* (grafted plants) treated with NAA at 8 (A), 14 (B) and 20 (C) DAT.....79

**Figure S35.** A) Principal Component Analysis (PCA) and B) Hierarchical Cluster Analysis (HCA) of alkaloids identified in *Annona emarginata* roots grafted with *Annona atemoya* treated with IAA, IBA and NAA in three collection times (8, 14 and 20 DAT) analyzed by APCI-MS.....80

**Figure S36.** A) Principal Component Analysis (PCA) and B) Hierarchical Cluster Analysis (HCA) of alkaloids identified in the roots of ungrafted *Annona emarginata* submitted to treatments with IAA, IBA and NAA at three collection times (8, 14 and 20 DAT) analyzed by APCI-MS.....81

## Capítulo II

**Figura 1.** Concentração de alcaloides totais (µg g de matéria seca) em folhas e raízes de *Annona crassiflora* tratadas com ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenoacético (ANA), ácido 2,3,5-Triiodobenzoico (TIBA) e ácido 1-N-naftilphtalâmico (NPA). Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas comparando os tratamentos (Controle, AIA, AIB, ANA, TIBA e NPA) e minúsculas comparando os órgãos (raízes e folhas), não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.....89

**Figura 2.** Estrutura química dos alcaloides identificados em raízes e folhas de *A. crassiflora*.....93

**Figura 3.** Análise de Componentes Principais (PCA) com agrupamento hierárquico (HCPC) baseado nos íons pares que apresentaram mais de 5% de abundância relativa (A) e Heatmap dos 25 íons com maior abundância relativa (B) registrados na análise por DI-MS de raízes e folhas de *A. crassiflora* tratadas com AIA, AIB, ANA, TIBA e NPA.....97

## Material Suplementar – Capítulo II

**Figura S1.** Espectro de APCI-MS<sup>n</sup> (modo positivo) do íon de *m/z* 276 (liriodenina).....106

**Figura S2.** Espectro de APCI-MS<sup>2</sup> (modo positivo) do íon de *m/z* 306 (lanuginosina).....106

**Figura S3.** Espectro de APCI-MS<sup>n</sup> (modo positivo) do íon de *m/z* 312 (Derivado de Tetrahydrothalifendina).....107

**Figura S4.** Espectro de APCI-MS<sup>n</sup> (modo positivo) do íon de *m/z* 326 (nornantenina).....107

**Figura S5.** Espectro de APCI-MS<sup>2</sup> (modo positivo) do íon de *m/z* 330 (reticulina).....107

**Figura S6.** Espectro de APCI-MS<sup>n</sup> (modo positivo) do íon de *m/z* 266 (anonaina).....108

**Figura S7.** Espectro de APCI-MS<sup>n</sup> (modo positivo) do íon de *m/z* 280 (roemerina).....108

**Figura S8.** Espectro de APCI-MS<sup>n</sup> (modo positivo) do íon de *m/z* 282 (nornuciferina).....108

**Figura S9.** Espectro de APCI-MS<sup>n</sup> (modo positivo) do íon de *m/z* 292 (lisicamina).....109

**Figura S10.** Espectro de APCI-MS<sup>n</sup> (modo positivo) do íon de *m/z* 294 (*N*-formil-anonaina).....109

**Figura S11.** Espectro de APCI-MS<sup>2</sup> (modo positivo) do íon de *m/z* 296 (xilopina).....109

**Figura S12.** Espectro de APCI-MS<sup>n</sup> (modo positivo) do íon de *m/z* 298 (estefarina).....110

**Figura S13.** Espectro de APCI-MS<sup>n</sup> (modo positivo) do íon de *m/z* 300 (4'-*O*-metilcoclaurina).....110

**Figura S14.** Espectro de APCI-MS<sup>n</sup> (modo positivo) do íon de *m/z* 314 (*N,O*-dimetilcoclaurina).....110

**Figura S15.** Espectro de APCI-MS<sup>n</sup> (modo positivo) do íon de *m/z* 324 (7-hidroxi-7-metil-*N*-formil-anonaina).....111

**Figura S16.** Espectro de APCI-MS<sup>n</sup> (modo positivo) do íon de *m/z* 328 (*N*-formil-xilopina e estefoldina).....111

**Figura S17.** Espectro de APCI-MS<sup>n</sup> (modo positivo) do íon de *m/z* 338 (subsessilina).....111

**Figura S18.** Espectro de APCI-MS<sup>n</sup> (modo positivo) do íon de *m/z* 342 (Derivado da preocoteína).....112

**Figura S19.** Espectro de APCI-MS<sup>n</sup> (modo positivo) do íon de *m/z* 356 (xilopinina).....112

## Capítulo III

**Figura 1.** Heatmap dos compostos orgânicos voláteis (COVs) foliares identificados em *Annona emarginata*, *Annona crassiflora* e *Annona neoinsignis* tratadas com auxinas (ácido indolacético



- AIA, ácido indolbutírico -IBA e ácido naftalenoacético – ANA) e inibidores de transporte de auxina - ITAs (ácido 2,3,5-Triiodobenzoico - TIBA e ácido 1-N-naftilphtalâmico – NPA).....123

**Figura 2.** (A) Média (%) e (B) Análise de Componentes Principais (PCA) com agrupamento hierárquico (HCPC) dos COVs foliares majoritários identificadas em folhas de *Annona emarginata* tratadas com auxinas (AIA, AIB e ANA) e ITAs (TIBA e NPA).....124

**Figura 3.** (A) Média (%) das classes e (B) Análise de Componentes Principais (PCA) com agrupamento hierárquico (HCPC) dos COVs foliares identificadas em folhas de *Annona emarginata* tratadas com auxinas (AIA, IBA e ANA) e ITAs (TIBA e NPA).....126

**Figura 4.** (A) Média (%) e (B) Análise de Componentes Principais (PCA) com agrupamento hierárquico (HCPC) dos COVs foliares majoritários identificadas em folhas de *Annona crassiflora* tratadas com auxinas (AIA, IBA e ANA) e ITAs (TIBA e NPA).....128

**Figura 5.** (A) Média (%) das classes e (B) Análise de Componentes Principais (PCA) com agrupamento hierárquico (HCPC) dos COVs foliares identificadas em folhas de *Annona crassiflora* tratadas com auxinas (AIA, IBA e ANA) e ITAs (TIBA e NPA).....129

**Figura 6.** (A) Média (%) e (B) Análise de Componentes Principais (PCA) com agrupamento hierárquico (HCPC) dos COVs foliares majoritários identificadas em folhas de *Annona neoinsignis* tratadas com auxinas (AIA, IBA e ANA) e ITAs (TIBA e NPA).....131

**Figura 7.** (A) Média (%) das classes e (B) Análise de Componentes Principais (PCA) com agrupamento hierárquico (HCPC) dos COVs foliares identificadas em folhas de *Annona neoinsignis* tratadas com auxinas (AIA, IBA e ANA) e ITAs (TIBA e NPA).....132



## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

**Table 1.** Concentration of total alkaloids ( $\mu\text{g g}^{-1}$  dry mass) in ungrafted *Annona emarginata* roots and grafted with *Annona atemoya* submitted to treatment with indoleacetic acid (IAA), indole butyric acid (IBA) and naphthalene acetic acid (NAA) at three collection times (8, 14 and 20 days after treatments—DAT).....32

**Table 2.** Concentration of total alkaloids ( $\mu\text{g g}^{-1}$  dry mass) in ungrafted *Annona emarginata* leaves and atemoya leaves (grafted plants) submitted to treatment with IAA, IBA and NAA at three collection times (8, 14 and 20 DAT).....34

**Table 3.** Alkaloids identified in ungrafted *Annona emarginata* and *Annona emarginata* grafted with *Annona atemoya*.....36

### Supplementary Materials – Capítulo I

**Table S1.** Profile of identified alkaloids present in roots and leaves of ungrafted *Annona emarginata* and *A. emarginata* grafted with *Annona atemoya* treated with indole acetic acid (IAA), indole butyric acid (IBA) and naphthalene acetic acid (NAA).....57

### Capítulo II

**Tabela 1.** Alcaloides identificados em raízes e folhas de *A. crassiflora*.....93

### Material Suplementar – Capítulo II

**Tabela S1.** Dados utilizados na análise de PCA baseados nas intensidades dos picos obtidos entre 150 e 500  $m/z$ , após a seleção dos íons pares com mais de 5% de abundância relativa comparado ao pico de maior intensidade.....105

### Capítulo III

**Tabela 1.** Composição química (%) dos compostos orgânicos voláteis (COVs) foliares de *Annona emarginata* tratada com auxinas (ácido indolacético - AIA, ácido indolbutírico -IBA e ácido naftalenoacético – ANA) e inibidores de transporte de auxina - ITAs (ácido 2,3,5-Triodobenzoico - TIBA e ácido 1-N-naftilphtalâmico – NPA).....119

**Tabela 2.** Composição química (%) dos compostos orgânicos voláteis foliares de *Annona crassiflora* tratada com auxinas (AIA, IBA e ANA) e ITAs (TIBA e NPA).....120

**Tabela 3.** Composição química (%) dos COVs foliares de *Annona neoinsignis* tratada com auxinas (AIA, IBA e ANA) e ITAs (TIBA e NPA).....121



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	16
1.1. Família Annonaceae e gênero <i>Annona</i> : principais características e importância .....	16
1.2. Quimiodiversidade das espécies de <i>Annona</i> .....	18
1.3. Ação das auxinas na modulação do metabolismo especializado .....	20
2. OBJETIVOS .....	22
3. REFERÊNCIAS .....	22
4. CAPÍTULO I – Effect of Auxins on the Accumulation of Alkaloids in Ungrafted <i>Annona emarginata</i> (Schltdl.) H. Rainer and <i>Annona emarginata</i> (Schltdl.) H. Rainer Grafted with <i>Annona atemoya</i> Mabb. ....	29
Resumo .....	30
4.1. Introduction .....	30
4.2. Results .....	32
4.2.1. Concentration of Total Alkaloids .....	32
4.2.2. Alkaloid Profile by DI-MS and Chemometric Analysis .....	35
4.3. Discussion .....	42
4.4. Materials and Methods .....	45
4.4.1. Plant Material .....	45
4.4.2. Experimental Design .....	46
4.4.3. Application of Plant Growth Regulators .....	46
4.4.4. Quantitative and Qualitative Analyses of Alkaloids .....	47
4.4.4.1. Obtaining Total Alkaloid Extracts and Quantification .....	47
4.4.4.2. Analysis of the Alkaloid Profile by DI-MS .....	47
4.4.5. Data Analysis .....	48
4.5. Conclusions .....	48
4.6. References .....	51
4.7. Supplementary Materials .....	57
Comprovante de publicação do capítulo I.....	82
5. CAPÍTULO II – Modulação de alcaloides por auxinas e seus inibidores de transporte em <i>Annona crassiflora</i> Mart. ....	83
Resumo .....	84
5.1. Introdução .....	84
5.2. Metodologia .....	86
5.2.1. Material vegetal e delineamento experimental .....	86
5.2.2. Aplicação dos reguladores vegetais .....	87
5.2.3. Extração e quantificação de alcaloides totais .....	87
5.2.4. Perfil de alcaloides por DI-MS .....	87
5.2.5. Análise dos dados .....	88
5.3. Resultados e Discussão .....	88
5.3.1 Alcaloides totais .....	89
5.3.2 Identificação dos alcaloides por DI-MS .....	92
5.3.3 Ação das auxinas e seus inibidores de transporte no perfil de alcaloides .....	96
5.4 Conclusão .....	99



5.5 Referências .....	99
5.6. Material Suplementar .....	105
6. CAPÍTULO III – Impacto das auxinas e seus inibidores de transporte na composição de voláteis foliares de <i>Annona</i> .....	113
Resumo .....	114
6.1. Introdução .....	114
6.2. Metodologia .....	116
6.2.1. Obtenção do material vegetal e delineamento experimental .....	116
6.2.2. Aplicação das auxinas e ITAs .....	117
6.2.3. Captura dos voláteis foliares e identificação dos compostos .....	117
6.2.4. Análise de dados .....	118
6.3. Resultados e discussão .....	119
6.3.1. Caracterização química dos compostos orgânicos voláteis (COVs) foliares nas espécies de <i>Annona</i> .....	119
6.3.2. Efeito das auxinas e seus inibidores de transporte no perfil dos COVs foliares .....	122
6.4. Conclusão .....	133
6.5. Referências .....	134
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	138

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1. Família Annonaceae e gênero *Annona*: principais características e importância

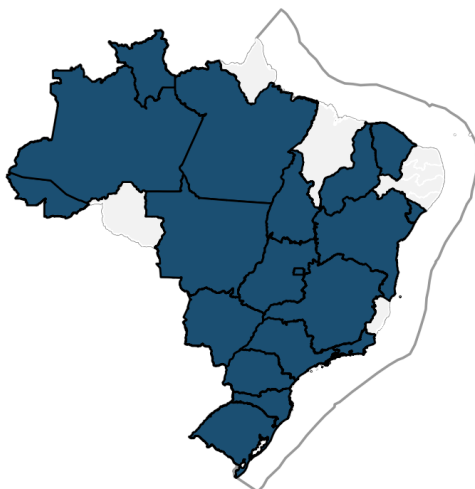
A família Annonaceae possui cerca de 108 gêneros e 2.503 espécies identificadas (Chatrou et al., 2012a, 2012b, 2018; Nge et al., 2024), sendo considerada a maior família da ordem Magnoliales com presença marcante em ecossistemas de florestas tropicais. A riqueza de espécies e abundância de indivíduos faz com que a família seja considerada ecologicamente e economicamente importante. As anonáceas estão amplamente distribuídas pelo Brasil, contando com 389 espécies pertencentes a 32 gêneros, dentre eles o gênero *Annona*, que se destaca no país onde são encontradas 80 espécies (24 endêmicas) das 162 identificadas globalmente no gênero (Mendes-Silva et al., 2025; WFO, 2025).

As espécies do gênero *Annona* ocorrem na forma de árvores ou arbustos, com tricomas simples, estrelados ou furcados. Suas folhas apresentam nervura primária impressa, plana ou proeminente na face adaxial. As flores são geralmente bissexuais, terminais ou axilares, solitárias ou com poucas inflorescências, podem apresentar duas brácteas por flor, com sépalas valvares, livres ou conatas na base, espessas, carnosas, de coloração branca, amarela, alaranjada ou vermelha. As pétalas podem estar ausentes ou, quando presentes (de três a seis), as externas são valvares, livres ou conatas podendo formar uma estrutura em forma de pá ou hélice, e as internas valvares e geralmente rudimentares. Apresentam numerosos estames. Os seus frutos são sincárpicos, resultantes da concrecência de numerosos carpelos livres ou conatos em uma estrutura carnosa. Apresentam numerosas sementes elipsoides e amplamente ovoides, sem arilo ou com arilo rudimentar (Mendes-Silva et al., 2025; Vinay; Sakthivel; Priyanka, 2017).

Espécies nativas de diferentes biomas brasileiros como a *Annona emarginata* nativa da Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal; *Annona crassiflora* nativa da Floresta Amazônica, Cerrado, Pantanal; *Annona neoinsignis* nativa da Floresta Amazônica, e espécies introduzidas no Brasil como a *Annona atemoya* cultivada nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste (Figura 1), se destacam no País e são relevantes para a manutenção da biodiversidade e economia local e foram selecionadas como espécies alvo desse estudo.

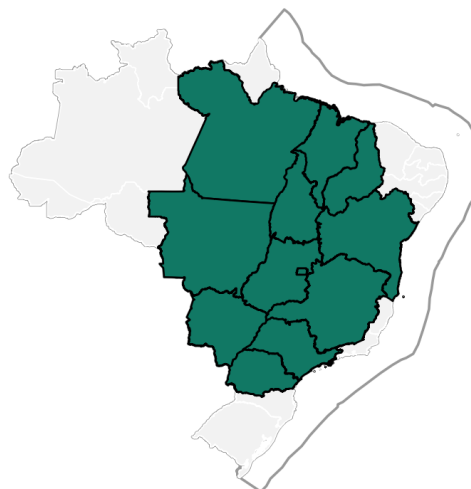
A) *Annona emarginata*

Nativa



B) *Annona crassiflora*

Nativa



C) *Annona neoinsignis*

Nativa



D) *Annona atemoya*

Cultivada

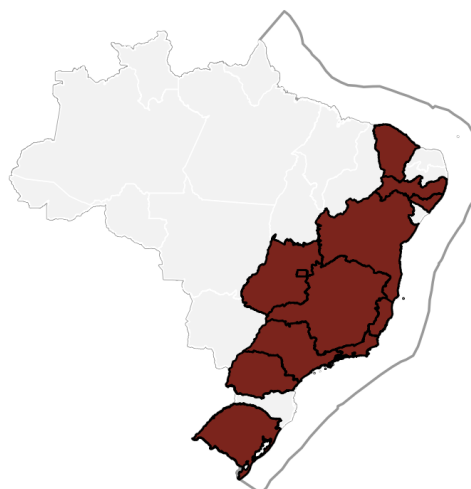


Figura 1. Ocorrência das espécies-alvo desse estudo, nativas e cultivadas, do gênero *Annona* no Brasil: *Annona emarginata* (A), *Annona crassiflora* (B), *Annona neoinsignis* (C) e *Annona atemoya* (D) (Lemos, 2014; Mendes-Silva et al., 2025)

Além da diversidade de espécies no Brasil, as espécies do gênero também se destacam pela sua relevância socioeconômica devido a produção de frutos in natura e alimentos processados, alvos crescentes para os comércios interno e externo (Lemos, 2014; São José et al., 2014). A popularização das espécies de *Annona* na fruticultura ocorre devido a suas



- ENDERS, Tara A.; STRADER, Lucia C. Auxin activity: Past, present, and future. *American Journal of Botany*, v. 102, n. 2, p. 180–196, fev. 2015.
- FOURNIER, Gilbert; LEBOEUF, Michel; CAVÉ, André. Annonaceae Essential Oils: A Review. *Journal of Essential Oil Research*, v. 11, n. 2, p. 131–142, mar. 1999.
- GAO, Chenxi *et al.* Integrated Volatile Metabolomics and Transcriptomics Analyses Revealed the Regulatory Mechanism of Aroma Compound Synthesis Induced by Microenvironmental Changes in Purple Tea Leaves. *Plant, Cell & Environment*, v. 48, n. 10, p. 7168–7185, 17 out. 2025.
- GELDNER, Niko *et al.* Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, v. 413, n. 6854, p. 425–428, set. 2001.
- HAMMES, Ulrich Z.; MURPHY, Angus S.; SCHWECHHEIMER, Claus. Auxin Transporters—A Biochemical View. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 14, n. 2, 1 mar. 2022.
- JAMWAL, Komal; BHATTACHARYA, Sujata; PURI, Sunil. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, v. 9, p. 26–38, 1 maio 2017.
- JAN, Rahmatullah *et al.* Plant Secondary Metabolite Biosynthesis and Transcriptional Regulation in Response to Biotic and Abiotic Stress Conditions. *Agronomy*, v. 11, n. 5, p. 968, 13 maio 2021.
- KASSAMBARA, Alboukadel; MUNDT, Fabian. factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. *CRAN: Contributed Packages*, 26 abr. 2016.
- KE, Yanguo *et al.* Auxin-mediated regulation of volatile organic compounds in plants. *Horticultural Plant Journal*, set. 2025.
- KHAN, M. Masroor A.; QUASAR, Naushin; AFREEN, Resalat. Nanotized form of indole acetic acid improve biochemical activities, the ultrastructure of glandular trichomes and essential oil production in *Ocimum tenuiflorum* L. *Industrial Crops and Products*, v. 193, 1 mar. 2023.
- LÊ, Sébastien; JOSSE, Julie; HUSSON, François. FactoMineR : An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*, v. 25, n. 1, 2008.
- LEBOEUF, M. *et al.* The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, v. 21, n. 12, p. 2783–2813, 1982.
- LEMOS, Eurico Eduardo Pinto de. A produção de anonáceas no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 36, n. spe1, p. 77–85, 2014.



- MA, Qian; GRONES, Peter; ROBERT, Stéphanie. Auxin signaling: a big question to be addressed by small molecules. *Journal of Experimental Botany*, v. 69, n. 2, p. 313–328, 4 jan. 2018.
- MENDES-SILVA, I. *et al.* *Annona* in Flora e Funga do Brasil. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB110235>>. Acesso em: 9 dez. 2025.
- MIMI, C. O. *et al.* Chemophenetics as a Tool for Distinguishing Morphotypes of *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer. *Chemistry and Biodiversity*, v. 18, n. 10, 2021.
- MONFORT, Lucila Elizabeth Fragoso *et al.* Effects of plant growth regulators, different culture media and strength MS on production of volatile fraction composition in shoot cultures of *Ocimum basilicum*. *Industrial Crops and Products*, v. 116, p. 231–239, 1 jun. 2018.
- MUSAZADE, Elshan; MRISHO, Isack Ibrahim; FENG, Xianzhong. Auxin metabolism and signaling: Integrating independent mechanisms and crosstalk in plant abiotic stress responses. *Plant StressElsevier B.V.*, , 1 dez. 2025.
- PANG, Zhiqiang *et al.* MetaboAnalyst 6.0: towards a unified platform for metabolomics data processing, analysis and interpretation. *Nucleic Acids Research*, v. 52, n. W1, p. W398–W406, 5 jul. 2024.
- PARMOON, Ghasem *et al.* Effect of Exogenous Application of Several Plant Growth Regulators on Photosynthetic Pigments of Fennel Plants. *Not Sci Biol*, v. 10, n. 4, p. 508–515, 2018.
- PINTO-ZEVALLOS, Delia M. *et al.* Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. *Química Nova*, v. 36, n. 9, p. 1395–1405, 2013.
- PRINS, Cláudia L.; VIEIRA, Ivo J. C.; FREITAS, Silvério P. Growth regulators and essential oil production. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 22, n. 2, p. 91–102, 2010.
- R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2025. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 4 dez. 2025
- RIBEIRO, Yrexam Rodrigues de Souza *et al.* 2,3,5-triiodobenzoic acid affects the in vitro propagation of *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) through alterations in endogenous polyamine and indol-3-acetic acid levels and the proteomic profile. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 156, n. 1, p. 25, 14 jan. 2024.
- ROCHA, Giovanna Nogueira da Silva Avelino Oliveira *et al.* Phytochemicals and biological properties of *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae): A systematic review from 1971 to 2020. *Chemico-Biological Interactions*, v. 336, p. 109390, 25 fev. 2021.
- SÃO JOSÉ, Abel Rebouças *et al.* Atualidades e perspectivas das Anonáceas no mundo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 36, n. spe1, p. 86–93, 2014.



- SIQUEIRA, Carlos A. T. *et al.* Chemical constituents of the volatile oil from leaves of *Annona coriacea* and in vitro antiprotozoal activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 21, n. 1, p. 0–0, fev. 2011.
- SIRENA, J. T. *et al.* Chemical Composition of the Essential Oil from *Annona crassiflora*. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 50, n. 3, p. 543–544, 18 jul. 2014.
- SLOWIKOWSKI, Kamil. ggrepel: Automatically Position Non-Overlapping Text Labels with “ggplot2”. CRAN: Contributed Packages, 9 jan. 2024. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=ggrepel>>
- SOUSA, Marília Caixeta *et al.* Plant growth regulators induce differential responses on primary and specialized metabolism of *Annona emarginata* (Annonaceae). *Industrial Crops and Products*, v. 189, p. 115789, 1 dez. 2022.
- SOUZA, Melissa P. *et al.* Essential Oil from the Leaves of *Annona neoinsignis* H. Rainer (Annonaceae) Against Liver Cancer: In Vitro and In Vivo Studies. *Molecules*, v. 30, n. 14, 1 jul. 2025.
- SUDRIÁ, C. *et al.* Effect of Benzyladenine and Indolebutyric Acid on Ultrastructure, Glands Formation, and Essential Oil Accumulation in *Lavandula dentata* Plantlets. *Biologia plantarum*, v. 44, n. 1, p. 1–6, 1 mar. 2001.
- TOBARUELA, Eric de Castro *et al.* Ethylene and Auxin: Hormonal Regulation of Volatile Compound Production During Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Fruit Ripening. *Frontiers in Plant Science*, v. 12, 10 dez. 2021.
- VAN DEN DOOL, H.; DEC. KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 11, n. C, p. 463–471, 1963.
- WANG, Junfang *et al.* Impact of hormone applications on ripening-related metabolites in Gewürztraminer grapes (*Vitis vinifera* L.): The key role of jasmonates in terpene modulation. *Food Chemistry*, v. 388, 15 set. 2022.
- WELLER, Benjamin *et al.* Dynamic PIN-FORMED auxin efflux carrier phosphorylation at the plasma membrane controls auxin efflux-dependent growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 114, n. 5, p. E887–E896, 31 jan. 2017.
- WFO. *Annona* L. Disponível em: <<http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-4000002240>>. Acesso em: 9 dez. 2025.
- WICKHAM, Hadley. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. 2. ed. Cham: Springer Cham, 2016.
- ZOU, Minxia; REN, Haiyun; LI, Jiejie. An Auxin Transport Inhibitor Targets *Villin*-Mediated Actin Dynamics to Regulate Polar Auxin Transport. *Plant Physiology*, v. 181, n. 1, p. 161–178, 1 set. 2019.