

Diversidade de alcaloides e atividade antifúngica de acessos de
Annona emarginata (Schltdl.) H. Rainer usados para enxertia de
Annona x atemoya Mabb. (atemoia)

GUSTAVO CABRAL DA SILVA

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:
Fisiologia e Bioquímica Vegetal.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Diversidade de alcaloides e atividade antifúngica de acessos de
Annona emarginata (Schltdl.) H. Rainer usados para enxertia de
Annona x atemoya Mabb. (atemoia)

GUSTAVO CABRAL DA SILVA

PROF^a DR^a GISELA FERREIRA

PROF. DR. MARIANO MARTÍNEZ-VÁZQUEZ

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:
Fisiologia e Bioquímica Vegetal.

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

Silva, Gustavo Cabral da.

Diversidade de alcaloides e atividade antifúngica de
acessos de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer usados para
enxertia de *Annona* x *atemoya* Mabb. (atemoia)
/ Gustavo Cabral da Silva. - Botucatu, 2022

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

Orientador: Gisela Ferreira

Coorientador: Mariano Martínez-Vázquez

Capes: 20303009

1. Anonacea. 2. Porta-enxertos. 3. Atividade antifúngica.
4. Alcalóides.

Palavras-chave: Annonaceae; Antracnose; Bioatividade;
Liriodenina; Porta-enxerto.

Dedico,

À minha amada mãe, Adaize Cabral da Silva, meu maior porto seguro.

“Olhar para trás após uma longa caminhada pode fazer perder a noção da distância que percorremos, mas se nos detivermos em nossa imagem, quando a iniciamos e ao término, certamente nos lembraremos o quanto nos custou chegar até o ponto final, e hoje temos a impressão de que tudo começou ontem. Não somos os mesmos, mas sabemos mais uns dos outros. E é por esse motivo que dizer adeus se torna complicado! Digamos então que nada se perderá. Pelo menos dentro da gente...”

João Guimarães Rosa

“A lua anda devagar, mas atravessa o mundo”

Mia Couto

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe Adaize Cabral da Silva por me apoiar em todas as minhas escolhas, por todo esforço para me garantir bons estudos e o tão sonhado ingresso na Universidade Pública. Agradeço por confiar em mim, no meu esforço, e me dar todo o amor e carinho do mundo. À minha irmã Yasmim da Silva Souza agradeço por estar presente nas nossas vidas, você chegou pouco tempo antes d'eu me despedir de vocês e me aventurar em Botucatu, mas foi essencial para continuar a garantir o amor e o carinho que minha mãe tanto precisava. A vocês duas agradeço por aguardarem o meu retorno, vocês são meu porto seguro.

Agradeço ao meu pai por acreditar em mim e na minha escolha profissional, você contribuiu fortemente com a minha formação. À minha avó paterna Josefa Maria da Silva e ao meu avô materno José Cabral da Silva, que mesmo distantes estiveram sempre presentes em meu coração.

Agradeço aos amigos da República Ressaca, minha segunda família e fiéis escudeiros Emerson (Pipoka), Abner (Gabarro), Lycia (Brack Broc), Lucas (Mano), Philipe (Netinho), João Paulo (Muié), Alexandre (Dino), Filipe (Bad), Thiago (Pikeno), Leonardo (Baile), Vinícius (Fagá), Adriano (Spoke), Bruno Luiz (Habbudo), André (Zé), João Vitor (Xuliana) e (Ice Blue), vocês foram fundamentais e contribuíram demais para a minha formação pessoal e profissional, agradeço pelo excelente convívio, trocas de conhecimentos, companheirismo e risadas. Agradeço à minha dupla de amigos e agregados da Ressaca, Eduardo (Xuxa) e Victor (Raladin) por estaremos presentes em todos os maiores e melhores momentos de Botucatu.

Agradeço ao meu trio de amigas Ana Carolina (Sorriso), Larissa (Sei Nada) e Giovana (Ninfa). Vocês foram essenciais para a minha formação. À Sorriso por ser a minha fiel dupla e parceira de graduação, pelas várias caronas oferecidas, agradeço por estar sempre ao meu lado, seja nos horários de aulas, ou fora dos horários de aula e por proporcionar momentos inesquecíveis os quais eu jamais esquecerei. À Sei Nada por nunca desistir de mim, nos piores e melhores momentos você sempre estava ao meu lado, agradeço por criar tantos entretenimentos de qualidade nas nossas vidas (rsrs). À Ninfa por sempre nos salvar em diversas provas e trabalhos, pelos almoços oferecidos nas casas dos seus pais, pelas trocas de conhecimentos e leituras e por ser o orgulho do nosso trio.

Agradeço aos amigos da empresa JM Bioanálises, Sorriso, Gilmar (Mórula), Tamiris Paschoal, Thiago Lizier, Mariá Del Bianco e Inácia Botelho por tornarem os meus dias mais leves e pelos melhores cafés de todas as manhãs e todas as risadas durante os meus 3 anos de empresa. Vocês me enriqueceram de conhecimentos e contribuíram para a minha formação profissional.

Agradeço aos meus amigos de UNESP e Botucatu Natália (Manjar), Bruna (Violenta), Amanda (Atakda), Ana Luisa (Scar), Sávio (Massacration), Amanda (Xuxana), Marina (Tô Sussa), Romário (Carioca), Karina (Pingente), Evandro, Guto, Mônica, Háley, Bruna e Monique. Saibam que carrego um pedacinho de cada um de vocês dentro de mim.

Agradeço ao meu primeiro orientador Professor Doutor Erick José Ramo da Silva, por toda troca de conhecimentos, conversas, apoio e confiança desde o início da minha formação acadêmica. Me orgulho de ter sido um de seus primeiros orientados e do profissional o qual eu me tornei a partir de seus ensinamentos. Ao meu amigo Alan (Gillete), que além de dividir a mesma turma de graduação, também compartilhou a mesma orientação (Prof. Dr. Erick), agradeço por todos os conselhos e por me motivar a querer sempre mais e jamais desistir dos nossos objetivos.

Agradeço a minha orientadora Professora Doutora Gisela Ferreira pelos quase 4 anos de parceria, amizade, apoio, dedicação e por acreditar e confiar no meu trabalho. Agradeço também pela liberdade de criar e inovar projetos os quais me desafiavam mas que ao mesmo tempo me enriqueciam. Me sinto realizado pela minha escolha e pela conclusão deste trabalho, tendo a certeza de que fiz a escolha certa.

Agradeço ao meu coorientador Professor Doutor Mariano Martínez-Vázquez pela disponibilidade e profissionalismo e por ser sempre prestativo nos momentos que precisei.

Agradeço aos amigos de pós graduação, em especial Ana Beatriz por tornar nossos dias de laboratório mais leve, sempre alegrando as minhas manhãs e tardes. Ao Professor Doutor Felipe Giroto por toda troca de conhecimento e discussões científicas.

Agradeço ao Professor Doutor Iván De la-Cruz-Chacón por todas as aulas e cursos ministrados, e por contribuir com a minha formação profissional. Saiba que os seus ensinamentos foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Agradeço a Doutora Livia Macedo Dutra, Professor Doutor Felipe Moura Araujo da Silva e Professor Doutor Ricardo Harakava pela disponibilidade e paciência em me ajudar em todos os momentos deste trabalho. Vocês contribuíram fortemente e tiveram papel fundamental nos resultados deste trabalho.

Agradeço a Professora Doutora Carmen Sílvia Fernandes Boaro e Professora Doutora Elisabeth Orika Ono, por concederem espaço em seus laboratórios para a realização deste trabalho.

Agradeço aos professores que fizeram parte da banca de qualificação e defesa de mestrado por toda contribuição ao trabalho e discussões científicas.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88887.496397/2020-00.

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	15
3. CAPÍTULO I: Revisão da literatura	15
3.1. Família Annonaceae Juss	15
3.2. Gênero <i>Annona</i> L.....	16
3.2.1. <i>Annona emarginata</i> (Schltdl.) H. Rainer	18
3.2.2. <i>Annona x atemoya</i> Mabb	19
3.3. Metabolismo especializado	20
3.3.1. Alcaloides e o gênero <i>Annona</i>	22
3.4. Fungos fitopatogênicos e o gênero <i>Annona</i>	25
3.4.1. <i>Colletotrichum</i> spp	26
3.5. Porta-enxertos de <i>Annona</i>	27
3.6. Referências Bibliográficas	28
RESUMO.....	39
ABSTRACT	41
4.1. Introdução.....	43
4.2. Material e métodos.....	45
4.2.1. Material vegetal e delineamento experimental	45
4.2.2. Teste de germinação.....	46
4.2.3. Teste preliminar para obtenção de maior diversidade de alcaloides	46
4.2.4. Extração e quantificação de alcaloides totais	47
4.2.5. Análise por ESI-MS dos extratos de <i>Annona</i> spp. e tratamento quimiométrico dos dados	47
4.2.6. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	48
4.2.7. Análises quimiométricas.....	49
4.2.8. Teste de bioatividade.....	49
4.2.9. Análise dos resultados.....	50
4.3. Resultados e discussão.....	51
4.3.1. Teste de germinação.....	51
4.3.2. Teste de pH para obtenção de maior diversidade de alcaloides	52
4.3.3. Quantificação de alcaloides totais	54
4.3.4. Análise por ESI-MS das frações alcaloídicas e tratamento quimiométrico dos dados	55

4.3.5.	Perfil espectral das folhas e raízes de indivíduos jovens e adultos de <i>Annona emarginata</i>	59
4.3.6.	Metabólitos identificados nas folhas e raízes de indivíduos jovens e adultos de <i>Annona emarginata</i>	62
4.3.7.	Metabólitos identificados em indivíduos adultos de <i>Annona x atemoya</i> enxertada em <i>A. emarginata</i>	71
4.3.8.	Análises quimiométricas.....	72
4.3.8.1.	Análise de componentes principais (PCA) das amostras de <i>Annona emarginata</i>	72
4.3.8.2.	Análise de componentes principais (PCA) das amostras de indivíduos adultos de <i>Annona emarginata</i> e <i>Annona x atemoya</i> enxertada em <i>A. emarginata</i>	75
4.3.9.	Teste de bioatividade.....	79
4.4.	Conclusão	82
4.5.	Referências bibliográficas	82
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
6.	APÊNDICES	88

SILVA, G. C. DA. Diversidade de alcaloides e atividade antifúngica de acessos de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer usados para enxertia de *Annona x atemoya* Mabb. (atemoia). 2022. 91 p. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP) - INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU (IBB-UNESP).

RESUMO - A diversidade de organismos vegetais no ambiente terrestre confere características próprias a cada espécie, que têm forte influência do metabolismo especializado das plantas, que pode ser modulado por fatores bióticos ou abióticos. Espécies da família Annonaceae sintetizam diversas moléculas do metabolismo especializadas como os alcaloides, que apresentam atividades biológicas e possuem importante papel nas funções fisiológicas, ecológicas e/ou evolutivas. O araticum de terra-fria (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer “terra-fria”) é considerado tolerante a patógenos, sendo utilizado como porta-enxerto para a atemoia (*Annona x atemoya* Mabb.), que apresenta suscetibilidade. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi encontrar diferenças na produção de alcaloides em acessos (indivíduos) de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer morfotipo ‘terra-fria’, a fim de selecionar porta-enxertos que apresentem tolerância a estresses bióticos, como aos fungos *Colletotrichum fructicola* e *C. theobromicola* causadores de antracnose em *Annona*, para que componham pomar de matrizes para a copa atemoia (*Annona x atemoya* Mabb.). Os alcaloides foram obtidos de plantas jovens (mudas) e adultas de 8 acessos de *Annona emarginata* (pé franco) e plantas adultas de *Annona x atemoya* enxertadas em *Annona emarginata*. A identificação foi realizada por espectroscopia de RMN (¹H, ¹³C, COSY, HSQC e HMBC), espectrometria de massa (ESI-MS) e comparação de dados da literatura. A fim de avaliar capacidade reprodutiva dos acessos foram realizados testes de germinação. Os extratos alcaloidais foram utilizados em teste de bioatividade em cepas de *Colletotrichum fructicola* e *C. theobromicola*. Os testes de germinação permitiram selecionar acessos 2 e 4, com maior germinabilidade. Os acessos com maior concentração de alcaloides totais nas raízes foram 5 e 7. Entre os acessos foram detectados os alcaloides anonaína, asimilobina, liriodenina, nornuciferina, lisicamina, xylopina, oxoxylopina e reticulina. A abundância dos alcaloides anonaína e liriodenina foi maior em indivíduos jovens e a reticulina foi maior em indivíduos adultos. Os alcaloides lisicamina, nornuciferina e oxoxylopina foram reportados pela primeira vez para a espécie *Annona emarginata*. Os testes biológicos tiveram respostas promissoras, as raízes dos acessos 1, 2, 4, 5, 7 e controle (jovens), 2-7 e controle (adultos) de *Annona emarginata* e adultos de *Annona x atemoya* inibiram a atividade do fungo *C. fructicola*. Os acessos 2, 4 e 5 (jovens), 2 e controle (adultos) de raízes de *Annona emarginata* inibiram a atividade do fungo *C. theobromicola*. A partir dos resultados podemos concluir que o perfil de alcaloides não apresentou diferenças entre os acessos de *Annona emarginata*, porém

a espécie se mostrou promissora na bioprospecção de novas moléculas, bem como seus efeitos bioativos.

Palavras chave: Annonaceae, Antracnose, Bioatividade, Liriodenina e Porta-enxerto.

SILVA, G. C. DA. Alkaloid diversity and antifungal activity of accessions of *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer used for grafting of *Annona x atemoya* Mabb. (atemoia). 2022. 91 p. MASTER'S DISSERTATION – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP) - BOTUCATU BIOCENCES INSTITUTE (IBB-UNESP).

ABSTRACT - The diversity of plant organisms in the terrestrial environment gives each species its own characteristics, which are strongly influenced by the specialized metabolism of plants, which can be modulated by biotic or abiotic factors. Species of the Annonaceae family synthesize several specialized metabolism molecules such as alkaloids, which have biological activities and play an important role in physiological, ecological and/or evolutionary functions. The terra-fria araticum ([*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer “terra-fria”]) is considered tolerant to pathogens, being used as a rootstock for atemoya (*Annona x atemoya* Mabb.), which has susceptibility. Thus, the objective of this work was to find differences in alkaloid production in accessions (individuals) of *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer morphotype 'terra-fria', in order to select rootstocks that present tolerance to biotic stresses, as well as to the fungi *Colletotrichum fructicola* and *C. theobromicola* that cause anthracnose in *Annona*, to compose a matrix orchard for the atemoya canopy (*Annona x atemoya* Mabb.). The alkaloids were obtained from young (seedlings) and adult plants of 8 accessions of *Annona emarginata* (franco foot) and adult plants of *Annona x atemoya* grafted onto *Annona emarginata*. Identification was performed by NMR spectroscopy (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC and HMBC), mass spectrometry (ESI-MS) and comparison of literature data. In order to evaluate the reproductive capacity of the accessions, germination tests were carried out. The alkaloid extracts were used in a bioactivity test in strains of *Colletotrichum fructicola* and *C. theobromicola*. The germination tests allowed the selection of accessions 2 and 4, with greater germinability. The accessions with the highest concentration of total alkaloids in the roots were 5 and 7. Among the accessions, the alkaloids anonaine, asimilobin, liriodenine, nornuciferine, lysicamine, xylopine, oxoxylopine and reticulín were detected. The abundance of anonaine and liriodenine alkaloids was higher in young individuals and reticulín was higher in adults. The alkaloids lysicamine, nornuciferine and oxoxylopine were reported for the first time for the species *Annona emarginata*. Biological tests had promising responses, the roots of accessions 1, 2, 4, 5, 7 and control (young), 2-7 and control (adults) of *Annona emarginata* and adults of *Annona x atemoya* inhibited the activity of the fungus *C. fructicola*. Accessions 2, 4 and 5 (young), 2 and control (adults) of *Annona emarginata* roots inhibited the activity of the fungus *C. theobromicola*. From the results we can conclude that the alkaloid profile did not show differences between the accessions of *Annona emarginata*, but the species showed promise in the bioprospecting of new

molecules, as well as their bioactive effects.

Key words: Annonaceae, Anthracnose, Bioactivity, Liriodenine and Rootstock.

1. INTRODUÇÃO

A variabilidade existente entre os organismos vegetais apresenta importante cenário a ser explorado, especialmente no que se refere a moléculas sintetizadas pelo metabolismo especializado. Metabólitos especializados possuem características e especificidades próprias, sendo muitas vezes associados à defesa das plantas, protegendo-as de invasões de patógenos, assegurando a sua manutenção e sobrevivência no ambiente (KROYMANN, 2011; PICHERSKY; LEWINSOHN, 2011).

Dentre a diversidade de espécies vegetais que sintetizam metabólitos especializados, a família Annonaceae tem grande importância. Além de serem economicamente importantes, devido à produção e comercialização de frutos, as espécies do gênero *Annona* têm sido bastante utilizadas na investigação fitoquímica, revelando a presença de metabólitos especializados, como os alcaloides (DE-LA-CRUZ-CHACÓN *et al.*, 2019; HONÓRIO *et al.*, 2021; SOUSA *et al.*, 2019). Em espécies como *Annona crassiflora*, *Annona macrophyllata* ($\equiv$ *Annona diversifolia*) e *Annona purpurea* foram identificados alcaloides como a anonaína, anoretina, xilopina, tetrahidropalmatrubina, estefalagina, talifolina, lirinidina, liriodenina, entre outros (DE-LA-CRUZ-CHACÓN *et al.*, 2019; DE LA CRUZ CHACÓN; GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2012; HONÓRIO *et al.*, 2021; PEÑA-HIDALGO *et al.*, 2021).

Cabe observar que embora as várias espécies da família Annonaceae sejam ricas em metabólitos especializados, diversas apresentam suscetibilidade a pragas e doenças que afetam raízes, caules, folhas, flores e frutos, como por exemplo a atemoia (*Annona x atemoya*) que é suscetível aos fungos causadores da antracnose (*Colletotrichum* spp.), sendo responsáveis por perdas todos os anos na produção agrícola (BASHA; BEGUM; RAGHAVENDRA, 2014; JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 2014).

Dessa forma o uso de porta-enxertos tolerantes ao ataque de pragas e doenças representa alternativa para reduzir os prejuízos em espécies dessa família (ZACARONI *et al.*, 2014). A *Annona emarginata* tem sido bastante utilizada como porta-enxerto para *Annona x atemoya* devido a sua tolerância a pragas e doenças, além de apresentar adaptações ambientais, especialmente quanto a estresse por restrição hídrica (BETTIOL NETO *et al.*, 2006; MANTOAN *et al.*, 2016). Neste contexto, encontrar variações no perfil de alcaloides em diferentes espécies ou acessos que estejam relacionadas à tolerância a patógenos, permitirá a obtenção de matrizes mais adequadas para a produção de mudas, além da identificação de metabólitos específicos da relação patógeno-hospedeiro.

Neste contexto, considerando-se a importância do metabolismo especializado na prospecção de moléculas bioativas e na compreensão de processos fisiológicos relacionados a

mecanismos de defesa das plantas e a possibilidade de associação destes conhecimentos na prática de produção de mudas de qualidade, foi desenvolvido este trabalho com o objetivo de encontrar diferenças na produção de alcaloides em acessos (indivíduos) de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer morfotipo ‘terra-fria’, a fim de selecionar porta-enxertos para compor plantio de matrizes para a copa atemoia (*Annona x atemoya* Mabb.) e que apresentem tolerância a estresses bióticos, como aos fungos *Colletotrichum fructicola* e *C. theobromicola*. Nossa hipótese é de que as espécies tolerantes (*Annona emarginata*) apresentam diferenças químicas no perfil de alcaloides, quando comparadas a espécies suscetíveis (*Annona x atemoya*) bem como efeito inibitório contra cepas de *Colletotrichum fructicola* e *C. theobromicola*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Encontrar diferenças na produção de alcaloides em acessos (indivíduos) de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer morfotipo ‘terra-fria’, a fim de selecionar porta-enxertos para compor plantio de matrizes para a copa atemoia (*Annona x atemoya* Mabb.) e que apresentem tolerância a estresses bióticos, como aos fungos *Colletotrichum fructicola* e *C. theobromicola*.

2.2. Objetivos específicos

Investigar as diferenças químicas no perfil de alcaloides entre *Annona emarginata* (tolerante) e *Annona x atemoya* (suscetível).

Analisar se extratos de alcaloides de *Annona emarginata* e *Annona x atemoya* apresentam atividade inibitória contra cepas de *Colletotrichum fructicola* e *C. theobromicola*.

Identificar se as diferenças no perfil de alcaloides de diferentes acessos de *Annona emarginata* permitem selecionar matrizeiros para a produção de porta-enxerto para atemoia.

3. CAPÍTULO I: Revisão da literatura

3.1. Família Annonaceae Juss.

A família Annonaceae possui cerca de 106 gêneros e 2430 espécies (CHATROU *et al.*, 2018) distribuídas de forma pantropical, sendo considerada uma das famílias de plantas mais diversas em termos de riqueza de espécies e abundância de indivíduos, desempenhando um

importante papel ecológico em termos de diversidade de espécies, especialmente em ecossistemas de florestas tropicais (CHATROU *et al.*, 2012; COUVREUR *et al.*, 2012; XUE *et al.*, 2018). Espécies da família Annonaceae podem ser encontradas em florestas tropicais e subtropicais, podendo ser classificadas em quatro subfamílias: Anaxagoreoideae, Ambavioideae, Annonoideae e Malmeoideae, e subdividir essas subfamílias em 14 tribos (CHATROU *et al.*, 2012; GUO *et al.*, 2017; LÚCIO *et al.*, 2015; XUE *et al.*, 2018). No Brasil, a família Annonaceae é representada por cerca de 29 gêneros e aproximadamente 370 espécies (SÁ *et al.*, 2019).

Dentre as principais características morfológicas que podemos citar para as espécies da família Annonaceae, destacam-se por serem em sua grande maioria árvores, arbustos e raramente lianas. Folhas simples, alternas, dísticas (exceto *Tetrameranthus*), margem inteira, estípulas ausentes, campilódroma ou broquidodroma. Flor solitária ou em inflorescência cimosa, axilar, extra-axilar, opositifolia, raramente terminal, ramiflora, cauliflora ou em ramo flageliforme, monoclina, raramente androdioica, actinomorfas, heteroclamídeas, sépalas 2, 3 ou 4, livres ou raramente conatas, valvares ou imbricadas, pétalas 6, raramente 3, 4, 8 ou 12, geralmente em ciclos, subiguais a bastante diferentes entre si, livres ou raramente conatas, valvares ou imbricadas, geralmente carnosas ou crassas; estames poucos a numerosos, espiralados, livres, conectivo dilatado em forma de disco, anteras rimosas, loceladas ou não, carpelos poucos a numerosos, livres ou soldados na base, raramente conatos, estaminódios raramente presentes, ovário súpero, carpelos muitos, raramente poucos, óvulos 1 a muitos, basais ou marginais. Fruto apocárpico ou sincárpico, carpídios deiscentes ou indeiscentes, sésseis ou estipitados, secos ou carnosos. Sementes às vezes ariladas, endosperma ruminado e embrião diminuto (LOBÃO *et al.*, 2020).

Dentre os 106 gêneros presentes na família, podemos citar, *Ambavia*, *Anaxagorea*, *Annona*, *Asimina*, *Duguetia*, *Guatteria*, *Sapranthus*, *Tetrameranthus*, *Uvaria*, *Xylopia*, entre muitos outros (CHATROU *et al.*, 2012). O gênero *Annona* é considerado um dos principais gêneros da família, devido a sua importância econômica.

3.2. Gênero *Annona* L.

O gênero *Annona* é considerado economicamente o mais importante da família, devido às suas propriedades alimentícias e medicinais (AL-GHAZZAWI, 2019; ANAYA-ESPARZA *et al.*, 2020; CHOWDHURY *et al.*, 2021; LEITE *et al.*, 2020; NUGRAHA *et al.*, 2019), sendo difundido nas Índias Ocidentais, Américas, África, Ilhas do Pacífico e Sudeste Asiático (NUGRAHA *et al.*, 2019). Este gênero inclui aproximadamente 162 espécies

(AL-GHAZZAWI, 2019; CHOWDHURY *et al.*, 2021) e no Brasil são encontradas 79 espécies aceitas, das quais 24 são endêmicas (MENDES-SILVA *et al.*, 2020a). A origem da palavra *Annona* é do latim e significa “colheita anual” (CHOWDHURY *et al.*, 2021; SÃO JOSÉ *et al.*, 2014).

Espécies do gênero *Annona* podem ser encontradas em forma de árvores, lianas, arbustos ou subarbustos. Folhas com nervura primária impressa, plana ou proeminente na face adaxial. Inflorescência supra-axilar, opositifolia, subaxilar ou terminal; uni a multiflora. Flor geralmente bissexual; sépalas 3, valvares, livres ou conatas na base; pétalas 3 ou 6, pétalas externas valvares, ou livres ou conatas na base ou completamente conatas formando estrutura em forma de pás do hélice na parte dorsal, pétalas internas valvares, raramente imbricadas, rudimentares ou não; estames numerosos, estaminódios ausentes, raramente presentes; carpelos numerosos livres ou conatos, óvulo 1, basal. Carpídios concrescidos em sincarpo carnoso, raramente carpídios livres e indeiscentes ou parcialmente concrescidos. Sementes numerosas, elipsoides a amplamente ovóides, sem arilo ou com arilo rudimentar (MENDES-SILVA *et al.*, 2020a).

Das espécies do gênero economicamente mais importantes e cultivadas, destacam-se as *Annona muricata* (graviola), *Annona x atemoya* Mabb. (atemoia), *Annona squamosa* (pinha ou fruta-do-conde) e *Annona cherimola* (cherimoia). No Brasil, inicialmente, apenas a pinha (*Annona squamosa*) e a graviola (*Annona muricata*) eram anonáceas populares na maioria dos Estados (LEMOS, 2014), porém com o passar dos anos, frutos de atemoia (*Annona x atemoya* Mabb.) e cherimoia (*Annona cherimola*) também passaram a ser economicamente rentáveis para a economia local. Outras espécies como *Annona crassiflora* (marolo) e *Annona coriacea* podem ser encontradas nos cerrados brasileiros, norte de Minas Gerais e oeste da Bahia e, apesar de não existirem cultivos comerciais, os frutos dessas duas espécies são colhidos extrativamente e comercializados em centros consumidores locais (SÃO JOSÉ *et al.*, 2014).

Muitas dessas espécies destacadas, inclusive as economicamente rentáveis ao país, necessitam de técnicas de cultivos mais adequadas para a sua produção, uma vez que, várias doenças podem afetar as folhas, ramos, raízes, flores e frutos da gravioleira, atemoieira e cherimoleira em diferentes etapas de seu desenvolvimento (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 2014). Neste contexto, o uso de porta-enxerto tolerantes como o araticum de terra-fria (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer “terra-fria”]), tem demonstrado bons resultados, sendo utilizado como porta-enxerto para *Annona x atemoya* Mabb. a qual é altamente suscetível e devido a isso a enxertia acaba sendo o método de propagação mais efetivo para a espécie (STENZEL; MURATA; NEVES, 2003). Isso faz com que ambas as espécies (araticum de terra-fria e atemoia) mereçam destaque quanto ao objetivo deste trabalho.

3.2.1. *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer

Annona emarginata (Schltdl.) H. Rainer, sinônimo de *Rollinia emarginata*, é nativa da América do Sul (MAAS *et al.*, 2001), podendo ser encontrada no Paraguai, Bolívia, Argentina e Brasil, atingindo porte de árvores com aproximadamente 15-18 metros (FÉVRIER *et al.*, 1999).

Pode ser encontrada em forma de arbusto ou árvore. Folhas glabras ou esparsamente adpresso-tomentosas em ambas as faces; pecíolo 2–15 mm; lâmina 1–14 × 1–9 cm, estreitamente elíptica, elíptica, lanceolada ou estreitamente ovada, ovada, obovada, ou circular, base cuneada, aguda a obtusa; nervação broquidódroma ou eucamptódroma. Inflorescência 1 – 3-flora, opositifolia, supra-axilar ou raramente axilar. Flores verdes, quando maduras se tornando amarelas à creme, com pedicelo 5–25 mm, bráctea 0,3–1,5 mm, triangular ou elíptica, sépalas 0,8–3,0 × 1,3–3,8 mm, elípticas à triangulares, gibosas ou não, pétalas externas em forma de pás do hélice, 3,5–18 × 2–16 × 0,5–1,0 mm, suborbiculares a orbiculares ou estreita a largamente obovadas, pétalas internas 1,2–4,6 mm; estames numerosos, 1–1,5 mm, carpelos numerosos 0,7 mm, glabros. Fruto 1,5–3,5 × 1,3–2,5 cm, elipsóide, globoso ou obovoide, glabro, aréolas indistintas ou pulvinadas e sem delimitação entre os carpídios, carpídios 10–50; sementes obvoídes 6–15 × 3–7 mm, castanho-claras (MENDES-SILVA *et al.*, 2020b).

No Brasil a espécie é conhecida como dois morfotipos, sendo *Annona emarginata* do tipo “terra-fria” e *Annona emarginata* do tipo “mirim”, que apresentam diferentes características morfológicas observadas no campo, como variações no tamanho das folhas, coloração das flores e aroma (OVILE MIMI *et al.*, 2021). E além das diferentes características morfológicas, os locais de ocorrência entre essas duas variações da espécie também é relevante, sendo a *Annona emarginata* do tipo “terra-fria” predominante em locais de elevadas altitudes, acima de 950 metros, e originalmente estão adaptadas à baixas temperaturas, e a *Annona emarginata* do tipo “mirim” ocorre em regiões baixas, normalmente próximas a cursos de água (BETTIOL NETO *et al.*, 2006). A espécie e seus morfotipos (“terra-fria” e “mirim”) são importantes na fruticultura, sendo frequentemente utilizadas como porta-enxertos para a *Annona x atemoya* (DE ALMEIDA; DE ALENCAR; YAMANISHI, 2010).

Além da sua importância na fruticultura, a espécie apresenta metabólitos especializados de interesse farmacológico. Moléculas como alcaloides e acetogeninas são sintetizadas e muitas delas apresentam efeitos biológicos comprovados. As cascas das raízes de *Annona emarginata*, que são utilizadas para extração de acetogeninas e alcaloides, apresentam atividades tripanocidas e leishmanicidas (FÉVRIER *et al.*, 1999). Extratos hexânicos, metanólicos e

diclorometano de raízes, folhas, flores e frutos de *Annona emarginata* foram utilizados para testar sua atividade antimicrobiana, apresentando resultados positivos (DOLAB *et al.*, 2018). Além de que, a presença de terpenos voláteis, como os óleos essenciais, foi identificada em *Annona emarginata* (CAMPOS *et al.*, 2014).

3.2.2. *Annona x atemoya* Mabb.

A atemoia (*Annona x atemoya* Mabb.) é uma espécie economicamente importante, cultivada em continentes tropicais e subtropicais, incluindo as Américas, Ásia, África e Austrália (LI *et al.*, 2019). Sua origem se deu a partir da hibridização entre espécies de mesma família, sendo *Annona squamosa* (pinha) e *Annona cherimola* (cherimoia). O primeiro cruzamento foi realizado por PJ Wester, um horticultor, nos Estados Unidos, em 1908 (MORTON, 1987). Os cultivares variam entre os países, por exemplo, Estados Unidos da América (Bradley, Page, Keller, Priestly, Stremer e Caves); Brasil (African Pride, Pink's Mammoth, Thompson e Gefner); Austrália (Island Gem, Nielsen, Hillary White, Maroochy Gold, Pink's Mammoth e African Pride); Israel (Jennifer, Kabri, Malalai, African Pride e Gefner) e Tailândia (Golden Flesh e Pet Pakchong) (AL KAZMAN; HARNETT; HANRAHAN, 2020).

Dentre as características morfológicas, as árvores de atemoia se assemelham muito às da cherimoia; com rápido crescimento, pode atingir 7,5-9 m, com galhos tipicamente caídos e mais baixos tocando o solo. As folhas são caducas, alternadas, elípticas, coriáceas, menos peludas que as da cherimóia; e até 15 cm de comprimento. As flores são de pedúnculo longo, triangulares, amarelas, com 6 cm de comprimento e 4-5 cm de largura. O fruto é cônico ou em forma de coração, geralmente com 10 cm de comprimento e 9,5 cm de largura; alguns pesando até 2,25 kg; verde-azulado claro ou verde ervilha, e ligeiramente amarelado entre as areolas. A casca, com 3 mm de espessura, é composta por aréolas fundidas mais proeminentes e angulares que as da pinha, com pontas arredondadas ou ligeiramente para cima; firme, flexível e indeiscente. A polpa perfumada é branca como a neve, de textura fina, quase sólida, não visivelmente dividida em segmentos, com poucas sementes; doce e subácido ao mesmo tempo e lembra o sabor da cherimoia. As sementes são cilíndricas, com 2 cm de comprimento e 8 mm de largura; um marrom tão escuro que parece preto; duro e liso (MORTON, 1987).

Os frutos resultantes deste cruzamento são altamente saborosos, devido à polpa doce e cremosa e ao sabor perfumado, quando totalmente maduras e apresentam alto teor de carboidratos, ácidos ascórbicos e nutrientes abundantes (LI *et al.*, 2019; PAREEK *et al.*, 2011). Porém existem problemas que precisam ser resolvidos em pós-colheita, como a necessidade de

maior controle da temperatura para evitar danos, seja por baixas ou elevadas temperaturas (CORDEIRO *et al.*, 2013). Além do que, os frutos das anonas, de maneira geral, são caracterizados por elevadas taxas de respiração, síntese de etileno e conteúdo de sólidos solúveis sendo as principais causas da rápida deterioração dos frutos da atemoia (CORDEIRO *et al.*, 2013; PAREEK *et al.*, 2011).

Além do interesse agrônômico, devido a produção e comercialização de frutos, a *Annona x atemoya* apresenta interesses farmacológicos, uma vez que sintetizam moléculas com atividades biológicas diversas. Dentre as atividades biológicas, relatam-se propriedades antioxidantes das folhas, devido a presença de polifenóis e alcaloides (MANNINO *et al.*, 2020). Extratos etanólicos e metanólicos de talos e folhas de atemoia foram avaliados quanto a ação antimicrobiana e antioxidante, apresentando resultados positivos (RABÊLO *et al.*, 2014).

3.3. Metabolismo especializado

As plantas são organismos sésseis e, portanto, o seu crescimento e desenvolvimento são dependentes de capacidades biossintéticas altamente especializadas, no que se refere a sua adaptação ao meio e defesa (LAURSEN; MØLLER; BASSARD, 2015). Como medida de defesa, as plantas sintetizam metabólitos especializados que desempenham papel importante na interação das plantas com o meio ambiente, e em particular com seu meio biótico, onde podem servir como atrativos para polinizadores ou dispersores de sementes, na defesa contra inimigos naturais, podendo inibir o crescimento e desenvolvimento de bactérias, fungos e vírus, ou como agentes aleloquímicos contra plantas vizinhas concorrentes. Dessa forma os metabólitos especializados representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; KROYMANN, 2011; PICHERSKY; LEWINSOHN, 2011; WINK, 2008). Essas moléculas são de grande importância devido as suas atividades, podendo dar origem a novos agentes terapêuticos ou biológicos (CORTES *et al.*, 2014).

A adaptabilidade das plantas a estresses ambientais é considerada um comportamento ecológico generalizado, intrínseco e implícito, sendo as respostas fisiológicas e bioquímicas da planta ainda não totalmente compreendidas (YANG *et al.*, 2018). Neste contexto, além da existência de um controle genético, a biossíntese de metabólitos especializados pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos. Diversos fatores são passíveis de tais modulações como o ciclo circadiano (dia/noite), sazonalidade, disponibilidade hídrica, estágio de desenvolvimento da planta (idade), temperatura, radiação ultravioleta, disponibilidade de macro e micronutrientes, altitude, poluição atmosférica e injúrias decorrentes de ataque por patógenos ou herbivoria, entre outros

(GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Em estudos realizados com *Annona lutescens*, ocorreu variação no teor de metabólitos por influência da sazonalidade (CASTRO-MORENO *et al.*, 2013). A disponibilidade hídrica também afetou a biossíntese em *Annona crassiflora* em condições de seca e alagamento (HONÓRIO *et al.*, 2021). De la Cruz-Chacón *et al.* (2012) verificaram variações em metabólitos especializados durante o desenvolvimento inicial de plântulas de *Annona macrophyllata* ($\equiv$ *Annona diversifolia*), demonstrando que o estágio de desenvolvimento da planta pode modular a biossíntese. E ainda, considerando-se as variações genéticas, Mimi *et al.* (2021) verificaram padrões distintos na síntese de alcaloides em dois morfotipos de *Annona emarginata* ('terra-fria' e 'mirim').

Os metabólitos especializados são sintetizados a partir do metabolismo primário das plantas, o que os levou a serem chamados de metabólitos secundários durante bastante tempo. Porém, com o avanço das pesquisas e o conhecimento da diversidade desses metabólitos, como também as suas funções ecológicas e o fato de como a capacidade de sintetizar tais metabólitos evoluiu em diferentes linhagens de plantas, representando adaptações a situações ecológicas específicas, esses compostos passaram a serem denominados “metabólitos especializados” (PICHESKY; LEWINSOHN, 2011).

Os avanços nos estudos do metabolismo especializado a partir de técnicas de separação de moléculas por placas preparativas TLC, Cromatografia Líquida (LC) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi possível o isolamento desses metabólitos, que tiveram as suas estruturas químicas elucidadas por espectrometria de massa, espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e cristalografia de raios-X. Porém, devido à abundância e riqueza de espécies vegetais, pouco se sabe sobre a quantidade real existente desses metabólitos, mas que provavelmente deve exceder 200.000, uma vez que, além das funções já conhecidas, muitos metabólitos especializados são intermediários em vias complexas e não são normalmente encontrados em altas concentrações nos tecidos da planta que estão sendo examinados, evitando assim a detecção e por isso esse valor (200.000) pode ser considerado uma subestimação grosseira (PICHESKY; LEWINSOHN, 2011; WINK, 2008).

Quimicamente, os metabólitos especializados podem ser divididos em três grupos, sendo os terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (alcaloides) (TAIZ *et al.*, 2017), sendo que o primeiro compreende a maior classe dos metabólitos especializados, com mais de 30.000 moléculas identificadas, seguido pelos compostos nitrogenados com mais de 20.000 substâncias (MATSUURA *et al.*, 2018). E devido a grande diversidade estrutural presente nesses metabólitos, muitos deles passaram a ser estudados para fins terapêuticos, quando isolados e testados, sendo considerados produtos naturais ou até mesmo sintetizados em laboratório de forma modelada ou derivada, compreendendo 40% de todos os medicamentos

aprovados entre 1981 e 2014 (NEWMAN; CRAGG, 2016). Portanto, as plantas passaram a desempenhar um papel de destaque nas indústrias farmacêuticas, e também sendo utilizadas para fins não medicinais, bastante empregadas na indústria química, alimentar, corantes, perfumes e cosméticos.

No que diz respeito à síntese de moléculas especializadas a família Annonaceae, em especial o gênero *Annona*, é fitoquimicamente reconhecida pela presença de metabólitos especializados, entre eles as acetogeninas (AGUILAR-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020; DURÁN-RUIZ *et al.*, 2019), óleos essenciais (GYESI; OPOKU; BORQUAYE, 2019; NAIK; SELLAPPAN, 2020), flavonoides (NGUYEN *et al.*, 2020; NOVAES; FERREIRA; SANTOS, 2018) e os alcaloides (DE-LA-CRUZ-CHACÓN *et al.*, 2019a; DE LA CRUZ-CHACÓN *et al.*, 2011; DE LA CRUZ CHACÓN; GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2012), sendo que estes últimos são objeto deste trabalho de investigação.

3.3.1. Alcaloides e o gênero *Annona*

Os alcaloides são um grupo de moléculas cuja estrutura química apresenta pelo menos um átomo de Nitrogênio (N) (HASHIMOTO; YAMADA, 1994), baixo peso molecular e que apresenta potencial hidrogeniônico (pH) principalmente básico, mas também pode incluir alguns grupos de moléculas de pH neutro ou ácido. Essas moléculas podem ser sintetizadas por uma grande variedade de organismos, como fungos, bactérias e plantas, sendo encontrados em cerca de 20% das espécies vegetais e que frequentemente exibem atividades fisiológicas (FACCHINI, 2001; HUGHES; SHANKS, 2002; ROY, 2017).

Por ser um grupo com grande variedade de estruturas químicas, os alcaloides foram classificados em quatro diferentes grupos, de acordo com a sua origem biogenética, sendo os alcaloides derivados de aminoácidos (ornitina/arginina, lisina, histidina, fenilalanina/tirosina, triptofano e os ácidos antranílicos e nicotínicos), alcaloides purínicos (derivados de bases nitrogenadas), os alcaloides terpênicos aminados e os alcaloides policetídeos (LOYOLA-VARGAS; GALAZ-ÁVALOS; KÚ-CAUICH, 2007).

A diversidade estrutural dos alcaloides confere um enorme campo a ser explorado devido aos seus efeitos terapêuticos, em pequenas quantidades. Porém em muitos casos eles podem ser altamente tóxicos, uma vez que garantem a sobrevivência de muitos organismos vegetais contra microorganismos, insetos e herbívoros e também contra plantas vizinhas por meio de compostos químicos alelopaticamente ativos (ROY, 2017). Ao todo, se conhecem cerca de 20.000 alcaloides, além dos aminoácidos não proteicos (700 estruturas), aminas (100 estruturas), glicosídeos cianogênicos (60 estruturas), glucosinolatos (100 estruturas),

alquilamidas (150 estruturas), bem como lectinas e outros peptídeos (2000 estruturas) (SCHÄFER; WINK, 2009).

No que se diz respeito às atividades terapêuticas desses metabólitos, podemos citar atividades anticancerígenas, antioxidantes, antimicrobianas, larvicidas, antifúngicas, anti-amebiano e citotóxica (AL-GHAZZAWI, 2019; COSTA *et al.*, 2013; DA CRUZ *et al.*, 2011; DE-LA-CRUZ-CHACÓN *et al.*, 2019a; DÍAZ-GODÍNEZ *et al.*, 2020; JUSTINO *et al.*, 2021; PEÑA-HIDALGO *et al.*, 2021), sendo que muitas dessas atividades estão relacionadas a alcaloides específicos da família Annonaceae.

Espécies da família Annonaceae sintetizam diversos alcaloides, como a liriodenina, que são relatadas em estudos com *Annona cacans* (SAITO; OLIVEIRA, 1994; SOUSA *et al.*, 2019), *Annona macrophyllata* ($\equiv$ *Annona diversifolia*) (DE LA CRUZ-CHACÓN *et al.*, 2011; DE LA CRUZ CHACÓN; GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2012), *Annona x atemoya* Mabb. (RABÊLO *et al.*, 2015), *Annona pickelii* (DUTRA *et al.*, 2012), *Annona rugulosa* (VENDRAMIN *et al.*, 2013), *Annona foetida* (COSTA *et al.*, 2011), *Annona salzmännii* e *Annona vepretorum* (DA CRUZ *et al.*, 2011; DE OLIVEIRA TELES *et al.*, 2015).

A liriodenina, embora seja abundante nas espécies da família Annonaceae, como por exemplo em *Annona macrophyllata* ($\equiv$ *Annona diversifolia*), podendo atingir até 0,2% do seu peso seco, também já foi isolada das famílias Araceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Monimiaceae, Papaveraceae, Rhamnaceae e Ranunculaceae (DE LA CRUZ CHACÓN; GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2012).

Entre as atividades biológicas da liriodenina podemos citar a ação antimicrobiana, antifúngica (DE LA CRUZ-CHACÓN *et al.*, 2011; LEVORATO VINCHE *et al.*, 2020), neurotóxica e citotóxicas (MAJRASHI *et al.*, 2021). Nas plantas a liriodenina apresenta um papel fundamental, desde o desenvolvimento inicial de plântulas de *Annona macrophyllata* ($\equiv$ *Annona diversifolia*), uma vez que durante a germinação, ocorre frequentemente ataque por fungos, causando danos ao embrião. Nas sementes capazes de germinar, se verifica diminuição da população fúngica à medida que o embrião se desenvolve, fenômeno o qual coincide com a emergência da plântula e aumento da liriodenina (DE LA CRUZ-CHACÓN *et al.*, 2011; DE LA CRUZ CHACÓN; GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2012).

Os alcaloides, de maneira geral, quando elucidados e testados seus efeitos biológicos, podem apresentar respostas positivas para o tratamento de diversas doenças, como já citadas. Em uma revisão de Egydio-Brandão, Novaes e Santos (2017), foi possível identificar 70 alcaloides relatados para espécies do gênero *Annona* entre 2005 e 2016, porém destes, menos de 30% haviam sido investigado quanto a sua atividade biológica, o que confere um excelente campo a ser explorado. Sendo assim, considerados promissores não só para elucidação de novos

compostos, mas também, para a descoberta de novas outras atividades biológicas (EGYDIO-BRANDÃO; NOVAES; SANTOS, 2017).

O gênero *Annona* é bastante utilizado na medicina popular para diferentes tratamentos, por ser uma fonte rica em metabólitos especializados, que foram isolados e identificados em diferentes partes da planta, podendo ser utilizado para diversos tratamentos. Alcaloides isolados de espécies do gênero *Annona* foram testados contra diversas enfermidades, tais como potenciais fontes de agentes leishmanicidas quando extraídos de *Annona squamosa* L. (VILANOVA *et al.*, 2011). *Annona cherimola* e *Annona x atemoya* tiveram efeitos positivos como antioxidantes e também efeitos quimio-preventivos (MANNINO *et al.*, 2020). *Annona crassiflora* foi descrita como potencial agente antitumoral (JUSTINO *et al.*, 2021). Como efeito antifúngico *Annona purpurea* e *Annona macrophyllata* ($\equiv$ *Annona diversifolia*) apresentaram efeitos inibitórios significativos (DE-LA-CRUZ-CHACÓN *et al.*, 2019a; DE LA CRUZ-CHACÓN *et al.*, 2011). E *Annona senegalensis* apresentou efeitos inibitórios em atividades anti-inflamatória (TAMFU *et al.*, 2021).

Dentre a diversidade de alcaloides encontradas no gênero *Annona*, podemos citar a Anonaína, Assimilobina, Liriodenina, Lanuginosídeo, Stepharine e Pronuciferina identificadas em folhas de *Annona cherimola* e *Annona x atemoya* (MANNINO *et al.*, 2020). Justino *et al.* (2021) identificaram os seguintes alcaloides em casca de frutos de *Annona crassiflora*: Anonaína, Isopolina, Isoboldina, Isocoridina, Liriodenina, Estefalagina, Nuciferina, Aterospermidina e Xilopina.

Em raízes, caules e folhas de *Annona purpurea* foram identificados diversos alcaloides, como Trimetoxiisoquinolina, Talifolina, Lirinidina, Anonaína, Tetrahidroisoquinolina, N-Metillaurotetanina, 2-(Metilamino)-3-fenilindol, Papaverina, Reticulina, Nuciferina, Annomontine, Xilopina, Glaucina, Talicsimidina, Puterina, Talbaicalidina, Talimicrinona, Magnoflorina, Isocoridina, Liriodenina, 7-Hidroxidesidroglaucina, 7-Hidroxidesidrotálicosimidina e Oxopurpureína, sendo que estes foram identificados sob influência do ciclo anual (DE-LA-CRUZ-CHACÓN *et al.*, 2019a).

A diversidade de alcaloides é tão ampla quanto as espécies do gênero *Annona* e a sua identificação, bem como a concentração podem facilmente serem moduladas por fatores decorrentes do ciclo anual da planta, devido a sazonalidade, como também da diferenciação dos órgãos ou estruturas da planta analisada. Estudos realizados com *Annona macrophyllata* ($\equiv$ *Annona diversifolia*) identificaram a presença da Liriodenina desde o processo de embebição das sementes, até o desenvolvimento inicial de plântula em pelo menos algumas das estruturas (endosperma, embrião, raiz e caule) em alguma fase do desenvolvimento (DE LA CRUZ CHACÓN; GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2012).

A presença e modulação da concentração de alcaloides nos indivíduos vegetais, apresentam um papel evolutivo e ecológico de adaptação ao meio ambiente, como também em resposta a ataques por patógenos. No entanto, embora o gênero *Annona* apresente grande número de compostos com atividade biológica, é comum o relato de ataque por fungos, seja em plantas adultas ou em condições de viveiro ou no pós-colheita.

3.4. Fungos fitopatogênicos e o gênero *Annona*

Dentre os organismos que podem ser considerados fitopatogênicos de plantas, podemos incluir os fungos, bactérias, vírus, nematóides e protozoários (DE LA CRUZ CHACÓN; GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2015). Estes organismos podem apresentar enfermidades para as plantas, muitas vezes levando a morte do indivíduo, sendo responsáveis por diversas perdas todos os anos na produção agrícola (BASHA; BEGUM; RAGHAVENDRA, 2014; JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 2014). Para o gênero *Annona*, os fungos fitopatogênicos têm provocado danos consideráveis, causando grandes perdas. Esses fungos podem afetar diferentes partes da planta acarretando em morte de galhos e ramos, necrose de folhas e caules jovens, queda de flores e frutos (especialmente de frutos jovens) e apodrecimento de frutos maduros (ÁLVAREZ *et al.*, 2014).

Espécies como *Annona muricata*, *Annona squamosa*, *Annona cherimola* e *Annona x atemoya* são altamente suscetíveis à fungos fitopatogênicos, podendo-lhes causar doenças como, antracnose (*Colletotrichum* spp.), podridão de raízes (*Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp., *Phytophthora* spp., *Cylindrocladium clavatum*), cancrose (*Albonectria rigidiuscula*, sin. *Calonectria rigidiuscula*, *Nectria rigidiuscula*), cancro depressivo ou cancrose da gravioleira (*Phomopsis* sp.), podridão-parda dos frutos da gravioleira (*Rhizopus stolonifer*) e podridão-preta-do-fruto da gravioleira (*Phytophthora* sp.) (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 2014).

De modo geral as doenças fúngicas podem ser controladas com uso de fungicidas químicos, porém o uso de forma indiscriminada tem representado uma grande ameaça à saúde humana e ao meio ambiente, resultando em poluição ambiental, perturbando a biodiversidade, causando surtos de pragas secundárias, desenvolvendo resistência a patógenos e contaminando a cadeia alimentar no ecossistema (BASHA; BEGUM; RAGHAVENDRA, 2014; HERNÁNDEZ-GUERRERO *et al.*, 2020). Devido a isso, novos estudos passaram a visar o uso de produtos alternativos, como os extratos vegetais, que possuem metabólitos especializados, como uma alternativa para o controle de fitopatogênicos. Esses metabólitos especializados possuem taxas de biodegradação mais rápidas, seja por serem rapidamente hidrolisados ou por apresentarem maior taxa de absorção (EKSTEEN *et al.*, 2001; LEISS *et al.*, 2011).

A atividade biológica de alcaloides extraídos de *Annona muricata* e *Annona purpurea* e testados em cepas de fungos fitopatogênicos de espécies do gênero *Annona*, apresentaram respostas positivas na inibição de *Colletotrichum siamense*, *Colletotrichum fructicola* e *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., (DE-LA-CRUZ-CHACÓN *et al.*, 2019a; HERNÁNDEZ-GUERRERO *et al.*, 2020; RUBIO-MELGAREJO *et al.*, 2020).

3.4.1. *Colletotrichum* spp.

Dentre os fungos fitopatogênicos, o gênero *Colletotrichum* é de grande importância, uma vez que praticamente todas as culturas cultivadas em todo o mundo são suscetíveis a uma ou mais espécies de *Colletotrichum* (DEAN *et al.*, 2012). A antracnose, causada por *Colletotrichum* spp., é considerada a doença fúngica mais importante das espécies da família Annonaceae, causando perdas de 53% até 70% em períodos de chuvas prolongadas durante a floração e produção de frutos (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 2014). Esses fungos apresentam distribuição principalmente tropical e subtropical, embora existam algumas espécies que afetam as culturas de clima temperado (DEAN *et al.*, 2012).

Os sintomas da doença podem ser observados nas folhas, ramos, flores e frutos, sendo que nas folhas são caracterizados por lesões irregulares, de cor escura e centro claro, que ocorrem tanto no limbo como nas nervuras. As folhas podem ficar deformadas e ainda cair, causando desfolhamento das plantas atacadas. Além disso, a antracnose pode acarretar em lesões necróticas limitadas, bem como podridões da copa e do caule, ferrugem das mudas, entre outras (CANNON *et al.*, 2012; JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 2014).

Os critérios para identificação das espécies de *Colletotrichum* são por base em morfologia descritiva, a partir da forma, tamanho dos conídios, germinação dos conídios, forma e dimensões de apressórios, presença ou ausência de cerdas e aspecto da colônia (CANNON *et al.*, 2012). Porém, aspectos morfológicos descritivos podem ser extremamente variável, o que torna a identificação não confiável, impedindo uma identificação correta de muitas espécies de *Colletotrichum*, uma vez que a correta identificação das espécies de *Colletotrichum* é essencial para um entendimento preciso da epidemiologia da doença e para o desenvolvimento de estratégias de controle mais eficientes (BORGES *et al.*, 2021; PHOULIVONG, 2011). Nesse contexto, as análises filogenéticas envolvendo as informações da sequência de nucleotídeos de regiões genômicas distintas, em associação com características morfológicas, são capazes de fornecer descrições mais precisas das espécies de *Colletotrichum* (VIEIRA *et al.*, 2020).

Nas espécies do gênero *Annona* possível identificar algumas espécies de fungos do gênero *Colletotrichum* causando antracnose. Costa *et al.*, (2019) conseguiram identificar nove

espécies de *Colletotrichum* (*Colletotrichum theobromicola*, *Colletotrichum siamense*, *Colletotrichum tropicale*, *Colletotrichum fructicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum brevisporum*, *Colletotrichum cliviae*, *Colletotrichum gigasporum* e *Colletotrichum karstii*) infectando *Annona muricata* e *Annona squamosa* L., sendo que dessas espécies, seis (*Colletotrichum fructicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum karstii*, *Colletotrichum siamense*, *Colletotrichum theobromicola* e *Colletotrichum tropicale*) já haviam sido reportadas por outros autores, estando associadas à antracnose em espécies do gênero *Annona* (ÁLVAREZ *et al.*, 2014; DAMM *et al.*, 2012; ROJAS *et al.*, 2010; UDAYANGA *et al.*, 2013; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012). No Brasil, apenas *Colletotrichum boninense*, *Colletotrichum fructicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum theobromicola* e *Colletotrichum magna* foram identificados como agentes causais da antracnose em culturas de *Annona squamosa* e *Annona muricata* (COSTA *et al.*, 2019; KAMEI *et al.*, 2014).

Os aspectos fitossanitários dos pomares são de grande importância para a garantia da manutenção das culturas no campo e os cuidados se iniciam com a escolha do porta-enxerto a ser utilizado (KAVATI *et al.*, 2013).

3.5. Porta-enxertos de *Annona*

As espécies de *Annona*, de maneira geral, são altamente suscetíveis às podridões de raízes e de colo e o aumento das áreas de produção de frutos vem favorecendo o aparecimento de novas pragas e doenças coevolúidas em outras espécies de anonáceas nativas e introduzidas, por meio de mudas e sementes contaminadas, o que dificulta a propagação. Sendo assim, o uso de porta-enxerto tolerante às pragas e doenças tornou-se uma alternativa para reduzir os prejuízos decorrentes do ataque destes patógenos, permitindo também maior adaptabilidade da copa ao meio (BETTIOL NETO *et al.*, 2006; COSTA; BUENO; FERREIRA, 2011; DE ALMEIDA; DE ALENCAR; YAMANISHI, 2010; ZACARONI *et al.*, 2014).

Várias doenças podem afetar as folhas, ramos, raízes, flores e frutos de espécies comerciais como, *Annona muricata*, *Annona squamosa*, *Annona cherimola* e *Annona x atemoya* em diferentes etapas de seu desenvolvimento (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 2014). Dessa forma, espécies tolerantes a pragas e doenças, que afetam espécies do gênero, vem sendo utilizadas como porta-enxertos para espécies suscetíveis. Estudos realizados com *Annona emarginata* (araticum de terra-fria) e *Annona mucosa* (biribá) como porta-enxertos para *Annona x atemoya* (Thompson) demonstraram melhores resultados de enxertia para o araticum de terra-fria, quando comparados com o biribá (DE ALMEIDA; DE ALENCAR; YAMANISHI, 2010).

Já as espécies de *Annona squamosa* e *Annona glabra* foram utilizadas como porta-enxerto para espécies de *Annona* x *atemoya* (Gefner) e dentre os métodos de enxertia, apenas o método de garfagem fenda cheia obteve sucesso para ambas as espécies usadas como porta enxerto para atemoia (Gefner) (LEITE *et al.*, 2013). E *Annona mucosa*, *Annona montana*, *Annona muricata* e *Annona crassiflora*, já foram utilizadas como possíveis porta enxertos para *Annona muricata*, porém apenas a *Annona mucosa* e *Annona muricata* apresentaram melhores resultados de enxertia para *Annona muricata* (ZACARONI *et al.*, 2014).

Dentre as espécies mencionadas como possíveis porta-enxertos para espécies do gênero *Annona*, os morfotipos de *Annona emarginata* (“terra-fria” e “mirim”) se tornaram importantes na agricultura, sendo frequentemente utilizadas como porta-enxertos para espécies como a *Annona* x *atemoya* (DE ALMEIDA; DE ALENCAR; YAMANISHI, 2010), uma vez que apresentam resistência a diversos patógenos que atacam a raiz e o colo da planta (BETTIOL NETO *et al.*, 2006) além de que, o morfotipo “terra-fria” apresenta tolerância a solos secos e diferentes adaptações ambientais (MANTOAN *et al.*, 2016), conferindo assim uma vantagem, do ponto de vista agrônomo. Porém, apesar das suas vantagens como porta-enxertos, o araticum-mirim induz nanismo das copas de atemoia. Já o araticum de terra-fria induz maior vigor a copa, quando comparadas às plantas enxertadas sobre o araticum-mirim. Alguns produtores acreditam que as mudas enxertadas sobre araticum de terra-fria não apresentam boa performance em regiões mais quentes, devido ter sua origem em regiões mais frias (BONAVENTURE, 1999).

No entanto, apesar da espécie *Annona emarginata* apresentar bons resultados de enxertia, devido a sua tolerância a algumas pragas e doenças (BETTIOL NETO *et al.*, 2006), além de sintetizar metabólitos especializados com atividades biológicas (DOLAB *et al.*, 2018; FÉVRIER *et al.*, 1999), tais metabólitos da espécie ainda não foram testados em cepas de *Colletotrichum* spp., principal gênero causador de antracnose em *Annona*.

3.6. Referências Bibliográficas

AGUILAR-HERNÁNDEZ, Gabriela *et al.* Ultrasound-assisted extraction of total acetogenins from the soursop fruit by response surface methodology. **Molecules**, [S. l.], v. 25, n. 5, p. 1–10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25051139>

AL-GHAZZAWI, Adel M. Anti - cancer activity of new benzyl isoquinoline alkaloid from Saudi plant *Annona squamosa*. **BMC Chemistry**, [S. l.], p. 1–6, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13065-019-0536-4>

AL KAZMAN, Bassam S. M.; HARNETT, Joanna E.; HANRAHAN, Jane R. The phytochemical constituents and pharmacological activities of *Annona atemoya*: A systematic

review. **Pharmaceuticals**, [S. l.], v. 13, n. 10, p. 1–16, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ph13100269>

ÁLVAREZ, Elizabeth *et al.* Diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species isolated from soursop in Colombia. **European Journal of Plant Pathology**, [S. l.], v. 139, n. 2, p. 319–332, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0388-7>

ANAYA-ESPARZA, Luis M. *et al.* Annonas: Underutilized species as a potential source of bioactive compounds. **Food Research International**, [S. l.], v. 138, n. October, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109775>

BASHA, S. Ameer; BEGUM, A. Sajeli; RAGHAVENDRA, G. Effect of *Annona muricata*, *Abutilon indicum* and *Evolvulus alsinoides* extract on spore germination of sorghum grain mold fungi. **International Journal of Bio-resource and Stress Management**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 102, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5958/j.0976-4038.5.1.020>

BETTIOL NETO, José Emílio *et al.* Enraizamento de estacas dos porta-enxertos *Araticum-de-Terra-Fria* (*Rollinia* sp.) e *Araticum-Mirim* (*Rollinia emarginata* Schltdl.) para anonáceas. **Ciência e Agrotecnologia**, [S. l.], v. 30, n. 6, p. 1077–1082, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1413-70542006000600005>

BORGES, Rafaela C. F. *et al.* *Colletotrichum* *siamense* as a causal agent of leaf anthracnose in seedlings of *Annona muricata* in nurseries from the Federal District, Brazil. **Journal of Plant Diseases and Protection**, [S. l.], v. 128, n. 2, p. 583–588, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00406-x>

CANNON, P. F. *et al.* *Colletotrichum* - current status and future directions. **Studies in Mycology**, [S. l.], v. 73, p. 181–213, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3114/sim0014>

CASTRO-MORENO, Marisol *et al.* Influence of seasonal variation on the phenology and liriiodenine content of *Annona lutescens* (Annonaceae). **Journal of Plant Research**, [S. l.], v. 126, n. 4, p. 529–537, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10265-013-0550-x>

CHATROU, Lars W. *et al.* A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, [S. l.], v. 169, n. 1, p. 5–40, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2012.01235.x>

CHATROU, Lars W. *et al.* A linear sequence to facilitate curation of herbarium specimens of Annonaceae. **Kew Bulletin**, [S. l.], v. 73, n. 3, p. 1–10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12225-018-9764-3>

CHOWDHURY, Shadman Sakib *et al.* Screening of antidiabetic and antioxidant potential along with phytochemicals of *Annona* genus: a review. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 7, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00300-9>

CORDEIRO, Nereida *et al.* Changes in the mesocarp of *Annona cherimola* Mill. “Madeira” during postharvest ripening. **Postharvest Biology and Technology**, [S. l.], v. 85, p. 179–184, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.05.014>

CORTES, Diego *et al.* Nuevos fármacos inspirados en Annonáceas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S. l.], v. 36, n. spe1, p. 22–31, 2014. Disponível em:

<https://doi.org/10.1590/S0100-29452014000500003>

COSTA, Emmanoel Vilaça *et al.* Trypanocidal activity of oxoaporphine and pyrimidine- β -carboline alkaloids from the branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). **Molecules**, [S. l.], v. 16, n. 11, p. 9714–9720, 2011 a. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules16119714>

COSTA, Emmanoel Vilaça *et al.* Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and larvicidal activities of the essential oils of *Annona salzmannii* and *A. pickelii* (Annonaceae). **Natural Product Communications**, [S. l.], v. 6, n. 6, p. 907–912, 2011 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1934578x1100600636>

COSTA, Emmanoel Vilaça *et al.* Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* A. DC. (Annonaceae). **Natural Product Research**, [S. l.], v. 27, n. 11, p. 1002–1006, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.688044>

COSTA, Jaqueline F. O. *et al.* Species diversity of *Colletotrichum* infecting *Annona* spp. in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, [S. l.], v. 153, n. 1, p. 169–180, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01630-w>

COSTA, Paula Nepomuceno; BUENO, Silvana Sales Catarina; FERREIRA, Gisela. Germination phases of *Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. Rainer seeds under different temperatures. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 253–260, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011005000025>

COUVREUR, Thomas L. P. *et al.* Keys to the genera of Annonaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, [S. l.], v. 169, n. 1, p. 74–83, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2012.01230.x>

DA CRUZ, Pedro Ernesto Oliveira *et al.* Chemical constituents from the bark of *Annona salzmannii* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, [S. l.], v. 39, n. 4–6, p. 872–875, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2011.06.008>

DAMM, U. *et al.* The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, [S. l.], v. 73, p. 1–36, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3114/sim0002>

DE-LA-CRUZ-CHACÓN, Iván *et al.* Spatio-Temporal Variation of Alkaloids in *Annona purpurea* and the Associated Influence on Their Antifungal Activity. **Chemistry and Biodiversity**, [S. l.], v. 16, n. 2, 2019 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800284>

DE-LA-CRUZ-CHACÓN, Iván *et al.* Antifungal activity in vitro of *Sapranthus microcarpus* (Annonaceae) against phytopathogens. **Acta Botanica Mexicana**, [S. l.], n. 126, p. 1–9, 2019 b. Disponível em: <https://doi.org/10.21829/ABM126.2019.1420>

DE ALMEIDA, Luis Felipe Paes; DE ALENCAR, Cristina Miranda; YAMANISHI, Osvaldo Kiyoshi. Propagação por enxertia de atemoia “Thompson” sobre espécies de *Rollinia*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S. l.], v. 32, n. 2, p. 41, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-29452010005000058>

DE LA CRUZ-CHACÓN, Iván *et al.* Liriodenine, early antimicrobial defence in *Annona*

- diversifolia*. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, [S. l.], v. 66 C, n. 7–8, p. 377–384, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/znc-2011-7-809>
- DE LA CRUZ CHACÓN, I.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. Liriodenine alkaloid in *Annona diversifolia* during early development. **Natural Product Research**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 42–49, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.533373>
- DE-LA-CRUZ-CHACÓN, I.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. in ‘**Annonaceae: tópicos seleccionados**’, Eds. J. R. Guedes D. S. A., R. Goncalves D. O J., A. P. De-Oliveira, Editora CRV, Brasil, 2015, Cap. 12, p. 367.
- DE LEMOS, Eurico Eduardo Pinto. the Production of *Annona* Fruits in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S. l.], v. 36, n. S1, p. 77–85, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452014000500009>
- DE OLIVEIRA TELES, Maria Nazaré *et al.* Alkaloids from leaves of *Annona salzmännii* and *Annona vepretorum* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, [S. l.], v. 61, p. 465–469, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.07.016>
- DEAN, Ralph *et al.* The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 414–430, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- DÍAZ-GODÍNEZ, César *et al.* Anti-amoebic Activity of Leaf Extracts and Aporphine Alkaloids Obtained from *Annona purpurea*. **Planta Medica**, [S. l.], v. 86, n. 6, p. 425–433, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/a-1111-9566>
- DOLAB, Juan G. *et al.* The antimicrobial activity of *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer and most active isolated compounds against clinically important bacteria. **Molecules**, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 1–14, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules23051187>
- DOS SANTOS, Ricardo C. *et al.* Bioactive extracts from *Annona hypoglauca*. **Chemical Engineering Transactions**, [S. l.], v. 64, p. 289–294, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3303/CET1864049>
- DURÁN-RUIZ, Claudia Azucena *et al.* Ontogenic synchronization of *Bephratelloides cubensis*, *Annona macrophyllata* seeds and acetogenins from Annonaceae. **Journal of Plant Research**, [S. l.], v. 132, n. 1, p. 81–91, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10265-018-01078-3>
- DUTRA, Livia Macedo *et al.* Chemical constituents from the leaves of *Annona pickelii* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, [S. l.], v. 41, p. 115–118, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2011.12.011>
- EGYDIO-BRANDÃO, Apm; NOVAES, P.; SANTOS, Dyac. Alkaloids from *Annona*: Review from 2005 To 2016. **JSM Biochem Mol Biol**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 1031, 2017.
- EKSTEEN, D. *et al.* Mycelial growth inhibition of plant pathogenic fungi by extracts of South African plant species. **Annals of Applied Biology**, [S. l.], v. 139, n. 2, p. 243–249, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2001.tb00400.x>
- FACCHINI, Peter J. Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular

- regulation, and metabolic engineering applications. **Annual Review of Plant Biology**, [S. l.], v. 52, p. 29–66, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.29>
- FÉVRIER, Anne *et al.* Acetogenins and other compounds from *Rollinia emarginata* and their antiprotozoal activities. **Planta Medica**, [S. l.], v. 65, n. 1, p. 47–49, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-1999-13961>
- GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>
- GONZÁLEZ-ESQUINCA, Alma Rosa *et al.* Alkaloids and acetogenins in Annonaceae development: biological considerations. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S. l.], v. 36, n. spe1, p. 01–16, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-29452014000500001>
- GUO, Xing *et al.* A mega-phylogeny of the Annonaceae: Taxonomic placement of five enigmatic genera and support for a new tribe, Phoenicantheae. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07252-2>
- GYESI, Joseph Nana; OPOKU, Rita; BORQUAYE, Lawrence Sheringham. Chemical Composition, Total Phenolic Content, and Antioxidant Activities of the Essential Oils of the Leaves and Fruit Pulp of *Annona muricata* L. (Soursop) from Ghana. **Biochemistry Research International**, [S. l.], v. 2019, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2019/4164576>
- HASHIMOTO, T.; YAMADA, Y. Alkaloid biogenesis: Molecular aspects. **Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.**, [S. l.], v. 45, n. 22, p. 257–285, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.45.060194.001353>
- HERNÁNDEZ-GUERRERO, Sara Elena *et al.* Identification of Fungal Pathogens of Mango and Soursop Fruits Using Morphological and Molecular Tools and Their Control Using Papaya and Soursop Leaf and Seed Extracts. **International Journal of Agronomy**, [S. l.], v. 2020, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2020/8962328>
- HERNÁNDEZ, Librado Vidal *et al.* La situación de las annonaceae en México: Principales plagas, enfermedades y su control. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S. l.], v. 36, n. SPEC. EDITION 1, p. 44–53, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452014000500005>
- HONÓRIO, Ana Beatriz Marques *et al.* Impact of drought and flooding on alkaloid production in *Annona crassiflora* mart. **Horticulturae**, [S. l.], v. 7, n. 10, p. 1–14, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/horticulturae7100414>
- HUGHES, Erik H.; SHANKS, Jacqueline V. Metabolic engineering of plants for alkaloid production. **Metabolic Engineering**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 41–48, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/mben.2001.0205>
- JUNQUEIRA, Nilton Tadeu Vilela; JUNQUEIRA, Keize Pereira. Principais doenças de anonáceas no Brasil: Descrição e controle. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S. l.], v. 36, n. SPEC. EDITION 1, p. 55–64, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452014000500006>
- JUSTINO, Allisson B. *et al.* Alkaloid and acetogenin-rich fraction from *Annona crassiflora*

fruit peel inhibits proliferation and migration of human liver cancer HepG2 cells. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 16, n. 7 July, p. 1–21, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250394>

KAMEI, SANDRA HIROMI *et al.* Identificação E Caracterização De Espécies Anonáceas No Estado De Alagoas. [S. l.], p. 209–216, 2014.

KAVATI, R. Porta-enxertos em anonáceas. In: Anonaceas: Propagação e produção de mudas. FERREIRA, G. et al. (Eds.). Botucatu: FEPAF, 2013.

KROYMANN, Juergen. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 246–251, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.021>

LAURSEN, Tomas; MØLLER, Birger Lindberg; BASSARD, Jean Etienne. Plasticity of specialized metabolism as mediated by dynamic metabolons. **Trends in Plant Science**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 20–32, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.002>

LEISS, Kirsten A. *et al.* An overview of NMR-based metabolomics to identify secondary plant compounds involved in host plant resistance. **Phytochemistry Reviews**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 205–216, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9175-z>

LEITE, Débora O. D. *et al.* *Annona* Genus: Traditional Uses, Phytochemistry and Biological Activities. **Current Pharmaceutical Design**, [S. l.], v. 26, n. 33, p. 4056–4091, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1381612826666200325094422>

LEITE, Grazianny Andrade *et al.* Portaenxertos e métodos de enxertia na produção de mudas de Atemoieira (*Annona squamosa* L. x *Annona cherimola* Mill.). **Semina: Ciências Agrárias**, [S. l.], v. 34, n. 5, p. 2117–2128, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n5p2117>

LEVORATO VINCHE, Adriele Dandara *et al.* Antifungal activity of liriodenine on agents of systemic mycoses, with emphasis on the genus paracoccidioides. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, [S. l.], v. 26, n. October 2020, p. 1–12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0023>

LI, Haili *et al.* Comparative transcriptomic analysis of split and non-split atemoya (*Annona cherimola* Mill. × *Annona squamosa* L.) fruit to identify potential genes involved in the fruit splitting process. **Scientia Horticulturae**, [S. l.], v. 248, n. January, p. 216–224, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.017>

LOBÃO, A.Q.; Lopes, J.C.; Erkens, R.H.J.; Mendes-Silva, I.; Pontes Pires, A.F.; Silva, L.V.; Oliveira, M.L.B.; Johnson, D.; Mello-Silva, R. (in memoriam) 2020. Annonaceae in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB110219>>. Acesso em: 10 jan. 2022

LOYOLA-VARGAS, Víctor Manuel; GALAZ-ÁVALOS, Rosa M.; KÚ-CAUICH, Roberto. *Catharanthus* biosynthetic enzymes: The road ahead. **Phytochemistry Reviews**, [S. l.], v. 6, n. 2–3, p. 307–339, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11101-007-9064-2>

LÚCIO, Ana Silvia Suassuna Carneiro *et al.* **Alkaloids of the Annonaceae: Occurrence and a Compilation of Their Biological Activities**. [S. l.: s. n.], v. 74E-book. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/bs.alkal.2014.09.002>

MAAS, Paul J. M. *et al.* Annonaceae from Central-eastern Brazil. **Rodriguesia**, [S. l.], v. 52, n. 80, p. 61–94, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2175-78602001528005>

MAJRASHI, Taghreed A. *et al.* In vitro cytotoxicity and neurotoxicity assessment of the alkaloidal constituents derived from *Asimina triloba* twigs. **South African Journal of Botany**, [S. l.], v. 140, p. 204–209, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.04.010>

MANNINO, Giuseppe *et al.* Chemical profile and biological activity of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) and atemoya (*Annona atemoya*) leaves. **Molecules**, [S. l.], v. 25, n. 11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25112612>

MANTOAN, Luís Paulo Benetti *et al.* Photosynthetic adjustment after rehydration in *Annona emarginata*. **Acta Physiologiae Plantarum**, [S. l.], v. 38, n. 6, p. 1–11, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2171-1>

MANTOAN, Luís Paulo Benetti; FERREIRA, Gisela; BOARO, Carmen Silvia Fernandes. Chlorophyll a fluorescence in *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer plants subjected to water stress and after rehydration. **Scientia Horticulturae**, [S. l.], v. 184, p. 23–30, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.12.019>

MATSUURA, Hélio Nitta *et al.* Specialized Plant Metabolism Characteristics and Impact on Target Molecule Biotechnological Production. **Molecular Biotechnology**, [S. l.], v. 60, n. 2, p. 169–183, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12033-017-0056-1>

MENDES-SILVA, I.; Lopes, J.C.; Silva, L.V.; Oliveira, M.L.B. 2020a. *Annona* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB110235>>. Acesso em: 10 jan. 2022

MENDES-SILVA, I.; Lopes, J.C.; Silva, L.V.; Oliveira, M.L.B. 2020b. *Annona* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB110243>>. Acesso em: 10 jan. 2022

MORTON, J. F. Atemoya. In: **Fruits of warm climates**. Morton, J.F. Miami, 1987, Cap. 6, p. 72–75

NAIK, Aditi Venkatesh; SELLAPPAN, Krishnan. Chromatographic Fingerprint of Essential Oils in Plant Organs of *Annona muricata* L. (Annonaceae) using HPTLC . **Analytical Chemistry Letters**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 214–226, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/22297928.2020.1763197>

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, [S. l.], v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>

NGUYEN, M. T. *et al.* Determination of the phytochemical screening, total polyphenols, flavonoids content, and antioxidant activity of soursop leaves (*Annona muricata* Linn.). **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, [S. l.], v. 736, n. 6, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1757-899X/736/6/062011>

NOVAES, Paula; FERREIRA, Marcelo J. Pen.; SANTOS, Deborah Yara Alves Cursino dos.

- Flavonols from *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, [S. l.], v. 78, n. April, p. 77–80, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2018.04.006>
- NUGRAHA, Ari Satia *et al.* Anti-infective and anti-cancer properties of the *Annona* species: Their ethnomedicinal uses, alkaloid diversity, and pharmacological activities. **Molecules**, [S. l.], v. 24, n. 23, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules24234419>
- OVILE MIMI, Carolina *et al.* Chemophenetics as a Tool for Distinguishing Morphotypes of *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer. **Chemistry and Biodiversity**, [S. l.], v. 18, n. 10, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100544>
- PAREEK, Sunil *et al.* Postharvest physiology and technology of *Annona* fruits. **Food Research International**, [S. l.], v. 44, n. 7, p. 1741–1751, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.016>
- PEÑA-HIDALGO, Miguel *et al.* Alkaloids from the Leaves of *Annona crassiflora* and Their Cytotoxic Activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S. l.], v. 31, n. 2, p. 244–248, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43450-021-00147-4>
- PHOULIVONG, S. *Colletotrichum* , naming , control , resistance , biocontrol of weeds and current challenges. [S. l.], p. 53–73, 2011.
- PICHERSKY, Eran; LEWINSOHN, Efraim. Convergent evolution in plant specialized metabolism. **Annual Review of Plant Biology**, [S. l.], v. 62, p. 549–566, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103814>
- RABÊLO, S. V. .. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activity of extracts from atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S. l.], v. 36, n. SPEC. EDITION 1, p. 265–271, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452014000500031>
- RABÊLO, Suzana V. *et al.* Alkaloids isolated from the leaves of atemoya (*Annona cherimola* × *Annona squamosa*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 419–421, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.006>
- RINALDI, Maria V. N. *et al.* Alkaloids and biological activity of beribá (*Annona hypoglauca*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 77–83, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.08.006>
- ROJAS, Enith I. *et al.* *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: Multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. **Mycologia**, [S. l.], v. 102, n. 6, p. 1318–1338, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3852/09-244>
- ROY, Arpita. A review on the alkaloids an important therapeutic compound from plants Antibacterial studies of medicinal plant View project. [S. l.], n. September, 2017. Disponível em: www.journalspub.com
- RUBIO-MELGAREJO, Alejandro *et al.* Phytochemical and Antioxidant Dynamics of the Soursop Fruit (*Annona muricata* L.) in response to *Colletotrichum* spp. **Journal of Food Quality**, [S. l.], v. 2020, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2020/3180634>

SÁ, Rafaela Damasceno *et al.* Oxalic acid content and pharmacobotany study of the leaf blades of two species of *Annona* (Annonaceae). **Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, [S. l.], v. 253, n. January, p. 10–16, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.flora.2019.02.011>

SAITO, Maria Lucia; OLIVEIRA, Fernando De. Seasonal Variation of *Annona cacans* Warming Composition. [S. l.], v. 12, 1994.

SÃO JOSÉ, Abel Rebouças *et al.* Atualidades e perspectivas das Anonáceas no mundo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S. l.], v. 36, n. SPEC. EDITION 1, p. 86–93, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452014000500010>

SCHÄFER, Holger; WINK, Michael. Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: Progress in alkaloid biosynthesis. **Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 4, n. 12, p. 1684–1703, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/biot.200900229>

SOUSA, Marília Caixeta *et al.* The production of alkaloids in *Annona cacans* seedlings is affected by the application of GA4+7 + 6-Benzyladenine. **Biochemical Systematics and Ecology**, [S. l.], v. 84, n. April, p. 47–51, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2019.03.007>

STENZEL, Neusa Maria Colauro; MURATA, Ives Massanor; NEVES, Carmen Silvia Vieira Janeiro. Superação da dormência em sementes de atemóia e fruta-do-conde. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 305–308, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-29452003000200031>

TAIZ, Lincon *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. [S. l.: s. n.], v. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 700 p.

TAMFU, Alfred Ngenge *et al.* Antibiofilm, antiquorum sensing and antioxidant activity of secondary metabolites from seeds of *Annona senegalensis*, Persoon. **Microbial Pathogenesis**, [S. l.], v. 144, n. October 2019, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104191>

TAMFU, Alfred Ngenge *et al.* Bioactive constituents from seeds of *Annona senegalensis* Persoon (Annonaceae). **Natural Product Research**, [S. l.], v. 35, n. 10, p. 1746–1751, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1634713>

UDAYANGA, Dhanushka *et al.* What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits? **Fungal Diversity**, [S. l.], v. 61, n. 1, p. 165–179, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0257-2>

VENDRAMIN, Mayara Evelyn *et al.* Chemical constituents from the leaves of *Annona rugulosa* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, [S. l.], v. 49, n. September 2009, p. 152–155, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2013.03.005>

VIEIRA, Willie Anderson Dos Santos *et al.* Optimal markers for the identification of *Colletotrichum* species. **Molecular phylogenetics and evolution**, [S. l.], v. 143, p. 106694, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106694>

VILA-NOVA, Nadjia Soares *et al.* Atividade leishmanicida e citotoxicidade de constituintes químicos de duas espécies de annonaceae cultivadas no Nordeste do Brasil. **Revista da**

Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, [S. l.], v. 44, n. 5, p. 567–571, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011000500007>

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, [S. l.], v. 73, p. 115–180, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3114/sim0011>

WINK, Michael. Plant Secondary Metabolism: Diversity, Function and its Evolution. [S. l.], v. 1, n. 4, p. 9–12, 2008.

XUE, Bine *et al.* A new annonaceae genus, wuodendron, provides support for a post-boreotropical origin of the Asian-neotropical disjunction in the tribe miliuseae. **Taxon**, [S. l.], v. 67, n. 2, p. 250–266, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.12705/672.2>

YANG, Li *et al.* Response of plant secondary metabolites to environmental factors. **Molecules**, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 1–26, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>

ZACARONI, Ana Beatriz *et al.* Desempenho agrônômico de gravioleira (*Annona muricata* L.) sobre diferentes espécies de porta-enxertos. **Cadernos de Agroecologia**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 5, 2014.

4. CAPÍTULO II: Diversidade de alcaloides em acessos de *Annona emarginata* morfotipo terra-fria (araticum de terra-fria) visando seleção de matrizes como porta-enxerto para *Annona x atemoya* (atemoia) var. ‘Thompson’ com tolerância fúngica

Conforme estabelecido pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), os resultados obtidos neste trabalho foram redigidos na forma de artigo. O periódico escolhido foi a revista *Industrial Crops and Products*.

Diversidade de alcaloides em acessos de *Annona emarginata* morfotipo terra-fria (araticum de terra-fria) visando seleção de matrizes como porta-enxerto para *Annona x atemoya* (atemoaia) var. ‘Thompson’ com tolerância fúngica

Gustavo Cabral da Silva e colaboradores

RESUMO – A atemoia (*Annona x atemoya* Mabb.) é um fruto de elevado valor comercial no Brasil e exterior, e que apresenta importante potencial para expansão da fruticultura em áreas tropicais e subtropicais. No entanto, a produção de atemoia é altamente propensa a perdas no campo devido a elevada suscetibilidade a doenças fúngicas, como a antracnose, o que justifica a busca por porta-enxertos tolerantes a este tipo de estresse. A espécie *Annona emarginata* tem proporcionado resultados satisfatórios como porta-enxerto para a atemoia devido a compatibilidade, características fisiológicas de produtividade e tem sido apontada como possível estratégia para reduzir as perdas decorrentes do ataque de patógenos, sendo uma promissora fonte de alcaloides antifúngicos. Neste contexto, a fim de selecionar porta-enxertos promissores de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer morfotipo ‘terra-fria’ para comporem pomar de matrizes para a copa atemoia (*Annona x atemoya* Mabb.), indivíduos adultos e jovens foram investigados quanto a produção de alcaloides totais, perfil de alcaloides por espectrometria de massa (ESI-MS) e RMN (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC) e atividade antifúngica contra *Colletotrichum fructicola* e *C. theobromicola*. As análises permitiram identificar pela primeira vez os alcaloides lisicamina, nornuciferina e oxoxylopina em *Annona emarginata*, além da confirmação dos alcaloides anonaína, asimilobina, liriidenina, reticulina e xylopina anteriormente relatados. Plantas jovens (mudas) apresentam abundância dos alcaloides anonaína e liriidenina e as adultas de reticulina, no entanto, os acessos (jovens e adultos) não diferiram em relação ao perfil dos alcaloides. Em relação ao potencial antifúngico, as amostras de raízes dos acessos 1, 2, 4, 5, 7 e controle (jovens), 2-7 e controle (adultos) de *Annona emarginata* e adultos de *Annona x atemoya* apresentaram maior atividade contra o fungo *C. fructicola*. Para o fungo *C. theobromicola*, os acessos 2, 4 e 5 (jovens), 2 e controle (adultos) de raízes de *Annona emarginata* também apresentaram atividade de inibição. Conclui-se que há estabilidade no perfil de alcaloides entre os acessos de *Annona emarginata*, porém a concentração desses metabólitos varia em função do estágio de desenvolvimento das plantas, além disso os resultados confirmam o uso da *Annona emarginata* como porta-enxerto devido a presença de importantes alcaloides antifúngicos, e destacam alguns acessos promissores devido à tolerância a dois importantes fungos relacionados a antracnose.

Palavras chave: Annonaceae, bioatividade, liriodenina, metabolismo especializado, produção de mudas, planta matriz.

Alkaloid diversity in accessions of *Annona emarginata* morphotype terra-fria (terra-fria araticum) aiming selection of matrices as rootstock for *Annona* x *atemoya* (atemoia) var. 'Thompson'

Gustavo Cabral da Silva and collaborators

ABSTRACT – The atemoya (*Annona* x *atemoya* Mabb.) is a fruit of high commercial value in Brazil and abroad, and which has important potential for expanding fruit production in tropical and subtropical areas. However, atemoya production is highly prone to field losses due to its high susceptibility to fungal diseases such as anthracnose, which justifies the search for rootstocks tolerant to this type of stress. The species *Annona emarginata* has provided satisfactory results as a rootstock for atemoya due to compatibility, physiological characteristics of productivity and has been identified as a possible strategy to reduce losses resulting from the attack of pathogens, being a promising source of antifungal alkaloids. In this context, in order to select promising rootstocks of *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer morphotype 'terra-fria' to compose a matrix orchard for the atemoya canopy (*Annona* x *atemoya* Mabb.), adult and juvenile individuals were investigated. as for the production of total alkaloids, alkaloid profile by mass spectrometry (ESI-MS) and NMR (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC and HMBC) and antifungal activity against *Colletotrichum fructicola* and *C. theobromicola*. The analyzes made it possible to identify for the first time the alkaloids lysicamine, nornuciferine and oxoxylopine in *Annona emarginata*, in addition to confirming the previously reported alkaloids anonaine, asimilobin, liriodenine, reticulín and xylopine. Young plants (seedlings) present an abundance of anonaine and liriodenine alkaloids and the adults of reticulín, however, the accessions (young and adults) did not differ in relation to the alkaloid profile. Regarding the antifungal potential, root samples from accessions 1, 2, 4, 5, 7 and control (young), 2-7 and control (adults) of *Annona emarginata* and adults of *Annona* x *atemoya* showed greater activity against the fungus *C. fructicola*. For the fungus *C. theobromicola*, accessions 2, 4 and 5 (young), 2 and control (adults) of *Annona emarginata* roots also showed inhibition activity. It is concluded that there is stability in the alkaloid profile among the accessions of *Annona emarginata*, however the concentration of these metabolites varies according to the stage of development of the plants, in addition the results confirm the use of *Annona emarginata* as rootstock due to the presence of important antifungal alkaloids, and highlight some promising accessions due to tolerance to two important fungi related to anthracnose.

Keywords: Annonaceae, bioactivity, liriodenine, mother plant, seedling production, specialized

metabolism.

4.1. Introdução

A diversidade de organismos vegetais no ambiente terrestre confere características próprias a cada espécie, que têm forte influência do metabolismo especializado das plantas. Os metabólitos especializados contribuem para a manutenção e sobrevivência do organismo vegetal, exibindo respostas de defesa a estresse biótico e abiótico, de sustentação, e como atrativo ou repelente a insetos (WINK, 2008). Diferente do metabolismo primário que é comum aos vegetais, o metabolismo especializado é específico a determinados grupos de plantas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; WINK, 2008).

Na família Annonaceae um dos principais grupos de metabólitos encontrados é o dos alcaloides, com relatos de cerca de 934 alcaloides, dos quais aproximadamente 99 apresentam atividades biológicas (DE-LA-CRUZ-CHACÓN *et al.*, 2019; LEVORATO VINCHE *et al.*, 2020; LÚCIO *et al.*, 2015) e possuem importante papel nas funções fisiológicas, ecológicas e/ou evolutivas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; WINK, 2008).

O gênero *Annona*, economicamente importante devido ao valor comercial dos frutos, apresenta abundância de alcaloides, com 70 compostos relatados em diferentes espécies e destes, menos de 30% foram investigados quanto a sua atividade biológica, o que confere excelente campo a ser explorado (EGYDIO-BRANDÃO; NOVAES; SANTOS, 2017). Alguns exemplos de espécies com estudos de alcaloides são a *Annona cacans* (SAITO; OLIVEIRA, 1994; SOUSA *et al.*, 2019a), *Annona macrophyllata* ($\equiv$ *Annona diversifolia*) (DE LA CRUZ-CHACÓN *et al.*, 2011; DE LA CRUZ CHACÓN; GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2012), *Annona x atemoya* Mabb. (RABÊLO *et al.*, 2015), *Annona pickelii* (DUTRA *et al.*, 2012), *Annona rugulosa* (VENDRAMIN *et al.*, 2013), *Annona foetida* (COSTA *et al.*, 2011a), *Annona crassiflora* (HONÓRIO *et al.*, 2021), *Annona sylvatica* (CORRÊA *et al.*, 2022) e *Annona emarginata* morfotipos terra-fria e mirim (OVILE MIMI *et al.*, 2021).

A abundância e diversidade de alcaloides no gênero *Annona* sugere estudos para a compreensão das relações fisiológicas, ecológicas e/ou evolutivas das diferentes espécies com o meio (DURÁN-RUIZ *et al.*, 2019) e representa importante alternativa na prospecção por moléculas bioativas, tanto de interesse medicinal (LEVORATO VINCHE *et al.*, 2020) como agrônomico, visando a indústria de agroquímicos e o manejo fitossanitário das culturas. Além disso, a bioprospecção por novas moléculas bioativas é importante ferramenta na busca por espécies que apresentem maior tolerância a estresses bióticos, e que possam ser empregadas como porta-enxerto para espécies comerciais suscetíveis a patógenos (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 2014).

A atemoia (*Annona x atemoya* Mabb.) apresenta elevado valor comercial no mercado

interno e externo devido a qualidade dos frutos (AL-GHAZZAWI, 2019; ANAYA-ESPARZA *et al.*, 2020; CHOWDHURY *et al.*, 2021; LEITE *et al.*, 2020; NUGRAHA *et al.*, 2019), que possuem polpa doce (cerca de 31 °Brix), cremosa, de sabor perfumado, com alto teor de carboidratos, ácidos ascórbicos e nutrientes (LI *et al.*, 2019; PAREEK *et al.*, 2011). A propagação da atemoia é realizada por enxertia, com clones selecionados, a fim de garantir as características agrônômicas das espécies comerciais. E devido a elevada suscetibilidade à pragas e doenças (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 2014) a busca por porta-enxertos tolerantes tornou-se uma constante para reduzir os prejuízos decorrentes do ataque de patógenos (ZACARONI *et al.*, 2014). Deste modo, encontrar espécies ou acessos que apresentem tolerância a estresse biótico é imprescindível para a formação de pomares com *pool* de matrizes seletas, destinadas a produção de porta-enxertos para espécies comerciais.

Espécies como *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer morfotipo ‘terra-fria’, *A. mucosa*, *A. squamosa* e *A. glaba* foram avaliadas como porta-enxertos para atemoia (BARON; GIMENEZ; FERREIRA, 2018; DE ALMEIDA; DE ALENCAR; YAMANISHI, 2010; LEITE *et al.*, 2013). A *A. emarginata* (morfotipo ‘terra-fria’) destaca-se por apresentar tolerância a estresses abióticos, como solos secos e diferentes adaptações ambientais e elevada compatibilidade com a atemoia (BARON *et al.*, 2017, 2019; MANTOAN *et al.*, 2016), além de relatos de tolerância a diversos patógenos que atacam a raiz e o colo da planta (BETTIOL NETO *et al.*, 2006). No entanto, embora existam citações de que *A. emarginata* é tolerante a estresse biótico e de que biossintetiza alcaloides como anonaína, asimilobina, liriodenina e reticulina (FÉVRIER *et al.*, 1999; NIETO, 1986; OVILE MIMI *et al.*, 2021), até o momento não foram encontrados relatos de atividade biológica com extratos desta espécie contra fungos fitopatogênicos que causam danos em *Annona*.

A antracnose, doença causada por fungos do gênero *Colletotrichum* spp., é uma das principais doenças que acometem as anonas (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 2014). Os fungos *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. (DE-LA-CRUZ-CHACÓN *et al.*, 2019), bem como *C. fructicola* e *C. theobromicola* prevalentes em Alagoas (COSTA *et al.*, 2019), são exemplos que provocam danos em pomares de *Annona* spp. Alcaloides extraídos de *Annona purpurea* e extrato aquoso de *Annona reticulata* apresentaram respostas positivas na inibição de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. (BAUTISTA-BAÑOS; HERNÁNDEZ-LÓPEZ; BARRERA-NECHA, 2000; DE-LA-CRUZ-CHACÓN *et al.*, 2019).

Com base no exposto, o objetivo deste trabalho foi encontrar diferenças na produção de alcaloides em acessos (indivíduos) de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer morfotipo ‘terra-fria’, a fim de selecionar porta-enxertos para compor plantio de matrizes para a copa atemoia (*Annona x atemoya* Mabb.) e que apresentem tolerância a estresses bióticos, como aos fungos

Colletotrichum fructicola e *C. theobromicola*; o que também poderá ser importante para o isolamento de moléculas bioativas promissoras para a indústria agrícola ou farmacêutica.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Material vegetal e delineamento experimental

O experimento foi iniciado a partir da seleção de 8 (oito) acessos de plantas adultas de araticum de terra-fria (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer' morfotipo "terra-fria"]) realizada pelos técnicos responsáveis pelo viveiro da Coordenadoria de Assistência Técnica e Integral (CATI) em São Bento do Sapucaí – SP, em área com aproximadamente 250 matrizes, que são usadas anualmente como porta-enxerto para a enxertia de atemoia (*Annona x atemoya* Mabb. var. 'Thompson').

Para a seleção dos acessos adultos foi observado o vigor das plantas, a capacidade de produção de frutos e a ausência de doenças durante aproximadamente 10 anos. De cada um dos acessos foram coletadas sementes e produzidas mudas.

Das plantas adultas e das mudas foram coletadas raízes e folhas que foram secas em temperatura ambiente (25°C +/- 2 °C) por 15 dias e armazenadas até a realização das análises referentes a quantificação de alcaloides totais, identificação de alcaloides e testes de bioatividade.

Além dos acessos, raízes e folhas de plantas adultas de atemoia (*Annona x atemoya* Mabb. var. 'Thompson') enxertadas em araticum de terra-fria foram coletadas no Sítio Paraizinho em Pardinho – SP para as análises de composição de alcaloides e teste de bioatividade.

Todas as plantas foram marcadas em campo e georreferenciadas com auxílio de GPS (GPSMAP® 62 - GARMIN). O material vegetal está depositado no Herbário "Irina Delanova Gemtchujnicov" (BOTU), Instituto de Biociências (IB), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) Câmpus Botucatu, sob o registro N° 28233 (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer' morfotipo 'terra-fria') e N° 27600 (*Annona x atemoya* Mabb. var. Thompson).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 36 tratamentos, em esquema fatorial 9 x 2 x 2 (9 acessos de *Annona emarginata* x 2 estádios de desenvolvimento – plantas adultas e jovens x 2 órgãos - raízes e folhas) e 4 (quatro) repetições.

Os tratamentos denominados de acessos, foram constituídos de 8 (oito) plantas adultas previamente selecionadas (acessos) e um controle, constituído por *pool* de 20 plantas

aleatórias do pomar. Este controle foi empregado para caracterizar a atividade realizada no viveiro.

As plantas jovens foram oriundas da germinação de sementes de cada uma das 8 plantas de *Annona emarginata* selecionadas. E o controle foi obtido a partir da coleta de sementes das 20 plantas de *Annona emarginata* aleatórias. A semeadura (abril de 2020) foi realizada em canteiros de areia e posteriormente foi realizado o transplante (junho/julho de 2020) para sacolas com volume de 2 L contendo substrato comercial a base de casca de pinus. No momento da coleta do material as mudas estavam com 12 meses.

As plantas enxertadas (copa atemoia ‘Thompson’ e porta-enxerto araticum de terra-fria) foram empregadas como forma de avaliar se haveria alterações na composição de alcaloides em raízes e folhas das plantas em pomar comercial. As amostras foram coletadas a partir de “pool” de 20 plantas.

4.2.2. Teste de germinação

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 9 x 2 (8 acessos + controle x água destilada (H₂O) e ácido giberélico (GA₃)) com 4 repetições de 25 sementes por tratamento. Os tratamentos foram constituídos por sementes de araticum de terra-fria obtidas dos 8 acessos e sementes utilizadas como controle de matrizes aleatórias de mesma espécie, embebidas em H₂O e GA₃ (ProGibb® 400) na concentração de 500 mg L⁻¹, por 36 h (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010) com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro em condições de temperatura alternada (20 °C e 30 °C). Após o processo de embebição por 36 horas, as sementes foram acondicionadas em rolos de papel de germinação (Germitest) umedecidos com 2,5 vezes a massa do papel e mantidas em germinadores com as condições estipuladas nos tratamentos (fotoperíodo e temperatura). Foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem e tempo médio de germinação (CARVALHO; NASCIMENTO; MÜLLER, 2000).

4.2.3. Teste preliminar para obtenção de maior diversidade de alcaloides

O método de extração por partição ácido-base proposto por De la Cruz-Chacon *et al.* (2012) foi modificado a fim de obter a maior diversidade de alcaloides por extrato alcaloidal. Essa modificação ocorreu pela variação de pH do método. O método proposto de extração ácido-base utiliza solventes ácidos como, o clorofórmio e ácido clorídrico a 1 M, sendo que o extrato acidificado é alcalinizado até pH 9,5 e depois reextraído com clorofórmio.

Por apresentarem afinidade por solventes ácidos, os alcaloides são facilmente extraídos com clorofórmio, se apresentando de forma cristalizada. A elevação do pH faz com que os alcaloides deixem de cristalizar e retornem à sua forma livre no meio (BARRETO *et al.*, 2006), facilitando o processo de extração que pode variar entre pH 7-11 (BARBOSA; TAVARES; SOARES, 2003). O método de extração proposto por De la Cruz-Chacón *et al.*, (2012), extrai com maior seletividade o alcaloide liriodenina em pH 9,5, porém existem outros compostos nitrogenados que podem ser extraídos em diferentes pH. Barbosa, Tavares e Soares (2003) extraíram alcaloides por partição líquido-líquido com clorofórmio em pH 7, pH 8 e pH 11, sendo que o pH 7 mostrou-se interessante por apresentar maior massa. Devido a isso a modificação no método ocorreu na etapa de alcalinização com carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3), sendo realizados testes para pH 9,5 e pH 7.

4.2.4. Extração e quantificação de alcaloides totais

As raízes e folhas de mudas e plantas adultas dos 8 acessos e controle de *Annona emarginata* foram coletadas para a extração e quantificação de alcaloides totais, sendo quatro repetições de cada tratamento. Os alcaloides foram extraídos das amostras empregando-se o método ácido-base, proposto por De la Cruz-Chacon *et al.*, (2012) (modificado). As amostras, depois de secas, foram moídas a fim de aumentar a superfície de contato e posteriormente carbonatadas com solução saturada de carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3) e deixadas secar totalmente em estufa a 35 °C. Os alcaloides foram extraídos com clorofórmio (CHCl_3) em agitação por 2 h e depois filtrados. A fase clorofórmica foi extraída com solução de ácido clorídrico (HCl) a 1 M e depois alcalinizadas com Na_2CO_3 até atingir valor de pH 7. Novamente foi reextraído com CHCl_3 e deixado evaporar em temperatura ambiente no escuro até análises futuras.

Após a evaporação completa do CHCl_3 as amostras foram diluídas com um volume conhecido de mesmo solvente e avaliado em espectrofotômetro com fonte de luz ultravioleta e o conteúdo total de alcaloides foi determinado por espectrofotometria a 254 nm utilizando liriodenina como padrão na elaboração da curva padrão ($y = 0,0881x - 0,0112$, $R^2 = 0,9949$).

4.2.5. Análise por ESI-MS dos extratos de *Annona* spp. e tratamento quimiométrico dos dados

As análises de espectrometria de massa de ionização por eletrospray (ESI-MS) foram realizadas no Laboratório de Cromatografia Líquida e Espectrometria de Massas (LABCEM)

da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) em colaboração com o Prof. Dr. Felipe Moura Araujo da Silva. As soluções estoque (1 mg mL^{-1}) das frações alcalóidicas foram preparadas em metanol. Alíquotas ($5 \text{ }\mu\text{L}$) das soluções estoque foram posteriormente diluídas a $5 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo as soluções resultantes analisadas por infusão direta no espectrometro de massas modelo LCQ Fleet, equipado com fonte de ESI e operando no modo positivo de aquisição para as análises de ESI-MS e ESI-MSn (SILVA *et al.*, 2016, SILVA-FILHO *et al.*, 2021). Os espectros foram obtidos a partir da média de pelo menos 10 espectros adquiridos. As condições analíticas da análise foram as seguintes: spray voltage, 5 kV; sheath gas, 10 arb; auxiliary gas, 5 arb; sweep gas, 0 arb; capillary temp, $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$; capillary voltage, 40 V; tube lens, 115 V; mass range, m/z 150 a 500; colision gas, He. Os espectros de ESI-MSn foram obtidos a partir da aplicação de energia de 20 a 30%.

4.2.6. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de uni (1D) e bidimensionais (2D) foram realizados na Central Analítica de Fármacos, Medicamentos e Alimentos (CAFMA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) em colaboração com o Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida e registrados em equipamento modelo Bruker™ Ascend III, operando a 9,4 Tesla, observando os núcleos de ^1H e ^{13}C a 400 e 100 MHz, respectivamente. O espectrômetro de RMN foi equipado com sonda de detecção direta multinuclear (BBO) de 5 mm com gradiente no eixo z.

Os experimentos de RMN de ^1H foram realizados utilizando os seguintes parâmetros de aquisição: sequência de pulsos zg30, tempo de espera (D1) de 2,0 s, 64 transientes (NS), 64k número de pontos (TD) distribuídos em uma janela espectral de 20.0254 ppm, resultando em tempo de aquisição (AQ) de 4,09 s e temperatura de 298 K. A sintonia (*matching* e *tuning*) para o ^1H e o ajuste da homogeneidade do campo magnético espacialmente (*shimming*) foram realizados para cada análise. O tempo experimental total foi de aproximadamente 15 minutos para cada amostra. Os espectros foram processados no programa TOPSPIN com 64k pontos aplicando-se uma multiplicação exponencial dos FIDs por um fator de 0,3 Hz. Os deslocamentos químicos foram calibrados em relação ao sinal do TMS (δ 0,0 ppm).

Por fim, os experimentos de correlação direta HSQC e à longa distância HMBC foram otimizadas para constantes de acoplamento média $^1J_{(\text{C,H})}$ e $^{\text{LR}}J_{(\text{C,H})}$ de 140 e 8 Hz, respectivamente. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) utilizando o tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm (δ), as constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hertz (Hz) e as

multiplicidades dos sinais foram indicadas segundo a convenção: simpleto (s), duplete (d), duplo duplete (dd), duplo duplo duplete (ddd), tripleto (t), entre outros.

4.2.7. Análises quimiométricas

Para a análise quimiométrica, os deslocamentos químicos foram referenciados em relação ao sinal do TMS em δ 0,00, e os espectros de RMN de ^1H tiveram a linha de base e fase corrigidas manualmente no software TopSpin. Para os dados de RMN, as variáveis de entrada nas análises quimiométricas foram comumente determinadas através dos *buckets* que consistiu na divisão dos espectros em intervalos de 0,05 ppm, onde a região espectral de 0,60-10,00 ppm foi selecionada para análise quimiométrica. A área de cada intervalo foi calculada empregando o modo especial de integração do programa AMIX e normalizados em relação a área total dos sinais. As regiões correspondentes aos sinais residuais de CDCl_3 (δ 7,24 -7,28) e acetona (δ 2,14-2,20) foram excluídas antes da análise multivariada.

O conjunto de espectros foi transformado em uma matriz de dados contendo as áreas dos *buckets* de cada um dos espectros das amostras, resultando em uma matriz inicial composta por 144 amostras (linhas) e 187 variáveis (colunas). A referida matriz de dados foi submetida à análise estatística pelo método de PCA utilizando o autoescalamento como pré-processamento. A análise do gráfico de *scores* obtido na análise de PCA, foi possível observar o agrupamento ou discriminação das amostras (folhas e raízes das mudas e indivíduos adultos) de *Annona emarginata*, enquanto o gráfico de *loadings* permitiu visualizar sinais (compostos) relevantes nos gráficos de *scores*, o que possibilitou correlacionar os resultados com a informação química entre os diferentes tratamentos e partes da planta.

4.2.8. Teste de bioatividade

Os ensaios de bioatividade, foram realizados na Unidade Laboratorial de Referência em Biologia Molecular Aplicada do Instituto Biológico de São Paulo em colaboração com o Prof. Dr. Ricardo Harakava, para identificação do efeito inibitório dos extratos de raízes de *Annona emarginata* e *Annona x atemoya* contra cepas fúngicas de *Colletotrichum fructicola* e *C. theobromicola*, baseando-se no método de microplacas proposto por Casado *et al.*, (2018) (modificado). O método permite resposta rápida e eficiente do crescimento fúngico a partir da medição de absorbância de luz que resulta da variação da turbidez do meio. Dessa forma, para obtenção da suspensão de conídios de *C. fructicola* e *C. theobromicola*, os fungos foram cultivados em placas de Petri com meio BDA (batata-dextrose ágar), em BOD por 4 dias a 24

°C, sob fotoperíodo de 12 h. À colônia fúngica foi acrescida de água Milli-Q e raspada com auxílio de alça de Drigalski. A suspensão foi filtrada para retenção do micélio. A concentração da suspensão foi avaliada por contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico com aumento de 150 x.

Os extratos de raízes de *Annona emarginata* (indivíduos jovens e adultos) e *A. x atemoya* (indivíduos adultos - enxertado) e liriodenina na concentração de 1 mg mL⁻¹ foram depositados em microplacas de ELISA (em triplicatas – 3 poços) sendo que cada poço continha a suspensão dos conídios (40 µL), caldo BDA concentrado 2x (50 µL) os extratos e a liriodenina (10 µL) (controle positivo foi utilizado metanol 10% no lugar do extrato e o controle negativo foi utilizado 50 µL do meio BDA concentrado 2x e 50 µL de metanol 2%). A incubação foi realizada em BOD a 24 °C, com 12 h de fotoperíodo, por 72 h. Após esse período, as absorbâncias a 620 nm foram medidas em leitor de microplaca (Multiskan FC Microplate Photometer, Thermo Scientific) (CASADO et al., 2018).

A liriodenina empregada no teste de bioatividade foi obtida a partir de raízes de *Annona emarginata* (3,772 Kg de massa seca e moída) coletadas em área de produção comercial em Botucatu – SP. O alcaloide foi extraído a partir do método proposto por De la Cruz-Chacon *et al.*, (2012) e purificado por cristalizações fracionadas utilizando clorofórmio como solvente. O isolamento da liriodenina se deu a partir de placas preparativas TLC (cromatografia em camada fina), utilizando como fase móvel clorofórmio:metanol (9:1). A liriodenina isolada foi diluída em clorofórmio e separada da sílica por filtração, tendo rendimento de 2,02 g (Apêndice A).

4.2.9. Análise dos resultados

Os dados de alcaloides totais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o software SigmaPlot (Versão 12.5) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$) (COSTA *et al.*, 2003).

A análise multivariada dos dados obtidos a partir das análises por ESI-MS foi realizada através do software Chemoface versão 1.5 (NUNES *et al.*, 2012). Íons com intensidade abaixo de 5% relativa aos íons mais abundantes foram negligenciados, durante a análise dos dados (SCHIOZER *et al.*, 2012). A análise de componentes principais (PCA) foi calculada através da variação dos íons registrados (variáveis), sendo a análise de HCA calculada através da distância euclidiana e média de ligação das quatro principais componentes.

Para a análise quimiométrica de RMN, os deslocamentos químicos foram referenciados em relação ao sinal do TMS em δ 0,00, e os espectros de RMN de ¹H tiveram a linha de base e fase corrigidas manualmente no software TopSpin. Para os dados de RMN, as variáveis de

entrada nas análises quimiométricas foram comumente determinadas através dos buckets que consistiu na divisão dos espectros em intervalos de 0,05 ppm, onde a região espectral de 0,60 - 10,00 ppm foi selecionada para análise quimiométrica. A área de cada intervalo foi calculada empregando o modo especial de integração do programa AMIX e normalizados em relação a área total dos sinais. As regiões correspondentes aos sinais residuais de CDCl₃ (δ 7,24 -7,28) e acetona (δ 2,14-2,20) foram excluídas antes da análise multivariada.

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Teste de germinação

A aplicação de giberelinas é comum em sementes de espécies da família Annonaceae para superar a dormência, por alterar o balanço hormonal entre o Ácido Abscísico (ABA) e as Giberelinas (GAs) e promover a síntese de enzimas hidrolíticas que degradam reservas da semente, disponibilizando energia para o desenvolvimento do embrião e consequente germinação (FERREIRA; DE-LA-CRUZ-CHACÓN; GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2016, 2020). Durante as 36 horas de embebição, período no qual há a ativação do metabolismo germinativo (COSTA; BUENO; FERREIRA, 2011; DE OLIVEIRA *et al.*, 2010; STENZEL; MURATA; NEVES, 2003), foi possível observar que a porcentagem e tempo médio de germinação de sementes de *Annona emarginata*, sob os fatores de embebição em H₂O e GA₃, não obtiveram uma variação significativa entre os tratamentos (acessos e controle) em função da embebição, porém alguns acessos apresentaram maior germinabilidade e menor tempo médio de germinação que outros, independentemente do tipo de embebição (Tabela 1).

Dentre as sementes obtidas pelos 8 acessos de *Annona emarginata* e sementes controle, o teste de germinação demonstrou melhor resposta quando observamos os resultados dos acessos 2, 4 e controle, atingindo valores de 58%, 50% e 46%, respectivamente, quando embebidas em H₂O e 58%, 45% e 49%, respectivamente, quando embebidas em GA₃ (Tabela 1). Diferindo do acesso 6, que obteve menor porcentagem de germinação (6%) quando embebida em GA₃ e do acesso 7 que apresentou menor porcentagem de germinação (9%) quando embebido em H₂O. Dessa forma, podemos indicar que os acessos 2 e 4, que demonstraram bons resultados de germinação, o que pode favorecer a escolha das plantas matrizes para a extração de sementes e produção dos porta-enxertos para copa de *Annona x atemoya* Mabb.

Os valores de tempo médio de germinação apresentaram valores significativos entre as diferentes soluções de embebição apenas para os acessos 1 e 6, sendo que as sementes

embebidas por 36 h em giberelina, apresentaram um menor tempo médio de germinação (Tabela 2).

Tabela 1. Germinabilidade (Porcentagem de germinação - % G; Tempo médio de germinação – TMG (dias)) de sementes de diferentes acessos e controle de *Annona emarginata*, embebidas por 36 h (H₂O ou GA₃) em temperatura alternada (20-30 °C), com fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuro.

Tratamentos	Germinabilidade			
	% G		TMG (dias)	
	H ₂ O	GA ₃	H ₂ O	GA ₃
Acesso 1	22 Acd ^a	11 Bde	27,599 Aab	10,125 Bbc
Acesso 2	58 Aa	58 Aa	18,770 Abd	13,757 Abc
Acesso 3	12 Ade	16 Ad	24,083 Abc	17,570 Abc
Acesso 4	50 Aa	45 Aab	10,700 Acd	4,756 Ac
Acesso 5	34 Abc	35 Abc	11,754 Acd	3,328 Ac
Acesso 6	15 Ad	6,6 Bde	19,021 Abd	5,041 Bbc
Acesso 7	9 Ade	14 Ad	26,063 Abc	20,208 Aab
Acesso 8	30 Ac	31 Ac	8,170 Ad	8,994 Abc
Controle	46 Aab	49 Aa	14,942 Abd	7,860 Abc

^aMédias seguidas de mesma letra, maiúsculas (solução de embebição em cada tratamento (acessos e controle)), e minúsculas (tratamento em cada solução de embebição), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.3.2. Teste de pH para obtenção de maior diversidade de alcaloides

Os resultados (Figuras 1 e 2) indicam que, dentre os padrões de alcaloides analisados, o extrato de alcaloide extraído em pH 7 confere uma maior diversidade de alcaloides, quando comparado ao extrato de alcaloide extraído em pH 9,5. Em pH 7 foi possível identificar os alcaloides norpredicentina, norglaucina, discretina, xilopinina, xilopina, assimilobina, laurotetanina, liriodenina e lanuginosina; Em pH 9,5 foi possível identificar os alcaloides liriodenina, xilopinina e lanuginosina.

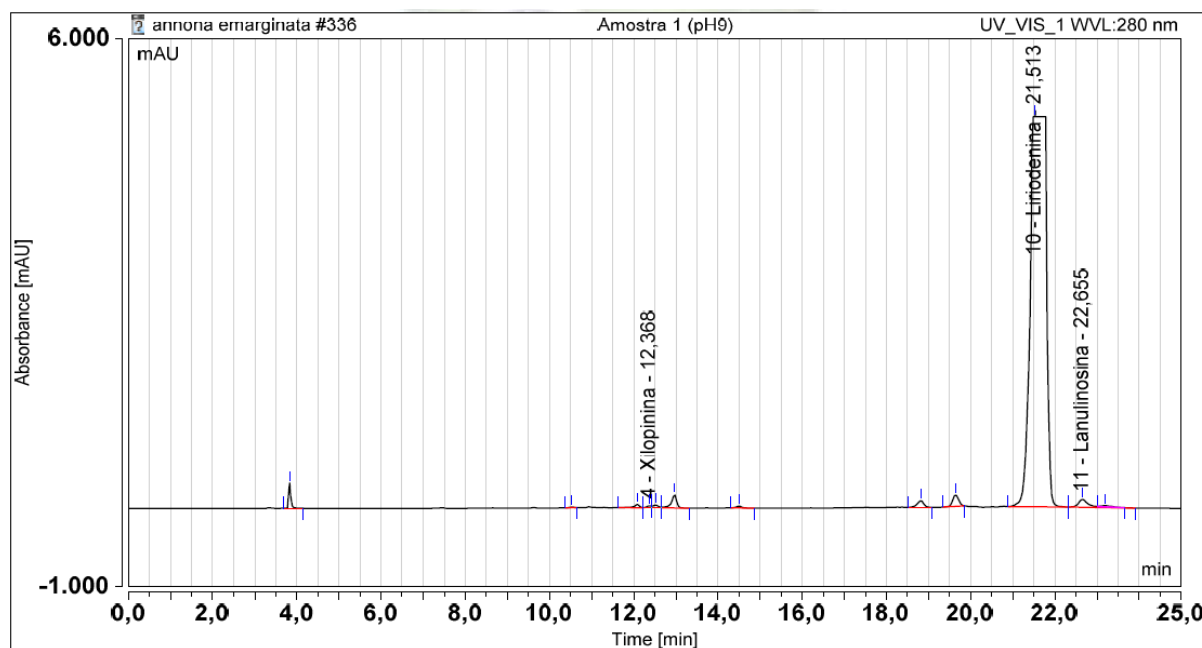


Figura 1. Cromatograma obtido durante análise de extração de alcaloides em pH 9 de cascas de raízes de *Annona emarginata*

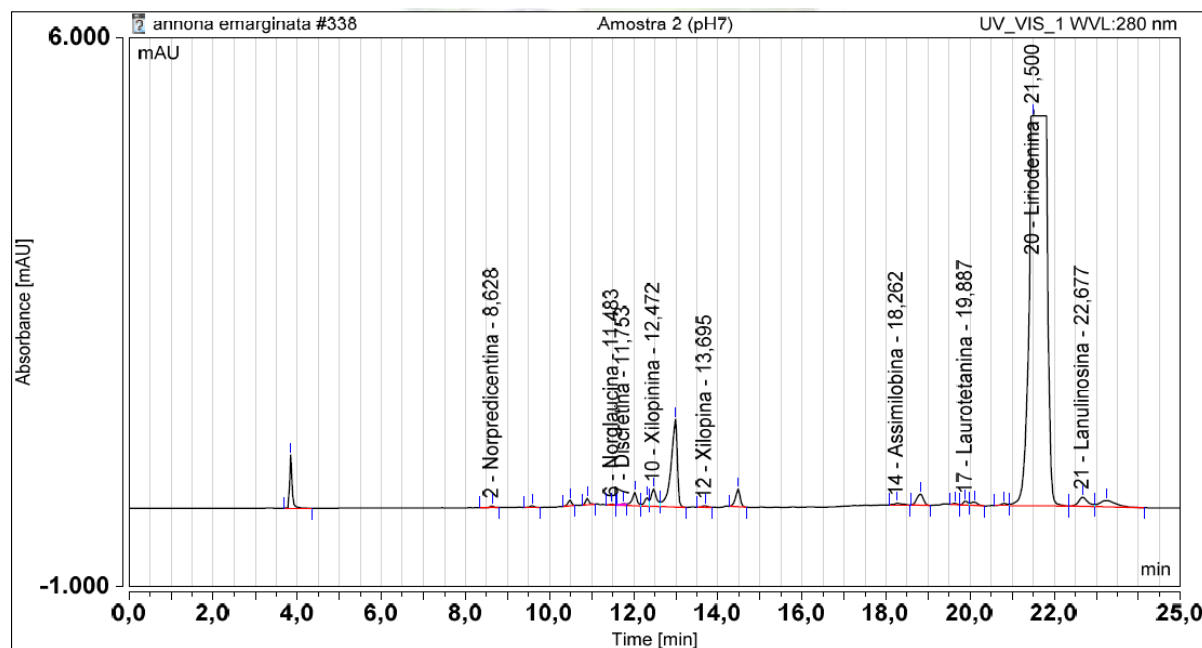


Figura 2. Cromatograma obtido durante análise de extração de alcaloides em pH 7 de cascas de raízes de *Annona emarginata*

Essa diversidade de alcaloides em extratos extraídos em pH 7 ocorre devido a baixa seletividade do método de extração de alcaloides que tem como foco a extração da liriodenina, dessa forma outras moléculas passam a ser identificadas, o que nos confere um ótimo ensaio de extração, corroborando com resultados obtidos por Barbosa, Tavares e Soares (2003), e que pode promover uma melhor resposta a ser obtida nos testes de bioatividade com cepas de

Colletotrichum fructicola e *C. theobromicola*, devido a presença e possível atividade de outras moléculas além da liriodenina, justificando a adaptação do método proposto por De la Cruz-Chacon *et al.* (2012).

4.3.3. Quantificação de alcaloides totais

As raízes de *Annona emarginata* apresentaram interações significativas em relação a quantificação de alcaloides totais entre os acessos e controle dos indivíduos jovens e adultos da espécie. Raízes dos acessos 5 e 7 de indivíduos adultos de *Annona emarginata*, apresentaram maiores concentrações de alcaloides totais ($276,774 \mu\text{g g}^{-1}$ e $199,298 \mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente), enquanto o tratamento controle apresentou a menor concentração de alcaloides totais ($6,386 \mu\text{g g}^{-1}$), dentre os indivíduos adultos (Tabela 2). Valores semelhantes aos acessos de indivíduos adultos de *Annona emarginata* também foram demonstrados em estudos realizados por Olive Mimi *et al.*, (2021) e De la Cruz-Chacón *et al.*, (2019), avaliando a concentração de alcaloides totais em raízes de indivíduos adultos de *Annona emarginata* e *Annona purpurea*, respectivamente.

Por outro lado, alguns acessos apresentaram diferenças estatísticas em relação a concentração de alcaloides totais em função do estágio de desenvolvimento. O controle apresentou maior concentração de alcaloides totais nas raízes de indivíduos jovens ($70.216 \mu\text{g g}^{-1}$), quando comparado ao controle do indivíduo adulto ($6.386 \mu\text{g g}^{-1}$) (Tabela 2). E entre os acessos 5 e 7 de indivíduos adultos, ambos diferiram estatisticamente quando comparados a seus indivíduos jovens ($29.684 \mu\text{g g}^{-1}$ e $40.815 \mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente). Dessa forma a concentração de alcaloides totais pode ser influenciada pelo estágio de desenvolvimento da planta (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; HÖFT; VERPOORTE; BECK, 1998), conforme observado nos acessos 5 e 7 dos indivíduos adultos e controle de indivíduos jovens, no entanto não foi o observado nos demais acessos.

Tabela 2. Concentração de alcaloides totais ($\mu\text{g g}^{-1}$ massa seca) em raízes de diferentes acessos e controle de indivíduos jovens e adultos de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer morfotipo ‘terra-fria’.

Extratos Alcaloídicos	Concentração de Alcaloides Totais	
	Indivíduos Jovens	Indivíduos Adultos
Acesso 1	41.513 Ab ^a	69.242 Ac
Acesso 2	48.447 Abc	31.401 Acd
Acesso 3	18.633 Ad	36.725 Acd
Acesso 4	76.739 Aab	53.695 Ac
Acesso 5	29.684 Bc	276.774 Aa
Acesso 6	40.292 Abc	35.076 Acd
Acesso 7	40.815 Bbc	199.798 Ab
Acesso 8	37.030 Abc	29.282 Acd
Controle	70.215 Aabc	6.386 Bd

Acessos: $P = < 0.001$; $F = 38.000$; Estádio de desenvolvimento: $P = < 0.001$; $F = 61.508$;

Interação: $P = < 0.001$; $F = 49.286$

^aMédias seguidas de mesma letra, maiúsculas comparando os estádios de desenvolvimento (linha) e minúsculas comparando acessos (coluna), não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados referentes aos alcaloides totais de folhas foram inconsistentes e portanto não serão apresentados.

4.3.4. Análise por ESI-MS das frações alcaloídicas e tratamento quimiométrico dos dados

A infusão direta de massa positiva das frações alcaloídicas de m/z 150 a 500 das amostras de raízes de *Annona emarginata* (indivíduos jovens e adultos) e *Annona x atemoya* enxertada em *A. emarginata* (indivíduos adultos) revelou vários íons com valores pares de m/z entre 200 e 400, destacando-se os íons majoritários de m/z 266, 268, 276, 282, 292, 296, 306 e 330 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (Apêndices B-I), sugerindo a presença de alcaloides em grande parte das amostras. Esta proposta foi baseada em estudos anteriores com diferentes alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos (DA SILVA *et al.*, 2017; DE LIMA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2016).

Esses íons majoritários e suas abundâncias relativas foram submetidos a análises de PCA e HCA. Os picos base correspondentes aos íons 266 e 276 $[\text{M} + \text{H}]^+$ foram responsáveis por agrupar as amostras de raízes de todos os indivíduos jovens dos diferentes acessos de *A. emarginata*, enquanto o pico base correspondente ao íon 330 $[\text{M} + \text{H}]^+$ foi responsável por agrupar as amostras de raízes dos indivíduos adultos dos diferentes acessos de *A. emarginata*.

(exceto dos acessos 01, 06 e controle) e *A. x atemoya* (enxertada) (Figura 3). E a partir da análise dos espectros MSⁿ desses íons (Apêndices B-I) foram observadas fragmentações chave previamente descritas para os alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos (DA SILVA *et al.*, 2017; DE LIMA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2016).

O íon de m/z 266 $[M + H]^+$ analisado a partir dos espectros MSⁿ apresentou forte evidência de esqueleto aporfínico, contendo um grupo metilenodióxi e a presença do grupo N-metil. Uma perda inicial de 17 ($-NH_3$) (m/z 266 $\rightarrow$ 249, Apêndice B), seguida por perda subsequente de 30 (CH_2O) (m/z 249 $\rightarrow$ 219, Apêndice B) e 28 ($-CO$) (m/z 219 $\rightarrow$ 191, Apêndice B) foi observada no espectro, reforçando a proposta estrutural do alcaloide aporfínico anonaína (DE LIMA *et al.*, 2020). A fragmentação do íon de m/z 276 $[M + H]^+$ e seu pico base em m/z 248 analisado a partir do espectro MS² indica a perda inicial de 28 ($-CO$) (m/z 276 $\rightarrow$ 248, Apêndice C) presente em sua estrutura, considerada uma molécula estável de esqueleto oxoaporfínico o alcaloides liriodenina (DA SILVA *et al.*, 2017; DE LIMA *et al.*, 2020). Dessa forma as moléculas de anonaína e liriodenina tiveram maior abundância (concentração) em todos os acessos e controle de *Annona emarginata* (indivíduos jovens), formando o primeiro agrupamento de acordo com o PCA biplot (Figura 3).

O espectro de MS² do íon de m/z 330 $[M + H]^+$, apresentou alta perda de unidade de massa, característica observada em alcaloides benzilisoquinolínicos, com fragmento de pico base em m/z 192, indicando perda de 138 ($-NH_3$) (m/z 330 $\rightarrow$ 192, Apêndice D), sendo que o íon m/z 192 apresenta um grupo metoxila e hidroxila no anel A, reforçando a proposta do alcaloide de esqueleto benzilisoquinolínico reticulina (DE LIMA *et al.*, 2020). E a abundância deste alcaloide em todos os indivíduos adultos dos acessos e controle de *Annona emarginata* (exceto dos acessos 01, 06 e controle) e *A. x atemoya* (enxertada) foi responsável por formar o segundo agrupamento de acordo com o PCA biplot (Figura 3).

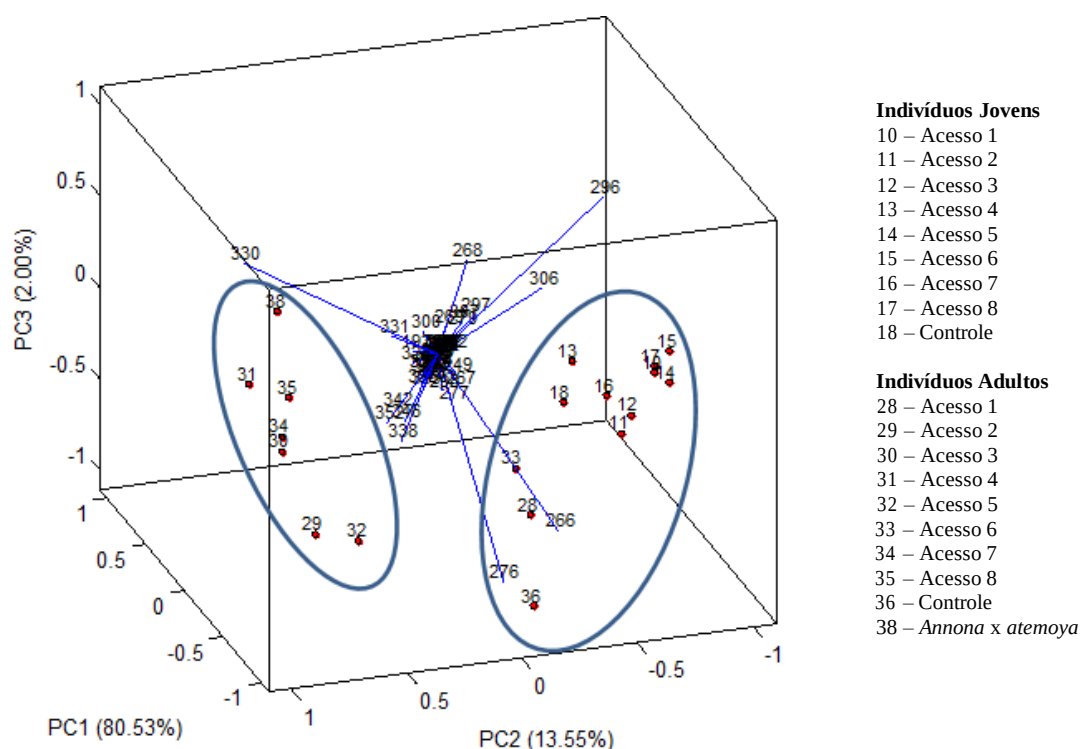


Figura 3: PCA score biplot gerado a partir dos extratos de alcaloides das raízes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer morfotipo ‘terra-fria’ e *Annona x atemoya* Mabb. var. ‘Thompson’, analisadas por ESI-MS.

Além disso, outros íons de m/z 268, 282 e 296 $[M + H]^+$, cuja abundância não foi responsável por agrupar os tratamentos, estavam presentes nas frações alcaloídicas e foram inspecionados por espectro de MS^n , apresentando forte evidência de esqueletos aporfínicos, com perdas de 17 ($-NH_3$) (m/z 268 $\rightarrow$ 251, Apêndice E; m/z 282 $\rightarrow$ 265, Apêndice F e m/z 296 $\rightarrow$ 279, Apêndice G). Perdas subsequentes de 32 ($-CH_3OH$) (m/z 251 $\rightarrow$ 219, Apêndice E) e 28 ($-CO$) (m/z 219 $\rightarrow$ 191, Apêndice E); 15 ($-CH_3$) (m/z 265 $\rightarrow$ 250, Apêndice F); e 30 (CH_2O)

(m/z 279 $\rightarrow$ 249, Apêndice G) e 28 ($-CO$) (m/z 249 $\rightarrow$ 221, Apêndice G). Dessa forma a fragmentação dos íons de m/z 268, 282 e 296 reforça a proposta dos alcaloides de esqueletos aporfínicos asimilobina, nornuciferina e xylopina, respectivamente (DE LIMA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2016). Outros íons de m/z 292 e 306 $[M + H]^+$ foram observados uma única fragmentação em seus espectros, com perda de 15 ($-CH_3$) (m/z 292 $\rightarrow$ 277, Apêndice H) (m/z 306 $\rightarrow$ 291, Apêndice I) correspondente a perda do radical metil para ambos, reforçando a proposta de alcaloides de esqueletos oxoaporfínicos lisicamina e oxoxylopina, respectivamente.

Dessa forma, foi possível dividir nossas amostras em dois grandes grupos conforme apresentado no dendograma de HCA (Figura 4). Sendo que, o primeiro grupo está representado pela abundância de alcaloides das classes aporfínicas e oxoaporfínicas, sendo anonaína e

liriodenina respectivamente, responsáveis por agrupar os tratamentos de indivíduos jovens de todos os acessos de *Annona emarginata* e *Annona x atemoya* (enxertada). Já o segundo grupo está sendo representado pela abundância do alcaloide de classe benzilisoquinolínico, a reticulina, estando presente e agrupando os tratamentos de indivíduos adultos de *Annona emarginata* e *Annona x atemoya* (enxertada).

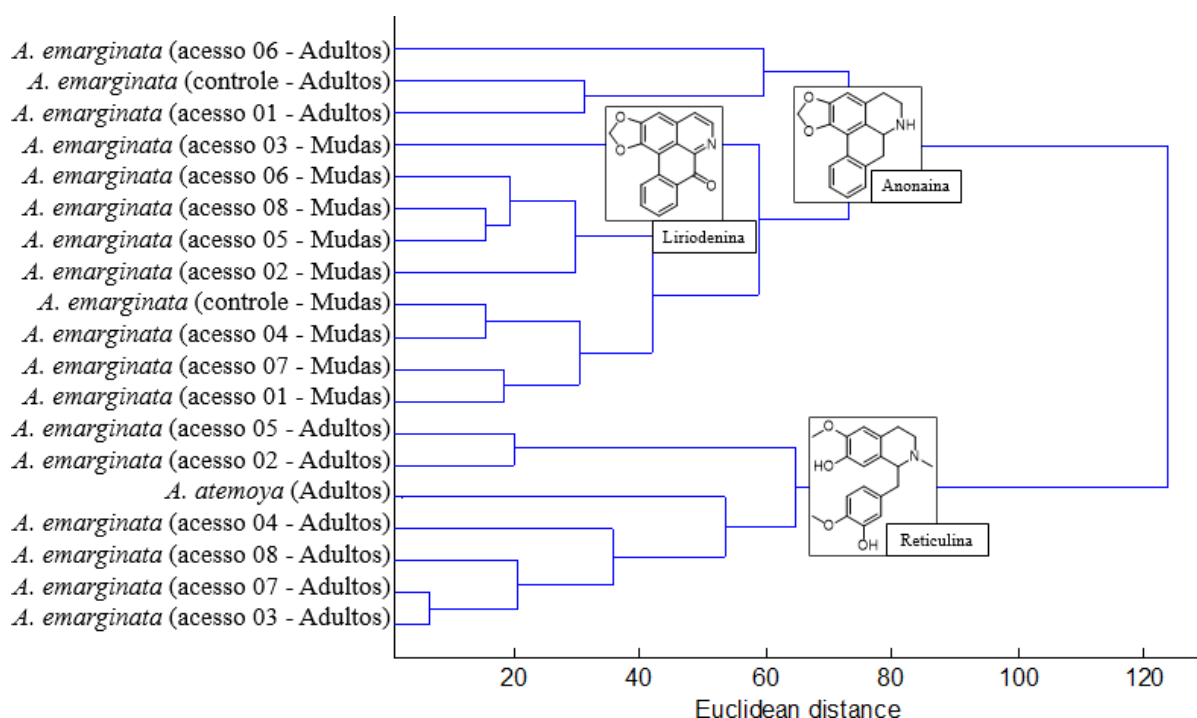


Figura 4: Dendrograma de HCA e as substâncias provisoriamente identificadas por meio de análise de fragmentação.

A literatura referente à presença de alcaloides em *Annona emarginata* é bastante escassa, o que a torna uma espécie promissora na bioprospecção de novas moléculas. O estudo permitiu o primeiro relato de três alcaloides para a espécie (nornuciferina, lisicamina e oxoxylopina). A nornuciferina e a lisicamina, embora considerados alcaloides onipresentes na família Annonaceae, encontrados principalmente nos gêneros *Annona*, *Duguetia*, *Fissistigma*, *Guatteria* e *Xylopia* (COSTA *et al.*, 2011b; DE OLIVEIRA TELES *et al.*, 2015; DUTRA *et al.*, 2012; LAN *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2004; NAVARRO *et al.*, 2001; NIK ABDULLAH ZAWAWI *et al.*, 2012; OROZCO-CASTILLO *et al.*, 2016; RASAMIZAFY; HOCQUEMILLER; CAVÉ, 1989), ainda não haviam sido reportados para a espécie *Annona emarginata*. Enquanto o alcaloide oxoxylopina é pouco reportado nas espécies da família Annonaceae, tendo sido encontrado apenas em *Annona cherimola*, *Fissistigma glaucescens* e *Uvaria scheffleri* (CHEN; WU, 2001; ICHIMARU *et al.*, 2010; LO; CHANG; WU, 2000) e agora, pela primeira vez na espécie *Annona emarginata*.

Dentre os demais alcaloides reportados nesta pesquisa alguns já foram identificados em raízes de indivíduos adultos de *Annona emarginata*, tais como asimilobina, liriodenina e xylopina (OVILE MIMI *et al.*, 2021). Outros autores como Nieto (1986) identificou a presença dos alcaloides anonaína, asimilobina e reticulina em partes aéreas de *Rollinia emarginata* ($\equiv$ *Annona emarginata*) e Fevrier *et al.* (1999) reportaram a presença da liriodenina em caules de *Rollinia emarginata* ($\equiv$ *Annona emarginata*).

Espécies do gênero como *Annona purpurea* já tiveram alcaloides como anonaína, liriodenina, reticulina e xylopina relatados em raízes de indivíduos adultos (DE-LA-CRUZ-CHACÓN *et al.*, 2019) e em raízes de indivíduos jovens de *Annona muricata* já foram relatadas a presença dos alcaloides anonaína, asimilobina, nornuciferina e reticulina (RILEY-SALDAÑA *et al.*, 2017), os quais também foram identificados neste trabalho. Além de que, anonaína, reticulina e xylopina já foram testadas, apresentando atividade inibitória contra cepas de fungos de interesse agrônomo e medicinal (BAUTISTA-BAÑOS; HERNÁNDEZ-LÓPEZ; BARRERA-NECHA, 2000; DE-LA-CRUZ-CHACÓN *et al.*, 2019; DE LA CRUZ-CHACÓN *et al.*, 2011; DE PAULO *et al.*, 1992; LEVORATO VINCHE *et al.*, 2020).

Os resultados referentes a análise por ESI-MS das frações alcaloídicas de folhas não apresentaram valores interpretativos, sendo retirados da análise por ESI-MS.

4.3.5. Perfil espectral das folhas e raízes de indivíduos jovens e adultos de *Annona emarginata*

A análise dos perfis espectrais obtido por RMN de ^1H das folhas de indivíduos jovens e adultos de *Annona emarginata* revelou constância em sua constituição química. As folhas não mostraram sinais significativos da presença de alcaloides (Figuras 5 e 6). Da mesma forma, a composição química das raízes dos indivíduos jovens e adultos foi mantida entre as amostras (Figuras 7 e 8). Quimicamente, sinais indicativos de alcaloides foram observados nas raízes em maior proporção em comparação as folhas. Além disso, metabólitos foram mais evidentes nas raízes de indivíduos adultos que nos indivíduos jovens, caracterizado pelo aumento da intensidade dos sinais, exceto para T7.

Dessa forma, a parte da planta e estágio de desenvolvimento selecionados desempenham um papel fundamental na qualidade do *fingerprint* e quantidade de metabólitos existentes, podendo contribuir para estudos guiados visando a seleção de compostos bioativos.

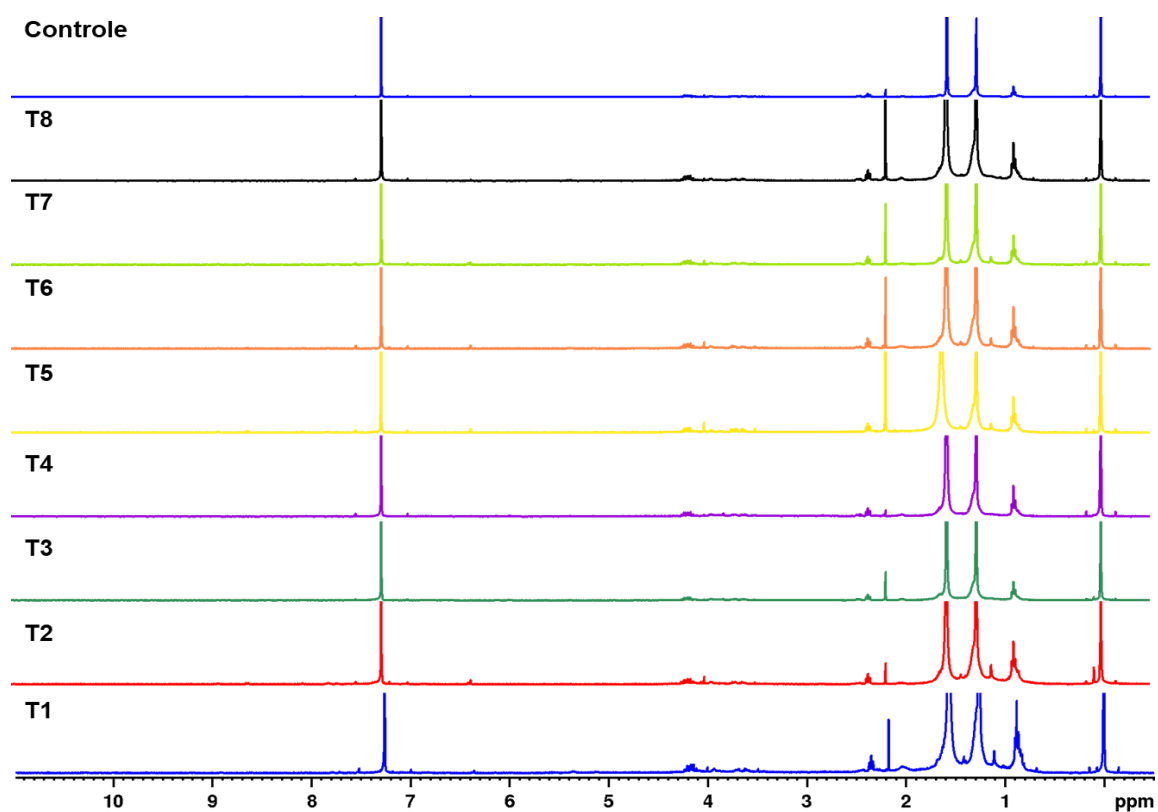


Figura 5. Espectros de RMN de ^1H das folhas das mudas de *A. emarginata* (400 MHz, CDCl_3). 6x

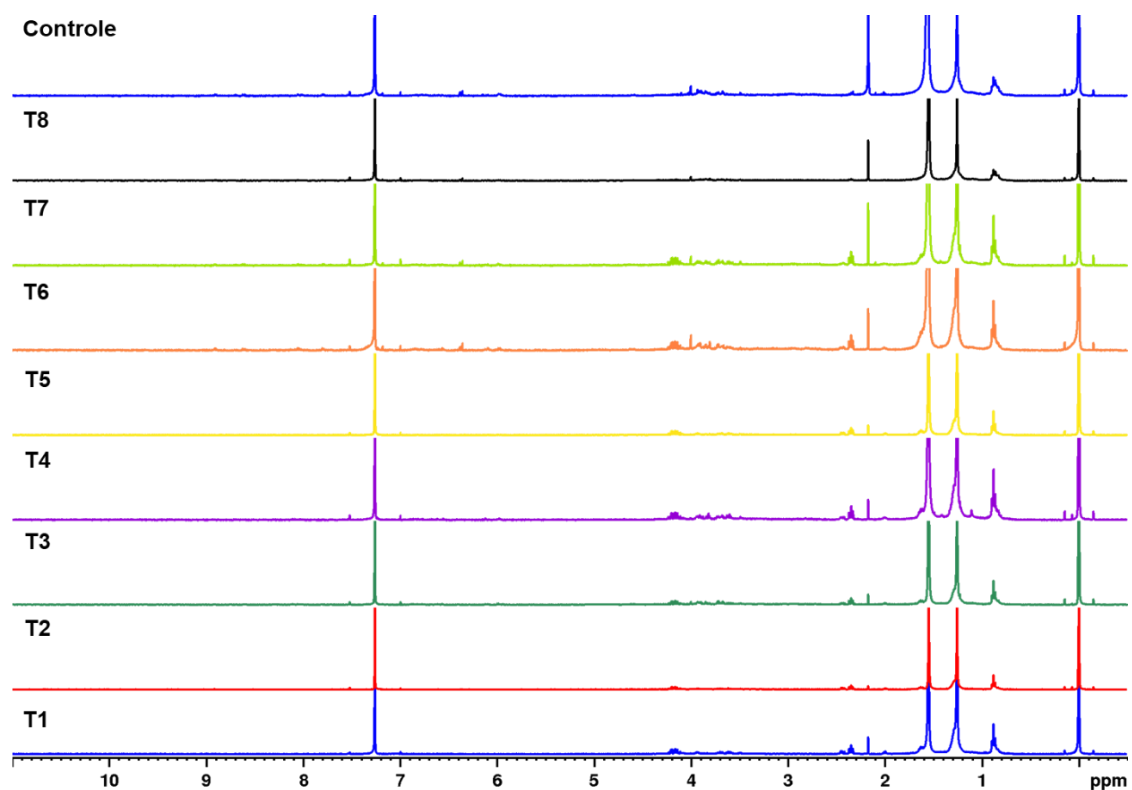


Figura 6. Espectros de RMN de ^1H das folhas de indivíduos adultos de *A. emarginata* (400 MHz, CDCl_3). 6x

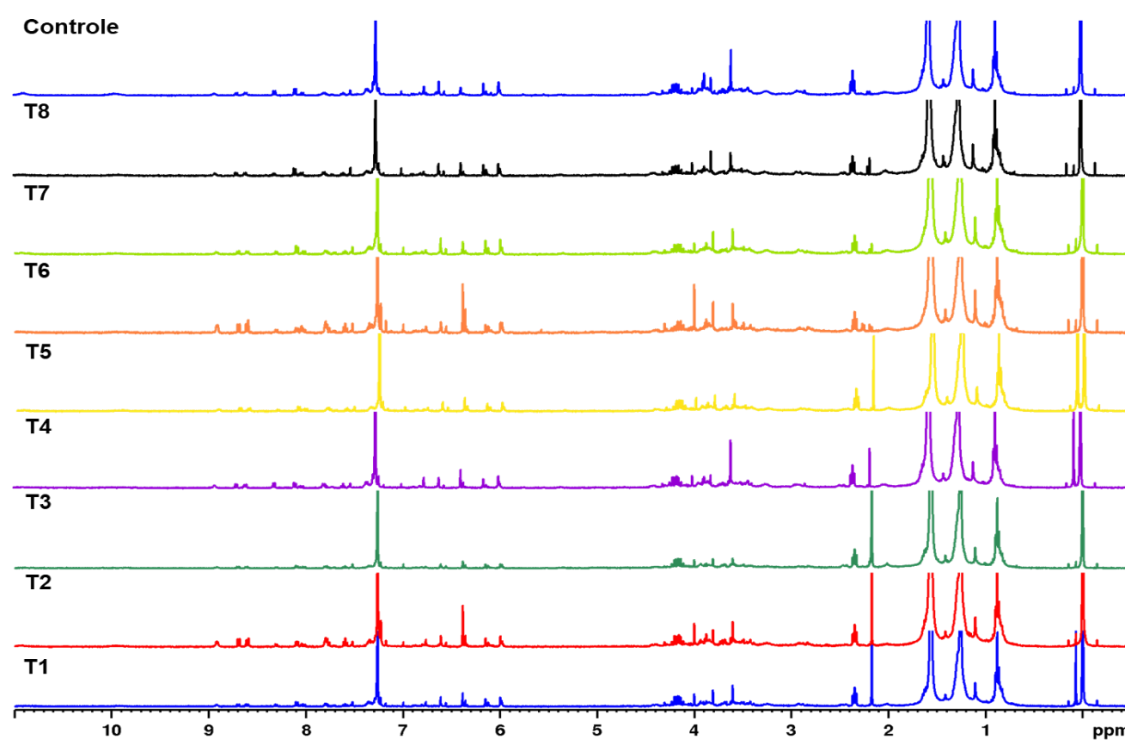


Figura 7. Espectros de RMN de ^1H das raízes das mudas de *A. emarginata* (400 MHz, CDCl_3).

6x

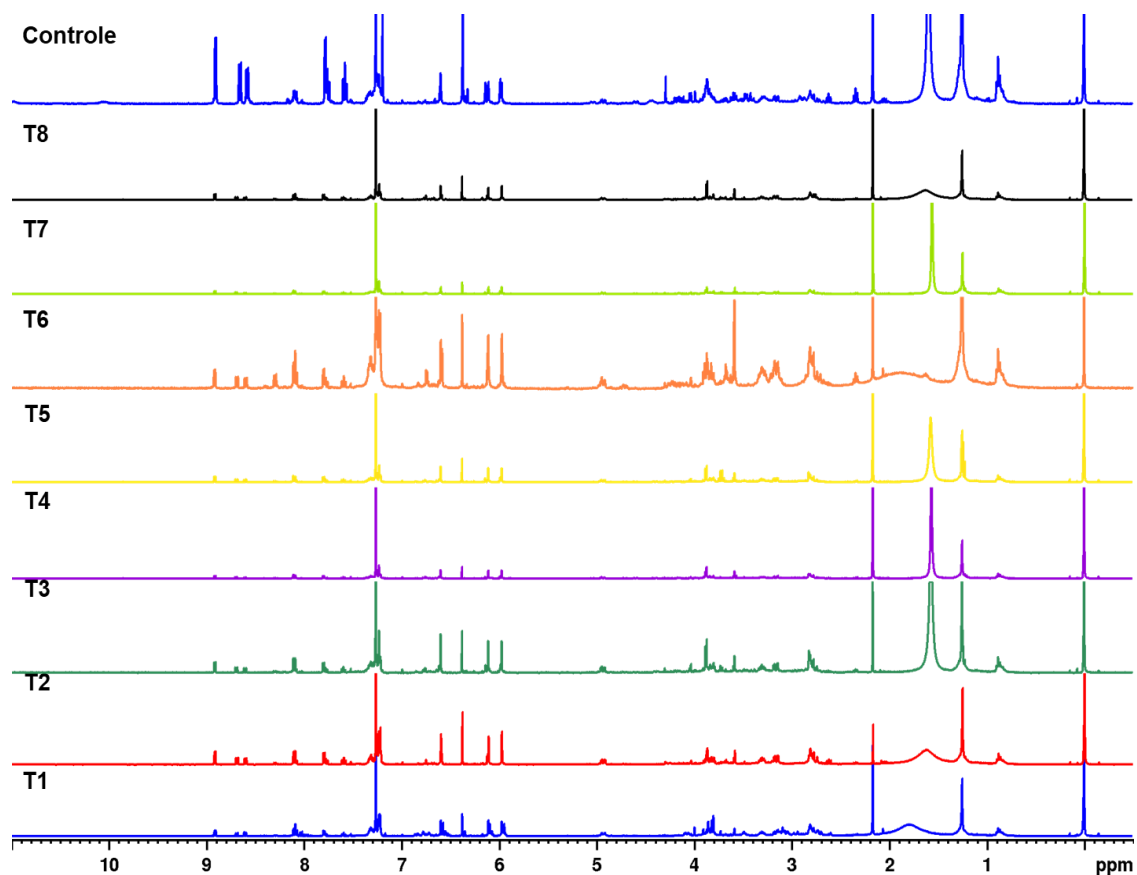


Figura 8. Espectros de RMN de ^1H das raízes de indivíduos adultos de *A. emarginata* (400 MHz, CDCl_3). 6x

4.3.6. Metabólitos identificados nas folhas e raízes de indivíduos jovens e adultos de *Annona emarginata*

A inspeção inicial dos espectros de RMN de ^1H revelou similaridades nos perfis metabólicos entre as amostras, cuja composição química é constituída de ácidos graxos e principalmente alcaloides. Nesse sentido, a identificação estrutural dos metabólitos foi realizada usando os dados de RMN uni e bidimensionais das raízes de indivíduos adultos (T1, T5 e T8) que foram estendidas para as demais amostras.

A análise dos espectros de RMN de ^1H de *Annona emarginata* permitiu observar a presença de sinais em δ_{H} 0,87 (t, $J = 7,4$ Hz), 1,25 (m), 1,63 (m), 2,35 (t, $J = 7,4$ Hz), que são indicativos de ácidos graxos de cadeia longa, constantemente encontrado em matrizes vegetais (Figura 9). Esses sinais foram identificados em todas as amostras das folhas e raízes de indivíduos jovens e adultos (Figuras 5-8).

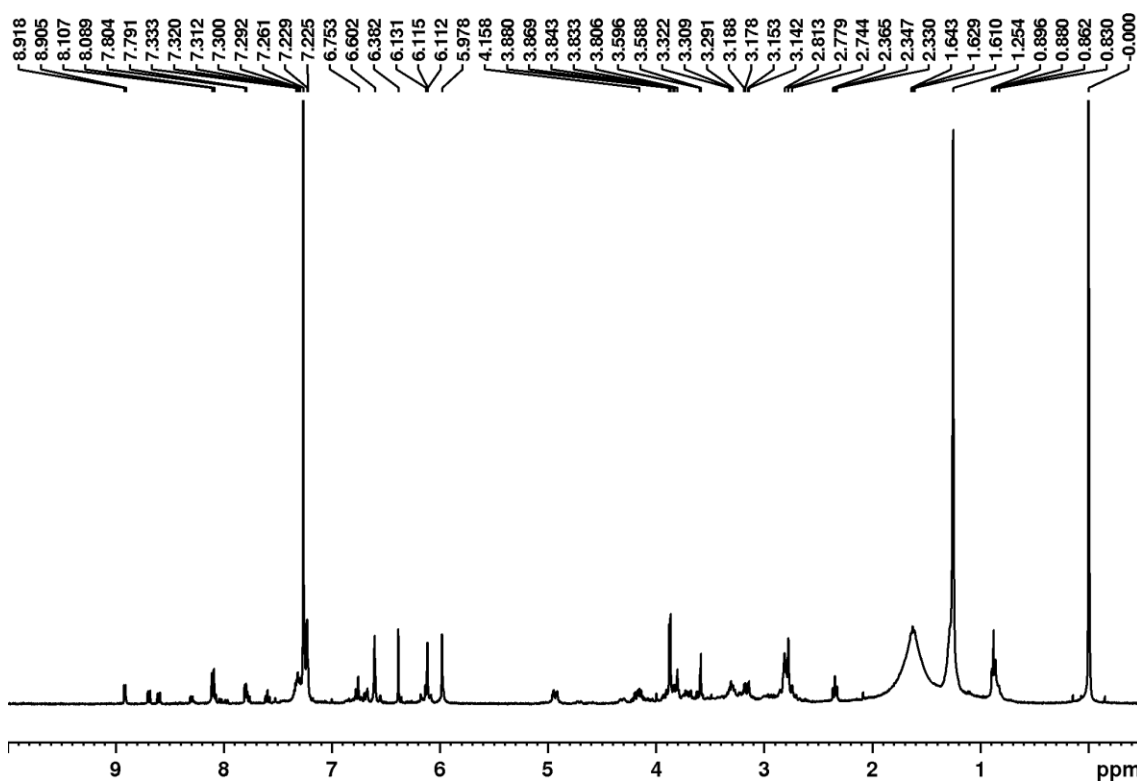


Figura 9. Espectro de RMN de ^1H das raízes de indivíduos adultos (T8) de *A. emarginata* (400 MHz, CDCl_3).

Em contrapartida, a análise da região aromática e de olefinas dos espectros de RMN de ^1H das raízes de indivíduos jovens e adultos de *A. emarginata* revelou sinais atribuídos a alcaloides com esqueletos aporfínico e oxoaporfínicos, comumente encontrados em espécies da família Annonaceae, particularmente no gênero *Annona* (Figura 10). Os alcaloides

identificados foram: lirioidenina, anonaina, asimilobina e xylopina. Assim, o espectro de RMN de ^1H permitiu observar a existência de hidrogênios α e β piridínicos em δ_{H} 7,79 (d , $J = 5,1$ Hz, H-4), 8,91 (d , $J = 5,1$ Hz, H-5), quatro sinais relativos a hidrogênios aromáticos em δ_{H} 8,68 (d , $J = 8,1$ Hz, H-11), 8,60 (dd , $J = 7,8$ e $1,4$ Hz, H-8), 7,77 (ddd , $J = 8,1$, $7,2$ e $1,4$ Hz, H-10) e 7,59 (ddd , $J = 7,8$, $7,2$ e $0,9$ Hz, H-9) típicos do anel D livre de substituição do esqueleto oxoaporfínico. Ademais, um simpleto em δ_{H} 6,38 característico de grupo metilenodióxi substituído em C-1 e C-2 do anel do esqueleto oxoaporfínico (Figura 10). Através das análises dos mapas de correlação COSY, HSQC e HMBC (Figuras 11-13), pode-se atribuir a substância como lirioidenina, alcaloide oxoaporfínico considerado marcador quimiofenético do gênero *Annona*.

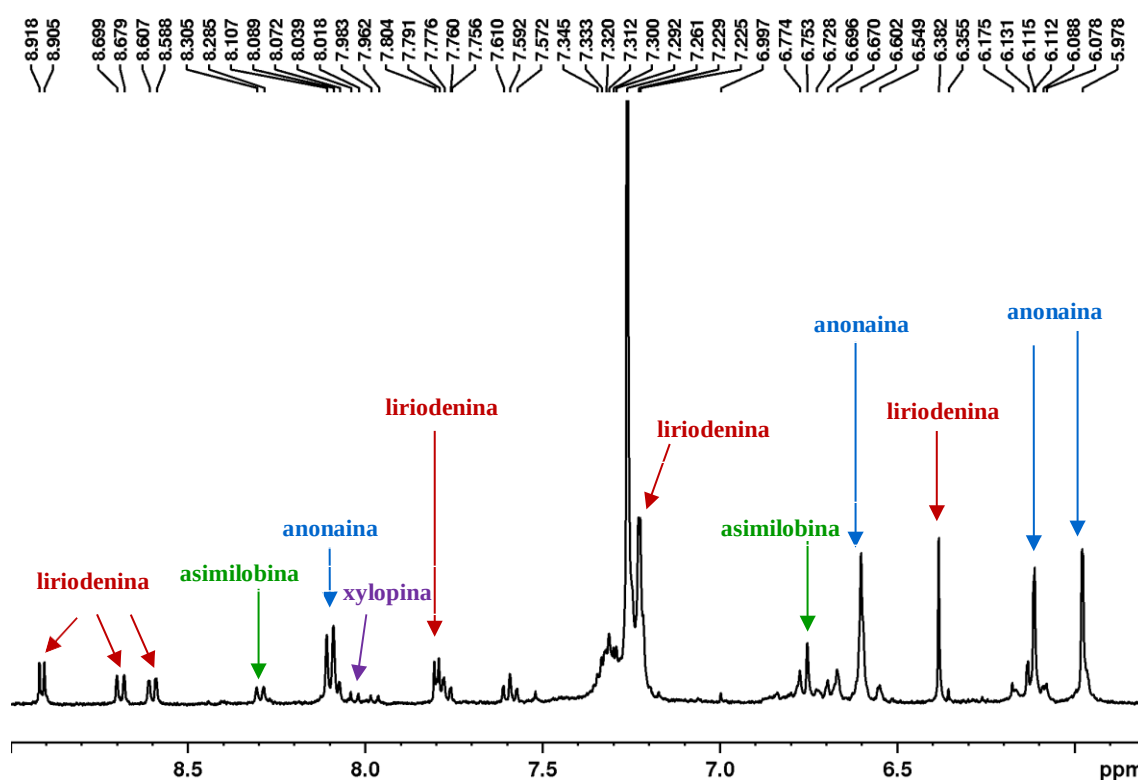


Figura 10. Ampliação da região de 9,00 – 5,80 ppm do espectro de RMN de ^1H das raízes de indivíduos adultos (T8) de *A. emarginata* (400 MHz, CDCl_3).

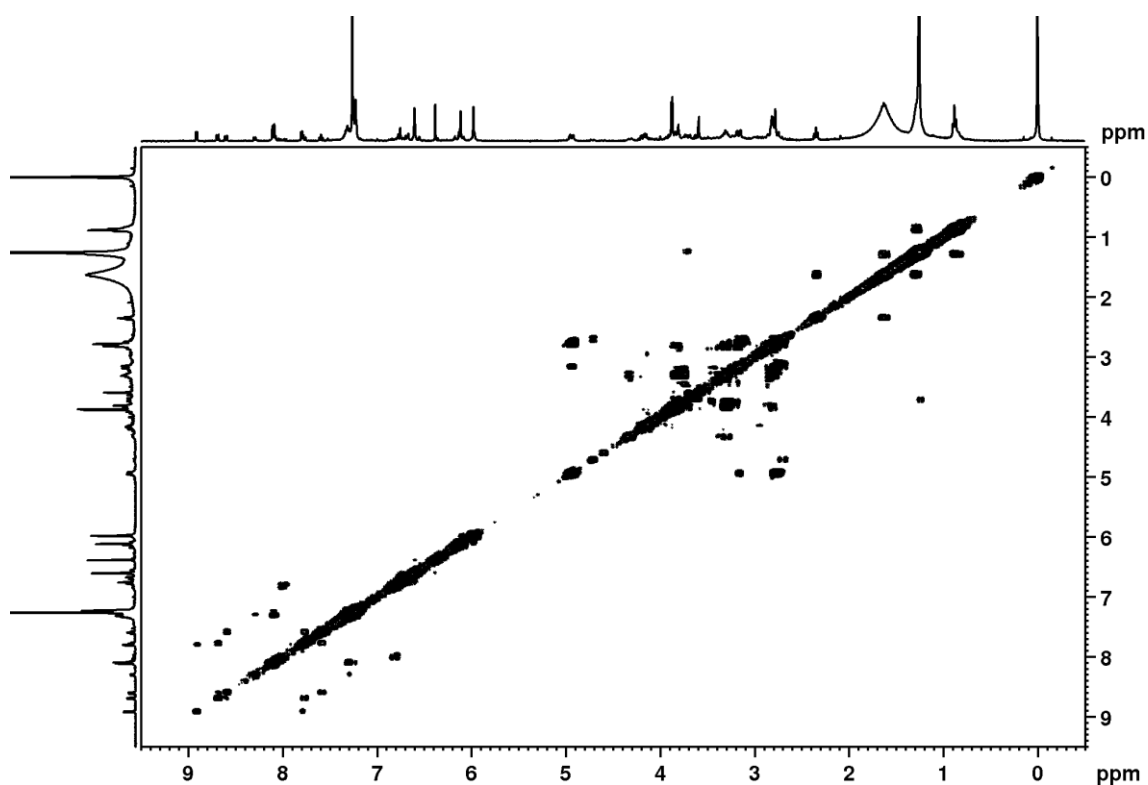


Figura 11. Mapa de correlação ^1H - ^1H COSY (400 MHz, CDCl_3) das raízes de indivíduos adultos (T8) de *A. emarginata*.

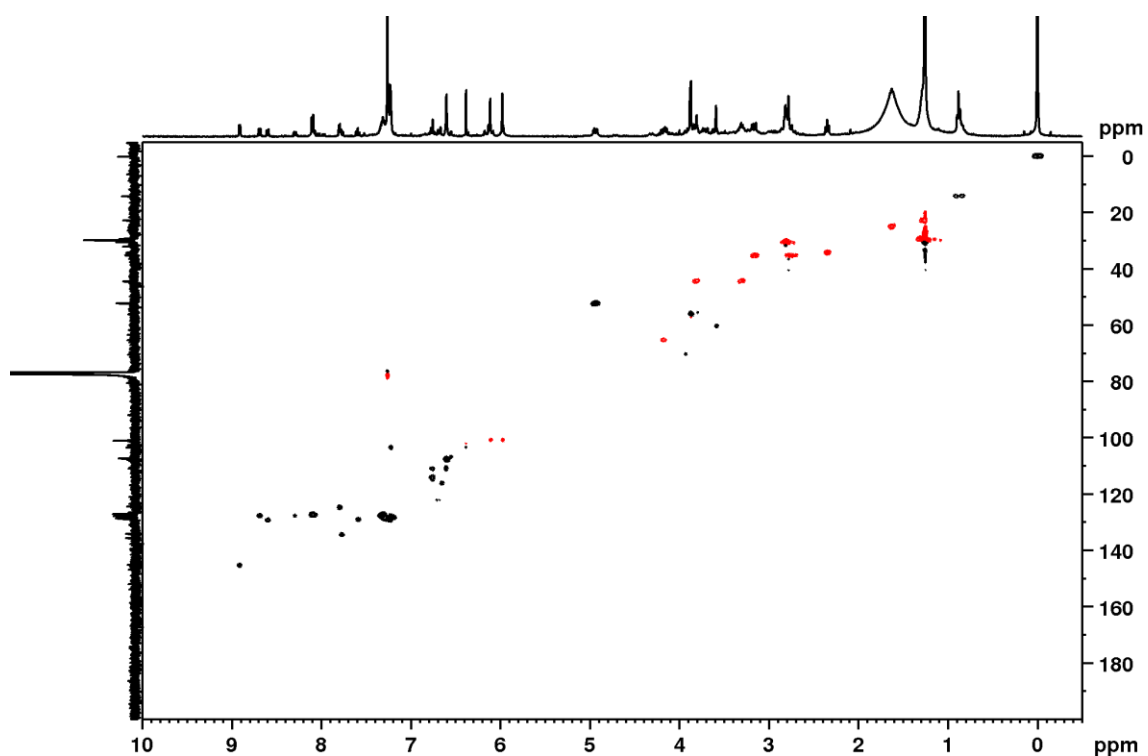


Figura 12. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C HSQC (^1H :400 e ^{13}C :100 MHz, CDCl_3) das raízes de indivíduos adultos (T8) de *A. emarginata*.

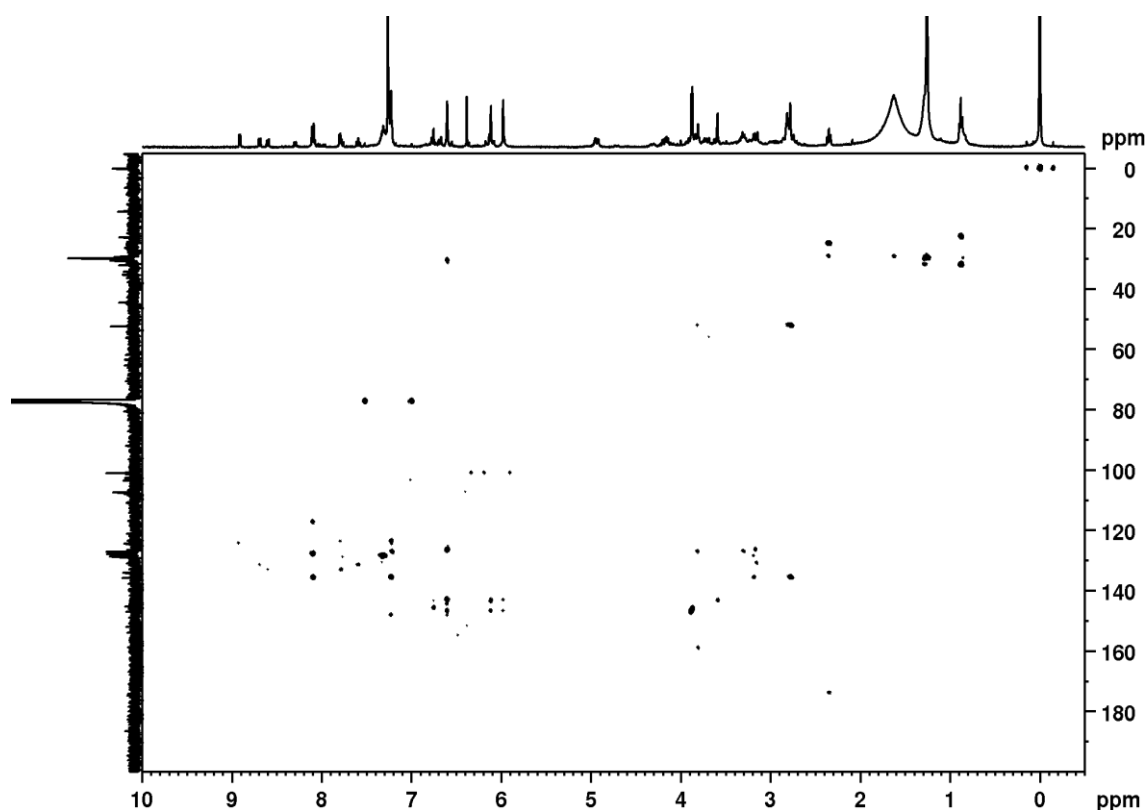


Figura 13. Mapa de correlação à longa distância ^1H - ^{13}C HMBC (^1H :400 e ^{13}C :100 MHz, CDCl_3) das raízes de indivíduos adultos (T8) de *A. emarginata*.

A anonaína foi confirmada devido à presença de sinais na região entre 2,77-3,81 típicos de hidrogênios metilênicos em C-4, C-5 e C-7 do esqueleto aporfínico (Figura 10). Arelado a este dado foram identificados dois dupletos em δ_{H} 6,11 (d , $J = 1,2$ Hz) e 5,97 (d , $J = 1,2$ Hz) característicos de hidrogênios metilenodióxi substituído em C-1 e C-2, que mostraram correlação direta HSQC com o sinal 100,7, assim como sinais atribuídos aos hidrogênios H-3 e H-11 em 6,60 (s) e 8,09 (d , $J = 7,8$ Hz), respectivamente (Figura 10). Os espectros de RMN de ^1H e mapas de correlação apresentados anteriormente confirmam a presença do alcaloide aporfínico anonaína (Figuras 10-13).

Também foram observados sinais em δ_{H} 6,76 (s) e 8,29 (d , $J = 7,8$ Hz) característicos dos hidrogênios H-3 e H-11 do anel A e D do alcaloide aporfínico sensu stricto asimilobina (Figura 10), respectivamente, bem como a ausência de substituições nos anéis B, C e D. A existência de um grupo metoxila na molécula foi confirmada pelo simpleto em δ_{H} 3,59 que mostrou correlação direta no HSQC com o carbono em 60,4, corroborando assim com o alcaloide asimilobina (Figura 12). Os alcaloides identificados são mais evidentes nas raízes dos indivíduos jovens e adultos de *A. emarginata*. Ademais, analisando o espectro de RMN de ^1H , foram identificados um triplete e um quarteto em δ_{H} 1,24 (t , $J = 7,0$ Hz) e 3,72 (q , $J = 7,8$ Hz) atribuídos aos hidrogênios metílicos e metilênicos do composto etanol (Figura 14).

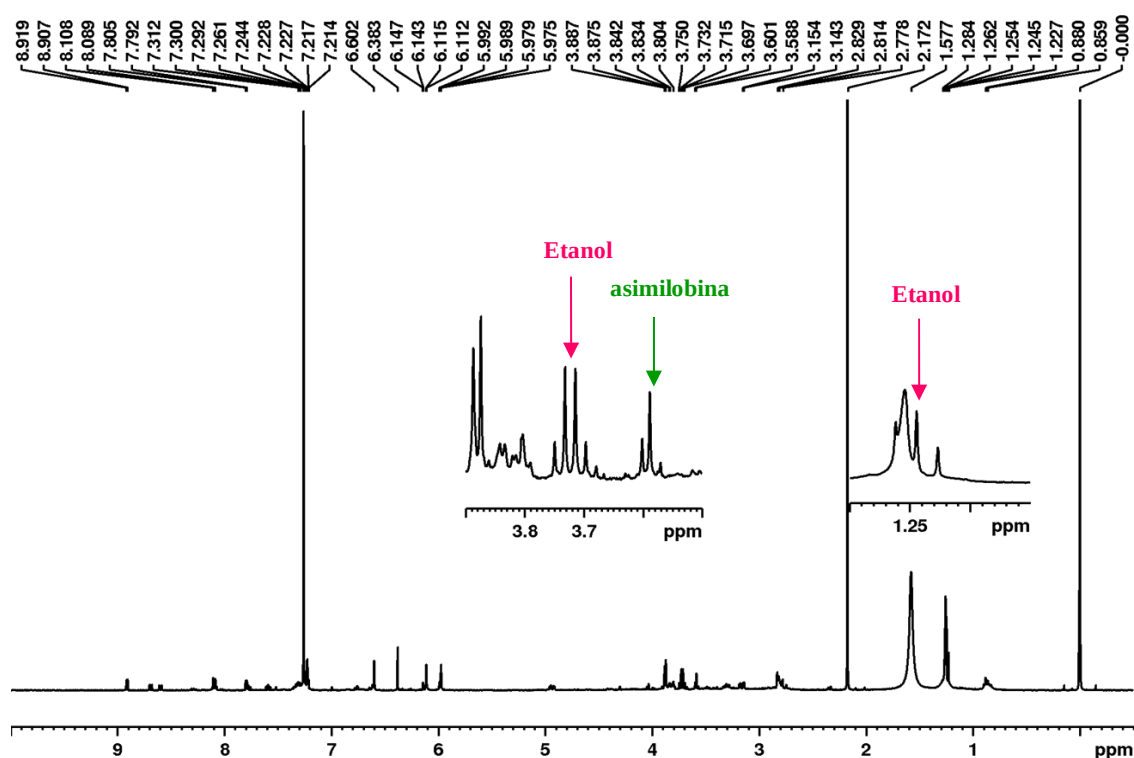


Figura 14. Espectro de RMN de ^1H das raízes de indivíduos adultos (T5) de *A. emarginata* (400 MHz, CDCl_3).

Além dos alcaloides apresentados, dois dupletos em δ_{H} 6,10 (d , $J = 1,3$ Hz) e 5,95 (d , $J = 1,3$ Hz) característicos de hidrogênios metilenodióxi substituído em C-1 e C-2, mostraram correlação direta HSQC com o sinal δ_{C} 100,6, assim como sinais atribuídos aos hidrogênios H-3 e H-11 em δ_{H} 6,58 (s) e 8,03 (d , $J = 8,3$ Hz) do anel A e D do alcaloide, respectivamente (Figura 15 e 18) foram atribuídos ao alcaloide xylopina. Ademais, sinais em torno de 2,74-3,53 típicos de hidrogênios metilênicos em C-4, C-5 e C-7 do esqueleto aporfínico revelaram correlação direta no HSQC com os sinais em δ_{C} 27,8, 42,6 e 35,9, respectivamente (Figura 17). O sinal em δ_{H} 8,03 (d , $J = 8,3$ Hz) demonstrou correlação direta HSQC com o carbono em δ_{C} 128,7 e à longa distância HMBC com os sinais em 116,5 (C-1a), 137,2 (C-7a) e 158,9 (C-9) (Figuras 17 e 18). Este último foi atribuído a C-9 devido a correlação à longa distância da metoxila em 3,80 (s) que revelou correlação direta HSQC com o carbono em δ_{C} 55,4 e à longa distância HMBC com o sinal em 158,9, justificando que a metoxila encontra-se localizado no anel D do alcaloide, confirmado após todas as atribuições e comparações com dados da literatura como sendo o alcaloide xylopina (Figuras 16, 17 e 18).

As estruturas dos metabólitos e os dados de RMN são apresentadas na Figura 19 e Tabela 3.

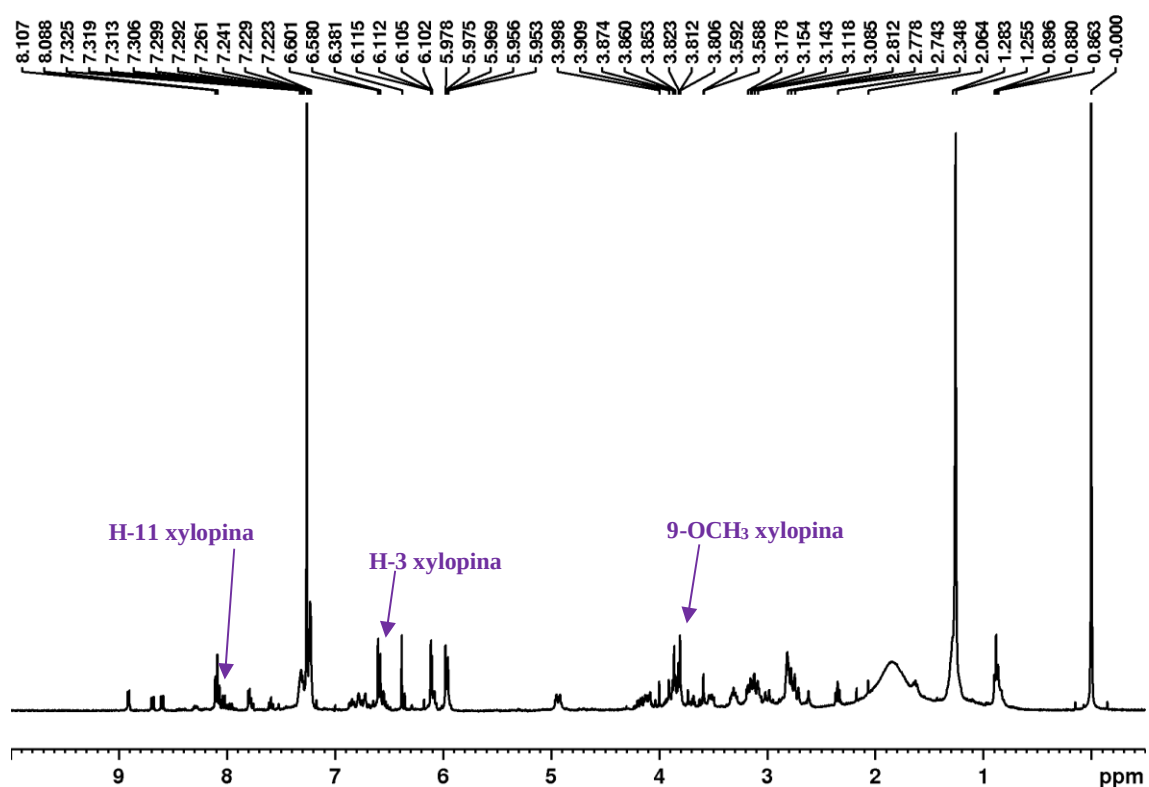


Figura 15. Espectro de RMN de ^1H das raízes de indivíduos adultos (T1) de *A. emarginata* (400 MHz, CDCl_3).

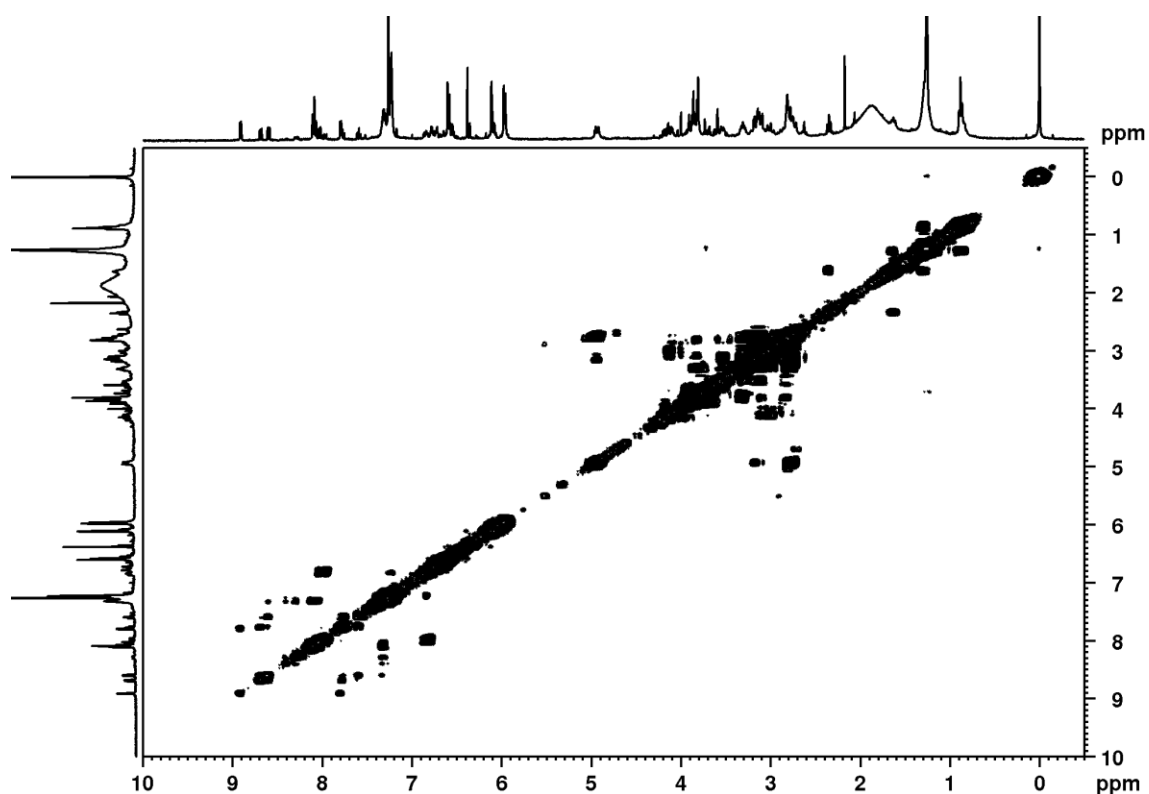


Figura 16. Mapa de correlação ^1H - ^1H COSY (400 MHz, CDCl_3) das raízes de indivíduos adultos (T1) de *A. emarginata*.

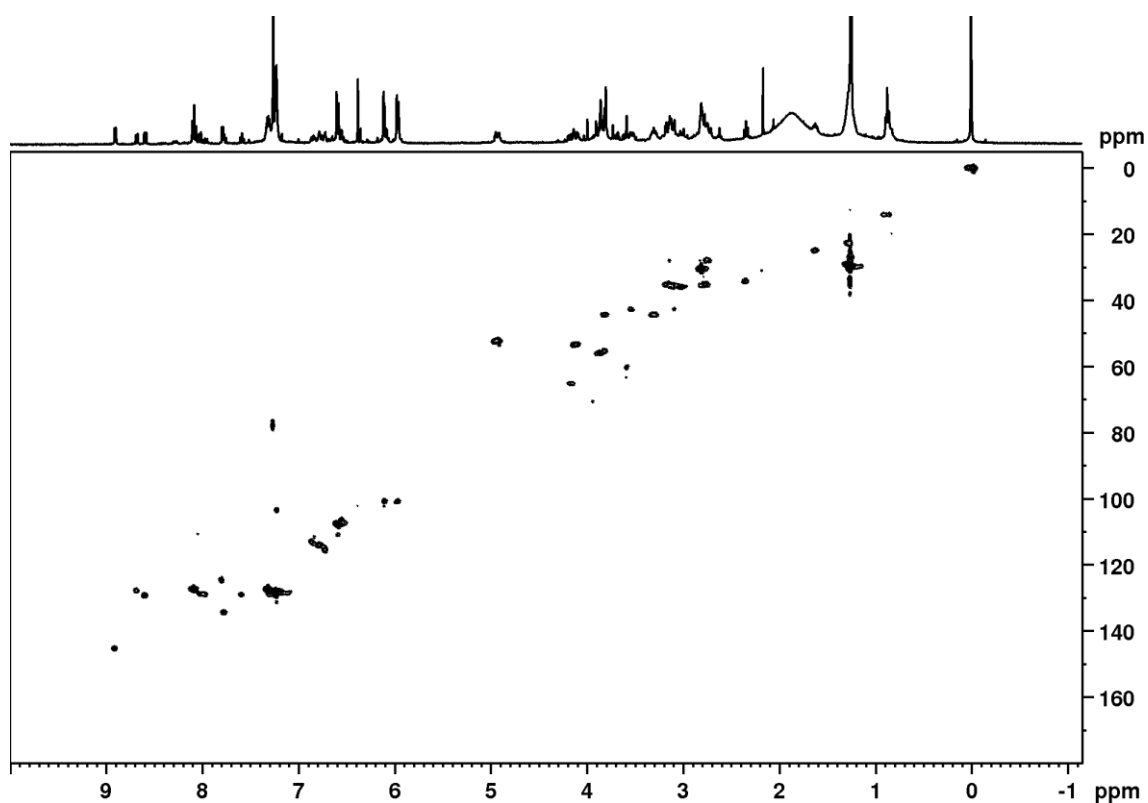


Figura 17. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C HSQC (^1H :400 e ^{13}C :100 MHz, CDCl_3) das raízes de indivíduos adultos (T1) de *A. emarginata*.

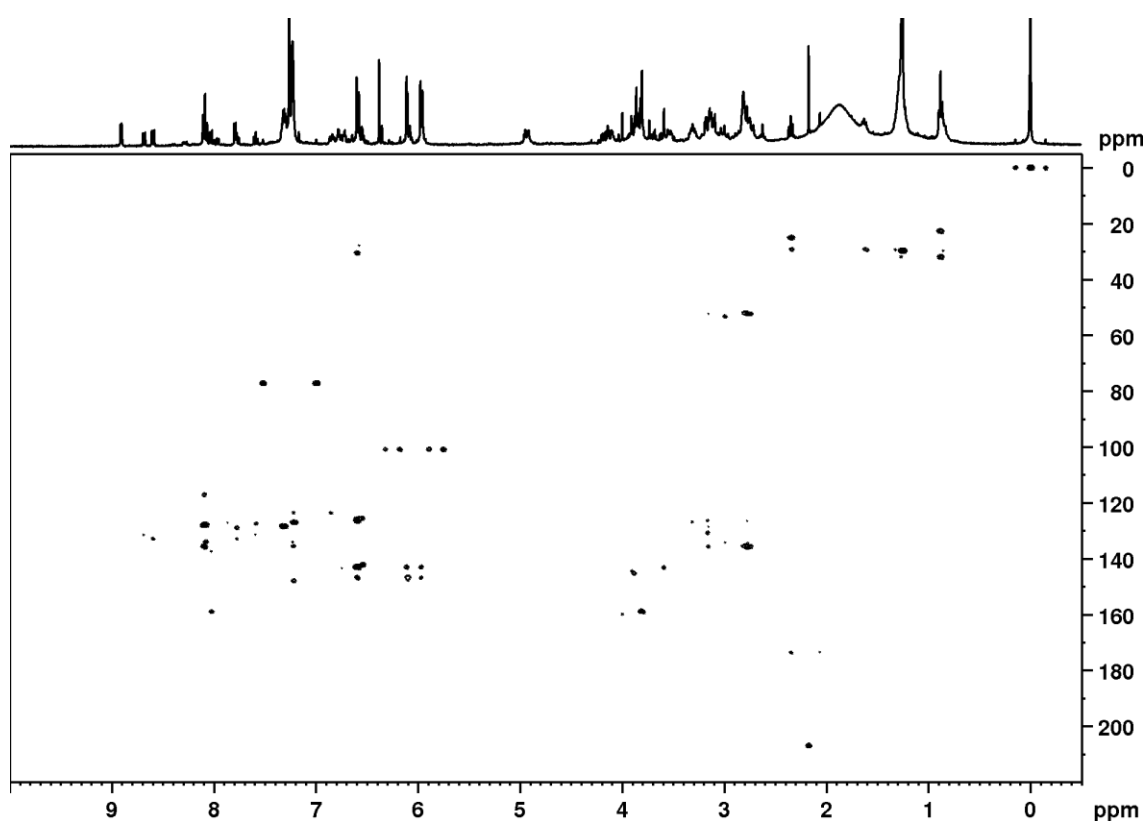


Figura 18. Mapa de correlação à longa distância ^1H - ^{13}C HMBC (^1H :400 e ^{13}C :100 MHz, CDCl_3) das raízes de indivíduos adultos (T1) de *A. emarginata*.

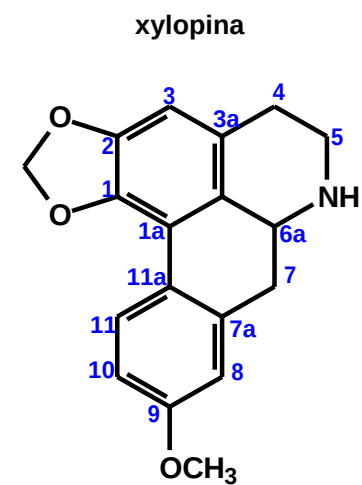
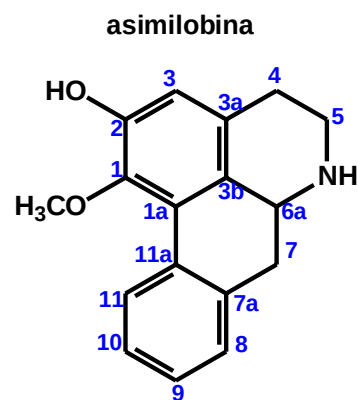
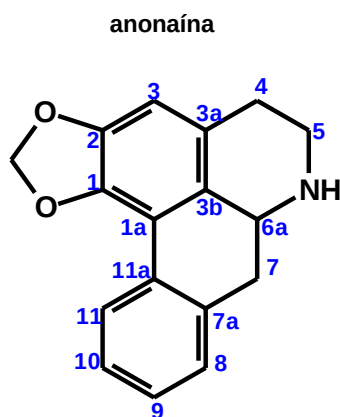
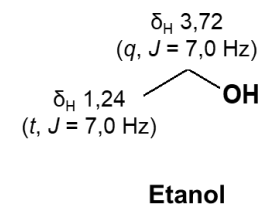
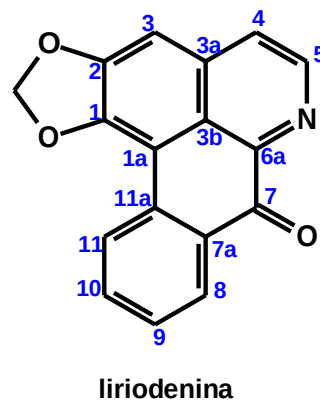
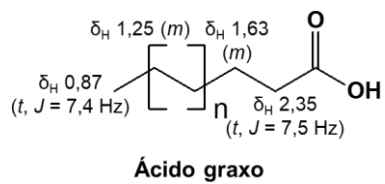


Figura 19. Estruturas dos metabólitos identificados em raízes de *Annona emarginata*.

Tabela 3. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C dos metabólitos secundários identificados em *Annona emarginata*.

Posição	Metabólitos							
	liriodenina		anonaína		xylopina		asimilobina	
	δ_{H} mult., (<i>J</i> em Hz) ^a	δ_{C} ^{a,b}	δ_{H} mult., (<i>J</i> em Hz) ^a	δ_{C} ^{a,b}	δ_{H} mult., (<i>J</i> em Hz) ^a	δ_{C} ^{a,b}	δ_{H} mult., (<i>J</i> em Hz) ^a	δ_{C} ^{a,b}
1	-	148,1	-	143,2	-	142,8	-	143,4
1a	-	108,5	-	117,2	-	116,5	-	NO
2	-	151,7	-	146,8	-	147,4	-	NO
3	7,22 <i>s</i>	103,4	6,60 <i>s</i>	107,7	6,58 <i>s</i>	108,0	6,76 <i>s</i>	114,0
3a	-	135,9	-	126,8	-	NO	-	NO
3b	-	123,4	-	126,5	-	125,5	-	NO
4	7,79 <i>d</i> (5,1)	124,6	2,80 <i>m</i>	30,5	2,74 <i>m</i> 3,14 <i>m</i>	27,8	NO	NO
5	8,91 <i>d</i> (5,1)	145,4	3,30 <i>m</i> 3,81 <i>m</i>	44,4	3,08 <i>m</i> 3,53 <i>m</i>	42,6	NO	NO
6a	-	145,7	4,94 <i>dd</i> (13,8 e 4,4)	52,3	4,11 <i>m</i>	53,4	NO	NO
7	-	NO	2,78 <i>dd</i> (14,2 e 13,8) 3,16 <i>dd</i> (14,2 e 4,4)	38,3	3,01 <i>m</i> 3,11 <i>m</i>	35,9	NO	NO
7a	-	131,6	-	135,5	-	137,2	-	NO
8	8,60 <i>dd</i> (7,8 e 1,4)	129,1	7,26 <i>m</i>	128,6	6,78 <i>m</i>	113,8	7,20-7,28 <i>m</i>	NO
9	7,59 <i>ddd</i> (7,8:7,2 e 0,9)	129,0	7,23 <i>m</i>	128,5	-	158,9		127,3
10	7,77 <i>ddd</i> (8,1:7,2 e 1,4)	134,5	7,31 <i>m</i>	127,5	6,84 <i>m</i>	113,1	7,32 <i>m</i>	128,6
11	8,68 <i>dd</i> (8,1)	127,7	8,09 <i>d</i> (7,8)	127,3	8,03 <i>d</i> (8,3)	128,7	8,29 <i>d</i> (7,8)	127,8
11a	-	132,9	-	130,4	-	NO	-	134,1
O-CH₂-O	6,38 <i>s</i>	102,2	5,97 <i>d</i> (1,2) 6,11 <i>d</i> (1,2)	100,7	5,95 <i>d</i> (1,3) 6,10 <i>d</i> (1,3)	100,6	-	-
1-OCH₃	-	-	-	-	-	-	3,59s	60,4
9-OCH₃	-	-	-	-	3,80 <i>s</i>	55,4	-	-

^aExperimento realizado a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão de referência. ^bDados determinados por experimentos de RMN HSQC e HMBC.

4.3.7. Metabólitos identificados em indivíduos adultos de *Annona x atemoya* enxertada em *A. emarginata*

A análise do *fingerprint* de indivíduos adultos de *Annona x atemoya* enxertada em *A. emarginata* revelou uma predominância de alcaloides nas raízes em comparações as folhas (Figuras 20 e 21). Como pode ser observado na figura 20, os alcaloides são inexistentes nas folhas. Por outro lado, as raízes são ricas em alcaloides.

Os principais metabólitos identificados foram os alcaloides já mencionados para a espécie *A. emarginata*, o que sugere que não há diferença significativa em termos de composição após enxertia, no entanto pode haver influência na concentração desses metabólitos, o que não foi avaliado nesse estudo. Os deslocamentos químicos dos metabólitos estão apresentados na tabela 3.

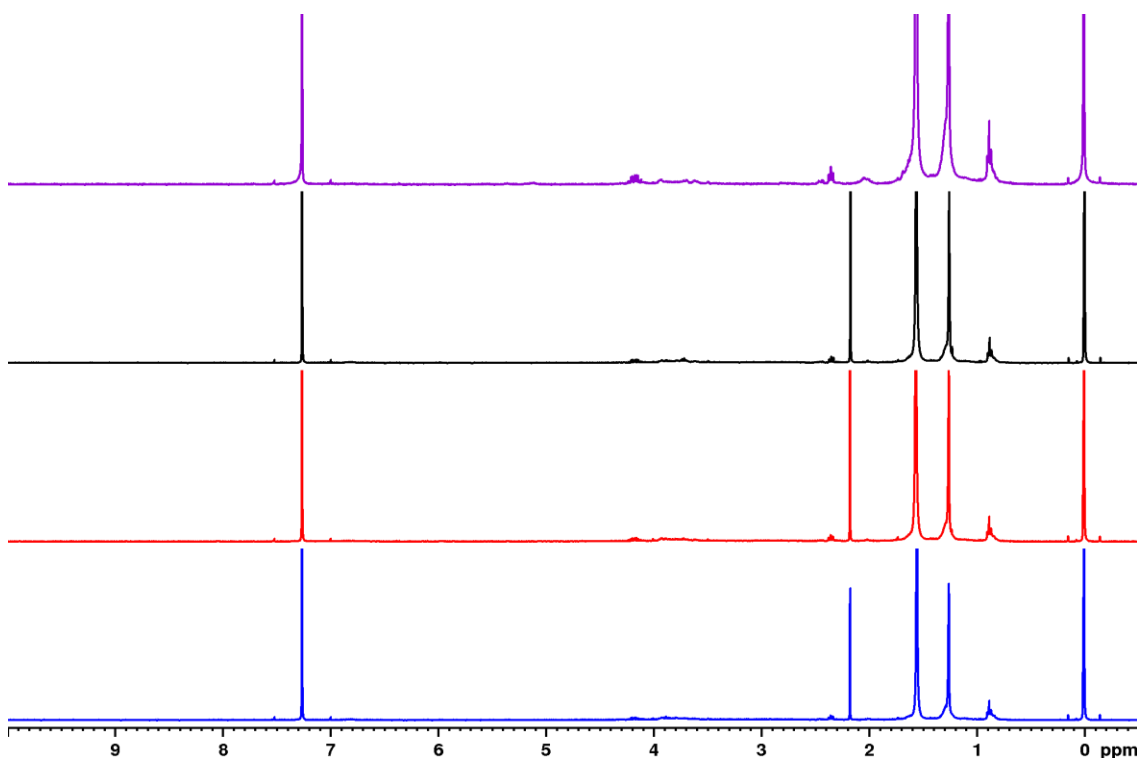


Figura 20. Espectros de RMN de ^1H de replicatas das folhas de indivíduos adultos de *Annona x atemoya* enxertada em *Annona emarginata* (400 MHz, CDCl_3). 6x

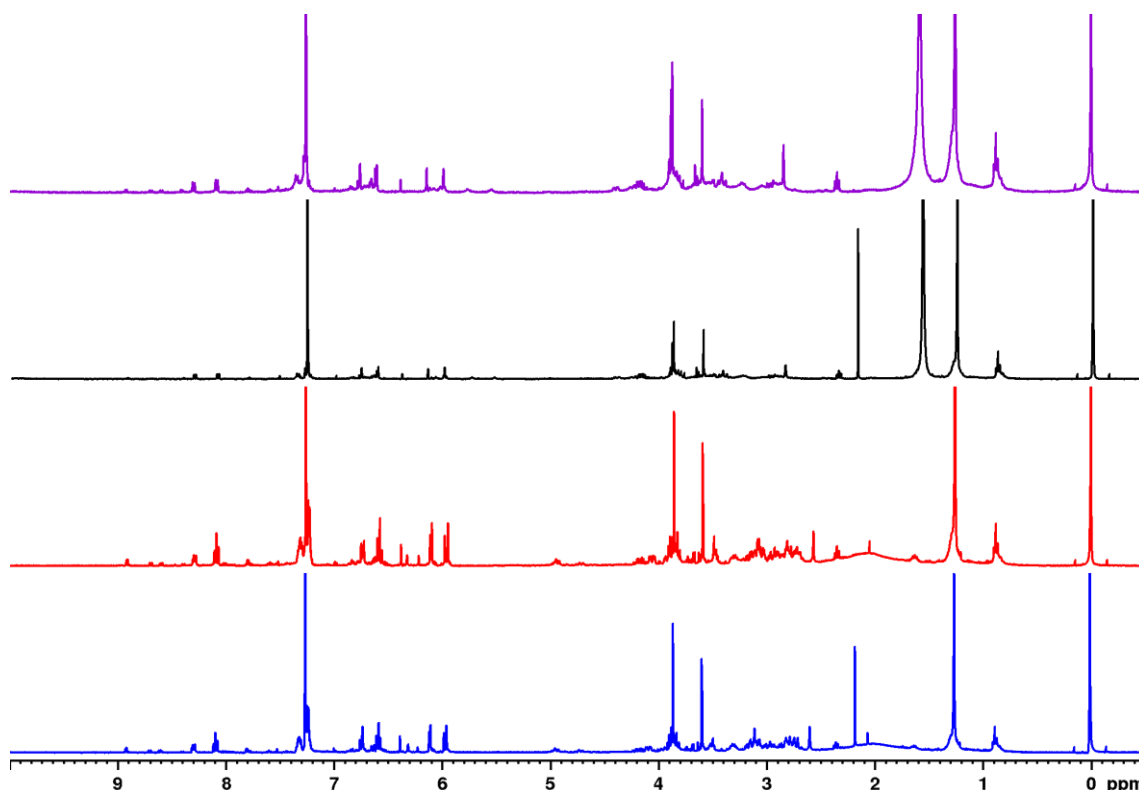


Figura 21. Espectros de RMN de ^1H de replicatas das raízes de indivíduos adultos de *Annona x atemoya* enxertada em *Annona emarginata* (400 MHz, CDCl_3). 6x

4.3.8. Análises quimiométricas

4.3.8.1. Análise de componentes principais (PCA) das amostras de *Annona emarginata*

Os indivíduos jovens e adultos de *A. emarginata* mostraram perfis similares nas folhas e raízes entre os acessos estudados, o que impossibilita uma discriminação efetiva apenas com a inspeção visual dos espectros. Dessa forma, a análise de componentes principais (PCA) foi empregada com a finalidade de investigar possíveis diferenças e similaridades entre as amostras de *A. emarginata* em função de sua composição química através dos experimentos de RMN de ^1H .

Antes da análise quimiométrica, é imprescindível considerar a influência de metabólitos de baixa intensidade, de forma a minimizar a predominância de compostos majoritários, tendo em vista que a concentração de metabólitos em matrizes vegetais pode ser alterada em diversas ordens de magnitude (SIMMLER *et al.*, 2018). Assim, a linha de base e fase de todos os espectros foram corrigidas manualmente, enquanto a área dos sinais foi determinada utilizando o modo de integração especial. Dos pré-processamentos avaliados, o autoescalamamento, também conhecido como escalamento por unidade de variância possibilitou

um melhor agrupamento entre as amostras.

As linhas dos espectros foram submetidas ao pré-tratamento escalamento em relação à intensidade total dos sinais, com o intuito de normalizar as integrais de cada *bucket* em relação à intensidade total dos sinais de um espectro, assim, as diferentes quantidades de amostras não afetam na diferenciação dos grupos. As colunas foram submetidas ao pré-processamento escalamento por unidade de variância, cujo dados são autoescalados (AMIX, 2008).

Os gráficos de scores e loadings relativos à PCA das amostras de indivíduos jovens e adultos *A. emarginata* (raízes e folhas) considerando as duas primeiras componentes principais explicam 42,02% e 22,08% da variância dos dados, totalizando 64,10% (Figura 22). A análise do gráfico de scores PC1xPC2 revelou a formação de dois grupos, em que o primeiro grupo encontra-se distribuído nos dois quadrantes de PC1($\pm$) e no lado negativo de PC2, sendo este constituído das amostras dos acessos e controle das raízes de indivíduos adultos de *A. emarginata*, enquanto o segundo grupo é formado pelas demais amostras e distribuídos em ambos os quadrantes de PC1 e no lado positivo de PC2, conforme evidenciado na Figura 22.

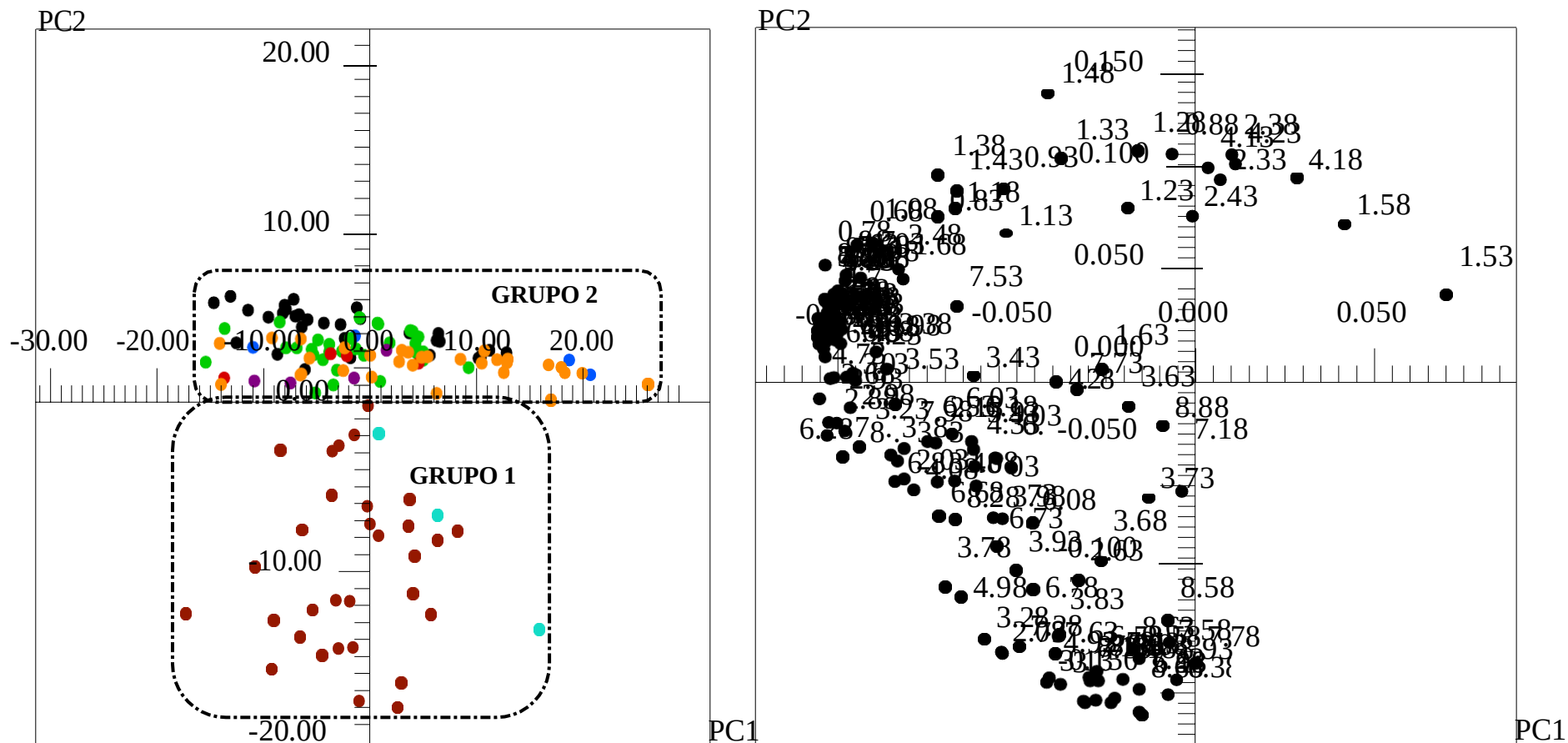


Figura 22. Análise de PCA (PC1-42,02% x PC2-22,08%) dos espectros de RMN de ^1H das amostras de *A. emarginata*. Scores: (•) Acessos – indivíduos jovens – folhas, (•) Controle – indivíduos jovens – folhas, (•) Acessos – indivíduos jovens – raízes, (•) Controle – indivíduos jovens – raízes, (•) Acessos – indivíduos adultos – folhas, (•) Controle – indivíduos adultos – folhas, (•) Acessos – indivíduos adultos – raízes, (•) Controle – indivíduos adultos – raízes. Loadings de PC1xPC2 explicando a influência das variáveis na distribuição das amostras apresentadas nos scores.

A não discriminação para as amostras do grupo 2 sugere que sua composição química é muito similar entre si, apesar de pertencer a acessos e partes diferentes da espécie *A. emarginata*.

Os metabólitos responsáveis pela diferenciação entre os grupos puderam ser observados através da análise do gráfico de *loadings*, o qual mostra os compostos químicos que mais influenciaram na variância dos dados. A análise do gráfico de *loadings* das amostras dos acessos e controle das raízes de indivíduos adultos de *A. emarginata* foram influenciados pelos compostos aromáticos, principalmente os alcaloides liriodenina (*buckets* em 6,38, 7,23, 7,58, 7,78, 8,58, 8,63, 8,68 e 8,93), anonaina (*buckets* em 2,78, 2,83, 3,18, 3,33, 4,93, 5,98, 6,13, 6,58, 7,28, 7,33 e 8,08), xylopina (*buckets* em 3,03, 3,08, 3,53, 3,78, 5,93, 6,07, 6,78, 6,83 e 8,03), bem como asimilobina (*buckets* em 3,58, 6,73 e 8,28).

O grupo 2 foi agrupado em PC2 positivo e diferenciadas das demais amostras, principalmente pela presença de compostos alifáticos de cadeia longa (*buckets* em 0,88, 1,23, 1,28, 1,58, 1,63 e 2,33), os quais são típicos de ácidos graxos (Figura 22).

4.3.8.2. Análise de componentes principais (PCA) das amostras de indivíduos adultos de *Annona emarginata* e *Annona x atemoya* enxertada em *A. emarginata*

A análise de componentes principais de indivíduos adultos de *A. emarginata* e *Annona x atemoya* enxertada em *A. emarginata* considerando as duas primeiras componentes explicam 62,05% e 80,99% da variância total dos dados empregando toda a região espectral e apenas a região aromática, respectivamente (Figuras 23 e 24). Na figura 19, é observado um comportamento similar na análise de componentes principal anteriormente mencionada (Figura 22). O gráfico de *scores* mostrou que as raízes de indivíduos adultos são discriminadas das folhas por PC2, em que folhas ocupam o lado positivo de PC2 e as raízes estão distribuídas no lado negativo de PC2 (Figura 23). O gráfico de *loadings* revela um comportamento semelhante ao observado anteriormente. Nesse caso, as raízes de indivíduos adultos mostraram que os alcaloides liriodenina, anonaina, xylopina e asimilobina (Grupo 1) diferenciam das folhas de indivíduos adultos que são caracterizados principalmente pela existência de ácidos graxos (Grupo 2) (Figura 23).

Por outro lado, uma discriminação mais eficiente foi observada ao considerar a análise da região aromática, em que as amostras das raízes de indivíduos foram discriminadas das folhas de indivíduos por PC1 (Figura 24). Os metabólitos anteriormente mencionados se mostraram evidentes para o comportamento das raízes em PC1 positivo, enquanto os

metabólitos que influenciaram para folhas de indivíduos adultos em PC1 negativo não foram identificados até o momento.

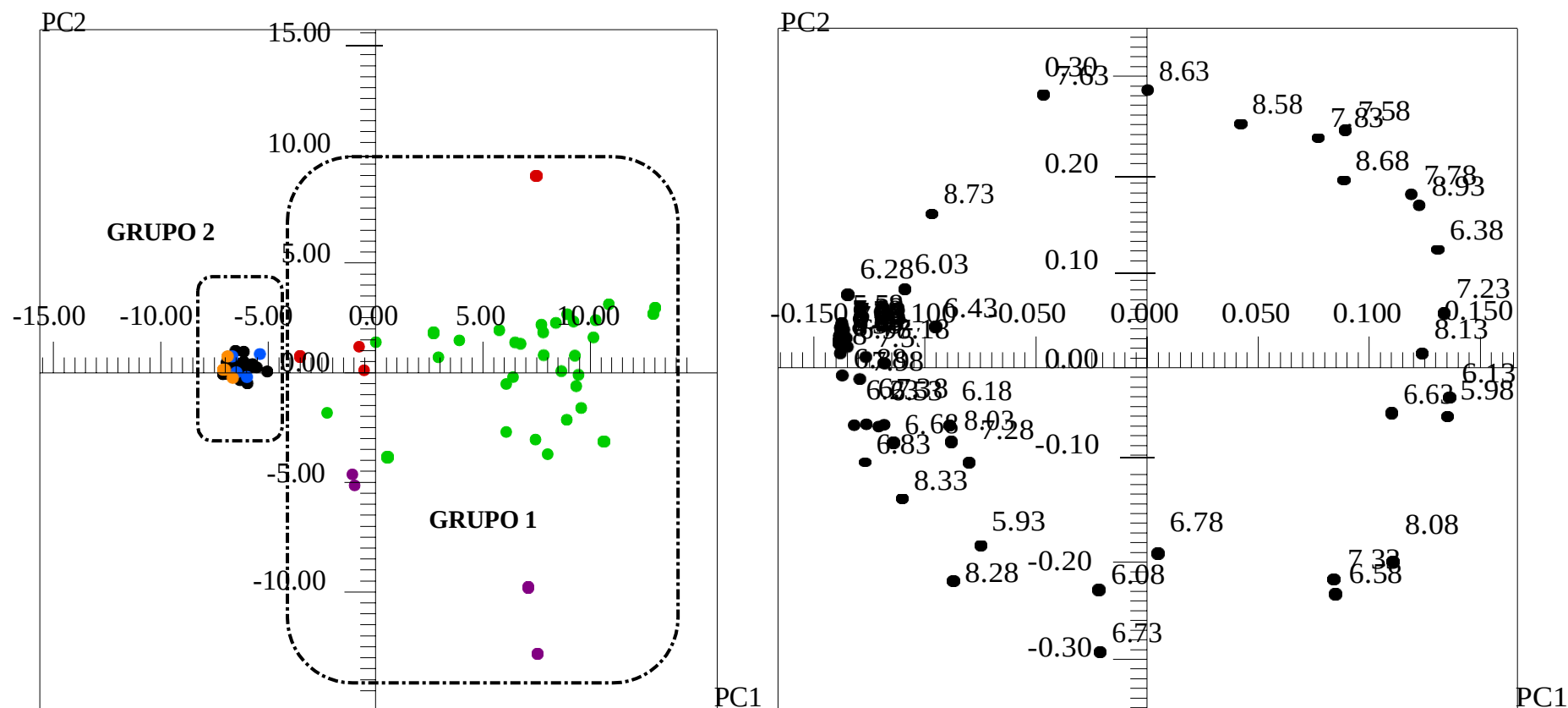


Figura 24. Análise de PCA (PC1-71,12% x PC2-9,87%) dos espectros de RMN de ^1H das amostras de *A. emarginata*. Scores: (•) Acessos – indivíduos adultos – folhas, (•) Controle – indivíduos adultos – folhas, (•) Acessos – indivíduos adultos *Annona* x *atemoya* enxertada com *A. emarginata* – folhas, (•) Acessos – indivíduos adultos – raízes, (•) Controle – indivíduos adultos – raízes, (•) Acessos – indivíduos adultos *Annona* x *atemoya* enxertada com *A. emarginata* – raízes. Loadings de PC1xPC2 explicando a influência das variáveis na distribuição das amostras apresentadas nos scores.

4.3.9. Teste de bioatividade

Os extratos [1 mg mL^{-1}] de raízes dos acessos de *Annona emarginata* (indivíduos jovens e adultos) e da planta enxertada com atemoia (*Annona x atemoya*) apresentaram atividades inibitórias variáveis entre os fungos *Colletotrichum fructicola* e *C. theobromicola* conforme as médias da absorbância (620 nm) comparadas com o controle (+) (Tabela 4).

O fungo *C. fructicola* demonstrou ser mais sensível aos extratos alcaloídicos, tendo a atividade inibida pela maioria dos extratos oriundos tanto de plantas jovens como adultas. Os acessos 1, 2, 4, 5, 7 e controle de indivíduos jovens, bem como acessos 2, 3, 4, 5, 6, 7 e controle de indivíduos adultos de *Annona emarginata* e da planta enxertada apresentaram atividade inibitória. Dessa forma, apenas o acesso 8 não demonstrou atividade alguma em nenhum dos estádios de desenvolvimento para *C. fructicola*.

O fungo *C. theobromicola* demonstrou ser mais tolerante à atividade dos extratos, sendo que apenas os acessos 2, 4 e 5 de indivíduos jovens, acesso 2 e controle de indivíduos adultos de *Annona emarginata* demonstraram efeito inibitório sobre o fungo (Figura 25).

Tabela 4. Atividade inibitória de extratos alcaloídicos de raízes e liriidenina (1 mg mL^{-1}) contra cepas fúngicas de *Colletotrichum fructicola* e *C. theobromicola* com valores médios de absorbância a 620 nm.

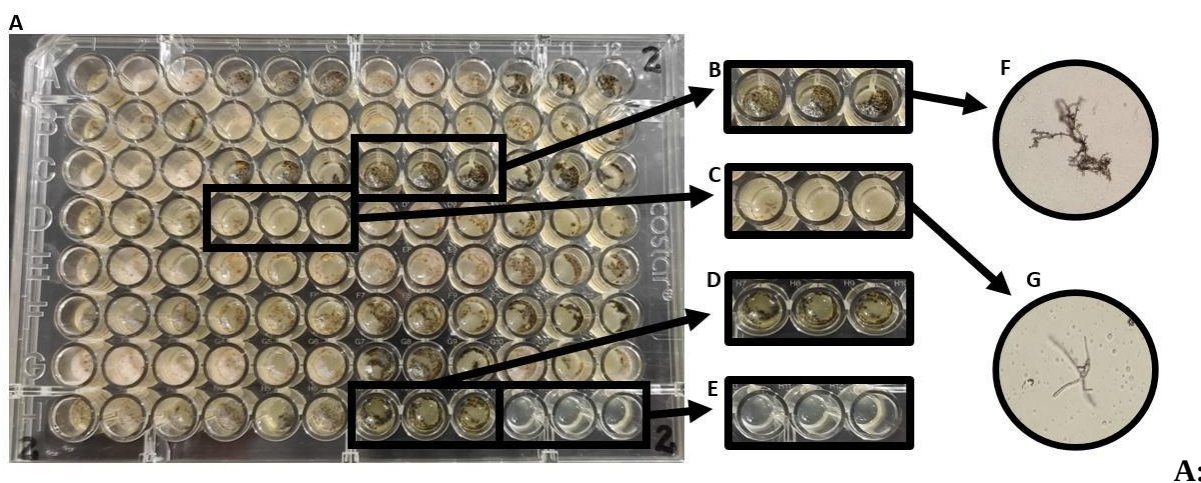
Extratos Alcaloídicos	<i>Colletotrichum fructicola</i>		<i>Colletotrichum theobromicola</i>	
	Indivíduos Jovens	Indivíduos Adultos	Indivíduos Jovens	Indivíduos Adultos
Acesso 1	1,211 < ^a	1,238 >	0,638 >	0,541 >
Acesso 2	1,083 <	1,203 <	0,350 <	0,435 <
Acesso 3	1,248 >	1,173 <	0,659 >	0,484 >
Acesso 4	1,095 <	1,219 <	0,321 <	0,556 >
Acesso 5	1,201 <	1,218 <	0,429 <	0,468 >
Acesso 6	1,233 >	1,161 <	0,469 >	0,461 >
Acesso 7	1,219 <	1,214 <	0,475 >	0,505 >
Acesso 8	1,228 >	1,223 >	0,633 >	0,578 >
Controle	1,168 <	1,101 <	0,525 >	0,350 <
<i>Annona x atemoya</i>	1,166 <		0,529 >	
Liriodenina	1,233 >		0,513 >	
Controle (+)	1,223		0,453	
Controle (-)	0,143		0,136	

^aMédia dos valores abaixo (<) do controle (+) são considerados inibitórios da atividade fúngica e acima (>) do controle (+) são considerados não inibitórios da atividade fúngica.

O teste de bioatividade dos extratos de *Annona emarginata* e *Annona x atemoya* contra

cepas fúngicas de *Colletotrichum* spp. demonstraram efeito inibitório em sua grande maioria, contribuindo de forma positiva em estudos que possibilitem identificar a atividade antifúngica dos alcaloides. Porém, o avanço nos ensaios de bioatividade, bem como isolamento das substâncias, tornam-se necessários para dar continuidade aos resultados aqui apresentados.

Figura 25. Representação visual do crescimento de isolados de *Colletotrichum theobromicola*



A: Microplacas contendo caldo BDA com diferentes extratos *Annona emarginata* e *Annona x atemoya* enxertada em *Annona emarginata* na concentração de 1 mg mL⁻¹; **B:** Extrato de raiz de *Annona emarginata* (acesso 3 – Indivíduo jovem) sem efeito inibitório sobre o fungo; **C:** Extrato de raiz de *Annona emarginata* (Acesso 4 – Indivíduo jovem) com efeito inibitório sobre o fungo; **D:** Controle positivo (com metanol a 10% no lugar do extrato) sem efeito inibitório sobre o fungo; **E:** Controle negativo (sem suspensão de conídios); **F:** (Microscópio) Formação de hifas em extratos que não inibiram a atividade do fungo; **G:** (Microscópio) Esporos germinados em extratos que inibiram a atividade do fungo.

Os extratos alcaloidais de raízes dos acessos e controle de *Annona emarginata* e raiz de *Annona x atemoya* enxertada em *Annona emarginata*, de perfil alcaloidal semelhante (anonaína, asimilobina, liriodenina, nornuciferina, lisicamina, oxoxylopina, reticulina e oxoxylopina), exibiram resposta contra os fungos *Colletotrichum fructicola* e *C. theobromicola*. De forma semelhante, extratos de alcaloides de raiz de *Annona purpurea*, os quais continham a presença dos alcaloides anonaína, liriodenina, reticulina e xylopina foram testados contra fungos de plantas, como *Colletotrichum gloesporioides*, *Curvularia lunata* e *Fusarium oxysporum*, com resultados promissores (DE-LA-CRUZ-CHACÓN *et al.*, 2019).

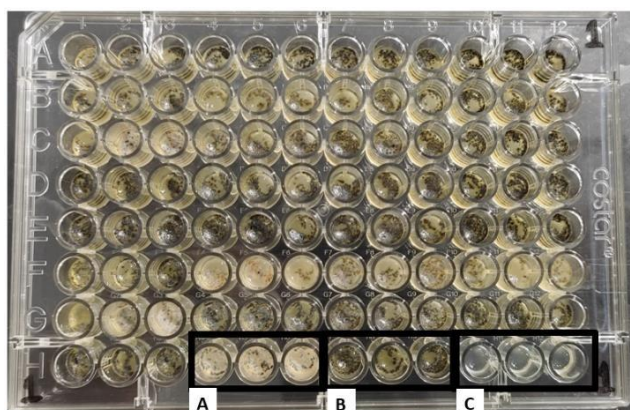
Os alcaloides anonaína, asimilobina e reticulina presentes nos extratos de *Annona emarginata* (mudas, adultas e plantas enxertadas) foram testados de forma isolada nos trabalhos de Paulo *et al.* (1992) e Costa *et al.*, (2013) que testaram os alcaloides isolados de casca de

árvore de *Annona salzmanii*, e obtiveram resultados positivos na inibição de fungos de pele como *Tricophyton rubrum* e *Microsporum gypsum* e fungos causadores de doenças infecciosas como *Candida albicans*, *C. dubliniensis* e *C. Parapsilosis*.

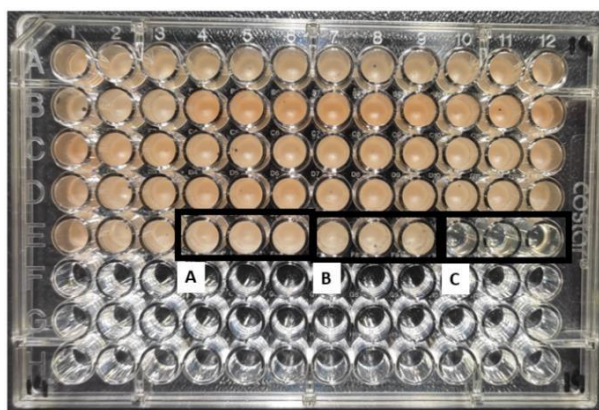
Os resultados de atividade inibitória da liriodenina isolada de raízes de *Annona emarginata* não demonstraram nenhum efeito inibitório na concentração de 1 mg mL^{-1} para os fungos *Colletotrichum fructicola* e *C. theobromicola* (Tabela 4 e Figura 26). Porém, a atividade inibitória da liriodenina isolada de casca da árvore de *Annona salzmanii*, raiz e casca da raiz de *Annona macrophyllata* ($\equiv$ *Annona diversifolia*) e extrato de alcaloide (com a presença da liriodenina) de raiz de *Annona purpurea*, apresentaram resultados positivos na inibição da atividade fúngica de *Colletotrichum gloesporioides*, *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus glaucus*, *Rhizopus stolonifer*, *Histoplasma capsulatum*, *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e *Paracoccidioides* spp. (COSTA *et al.*, 2013; DE-LA-CRUZ-CHACÓN *et al.*, 2019; DE LA CRUZ-CHACÓN *et al.*, 2011; LEVORATO VINCHE *et al.*, 2020), sendo estes, fungos de interesse tanto agrônômico, quanto medicinal.

Figura 26. Representação visual do crescimento de isolados de *Colletotrichum theobromicola* (Placa A) e *Colletotrichum fructicola* (Placa B) em microplacas contendo caldo BDA com diferentes extratos *Annona emarginata* e *Annona x atemoya* enxertada em *Annona emarginata* e liriodenina na concentração de 1 mg mL^{-1}

Placa A



Placa B



Placa A e B: Liriodenina a 1 mg mL^{-1} ($10 \text{ }\mu\text{L}$) com caldo BDA ($50 \text{ }\mu\text{L}$) e suspensão de conídios ($40 \text{ }\mu\text{L}$) (A); Controle positivo com caldo BDA ($50 \text{ }\mu\text{L}$), suspensão de conídios ($40 \text{ }\mu\text{L}$) e metanol 10% ($10 \text{ }\mu\text{L}$) (B); Controle negativo com caldo BDA ($50 \text{ }\mu\text{L}$), metanol 2% ($50 \text{ }\mu\text{L}$), sem suspensão de conídios (C).

Os resultados deste trabalho reforçam a necessidade do uso de porta-enxertos com maior

tolerância a estresses bióticos para *Annona* e neste contexto os todos os acessos apresentaram a mesma constituição química referentes ao perfil de alcaloides, sendo moléculas promissoras devido seus efeitos (BAUTISTA-BAÑOS; HERNÁNDEZ-LÓPEZ; BARRERA-NECHA, 2000; DE-LA-CRUZ-CHACÓN *et al.*, 2019; DE LA CRUZ-CHACÓN *et al.*, 2011). E embora que os *Colletotrichum* spp. estudados não tenham relatos de danos em raízes, o fato das raízes de *Annona emarginata* possuírem moléculas que inibem o desenvolvimento destes fungos indica que estas substâncias bioativas podem representar importante papel na indústria de agroquímicos para a proteção contra fungos fitopatogênicos. E neste contexto, além das substâncias citadas na literatura ainda foram detectadas pela primeira vez os alcaloides lisicamina, nornuciferina e oxoxylopina, o que indica diversidade de metabólitos especializados a serem explorados na espécie.

A quantidade de extratos alcaloidais de folhas foi baixa, não sendo suficiente para utilizar nos testes de bioatividade.

4.4. Conclusão

A partir da identificação química foi possível relatar pela primeira vez os alcaloides nornuciferina, oxoxylopina e lisicamina em raízes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer' morfotipo 'terra-fria' (araticum de terra-fria). Os alcaloides liriodenina e anonaina são predominantes em raízes de indivíduos jovens, enquanto o alcaloide reticulina é predominante em raízes de indivíduos adultos de araticum de terra-fria. Deste modo, os resultados confirmam o uso da *Annona emarginata* como porta-enxerto devido a presença de importantes alcaloides antifúngicos, e destacam alguns acessos promissores devido à tolerância a dois importantes fungos relacionados a antracnose.

4.5. Referências bibliográficas

ABDELNUR, Patrícia Verardi. Metabolômica e Espectrometria de Massas. **Circular Técnica**, **10**, [S. l.], p. 1–4, 2011.

AL-GHAZZAWI, Adel M. Anti - cancer activity of new benzyl isoquinoline alkaloid from Saudi plant *Annona squamosa*. **BMC Chemistry**, [S. l.], p. 1–6, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13065-019-0536-4>

ANAYA-ESPARZA, Luis M. *et al.* *Annona*: Underutilized species as a potential source of bioactive compounds. **Food Research International**, [S. l.], v. 138, n. October, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109775>

BARBOSA, W. L. R.; TAVARES, I. C. C.; SOARES, D. C. Alcalóides de *Aspidosperma auriculatum* Standl. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S. l.], v. 13, p. 6–8, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2003000300003>

BARRETO, R.A.; HUGHES, J.B., SOUZA, C.S; SILVA, V.D.A.; SILVA, A.R.; VELOZO, E.S; BATATINHA, M.J.M.; COSTA, M.F.D.; EL-BACHÁ, R. S. .. Costa S. L. O alcalóide monocrotalina , extraído de *Crotalaria retusa* , altera a expressão de GFAP , a morfologia e o crescimento de culturas primárias de astrócitos . **Revista Brasileira de Saúde**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 112–127, 2006. Disponível em: <http://www.rbspa.ufba.br>

BARON, Daniel *et al.* IS *Annona emarginata* CAPABLE OF ACCUMULATE ESSENTIAL HEAVY METALS WITHOUT DAMAGES IN THE METABOLISM? **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S. l.], v. 39, n. 1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0100-29452017646>

BARON, Daniel *et al.* An overview of grafting re-establishment in woody fruit species. **Scientia Horticulturae**, [S. l.], v. 243, n. May 2018, p. 84–91, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.08.012>

BARON, Daniel; GIMENEZ, Juliana Iassia; FERREIRA, Gisela. Abscysic acid and compatibility of atemoya (*Annona x atemoya* Mabb.) grafted onto native species. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S. l.], v. 40, n. 4, p. 1–5, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0100-29452018954>

BAUTISTA-BAÑOS, Silvia; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, Mónica; BARRERA-NECHA, Laura Leticia. Antifungal Screening of Plants of the State of Morelos, Mexico Against Four Fungal Postharvest Pathogens of Fruits and Vegetables. **Revista Mexicana de Fitopatología**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 36–41, 2000.

BETTIOL NETO, José Emílio *et al.* Enraizamento de estacas dos porta-enxertos Araticum-de-Terra-Fria (*Rollinia* sp.) e Araticum-Mirim (*Rollinia emarginata* Schltdl.) para anonáceas. **Ciência e Agrotecnologia**, [S. l.], v. 30, n. 6, p. 1077–1082, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1413-70542006000600005>

CASADO, Priscila Santos *et al.* Efficient method, based on microplate readers, to detect resistance to triazole (DMI) and strobilurin (QoI) fungicides in wheat blast pathogen populations. **Summa Phytopathologica**, [S. l.], v. 44, n. 3, p. 236–244, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/185072>

CHEN, Chung Yi; WU, Yang Chang. Annocherine C, A new C- α hydroxy benzylisoquinoline and other constituents from the leaves of *Annona cherimola*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, [S. l.], v. 48, n. 6 B, p. 1203–1206, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jccs.200100177>

CHOWDHURY, Shadman Sakib *et al.* Screening of antidiabetic and antioxidant potential along with phytochemicals of *Annona* genus: a review. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 7, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00300-9>

CORREIA, Patricia Luciana Carriel *et al.* Effect of Nitrogen Sources on Photosynthesis and Biosynthesis of Alkaloids and Leaf Volatile Compounds in *Annona sylvatica* A. St.-Hil. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 956–970, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42729-021-00705-8>

COSTA, Emmanoel Vilaça *et al.* Trypanocidal activity of oxoaporphine and pyrimidine- β -carboline alkaloids from the branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). **Molecules**, [S. l.], v. 16, n. 11, p. 9714–9720, 2011 a. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules16119714>

COSTA, Emmanoel Vilaça *et al.* Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and larvicidal activities of the essential oils of *Annona salzmannii* and *A. pickelii* (Annonaceae). **Natural Product Communications**, [S. l.], v. 6, n. 6, p. 907–912, 2011 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1934578x1100600636>

COSTA, Emmanoel Vilaça *et al.* Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* A. DC. (Annonaceae). **Natural Product Research**, [S. l.], v. 27, n. 11, p. 1002–1006, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.688044>

COSTA, Janaína Ribeiro. Técnicas Experimentais aplicadas às Ciências Agrárias. **Embrapa Agrobiologia**, [S. l.], p. 54, 2003. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/107882/1/DOC163.pdf>

COSTA, Jaqueline F. O. *et al.* Species diversity of *Colletotrichum* infecting *Annona* spp. in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, [S. l.], v. 153, n. 1, p. 169–180, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01630-w>

DA SILVA-FILHO, Francinaldo A. *et al.* Screening of alkaloid-producing endophytic penicillium strains from amazon medicinal plants by electrospray ionization mass spectrometry (esi-ms) and principal component analysis (pca). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S. l.], v. 32, n. 9, p. 1832–1839, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20210074>

DA SILVA, Felipe M. A. *et al.* Positive electrospray ionization ion trap mass spectrometry and ab initio computational studies of the multi-pathway fragmentation of oxoaporphine alkaloids. **International Journal of Mass Spectrometry**, [S. l.], v. 418, p. 30–36, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2016.12.004>

DE-LA-CRUZ-CHACÓN, Iván *et al.* Spatio-Temporal Variation of Alkaloids in *Annona purpurea* and the Associated Influence on Their Antifungal Activity. **Chemistry and Biodiversity**, [S. l.], v. 16, n. 2, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800284>

DE ALMEIDA, Luis Felipe Paes; DE ALENCAR, Cristina Miranda; YAMANISHI, Osvaldo Kiyoshi. Propagação por enxertia de atemoia “Thompson” sobre espécies de *Rollinia*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S. l.], v. 32, n. 2, p. 41, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-29452010005000058>

DE LA CRUZ-CHACÓN, Iván *et al.* Liriodenine, early antimicrobial defence in *Annona diversifolia*. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, [S. l.], v. 66 C, n. 7–8, p. 377–384, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/znc-2011-7-809>

DE LA CRUZ CHACÓN, I.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. Liriodenine alkaloid in *Annona diversifolia* during early development. **Natural Product Research**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 42–49, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.533373>

DE LIMA, Bruna R. *et al.* Integrative approach based on leaf spray mass spectrometry, HPLC-DAD-MS/MS, and NMR for comprehensive characterization of isoquinoline-derived alkaloids in leaves of *Onychopetalum amazonicum* R. E. Fr. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S. l.], v. 31, n. 1, p. 79–89, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190125>

DE OLIVEIRA TELES, Maria Nazaré *et al.* Alkaloids from leaves of *Annona salzmanii* and *Annona vepretorum* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, [S. l.], v. 61, p. 465–469, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.07.016>

DE Q. PAULO, Marçal *et al.* Antimicrobial activity of benzyloisoquinoline alkaloids from *Annona salzmanii* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 36, n. 1, p. 39–41, 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(92\)90058-Y](https://doi.org/10.1016/0378-8741(92)90058-Y)

DURÁN-RUIZ, Claudia Azucena *et al.* Ontogenic synchronization of *Bephratelloides cubensis*, *Annona macrophyllata* seeds and acetogenins from Annonaceae. **Journal of Plant Research**, [S. l.], v. 132, n. 1, p. 81–91, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10265-018-01078-3>

DUTRA, Livia Macedo *et al.* Chemical constituents from the leaves of *Annona pickelii* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, [S. l.], v. 41, p. 115–118, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2011.12.011>

EGYDIO-BRANDÃO, Apm; NOVAES, P.; SANTOS, Dyac. Alkaloids from *Annona*: Review from 2005 To 2016. **JSM Biochem Mol Biol**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 1031, 2017.

FÉVRIER, Anne *et al.* Acetogenins and other compounds from *Rollinia emarginata* and their antiprotozoal activities. **Planta Medica**, [S. l.], v. 65, n. 1, p. 47–49, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-1999-13961>

GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>

GONZÁLEZ-ESQUINCA, Alma Rosa *et al.* Alkaloids and acetogenins in Annonaceae development: biological considerations. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S. l.], v. 36, n. spe1, p. 01–16, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-29452014000500001>

HÖFT, M.; VERPOORTE, R.; BECK, E. Leaf alkaloid contents of *Tabernaemontana pachysiphon* as influenced by endogenous and environmental factors in the natural habitat. **Planta Medica**, [S. l.], v. 64, n. 2, p. 148–152, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-2006-957393>

HONÓRIO, Ana Beatriz Marques *et al.* Impact of drought and flooding on alkaloid production in *Annona crassiflora* Mart. **Horticulturae**, [S. l.], v. 7, n. 10, p. 1–14, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/horticulturae7100414>

ICHIMARU, Momoyo *et al.* Hydroxyespintanol and schefflerichalcone: Two new compounds from *Uvaria scheffleri*. **Journal of Natural Medicines**, [S. l.], v. 64, n. 1, p. 75–79, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11418-009-0358-0>

JUNQUEIRA, Nilton Tadeu Vilela; JUNQUEIRA, Keize Pereira. Principais doenças de

anonáceas no Brasil: Descrição e controle. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S. l.], v. 36, n. SPEC. EDITION 1, p. 55–64, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452014000500006>

LAN, Yu Hsuan *et al.* The first bis-retrochalcone from *Fissistigma latifolium*. **Planta Medica**, [S. l.], v. 77, n. 18, p. 2019–2022, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0031-1280088>

LEBOEUF, M. *et al.* The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 21, n. 12, p. 2783–2813, 1980. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)85046-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)85046-1)

LEITE, Débora O. D. *et al.* *Annona* Genus: Traditional Uses, Phytochemistry and Biological Activities. **Current Pharmaceutical Design**, [S. l.], v. 26, n. 33, p. 4056–4091, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1381612826666200325094422>

LEITE, Grazianny Andrade *et al.* Portaenxertos e métodos de enxertia na produção de mudas de Atemoieira (*Annona squamosa* L. x *Annona cherimola* Mill.). **Semina: Ciências Agrárias**, [S. l.], v. 34, n. 5, p. 2117–2128, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n5p2117>

LEVORATO VINCHE, Adriele Dandara *et al.* Antifungal activity of liriodenine on agents of systemic mycoses, with emphasis on the genus *Paracoccidioides*. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, [S. l.], v. 26, n. October 2020, p. 1–12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0023>

LI, Haili *et al.* Comparative transcriptomic analysis of split and non-split atemoya (*Annona cherimola* Mill. × *Annona squamosa* L.) fruit to identify potential genes involved in the fruit splitting process. **Scientia Horticulturae**, [S. l.], v. 248, n. January, p. 216–224, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.017>

LIMA, Micheline A. *et al.* Alkaloids and volatile constituents from *Guatteria poeppigiana*. **Biochemical Systematics and Ecology**, [S. l.], v. 32, n. 3, p. 347–349, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2003.08.006>

LINDON, John C.; NICHOLSON, Jeremy K. Analytical technologies for metabonomics and metabolomics, and multi-omic information recovery. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 194–204, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.08.009>

LO, Wen Li; CHANG, Fang Rong; WU, Yang Chang. Alkaloids from the leaves of *Fissistigma glaucescens*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, [S. l.], v. 47, n. 6, p. 1251–1256, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jccs.200000172>

LÚCIO, Ana Silvia Suassuna Carneiro *et al.* **Alkaloids of the Annonaceae: Occurrence and a Compilation of Their Biological Activities**. [S. l.: s. n.]. v. 74E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.alkal.2014.09.002>

MANTOAN, Luís Paulo Benetti *et al.* Photosynthetic adjustment after rehydration in *Annona emarginata*. **Acta Physiologiae Plantarum**, [S. l.], v. 38, n. 6, p. 1–11, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2171-1>

NAVARRO, V. R. *et al.* Alcaloides de *Duguetia flagellaris* Huber (Annonaceae). [S. l.], 2001.

NIETO, Matias. ALKALOIDS FROM *Rollinia emarginata*. [S. l.], v. 2783, n. October 1985, p. 15261, 1986.

NIK ABDULLAH ZAWAWI, Nik Khairunissa *et al.* Oxoaporphine alkaloids and flavonols from *Xylopiya ferruginea* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, [S. l.], v. 43, p. 7–9, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.02.019>

NUGRAHA, Ari Satia *et al.* Anti-infective and anti-cancer properties of the *Annona* species: Their ethnomedicinal uses, alkaloid diversity, and pharmacological activities. **Molecules**, [S. l.], v. 24, n. 23, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules24234419>

OROZCO-CASTILLO, José Agustín *et al.* Aporphine alkaloid contents increase with moderate nitrogen supply in *Annona diversifolia* Saff. (Annonaceae) seedlings during diurnal periods. **Natural Product Research**, [S. l.], v. 6419, p. 1–6, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1143826>

OVILE MIMI, Carolina *et al.* Chemophenetics as a Tool for Distinguishing Morphotypes of *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer. **Chemistry and Biodiversity**, [S. l.], v. 18, n. 10, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100544>

PAREEK, Sunil *et al.* Postharvest physiology and technology of *Annona* fruits. **Food Research International**, [S. l.], v. 44, n. 7, p. 1741–1751, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.016>

RABÊLO, Suzana V. *et al.* Alkaloids isolated from the leaves of atemoya (*Annona cherimola* × *Annona squamosa*). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 419–421, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.006>

RASAMIZAFY, S.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Alcaloides des annonacees, Alcaloides des ecórces d'un *Duguetia spixiana* de Bolivie. **Journal of Natural Products**, [S. l.], v. 50, n. 4, p. 674–679, 1989.

RILEY-SALDAÑA, Christian Anabí *et al.* Acetogenins and alkaloids during the initial development of *Annona muricata* L. (Annonaceae). **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, [S. l.], v. 72, n. 11–12, p. 497–506, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/znc-2017-0060>

SAITO, Maria Lucia; OLIVEIRA, Fernando De. Seasonal Variation of *Annona cacans* Warming Composition. [S. l.], v. 12, 1994.

SILVA, Felipe M. A. *et al.* Chemotaxonomy of the Amazonian *unonopsis* species based on leaf alkaloid fingerprint direct infusion ESI-MS and chemometric analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 599–604, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150296>

SOUSA, Marília Caixeta *et al.* The production of alkaloids in *Annona cacans* seedlings is affected by the application of GA4+7 + 6-Benzyladenine. **Biochemical Systematics and Ecology**, [S. l.], v. 84, n. March, p. 47–51, 2019 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2019.03.007>

VENDRAMIN, Mayara Evelyn *et al.* Chemical constituents from the leaves of *Annona*

rugulosa (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, [S. l.], v. 49, n. September 2009, p. 152–155, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2013.03.005>

WINK, Michael. Plant Secondary Metabolism: Diversity, Function and its Evolution. [S. l.], v. 1, n. 4, p. 9–12, 2008.

ZACARONI, Ana Beatriz *et al.* Desempenho agrônômico de gravioleira (*Annona muricata* L.) sobre diferentes espécies de porta-enxertos. **Cadernos de Agroecologia**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 5, 2014.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

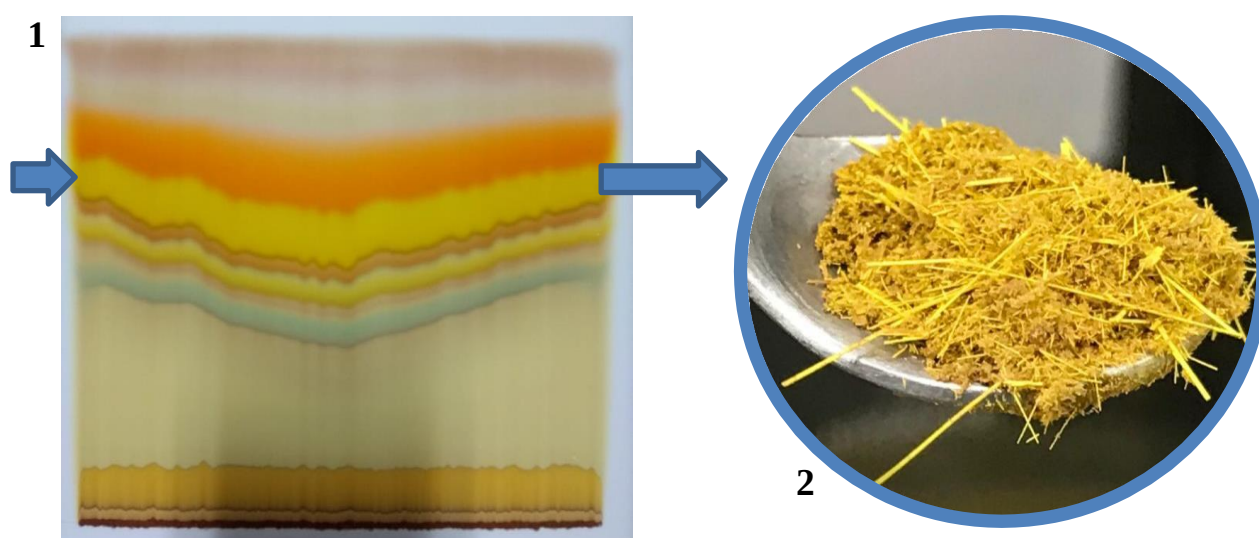
Esta pesquisa revelou que não existem diferenças no perfil de alcaloides entre os estádios de desenvolvimento de *Annona emarginata*, mas que a concentração dos alcaloides detectados pode variar de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta.

Alguns alcaloides são reportados pela primeira vez, indicando a importância da espécie *Annona emarginata*, o que também sugere que é espécie promissora para novos estudos.

As respostas positivas do teste de bioatividade sugerem estudos com outros agentes patogênicos.

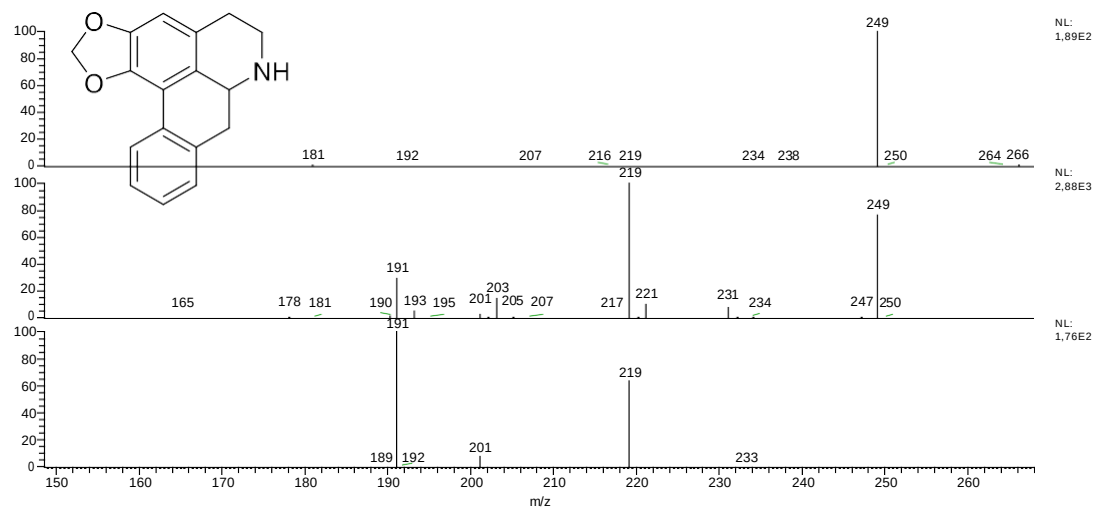
A bioprospecção confirmou ser importante ferramenta na seleção de espécies com maior tolerância a patógenos como a *Annona emarginata*, justificando seu uso como porta-enxerto para atemoia (*Annona x atemoya* Mabb.), além de dar importante indicativo de moléculas para a indústria agrícola e farmacêutica.

6. APÊNDICES

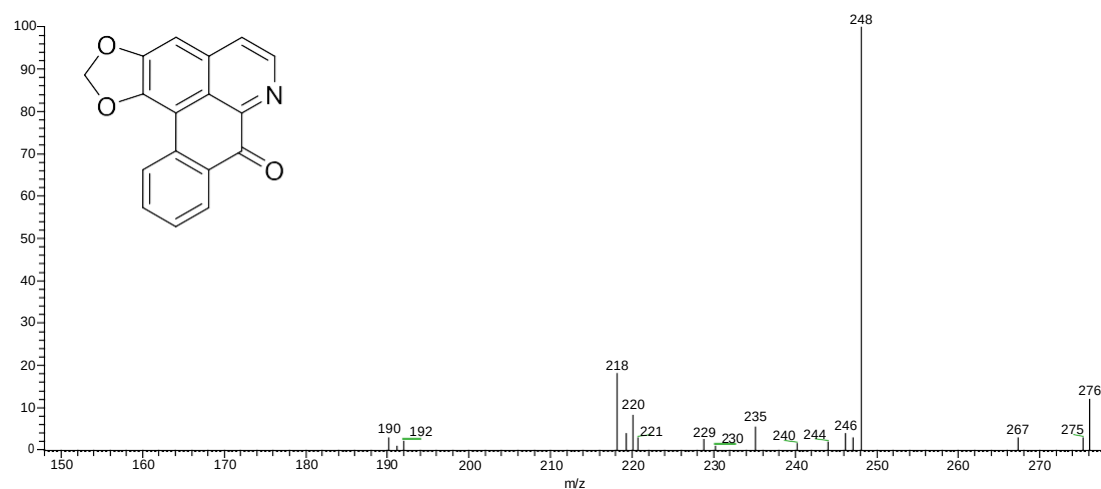


Apêndice A: (1) Placa preparativa TLC com extrato de alcaloides purificado por cristalografia fracionada. As setas azuis representam a região (cor amarela) a qual foi identificada como

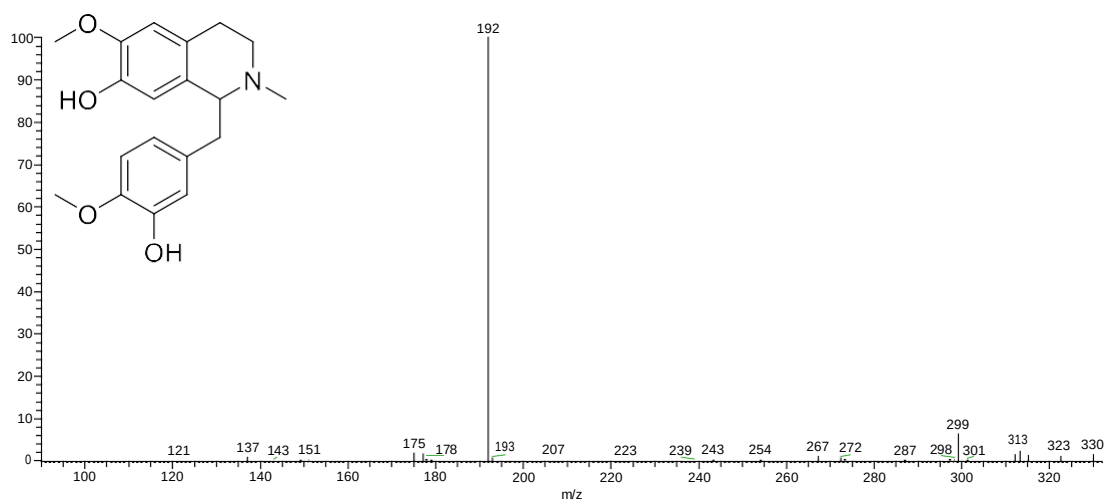
100% 249 NL: 1,8-OCF3



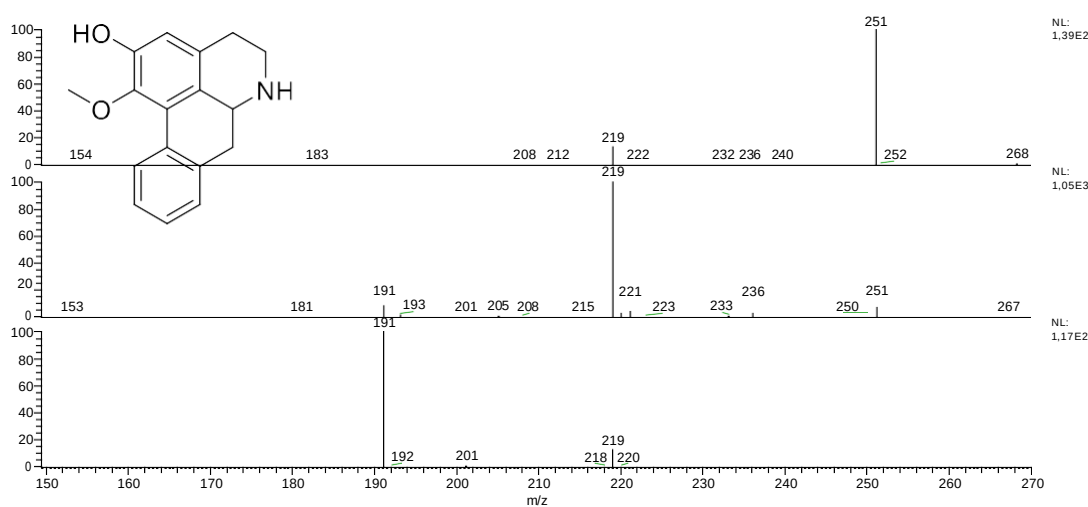
Apêndice B. Espectro de ESI-MSⁿ (modo positivo) do íon de m/z 266 (anonaína).



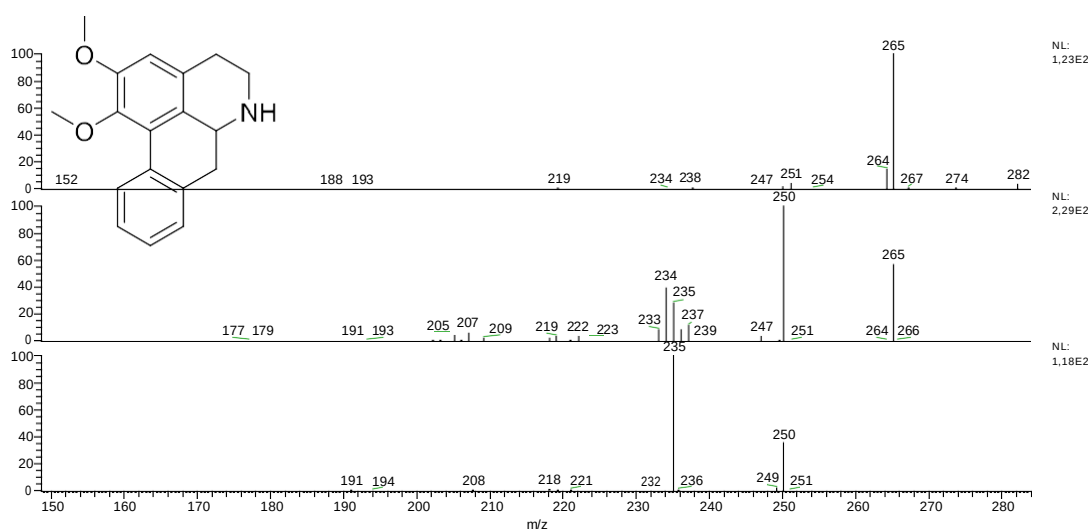
Apêndice C. Espectro de ESI-MS² (modo positivo) do íon de m/z 276 (liriodenina).



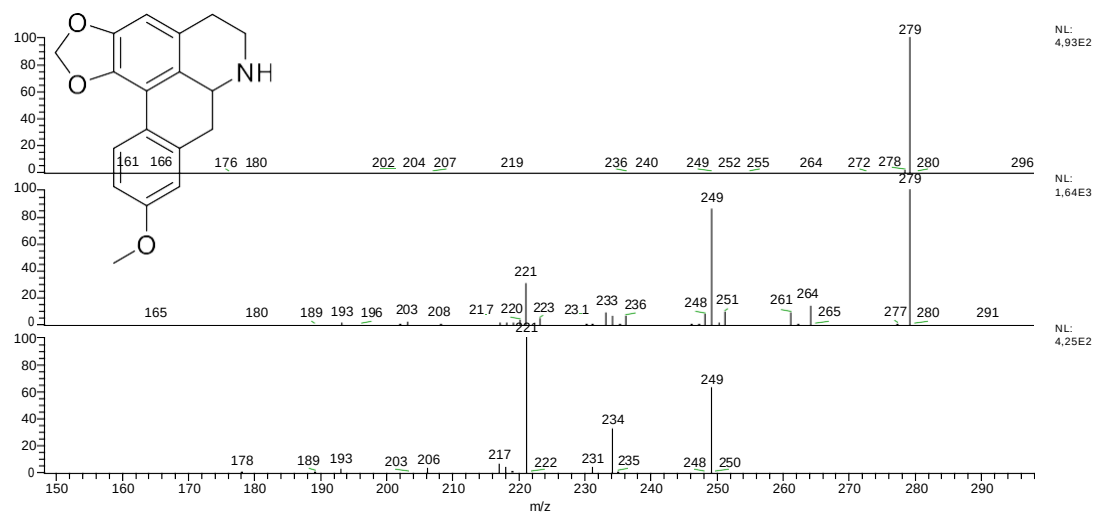
Apêndice D. Espectro de ESI-MS² (modo positivo) do íon de m/z 330 (reticulina).



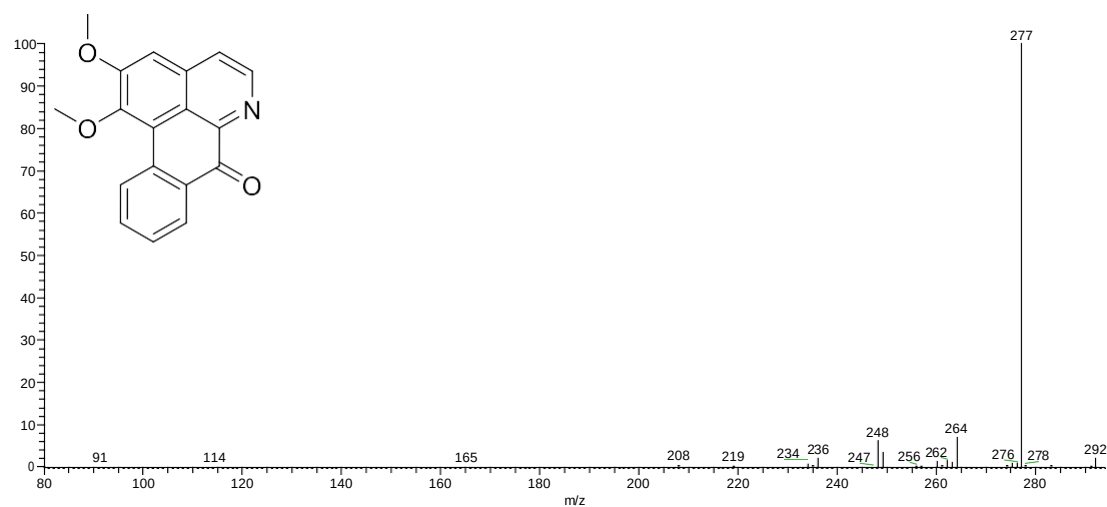
Apêndice E. Espectro de ESI-MSⁿ (modo positivo) do íon de m/z 268 (asimilobina).



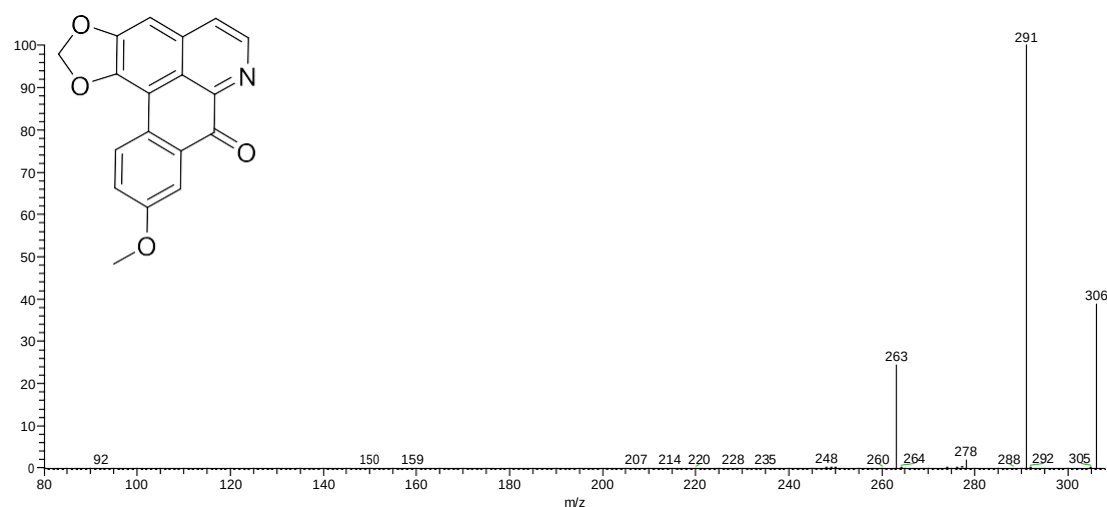
Apêndice F. Espectro de ESI-MSⁿ (modo positivo) do íon de m/z 282 (nornuciferina).



Apêndice G. Espectro de ESI-MS² (modo positivo) do íon de m/z 296 (xylopina).



Apêndice H. Espectro de ESI-MS² (modo positivo) do íon de m/z 292 (lisicamina).



Apêndice I. Espectro de ESI-MS² (modo positivo) do íon de m/z 306 (oxoxylopina).