Anary Priscila Monteiro Egydio

Análises das variações fitoquímicas, estrutura genética e importância econômica de *Annona crassiflora* Mart., no cerrado

São Paulo

2009

Análises das variações fitoquímicas, estrutura genética e importância econômica de *Annona crassiflora* Mart., no cerrado

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Botânica.

Orientadora: Dra Déborah Yara Alves Cursino dos Santos

São Paulo

2009

Ficha catalográfica

Egydio, Anary Priscila Monteiro
Análises das variações fitoquímicas,
estrutura genética e importância econômica de
Annona crassiflora Mart., no cerrado
Páginas 68

Tese (Doutorado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Botânica.

1. *Annona crassiflora* 2. cerrado I.
Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Botânica

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

Dedico a minha amada família
Aos meus pais Regina e Eydio
Aos meus irmãos Emanuel e André

*“... A Terra, que é nosso lar, está viva como uma
comunidade de vida única...
...Todos as coisas tecem um todo único...”
Daisaku Ikeda*

Agradecimentos

- ❖ *À Profa. Dra Débora Yara Alves Cursino dos Santos pela preciosa orientação, pelo valioso exemplo de conduta profissional e pela amizade.*
- ❖ *Ao pesquisador MSC João Ms. João Del Giudice Neto, responsável da Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu (Instituto de Botânica-Ibt) - São Paulo - que permitiu a realização do presente trabalho e proporcionou excelente infra-estrutura e auxílio técnico dos funcionários.*
- ❖ *Ao engenheiro agrônomo Carlos Scatena Zanato, pesquisador responsável e administrador da Estação Ecológica de Jataí e Experimental de Luís Antônio (Instituto Florestal-IF), que permitiu a realização do presente trabalho e proporcionou excelente infra-estrutura e auxílio técnico dos funcionários.*
- ❖ *Ao gerente de Projetos e Pesquisas do Instituto Estadual de Florestas - José Medina da Fonseca - que autorizou a realização do presente trabalho no Parque Estadual do Sumidouro e Serra do Rolá-Moça e proporcionou excelente infra-estrutura e auxílio técnico dos funcionários.*
- ❖ *À Recor - Reserva Ecológica do IBGE - que autorizou a realização do presente trabalho e proporcionou excelente infra-estrutura e auxílio técnico dos funcionários.*
- ❖ *À Sra. Maria Nílva Bortoletti - proprietária da Fazenda Sonho Verde, localizada em Cristalina (Goiás), que atenciosamente e de forma prestativa autorizou a realização do presente trabalho em sua propriedade.*
- ❖ *À Profa. Dra. Eny Iochevet por ter autorizado a realização da análise de aminoácidos livres no Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.*
- ❖ *À Dra Cláudete Santa Catarina pela orientação para o desenvolvimento da análise de aminoácidos livres no Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.*

- ❖ *Ao pesquisador Dr Marco Tiné que autorizou a análise de identificação dos carboidratos solúveis no laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Botânica de São Paulo.*
- ❖ *À Profa. Dra Vera Solferini que autorizou e orientou a realização da análise de isoenzimas no Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da Unicamp- Universidade Estadual de Campinas.*
- ❖ *Ao mestrando Kaiser Dias Schwarcz pelo auxílio na realização da análise de isoenzimas no Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da Unicamp- Universidade Estadual de Campinas.*
- ❖ *Ao Prof. Dr Antonio Salatino e a Profa. Dra Maria Luíza Salatino pelos preciosos momentos de descontração e pelos diálogos construtivos.*
- ❖ *À Profa. Dra Cláudia Maria Furlan por toda colaboração e por todos os momentos agradáveis.*
- ❖ *Aos colegas do Laboratório de Fitoquímica - Adne, Carol, Carlos, Cíntia, Cristiane, Daniel, Fábio, Lucimar, Mayumi, Milene e Silvana- por toda colaboração mútua e os vários momentos agradáveis.*
- ❖ *À Mourisa por toda a eficiência e prestatividade como técnica do laboratório, e também pelos momentos de descontração.*
- ❖ *Ao assistente de campo - Sr. Paulo que de forma muito atenciosa contribuiu para a realização de minhas coletas na reserva de Mogi-Guaçu.*
- ❖ *À CAPES, pela bolsa a mim concedida.*
- ❖ *À FAPESP pela bolsa auxílio concedida para o desenvolvimento da análise de variação de alcalóides.*

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL	01
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
CAPÍTULO 1. USO POTENCIAL DA POLPA E DAS SEMENTES DE <i>Annona crassiflora</i> MART.	20
<i>Abstract</i> /Resumo	20
Introdução	21
Materiais e Métodos	22
Resultados e Discussão	24
Referências Bibliográficas	32
CAPÍTULO 2. VARIAÇÕES NA CONCENTRAÇÃO E NO PERFIL DE ALCALÓIDES DE <i>Annona crassiflora</i> MART. NO CERRADO	36
<i>Abstract</i> /Resumo	36
Introdução	37
Materiais e Métodos	38
Resultados e Discussão	39
Referências Bibliográficas	48
CAPÍTULO 3. COMPARAÇÃO DE POPULAÇÕES DE <i>Annona crassiflora</i> MART. DE DIFERENTES REGIÕES DE CERRADO: MARCADORES ISOENZIMÁTICOS	51
<i>Abstract</i> /Resumo	51
Introdução	52
Materiais e Métodos	53
Resultados e Discussão	57
Referências Bibliográficas	61
CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
RESUMO GERAL	66
ABSTRACTS	67

INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, um dos problemas ambientais mais críticos é a perda da biodiversidade, apesar da sua reconhecida importância como bem público em termos globais e locais (Perrings & Gadgil, 2003).

Várias atividades humanas, juntamente com o crescimento populacional, têm provocado a rápida deterioração dos ecossistemas e o declínio do número de espécies e de sua diversidade genética (Prescott *et al.*, 2000). De acordo com dados da FAO (2001), a perda das florestas tropicais durante a década de 1990 foi de aproximadamente 15,2 milhões de hectares por ano, dos quais 90% ou mais foram convertidos em áreas de uso agrícola e outros fins.

Por outro lado, apesar do avanço na produção agrícola em todo o mundo, não há introdução significativa de novas fontes alimentícias na dieta humana. Historicamente, o homem utiliza aproximadamente três mil espécies vegetais como alimentos. Destas, cerca de 150 são cultivadas e apenas 20 são produzidas e consumidas mundialmente. Em contrapartida, a Organização Mundial da Saúde estima que 1,2 bilhões de pessoas sofram com a má nutrição, sendo observada uma tendência de aumento desse número, principalmente nos países em desenvolvimento (Simpson & Ogorzaly, 2001).

Nesse contexto, muitos países têm procurado promover o manejo dos recursos florestais sobre uma base sustentável (Hinrichsen & Robey, 2000). O Brasil tem se empenhado em discutir e implementar a CDB - Convenção sobre Diversidade Biológica, firmada na Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento – CNUMAD (Rio-92) que tem os seguintes objetivos: a conservação da biodiversidade, que engloba diversidade genética, de espécies e ecossistemas; o uso sustentável dos recursos biológicos e a repartição justa e equitativa dos benefícios derivados da utilização dos recursos genéticos e bioquímicos (Péret de Sant'Ana, 2002).

As políticas ambientais brasileiras têm evoluído gradativamente e têm mostrado adequação aos princípios internacionais da CDB. Com base nos instrumentos legais infraconstitucionais todos os setores da sociedade têm sido orientados à conservação e ao uso sustentável dos recursos florestais (Wolf, 2000).

Um dos dispositivos legais que abordam esse assunto é a Lei Nº 11.284, de 2 de Março de 2006, que dispõe princípios e definições para gestão de florestas públicas. Um dos princípios abordados no artigo 2º se refere ao o estabelecimento de atividades que promovam o uso eficiente e racional das florestas e que contribuam para o cumprimento das metas do desenvolvimento sustentável local, regional e de todo o País. Outro princípio é a promoção do processamento local e o incentivo ao aumento da agregação de valor aos produtos e serviços da floresta, bem como à diversificação industrial, ao desenvolvimento tecnológico e outros. O artigo 3º desta mesma Lei define o manejo florestal sustentável como aquele que consiste em

administrar as florestas com intuito de obter benefícios econômicos, sociais e ambientais, porém respeitando os mecanismos de sustentação do ecossistema e utilizando as espécies madeireiras, os seus produtos e subprodutos não madeireiros, bem como uso de outros bens e serviços de natureza florestal, de forma cumulativa ou alternativa (Presidência da República, 2006).

Neste sentido, tem aumentado a expectativa no que se refere ao potencial dos produtos florestais não madeireiros (NTFPs) para sustentar os sistemas rurais e como algo capaz de promover o desenvolvimento e a conservação de forma compatível (Wollenberg & Ingles, 1998). Para isso, é importante compreender efetivamente o valor das espécies no âmbito sócio-econômico (Lawrence *et al.*, 2005) e ecológico. São necessárias pesquisas sobre a caracterização do potencial de uso econômico das espécies vegetais, principalmente no que se refere às propriedades alimentícias e medicinais, e são necessárias avaliações sobre o nível de variabilidade intrínseco de substâncias presentes nessas espécies, o que pode afetar o seu uso potencial e seu valor.

No Brasil os estudos com esses enfoques têm avançado em todos os ecossistemas, porém os conhecimentos ainda são muito incipientes, principalmente no bioma cerrado (Carpanezzi, 2005). O cerrado brasileiro cobre uma área de aproximadamente dois milhões de quilômetros quadrados. As áreas de vegetação do cerrado estão amplamente distribuídas, sendo a maior parte na região central, abrangendo os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Pará, Rondônia e Acre (Ratter *et al.*, 2006).

O cerrado é considerado um dos 25 sítios de maior biodiversidade do mundo (Myers *et al.*, 2000). No entanto, estima-se que nos últimos 40 anos cerca de 50% a 60% da cobertura original tenha sido removida (Ratter *et al.*, 2006). Com os avanços da agricultura moderna, o cerrado tem sido substituído por áreas de pastagens ou para cultivo de soja e outros grãos (Felfili, 2002). A rápida e intensiva expansão da produção agrícola no cerrado tem fragmentado esse bioma, causando perda da biodiversidade e ameaçando a viabilidade das espécies a longo prazo.

Nesse bioma há uma grande quantidade de produtos florestais não madeireiros potencialmente úteis economicamente. Os frutos de espécies nativas do cerrado ocupam um lugar de destaque na alimentação da população local. Muitos desses frutos possuem elevado teor de açúcares, proteínas, vitaminas e sais minerais (Almeida *et al.*, 1998a). Além do uso alimentício, há diversas espécies vegetais com potencial oleaginoso, bem como fornecedoras de fibras, forragem, tanino, corantes e medicamentos. Estes produtos são utilizados de diversas formas pelas populações locais que buscam na sua exploração, alternativas que contribuam para sua sobrevivência (Gomes & Amâncio, 1995). Muitos produtos florestais não madeireiros são comercializados nas margens das estradas, nas feiras livres, ou através de uma cadeia

de comercialização que inclui intermediários locais e regionais, consumidores e indústrias de processamento (Chávez Pozo, 1997).

Dentre as várias espécies de uso popular, algumas são da família Annonaceae. Essa família é constituída por, aproximadamente, 120 gêneros com distribuição marcadamente tropical e subtropical em todo o mundo (Joly, 2002). Dentre esses gêneros, *Annona* é considerado muito importante economicamente por apresentar algumas espécies que são amplamente cultivadas e comercializadas no Brasil, como *A. squamosa* (fruta-do-conde), *A. muricata* (graviola), *A. reticulata* (condessa) e *A. cherimola* (cherimóia), todas não nativas. Essas espécies são consideradas economicamente importantes, principalmente, devido às propriedades nutricionais dos frutos que são consumidos *in natura* ou na forma de sucos e sorvetes (Lorenzi & Matos, 2002). Há espécies silvestres dessa família que não apresentam importância econômica relevante ao mercado, porém são muito apreciadas por comunidades locais.

A *Annona crassiflora* Mart. é uma espécie nativa do cerrado e apresenta ampla distribuição nesse bioma, sendo encontrada na Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Tocantins. É conhecida popularmente como araticum, marolo, pinha-do-cerrado, entre outros. Os frutos dessa espécie são muito apreciados por populações locais, sendo encontrados em muitos pomares domésticos e consumidos *in natura* e/ou utilizados na fabricação de compotas, doces, geléias, sorvetes, sucos e licores (Almeida *et al.*, 1998b, Lorenzi, 1998, Lorenzi & Matos, 2002) (**Figura 1**).

É uma espécie arbórea de 4 a 8 m de altura, o diâmetro do tronco é de 20 a 30 cm e é revestido por casca áspera e corticosa. As folhas são alternas, simples, sem estípulas, são crasso-membranosas, glaucas e ferrugínea-hirsutas quando jovens e o limbo é obovado a oblongo (Ribeiro *et al.*, 2000). As flores são solitárias, axilares e têm pétalas engrossadas e carnosas. Seu fruto é do tipo baga subglobosa, de superfície tomentosa e tuberculada ou papilosa. A polpa é amarela ou avermelhada, adocicada e tem cheiro agradável. As sementes são elípticas. Floresce durante os meses de outubro e novembro e a frutificação ocorre a partir de janeiro e fevereiro (Lorenzi, 1998).

No que se refere à biologia reprodutiva as flores são hermafroditas, apresentam protoginia e termogênese. De acordo com Gottesberger (1989), a forte dicogamia com quase nenhuma sobreposição das fases feminina e masculina em flores de *Annona* aumenta a possibilidade de fecundação cruzada (Ribeiro *et al.*, 2000). A dispersão das sementes de *A. crassiflora* é realizada por animais (zoocoria) (Rizzini, 1971).

Com relação às propriedades químicas, dentre vários metabólitos secundários, a análise de alcalóides merece atenção especial considerando que é uma importante classe de substâncias, característica da Annonaceae.

Figura 1. Aspectos gerais de *Annona crassiflora*. A) Vista geral da planta; B) Detalhe da flor; C) Detalhe do fruto. (Fotos: A. P. M. Egydio, 2007)

A maioria dos alcalóides que ocorrem nessa família são derivados isoquinolínicos, dentre os quais são encontrados os benziltetraidroisoquinolínicos, os bisbenzilisquinolínicos, as protoberberinas, os aporfínoídes *sensu lato*, incluindo aporfínicos *sensu strictu*, oxoaporfínicos e fenantrenos (Leboeuf *et al.*, 1982), as cularinas e as isoquinolonas. Poucos alcalóides relatados em Annonaceae não são derivados isoquinolínicos, como a eupolauridina, a naftiridina, os pirimídicos- β -carbolínicos, os indolosesquiterpenos (Cavé, 1985) e outros.

Todos os alcalóides isoquinolínicos são derivados dos benzilisquinolínicos, com poucas exceções em Cactaceae, por exemplo. A reação inicial da biossíntese benzilisquinolínica é a condensação de duas unidades aromáticas, ambas derivadas da tirosina (Cavé, 1985).

Em *Annona* já foram relatados alcalóides como o benzilisquinolínico reticulina (Chang *et al.*, 2000a), os aporfínicos anonaina e asimilobina (Chang *et al.*, 2000b) e o alcalóide oxoaporfínico liriodenina (Wu *et al.*, 1993). Todos esses alcalóides foram detectados em folhas e cascas de *A. crassiflora* provenientes das Guianas (Hocquemiller *et al.*, 1982) (**Figura 2**).

Muitos desses alcalóides têm potencial medicinal. Alguns relatados em *A. cherimola* têm atividade citotóxica (Cassady, 1990) e efeito relaxante (Chuliá *et al.*, 1995), em *A. squamosa* foi encontrado um alcalóide que é um princípio ativo cardiotônico (Wagner *et al.*, 1980) e alguns alcalóides provenientes de *A. purpurea* que mostraram significativa inibição da agregação plaquetária (Chang *et al.*, 1998). Além disso, algumas dessas substâncias têm propriedades tóxicas, podendo conferir às plantas proteção contra herbívoros, pragas e patógenos. Estudos com extratos de diversas espécies de *Annona* demonstraram atividades larvicida, inseticida, moluscicida, entre outras (Saxena *et al.*, 1993).

A ocorrência dos alcalóides nas plantas pode ser dependente de seu habitat e distribuição geográfica (Levin, 1976). Há espécies que apresentam diferentes quimiotipos caracterizados pela variação na composição de alcalóides de acordo com a distribuição espacial. Na natureza, variações dos fatores bióticos e abióticos podem resultar em diferentes padrões químicos ecogeográficos. Macel *et al.* (2004) detectaram diferentes quimiotipos em populações de *Senecio jacobaeae* com base nos seus alcalóides pirrolizidínicos. Esses autores sugeriram que esses padrões teriam sido influenciados pelas diferenças na comunidade de herbívoros nas diferentes populações. Tais diferenças podem interferir na capacidade de adaptação da espécie ao ambiente, pois essas substâncias podem estar relacionadas à resistência ao ataque de herbívoros e patógenos.

Estudos sobre o padrão de variação adaptativa de caracteres fenotípicos também são importantes para subsidiar ações de conservação, pois podem ser um indicativo do potencial para a sobrevivência das

espécies. Há poucos dados na literatura relacionados à existência de variação na concentração e no perfil de alcalóides correlacionados a diferenças geográficas, principalmente em espécies nativas do Brasil.

Reticulina isolada de
A. glabra

Anonaina isolada de
A. purpurea

Assimilobina isolada de
A. purpurea

Liriodenina isolada de
A. montana

Figura 2. Exemplos de alcalóides identificados em espécies de *Annona*.

Com relação aos métodos que são utilizados para analisar os alcalóides, geralmente essas substâncias, por apresentarem caráter básico, são extraídas das plantas através de um solvente alcoólico fracamente ácido. Na forma de sal se tornam solúveis em água. Em seguida, é adicionada amônia concentrada para que o alcalóide volte à sua forma original (básica), sendo agora solúvel em solventes orgânicos. Esse extrato, geralmente é submetido a testes de detecção, sendo usados para isso diferentes reagentes, como Dragendorff, por exemplo (Chang *et al.*, 2000a).

Nos últimos anos, a quantificação de alcalóides tem sido feita por cromatografia a gás acoplada ao detector de ionização por chama (CG/FID) (Macel *et al.*, 2004) ou acoplado ao espectrômetro de massas (Suau *et al.*, 2002) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Em geral, a concentração dos alcalóides individuais é feita através de uma curva de calibração usando o método de padrão externo (Milanowski *et al.*, 2002).

A identificação dos alcalóides pode ser feita por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG / MS), ressonância magnética nuclear de C (RMN C) e de H (RMN H), espectroscopia de radiação infravermelha (IV), espectrofotometria de ultravioleta (UV) e cromatografia em camada delgada (CCD) (Chang *et al.*, 1998).

Quanto às características nutricionais do fruto de *A. crassiflora*, recentemente alguns estudos relataram as propriedades químicas da polpa e das sementes dessa espécie. Cada 100 g de polpa contém 52 kcal, 76,32% de umidade, 1,28% de proteína, 0,29% de lipídeos cuja composição dos ácidos graxos é de cerca de 80% de monoinsaturados, 16% de saturados e 4% de poliinsaturados, 21,5% de carboidratos totais (Almeida *et al.*, 1998b), 52 mg de Ca, 24 mg de P, 2,3 mg de Fe, 21 mg de vitamina C, 50 mg de vitamina A, 0,04 mg de vitamina B1 e 0,07 mg de vitamina B2 (Almeida *et al.*, 1998a). Caramori *et al.* (2004) analisaram a composição centesimal da semente de *A. crassiflora* e encontraram 4,8% de umidade, 2,27% de cinzas, 16,33% de proteínas, 35,24% de lipídeos e 41,46% de carboidratos. Entretanto, ainda faltam informações com relação ao potencial nutricional da polpa e das sementes dessa espécie. Não há dados na literatura sobre a concentração total e a identificação de aminoácidos livres, relacionados ao perfil dos carboidratos solúveis na polpa e nas sementes e o perfil de ácidos graxos não foi descrito nas sementes.

Os aminoácidos são unidades químicas de baixo peso molecular (75-204 u) que possuem, no mínimo, um grupo carboxílico e um grupo amina ligados ao mesmo átomo de carbono (Oliveira *et al.*, 2002). Tanto os tecidos animais quanto os vegetais possuem uma pequena porção (1-3%) dos aminoácidos na forma livre, sendo a maioria encontrada como parte constituinte de proteínas (Farfán, 1994).

A composição de aminoácidos, tanto livres como formando peptídeos, é limitada em tabelas de composição de alimentos (Farfán, 1994). Os aminoácidos são substâncias biologicamente ativas presentes nos alimentos e bebidas (Belitz & Grosh, 1999). Estão envolvidos no metabolismo secundário e na produção de substâncias que diretamente ou indiretamente têm um papel importante na interação planta-ambiente (Gomes & Rosa, 2000) e para a nutrição humana (Silva *et al.*, 2004).

Em termos nutricionais os aminoácidos podem ser classificados em essenciais, não essenciais e condicionalmente essenciais. Os aminoácidos essenciais são aqueles que não podem ser produzidos pelo corpo humano e somente são adquiridos pela ingestão de alimentos, vegetais ou animais. Estes são a fenilalanina, a isoleucina, a leucina, a lisina, a metionina, a serina, a treonina, o triptofano e a valina (Gehrke *et al.*, 1985). Os aminoácidos não-essenciais são aqueles que o corpo humano pode sintetizar, como exemplo a alanina, a asparagina, o ácido glutâmico e o ácido aspártico (Guyton, 1992). Uma terceira classe de aminoácidos recentemente introduzida é a chamada de “condicionalmente essenciais”, que são aqueles que podem ser considerados essenciais em determinados estados fisiológicos de desenvolvimento e/ou

determinada condição clínica (Dutra-de-Oliveira & Marchini, 1998), como a arginina, a glutamina, a histidina, a glicina, a cisteína, a prolina e a tirosina (Carmelo Jr. & Martinez, 2005).

Além dos aspectos nutricionais, essas substâncias têm extrema importância com relação à qualidade sensorial e tecnológica dos produtos (Farfán, 1994) por afetarem a qualidade dos alimentos, incluindo sabor, aroma e cor. Nos últimos anos tem aumentado o interesse sobre a identificação dos aminoácidos livres em sucos pois, a maioria das espécies vegetais tem um padrão característico no perfil (Belitz & Grosh, 1999), o que permite maior controle de autenticidade da matéria-prima ou do produto final.

Várias técnicas têm sido utilizadas para determinação dos aminoácidos livres, como o método espectrofotométrico para dosagens individuais dos aminoácidos triptofano (Spies, 1967) e de metionina (Horn, 1946), a cromatografia de camada delgada bidimensional (Noomrio & Dahot, 1996), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector UV-Vis (Gomes & Rosa, 2000), a cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-RP) com detector de fluorescência (Astarita *et al.*, 2004) e a cromatografia a gás equipada com detector de ionização por chama (CG/FID) (Silva *et al.*, 2003) ou acoplada a um espectrômetro de massas (Marchini *et al.*, 1997).

Geralmente, a análise de aminoácidos das matrizes de alimentos é feita por cromatografia líquida (Baxter, 1996). A utilização da cromatografia a gás, apesar de ter vantagens como alta resolução e o custo muito reduzido em comparação com a CLAE (Silva *et al.*, 2003), requer uma etapa anterior de derivação dos aminoácidos. Husek (1991,1998) desenvolveu um protocolo rápido de derivação baseado no tratamento dos aminoácidos. Assim mesmo, ainda há uma limitação no uso da cromatografia gasosa para análise de aminoácidos que é a incapacidade de determinar a arginina (Silva *et al.*, 2003).

A arginina já foi relatada na literatura como um dos aminoácidos mais abundantes nas folhas, caules e raízes de *A. crassiflora* (Hocquemiller *et al.*, 1982). Dessa forma, uma das técnicas mais interessantes para análise dessas substâncias nessa espécie é a cromatografia líquida de fase reversa (CLAE-RP) com detector de fluorescência. Nesse método, em geral tem sido utilizado o reagente *o*-ftalaldeído (OPA) que transforma os enantiômeros dos aminoácidos nos seus respectivos diastereômeros fluorescentes para que os mesmos sejam detectados.

Os carboidratos são os constituintes bioquímicos mais abundantes nos vegetais, chegando a representar 50% a 80% da massa seca. São importantes fontes de energia e compõem a parte estrutural das células (Kays, 1991). São definidos como poliidroxialdeídos, poliidroxicetonas, poliidroxiálcoois, poliidroxiácidos e seus respectivos derivados (Bobbio & Bobbio, 1989). Isto significa que possuem vários grupamentos hidroxila e também um grupamento aldeído ou cetona em suas moléculas (Dietrich *et al.*, 1988).

Essas substâncias são classificadas em monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. Os monossacarídeos são chamados de carboidratos simples, referindo-se a uma unidade. O número de átomos de carbono varia de três a oito e podem diferir quanto à posição das hidroxilas nas moléculas (Dietrich *et al.*, 1988). Os oligossacarídeos (do grego, oligo = poucos) contêm de duas a dez unidades monossacarídicas unidas em ligação glicosídica. A sacarose é o principal oligossacarídeo, tanto pela quantidade e frequência com que é encontrado na natureza, como pela sua importância na alimentação humana (Simpson & Ogozary, 2001). Os polissacarídeos contêm acima de dez unidades de monossacarídeos em longas cadeias lineares ou ramificadas. A maioria dos polissacarídeos possui unidades repetitivas de um único tipo ou de dois monossacarídeos (Lenhinger *et al.*, 2002). Entre os polissacarídeos, o amido constitui a mais importante reserva de todas as plantas superiores sendo encontrado, principalmente, em sementes, tubérculos, rizomas e bulbos, ocorrendo também em algas (Bobbio & Bobbio, 1989).

Os principais carboidratos solúveis que constituem os frutos são os monossacarídeos frutose e glicose, e o dissacarídeo sacarose (Ayaz & Bertoft, 2001). São encontrados em variadas proporções de acordo com a espécie (Lowell, 1989, Hubbard *et al.*, 1991) e são os principais determinantes do sabor (Ayaz & Bertoft, 2001).

Para quantificação dos carboidratos solúveis totais diferentes métodos podem ser utilizados. Silva *et al.* (2003) avaliaram a eficiência de sete diferentes tipos de métodos para dosagem dos carboidratos solúveis totais, incluindo métodos espectrofotométricos, titulométricos e gravimétricos. A identificação dos carboidratos pode ser feita por cromatografia a gás com detector de ionização por chama (AOAC, 1970; Rahman *et al.*, 1999) e cromatografia líquida de troca aniônica de alta resolução com detector de pulso amperométrico (CLAE/CTI-DPA) (Souza *et al.*, 2004).

Os lipídeos são importantes substâncias de reserva nas plantas encontradas, principalmente, nas sementes com a função de reserva energética para o embrião durante a germinação. Estão armazenados no protoplasma das células em inclusões denominadas oleossomos, que surgem do retículo endoplasmático (Bruneton, 1993).

Quimicamente são, na maioria, misturas de triglicerídeos, ou seja, são formados por um triol, o glicerol, esterificado por ácidos graxos, os quais são ácidos carboxílicos alifáticos de comprimento variável. A imensa maioria de ácidos graxos vegetais está incluída em dois grupos: ácidos graxos saturados e seus homólogos insaturados. Em ambos os grupos, 16 ou 18 átomos de carbono são mais comuns, tais como os ácidos palmítico, oléico, linoléico e esteárico. Ácidos graxos saturados com menos de 12 átomos de

carbono e ácidos insaturados com cadeias curtas ($\leq C_{16}$) ou de 20 carbonos ou mais são raros em plantas (Bruneton, 1993).

Alguns ácidos graxos são classificados como essenciais na dieta humana, pois não são sintetizados pelo organismo, como os ácidos linoléico e linolênico. Outra propriedade importante para a nutrição humana é que a proporção de ácidos graxos insaturados seja maior do que a de saturados (Bruneton, 1993). Algumas espécies de *Annona* estudadas têm mostrado esta característica na composição dos triglicerídeos obtidos da polpa e das sementes (Wellé *et al.*, 2004).

A quantificação dos lipídeos pode ser feita por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN 1H) (Rutar, 1989), espectroscopia de radiação infravermelha, análise de elementos de carbono, método de metilação direta seguida por cromatografia a gás (Li *et al.*, 2006) e gravimetria (Garcés & Mancha, 1993). A identificação dos ácidos graxos é obtida por análise em cromatografia a gás (Li *et al.*, 2006).

Outro aspecto a ser considerado para muitos ecossistemas, incluindo o cerrado brasileiro, é que a fragmentação do habitat tem ameaçado a manutenção da biodiversidade. Em decorrência dessa fragmentação ocorrem mudanças que resultam na redução do tamanho populacional (“bottlenecks”) e conduzem à erosão genética. Apesar da alta diversidade de espécies em tais regiões e o reconhecimento da importância da conservação, há ainda poucos estudos com esta abordagem que tenham sido publicados para espécies de cerrado.

A preservação da diversidade é de grande importância para conservação do bioma, do germoplasma e para programas de melhoramento genético. As populações de espécies silvestres, além de serem unidades sobre as quais deve incidir o manejo para produção ou conservação dos recursos naturais, são importantes fontes de germoplasma (Robinson, 1991).

É evidente a necessidade de estudos que possam subsidiar programas de conservação. Para tanto é fundamental analisar a estrutura genética e qual a estabilidade das linhagens evolutivas, visto que são muito influenciadas por padrões de fluxo gênico dentro e entre populações. A estrutura genética da população se refere à heterogeneidade na distribuição dos genótipos e do grau de endogamia dentro das populações e entre estas (Robinson, 1991).

Para a análise de diversidade genética o seqüenciamento de DNA de genomas de plastídeos e nuclear é uma técnica muito utilizada em níveis hierárquicos superiores (Koopman, 2005). Em níveis hierárquicos inferiores, as seqüências de DNA muitas vezes não mostram acentuada variação, não produzindo a resolução necessária para a distinção dos táxons envolvidos (Després *et al.*, 2003).

Nas últimas décadas tem aumentado o uso de marcadores moleculares para a avaliação da diversidade genética de populações naturais de plantas e animais. As técnicas mais comumente utilizadas são isoenzimas, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), Microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Ferreira & Gratapaglia, 1996).

As isoenzimas são formas diferentes de uma mesma enzima que catalisam a mesma reação na célula. São produtos da expressão gênica (Ferreira & Gratapaglia, 1996), sendo controladas geneticamente por um ou vários genes situados num único loco ou em diferentes locos, respectivamente. Essas proteínas representam a consequência bioquímica da substituição, deleção ou adição de um ou mais aminoácidos no polipeptídeo, afetando a sua carga elétrica e, conseqüentemente, a sua mobilidade durante a eletroforese (Robinson, 1991).

A detecção das isoenzimas envolve basicamente três passos: a extração de proteínas do tecido vegetal, a separação destas proteínas através de eletroforese e a coloração histoquímica do gel, o que permite a visualização do produto da reação enzimática na forma de uma banda (Ferreira & Gratapaglia, 1996).

A mobilidade da molécula através do gel depende do seu peso molecular e da sua conformação (Robinson, 1991). Vários tipos de géis de eletroforese podem ser usados, como de amido, de penetrose, de poliacrilamida entre outros, bem como diversos sistemas de tampões (Ferreira & Gratapaglia, 1996).

Após a separação das isoenzimas por eletroforese, essas proteínas são identificadas por meio de reações químicas baseadas em suas atividades catalíticas específicas. Nesse processo são fornecidos os substratos e os cofatores necessários à reação da enzima *in vitro*, além de substâncias que por meio de uma reação secundária formam produtos coloridos e insolúveis que permitem identificar exatamente a sua posição no gel. O conjunto de bandas coloridas que uma enzima forma no gel é denominado zimograma (Robinson, 1991).

A interpretação do zimograma é baseada no conhecimento da estrutura química da enzima (monomérica, dimérica ou mais complexas) (Robinson, 1991). As diferenças na mobilidade das isoenzimas em um campo elétrico são resultantes de diferenças nas seqüências de DNA que codificam tais enzimas. Com base no número e posição das bandas por região de migração (loco), é determinado o número de locos e de alelos por loco que a população apresenta, e é possível inferir sobre o controle genético da enzima na espécie. Se os padrões de bandas de dois indivíduos diferem, é assumido que estas diferenças possuem base genética e são hereditárias (Murphy *et al.*, 1980). De acordo com Hamrick & Godt (1989), ao

nível de espécie cerca de 50% dos locos de isoenzimas analisados apresentam polimorfismos, já para população um terço deles é polimórfico.

A análise de isoenzimas proporciona várias vantagens, sendo que uma das principais é se ter o conhecimento do controle genético da maioria das isoenzimas, o que permite que inferências genéticas possam ser feitas diretamente a partir dos padrões de bandas observados. É uma técnica de baixo custo e acessível. Vários locos isoenzimáticos podem ser analisados rápida e simultaneamente. Os alelos isoenzimáticos são codominantes, o que possibilita que genótipos heterozigotos e homozigotos de um determinado loco sejam facilmente identificados, pois num indivíduo diplóide, ambos os alelos de um loco são expressos e visualizados (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Há, entretanto, algumas limitações dos marcadores isoenzimáticos para genomas mais amplos como, por exemplo, o mapeamento genético ou caracterização detalhada do germoplasma, que se referem ao número total de locos que podem ser detectados no genoma e o número de alelos por locos, isto é, o nível de polimorfismo genético detectável em cada loco. Dentro da variabilidade detectável, algumas proteínas podem apresentar modificações pós-tradução, produzindo as chamadas “isoenzimas conformacionais” ou formas múltiplas do produto de um único gene, as quais diferem em estruturas secundárias e terciárias (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Outro fator a ser considerado é o nível de variabilidade genética presente em diferentes sistemas enzimáticos. Gillespie & Langley (1974) distinguiram dois grupos de enzimas. As enzimas que classificaram no **Grupo I** agem sobre um substrato fisiológico único. Esse grupo inclui as enzimas reguladoras e a maioria das enzimas envolvidas no metabolismo intermediário, na glicólise e no Ciclo de Krebs. As enzimas incluídas no **Grupo II**, como as esterases, fosfatases, peroxidases e álcool desidrogenases são enzimas que utilizam substratos múltiplos, freqüentemente de origem externa, e que respondem diretamente à diversidade ambiental. Essas são menos numerosas que as do **Grupo I**, porque têm funções mais generalizadas na célula. A variabilidade genética nas enzimas do **Grupo I** é mais baixa que a das enzimas do **Grupo II**. Os substratos utilizados pelas enzimas do **Grupo I** são, geralmente, produzidos dentro da própria célula e mantidos mais estáveis qualitativa e quantitativamente pelos processos que controlam a homeostase no organismo.

Gillespie (1992) ressaltou que as enzimas mais polimórficas tendem a ser as mais freqüentemente escolhidas para quantificar a variabilidade genética. Dessa forma, possivelmente não representam uma amostragem ao acaso da variabilidade contida no organismo examinado. Para se descrever a variabilidade genética em determinada espécie, é importante utilizar muitos locos (20 ou mais, se possível), incluindo entre eles enzimas representativas dos dois grupos já mencionados (Robinson, 1991).

A avaliação da magnitude da diversidade requer parâmetros de diversidade genética, sendo que os mesmos são empregados de acordo com a informação proporcionada por cada tipo de marcador. Os alelos isoenzimáticos são codominantes, ou seja, genótipos heterozigotos e homozigotos de um determinado loco são facilmente identificados. Isto permite estimar parâmetros como frequências genotípicas e frequências alélicas e a partir destes, coeficientes de diversidade gênica e heterozigosidade. Além disso, desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg em um loco ou do equilíbrio de ligação gamética entre locos podem ser testados (Weir, 1990).

Diante do exposto o presente projeto tem os seguintes objetivos:

1. Identificar e quantificar aminoácidos livres, carboidratos solúveis e ácidos graxos da polpa e das sementes, visando ampliar os conhecimentos sobre potencial econômico de *A. crassiflora* e fornecer parâmetros que possam auxiliar no controle de qualidade de produtos derivados;
2. Avaliar qual o nível de variações quantitativas e qualitativas dos alcalóides foliares de *A. crassiflora* em amostras provenientes de diferentes regiões do cerrado;
3. Avaliar qual a magnitude da diversidade genética entre diferentes populações de *A. crassiflora* utilizando marcadores isoenzimáticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, S.P. 1998a Frutas nativas do cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. In: SANO, S.M. & ALMEIDA, S.P. (eds.) *Cerrado ambiente e flora*. Embrapa – CPAC, Planaltina, Distrito Federal.
- ALMEIDA, S.P., PROENÇA, C.E.B., SANO, S.M. & RIBEIRO, J.F. 1998b *Cerrado: espécies vegetais úteis*. Embrapa – CPAC, Planaltina, Distrito Federal.
- AOAC Official Methods of Analysis. 1970 *Association of Official Analytical Chemists*. 11ªed., Washington, D.C.
- ASTARITA, L.V., FLOH, E.I.S. & HANDRO, W. 2004 Free amino acids, protein and water content changes associated with seed development in *Araucaria angustifolia*. *Biological Plantarum* 47:53-59.
- AYAZ, F.A. & BERTOFT, E. 2001 Sugar and phenolic acid composition of stored commercial oleaster fruits. *Journal of food composition and analysis* 14: 505-511.
- BAXTER, J.H. 1996 *Handbook of Food Analysis*. L.M.L. Mollet, Ghent, Belgium.
- BELITZ, H.D. & GROSH, W. 1999 *Food Chemistry*. Springer Verlag, Berlin.
- BOBBIO, F.O. & BOBBIO, P.A. 1989 *Introdução a Química de Alimentos*. 2ª ed. Livraria Varela LTDA, São Paulo.

- BRUNETON, J. 1993 *Pharmacognosy, Phytochemistry, Plants Medicinal*. 2ªed. Lavoisier Publishing, Paris.
- CARAMORI, S.S., LIMA, C.S. & FERNANDES, K.F. 2004 Biochemical characterization of selected plant species from brazilian savannas. *Brazilian Archives of Biology and Technology. An International Journal* 47 (2): 253-259.
- CAMELO JR., J.S. & MARTINEZ, F.E. 2005 Dilemas nutricionais no pré-termo extremo e repercussões na infância, adolescência e vida adulta. *Jornal de Pediatria* 81 (1): 33-42.
- CARPANEZZI, A.A. 2005 Fundamentos para a reabilitação de Ecossistemas florestais. In: GALVÃO, A.P.M. & PORFÍDIO DA SILVA, W. *Restauração Florestal – Fundamentos e Estudos de caso* – EMBRAPA Florestas, Colombo.
- CASSADY, J.M. 1990 Natural products as a source of potential cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. *Journal of Natural Products* 53 (1): 23-41.
- CAVÉ, A. 1985 *Annonaceae Alkaloids. The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- CHANG, F.R., WEI, J.L., TENG, C.M. & WU, Y.C. 1998 Two New 7-dehydroaporphine alkaloids and antiplatelet action aporphines from the leaves of *Annona purpurea*. *Phytochemistry* 49: 2015-2018.
- CHANG, F.R., CHEN, C.Y., HSIEH, T.J., CHO, C.P. & WU, Y.C. 2000a Chemical constituents from *Annona glabra* III. *Journal of the Chinese Chemical Society* 47: 913-920.
- CHANG, F.R., CHEN, C.Y., WU, P.H., KUO, R.Y., CHANG, Y.C. & WU, Y.C., 2000b New alkaloids from *Annona purpurea*. *Journal of Natural Products* 63: 746-748.
- CHÉVEZ POZO, O.V. 1997 *O pequi (Caryocar brasiliense): uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do cerrado no Norte de Minas Gerais*. Dissertação de Mestrado apresentada a UFLA - Universidade Federal de Lavras: DAE.
- CHULIÁ, S., IVORRA, M.D., CAVE, A., CORTES, D. & NOGUERA, M.A. 1995 Relaxant activity of three aporphine alkaloids from *Annona cherimoia* on isolated aorta of rat. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 47(8): 647-650.
- DESPRÉS, L., GIELLY, L., REDOUTET, B. & TABERLET, P. 2003 Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27: 185-196.
- DIETRICH, S.M.C., RIBEIRO, R.C.L.F., CHU, E.P. & BUCKERIDGE, M.S. 1988 O açúcar das plantas. *Ciência Hoje* 7(39): 42-48.
- DUTRA- DE-OLIVEIRA, J.E. & MARCHINI, J.S. 1998 *Ciências Nutricionais*. Editora Sarvier, São Paulo.

- FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. 2001 *Global Forest Resources Assessment 2000 – Main report*. FAO Forestry Paper Nº 140. Rome. www.fao.org/forestry/site/ (acessado em 14/09/2008).
- FARFÁN, J.A. 1994 *Química de proteínas aplicada à ciência e tecnologia de alimentos*. 2ª ed. Unicamp, Campinas.
- FELFILI JM (2002) Padrões de Diversidade do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro. In: ARAÚJO EL, MOURA NA, SAMPAIO EVSB, GESTINARI LMS, CARNEIRO JMT (eds). *Biodiversidade, conservação e uso sustentável da Flora do Brasil*. Universidade Federal Rural de Pernambuco/Imprensa Universitária, Recife.
- FERREIRA, M.E. & GRATAPAGLIA, D. 1996 *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2ª ed. Embrapa/Cenargen, Brasília.
- GARCES, R. & MANCHA, M. 1993 One-step lipid extraction, and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Analysis Biochemical* 211:139-143.
- GEHRKE, C.W., WALL, L.L., ABSHEER, J.S., KAISER, F.E & ZUMWALT, R.W. 1985 Sample preparation for chromatography of amino acids: acid hydrolysis of proteins. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists (JAOAC)* 68 (5): 811-821.
- GILLESPIE, J.H. 1992 *The causes of molecular evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- GILLESPIE, J.H. & LANGLEY, C.H. 1974 A general model for enzyme variation in natural populations. *Genetics* 76:837-884.
- GOMES, M.A.O. & AMÂNCIO, R. 1995 *Relatório do diagnóstico participativo de agroecossistemas*. UFLA-DAE, Lavras.
- GOMES, M.H. & ROSA, E. 2000 Free amino acid composition in primary and secondary inflorescences of 11 broccoli (*Brassica oleraceae* var *italica*) cultivars and its variation between growing seasons. *Journal Science Agricultural* 81: 295-299.
- GOTTESBERGER, G. 1989 Comments on flower evolution and beetle pollination in the genus *Annona* and *Rollinia* (Annonaceae). *Plant Systematics and Evolution* 167 (3-4): 189-194.
- GUYTON, A.C. 1992 *Tratado de Fisiologia Médica*. 8ª edição. Editora Guanabara, Rio de Janeiro.
- HAMRICK, J.L. & GODT, M.J. 1989 Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A.H.D., CLEGG, M.T., KAHLER, A.L. & WEIR, B.S. (eds) *Plant Population Genetics, Breeding and Germplasm Resources*. Sinauer, Sunderland, Mass.

- HINRICHSEN, D. & ROBEY, B. 2000 *Population and the Environment: The Global Challenge. Population Reports. Series M. Nº.15.* Baltimore, Johns Hopkins University School of Public Health. Population Information Program, Fall. www.actionbioscience.org (acessado 29/11/08).
- HOCQUEMILLER, R., CAVÉ, A., JACQUEMIN, H. & TOUCHÉ, A. 1982 Alcaloides des Annonacées, XXXZVI (*): Alcaloides de L' *Annona crassiflora* Mart. *Plantes médicinales et phytothérapie* XVI: 4-6.
- HORN, J. MILLARD, JONE, D.B. & BLUM, A.E. 1946 Colorimetric determination of methonine in proteins and foods. *Journal of Biological Chemistry* 116: 313-320.
- HUBBARD, N.L., PHAR, D.M. & HUBER, S.C. 1991 Sucrose phosphate synthase and other sucrose metabolizing enzymes in fruits of various species. *Physiologia Plantarum* 82: 191-196.
- HUSEK, P. 1991 Rapid derivatization and gas chromatographic determination of amino acids. *Journal of chromatography* 552 (1-2): 289-299.
- HUSEK, P. 1998 Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* 717 (1-2): 57-91.
- JOLY, A.B. 2002 *Introdução à taxonomia vegetal.* Companhia Editora Nacional, São Paulo.
- KAYS, E.J. 1991 *Postharvest physiology of perishable plant products.* V. N. Reinhold, New York.
- KOOPMAN, W.J.M. 2005 Phylogenetic Signal in AFLP Data Sets. *Systematic Biology* 54: 197-217.
- LAJOLO, F. M. 1987 Efeito do processamento sobre o valor nutricional dos alimentos. Situação na América Latina e Caribe, e importância para elaboração de tabelas de composição. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 37: 667-672.
- LAWRENCE, A., PHILLIPS, O.L., ISMODES, A.R., LOPEZ, M., ROSE, S., WOOD, D. & FARFÁN, A.J. 2005 Local values for harvested forest plants in Madre de Dios, Peru: Towards a more contextualized interpretation of quantitative ethnobotanical data. *Biodiversity and Conservation* 14: 45-79.
- LEBOEUF, M., LEGUEUT, C., CAVE, A., DESCONCLOIS, J. F., FORGACS, P. & JACQUEMIN, H. 1982 Alcaloïdes des annonacées: alcaloïdes d' *Annona muricata* L.L. *Planta Medica* 42: 37-44.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L. & COX, M.M.L 2002 *Princípios de Bioquímica.* 3.ed. Sarvier, São Paulo.
- LEVIN, D. A. 1976 Alkaloid-bearing plants: an ecogeographic perspective. *American Naturalist* 972: 261-284.
- LI, Y., BEISSON, F., POLLARD, M. & OHLROGGE, J. 2006 Oil content of *Arabidopsis* seeds: The influence of seed anatomy, light and plant-to-plant variation. *Phytochemistry* 67:904-915.

- LORENZI, H. 1998 *Árvores brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. VI. 2. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, São Paulo.
- LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. 2002 *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, Nova Odessa.
- LOWELL, C.A., TOMLINSON, P.T. & KOCH, K.E. 1989 Sucrose metabolizing enzymes in transport tissues and adjacent sink structures in developing citrus fruit. *Plant Physiology* 90: 1394-1402.
- MACEL, M., VRIELING, K. & KLINKHAMER, G.L. 2004 Variation in pyrrolidizidine alkaloid patterns of *Senecio jacobaea*. *Phytochemistry* 65: 865-873.
- MARCHINI, J.S., FILHO, A.B., VANNUCCHI, H., DARMAUN, D. & KREMPF, M. 1997 Utilização de espectrometria de massa para o estudo do metabolismo protéico e aminoacídico em medicina. *Medicina* 30: 494-507.
- MILANOWSKI, D.J., WINTER, R.E.K., ELVIN-LEWIS, M.P.F. & LEWIS, W.H. 2002 Geographic distribution of three alkaloid chemotypes of *Croton lechleri*. *Journal of Natural Products* 65:814-819.
- MURPHY, R.W., SITES, J.W.Jr., BUTH, D.G. & HAUFLER, C.H. 1980 Proteins I: isozyme electrophoresis. In: HILLIS, D.M. & MORITZ, C. (eds.) *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Sunderland.
- MYERS, N., MITTERMEIER, R.A., MITTERMEIER, C.G., FONSECA, G.A.B. & KENT, J. 2000 Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- NOOMRIO, M.H. & DAHOT, M.U. 1996 Nutritive value of *Eugenia jambosa* fruit. *Journal of Islamic Academy of Sciences* 9 (1): 9-12.
- OLIVEIRA, M.E.B, OLIVEIRA, G.S.F, MAIA, G.A., MOREIRA, R.A. & MONTEIRO, A.C.O. 2002 Aminoácidos livres majoritários no suco de caju: variação ao longo da safra. *Revista Brasileira de Fruticultura* 24:133-137.
- PÉRET DE SANT' ANA, P.J. 2002 *A bioprospecção no Brasil – Contribuições para uma gestão ética*. Paralelo 15, Brasília.
- PERRINGS, C. & GADGIL, M. 2003 Conserving biodiversity: reconciling local and global public benefits In: KAUL, L., CONCEICAO, P.L.E., GOULVEN, K. & MENDOZA, R.L. (eds.) *Providing global public goods: managing globalization*, Oxford.
- PRESCOTT, J., GAUTHIER, B. & NAGAHUEDI, M.S.J. 2000 *Guide to Developing a Biodiversity Strategy from a Sustainable Development Perspective*. Institut del'énergie et de l'environnement de La

- Francophonie (IEPF), Ministère de l'Environnement du Québec, United Nations Development Programme (UNDP), United Nations Environment Programme (UNEP), Québec, Canada. www.undp.org/bpsp/thematic_links/docs/sectoralGuidelinesEng (acessado em 29/11/2008).
- PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. CASA CIVIL. SUBCHEFIA PARA ASSUNTOS JURÍDICOS. LEI Nº 11.284 DE 2 DE MARÇO DE 2006. www.planalto.gov.br/ccivil_03/ Ato2004-2006/2006/Lei/L11284.htm (acessado em 15/09/2008).
- RAMAN, M.A., NAHAR, N., MIAN, J. & MOSIHUAZZAMAN, M. 1999 Variation of carbohydrate composition of two forms of fruit from jack tree (*Artocarpus heterophyllus* L.) with maturity and climatic conditions. *Food Chemistry* 65:91-97.
- RATTER, J.A., BRIDGEWATER, S. & RIBEIRO, J.F. 2006 Biodiversity Patterns of woody cerrado vegetation: an overall view. In: PENNINGTON, R.T, LEWIS, G.P. & RATTER, J.A. (eds.) Neotropical savanas and seasonally dry forests. Plant diversity, biogeography and conservation. CRC Press, Florida.
- RIBEIRO, J.P., BRITO, M.P., JUNIOR, E.S. & FONSECA, C.E.L. 2000 *Araticum*. Funep, Jaboticabal.
- RIZZINI, C.T. 1971 Aspectos ecológicos da regeneração em algumas plantas do cerrado. In: *Anais do simpósio sobre o cerrado* 3. Blücher Edusp, São Paulo.
- ROBINSON, I.P. 1991 Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A.C. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins*. Editora EFV, Viçosa.
- RUTAR, V. 1989 Magic angle sample spinning NMR-spectroscopy of liquids as a nondestructive method for studies of plant seeds. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 37:67-70.
- SAXENA, R.C., HARSHAN, V., SAXENA, A., SUKUMARAN, P., SHARMA, M.C. & KUMAR, M.L. 1993 Larvicidal and chemosterilant activity of *Annona squamosa* alkaloids against *Anopheles stephensi*. *Journal American Mosquito Control Association* 9: 84-7.
- SILVA, R.N., MONTEIRO, V.N., ALCANFOR, J.X., ASSIS, L.M. & ASQUIERI, E.R. 2003 Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. *Ciência e tecnologia de alimentos* 23(3): 337-341.
- SILVA, B.M., CASAL, S., ANDRADE, P.B., SEABRA, R.M., OLIVEIRA, M.B.P.P. & FERREIRA, M.A. 2004 Free amino acid composition of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp and peel) and jam. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:1201-1206.
- SIMPSON, B.B. & OGORZALY, M.C. 2001 *Economic Botany. Plants in our world*. MacGraw – Hill, Inc New York.

- SOUZA, A., De PAULA, A.C.C.F.F. & FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 2004 Effects of irradiance on non-structural carbohydrates, growth, and hypoglycemic activity of *Rhynchelytrum repens* (WILLD.) C.E. HUBB. (POACEAE). *Brazilian Journal Biology* 64 (3): 697-706.
- SPIES, J.R. 1967 Determination of tryptophan in proteins. *Analytical Chemistry* 39 (10):1412-1415.
- SUAU, R., CABEZUDO, B., RICO, R., NÁJERA, F. & LÓPEZ-ROMERO, J.M. 2002 Direct Determination of Alkaloid Contents in *Fumaria* Species by GC-MS. *Phytochemical Analysis* 13: 363-367.
- WAGNER, H., HEITER, M & FERSTI, W. 1980 New drugs with cardiotoxic activity. Chemistry and pharmacology of cardiotoxic active principle of *Annona squamosa*. *Planta Medica* 40 (1): 77-85.
- WEIR, B.S. 1990 *Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data*. Sinauer Associates, Massachusetts.
- WÉLÉ, A., NDOYE, I. & BADIANE M. 2004 Fatty acid and essential oil compositions of the seed oil of five *Annona* species. *Nigerian Journal Natural Products and Medicine* 8: 62-65.
- WOLLENBERG, E. & INGLES, A. 1998 *Incomes from the forest: methods for the development and conservation of forest products for local communities*. Center for International Forestry Research (CIFOR), Jakarta.
- WOLF, S. 2000 *Legislação ambiental brasileira: grau de adequação à Convenção sobre Diversidade Biológica*, MMA, Brasília.
- WU, Y.C., CHANG, G.Y., DUH, C.Y. & WANG, S.K. 1993 Cytotoxic alkaloids of *Annona montana*. *Phytochemistry* 33: 497-500.

CAPÍTULO 1

USO POTENCIAL DA POLPA E DAS SEMENTES DE *ANNONA CRASSIFLORA* MART.

Este capítulo foi formatado para ser submetido à Economic Botany

ABSTRACT

The purpose of this study was to analyze the profile of free amino acids, free sugars and fatty acids in *A. crassiflora* fruit pulp and seeds. Compounds were analyzed, respectively, for HPLC-F, HPLC/ PAD and GC/MS. The total yield of free amino acids in pulp ranged from 1101,99 µg/g to 1975,7 µg/g dry matter and in seeds from 636,3 µg/g to 17.445,83 µg/g also as regards dry matter. Glutamin was the most abundant in all the samples. Total sugar yield from pulp ranged from 11,5 g/100g to 17,03 g/100g in dry matter and from seeds from 13,69 g/100g to 40,47 g/100g. Fructose, glucose and sucrose were detected in all samples. The amount of total lipids from pulp varied from 7 g/100g to 16,2 g/100g in dry matter and from seeds from 34,36 g/100g to 35,98 g/100g. Oleic acid and/or petroselinic (18:1) were the most abundant in all samples of pulp and seeds of different geographical origins. Without doubt, obtained data permitted widening knowledge on the potential uses to be made of *A. crassiflora*.

Key words: *Annona crassiflora*, marolo, free amino acids, fatty acids, soluble sugars

RESUMO

O presente estudo propôs analisar a composição de aminoácidos livres, de carboidratos solúveis e de ácidos graxos da polpa e das sementes de *Annona crassiflora*. As análises foram feitas, respectivamente, por CLAE/F, por CLAE/CTI-DPA e por CG/MS. O teor total de aminoácidos livres na polpa variou de 1101,99 µg/g a 1975,7 µg/g de massa seca, enquanto nas sementes variou de 636,3 µg/g a 17.445,83 µg/g de massa seca. A glutamina foi majoritária em todas as amostras. O teor total dos carboidratos da polpa variou de 11,5 g/100g a 17,03 g/100g e das sementes variou de 13,69 g/100g a 40,47 g/100g de matéria seca. A frutose, a glicose e a sacarose foram detectadas em todas as amostras. A quantidade de lipídeos totais da polpa variou de 7g/100g a 16,2 g/100g de massa seca e das sementes variou de 34,36 g/100g a 35,98 g/100g de massa seca. O ácido oléico e/ou petroselínico (18:1) foram majoritários em todas as amostras de polpa e de sementes de diferentes origens geográficas. Certamente os dados obtidos permitiram ampliar os conhecimentos sobre potencial de aproveitamento dessa espécie.

Palavras-chave: *Annona crassiflora*, marolo, aminoácidos livres, carboidratos solúveis, ácidos graxos

INTRODUÇÃO

Annona crassiflora Mart. é uma espécie silvestre nativa do Brasil e apresenta ampla distribuição no bioma cerrado, sendo encontrada na Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Tocantins (Lorenzi 1998).

É conhecida popularmente como araticum, marolo, pinha-do-cerrado entre outros (Almeida et al. 1998). Os frutos desta espécie são muito apreciados por populações locais no cerrado, inclusive são encontrados em muitos pomares domésticos (Lorenzi e Matos 2002), sendo consumidos *in natura* e/ou utilizados na fabricação de compotas, doces, geléias, sorvetes, sucos e licores (Almeida et al. 1998).

Além da polpa, há relatos que se referem ao uso de sementes de algumas espécies domesticadas e silvestres de *Annona* sp. Atualmente, muitos estudos têm sido voltados para o aproveitamento econômico de sementes provenientes de espécies não tradicionalmente oleaginosas. Milhares de sementes de frutos comestíveis de várias espécies são desperdiçadas anualmente, resultando em problemas de descarte.

Recentemente alguns estudos relataram as propriedades químicas da polpa e das sementes de *A. crassiflora*. Almeida et al. (1998) verificaram que para cada 100 g de massa seca de polpa há 76,32% de umidade, 1,28% de proteína, 0,29% de lipídeo com cerca de 80% de ácidos graxos monoinsaturados, 16% de saturados e 4% de poliinsaturados, 21 mg de vitamina C, 21,5% de carboidratos totais. Caramori et al. (2004) analisaram a composição centesimal da semente de *A. crassiflora* e encontraram 4,8% de umidade, 2,27% de cinzas, 16,33% de proteínas, 35,24% de lipídeos e 41,46% de carboidratos. Entretanto, ainda faltam informações com relação ao potencial nutricional da polpa e das sementes dessa espécie. Não há dados na literatura sobre a concentração total e a identificação dos aminoácidos livres, sobre o perfil de carboidratos solúveis em ambas as partes do fruto dessa espécie e o perfil de ácidos graxos não foi descrito nas sementes.

A composição de aminoácidos, tanto livres como formando peptídeos, é limitada em tabelas de composição de alimentos (Farfán 1994). Os aminoácidos são substâncias biologicamente ativas presentes nos alimentos e bebidas (Belitz e Grosh 1999). Além dos aspectos nutricionais, essas substâncias têm extrema importância com relação à qualidade sensorial e tecnológica dos produtos (Farfán 1994). Nos últimos anos tem aumentado o interesse sobre a identificação dos aminoácidos livres em sucos, pois a maioria das espécies vegetais tem um padrão característico no perfil (Belitz e Grosh 1999), o que permite maior controle de autenticidade da matéria-prima ou do produto final.

Os principais carboidratos solúveis que constituem os frutos são os monossacarídeos frutose e glicose, e o dissacarídeo sacarose. São encontrados em variadas proporções de acordo com a espécie e são os principais determinantes do sabor (Ayaz e Bertoft 2001).

Alguns ácidos graxos são classificados como essenciais a dieta humana, pois não são sintetizados pelo organismo. Outra propriedade importante para a nutrição humana é que a proporção de ácidos graxos insaturados seja maior do que os saturados (Bruneton 1993). Algumas espécies de *Annona* estudadas têm mostrado esta característica na composição dos triglicerídeos obtidos da polpa (Andrade et al. 2001) e das sementes (Wellé et al. 2004).

Diante do exposto o presente estudo propôs analisar a composição dos aminoácidos livres, carboidratos solúveis e ácidos graxos na polpa e nas sementes de *A. crassiflora* coletadas em três diferentes regiões do cerrado.

MATERIAIS E MÉTODOS

A polpa e as sementes de um fruto de cada um dos indivíduos analisados (**Tabela 1**) foram separadas manualmente e liofilizadas (Labconco FreeZone 4,5 Liter Benchtop - Freeze Dry System - modelo 77500) por cerca de 120 h. Foi feito cálculo de massa seca para as amostras liofilizadas.

Tabela 1- Locais de coleta de amostras de *Annona crassiflora* Mart..

Estado	Município	Latitude	Longitude	Voucher specimen
Minas Gerais	Belo Horizonte	20° 01.718'S	44° 00.596'W	A. P. M. Egydio 3
São Paulo	Mogi-Guaçu	22° 15.231'S	47°09.386' W	A. P. M. Egydio 7
São Paulo	Luís Antonio	21° 35.192'S	47° 46.692'W	A. P. M. Egydio 8

Os aminoácidos livres foram extraídos utilizando 0,2 g das amostras previamente secas e desengorduradas. As amostras foram maceradas em 6 mL de etanol 80% e, em seguida, foram concentradas em speed vac a 45°C. Foram ressuspensas em 2 mL de água e centrifugadas a 15000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado através de uma membrana de 0,2 µm (Millipore) (Silveira et al. 2004). Alíquotas de 0,55 mL da amostra foram derivadas com 750 µL de solução de OPA (140 mg de o-ftaldialdeído, 2,8 mL de metanol 100%, 18,2 mL de tampão borato 400 mM pH 9.5 e 166,2 µL de β-mercaptoetanol) (Marur et al. 1994).

A análise e identificação dos aminoácidos livres foram feitas de acordo com Astarita et al. (2004). Os aminoácidos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE/F) (Shimadzu) empregando uma coluna Supelcosil LC-18 fase reversa com 25 cm x 4,6 mm, revestimento de sílica gel e tamanho de partícula 5 µm (Sigma/ Supelco).

Os reagentes utilizados para fase móvel foram obtidos da Merck. O solvente A foi constituído pelos seguintes reagentes: 4,10 g de acetato de sódio, 8,96 g de fosfato de sódio, 20 mL/L de tetrahidrofurano e 20 mL/L de metanol, 960 mL de Água MilliQ e o pH 8.10. O solvente B foi constituído de solução de metanol

65%. Foi utilizada uma programação de gradiente baseada no percentual do solvente B nas seguintes condições: 10% (0,01 min), 22% (30 min), 38% (40 min), 55% (46 min), 60% (56 min), 80% (59 min), 100% (76 min), 100% (88 min) e 10% (90 min). O fluxo foi de 1 mL/min. Para detecção dos aminoácidos foi utilizado o comprimento da excitação e emissão da fluorescência, respectivamente, de 250 nm e 480 nm. As áreas e os tempos de retenção foram comparados com amostras de concentrações conhecidas de padrões de aminoácidos (Sigma).

A extração dos carboidratos solúveis totais foi feita de acordo com método modificado de Pollock e Jones (1979). Foi utilizado 0,1 g da polpa e de sementes secas desengorduradas. As amostras foram submetidas à fervura em etanol 80% por 5 min. Em seguida, foram centrifugadas a 2000 g por 10 min. Este processo foi repetido por duas vezes. Os extratos foram filtrados e reunidos.

Para determinar o teor de carboidratos solúveis totais foi empregado o método fenol-sulfúrico (Dubois et al. 1956). Foram utilizados de 10 µL a 20 µL do extrato e o volume foi completado para 500 µL com água destilada. Em seguida, foram adicionados 0,5 mL de fenol 5% e 2,5 mL de H₂SO₄. As dosagens foram feitas três vezes. As amostras foram lidas em espectrofotômetro UV, Beckman DU70, em comprimento de onda de 490 nm. Foi construída uma curva padrão com solução de glicose com as seguintes concentrações: 10 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg.

O extrato bruto de carboidratos solúveis totais foi concentrado em speed vac a temperatura ambiente e posteriormente, solubilizado em volume conhecido de água MilliQ. A identificação dos carboidratos foi feita por cromatografia líquida de troca aniônica de alta eficiência com detector de pulso amperométrico (CLAE/CTI-DPA) usando uma coluna CarboPac PA-1 4 x 250 mm sobre sistema Dionex DX 300 (USA) de acordo com Itaya et al. (1997). O sistema de solvente utilizado foi isocrático com 20 mM NaOH e o fluxo foi de 0,2 mL.min⁻¹.

A extração dos lipídeos foi feita utilizando extratores Soxhlet. Foi utilizado 1g de amostra previamente seca. As amostras foram tratadas com *n*-hexano durante seis horas. Os extratos foram secos em rotaevaporador sob pressão reduzida (Maestri et al. 2001). As amostras foram transferidas para frascos previamente pesados e foram armazenadas em dessecadores até atingirem massa constante para obtenção do rendimento lipídico total (Garces e Mancha 1993).

Os triglicerídeos foram saponificados com 10 mL de solução metanólica de KOH 10% sob refluxo por duas horas. As amostras foram acidificadas com solução de HCl 10% até atingir o pH entre 4,0 – 5,0. A extração dos ácidos graxos foi realizada por quatro vezes com clorofórmio, os extratos obtidos deste processo foram reunidos e os solventes removidos sob pressão reduzida (Grunwald e Endress 1988).

Os ácidos graxos foram submetidos ao processo de metilação, sendo dissolvidos em éter sulfúrico e adicionados de cinco volumes de solução etérea de diazometano. As soluções foram concentradas até a secar sob fluxo de nitrogênio (Vogel 1971).

A identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi feita em cromatógrafo gasoso (HP 5890 ser.II Plus) acoplado a espectrômetro de massas (HP 5989B), nas seguintes condições: temperatura da fonte = 200°C, temperatura do quadrupolo = 100°C, EM = 70eV, temperatura do injetor e detector = 300°C, gás de arraste: He (1,2 mL/min), coluna DB5HT (25m x 0,32mm). A programação da rampa de aquecimento da coluna foi a seguinte: temperatura inicial foi 120°C aumentando 10°C/min até atingir a temperatura final 280°C, mantida por 10 min.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor e a composição dos aminoácidos livres da polpa e das sementes de *A. crassiflora* de amostras provenientes de três diferentes regiões estão apresentados na **Tabela 2**.

O teor médio total de aminoácidos livres da polpa foi 1613, 91 ± 455, 78 µg/g de massa seca, sendo que a amostra de Mogi-Guaçu (São Paulo) apresentou o menor valor de 1101,99 µg/g de massa seca, a de Luís Antonio (São Paulo) apresentou 1764,07 µg/g de massa seca e para a de Belo Horizonte (Minas Gerais) o valor conseguido foi de 1975,66 µg/g de massa seca. A polpa de *A. crassiflora* mostrou maior teor total de aminoácidos livres comparado com espécies de importância comercial, como o marmelo (*Cydonia oblonga* - 1,27 ± 0,762 µg/g de massa seca) (Silva et al. 2004) e foi menor do que o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* - 6600 ± 1400 µg/g a 24300 ± 1500 µg/g de massa seca) (Rohsius et al. 2006).

A concentração média de aminoácidos livres totais das sementes foi 7554,5 ± 8790,32 µg/g de massa seca. Pelo valor de desvio nota-se que os teores obtidos para os três indivíduos foram muito discrepantes. A amostra de Mogi-Guaçu (São Paulo) apresentou o valor de 4581,38 µg/g de massa seca, para a de Luís Antonio (São Paulo) foi obtido o valor de 636,28 µg/g de massa seca, já a amostra de Belo Horizonte (Minas Gerais) apresentou um valor muito maior que as anteriores - 17445,83 µg/g de massa seca. As amostras de São Paulo mostraram a concentração total de aminoácidos livres menor do que algumas culturas que são comercializadas. O teor verificado na amostra de Belo Horizonte é mais alto do que os valores encontrados na soja (*Glycine max* var. Shirayama-dadacha - 11000,00 µg/g de massa fresca) (Toshinori et al. 2004) e é próximo ao feijão “moth” (*Vigna aconitifolia* - 20300,00 µg/g de massa seca) (Mathur et al. 2006). Estes dados parecem indicar o potencial de aproveitamento dos aminoácidos livres das sementes de *A. crassiflora*.

Um aspecto a ser ressaltado é que foi constatada acentuada variação relacionada à concentração total dos aminoácidos livres das amostras de diferentes origens geográficas. Isto ficou evidente através do

alto valor no desvio padrão, principalmente nas sementes. O teor médio total dos aminoácidos livres na polpa foi de $1613,91 \pm 455,78 \mu\text{g/g}$ e nas sementes $7554,50 \pm 8790,32 \mu\text{g/g}$ (**Tabela 2**). Isto tem sido observado em culturas importantes economicamente. Rhosius et al. (2006) verificaram que as sementes de *Theobroma cacao* (cacau) mostraram alta variação do teor total dos aminoácidos livres entre amostras provenientes de diferentes locais. Para essa cultura, essa variação pode gerar algumas implicações econômicas, considerando que estas sementes são utilizadas para produção de chocolate e os aminoácidos livres são importantes precursores do aroma deste produto.

Foram identificados 20 aminoácidos na polpa e nas sementes que são os seguintes: L-Alanina (ALA), L-Arginina (ARG), L-Asparagina (ASN), L-Ácido aspártico (ASP), L-Ácido glutâmico (GLU), L-Citosina (CIT), L-Glutamina (GLN), L-Histidina (HIS), L-Isoleucina (ILE), L-Leucina (LEU), L-Lisina (LIS), L-Metionina (MET), L-Fenilalanina (PHE), L-Serina (SER), L-Treonina (TRE), L-Triptofano (TRP), L-Tirosina (TIR), L-Glicina (GLY), L-Ornitina (ORN) e L-Ácido γ -amino butírico (GABA) (**Tabela 2**). Quatro destes aminoácidos (arginina, histidina, lisina e ornitina) já foram detectados em extratos de outras partes de *A. crassiflora* como no caule, tronco e raízes (Lebouf et al. 1982).

A glutamina foi majoritária em todas as amostras (**Tabela 2**). Este aminoácido é classificado como “condicionalmente essencial” e, dentre outras funções, durante situações de inflamação como infecções e ferimentos pode estimular a proliferação das células imunes (Newsholme 2001). Segundo Gomes e Rosa (2000) as maiores fontes vegetais dessa substância são órgãos de armazenamento como tubérculos de batata e raízes como a cenoura e o nabo, porém há muitas frutas como pêssago (*Prunus* sp), a cereja (*Prunus* sp) (Gorsel et al. 1992) e a manga (*Mangifera indica*) e sementes como o feijão-trepador (*Phaseolus coccineus*) que também apresentam este aminoácido como mais abundante (Bruckner e Westhauser 2003).

Foram detectados aminoácidos que são essenciais, ou seja, aqueles que não são produzidos pelo organismo humano, dentre os quais a isoleucina, a leucina, a metionina, a fenilalanina, a tirosina e o triptofano. A soma dos aminoácidos essenciais na polpa variou de $53,07 \mu\text{g/g}$ a $89,8 \mu\text{g/g}$ de massa seca e nas sementes variou de $57,5 \mu\text{g/g}$ a $1078,1 \mu\text{g/g}$ de massa seca. Esses dados sugerem o uso potencial da polpa e das sementes de *A. crassiflora* para suplementar as necessidades dietéticas do organismo humano.

Cabe salientar que, mesmo que em pequenas quantidades, foi verificada a presença da tirosina e da fenilalanina, em todas as amostras. A detecção desses aminoácidos pode agregar mais valor a *A. crassiflora*. Já foi demonstrado que esses aminoácidos podem contribuir para melhorar muitas funções neurais por serem precursores de neurotransmissores como a dopamina e a adrenalina (Clark e Boldingh 1994).

Tabela 2 - Rendimento total (µg/g) e composição dos aminoácidos livres (µg/g) da polpa e das sementes de *A. crassiflora* de três diferentes regiões geográficas

Aminoácidos livres	Origem geográfica									
	Polpa					Semente				
	MG (SP)	LA (SP)	BH (MG)	x ± dp		MG (SP)	LA (SP)	BH (MG)	x ± dp	
ALA	34,38	56,3	45,2	45,29	8,96	110,2	5,1	360,1	158,48	182,35
ARG	15,78	10,3	140,3	55,44	60,04	396,2	34,4	1746,2	725,59	902,23
ASN	3,87	8,9	39,6	17,43	15,78	351,4	24,2	154,4	176,63	164,72
ASP	3,10	1,1	5,8	3,33	1,93	99,5	2,9	152,2	84,88	75,70
CIT	19,33	9,1	74,3	34,23	28,62	202,1	24,2	0,0	75,41	110,34
GABA	15,93	5,2	147,1	56,07	64,52	73,7	41,8	400,2	171,90	198,34
GLN	922,40	1555,1	1254,4	1243,97	258,41	2328,1	309,5	11433,8	4690,47	5926,44
GLU	4,09	7,4	29,9	13,82	11,48	346,9	33,1	554,0	311,31	262,26
GLY	9,57	13,0	31,9	18,16	9,84	33,8	15,0	85,4	44,70	36,45
HIS	0	0	34,6	11,53	16,31	248,0	65,4	910,0	407,78	444,43
ILE	5,07	8,4	8,5	7,30	1,58	28,7	5,5	152,0	62,08	78,77
LEU	17,03	19,1	26,5	20,87	4,07	21,2	5,6	242,6	89,83	132,57
LIS	3,00	6,7	11,2	6,99	3,36	29,2	0,0	121,7	50,32	63,56
MET	2,36	2,8	2,5	2,54	0,16	23,4	4,7	139,3	55,81	72,91
ORN	11,02	21,7	51,1	27,96	16,96	23,5	0,0	33,7	19,07	17,28
PHE	7,08	6,1	10,7	7,95	1,98	23,3	10,2	128,5	53,98	64,86
SER	3,19	4,5	13,0	6,89	4,32	52,3	17,4	283,4	117,73	144,57
TIR	3,14	3,4	13,3	6,62	4,73	28,2	8,8	132,4	56,47	66,46
TRE	3,26	2,8	7,5	4,53	2,12	29,6	5,9	132,7	56,04	67,42
TRP	18,39	22,2	28,3	22,98	4,09	132,2	22,7	283,2	146,02	130,84
Σ ALE	53,07	61,9	89,8	68,26	15,66	256,9	57,5	1078,1	464,19	540,94
Total	1101,99	1764,07	1975,66	1613,91	455,78	4581,38	636,28	17445,83	7554,50	8790,32

Siglas: L-alanina (ALA), L-Arginina (ARG), L-Asparagina (ASN), L-Ácido aspártico (ASP), L-Ácido glutâmico (GLU), L-citosina (CIT), L-Glutamina (GLN), L-Histidina (HIS), L-Isoleucina (ILE), L-Leucina (LEU), L-Lisina (LIS), L-Metionina (MET), L-Fenilalanina (PHE), L-Serina (SER), L-Treonina (TRE), L-Triptofano (TRP), L-Tirosina (TIR), L-Glicina (GLY), L-Ornitina (ORN) e L-Ácido γ – amino butírico (GABA), Σ ALE - Soma de aminoácidos livres essenciais. Locais: MG (SP) - Mogi-guaçu (São Paulo), LA (SP) - Luís Antonio (São Paulo), BH (MG) - Belo Horizonte (Minas Gerais)

Alimentos que contêm elevada concentração dessas substâncias têm sido denominados de alimentos “smart”, ou seja, são capazes de influenciar na atenção, na memória e outras funções neurais. Em *A. crassiflora* os valores variaram de 9,5 µg/g a 24 µg/g na polpa e de 19 µg/g a 260,9 µg/g nas sementes.

Com relação ao perfil dos aminoácidos livres de *A. crassiflora*, em geral, não foi observada variação entre as amostras dos diferentes locais (**Tabela 2**). Na polpa, independentemente da origem geográfica, além da glutamina, alguns aminoácidos foram mais abundantes como a alanina, o triptofano, a citosina, a ornitina e a arginina. Nas sementes, além da glutamina, os aminoácidos o triptofano, a arginina, o ácido glutâmico, a histidina e o ácido γ-aminobutírico também foram majoritários.

Esses dados parecem indicar há seis aminoácidos que são característicos na polpa e nas sementes de *A. crassiflora*. Esse perfil comum, independente da origem geográfica, poderia ser utilizado como padrão de autenticidade para o fruto e seus produtos da espécie estudada. Wallrauch e Faethe (1988) analisaram o perfil de diversas frutas e apontaram que a presença de oito aminoácidos mais abundantes serviu para a caracterização de cada uma das diferentes espécies. Silva et al. (2004) avaliaram amostras de polpa e geléia de marmelo (*Cydonia Oblonga*) de sete diferentes regiões e constataram que o perfil da geléia foi similar ao da polpa e que este não variou entre as diferentes regiões. No entanto, observaram variações nas concentrações.

Informações relacionadas ao perfil de aminoácidos podem proporcionar informações sobre possível adulteração ou falsificação de derivados como sucos, geléias e outras sobremesas provindas da polpa de frutas (Belitz e Grosh 1999). Os dados obtidos para *A. crassiflora* nos apontam para definição de um perfil de aminoácidos livres, tanto na polpa como nas sementes, que poderiam servir de parâmetro para maior controle de qualidade e autenticidade dos frutos e seus derivados comercializados.

Na **tabela 3** está descrito o teor total dos carboidratos solúveis da polpa e das sementes de *A. crassiflora*. O teor médio total dos carboidratos solúveis da polpa foi de $15,16 \pm 3,18$ g/100g de massa seca. As amostras de Mogi-Guaçu e Luís Antonio (São Paulo) apresentaram quantidades maiores, 17,03 g/100g e 16,68 g/100g de massa seca, respectivamente, comparados a Belo Horizonte (Minas Gerais) que mostrou o valor de 11,5 g/100g de massa seca.

As amostras de São Paulo mostraram valores similares aos já encontrados para essa espécie (Almeida et al. 1998) e são próximos aos detectados para outras espécies comerciais de *Annona*, como *A. cherimola* (18,42 g/100g) (Lizana e Reginato 1990), *A. squamosa* (19,6 g/100g) (Leal et al. 1990) e *A. muricata* (17,25 g/100g) (Castro et al. 1984). Além disso, a concentração dos carboidratos solúveis totais de

A. crassiflora é alta comparada com outras espécies que são amplamente comercializadas, como o abacaxi (*Ananas comosus*) (12 g/100g de polpa), a maçã (*Malus* sp) (15 g/100g de polpa) e a ameixa (*Prunus* sp) (14 g/100g de polpa) (Taco 2006) (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Teor total (g/100g) de carboidratos solúveis da polpa e das sementes de *A. crassiflora* de três diferentes regiões geográficas.

Origem geográfica	Polpa	Semente
MG (SP)	17,30	40,47
LA (SP)	16,68	13,69
BH (MG)	11,50	23,89
x ± dp	15,16 ± 3,18	26,02 ± 13,51

Siglas - MG (SP) - Mogi-guaçú (São Paulo), LA (SP) - Luís Antonio (São Paulo), BH (MG) - Belo Horizonte (Minas Gerais)

O rendimento médio total dos carboidratos solúveis das sementes foi de 26,02 ± 13,52 g/100g de matéria seca, sendo as menores quantidades detectadas nas amostras de Belo Horizonte (Minas Gerais) e de Luís Antonio (São Paulo), respectivamente, 23,89 g/100g de matéria seca e 13,69 g/100g de matéria seca. A amostra de Mogi-Guaçú (São Paulo) apresentou o maior valor de 40,47 g/100g de matéria seca. Este valor está muito próximo ao encontrado nas sementes de *A. crassiflora* (Caramori et al. 2004).

Foi constatada ampla variação na concentração total dos carboidratos solúveis entre as amostras provenientes de diferentes locais, assim como para os aminoácidos livres. Isto tem sido verificado em outras espécies, como por exemplo, em frutos de *Hippophae rhamnoides* provenientes de diferentes regiões da Europa e da Ásia (Tang e Tigerstedt 2001).

Com relação à composição dos carboidratos solúveis foram encontradas a glicose, a frutose e a sacarose na polpa e nas sementes de *A. crassiflora*. A concentração dos mesmos não foi apresentada devido a alguns problemas nos cálculos. Esses são os principais carboidratos que constituem a polpa de várias espécies frutíferas de importância econômica (Ayaz e Bertoft 2001), incluindo outras espécies de *Annona*, como cherimóia (*A. cherimola*) (Lizana e Reginato 1990), a graviola (*A. muricata*) (Castro et al. 1984) e a fruta-do-conde (*A. squamosa*) (Leal et al. 1990).

A **tabela 4** apresenta o rendimento de lipídeos totais e a composição de ácidos graxos da polpa e das sementes das amostras de *A. crassiflora*. A quantidade média de lipídeos totais da polpa foi de 12,8 ± 5 g/100g de massa seca, sendo que as amostras de Mogi-Guaçú e Luís Antonio (São Paulo), Belo Horizonte (Minas Gerais) apresentaram 14,96 g/100g, 16,3 g/100g e 7,1 g/100g de massa seca, respectivamente. Estes valores são altos comparados ao valor de cerca de 0,3 g/100g de massa seca relatado para essa espécie (Almeida et al. 1998). Para as sementes, o teor médio total dos lipídeos das sementes foi 35 ± 0,7

g/100g. Em todas as amostras os valores foram superiores aos observados para a polpa. A amostra de Mogi-Guaçu (São Paulo) apresentou 35,98 g/100g, a de Luís Antonio (São Paulo) 34,7 g/100g e a de Belo Horizonte (Minas Gerais) 34,36 g/100g de massa seca. Estes valores são semelhantes aos já encontrados para essa espécie (Caramori et al. 2004) e um pouco inferiores aos de outras espécies de *Annona*, como a *A. muricata* que mostrou o rendimento de 47,1 g/100g (Onimawo 2002) e a *A. coriacea* com 45,4 g/100g (Agostini et al. 1995).

Há muitas espécies cujo óleo é mundialmente consumido e que contêm quantidade igual ou menor do que as espécies de *Annona*, como por exemplo o milho (*Zea mays*) com 20 g/100g, a azeitona (*Olea europea*) com 15 g/100g, a soja (*Glycine Max*) com 15 a 20 g/100g e o girassol (*Helianthus annuus*) com 20 a 30g/100g (Bruneton 1993).

Quanto à identificação dos ácidos graxos foram detectados os ácidos mirístico (14:0), palmítico (16:0), palmitoléico (16:1), esteárico (18:0), oléico e/ou petroselinico (18:1) e linoléico (18:2) (**Figura 4 e Tabela 5**). Através da metodologia empregada não foi possível separar o ácido oléico do ácido petroselinico, sendo ambos detectados em um mesmo pico (**Figura 4**). Além disso, não foi possível determinar qual a posição da dupla ligação no ácido oléico, a qual pode ser no carbono 9,11 ou 13.

Foram observadas diferenças no perfil dos ácidos graxos entre a polpa e a semente. Os ácidos mirístico e palmitoléico foram encontrados somente na polpa, sendo o ácido palmitoléico (16:1) detectado somente nas amostras de São Paulo. Já o ácido linoléico foi detectado somente nas sementes.

O ácido oléico e/ou petroselinico (18:1) foi majoritário em todas as amostras (**Tabela 4**). A porcentagem de ácidos graxos insaturados foi maior do que os saturados tanto na polpa como nas sementes, sendo que os valores variaram de 79,4 % a 91,5 % de massa seca e de 80,3% a 86,6% de massa seca, respectivamente. Óleos com ácidos graxos monoinsaturados têm despertado um interesse crescente no mercado internacional. Devido a esta propriedade e por conterem alta quantidade de lipídeos totais, o óleo das sementes de *Annona* pode ser sugerido para aproveitamento.

Os dados obtidos para *A. crassiflora* indicam que as sementes desta espécie, assim como de outras *Annona*, que freqüentemente são descartadas, poderiam ser mais uma alternativa econômica. As sementes contêm alto teor de lipídeos e de aminoácidos livres. Essas substâncias poderiam ser aproveitadas como bioproduto da espécie e/ou produto florestal não madeireiro do cerrado.

Para o uso alimentar é recomendável um processo de refinamento apropriado, considerando que as sementes dessa espécie são descritas pela medicina popular como anti-diarréicas e são usadas para afecções do couro cabeludo. Em outras espécies do *Annona* já foi constatada a presença de acetogeninas bioativas (Chen et al. 1999), diterpenos e saponinas. Os lipídeos das sementes de outras espécies de

Annona têm sido indicados para uso como óleo semi-secante devido ao grau de insaturação (Lebouf et al. 1982).

Com relação aos aminoácidos livres, há algumas alternativas para que se possa aproveitá-los. Shashirekha et al. (2005) utilizaram pó de sementes de algodão como suplemento para um substrato para o cultivo do cogumelo *Pleurotus florida*. Estes autores verificaram que o teor de aminoácidos livres propiciou um incremento de 125% na composição química do cogumelo, demonstrando a eficiência do uso do suplemento de sementes ricas em aminoácidos livres para bioconversão de um substrato de crescimento em biomassa nutricionalmente comestível.

Exceto para lipídeos totais, todos os parâmetros químicos analisados mostraram variação da concentração entre as amostras provenientes de diferentes regiões geográficas. Esta avaliação sobre variações que podem ocorrer no nível de nutrientes nos alimentos é fundamental. Há fatores ambientais que podem interferir no valor nutricional dos alimentos, provocando a perda de conteúdo ou a biodisponibilidade de nutrientes, como os lipídeos, carboidratos e outros (Lajolo 1987). Esta variação é importante também para avaliação de identificação de fenótipos que possam ser mais promissores no sentido de produzir maior ou menor quantidade de substâncias de interesse econômico. Estas informações podem ser muito úteis para programas de melhoramento e conservação do germoplasma de *A. crassiflora* e espécies correlacionadas.

Tabela 4 - Rendimento total de lipídeos (g/100g) e composição dos ácidos graxos (% relativa) da polpa e sementes de *Annona crassiflora* de três diferentes regiões geográficas

Origem geográfica										
Ácidos Graxos	Polpa					Semente				
	MG (SP)	LA (SP)	BH (MG)	x ± dp		MG (SP)	LA (SP)	BH (MG)	x ± dp	
Mirístico (14:0)	1,7	1,1	2,4	1,7	0,7	0,0	0,0	0,0	0	0,0
Palmítico (16:0)	14,0	4,7	11,1	9,9	4,7	7,7	7,7	6,8	7,4	0,4
Palmitoléico (16:1)	0,0	8,4	0	2,8	4,8	0	0	0	0	0,0
Esteárico (18:0)	5,0	2,7	3,1	3,6	1,2	8,0	12,0	6,8	8,9	2,2
Oléico/Petroselinico (18:1)	79,4	83,1	83,4	82,0	2,2	55,7	42,0	63,8	53,8	9,0
Linoléico (18:2)	0	0	0	0	0	28,7	38,3	22,8	29,9	6,4
Teor total	14,96	16,3	7,1	12,8	5,0	35,98	34,7	34,36	35,0	0,7

Siglas - MG (SP) - Mogi-guaçu (São Paulo), LA (SP) - Luís Antonio (São Paulo), BH (MG) - Belo Horizonte (Minas Gerais)

Figura 4. Cromatograma de ácidos graxos de sementes de *A. crassiflora*. Em destaque os espectros de massas do Ácido petroselinico (A) e do Éster metílico do ácido oléico (B)

Tabela 5 - Identificação de ácidos graxos de sementes e polpa por CG/MS de *A. crassiflora*

Pico	Rt (in min)	Nome	El-MS m/z	Referência
1	11.592	Ácido palmítico (16:0)	55,74,87,115,129,143,171,185,199,227,270	Wiley 275, Lipidlibrary
2	14.504	Ácido linoléico (18:2)	41,67,81,95,123,135,150,178,263,294	Wiley 275, Lipidlibrary
3	14.660	Ácido Oléico (18:1 <i>n</i> -9)	41,55,74,97,111,180,194,222,246,264, 296	Wiley 275, Lipidlibrary
4	14.660	Ácido petroselinico (18:1 <i>n</i> -6)	15,41,55,74,96,123,137,166,180,220,222,264,266,296	Wiley 275, Lipidlibrary
5	15.223	Ácido esteárico (18:0)	55,74,87,101,143,255,298	Wiley 275, Lipidlibrary

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostini T.D., Cecchi H.M. e Barrera A.D.** 1995. Chemical characterization of the oil and pulp of marolo (*Annona coriaceae*). Archivos Latinoamericanos de Nutrición 45: 237-241.
- Almeida, S.P.** 1998. Frutas nativas do cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes pgs. 247-285. in: Sano, S.M., Almeida, S.P., ed. Cerrado ambiente e flora. Planaltina: Embrapa-CPAC.
- Astarita, L.V., Floh, E.I.S. e Handro, W.** 2004. Free amino acids, protein and water content changes associated with seed development in *Araucaria angustifolia*. Biological Plantarum 47:53-59.
- Ayaz, F.A. e Bertoft, E.** 2001. Sugar and phenolic acid composition of stored comercial oleaster fruits. Journal of food composition and analysis 14: 505-511.
- Belitz, H.D. e Grosh, W.** 1999. Food Chemistry Springer Verlag, Berlin.
- Brückner, H. e Westhauser, T.** 2003. Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. Biomedical and Life Sciences 24: 43-55.

- Bruneton, J.** 1993. Pharmacognosy, Phytochemistry, Plants Medicinal. 2^aed. Lavoisier Publishing, Paris.
- Caramori, S.S., Lima, C.S. e Fernandes, K.F.** 2004. Biochemical characterization of selected plant species from brazilian savannas. Brazilian Archives of Biology and Technology. An International Journal 47: 253-259.
- Castro, F.A., Maia, G.A., Holanda, L.F.F., Guedes, Z.B.L. e Moura, F.J.A.** 1984. Características físicas e químicas da graviola. Pesquisa Agropecuária Brasileira 19: 361-365.
- Chen C.Y. Chang F.R. e Wu, Y.C.** 1999. Cheritamine, a new N-fatty acyl tryptamine and other constituents from stems of *Annona cherimola*. Journal of the Chinese Chemical Society 46: 77-86.
- Clark, C. e Bolding, H.** 1994. Amino acids in ripening kiwifruit. HortResearch Publication www.hortnet.co.nz/publications/science/smart.htm (acessado 22/12/08)
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. e Smith, F.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28:350-356.
- Farfán, J.A.** 1994. Química de proteínas aplicada à ciência e tecnologia de alimentos. 2^a ed. Unicamp, Campinas.
- Garces, R. e Mancha, M.** 1993. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. Analysis Biochemical 211:139-143.
- Gomes, M.H. e Rosa, E.** 2000. Free amino acid composition in primary and secondary inflorescences of 11 broccoli (*Brassica oleraceae* var *italica*) cultivars and its variation between growing seasons. Journal Science Agricultural 81: 295-299.
- Gorsel, H., Li, C., Kerbel, E.D., Smits, M. e Kader, A.A.** 1992. Compositional Characterization of Prune Juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry 40: 784-789.
- Grunwald, C. e Endress, A.G.** 1988. Oil, fatty acid, and protein content of seeds harvested from soybeans exposed to O₃ and/ or SO₂. Botanical Gazette 149: 283-288.
- Itaya, N.M., Buckeridge, M.S. e Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 1997. Biosynthesis in vitro of high-molecular mass fructan by cell-tree extracts from tuberosus roots of *Viguiera discolor* (Asteraceae). New Phytopathological 136: 53-60.
- Lajolo, F. M.** 1987. Efeito do processamento sobre o valor nutricional dos alimentos. Situação na América Latina e Caribe, e importância para elaboração de tabelas de composição. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 37: 667-672.
- Leal F.** 1990. Sugar Apple. In: Nagy, S, Shaw, P.E. e Wardowski, W.F. ed. Tropical and Subtropical Fruits: Composition, Properties and Uses. Lake Alfred, Florida.

- Leboeuf, M., Cave, A., Bhaumik, P.K., Mukherjee, B. e Mukherjee, R.** 1982. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry* 21: 2783-2813.
- Lizana, L.A. e Reginato, G.** 1990. Cherimoya. pgs. 131 -148 *in*: Nagy, S, Shaw, P.E. e Wardowski, W.F. ed. Tropical and Subtropical Fruits: Composition, Properties and Uses. Lake Alfred, Florida.
- Lorenzi, H.** 1998. Árvores brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA. VI. 2, São Paulo.
- Lorenzi, H. e Matos, F.J.A.** 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, Nova Odessa.
- Maestri, D.M., Fortunato, R.H., Greppi, J.A. e Lamarque, A.L.** 2001. Compositional studies of seeds and fruits from two varieties of *Geoffroea decorticans*. *Journal of Food Composition and Analysis* 14: 585-590.
- Mathur, N., Singh, J., Bohra, S., Bohra, A. e Vyas, A.** 2006. Biomass Production, Productivity and Physiological Changes in Moth Bean Genotypes at Different Salinity Levels. *American Journal of Plant Physiology* 1: 210-213.
- Marur, C.J., Sodek, L. e Magalhães, A.C.N.** 1994. Free amino acids in leaves of cotton plants under water deficit. *Revista brasileira de Fisiologia Vegetal* 6: 103-108.
- Newsholme, P.** 2001. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *Journal of Nutrition* 131: 2515-2522.
- Onimawo, I.A.** 2002. Proximate composition and selected physicochemical properties of the seed, pulp and oil of sour sop (*Annona muricata*). *Plant Foods for Human Nutrition* 57: 165-171.
- Pollock, C.J. e Jones, T.** 1979. Seasonal patterns of fructan metabolism in forage grasses. *New Phytopathological* 83:9-15.
- Rohsius, C., Atissek, R e Lieberei, R.** 2006. Free amino acid amounts in raw cocoas from different origins. *European Food Research and Technology* 222: 432-438.
- Shashirekha, M., Rajarathnam, N. e Bano, Z.** 2005. Effects of supplementing rice straw growth substrate with cotton seeds on the analytical characteristics of the mushroom, *Pleurotus florida* (Block & Tsao). *Food Chemistry* 92: 255–259.
- Silva, B.M., Casal, S., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Oliveira, M.B.P.P. e Ferreira, M.A.** 2004. Free amino acid composition of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp and peel) and jam. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:1201-1206.

- Silveira V., Floh, E.I.S., Handro, W. e Guerra, M.P.** 2004. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69:233-249.
- TACO Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA-UNICAMP** 2006. 2. ed., NEPA-UNICAMP, Campinas.
- Tang, X. e Tigerstedt, P.M.A.** 2001. Variation of physical and chemical characters within an elite sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) breeding population. Scientia Horticulturae 88: 203-214.
- Toshinori, A., Takamitsu, U. e Takeo, S.** 2004. Varietal differences in free amino acid and sugar concentrations in immature seeds of soybean under raw and boiling treatments. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology 51:172-176.
- Vogel, A.J.** 1971. Análises de química orgânica qualitativa. EPU, São Paulo.
- Wallrauch, S. e Faethe, W.** 1988. Amino acids: criteria for the evaluation of fruit juices. pgs. 21-48. *in*: Nagy, S., Attaway, S.A. e Rhodes, M.E. ed. Adulteration of fruit juice and beverages. Marcel Dekker, New York.
- Wélé, A., Ndoye, I. e Badiane M.** 2004. Fatty Acid and essential oil compositions of the seed oil of five *Annona* species. Nigerian Journal of Natural Products and Medicinal 8: 62-65.

CAPÍTULO 2

VARIAÇÕES NA CONCENTRAÇÃO E NO PERFIL DE ALCALÓIDES DE *Annona crassiflora* MART. NO CERRADO

Formatado para submissão à revista Biochemical Systematics and Ecology

ABSTRACT

The aim was to evaluate the size of alkaloid profile diversity in *A. crassiflora* leaves. Samples from eight different regions of the 'cerrado' were analyzed. Alkaloids were quantified and identified by means of CG/FID and CG/EIMS, respectively. Total alkaloid rate varied from $221,1 \pm 17,14$ ug/g to $2.986,89 \pm 367,1$ ug/g of dry mass. The identified alkaloids anonaine, anoretine, romucosine and xilopine presented regional differences. This variation in concentration and alkaloid profile in *A. crassiflora* populations suggests ample phenotypic plasticity of these metabolites in response to biotic and/or abiotic factors, besides elevated genetic variability related to gene expression by those involved in metabolite biosynthesis.

Keywords: *Annona crassiflora*, isoquinoline alkaloids, cerrado

RESUMO

Foi proposto avaliar qual a magnitude da diversidade do perfil de alcalóides das folhas de *A. crassiflora*. Foram analisadas amostras provenientes de oito regiões de cerrado diferentes. A quantificação e identificação dos alcalóides foram feitas por CG/FID e CG/EIMS, respectivamente. O teor total de alcalóides variou de $221,1 \pm 17,14$ µg/g a $2986,89 \pm 367,1$ µg/g de massa seca. Foram identificados os alcalóides anonaina, anoretina, romucosina e xilopina que mostraram diferenças entre as regiões. Esta variação na concentração e no perfil alcaloídico das populações de *A. crassiflora* sugere ampla plasticidade fenotípica desses metabólitos em resposta a fatores bióticos e/ou abióticos, além de alta variabilidade genética relacionada à expressão dos genes envolvidos na biossíntese desses metabólitos.

Palavras-chave: *Annona crassiflora*, alcalóides isoquinolínicos, cerrado

INTRODUÇÃO

O cerrado é considerado um dos 25 sítios de maior biodiversidade do mundo (Myers et al., 2000). No entanto, estima-se que nos últimos 40 anos cerca de 50% a 60% de sua cobertura original tenha sido removida devido à rápida expansão agrícola (Ratter et al., 2006). Evidentemente, no decorrer desse processo tem ocorrido a perda dos recursos naturais. Pesquisas sobre o padrão de variação adaptativa de caracteres fenotípicos são muito importantes para subsidiar ações de conservação, pois podem indicar qual o potencial para a sobrevivência de espécies em diferentes regiões (Crandall et al., 2000).

Annonaceae tem sido apontada como uma das famílias com os maiores valores de riqueza florística em áreas de cerrado em todo o território brasileiro (Lugnani et al., 2007). Esta família é constituída por, aproximadamente, 120 gêneros com distribuição marcadamente tropical e subtropical em todo o mundo (Joly, 2002). Dentre esses gêneros, *Annona* é considerado muito importante economicamente por apresentar algumas espécies que são amplamente cultivadas e comercializadas no Brasil, como *A. squamosa* (fruta-do-conde), *A. muricata* (graviola), *A. reticulata* (condessa) e *A. cherimola* (cherimóia), todas não nativas. Há espécies silvestres dessa família que não apresentam importância econômica relevante ao mercado, porém são muito apreciadas por comunidades locais.

Annona crassiflora Mart. é uma espécie típica do cerrado. Apresenta ampla distribuição nesse bioma, sendo encontrada em São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Tocantins (Lorenzi, 1998). É conhecida popularmente como araticum, marolo, pinha-do-cerrado, entre outros nomes (Almeida et al., 1998).

Dentre os metabólitos secundários, os alcalóides isoquinolínicos são considerados como uma importante característica para as espécies da Annonaceae (Cavé, 1985). Em *Annona* já foram relatados alcalóides como o benzilisoquinolínico reticulina (Chang et al., 2000a), os aporfínicos anonaina e asimilobina (Chang et al., 2000b) e o alcalóide oxoaporfínico liriodenina (Wu et al., 1993). Todos esses alcalóides foram detectados em folhas e cascas de *A. crassiflora* provenientes das Guianas (Hocquemiller et al., 1982).

Há poucos dados na literatura relacionados à existência de variação na concentração e no perfil de alcalóides correlacionados a diferenças geográficas, principalmente em espécies nativas do Brasil. Milanowski et al. (2002), por exemplo, analisando diversas amostras de *Croton lechleri* propuseram o reconhecimento de três quimiotipos baseados na composição dos alcalóides isolados das folhas.

Existem muitos artigos relacionados à composição de alcalóides em diversas espécies de Annonaceae (Cavé, 1985), entretanto este é o primeiro estudo que busca correlacionar variações quantitativas e/ou qualitativas desses metabólitos em uma espécie dessa família com a distribuição

geográfica. Neste trabalho foram analisadas a composição e a quantidade de alcalóides em amostras de *Annona crassiflora* provenientes de oito regiões diferentes, afim de verificar a existência de variação nesses metabólitos que possa ser correlacionada à distribuição geográfica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas amostras provenientes de oito regiões do cerrado, a saber Mogi-Guaçu (São Paulo) em 05/03/2007, Luís Antonio (São Paulo) em 18/03/2007, Belo Horizonte (Minas Gerais) em 06/04/2007, Lagoa Santa (Minas Gerais) e Baldim (Minas Gerais) em 08/04/2007, Santana do Riacho (Minas Gerais) em 09/04/2007, Cristalina (Goiás) em 04/04/2007 e Brasília (Distrito Federal) em 03/04/2007 (**Tabela 1**). Em cada uma destas regiões foram coletadas folhas de três indivíduos. As exsiccatas foram depositadas no Herbário SPF (Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo).

Com exceção de Mogi-Guaçu, os dados climáticos de todos os locais de coleta foram obtidos do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) nas seguintes estações meteorológicas: Luís Antonio (São Paulo) - Estação São Simão; Belo Horizonte (Minas Gerais) - Estação Belo Horizonte; Lagoa Santa (Minas Gerais), Baldim (Minas Gerais) e Santana do Riacho (Minas Gerais) - Estação Sete Lagoas; Cristalina (Goiás) - Estação Formosa e Brasília (Distrito Federal) - Estação Brasília. As informações climáticas de Mogi-Guaçu (São Paulo) foram obtidas no Posto meteorológico automático da Reserva Biológica de Mogi-Guaçu do Instituto de Botânica e os dados de insolação total diária foram obtidos da Estação São Simão.

Testes preliminares de detecção de alcalóides utilizando o reagente de Dragendorff (Chang et al., 2000a) revelaram a marcante presença dessas substâncias em todas as amostras de *Annona crassiflora*.

As folhas foram secas a 50 °C em estufa de ventilação. Os alcalóides foram extraídos a partir de 20 g a 50 g de tecido seco pulverizado com 250 mL de solução etanólica levemente ácida a temperatura ambiente por aproximadamente 24 h. O extrato foi filtrado e alcalinizado com solução concentrada de hidróxido de amônio até pH 8. Os alcalóides foram extraídos por três vezes com 125 mL de clorofórmio (Suau et al., 2002). A fração clorofórmica foi concentrada sob pressão reduzida e submetida à cromatografia em coluna preenchida com sílica gel 60 (230-400 mesh) eluída com 63 mL de clorofórmio: metanol 20:1 (Chang et al., 1998, Chen et al., 2001). O solvente foi eliminado e a amostra armazenada a temperatura ambiente até posterior análise.

Cada amostra foi acrescida de 5 µg de papaverina como padrão interno. As amostras foram solubilizadas em 1 mL de diclorometano e analisadas em cromatografia gasosa.

A identificação dos alcalóides foi feita em cromatógrafo gasoso (HP 5890 ser.II Plus) acoplado a espectrômetro de massas (HP 5989B) nas seguintes condições: temperatura da fonte = 250°C, temperatura

do quadrupolo = 100°C, EM = 70eV, temperatura do injetor e detector = 300°C, gás de arraste: He (1 mL/min) e a coluna DB-5HT (32m x 0,32mm). O aquecimento da coluna foi feito da seguinte forma: a temperatura inicial foi 150°C e o aquecimento foi de 10°C por minuto até atingir a temperatura final 280°C que foi mantida por 10 min (Suau et al., 2002 modificado).

A quantificação dos alcalóides foi feita em cromatografia gasosa (HP 5989B) equipada com detector por ionização de chamas (FID), utilizando as mesmas condições descritas acima para o desenvolvimento da cromatografia.

Para análise quantitativa os dados obtidos foram submetidos, conjuntamente, a análise de variância (OneWay ANOVA on ranks). Quando constatadas variações significativas ($p \leq 0.05$), os dados foram submetidos ao teste de comparação múltipla pelo método de Student Newman Keuls. Para estimar o nível de significância de correlação entre a concentração total dos alcalóides com distribuição geográfica das amostras analisadas foi aplicado o teste de Spearman. Foi aplicado o método de regressão linear para avaliar qual o nível de dependência entre a concentração total dos alcalóides e fatores abióticos, como a temperatura, a umidade relativa do ar e a insolação total. Para a execução destes métodos foi utilizado o software SigmaStat versão 2.0 (Neter et al., 1996).

Os dados de teor médio de xilopina, anonaína, anoretina e de alcalóides totais foram submetidos à análise por agrupamento, onde foi utilizada a distância Euclidiana simples e o método de conexão de grupos em par usando a média aritmética não ponderada (UPGMA) (Morgano, 1999). Para isto, todos os dados foram, previamente, auto-escalados uma vez que as diversas variáveis diferem em ordem de grandeza. Essas análises foram realizadas com auxílio do software FitopacShell 2006.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor total de alcalóides variou de $221,1 \pm 17,14 \mu\text{g/g}$ a $2986,89 \pm 367,1 \mu\text{g/g}$ de massa seca (**Tabela 1**). Hocquemiller (1982) relatou valores por volta de $1100 \mu\text{g/g}$ em folhas de *A. crassiflora* provenientes das Guianas. As amostras coletadas nas regiões de Baldim (Minas Gerais) e Cristalina (Goiás) apresentaram valores bem próximos aos já observados para essa espécie, $1022,32 \pm 93,62 \mu\text{g/g}$ e $1067,04 \pm 71,04 \mu\text{g/g}$ de massa seca, respectivamente. Não há mais dados na literatura sobre a concentração total de alcalóides em espécies de *Annona*.

Annona crassiflora é uma espécie típica do cerrado brasileiro, com ampla distribuição, sendo relatada na literatura como presente nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Tocantins (Lorenzi, 1998). No presente trabalho, foram coletadas amostras de oito populações abrangendo os estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás e o Distrito Federal. O cerrado de Mogi-Guaçu em São Paulo foi considerado o ponto zero para as coletas. Os dados encontrados sugerem

uma tendência no aumento do teor médio de alcalóides totais correlacionado ao aumento da distância de cada ponto de coleta para região considerada como ponto inicial. A amostra (média dos três indivíduos) proveniente de Brasília (DF) (distante 812 km de Mogi-Guaçu) apresentou quantidades significativamente maiores (Anova $p \leq 0,05$) que qualquer outra amostra analisada, sendo detectado $2986,89 \pm 367,1 \mu\text{g/g}$ de massa seca de alcalóides totais nas folhas. Em seguida, para a amostra de Cristalina (Goiás) (765 km distante de Mogi-Guaçu) o valor médio de alcalóides totais foi $1067,04 \pm 71,83 \mu\text{g/g}$ de massa seca. Para as amostras de Minas Gerais foram detectados valores médios variando de $759,41 \pm 25,23 \mu\text{g/g}$ a $1022,32 \pm 93,62 \mu\text{g/g}$. Dentre as quatro amostras coletadas em Minas Gerais, a amostra de Baldim (MG) apresentou o maior valor médio de alcalóides totais. As amostras provenientes de São Paulo, coletadas em Luís Antonio e Mogi-Guaçu apresentaram os teores mais baixos de alcalóides totais, $653,88 \pm 106,87 \mu\text{g/g}$ e $221,1 \pm 17,14 \mu\text{g/g}$, respectivamente. A concentração total dos alcalóides mostrou correlação significativamente positiva com distribuição geográfica ($r=0,885$, $p < 0.050$) das amostras analisadas (**Figura 1 e Tabela 1**).

Com relação à composição foram identificados os seguintes alcalóides: os aporfínicos - anonaína e xilopina; o fenantreno - anoretina e o benzilisoquinolínico, romucosina e foi detectado um alcalóide que não foi identificado (**Figura 2 e Tabela 2**). A ocorrência de anonaína em *A. crassiflora* era prevista, considerando que Hocquemiller (1982) encontrou este alcalóide em amostras de *A. crassiflora* provenientes das Guianas. A xilopina e a anonaína já foram detectadas em *A. squamosa* (Bhaumik, 1979). Alguns autores já apontaram propriedades fitoterápicas similares para *A. crassiflora* e *A. squamosa* (Lorenzi e Matos, 2002). A romucosina já foi encontrada em outras espécies de *Annona* (Chang et al., 2000a).

Foi observado que a anonaína foi o principal alcalóide nas amostras de Brasília (Distrito Federal), Lagoa Santa (Minas Gerais), Baldim (Minas Gerais), Belo Horizonte (Minas Gerais), Luís Antonio (São Paulo) e Mogi-Guaçu (São Paulo). Dentre estas amostras, aquela proveniente de Brasília (Distrito Federal) apresentou valor ($2254,33 \pm 109,67 \mu\text{g/g}$) significativamente maior (Anova $p \leq 0,05$) dessa substância comparado com as outras regiões. A anoretina foi majoritária nas plantas provenientes de Cristalina (Goiás) e de Santana do Riacho (Minas Gerais), sendo a quantidade detectada em Cristalina ($559,87 \pm 27,86 \mu\text{g/g}$) significativamente maior (**Tabela 1**). Exceto anonaína e anoretina, os demais alcalóides detectados em *A. crassiflora* não foram universais nas oito populações amostradas. A xilopina não foi detectada nos indivíduos das amostras de Belo Horizonte, Luís Antônio e Mogi-Guaçu. Entre as amostras nas quais esse alcalóide foi detectado, a amostra de Cristalina (Goiás) apresentou uma quantidade significativamente maior. A maior variabilidade no perfil dos alcalóides foi detectada com relação ao alcalóide romucosina. Mesmo entre os indivíduos de uma mesma região, a presença e/ou quantidade desse alcalóide foi muito

variável, o que fica evidenciado pelos altos valores de desvio padrão (**Tabela 1**). Dessa forma, os dados quantitativos de romucosina não foram submetidos à análise de variância e agrupamento.

Através da análise de agrupamento (análise cluster) foi verificado o nível de semelhança entre as amostras provenientes de diferentes regiões. Foram formados dois grupos que são os seguintes: **I** – Mogi – Guaçu (São Paulo), Luís Antonio (São Paulo) e Belo Horizonte (Minas Gerais) e **II** – Santana do Riacho (Minas Gerais), Cristalina (Goiás), Brasília (Distrito Federal), Lagoa Santa (Minas Gerais) e Baldim (Minas Gerais) (**Figura 3**). O carácter que foi determinante para formação dos grupos foi a presença/ausência de xilopina. Nas amostras de Mogi – Guaçu (São Paulo), Luís Antonio (São Paulo) e Belo Horizonte (Minas Gerais) esse alcalóide não foi detectado (**Tabela 1**). Dentro de cada grupo as relações de similaridade obtidas foram devidas às variações quantitativas e não qualitativas.

Essa ampla variação dos alcalóides entre as amostras de *A. crassiflora* provenientes de diferentes regiões geográficas parece refletir ampla plasticidade fenotípica na síntese desses metabólitos. Isto pode ocorrer em resposta a fatores bióticos e/ou abióticos, além da alta variabilidade genética que pode ser relacionada à expressão dos genes envolvidos na biossíntese desses metabólitos.

Alguns relatos na literatura relacionaram a diferenciação de alcalóides, principalmente, à influência de fatores abióticos como a umidade do solo e a disponibilidade de nitrogênio (Hunt et al., 2005), temperatura (Salminen et al., 2005), qualidade e quantidade de luminosidade (Vasquez-Flota e De Luca, 1998) e umidade (Saenz et al., 1993), porém há controvérsias.

No presente trabalho estes fatores abióticos parecem não estar relacionados à variação quantitativa total e do perfil dos alcalóides. Esses fatores variaram, porém não foi observada qualquer relação de dependência significativa entre eles e a concentração total dos alcalóides verificados entre as regiões. A temperatura média (°C), a umidade relativa do ar diária (%) e a insolação total diária (horas) variaram, respectivamente, da seguinte forma: Mogi-Guaçu (São Paulo) - 21°C, 60%, 10 h; Luís Antonio (São Paulo) - 24°C, 90%, 2 h; Belo Horizonte (Minas Gerais) - 23°C, 70%, 1 h; Lagoa Santa (Minas Gerais) – 23°C, 70%, 6 h; Baldim (Minas Gerais) - 23°C, 70%, 6 h; Santana do Riacho (Minas Gerais) - 23°C, 80%, 3 h; Cristalina (Goiás) - 24°C, 50%, 6 h e Brasília (Distrito Federal) - 22°C, 70%, 1 h (INMET 2007) (**Figura 4**).

No que se refere à influência de outros fatores abióticos, como a umidade e a disponibilidade de nutrientes do solo são necessários mais estudos para avaliar se há uma possível correlação desses fatores com a produção dos alcalóides de *A. crassiflora*.

Quanto à influência dos fatores bióticos, poucos herbívoros ou patógenos já foram relatados nas folhas da *A. crassiflora*, o que sugere alto nível de defesa (Ribeiro et al., 2000). Os altos teores dos

alcalóides detectados em algumas amostras podem estar envolvidos nos mecanismos de defesa dessa espécie.

Segundo Mishra et al. (2001), a concentração total e os tipos de alcalóides podem ser relacionados ao estresse biótico e ao genótipo da planta hospedeira. Macel et al. (2004) sugeriram que diferentes padrões nos alcalóides pirrolizidínicos em diferentes populações de *Senecio jacobaeae* teriam sido influenciados pelas diferenças na comunidade de herbívoros. Faeth et al. (2006) verificaram em *Festuca arizonica* que o nível de peramina diferiu significativamente com a presença de um fungo endofítico e de acordo com diferentes genótipos do hospedeiro.

Além dos aspectos ecológicos, os alcalóides identificados em *A. crassiflora* sugerem potenciais aplicações medicinais para essa espécie. Já foram relatadas propriedades para anonaína, romucosina e anoretina que, respectivamente, mostraram significativa atividade antibacteriana (Paulo et al., 1992), atividade anti-agregante plaquetária (Chen et al., 1999, Wu et al., 1998) e potencial citotóxico contra células cancerígenas (Wu et al., 1993). Neste sentido, as amostras provenientes de Brasília (Distrito Federal) e Cristalina (Goiás) seriam bastante interessantes para serem avaliadas, por apresentarem altos níveis de anonaína e anoretina.

Tabela 1. Localidade e teores de alcalóides das amostras de *Annona crassiflora* analisadas. As exsiccatas foram depositadas no Herbário SPF.

Localidade	Voucher	DT	ALCALÓIDES (µg/g massa seca)					
			N.I.*	Romucosina *	Xilopina	Anoretina	Anonaina	TOTAL
			x ± dp	x ± dp	x ± dp	x ± dp	x ± dp	x ± dp
Centro-Oeste								
Brasília (Distrito Federal)	A. P. M. Egydio 1	812	178,83 ± 184,89	300,69 ± 219,55	66,24 ± 13,34 b	186,78 ± 11,09 c	2254,33 ± 109,66 a	2986,89 ± 367,11 a
(15°57.045'S, 47°52.353'W)								
Cristalina (Goiás)	A. P. M. Egydio 2	765	0	2,5 ± 2,0	126,46 ± 21,41 a	559,87 ± 27,86 a	365,69 ± 20,11 d	1067,04 ± 71,83 b
(16°59.599'S, 47°45.843'W)								
Sudeste								
Santana do Riacho (Minas Gerais)	A. P. M. Egydio 5	558	43,23 ± 3,74	13,63 ± 11,12	94,18 ± 14,42 a	361,2 ± 95,18 b	247,17 ± 65,6 e	759,41 ± 25,23 c
(19°20.234'S, 43°37.594'W)								
Baldim (Minas Gerais)	A. P. M. Egydio 6	527	28,73 ± 7,8	165,18 ± 153,74	20,92 ± 1,04 b	63,9 ± 16,67 d	743,57 ± 62,85 b	1022,32 ± 93,62 b
(19°15.520'S, 43°57.028'W)								
Lagoa Santa (Minas Gerais)	A. P. M. Egydio 4	502	6,52 ± 5,32	4,07 ± 3,32	33,7 ± 10,61 b	18,94 ± 15,47*	779,67 ± 12,71 b	842,91 ± 12,6 c
(19°33.831'S, 43°57.565'W)								
Belo Horizonte (Minas Gerais)	A. P. M. Egydio 3	475	167,57 ± 23,69	210,79 ± 2,92	0	130,31 ± 21,79 c	442,83 ± 29,43 c	791,32 ± 17,68 c
(20°01.718'S, 44°00.596'W)								
Luís Antonio (São Paulo)	A. P. M. Egydio 8	177	149,64 ± 37,5	0	0	58,5 ± 20,25 *	445,74 ± 114,5 c	653,88 ± 106,88 c
(21°35.192'S, 47°46.692'W)								
Mogi-Guaçu (São Paulo)	A. P. M. Egydio 7	0	0	0	0	106,4 ± 2,14 c	114,64 ± 15,97 f	221,05 ± 17,14 d
(22°15.231'S, 47°09.386'W)								

Sigla N.I. alcalóide não identificado. (DT) Distância a partir de Mogi-Guaçu (Km). As letras minúsculas nas colunas indicam as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as regiões. O * indica os valores que não foram submetidos a análise de variância (ANOVA).

Figura 1 – Correlação entre média da concentração total de alcalóides e a distância geográfica ($r = 0,885$, $\rho < 0.050$). A distância foi medida a partir da região de MO (SP), que foi considerada como ponto inicial. Os números indicam as seguintes localidades: 1- Mogi-Guaçu (São Paulo); 2- Luís Antonio (São Paulo); 3 – Belo Horizonte (Minas Gerais); 4 – Lagoa Santa (Minas Gerais); 5 – Baldim (Minas Gerais); 6 – Santana do Riacho (Minas Gerais); 7 – Cristalina (Goiás) e 8 – Brasília (Distrito Federal).

Figura 2 – Cromatograma do perfil alcaloídico de *A. crassiflora* obtido através do CG/EM. Os números indicam as substâncias identificadas: 1. não identificado, 2. romucosina, 3. xilopina, 4. anoretina, 5. anonaína. (PA) corresponde a papaverina adicionada como padrão interno.

Tabela 2 - Identificação do extrato alcaloídico por CG/MS de *A. crassiflora*

Pico	Rt (<i>in min</i>)	Tipo	Nome	EI-MS m/z (intensidade relativa, %)	Referência
1	11.744	Não identificado		190 (20), 206 (100), 207 (12)	Suau et al 2002
2	13.155	Benzilisoquinolínico	Romucosina	42 (88), 55 (26), 69 (31), 81 (29), 102 (33), 109 (26), 123 (19), 139 (20), 163 (38), 165 (60), 179 (14), 193 (13), 208 (24), 235 (16), 251 (9,27), 266 (96), 278 (18), 293 (26), 308 (100)	Chen et al. 1996
3	13.229	Aporfínico	Xilopina	294 (100), 295 (53)	Bhaumik 1979
4	15.277	Fenantreno	Anoretina	293 (100)	Wu et al 1993
5	15.436	Aporfínico	Anonaína	265 (100)	Hsieh et al. 1999

Figura 3 – Relações de similaridade entre as amostras de *Annona crassiflora* coletadas em diferentes regiões baseadas nos teores médios da xilopina, anonaína, anoretina e alcalóides totais obtidas com Índice de Distância Euclidiana Simples e agrupadas pelo método UPGMA.

Figura 4 – Regressão linear entre média da concentração total de alcalóides e fatores abióticos, como a temperatura (°C) **(a)** ($R^2 = 0,0134$, $p > 0,001$), umidade relativa do ar (%) **(b)** ($R^2 = 0,0017$, $p > 0,001$) e insolação total diária (h) **(c)** ($R^2 = 0,2606$, $p > 0,001$). Os números indicam as seguintes localidades: 1- Mogi-Guaçu (São Paulo); 2 - Luís Antonio (São Paulo); 3 – Belo Horizonte (Minas Gerais); 4 – Lagoa Santa (Minas Gerais); 5 – Baldim (Minas Gerais); 6 – Santana do Riacho (Minas Gerais); 7 – Cristalina (Goiás) e 8 – Brasília (Distrito Federal).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, S.P., PROENÇA, C.E.B., SANO, S.M., RIBEIRO, J.F., 1998. Cerrado: espécies vegetais úteis. Embrapa – CPAC, Planaltina, Distrito Federal.
- BHAUMIK, P.K., MUKHERJEE, B., JUNEJA, J.P., BHACCA, N.S. MUKHERJEE, R., 1979. Alkaloids from leaves of *Annona squamosa*. *Phytochem.* 18, 1584-1586.
- CAVÉ, A., 1985. Annonaceae Alkaloids. The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- CHANG, F.R., WEI, J.L., TENG, C.M., WU, Y.C., 1998. Two New 7-dehydroaporphine alkaloids and antiplatelet action aporphines from the leaves of *Annona purpurea*. *Phytochem.* 49, 2015-2018.
- CHANG, F.R., CHEN, C.Y., HSIEH, T.J., CHO, C.P., WU, Y.C., 2000a. Chemical constituents from *Annona glabra* III. *J Chin. Chem. Soc.* 47, 913-920.
- CHANG, F.R., CHEN, C.Y., WU, P.H., KUO, R.Y., CHANG, Y.C., WU, Y.C., 2000b. New alkaloids from *Annona purpurea*. *J. Nat. Prod.* 63,746-748.
- CHEN C.Y., CHANG F.R., WU, Y.C., 1996. Isoquinoline Alkaloids and Lignans from *Rollinia mucosa*. *J. Nat. Prod.* 59, 904-906.
- CHEN C.Y., CHANG F.R., WU, Y.C., 1999. Cheritamine, a new N-fatty acyl tryptamine and other constituents from the stems of *Annona cherimola*. *J. Chin. Chem. Soc.* 46, 77-86.
- CHEN, C.Y., CHANG, F.R., PAN, W.B., WU, Y.C., 2001. Four alkaloids from *Annona cherimola*. *Phytochem.* 56, 753-757.
- CRANDALL, K.A., BININDA-EMONDS, O.R.P., MACE, G.M., WAYNE, R.K., 2000. Considering evolutionary process in conservation biology. *Tree* 15, 290-295.
- FAETH, S.H., GARDNER, D.R., HAYES, C.J., JANI, A., WITTLINGER, S.K., JONES, T.A., 2006. Temporal and spatial variation in alkaloid levels in *Achnatherum robustum*, a native grass infected with the endophyte *Neotyphodium*. *J. Chem. Ecol.* 32,307-324.
- HOCQUEMILLER, R., CAVÉ, A., JACQUEMIN, H., TOUCHÉ, A., 1982. Alcaloides des Annonacées, XXXZVI (*): Alcaloides de *L`Annona crassiflora* Mart. *Plant. Med. Phyt.* XVI, 4-6.
- HSIEH, T.J., WU, Y.C., CHEN, S.C., 2004. Chemical constituents from *Annona glabra*. *J. Chin. Chem. Soc.* 51, 869-876.
- HUNT, M.G., RASMUSSEN, S., NEWTON, P.C.D., PARSONS, A.J., NEWMAN, J.A., 2005. Near-term impacts of elevated CO₂, nitrogen and fungal endophyte-infection on *Lolium perenne* L., growth, chemical composition and alkaloid production. *Plant Cell Environ.* 28,1345-1354.
- JOLY, A.B., 2002. Introdução à taxonomia vegetal. Companhia Editora Nacional: São Paulo.

- LORENZI, H., 1998. Árvores brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil, Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, São Paulo.
- LORENZI, H., MATOS, F.J.A., 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas, Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, São Paulo.
- LUGNANI, J.S., RESENDE, U.M., BUENO, M.L., 2007. Comparação entre duas formações vegetacionais arbóreas do Parque Estadual do Prosa-PEP, Campo Grande, MS. *Rev. Bras. Bioc.* 5, 453-455.
- MACEL, M., VRIELING, K., KLINKHAMER, G.L., 2004. Variation in pyrrolidizidine alkaloid patterns of *Senecio jacobaea*. *Phytochem.* 65, 865-873.
- MILANOWSKI, D.J., WINTER, R.E.K., ELVIN-LEWIS, M.P.F., LEWIS, W.H., 2002. Geographic Distribution of Three Alkaloid Chemotypes of *Croton lechleri*. *J. Nat. Prod.* 65, 814-819.
- MISHRA, P., UNİYAL, G.C., SHARMA, S., KUMAR, S., 2001. Pattern of diversity for morphological and alkaloid yield related traits among the periwinkle *Catharanthus roseus* accessions collected from in and around Indian subcontinent. *Gen. Res. Crop Evol.* 48, 273-286.
- MORGANO, M.A., QUEIROZ, S.C.N., FERREIRA, M.M.C., 1999. Aplicação da análise exploratória na diferenciação de vegetais. *Braz. J. Food Tech.* 2, 73-79.
- MYERS, N., MITTERMEIER, R.A., MITTERMEIER, C.G., FONSECA, G.A.B., KENT, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853-858.
- NETER, J., KUTNER, M.H., NACHTSHEIM, C.J., WASSERMAN, W., 1996. *Applied linear statistical models*, Truvin, Chicago.
- PAULO, M.Q., BARBOSA FILHO, J.M., LIMA, E.O., MAIA, R.F., BARBOSA, R.C., KAPLAN, M.A., 1992. Antimicrobial Activity of Benzylisoquinoline Alkaloids from *Annona-Salzmannii* Dc. *J. Ethnoph.* 36, 39-41
- RATTER, J.A., BRIDGEWATER, S., RIBEIRO, J.F., 2006. Biodiversity Patterns of woody cerrado vegetation: an overall view. In: PENNINGTON, R.T, LEWIS, G.P., RATTER, J.A. ed. Neotropical savanas and seasonally dry forests. Plant diversity, biogeography and conservation. CRC Press, Florida.
- RIBEIRO, J.F., BRITO, M.A., JUNIOR, E.J.S., FONSECA, C.E.L., 2000. Araticum (*Annona crassiflora* Mart.), Embrapa Cerrados, Jaboticabal, São Paulo.
- SAENZ, K., SANTAMARIA, J.M., VILLANEUVA, M.A., VARGAS, V.M.L., OROPEZA, C., 1993. Change in alkaloid content of plant of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don as a result of water stress and treatment with abscisic acid. *J. Plant Physiol.* 142, 244-247.

- SALMINEN, S.O., RICHMOND, D.S., GREWAL, S.K., GREWAL, P.S., 2005. Influence of temperature on alkaloid levels and fall armyworm performance in endophytic tall fescue and perennial ryegrass. *Ent. Exp. Appl.* 115, 417-426.
- SUAU, R., CABEZUDO, B., RICO, R., NÁJERA, F., LÓPEZ-ROMERO, J.M., 2002. Direct Determination of Alkaloid Contents in *Fumaria* Species by GC-MS. *Phyto. Anal.* 13, 363-367.
- VÁSQUEZ-FLOTA, F., DELUCA, V., 1998. Development and light regulation of desacetoxy-vindoline 4-hydroxylase in *Catharanthus roseus* (L.) Don. *Plant Physiol.* 117,1351-1361.
- WU, Y.C., CHANG, G.Y., DUH, C.Y., WANG, S.K., 1993. Cytotoxic alkaloids of *Annona montana*. *Phytochem.* 33,497-500.
- WU, Y.C., CHANG, F.R., CHAO, Y.C., TENG, C.M., 1998. *Phyto. Res.* 12, 39-41.

CAPÍTULO 3

COMPARAÇÃO DE POPULAÇÕES DE *ANNONA CRASSIFLORA* MART. DE DIFERENTES REGIÕES DE CERRADO: MARCADORES ISOENZIMÁTICOS

Este capítulo está formatado para ser submetido à Conservation Genetic.

ABSTRACT

Annona crassiflora Mart. is a native fruit tree species from the 'cerrado' with high use-potential and wide distribution. The aim of the present study was to evaluate the size of genetic diversity in diverse populations of the species coming from several regions of the Brazilian 'cerrado', by using isoenzymatic markers. Sampling was undertaken with individuals from eight populations of *Annona crassiflora* Mart., distributed throughout regions of the 'cerrado' in the states of São Paulo, Minas Gerais and Goiás, besides the Federal District. Isoenzymatic data manifested low genetic variability. This gives rise to two hypotheses to explain the low level of polymorphism noted. The first points to the inefficiency of isoenzymatic techniques in reckoning species genetic diversity, the second considers that the excess of homozygosis (indicated by the low isoenzymatic variability level) would be an indication of a process of genetic erosion in this species, possibly related to habitat degradation.

Key words: isozymes, *Annona crassiflora*, genetic population structure

RESUMO

A *Annona crassiflora* Mart. é uma espécie frutífera nativa do cerrado, possui alto potencial de uso e ampla distribuição. O presente trabalho tem como objetivo avaliar qual a magnitude da diversidade genética de diferentes populações de *A. crassiflora* provenientes de diferentes regiões de cerrado do Brasil, utilizando os marcadores isoenzimáticos. Foram amostrados indivíduos de oito populações de *Annona crassiflora* Mart., distribuídas em regiões de cerrado nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás e no Distrito Federal. Os dados isoenzimáticos mostraram baixa variabilidade genética. Duas hipóteses podem ser levantadas para explicar o baixo nível de polimorfismos verificado em *A. crassiflora*. A primeira aponta a ineficiência da técnica de isoenzimas para acessar a diversidade genética dessa espécie. A outra considera que o excesso de homozigose (indicado pelo baixo nível de variabilidade nas isoenzimas) seria um indicativo do processo de erosão genética nessa espécie, possivelmente relacionado à degradação do seu habitat (cerrado).

Palavras-chaves: isoenzimas, *Annona crassiflora*, estrutura genética populacional

INTRODUÇÃO

O cerrado é considerado um dos 25 sítios de maior biodiversidade do mundo (Myers et al. 2000). No entanto, estima-se que nos últimos 40 anos cerca de 50% a 60% da sua cobertura original tenha sido removida (Ratter et al. 2006). Com os avanços da agricultura moderna, o cerrado tem sido substituído por áreas de pastagens ou cultivo de soja e outros grãos (Felfili 2002). A rápida e intensiva expansão da produção agrícola no cerrado tem fragmentado esse bioma, causando perda da biodiversidade e ameaçando a viabilidade das espécies ao longo prazo.

Apesar da alta diversidade de espécies em tais regiões e do reconhecimento da importância da conservação, há ainda poucos estudos relacionados à análise da diversidade genética das espécies que compõem esse bioma. É evidente a necessidade de analisar a estrutura genética e qual a estabilidade das linhagens evolutivas, visto que as populações são muito influenciadas por padrões de fluxo gênico dentro e entre elas (Robinson et al. 1991). Os conhecimentos sobre a estrutura espacial são importantes para definir estratégias de amostragem em populações naturais (Epperson 1990). Estudos com este enfoque são fundamentais para uso racional e a conservação dos recursos naturais do cerrado.

Marcadores genéticos, como as isoenzimas, têm sido usados amplamente para analisar possíveis variações genéticas das populações. Essa técnica proporciona várias vantagens, sendo que uma das principais é o conhecimento prévio sobre o controle genético da maioria das isoenzimas, o que permite que inferências genéticas possam ser feitas diretamente a partir dos padrões de bandas observados. Os alelos isoenzimáticos são codominantes, o que possibilita que genótipos heterozigotos e homozigotos de um determinado loco sejam facilmente identificados, pois num indivíduo diplóide, ambos os alelos de um loco são expressos e visualizados. É uma técnica de baixo custo e acessível. Vários locos isoenzimáticos podem ser analisados rápida e simultaneamente (Ferreira e Grattapaglia 1996).

Em geral as populações de espécies silvestres, além de serem unidades sobre as quais deve incidir o manejo para produção ou conservação dos recursos naturais, são importantes fontes de germoplasma (Robinson 1991).

A *Annona crassiflora* Mart. é uma espécie silvestre nativa do cerrado. É conhecida popularmente como araticum, marolo, pinha-do-cerrado, entre outros (Almeida et al. 1998). Os frutos dessa espécie são muito apreciados por populações locais, sendo encontrados em muitos pomares domésticos (Lorenzi 1998) e consumidos *in natura* e/ou utilizados na fabricação de compotas, doces, geléias, sorvetes, sucos e licores (Almeida et al. 1998). Essa espécie apresenta ampla distribuição nesse bioma, ocorrendo nos estados da Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Tocantins (Lorenzi 1998).

Recentemente, alguns estudos foram desenvolvidos com relação ao nível de diversidade genética dessa espécie utilizando as isoenzimas como marcadores (Telles et al. 2003), o seqüenciamento de uma região do DNA do cloroplasto (Blanco et al. 2007) e microsatélites (Pereira et al. 2008). Os resultados sugeriram um alto nível de diversidade genética nas populações naturais de *A. crassiflora*. Entretanto, estes estudos se restringiram a amostras de somente um estado brasileiro, Goiás. Telles et al. (2003) ressaltaram a importância de que se realizem coletas em mais localidades a fim de proceder investigações mais refinadas de análise espacial da variabilidade genética.

Diante do exposto o presente trabalho tem como objetivo avaliar qual a magnitude da diversidade genética entre diferentes populações de *A. crassiflora* provenientes de diferentes regiões de cerrado do Brasil, utilizando os marcadores isoenzimáticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Folhas jovens ou maduras tenras foram amostradas de indivíduos de oito populações de *Annona crassiflora* Mart., distribuídas em regiões de cerrado nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás e no Distrito Federal (**Tabela 1** e **Figura 1**). O material foi mantido em nitrogênio líquido ou em freezer - 80°C até o momento da análise. Para amostragem foi considerada a distância mínima de 1 metro entre os indivíduos e a de 30 km entre as diferentes populações.

As exsiccatas de todas as coletas foram depositadas no Herbário SPF (Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo).

A extração foi feita através da trituração de pequenos pedaços de tecido foliar em tampão de extração (100 mL Tris-HCl 0,1 M pH 7,0, 27,33 g de sacarose, 2,4 g de PVP, 0,1488 g de EDTA, 0,58 g de albumina bovina, 0,52 g de DIECA, 2,4 g de BORAX, 100 µL de β-mercaptoetanol) (modificado de Sun e Ganders 1990). Os extratos foram absorvidos em retângulos de papel Whatman #3 (0,4 x 10 mm) que foram aplicados em géis de amido Sigma (8,5%) com 1 cm de espessura.

Foram testados 43 sistemas enzimáticos em cinco sistemas gel/tampão do eletrodo. Dentre esses, 10 sistemas enzimáticos em dois sistemas gel/tampão do eletrodo mostraram boa resolução (descritos na **Tabela 2**). A revelação das isoenzimas foi feita com base no protocolo descrito por Alfenas (1998).

A eletroforese horizontal foi conduzida até o marcador (azul de bromofenol) atingir aproximadamente nove cm do local de aplicação. Quanto à análise dos resultados, os padrões de bandas foram interpretados geneticamente a partir da observação direta dos géis. Parâmetros genéticos não foram calculados devido ao alto nível de monomorfismo intra e interpopulacional em *A. crassiflora*.

Tabela 1. Localidade, número de indivíduos e voucher das amostras coletadas de *Annona crassiflora*.

Localidade	Latitude	Longitude	Nº de indivíduos	Voucher
Centro-Oeste				
Brasília (Distrito Federal)	15°57.045'S	47°52.353'W	20	A.P.M. Egydio 1
Cristalina (Goiás)	16°59.599'S	47°45.843'W	22	A.P.M. Egydio 2
Sudeste				
Belo Horizonte (Minas Gerais)	20°01.718'S	44°00.596'W	20	A.P.M. Egydio 3
Lagoa Santa (Minas Gerais)	19°33.831'S	43°57.565'W	25	A.P.M. Egydio 4
Santana do Riacho (Minas Gerais)	19°20.234'S	43°37.594'W	20	A.P.M. Egydio 5
Baldim (Minas Gerais)	19°15.520'S	43°57.028'W	20	A.P.M. Egydio 6
Mogi-Guaçu (São Paulo)	22°15.231'S	47°09.386'W	30	A.P.M. Egydio 7
Luís Antonio (São Paulo)	21°35.192'S	47°46.692'W	30	A.P.M. Egydio 8

Figura 1 – Localização das diferentes populações amostradas de *Annona crassiflora* Mart..

Tabela 2. Sistemas gel/Tampão do eletrodo, condições de corrida e sistemas enzimáticos padronizados

Sistemas de gel/ Tampão do eletrodo	Condições de corrida	Sistemas enzimáticos	Sistemas de revelação
Tampão do eletrodo: 8,4 g ácido cítrico, N-3-Aminopropil morfolina para ajustar o pH 6,5, 1L de água, gel: 34 g de amido, 20 mL do tampão eletrodo, 430 mL de água.	20 mA	Glutamato-oxaloacetato transaminase (GOT)	Incubação do gel no escuro por 30 minutos na temperatura de 37 °C numa solução constituída por 25 mL de Tampão Tris HCL 0,2 M pH 8,0 (24,2g de Tris, 1000 mL de água, ajuste do pH com HCl 1N), 50 mg de ácido aspártico, 3 mg de piridoxal 5' fosfato, 100 mg de ácido α -cetoglutarico. Em seguida, foi adicionado 25 mg de Fast Blue BB salt e o gel foi incubado no escuro por 12 h na temperatura ambiente de 37 °C.
		Fosfoglutamase (PGM)	Incubação do gel no escuro por 10 minutos na temperatura de 37 °C numa solução constituída por 30 mL de Tampão Tris HCL 0,2 M pH 8,0 (24,2g de Tris, 1000 mL de água, ajuste do pH com HCl 1N), 50 mg de glicose 1 fosfato, 30 U de glicose 6 fosfato, 600 μ L de $MgCl_2$ (100 mg /mL), 300 μ L de brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difenil-tetrazólio (MTT) (10mg/mL), 300 μ L de Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) (10mg/mL). Em seguida, foi adicionado 300 μ L de metassulfato de fenazina (PMS) (1mg / mL) e o gel foi incubado no escuro por 12 h na temperatura ambiente de 37 °C.
		Fosfoglucose isomerase (PGI)	Incubação do gel no escuro por 30 minutos na temperatura de 37 °C numa solução constituída por 30 mL de Tampão DH (48,4g de Tris, 12,5 mL de HCL concentrado, 1L de água destilada, pH 8,4, diluído 4x), 7 mg de frutose 6 fosfato, 12 U de glicose 6 fosfato DH, 300 μ L de $MgCl_2$ (100 mg/mL), 300 μ L de brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difenil-tetrazólio (MTT) (10mg/mL), 300 μ L de Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) (10 mg/mL). Em seguida, foi adicionado 600 μ L de metassulfato de fenazina (PMS) (1mg/mL) e o gel foi incubado no escuro por 12 h temperatura ambiente de 37 °C.
		Enzima málica (ME)	Incubação do gel no escuro por 10 minutos na temperatura de 37 °C numa solução constituída por 30 mL de Tampão Tris HCL 0,05 M pH 7,0 (6,055g, 1000 mL, ajuste do pH com HCl 1N), 10 mL de substrato de MDH (1,34g de L-Malato, 10mL de água e ajuste do pH 7,0 com Na_2CO_3), 650 μ L Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) (10mg/mL), 300 μ L de $MgCl_2$ (100 mg/mL), 400 μ L de brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difenil-tetrazólio (MTT) (10mg/mL). Em seguida, foi adicionado 600 μ L de metassulfato de fenazina (PMS) (1mg/mL) e o gel foi incubado no escuro por 12 h na temperatura ambiente de 37 °C.
		Glucose desidrogenase (GDH)	Incubação do gel no escuro por 10 minutos na temperatura de 37 °C numa solução constituída por 30 mL de Tampão Tris HCL 0,05 M pH 8,0, 700 μ L de brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difenil-tetrazólio (MTT) (10mg /mL), 500 μ L de nitroblue tetrazolium (NBT) (20 mg/g), 72 mg de $CaCl_2$, 650 mg L-glutamato, 600 μ L de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) (25mg /mL). Em seguida, foi adicionado 600 μ L de metassulfato de fenazina (PMS) (1mg / mL) e o gel foi incubado no escuro por 12 h na temperatura ambiente de 37 °C.

Tabela 2. Sistemas gel/Tampão do eletrodo, condições de corrida e sistemas enzimáticos padronizados (continuação)

Sistemas de gel/ Tampão do eletrodo	Condições de corrida	Sistemas enzimáticos	Sistemas de revelação
<p>Tampão do eletrodo: 10,1 g de histidina, ácido cítrico para acertar o pH 6,1, 1L de água</p> <p>gel: 38 g de amido, 100 mL tampão eletrodo diluído 1:4, 380 mL de água</p>	120 V	Diaforese (DIA)	Incubação do gel no escuro por 10 minutos na temperatura de 37 °C numa solução constituída por 50 mL de Tampão DH (48,4g de Tris, 12,5 mL de HCL concentrado, 1L de água destilada, pH 8,4), 12,5 mg de β -NADH (β -nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida) e brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difenil-tetrazólio (MTT) (10mg /mL), 1 mg de 2,6-diclorofenol-endofenol e, em seguida, o gel foi incubado no escuro por 12 h na temperatura ambiente de 37 °C.
		Leucina Aminopeptidase (LAP)	Incubação do gel no escuro por 10 minutos na temperatura de 37 °C numa solução constituída por 25 mL de Tampão Tris maleato 0,2 M pH 6,0 (24,2 g de Tris, 23,22g de ácido maléico, 1000mL de água destilada, ajuste do pH com NaOH), 35 mg de α -leucina β -naftalamida HCL, 100 μ L de N-Dimetilformamida. Em seguida foi adicionado 40 mg de Fast Garnet e o o gel foi incubado no escuro por 12 h na temperatura ambiente de 37 °C.
		Malato desidrogenase (MDH)	Incubação do gel no escuro por 10 minutos na temperatura de 37 °C numa solução constituída por 30 mL de Tampão Tris HCL 0,1 M pH 8,0 (24,2g de Tris, 1000 mL de água, ajuste do pH com HCl 1N, diluído 1x), 10 mL de substrato de MDH (1,34g de L- Malato, 10mL de água e ajuste do pH 7,0 com Na_2CO_3), 450 μ L de β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) (25mg /mL), 450 μ L de brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difenil-tetrazólio (MTT) (10mg /mL). Em seguida, foi adicionado 350 μ L de metassulfato de fenazina (PMS) (1mg / mL) e o gel foi incubado no escuro por 12 h na temperatura ambiente de 37 °C.
		Fosfatase alcalina (ALP)	Incubação do gel no escuro por 10 minutos na temperatura de 37 °C numa solução constituída por 30 mL de Tampão Tris HCL 0,05 M pH 8,0 (24,2g de Tris, 1000 mL de água, ajuste do pH com HCl 1N, diluído 4x), 800 μ L de α -naftil fosfato, 300 μ L de α -naftil acetato, 300 μ L MgCl_2 (100 mg /mL). Em seguida, foi adicionado 40 mg de Fast Blue RR salt e o gel foi incubado no escuro por 12 h na temperatura ambiente de 37 °C.
		6-Fosfogluconato Desidrogenase (6PGD)	Incubação do gel no escuro por 10 minutos na temperatura de 37 °C numa solução constituída por 30 mL de Tampão Tris HCL 0,1 M pH 8,0 (24,2g de Tris, 1000 mL de água, ajuste do pH com HCl 1N, diluído 1x), 600 μ L de Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) (10mg /mL), 600 μ L de MgCl_2 (100 mg/mL), 600 μ L de brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difenil-tetrazólio (MTT) (10mg/mL) e 2 gotas de nitroblue tetrazolium (NBT) (20 mg/g). Em seguida, foi adicionado 600 μ L de metassulfato de fenazina (PMS) (1mg / mL) e o gel foi incubado no escuro por 12 h na temperatura ambiente de 37 °C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 10 sistemas analisados, as enzimas diaforese (DIA), leucina aminopeptidase (LAP), malato desidrogenase (MDH), fosfatase alcalina (ALP), enzima málica (ME), glucose desidrogenase (GDH) e glutamato-oxaloacetato transaminase (GOT) mostraram monomorfismo isoenzimático. Somente as enzimas fosfoglutamase (PGM), 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGD) e fosfoglucose isomerase (PGI) apresentaram variações (**Figura 2**).

Os dados obtidos foram similares, porém não iguais, ao trabalho de Telles et al. (2003). Esses autores avaliaram as enzimas 6PGD, a PGM, a LAP e a MDH. Eles verificaram que a MDH foi monomórfica e as enzimas 6PGD, PGM e LAP foram polimórficas. No presente trabalho também foi observado que a MDH foi monomórfica e as enzimas 6PGD e PGM mostraram polimorfismos. No entanto, não foram detectados polimorfismos na enzima LAP nas amostras analisadas.

O baixo nível de polimorfismos encontrado não era o resultado esperado para *A. crassiflora*. *Annona* é caracterizado por forte dicogamia, com quase nenhuma sobreposição das fases feminina e masculina (Gottesberger 1989), havendo grande possibilidade de ocorrer fecundação cruzada. Esse processo certamente pode influenciar a estrutura genética de uma espécie, permitindo maior diversidade genética entre populações. No entanto, no presente trabalho os padrões isoenzimáticos não mostraram alta variabilidade genética para a espécie estudada.

O mecanismo de dispersão das sementes é também um dos principais fatores ecológicos que podem contribuir para estruturação genética de uma espécie. A dispersão restrita dos genes resultante da capacidade limitada da dispersão das sementes em curta distância tem sido considerada a principal razão da estruturação espacial dos genótipos (Blanco et al. 2007). No entanto, o mecanismo de dispersão de sementes da *A. crassiflora* parece não restringir o fluxo gênico entre as populações.

A dispersão das sementes em *A. crassiflora* ocorre por zoocoria (Lorenzi e Matos 2002). Golin (2008) verificou que dentre vários animais que se alimentam dos frutos dessa espécie, a anta (*Tapirus terrestris*) é a espécie que mostra maior frequência de visitaço e de consumo, seguida de outros vertebrados como o lobete (*Cerdocyon thous*), o tatu (*Dasypus* sp.), o veado catingueiro (*Mazama gouazoubira*), lobo-guar (*Chrysocyon brachyurus*) e a gralha-do-campo (*Cyanocorax cristatellus*) (Jcomo 2004).

A anta o maior mamfero frugvoros do Brasil (Eisenberg e Redford 1999). Os frugvoros de grande porte tendem a dispersar grande quantidade e variedade de sementes para locais distantes da planta-me e, com isso, parecem influenciar bastante os processos ecolgicos da comunidade (Fragoso e Huffman 2000).

Figura 2. Exemplos de géis de isoenzimas. a) Padrões polimórficos: PGI e PGM, e b) Padrões monomórficos: LAP, MDH, ALP. As setas indicam as regiões de migração (bandas). Os nomes na parte superior no canto esquerdo indicam as enzimas. Os nomes abaixo do gel indicam as diferentes populações.

Além das características de biologia reprodutiva, não era esperado encontrar baixo nível de polimorfismos, principalmente, nas quatro populações de *A. crassiflora* provenientes de áreas protegidas (Brasília - Distrito Federal, Belo Horizonte – Minas Gerais, Pedro Antonio – São Paulo e Mogi-Guaçu – São Paulo). Essas áreas de cerrado são distantes geograficamente e apresentam diferentes condições climáticas e microclimáticas, o que tende a possibilitar maior divergência genética.

Duas hipóteses podem ser levantadas para explicar o baixo nível de polimorfismos verificado em *A. crassiflora*. A primeira aponta a ineficiência da técnica de isoenzimas para acessar a diversidade genética dessa espécie, a outra considera que o excesso de homozigose (indicado pelo baixo nível de variabilidade nas isoenzimas) seria um indicativo do processo de erosão genética nessa espécie, possivelmente relacionado à degradação do seu habitat (cerrado).

A primeira possibilidade pode ocorrer visto que, apesar dessa técnica já ter sido empregada para muitos estudos relacionados à caracterização genética de populações de muitas espécies, há relatos na literatura que apontam que as isoenzimas foram ineficientes para essa finalidade para várias outras, como por exemplo em espécies de *Digitaria* (Adoukounou et al. 2007) e espécies do *Borderea* (Segarra-Moragues e Catalán 2003).

Esse monomorfismo isoenzimático pode ocorrer devido a algumas limitações da técnica. Embora as isoenzimas sejam consideradas marcadores seletivamente neutros, o nível de polimorfismo possui um limite, uma vez que essas enzimas possuem a mesma função metabólica. O método se limita às enzimas solúveis e somente são detectadas as substituições de aminoácidos que resultam em diferenças na mobilidade da proteína durante a eletroforese (Stuber e Goodman 1983).

Outra possibilidade para explicar o monomorfismo isoenzimático observado em *A. crassiflora* é que esse resultado pode ser um indicativo de que as populações dessa espécie estão sofrendo erosão gênica. Isto pode ser muito provável, considerando as interferências antropogênicas que ocorreram nos últimos anos.

É bem conhecido que a fragmentação do habitat, por perda ou conversão, gerada por diferentes tipos de atividades humanas, pode diminuir o nível de fluxo gênico, reduzir o tamanho efetivo das populações de uma espécie numa região (Fahring 2003), provocar a perda de diversidade e aumentar a deriva genética e a depressão por endogamia (Young et al. 1996). A análise da diversidade genética do baru (*Dipteryx alata*), uma espécie do cerrado, mostrou que há maior descontinuidade genética entre populações de regiões que têm sofrido recente expansão sócio-econômica e aumento da densidade populacional (Soares et al. 2008).

Ao longo prazo, a perda da variabilidade genética dentro de uma espécie pode diminuir sua habilidade de adaptação (Poschlod 1996). Essa espécie pode se tornar ameaçada por ser mais vulnerável a novas mudanças evolutivas impostas, por exemplo, por doenças, competição ou mudanças nas condições ambientais (Ellstrand e Ellam 1993). Esses processos podem conduzir as populações à extinção, pois aquelas com baixos níveis de diversidade acabam sucumbindo à pressão da seleção natural (Blanco et al. 2007).

Blanco et al. (2007) observaram que, apesar da alta variação genética presente em algumas populações de *A. crassiflora* de Goiás, algumas parecem mostrar um iminente processo de diferenciação como resultado provável da fragmentação pelo qual o cerrado vem passando nos últimos 60 anos. Isso pode ser uma consequência genética da fragmentação do habitat, resultando no isolamento das populações e na mudança do nível de fluxo gênico (Young et al. 1996).

Como dito anteriormente, foram detectados polimorfismos em apenas três sistemas enzimáticos (PGM, 6PGD e PGI) (**Figura 2**). Segundo Robinson (1991) para se descrever a variabilidade genética em determinada espécie é importante utilizar muitos locos, sendo recomendado vinte ou mais. Telles et al. (2003), apesar de detectar polimorfismos em somente três sistemas enzimáticos (PGM, 6PGD e LAP) descreveram a divergência genética entre seis populações de dois municípios de Goiás estimando a porcentagem de locos polimórficos em 80%. No entanto, esses mesmos autores ressaltam que esse valor deve ser considerado com reserva, devido ao pequeno número de locos amostrados.

Muitos trabalhos têm utilizado as enzimas PGM e PGI para descrever a estrutura genética de algumas espécies, apoiados sempre por polimorfismos observados em outras enzimas (Quesada et al. 2002, Perfectti e Pascal 2005) já que ambas apresentam limitações.

A PGM e a PGI são fosfatases que frequentemente são encontradas na parte externa da célula, têm funções generalizadas e respondem diretamente à diversidade ambiental. A enzima PGI pode apresentar padrões complexos em que tanto genótipos homozigotos quanto heterozigotos têm bandas múltiplas (Quesada et al. 2002). O sistema fosfoglucomutase (PGM) é controlado por pelo menos seis locos, alguns com alelos múltiplos, outros com alelos nulos e, ainda, com alelos cuja expressão é influenciada por outros locos (Stuber e Goodman 1983). Devido a esses fatores, essas enzimas geralmente mostram alto nível de polimorfismos (Robinson 1991), aumentando a possibilidade de erros na interpretação dos zimogramas.

Dessa forma, não seria recomendável analisar a estrutura genética de *A. crassiflora* com base somente nas três enzimas que mostraram variações, especialmente sendo duas delas a PGM e a PGI. A

análise proposta seria bastante inconsistente devido ao baixo número de locos e as limitações intrínsecas dos sistemas enzimáticos.

Considerando todos esses aspectos é necessário utilizar outros marcadores genéticos para confirmar a homogeneidade mostrada pelas isoenzimas. Na literatura foi relatado o uso de marcadores como microssatélites (Pereira et al. 2008) e o seqüenciamento da região *trnL* do DNA do cloroplasto (Blanco et al. 2007) para caracterização genética de populações de *Annona crassiflora*.

Quanto aos microssatélites, um conjunto de 10 pares de iniciadores foi desenvolvido, mostrando-se altamente informativo e uma ferramenta potente para desenvolver estudos sobre o padrão genético de *A. crassiflora* (Pereira et al. 2008).

Blanco et al. (2007) não observaram correlação entre distâncias genéticas e geográficas entre as populações de *A. crassiflora*, sugerindo ausência de fluxo gênico atual entre elas. Além disso, dentre as populações amostradas de Goiás foram identificadas desde aquelas em bom estado de conservação genética, ou seja, com alto nível de heterozigose, até populações com baixíssimos níveis de diversidade (Blanco et al. 2007). Assim como há populações de *A. crassiflora* do estado de Goiás que tem baixo nível de diversidade genética, pode haver mais populações em todo o cerrado em território brasileiro que também estejam ameaçadas.

Cabe ressaltar que ambos os estudos de Blanco et al. (2007) e Pereira et al. (2008) foram restritos a análise de populações somente de Goiás. Apesar de não ter sido possível apresentar respostas conclusivas quanto à estrutura genética da *A. crassiflora*, os resultados obtidos foram bastante relevantes. É fundamental utilizar outro marcador genético para confirmar qual é a estrutura genética dessa espécie, de acordo com sua ampla distribuição no cerrado que ocorre em praticamente todo o Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADOUKONOU-SAGBADJA H, WAGNER C, DANSI A, AHLEMEYER J, DAÏNOU O, AKPAGANA K, ORDON F, FRIEDT W (2007) Genetic diversity and population differentiation of traditional fonio millet (*Digitaria* spp.) landraces from different agro-ecological zones of West Africa. *Theoretical and Applied Genetics* 115, 917–931.
- ALFENAS, AC (1998) *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos*. Viçosa, MG: UFV.
- ALMEIDA SP, PROENÇA CEB, SANO SM, RIBEIRO JF (1998) *Cerrado: espécies vegetais úteis*. Embrapa CPAC, Planaltina.

- BLANCO AJV, PEREIRA MF, COELHO ASG, CHAVES LJ (2007) Diversidade genética em populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart.) por meio da análise de seqüências de cpdna. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 37(3),169-175.
- EISENBERG JF e REDFORD KH (1999) *Mammals of the Neotropics. The Central Neotropic, Ecuador, Peru, Bolívia, Brazil*. Vol. III. University of Chicago Press, Chicago.
- ELLSTRAND NC e ELLAM DR (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24, 217-242.
- EPPERSON BK (1990) Spatial patterns of genetic variation within plant populations *In*: BROWN AHD, CLEGG MT, KAHLER AL, WEIR BS (eds.) *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*. Sinauer Associates, Sunderland.
- FAHRING L (2003) Effects of fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 34,487–515.
- FELFILI JM (2002) Padrões de Diversidade do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro. *In*: ARAÚJO EL, MOURA NA, SAMPAIO EVSB, GESTINARI LMS, CARNEIRO JMT (eds). *Biodiversidade, conservação e uso sustentável da Flora do Brasil*. Universidade Federal Rural de Pernambuco/Imprensa Universitária, Recife.
- FERREIRA ME e GRATTAPAGLIA D (1996) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2ª ed., Embrapa/Cenargen, Brasília.
- FRAGOSO JMV e HUFFMAN JM (2000) Seed-dispersal and seedling recruitment patterns by the last Neotropical megafauna element in Amazonia, the Tapir. *Journal of Tropical Ecology*, 16,369-385.
- JÁCOMO ATA, LEANDRO S e DINIZ-FILHO JAF (2004) Niche separation between the maned-wolf *Chrysocyon brachyurus*, the crab-eating fox *Dusicyon thous* and the hoary fox *Dusicyon vetulus* in central Brazil. *Journal of Zoology*, 262,99-106.
- GOLIN V (2008) Frugivoria e dispersão de sementes de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) por animais em área de cerrado matogrossense. Dissertação de Mestrado. Universidade do Estado de Mato Grosso.
- GOTTESBERGER G (1989) Comments on flower evolution and beetle pollination in the genero *Annona* and *Rollinia* (Annonaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 167, 189-194.
- LORENZI H (1998) *Árvores brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. VI. 2, Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA., São Paulo.
- LORENZI H e MATOS FJA (2002) *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, Nova Odessa.

- MYERS N, MITTERMEIER RA, MITTERMEIER CG, FONSECA GAB e KENT J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853-858.
- PEREIRA MF, BANDEIRA LF, BLANCO AJ, CIAMPI VAY e COELHO ASG (2008) Development of microsatellite markers in *Annona crassiflora* Mart., a Brazilian Cerrado fruit tree species. *Molecular Ecology Resources*, 8, 1329–1331.
- PERFECTTI F e PASCUAL L (2005) Genetic diversity in a worldwide collection of cherimoya cultivars. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52: 959–966.
- POSCHLOD P (1996) Das Metapopulationskonzept—eine Betrachtung aus pflanzenökologischer Sicht. *Z. Ökologie u. Naturschutz*, 5, 161–185.
- QUESADA T, LOBO J e ESPINOZA, M (2002) Isozyme diversity and analysis of the mating system of the wild rice *Oryza latifolia* Desv. in Costa Rica. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 49, 633–643.
- RATTER JA, BRIDGEWATER, S e RIBEIRO, JF (2006) Biodiversity Patterns of woody cerrado vegetation: an overall view. In: PENNINGTON RT, LEWIS GP e RATTER JA ed. *Neotropical savanas and seasonally dry forests. Plant diversity, biogeography and conservation*. CRC Press, Florida.
- ROBINSON IP (1991) Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS AC *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins*. Viçosa: Editora EFV, Viçosa.
- SEGARRA-MORAGUES JG e CATALÁN P (2003) Life history variation between species of the relictual genus *Borderea* (Dioscoreaceae): phylogeography, genetic diversity, and population genetic structure assessed by RAPD markers. *Biological Journal of the Linnean Society*, 80, 483–498.
- SUN M e GARDERS FR (1990) Outcrossing rates and allozyme variation in rayed and rayless morphs of *Bidens pilosa*. *Heredity*, 64, 139–143.
- SOARES TN, CHAVES LJ, TELLES MPC, DINIZ-FILHO JAF e RESENDE LV (2008) Landscape conservation genetics of *Dipteryx alata* (“baru” tree: Fabaceae) from Cerrado region of central Brazil. *Genetica*, 132, 9–19.
- STUBER CW e GOODMAN MM (1983) Inheritance, intracellular localization and genetic variation of phosphoglucumutase isozymes in maize (*Zea mays* L.). *Biochemical genetics*, 21, 667-689.
- TELES MPC, COELHO ASG, VALVA FD e BANDEIRA LF (2003) Caracterização genética de populações naturais de *Araticum* (*Annona crassiflora* Mart. - Annonaceae) no Estado de Goiás. *Revista Brasileira de Botânica*, 26, 123-129.
- YOUNG A, BOYLE T e BROWN T (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution*, 11, 413–418.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dada a escala de degradação do cerrado ocorrida no passado, um dos principais desafios atuais é encontrar alternativas sustentáveis para sua melhor utilização. Para tanto é fundamental conhecer os recursos naturais existentes. Há um enorme potencial não madeireiro no cerrado, onde estão presentes inúmeras espécies vegetais com potencial de aproveitamento econômico, porém para a maioria ainda faltam estudos. O planejamento para manejo sustentável depende dos tipos de recursos locais e do valor dos produtos.

Neste sentido, os dados obtidos no presente trabalho permitiram ampliar os conhecimentos relacionados ao potencial de uso de *Annona crassiflora* no que se refere às suas propriedades nutricionais e medicinais.

A análise da polpa mostrou alto potencial de uso com relação ao teor e composição de aminoácidos livres e o dos carboidratos solúveis. A análise da polpa mostrou alto potencial de uso com relação ao teor e composição de aminoácidos livres e os carboidratos solúveis. As sementes poderiam ser sugeridas como bioproduto de *A. crassiflora*, ainda completamente não explorado, por conterem alto teor de lipídeos e de aminoácidos livres com características bastante interessantes. O teor e o perfil de alcalóides identificados nas folhas de *A. crassiflora* apontam para possíveis usos medicinais dessas espécies, o que já é feito pela população local.

Outro aspecto importante relacionado aos parâmetros químicos analisados em *A. crassiflora*, exceto para os lipídeos totais, é a ampla variação do teor desses metabólitos entre as amostras provenientes de diferentes regiões geográficas. Uma grande variação de caracteres químicos aponta para uma ampla plasticidade fenotípica nessa espécie. Esses dados são interessantes para auxiliar na identificação de fenótipos mais promissores, no sentido de produzir maior ou menor quantidade de substâncias de interesse econômico. Esse tipo de avaliação pode beneficiar programas de melhoramento e conservação do germoplasma de *A. crassiflora* e espécies correlacionadas.

Além da caracterização química foi feita uma avaliação da estrutura genética de diferentes populações de *A. crassiflora*, utilizando marcadores isoenzimáticos. No entanto, foi verificado alto nível de monomorfismos. Duas hipóteses podem ser levantadas para explicar o baixo nível de polimorfismos verificado em *A. crassiflora*. A primeira aponta a ineficiência da técnica de isoenzimas para acessar a diversidade genética dessa espécie, a outra considera que o excesso de homozigose (indicado pelo baixo nível de variabilidade nas isoenzimas) seria um indicativo do processo de erosão genética nessa espécie,

possivelmente, relacionado à degradação do seu habitat (cerrado). Considerando esses aspectos é necessário utilizar outros marcadores genéticos para verificar se os mesmos também confirmariam a homogeneidade mostrada pelas isoenzimas.

Para estabelecer medidas de conservação é necessário compreender qual o nível de integridade ecológica e genética das espécies nativas de acordo com a localização geográfica no bioma, além do valor econômico. Nos últimos anos tem sido reconhecido que para atingir a condição de sustentabilidade nesse bioma é necessário elaborar planos de ação não generalistas e sim regionais. Todo esforço de planejamento deve ser concentrado no reconhecimento dos recursos naturais em microrregiões.

Apesar de não ter sido possível apresentar respostas conclusivas quanto à estrutura genética de *A. crassiflora*, vale salientar que é fundamental obter dados sobre variações fenotípicas e genotípicas relacionadas a diferentes áreas de distribuição geográfica. Essas informações podem auxiliar no entendimento sobre o potencial adaptativo de *A. crassiflora* em resposta às características diversas observadas no bioma cerrado, que é altamente heterogêneo.

As informações adquiridas para *A. crassiflora* adicionadas a dados de outras espécies desse bioma podem atender as possíveis peculiaridades de cada região do cerrado, podendo subsidiar adequadamente o planejamento para definição de unidades de conservação em áreas públicas, bem como a restauração de áreas degradadas. Além disso, em áreas particulares, esses dados podem ser utilizados para orientar os proprietários rurais para o melhor uso dos recursos naturais para fins produtivos e ao mesmo tempo conservacionistas, conforme é determinado pela Lei.

Diante do exposto, os dados obtidos no presente trabalho sugerem formas de agregar mais valor econômico e ecológico à *A. crassiflora* e podem proporcionar uma base para o uso mais eficiente e racional dos recursos dessa espécie, contribuindo para exploração sustentável do cerrado, o que permite também o desenvolvimento de comunidades locais.

RESUMO GERAL

A *Annona crassiflora* Mart. é uma espécie frutífera nativa do cerrado que possui alto potencial de uso e ampla distribuição. O presente trabalho tem os seguintes objetivos: identificar e quantificar aminoácidos livres, carboidratos solúveis e ácidos graxos da polpa e das sementes, visando ampliar os conhecimentos sobre potencial econômico de *A. crassiflora*; avaliar qual o nível de variações quantitativas e qualitativas de alcalóides de *A. crassiflora* de amostras provenientes de diferentes regiões do cerrado; avaliar qual a magnitude da diversidade genética entre diferentes populações de *A. crassiflora*, utilizando marcadores isoenzimáticos. Com relação às propriedades nutricionais, as análises de aminoácidos livres, carboidratos e lipídeos foram feitas por CLAE/F, por CLAE/CTI - DPA e por CG/EM, respectivamente. O teor total de aminoácidos livres na polpa variou de 1101,99 µg/g a 1975,7 µg/g de massa seca, enquanto nas sementes variou de 636,3 µg/g a 17.445,83 µg/g de massa seca. A glutamina foi majoritária em todas as amostras. O teor total dos carboidratos solúveis da polpa variou de 11,5 g/100g a 17,03 g/100g e das sementes variou de 13,69 g/100g a 40,47 g/100g de matéria seca. Foram detectadas a frutose, a glicose e a sacarose em todas as amostras de polpa e de sementes. A quantidade de lipídeos totais da polpa variou de 7g/100g a 16,2 g/100g de massa seca e das sementes variou de 34,36 g/100g a 35,98 g/100g de massa seca. O ácido oléico e/ou petroselinico (18:1) foram majoritários em todas as amostras de polpa e de sementes de diferentes origens geográficas. Certamente os dados obtidos permitiram ampliar os conhecimentos sobre potencial de aproveitamento dessa espécie. Para avaliar a magnitude da variação dos alcalóides das folhas de *A. crassiflora*, a quantificação e identificação dos alcalóides foram feitas, respectivamente, por CG/FID e CG/EM. Foi verificado que o teor total de alcalóides variou de $221,1 \pm 17,14$ µg/g a $2986,89 \pm 367,1$ µg/g de massa seca. Foram identificados os alcalóides anonaína, anoretina, romucosina e xilopina que mostraram diferenças entre as regiões. Essa variação na concentração e no perfil alcaloídico das populações de *A. crassiflora* sugere ampla plasticidade fenotípica desses metabólitos em resposta a fatores bióticos e/ou abióticos, além de alta variabilidade genética relacionada à expressão dos genes envolvidos na biossíntese desses metabólitos. A avaliação da estrutura genética foi feita através da análise isoenzimática. Os dados isoenzimáticos mostraram baixa variabilidade genética. Duas hipóteses são apontadas para explicar o baixo nível de polimorfismos verificado em *A. crassiflora*, uma delas relacionada à técnica e outra relacionada ao próprio processo de degradação do ambiente. Diante do exposto, os dados obtidos no presente trabalho sugerem formas de agregar mais valor econômico e ecológico à *A. crassiflora* e podem proporcionar uma base para o uso mais eficiente e racional dos recursos dessa espécie, contribuindo para exploração sustentável do cerrado, o que permite também o desenvolvimento de comunidades locais.

ABSTRACT

Annona crassiflora Mart. is a native fruit tree species from the 'cerrado', possessing high use potential and a wide distribution. The proposed aims were to identify and quantify free amino acids, free sugars and fatty acids in the pulp and seeds of this plant, with a view to widening knowledge on economical potentiality, as well as to evaluate the level of alkaloid quantitative and qualitative variation in samples coming from different regions of the 'cerrado, and finally define the size of genetic diversity among these different populations by using isoenzymatic markers. As to nutritional properties, analyses of free amino acids, free sugars and fatty acids were undertaken with, respectively, CLAE/F, CLAE/CTI – DPA and CG/MS. The total rate of free amino acids in the pulp varied from 1101,99 ug/g to 1975,7 ug/g of dry mass, whereas in the seeds this variation was from 636,3 ug/g to 17.445,83 µg/g. Glutamin was preponderant in all the samples. Total free sugar rate in pulp varied from 11,5 g/100g to 17,03 g/100g and in seeds from 13,69 g/100g to 40,47 g/100g of dry matter. Fructose, glucose and sacarose was detected in all samples. The amount of total lipids in pulp varied from 7 g/100g to 16,2 g/100g of dry weight and in seeds from 34,36 g/100g to 35,98 g/100g. Oleic and/or petroselinic acids (18:1) were the most abundant in all pulp and seed samples from the different geographic regions. The obtained results certainly permit widening knowledge on the potentiality for use of this plant species. In order to evaluate the size of alkaloid variation in *A. crassiflora* leaves, alkaloid quantification and identification was done with, respectively, CG/FID and and CG/EIMS. It was noted that the total alkaloid rate varied from $221,1 \pm 17,14$ ug/g to $2986,89 \pm 367,1$ ug/g of dry mass. The alkaloids anonain, anoretin, romucosin and xilopin were identified, these showing differences among regions. This variation in alkaloid concentration and profile in *A. crassiflora* populations suggests the wide phenotypic plasticity of these metabolites in response to biotic and/or abiotic factors, besides high genetic variability related to gene expression of those involved in their biosynthesis. Genetic structure evaluation was done through isoenzymatic analysis. Isoenzymatic data revealed low genetic variability. Two hypotheses may be raised to explain this low polymorphism level. The first points to inefficient isoenzymatic techniques in reckoning species genetic diversity, whereas the second takes into consideration that excessive homozygosis (indicated by the low level of isoenzymatic variability) could be an indication of the process of species genetic erosion, possibly related to habitat ('cerrado') degradation. In view of this, data obtained in the present study suggest forms of aggregating additional economical and ecological value to *A. crassiflora*, and could furnish a base for the more efficient and rational use of resources from this species, thus contributing to sustainable exploitation of the "cerrado", and also allowing for local community development.