PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS RELACIONADOS COM A RESISTÊNCIA DE *Psidium spp.* AO NEMATOIDE *Meloidogyne enterolobii*

SARA NÁLLIA DE OLIVEIRA COSTA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES
MARÇO - 2021

PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS RELACIONADOS COM A RESISTÊNCIA DE *Psidium spp.* AO NEMATOIDE *Meloidogyne enterolobii*

SARA NÁLLIA DE OLIVEIRA COSTA

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Kátia Valevski Sales Fernandes

Coorientadora: Dra. Juliana Martins Ribeiro
(Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa
Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semiárido –
Embrapa Semiárido)

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES
MARÇO - 2021

FICHA CATALOGRÁFICA
UENF - Bibliotecas
Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

C837 Costa, Sara Nállia de Oliveira.

Prospecção de metabólitos secundários relacionados com a resistência de *Psidium* spp. ao nematoide *Meloidogyne enterolobii*. / Sara Nállia de Oliveira Costa. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

96 f. : il.
Bibliografia: 14 - 44.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2021.
Orientadora: Katia Valevski Sales Fernandes.

1. Goiabeira. 2. Araçazeiro. 3. Meloidoginose. 4. Metabólitos secundários. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS RELACIONADOS COM A RESISTÊNCIA DE *Psidium spp.* AO NEMATOIDE *Meloidogyne enterolobii*

SARA NÁLLIA DE OLIVEIRA COSTA

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 10 de março de 2021.

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Olga Lima Tavares Machado (Membro interno - UENF)

Dr. Antônio Jesus Dorighetto Cogo (Membro interno - UENF)

Prof. Dr. Márcio dos Santos Teixeira Pinto (Membro externo - UFT)

Profa. Dra. Kátia Valevski Sales Fernandes - Orientadora

Dra. Juliana Martins Ribeiro - Coorientadora

10

Governo do Estado do Rio de Janeiro
Secretaria de Estado de Ciência e Tecnologia
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
SECRETARIA ACADÊMICA/REITORIA

DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: Sara Nállia de Oliveira Costa Matrícula: 201912120015

Programa: Biociências e Biotecnologia

Orientador: Katia Valevski Sales Fernandes

Area/Linha: Biologia Celular/Biologia Vegetal, Bases Bioquímicas e Moleculares de Defesa de Plantas

Título: Prospecção de metabólitos secundários relacionados com a resistência de *Psidium* spp. ao nematoide *Meloidogyne enterolobii*.

Resultado final:

APROVADO [X] REPROVADO [ ] Data da defesa: 10/03/2021

Resultado final adiado em razão de:

MODIFICAÇÕES [ ] NOVA DEFESA [ ] Prazo:_____(3 a 6 meses)

Banca examinadora:

Membro	**Título**	**Assinatura**
Katia Valevski Sales Fernandes (Presidente)	D.Sc.	
Antônio Jesus Dorighetto Cogo	D.Sc.	
Juliana Martins Ribeiro	D.Sc.	
Márcio dos Santos Teixeira Pinto	D.Sc.	
Olga Lima Tavares Machado	D.Sc.	

Observações:

A participação dos professores Katia Valevski Sales Fernandes, D.Sc., Juliana Martins Ribeiro, D.Sc., Olga Lima Tavares Machado, D.Sc., Antônio Jesus Dorighetto Cogo, D.Sc. e Márcio dos Santos Teixeira Pinto, D.Sc. aconteceu por videoconferência segundo Resolução CPPG 01/2016.

Em____/____/_____

Arnoldo Rocha Facanha

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

Av. Alberto Lamego, 2000 - Parque Califórnia - Campos dos Goytacazes/RJ - 28013-602
Tel.: (22) 27486039 - correio eletrônico: secretariaacademica@uenf.br

Com amor, aos meus ancestrais
que abriram os caminhos.

Agradecimentos

À maior força do universo, por me permitir errar, aprender e crescer, por me ensinar compreensão e tolerância na construção do meu caminho, mantendo viva a fé em mim;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos nos anos de Curso do mestrado;

Ao Programa de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro por oportunizar o estudo e o desenvolvimento da Ciência;

À Professora Kátia, pela orientação, competência, profissionalismo e dedicação tão importantes;

À Pesquisadora Juliana, pela coorientação, conhecimento compartilhado, afeto e empatia. Não teria chegado neste ponto sem o seu apoio;

Ao Pesquisador José Mauro da Cunha e Castro e a EMBRAPA Semiárido pela colaboração com o fornecimento das plantas *Psidium* spp. para este estudo;

À Professora Michelle Muzitano, Professor Rafael Garret e Marcos Vinicius Toledo, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela colaboração com as análises metabolômicas em LC-MS;

Ao Professor Humberto Ramos, da Universidade Federal de Viçosa, pelos conhecimentos compartilhados no tratamento de dados e identificação de substâncias químicas;

Aos membros da banca examinadora que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação;

À minha mãe Dina Amélia e ao meu irmão Leonardo por sonharem comigo que esta realização seria possível;

Ao meu parceiro e incentivador, Allan. Eu te quero bem, tanto e tanto;

Ao meu sobrinho Benício, por me ensinar amor sensível e incondicional;

Aos meus amigos: Adriana, Sara, Mariana e Bruno, por sempre se orgulharem das minhas conquistas, por não soltarem minha mão e serem a família que eu escolhi.

Juntas, serão uma força.
(Bertha Lutz)

RESUMO

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) pertence à família Myrtaceae e é uma espécie tropical da América do Sul, considerada a 11ª fruteira de maior importância econômica no Brasil. Seu fruto pode ser consumido *in natura* e em diversos produtos derivados. Há também interesse da farmacologia em seu potencial biotecnológico, a partir de relatos de atividades bioativas. Entretanto, interações sinérgicas entre o nematoide *Meloidogyne enterolobii* e o fungo *Fusarium solani*, ocorrentes nas raízes destas plantas, acarretam uma sintomatologia que decorre na formação de galhas e apodrecimento das raízes. Araçazeiros *P. guineense* e *P. cattleianum* já foram identificados como sendo resistente e imune, respectivamente, ao nematoide. Neste contexto, este trabalho objetivou realizar uma comparação dos perfis metabolômicos, a partir de amostras de raízes de *P. guajava*, *P. cattleianum* e *P. guineense*, infectadas e não infectadas por *M. enterolobii*, visando a prospecção de metabólitos secundários, como recursos bioquímicos com potencial ao controle do nematoide, através da espectrometria de massas acoplada a cromatografia em fase líquida (LC-MS). Os resultados encontrados indicaram que os metabólitos secundários alterados após a infecção, produzidos ou suprimidos, são, em sua maioria, de natureza química polar com agrupamentos diferencialmente produzidos de taninos hidrolisáveis e lignanas nas espécies *P. guineense* e *P. cattleianum*. Também foi identificado um agrupamento de substâncias apolares, da classe dos terpenos. Foi possível observar que o metaboloma das espécies passou por regulação após a infecção, mostrando que a técnica da análise metabolômica é bastante promissora nos avanços à descoberta sobre a resistência ao nematoide. No entanto, estudos complementares ainda são necessários para aprofundar todo o universo de alterações induzidas pela interação com o nematoide.

Palavras-chave: Goiabeira; Araçazeiro; Meloidoginose; Metabólitos secundários.

ABSTRACT

Guava tree (*Psidium guajava* L.) belongs to the Myrtaceae family and is a tropical species from South America, considered the 11th fruit tree of greatest economic importance in Brazil. Its fruit can be consumed in natura and in several derived products. There is also an interest in pharmacological biotechnological potential, based on reports of its bioactive activities. However, synergistic interactions between the nematode *Meloidogyne enterolobii* and the fungus *Fusarium solani*, occurring in the roots of these plants, cause a symptom that results in the formation of galls and rotting of the roots. *P. guineense* and *P. cattleianum* have already been identified as being resistant and immune species, respectively, to the nematode. In this context, this work aimed to make a comparison of the metabolomic profiles, from samples of roots from *P. guajava*, *P. cattleianum* and *P. guineense*, infected and not infected by *M. enterolobii*, aiming at the prospecting of secondary metabolites as resources biochemicals with the potential to control the nematode, through mass spectrometry coupled to liquid chromatography (LC-MS). The results obtained indicate that the secondary metabolites modified after infection, either produced or suppressed, are mostly of a polar chemical nature with differentially expressed groupings of hydrolysable tannins and lignans in the species *P. guineense* and *P. cattleianum*. A grouping of nonpolar substances, of the terpene class, were also identified. It was possible to observe that the metabolome of the species went through regulation after the infection, revealing that the technique of the metabolomic analysis is very promising in the advances for the discovery of the resistance to the nematode. However, further studies are still needed to deepen the entire set of changes induced by the nematode infection.

Keywords: Guava tree; Brazilian guava tree; Meloidoginosis; Secondary.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – *P. guajava* cv. Paluma (A) e seu fruto (B) (Watanabe, 2007).....14
Figura 2 - Estruturas químicas de fitoquímicos isolados de folhas de *P. guajava*: quercetina e glicosídeos (A); e ácidos triterpênicos (B) (Ngbolua *et al.*, 2018)...15
Figura 3 - Estrutura química para nove triterpenoides de *P. guajava* (Chao *et al.*, 2020). 16
Figura 4 - Representações gráficas obtidas pelos Bancos de Tabelas Estatísticas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) com comparação do crescimento, nos últimos 10 anos (2010 – 2019), do agronegócio nacional da goiaba: Área plantada ou destinada à colheita (hectares) (A), Área colhida (hectares) (B), Quantidade produzida (toneladas) (C) e Valor da produção (mil reais) (D) ("Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA", 2020).....17
Figura 5 - Mapa global da densidade de nematoides do solo na escala de pixels de 30 arco-segundo (aproximadamente 1 km^2). Número de nematoides por 100 g de solo seco (Hoogen *et al.*, 2019). 19
Figura 6 - Estratégias de infecção de nematoides parasitas de plantas (NPPs) (Sato, Kadota e Shirasu, 2019). 20
Figura 7 - Modelo esquemático do ciclo de vida dos nematoide-das-galhas, *Meloidogyne* spp. (Ibrahim *et al.*, 2019).....22
Figura 8 - Espécies de *Psidium*: *P. guineense* (A) (Emmanoel *et al.*, 2013) e *P. cattleianum* (B) (Franzon e Sousa-Silva, 2009). 23
Figura 9 – Campo experimental de Bebedouro da Embrapa Seminário (Petrolina - PE): 'BRS Guaraçá' com 10 anos de plantio após cruzamento (A) e cultivo de goiabeiras e araçazeiros (B). Em destaque, à direita, goiabeira sem o porta-enxerto com sintomas de deficiência nos tecidos vegetais (B). Fonte: (Autoria própria). 24
Figura 10 – O reconhecimento de ascr #18 derivado de nematoides ativa a imunidade acionada por padrão (PTI) em plantas, semelhante aos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) derivados de outros micro-organismos (Manohar *et al.*, 2020).....28
Figura 11 - Esquema das vias induzidas durante a resposta da planta à infecção por nematoides (Przybylska e Obrępalska-Stęplowska, 2020). 29

Figura 12 - Compostos de baixo peso molecular em plantas são funcionalmente classificados como metabólitos primários, metabólitos secundários ou hormônios (Erb e Kliebenstein, 2020). 31
Figura 13 - Esquema geral das vias de biossíntese do metabolismo vegetal secundário e suas conexões com o metabolismo primário (Dewick, 2015). 33
Figura 14 – Esquema da via biossintética do acetato-malonato (Dewick, 2015).....35
Figura 15 - Esquema da via biossintética do chiquimato (Dewick, 2015). 37
Figura 16 - Biossíntese dos flavonoides, estilbenos e taninos condensados pelas vias do chiquimato e acetato-malonato (adaptado de Dewick, 2015; Estévez e Estévez, 2012) 39
Figura 17 - Esquema das vias MVA e MEP na biossíntese dos terpenos (adaptado de Dewick, 2015). 41
Figura 18 - Esquema da biossíntese dos aminoácidos precursores dos metabolitos nitrogenados (Lehninger e Nelson, 2018). 43
Figura 19 - Ordem crescente de polaridade dos solventes químicos utilizados na extração dos metabólitos. 48
Figura 20 – Dendrogramas para comparação do perfil analítico das extrações com solventes diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH): *P. guajava* (A), *P. guineense* (B) e *P.* cattleianum (C). Em verde tem-se as amostras sem infecção ao nematoide (controle) e vermelho após 20 dias de infecção ao *M. enterolobii*. Gráficos obtidos após tratamento de dados no XCMS Online e gerados no Software MetaboloAnalyst. 50
Figura 21 – Representações gráficas de redes moleculares (*molecular networking*) obtidas por análise de dados em *Cytoscape* destacando os agrupamentos A, B C e D diferencialmente expressos das espécies resistente e imune; diamante – apenas controle; elipse – apenas após 20 dias de infecção; hexágono – em amostras controle e após 20 dias de infecção; amarelo – *P. cattleianum*; rosa – *P. guajava*; alaranjado claro – *P. guineense*; verde – *P. cattleianum* e *P. guajava*; vermelho – *P. guineense* e *P. cattleianum*; alaranjado escuro – *P. guineense* e *P. guajava*; e cinza – para as três espécies *Psidium*; os números mostrados nos nodos referem-se à massa molecular da respectiva substância química. 51
Figura 22 – Representações gráficas de redes moleculares (*molecular networking*) dos agrupamentos: A - substâncias 1 a 7, B – substâncias 8 a 11, C – substâncias 12 a 15, D – substâncias 16 a 40; diamante – apenas controle; elipse – apenas

após 20 dias de infecção; hexágono – em amostras controle e após 20 dias de infecção; amarelo – *P. cattleianum*; rosa – *P. guajava*; alaranjado claro – *P. guineense*; verde – *P. cattleianum* e *P. guajava*; vermelho – *P. guineense* e *P. cattleianum*; alaranjado escuro – *P. guineense* e *P. guajava*; e cinza – para as três espécies *Psidium*; os números mostrados nos nodos referem-se à massa molecular da respectiva substância química. 52

Figura 23 - Estrutura química do ácido elágico correlacionado com ramnose pertencente a classe dos taninos hidrolisáveis, representante do agrupamento (A). 59

Figura 24 - Estruturas químicas do dendromonilisídeo E, picraquassiosídeo C e leptolepisol B pertencentes a classe das lignanas, representantes do agrupamento (B). 60

Figura 25 - Estrutura química da oleana-9(11), 12-dien-3-ona pertencente a classe dos terpenos, representante do agrupamento (C). 61

Figura 26 – Perfil comparativo dos cromatogramas das frações diclorometano (DCM) (A), acetato de etila (AcOEt) (B) e metanol (MeOH) (C) obtidas por análise de *P. guajava* nas condições controle (GUAJC, em verde) e após 20 dias de infecção (GUAJ20D, em vermelho) em LC-MS. 63

Figura 27 – Perfil comparativo dos cromatogramas das frações diclorometano (DCM) (A), acetato de etila (AcOEt) (B) e metanol (MeOH) (C) obtidas por análise de *P. guineense* nas condições controle (GUINC, em verde) e após 20 dias de infecção (GUIN20D, em vermelho) em LC-MS. 64

Figura 28 – Perfil comparativo dos cromatogramas das frações diclorometano (DCM) (A), acetato de etila (AcOEt) (B) e metanol (MeOH) (C) obtidas por análise de *P. cattleianum* nas condições controle (CATTC, em verde) e após 20 dias de infecção (CATT20D, em vermelho) em LC-MS. 65

Figura 29 – Imagens espectrais dos fragmentos de massa obtidos, apresentados em vermelho, da substância retira entre 2.64 – 2.67 min, seguidos pela estrutura química da substância L-arginina (C6H14N4O2), identificada por fragmentos em azul comparados com bibliotecas NIST. 66

Figura 30 – Imagens espectrais dos fragmentos de massa obtidos, apresentados em vermelho, da substância retira entre 25.86 - 25.92 min, seguidos pela estrutura química da substância eudesmina (C22H26O6), identificada por fragmentos em azul comparados com bibliotecas NIST. 67

Figura 31 – Representações gráficas por *heatmap* obtidas pelo software *MetaboloAnalyst 5.0* com as cinquenta substâncias com maiores picos de intensidade de amostras extraídas em diclorometano (DCM) (A), acetato de etila (AcOEt) (B) e metanol (MeOH) (C) obtidas por análise de *P. guajava* nas condições controle (GUAJ_CONT, em verde) e após 20 dias de infecção (GUAJ_20D, em vermelho).....68

Figura 32 – Representações gráficas por *heatmap* obtidas pelo software *MetaboloAnalyst 5.0* com as cinquenta substâncias com maiores picos de intensidade de amostras extraídas em diclorometano (DCM) (A), acetato de etila (AcOEt) (B) e metanol (MeOH) (C) obtidas por análise de *P. guineense* nas condições controle (GUIN_CONT, em verde) e após 20 dias de infecção (GUIN_20D, em vermelho). 69

Figura 33 – Representações gráficas por *heatmap* obtidas pelo software *MetaboloAnalyst* com as cinquenta substâncias com maiores picos de intensidade de amostras extraídas em diclorometano (DCM) (A), acetato de etila (AcOEt) (B) e metanol (MeOH) (C) obtidas por análise de *P. cattleianum* condições controle (CATTL_CONT, em verde) e após 20 dias de infecção (CATTL_20D, em vermelho).....70

Figura 34 – Plantas de *P. guajava* analisadas neste estudo: Indivíduos controle (sem infecção) (A); Indivíduos após 20 dias de infecção por ovos e J2 de *M. enterolobii* (B); Raízes de indivíduos infectados evidenciando a formação das galhas (C). 92

Figura 35 - Plantas de *P. guineense* analisadas neste estudo: Indivíduos controle (sem infecção) (A); e Indivíduos após 20 dias de infecção por ovos e J2 de *M. enterolobii* (B).....93

Figura 36 - Plantas de *P. cattleianum* analisadas neste estudo: Indivíduos controle (sem infecção) (A); e Indivíduos após 20 dias de infecção por ovos e J2 de *M. enterolobii* (B). 94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados dos agrupamentos obtidos em Molecular networking gerados pelo software Cytoscape 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt – acetato de etila

AMP - acetate-malonate pathway

ANP - anti-nematode phytochemical

CN - cyst nematode

DAMP - damage-associated molecular pattern

DCM - diclorometano

ETI - effector-triggered immunity

ETS - effector-triggered susceptibility

HR - hypersensitive response

MAMP - microbe-associated molecular pattern

MeOH - metanol

NAMP - nematode-associated molecular pattern

NO - nitric oxide

NPP - nematoide parasita de planta

OEs - óleos essenciais

PAMP - pathogen-associated molecular pattern

PGIP - polygalacturonase-inhibiting protein

PGR - plant growth regulators

PLCP - papain-like cysteine protease

PPN - plant parasitic nematode

PR-protein - pathogenesis-related protein

PRR - pattern recognition receptor

PTI - pattern-triggered immunity

RKN - root-knot nematodes

ROS - reactive oxygen species

SAR - systemic acquired resistance

SOC - soil organic carbono

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14

1.1. GOIABA E SUA IMPORTÂNCIA 14
1.2. *MELOIDOGYNE ENTEROLOBII* (SIN. *M. MAYAGUENSIS*) E A DOENÇA-DAS-GALHAS 18
1.2.1. *Psidium* spp. resistente e imune ao nematoide parasita de plantas 22
1.2.2. Medidas de controle do fitonematoide 24
1.3. MECANISMOS DE DEFESA VEGETAL CONTRA NEMATOIDES 26
1.3.1. Metabolismo de plantas 30

2. OBJETIVOS 45

2.1. OBJETIVO GERAL 45
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 45

3. MATERIAIS E MÉTODOS 46

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO 46
3.2. ANÁLISE DE PERFIS METABOLÔMICOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS ACOPLADA A CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA (LC-MS) 46
3.2.1. Extração de metabólitos secundários 46
3.2.2. Método analítico em LC-MS 47
3.2.3. Processamento e tratamento dos dados cromatográficos 48
3.2.4. Identificação dos metabólitos 48

4. RESULTADOS 50

4.1. COMPARAÇÃO POR DENDROGRAMA DO PERFIL ANALÍTICO DAS EXTRAÇÕES 50
4.2. ANÁLISES POR MOLECULAR NETWORKING E IDENTIFICAÇÃO POR BUSCAS NO SCIFINDER 51
4.3. ANÁLISES POR SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS COM IDENTIFICAÇÃO POR BIBLIOTECAS NIST 62
4.4. ANÁLISES POR HEATMAP COM IDENTIFICAÇÃO POR BIBLIOTECAS NIST 67

5. DISCUSSÃO 72

6. CONCLUSÃO 77

6.1. PERSPECTIVAS FUTURAS 77

REFERÊNCIAS 79

APÊNDICE A - INDIVÍDUOS DE *P. GUAJAVA* NAS CONDIÇÕES TESTE 92
APÊNDICE B - INDIVÍDUOS DE *P. GUINEENSE* NAS CONDIÇÕES TESTE 93
APÊNDICE C - INDIVÍDUOS DE *P. CATTLEIANUM* NAS CONDIÇÕES TESTE 94

1. INTRODUÇÃO

1.1. Goiaba e sua importância

A família Myrtaceae é caracterizada por plantas dicotiledôneas pertencentes ao grupo das Angiospermas. Dentre seus 130 gêneros botânicos, o gênero botânico *Psidium* abrange 150 espécies, sendo *Psidium guajava* L., conhecida como goiabeira, a mais importante das mirtáceas (Silva *et al.*, 2010).

A temperatura ideal para a frutificação da goiabeira é entre 25 e 28 ºC, mas tolera temperaturas até 46 ºC. A planta pode atingir entre 3 e 10 m de altura (Figura 1A), suas raízes adventícias são superficiais com casca lisa, variando nos tons verdes a marrom, com desprendimento de finas camadas. O fruto é carnoso em formato de globo ou ainda ovoide, possuindo entre 4 e 10 cm de diâmetro e peso variando de 100 a 450 g. A casca pode se apresentar na cor verde-clara a amarelo-brilhante (Figura 1B) e a polpa pode ser vermelha, rosa, amarela ou branca (Ngbolua *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2010).

Figura 1 – *P. guajava* cv. Paluma (A) e seu fruto (B) (Watanabe, 2007).

A goiaba constitui uma importante fonte de ácido ascórbico (vitamina C) com níveis seis a sete vezes maiores que em outros frutos cítricos, ainda rica em fibras. O fruto também contém altos teores de açúcares, retinol (vitamina A) e vitaminas do grupo B, como a tiamina (vitamina B1) e a niacina (vitamina B3), e teores significativos

de fósforo, potássio, ferro e cálcio (Kamath *et al.*, 2008; Ngbolua *et al.*, 2018).

Há um crescente interesse biotecnológico em *P. guajava*, em função das suas propriedades farmacológicas e ações antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antidiarreica, antidiabética, anti-hiperlipidêmica, cardioprotetora, antimutagênica, hepatoprotetora e larvicida. As folhas de *P. guajava* contêm um óleo essencial rico em compostos fenólicos dos grupos dos taninos e flavonoides, alcaloides e dezenas de terpenoides, como saponinas, sendo o ácido corosólico, o principal triterpenoide (Chandnani *et al.*, 2020; Chao *et al.*, 2020; Felix, Pereira e Mendes, 2020; Ngbolua *et al.*, 2018).

Na figura 2A, tem-se a estrutura base no qual diferentes radicais podem ser atribuídos aos terminais R, obtendo-se os seguintes compostos: quercetinas, 3-O-L-arabinofuranosídeo, 3-O-a-L-arabinopiranosídeo, 3-O-ß-D-glucosídeo, 3-O-ß-D-galactosídeo, 3-O-ß-L-rhamnosídeo, 3-O-ß-D arabinopiranosídeo, 3-O-gentiobiosídeo e 4'-glucuronídeo. Em 2B, triterpenos: os ácidos guavanoico, guavacumárico, guajanoico, ursólico, 2a-hidroxiursólico, maslínico, asiático, jacumarico e isoneriucumárico (Ngbolua *et al.*, 2018).

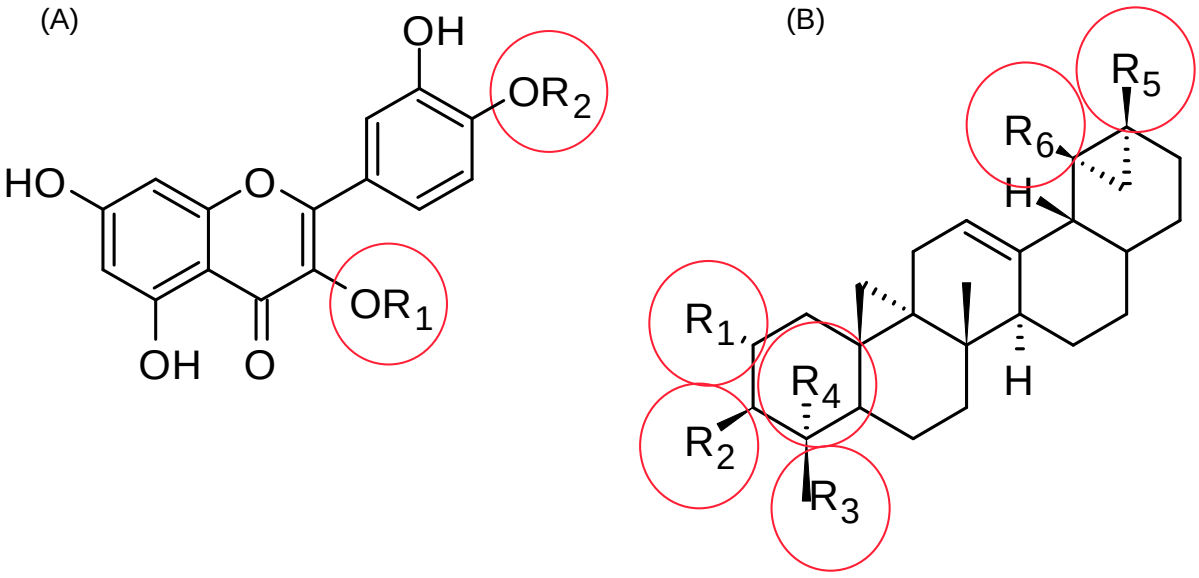


Figura 2 - Estruturas químicas de fitoquímicos isolados de folhas de *P. guajava*: quercetina e glicosídeos (A); e ácidos triterpênicos (B) (Ngbolua *et al.*, 2018).

De acordo com o estudo de Chao *et al.* (2020), foi possível determinar nove triterpenoides em *P. guajava* que demonstraram boa atividade de inibição de α-glucosidases e assim, potencial atividade no tratamento de diabetes. Na figura 3, tem-

se a estrutura base desses triterpenoides, onde nas terminações R ocorrem variações de oxigênio (O), hidroxila (OH), metil (CH_3), *cis-p*-cumaroil e *trans-p*-cumaroil: os ácidos asiático, maslínico, corosólico, 3β-O-cis-p-cumaroil-2α-hidroxi-olean-12-en-28-oico, 3β-O-*cis-p*-cumaroil-2α-hidroxi-urs-12-en-28-oico, 3β-O-*trans-p*-cumaroil-2α-hidroxi-olean-12-en-28-oico, 3β-O-*trans-p*-cumaroil-2α-hidroxi-urs-12-en-28-oico, oleanólico e ursólico, sugerindo que sejam biomarcadores desta espécie.

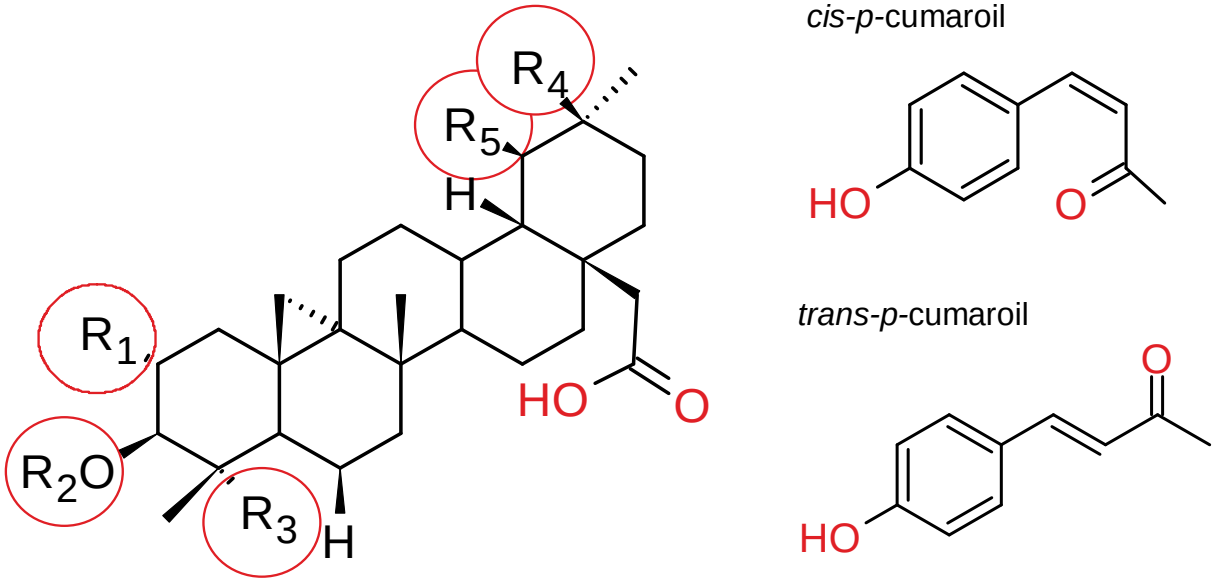


Figura 3 - Estrutura química para nove triterpenoides de *P. guajava* (Chao *et al.*, 2020).

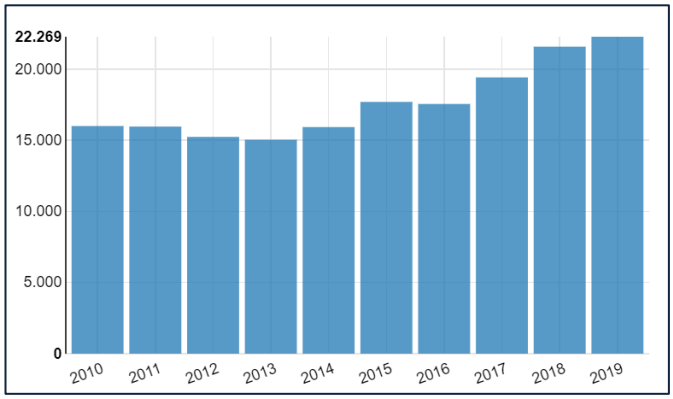
Em 2020, foram muitos os estudos promissores relacionados aos metabólitos produzidos por *P. guajava*. Neste ano, pela pandemia causada pelo SARS-CoV-2 (novo coronavírus), os metabólitos secundários de *P. guajava* L., destacando o flavonol morin-3-O-arabinosídeo e o flavonoide isoquercetina, mostraram uma ligação considerável às proteínas-chave, TMPRSS2, proteína spike e ACE2, envolvidas na virulência de SARS-CoV-2 (Jesus *et al.*, 2020). Tem-se, ainda, um interesse na zootecnia relativo à alimentação de animais, tendo sido demonstrado que a incorporação de subprodutos de goiaba na dieta de ovinos em confinamento é adequada para a manutenção do bom desempenho e viabilidade econômica do sistema (Costa *et al.*, 2019).

Em todo o mundo, os principais produtores de goiaba são Paquistão, Brasil, México, Itália, Grécia e outros países do mediterrâneo (Salazar *et al.*, 2006). No agronegócio brasileiro, importante na geração de empregos e no Produto Interno

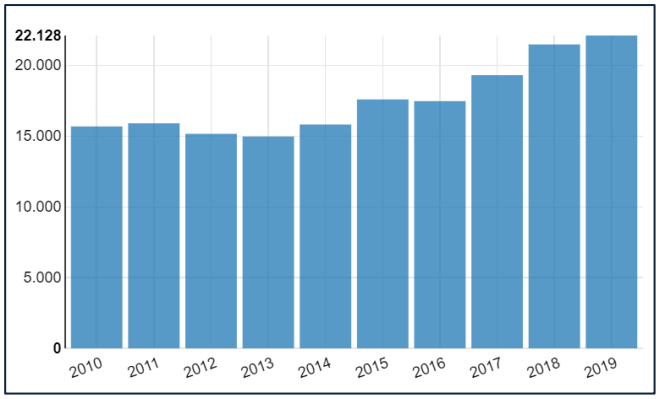
Bruto (PIB) (ESALQ/USP e CNA, 2019), o cultivo da goiaba possui grande relevância, principalmente nos estados de Pernambuco e São Paulo em que a produção se destina tanto às indústrias para fabricação de produtos como geléias, doces, sorvetes, “guatchup”, como ao seu consumo *in natura* (Ribeiro *et al.*, 2018a).

A goiabeira, com destaque para a cultivar “Paluma”, é a 11ª fruteira de maior importância econômica no Brasil (Antonio e Santos, 2020). Nesse contexto, estão apresentados abaixo alguns gráficos (Figura 4) obtidos dos Bancos de Tabelas Estatísticas gerados pela plataforma do Sistema IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) de Recuperação Automática (SIDRA), comparando o crescimento nos últimos 10 anos (2010 – 2019) do agronegócio nacional da goiaba.

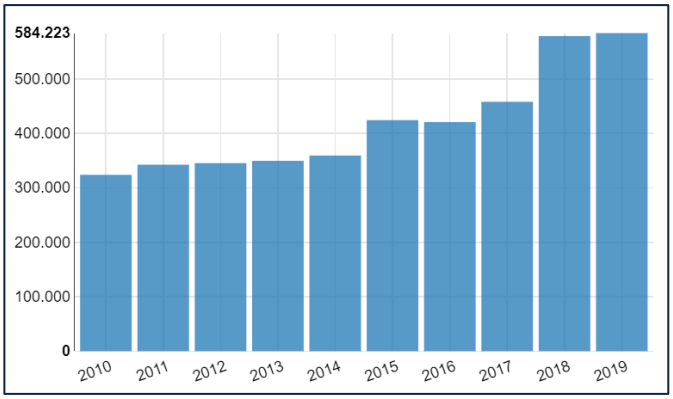
(A) Área plantada ou destinada a colheita (hectares)



(B) Área colhida (hectares)



(C) Quantidade produzida (toneladas)



(D) Valor da produção (mil reais)

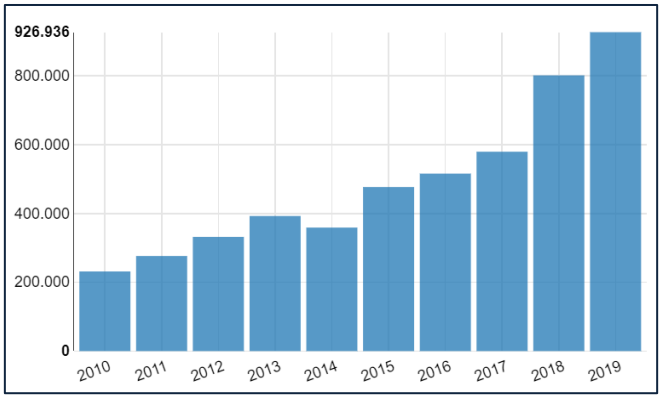


Figura 4 - Representações gráficas obtidas pelos Bancos de Tabelas Estatísticas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) com comparação do crescimento, nos últimos 10 anos (2010 – 2019), do agronegócio nacional da goiaba: Área plantada ou destinada à colheita (hectares) (A), Área colhida (hectares) (B), Quantidade produzida (toneladas) (C) e Valor da produção (mil reais) (D) (“Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA”, 2020).

De acordo com os dados publicados, o aumento crescente de área plantada ou destinada à colheita do agronegócio total alcançou, em 2019, 81.176.283 hectares e

80.576.400 hectares de área colhida. De 2010 a 2017, as áreas para cultivo e colhidas de goiaba eram de 0,02% (19.412 e 19.324 hectares, respectivamente) dos territórios totais agricultáveis. A partir de 2018, teve-se um aumento para cerca de 0,03% (22.269 e 22.128 hectares, respectivamente) (Figuras 4A e 4B).

Observa-se, pela figura 4C, que mesmo com o período da crise político-econômica do Brasil que se iniciou em 2014, conhecida como grande recessão brasileira (Filho, 2017), houve um crescente aumento da produção de goiaba ao longo desta década, alcançando 584.223 toneladas em 2019, acompanhada do rendimento médio da produção com 26.402 quilogramas por hectare. Com isso, todo o agronegócio brasileiro movimentou, só em 2019, cerca de 361 bilhões de reais, dos quais, nos anos de 2018 e 2019, a goiaba mostrou evidente aumento de valor de produção, 23% (800 milhões) e 26% (927 milhões de reais), respectivamente (Figura 4D) (“Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA”, 2020).

Por esse motivo, há elevado interesse de grandes empresas detentoras de importantes patentes, como a *Pioneer Hi-Bred International*, *E.I. Du Pont De Nemours and Company, 2Blades Foundation*, *Syngenta Participations Ag* e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), em pesquisas visando à melhoria na produção deste recurso.

1.2. Meloidogyne enterolobii (sin. M. mayaguensis) e a doença-das-galhas

Os nematoides participam de todos os níveis tróficos da cadeia alimentar do solo e, com isso, são os animais mais abundantes da Terra. De acordo com estudo realizado por Hoogen *et al.* (2019) com o intuito de compreender a abundância global do Filo Nematoda, os mapas obtidos demonstram que uma biomassa total de nematoides de aproximadamente 300 milhões de toneladas habitam solos das superfícies em todo o mundo, sendo mais abundantes nas regiões subárticas com 38% do total, 24% nas temperadas e 21% nas regiões tropicais.

Na Figura 5, tem-se o mapa global da densidade populacional de nematoides por 100 g de solo. As densidades mais baixas foram mostradas nos desertos mais quentes como o Deserto do Saara, Deserto de Gobi e Deserto de Kalahari, regiões que são caracterizadas por estoques de carbono orgânico no solo (SOC) muito baixos.

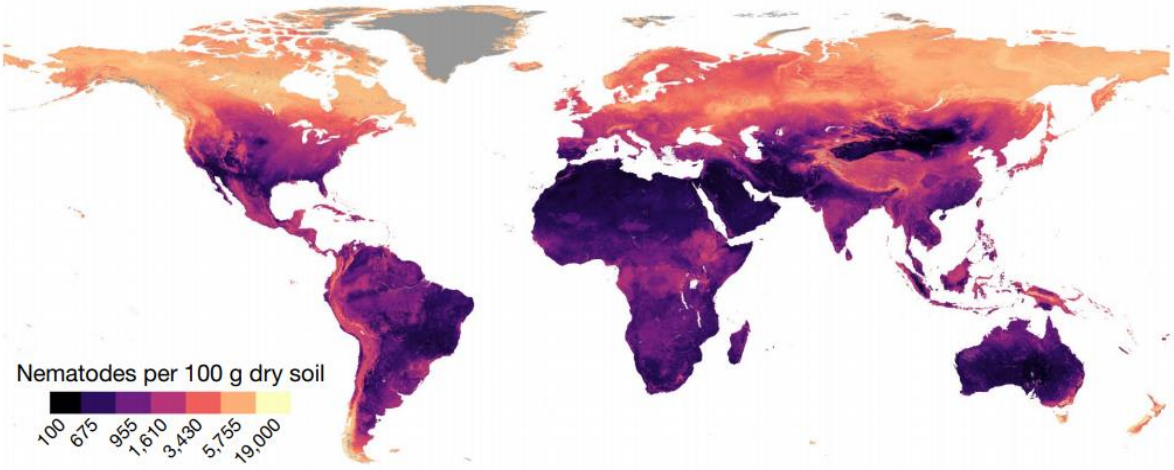


Figura 5 - Mapa global da densidade de nematoides do solo na escala de pixels de 30 arco-segundo (aproximadamente 1 km^2). Número de nematoides por 100 g de solo seco (Hoogen *et al.*, 2019).

São conhecidas aproximadamente 4.100 espécies de fitonematoides. Os nematoides parasitas de plantas (NPPs) podem ser subdivididos em: i) ectoparasitas migratórios – aqueles que se alimentam em locais diferentes e penetram no tecido vegetal apenas usando o estilete de alimentação; ii) endoparasitas migratórios – migram para dentro do tecido causando danos; iii) endoparasitas sedentários – induzem os centros de alimentação com as células multicelulares e hipertrofiadas. Os dois principais PPNs no grupo sedentário são os nematoides-das-galhas do gênero *Meloidogyne* e os nematoides-dos-cistos, pertencentes aos gêneros *Globodera* e *Heterodera* (Sato, Kadota e Shirasu, 2019). Tem-se, ainda, a classificação um quarto grupo, chamado de semiendoparasitas, em que a parte anterior do corpo se mantém nos tecidos vegetais, enquanto a parte posterior fica do lado de fora (Shah e Mahamood, 2017). Em todo o mundo, há mais de 100 espécies descritas de nematoides-das-galhas (“root-knot nematodes” – RKN) (Przybylska e Obrępalska-Stęplowska, 2020).

Na figura 6, tem-se um esquema que demonstra as estratégias de infecção dos NPPs. Em 6A, os ectoparasitas absorvem os nutrientes sem invadir a raiz da planta e induzem a formação de células de nutrição; em 6B, os endoparasitas migratórios se movem e se alimentam do tecido vegetal, e os sedentários incluem os nematoides-das-galhas e os nematoides-dos-cistos (“cyst nematode” – CNs); em 6C, os juvenis de *Meloidogyne* em fase J2 entram raiz, migram intercelularmente para o cilindro vascular, estabelecem as células gigantes, tornam-se sedentários e absorvem

nutrientes e água através do estilete de alimentação e as fêmeas adultas formam uma massa de ovos; em 6D, J2 de nematoides-dos-cistos se movem dentro da raiz intracelularmente, também se tornam sedentários e as fêmeas adultas retêm parte dos ovos dentro do corpo, formando um cisto após a morte (Sato, Kadota e Shirasu, 2019).

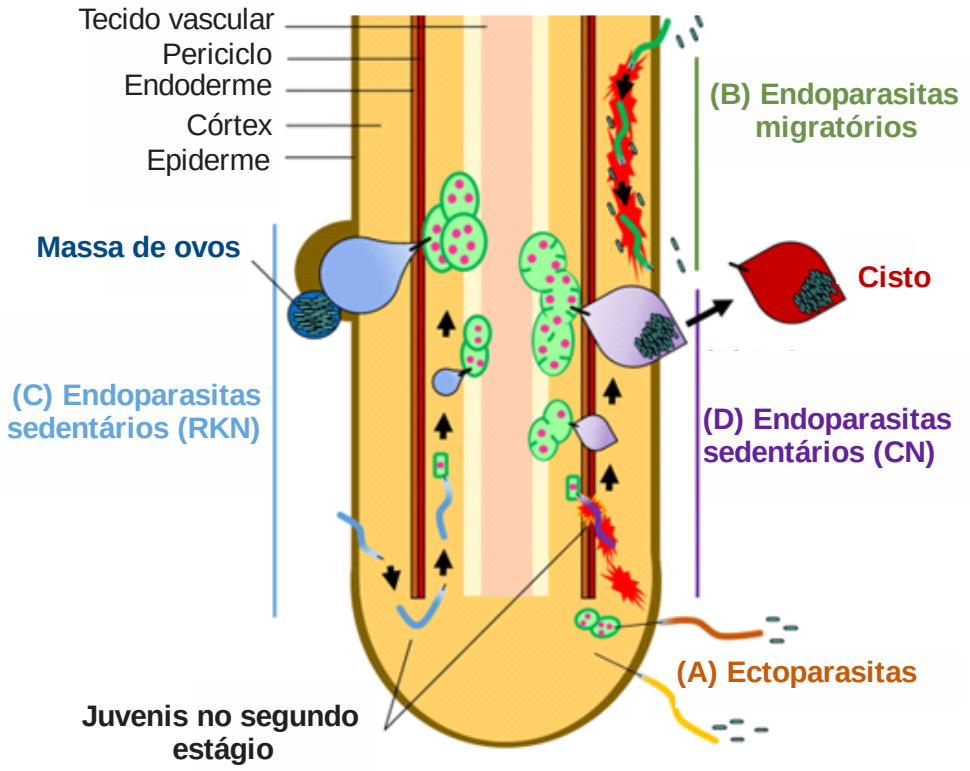


Figura 6 - Estratégias de infecção de nematoides parasitas de plantas (NPPs) (Sato, Kadota e Shirasu, 2019).

Na lista dos 10 principais fitonematoides, *Meloidogyne* spp., pertencente à classe Chromadorea, da família Meloidogynidae, ocupa posição de liderança (Jones *et al.*, 2013). Este gênero possui uma distribuição mundial, principalmente em territórios de clima tropical, e parasita quase todas as espécies de plantas superiores, contribuindo para sua posição de destaque como fitoparasita economicamente importante (Coyne, Nicol e Claudius-Cole, 2007; Tylenchida *et al.*, 2019).

A goiabeira é atacada por 80 espécies diferentes de pragas e doenças, entre elas o nematoide-das-galhas, *Meloidogyne enterolobii*. Este é o principal agente causador da morte de plantas em áreas de cultivo no Brasil (Ribeiro *et al.*, 2018b).

Desde 2001, a meloidoginose, conhecida também como “declínio da goiabeira”, causa perdas econômicas diretas e indiretas para toda a cadeia produtiva da goiaba

(Ribeiro *et al.*, 2019). Num estudo realizado nos estados da Bahia, Ceará, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Rio de Janeiro, quanto à infecção de goiabeiras por este fitonematoide, reportou-se uma perda de US$ 60 milhões, desconsiderando ainda os impactos em outros setores da cadeia de produção (Pereira *et al.*, 2016).

M. enterolobii é a praga mais prejudicial por causa de sua ampla gama de hospedeiros, sua agressividade e capacidade de superar a resistência de diversas plantas (Prabhu *et al.*, 2020). Há, ainda, os primeiros registros de *M. enterolobii* atacando gardênia jasminoide (Sun, Long e Lu, 2019), amoreira (Sun, Long e Lu, 2019), cânhamo (Ren *et al.*, 2020) e gengibre (Zhuo *et al.*, 2018), na China; mirtilo, nos EUA (Moore *et al.*, 2020); bananeiras (Luquine *et al.*, 2018) e amoreira brasileira (Soares, Lopes e Dias-Arieira, 2018) no Brasil; e ainda goiabeiras (Bhati e Parashar, 2020; Satya Kumar, 2018), na Índia. Em 2020, foi publicado um artigo quanto ao problema emergente no distrito Ratlam, na Índia, em que os agricultores relatam nunca terem visto esse tipo de doença de raiz em suas aldeias, levando a uma perda da produtividade de 45 a 85% (Singh, 2020).

A meloidoginose ou doença-das-galhas em goiabeira é considerada uma interação complexa entre *M. enterolobii* e o fungo *Fusarium solani*. A planta infectada por este nematoide apresenta crescimento atrofiado; as folhas exibem amarelamento; o número e o tamanho das flores e dos frutos ficam reduzidos; nas raízes observam-se galhas de grande porte e múltiplas; e o sistema radicular se torna pouco desenvolvido e este quadro sintomatológico pode evoluir para a morte da árvore (Prabhu *et al.*, 2020). A formação das galhas nas raízes e a descoloração das folhas é apenas o sintoma primário, sendo este agravado pela podridão acarretada pelo fungo fitopatogênico (Chiamolera *et al.*, 2018).

Na Figura 7, tem-se o ciclo completo do *Meloidogyne,* parasita sedentário obrigatório que requer a infecção de uma planta hospedeira para completar seu ciclo de vida. Inicia-se com a deposição de 400-500 ovos pelas fêmeas em massas de ovos situadas na superfície das raízes, em contato com o solo, ou dentro dos tecidos da planta. Juvenis de segundo estádio (J2) eclodem dos ovos e entram nas raízes; migram intercelularmente em direção à parte central onde se encontram os feixes vasculares e, com golpes de estilete, liberam enzimas que induzem, dentro das raízes das plantas hospedeiras, a formação de estruturas únicas do local de alimentação, denominadas cenócitos (células gigantes multinucleadas, hipertrofiadas e metabolicamente ativas). Após duas ecdises ou trocas de cutículas, J3 e J4 passam

a direcionar os nutrientes aos nematoides que gradualmente se tornam obesos e sedentários. Os machos voltam à condição vermiforme, abandonam as raízes e retornam ao solo. As fêmeas adultas depositam ovos, que irão dar origem aos novos juvenis infecciosos (Ibrahim *et al.*, 2019) e completam seu ciclo de vida (três a quatro semanas), numa temperatura ideal de 25 ºC (Bozbuga *et al.*, 2018; Ferraz e Brown, 2016; Ibrahim *et al.*, 2019; Leal-Bertioli *et al.*, 2016).

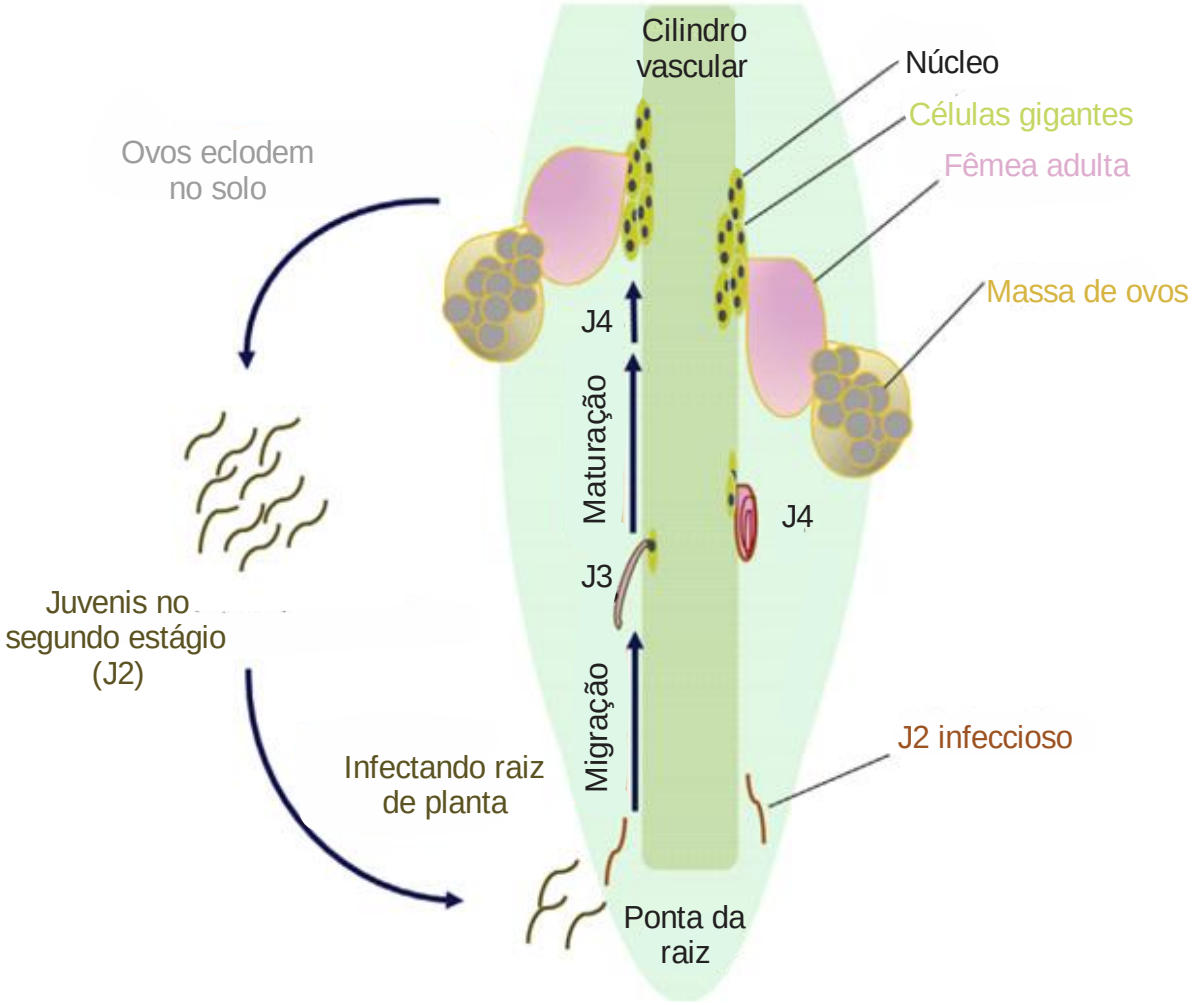


Figura 7 - Modelo esquemático do ciclo de vida dos nematoide-das-galhas, *Meloidogyne* spp. (Ibrahim *et al.*, 2019).

1.2.1. Psidium spp. *resistente e imune ao nematoide parasita de plantas*

Depois que um patógeno infecta a planta hospedeira, a mortalidade do hospedeiro é fortemente correlacionada à sua taxa reprodução (Zhang *et al.*, 2019). De acordo com o Fator de Reprodução (FR), obtido pela razão entre a população final

e a inicial de fitonematoides após a infecção dos juvenis de segundo estádio, é possível definir a planta como: i) suscetível - que possui FR igual ou superior a 1,0 e o parasito irá alcançar a fase adulta; ii) resistente - FR é inferior a 1,0, o parasito atinge a fase adulta, mas a reprodução não levará a uma produção de ovos e juvenis de segundo estádio maior que aquela inoculada, e iii) imune - em que o FR é igual a zero e o nematoide não consegue infectar as raízes da planta (Filho e Dallagnol, 2018).

No estudo realizado por Sreekavya *et al.* (2019), com o objetivo de avaliar a reação de acessos de *Psidium* spp. a diferentes níveis de inoculação de *M. enterolobii*, não foram observadas galhas complexas ou de alimentação em *P. cattleianum*. Todas as plantas dessa espécie, popularmente conhecida como araçazeiro, foram imunes ao nematoide (Miranda et al., 2012) com FR 0,003 (<1,0). Em acessos de *P. guajava,* o fator de reprodução foi igual a 1,610 (FR>1,0), considerada, então, suscetível (Castro et al., 2016). Quanto a *P. guineense,* que possui similaridade genética de 81,4% com *P. guajava* (Oliveira *et al.*, 2019) o fator foi de 0,90 (FR~1,0) (Souza *et al.*, 2016), classificada como resistente.

Na figura abaixo, observam-se os frutos de *P. guineense* (Figura 8A) e *P. cattleianum* (Figura 8B).

Figura 8 - Espécies de *Psidium*: *P. guineense* (A) (Emmanoel *et al.*, 2013) e *P. cattleianum* (B) (Franzon e Sousa-Silva, 2009).

1.2.2. Medidas de controle do fitonematoide

No Brasil, pela Embrapa Semiárido, por meio do melhoramento clássico, obteve o híbrido ‘BRS Guaraçá’, registrado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para ser utilizado como porta-enxerto de goiabeira. Esse porta-enxerto, resistente a *M. enterolobii*, originou do cruzamento entre uma planta-mãe (*P. guajava* – espécie suscetível) e uma planta-pai, um araçazeiro (*P. guineense* – espécie resistente). Em testes realizados a campo, este híbrido foi compatível como porta-enxerto para as goiabeiras “Paluma” e ‘Pedro Sato”, além de resistente a *M. enterolobii* (Ribeiro, 2019; Souza, Santos e Costa, 2018).

Na figura 9A, tem-se o ‘BRS Guaraçá’ com 10 anos desde o plantio, resultado do cruzamento supracitado, e em 9B os cultivos de goiabeiras e araçazeiros, em Petrolina, PE, no Campo Experimental de Bebedouro, pertencente à Embrapa Semiárido, destacando, à direita, aqueles sem o porta-enxerto.

Figura 9 – Campo experimental de Bebedouro da Embrapa Seminário (Petrolina - PE): ‘BRS Guaraçá’ com 10 anos de plantio após cruzamento (A) e cultivo de goiabeiras e araçazeiros (B). Em destaque, à direita, goiabeira sem o porta-enxerto com sintomas de deficiência nos tecidos vegetais (B). Fonte: (Autoria própria).

Entretanto, mesmo que o “BRS Guaraçá” constitua um método de controle efetivo, é necessário dar continuidade aos programas de melhoramento genético, pois a resistência desta cultivar pode ser quebrada futuramente pelo parasita.

Além dos programas de melhoramento genético de *Psidium* spp., outros estudos continuam sendo conduzidos visando ao controle deste patógeno. De acordo

com as recomendações, deve-se optar por um plano de controle com duas ou mais táticas (Moura *et al.*, 2014; Ntalli *et al.*, 2020).

No manejo de áreas infestadas, têm-se como práticas: i) Pousio – repouso da área por 1 a 12 meses; ii) Alqueive – eliminação de toda vegetação da área; iii) Inundação do solo – a fim de reduzir a concentração de oxigênio; iv) Rotação de culturas com vegetais não hospedeiros de um determinado nematoide; e v) Cultivo de plantas-armadilha suscetíveis ao nematoide – controle natural (Silva *et al.*, 2010). Contudo, para as áreas de cultivo de goiabeiras que tenham sido infectadas por nematoides, a estratégia da rotação de culturas não é recomendada, pois a característica perene da espécie vegetal limita o sucesso dessa prática de controle (Halbrendt e Mondia, 2004).

No controle biológico, buscam-se estratégias de controle inoculativo ou inundativo baseada no crescimento de populações inimigas. Num trabalho de Bellé *et al.* (2019), foi demonstrado que plantas daninhas apresentaram suscetibilidade à infestação por *M. enterolobii*, podendo, assim, serem usadas, no controle natural, como armadilhas para o nematoide e, consequentemente, o parasita não iria buscar as espécies de interesse na produção. Mas, muitos estudos ainda precisam ser realizados.

Os nematicidas (controle químico) disponíveis no Brasil, pertencentes aos grupos químicos dos carbamatos e organofosforados, são altamente tóxicos ao ser humano e ao ambiente e, de modo geral, sem muita eficiência do controle do *M. enterolobii.* Até o momento, não existem nematicidas registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para utilização na cultura da goiabeira (Ribeiro *et al.*, 2018b).

Ainda não foram respondidas as perguntas relacionadas ao que rege suscetibilidade e a resistência de *Psidium* spp. ao nematoide *M. enterolobii* ao nível molecular. Neste contexto, a resistência genética assume um papel muito importante no manejo deste parasita. Com o conhecimento sobre a defesa das plantas é possível fornecer estratégias para intervir no ponto de percepção do fitopatógeno.

Faz-se necessário que em 50 anos a produção de alimentos seja dobrada. Acredita-se que 70% desse aumento deverá ser alcançado através da admissão desses novos estudos (Esse, Reuber e Does, 2020).

1.3. Mecanismos de defesa vegetal contra nematoides

O triângulo das doenças representa a interação de três vias na progressão de fitopatologias e a infecção é, portanto, o efeito líquido da interação entre o patógeno, o ambiente e a planta hospedeira. As plantas são frequentemente atacadas por patógenos, que buscam alimento para sua sobrevivência e reprodução. Com isso, esses organismos vegetais são capazes de ativar respostas imunológicas contra os ataques desses invasores (Castro-Moretti *et al.*, 2020; Hou *et al.*, 2019; Pandey e Senthil-Kumar, 2019).

A partir de sinais no reconhecimento do patógeno, as plantas possuem a capacidade de induzir o processo de defesa vegetal, por: i) resposta hipersensitiva (HR), que se constitui na primeira etapa de resposta induzida; ii) resistência sistêmica adquirida (SAR), na qual ocorre a ativação após a infecção inicial resultar em sintomas de doenças; iii) a indução de proteínas relacionadas à patogênese (PR proteínas); e iv) compostos sinalizadores, como ácido salicílico e peróxido de hidrogênio (Fernandes *et al.*, 2009; Hou *et al.*, 2019).

A primeira linha do sistema de defesa vegetal, chamada ainda de imunidade inata ou imunidade basal, inclui as barreiras físicas, como a parede celular, ceras e cutículas; e as químicas, incluindo enzimas e metabólitos secundários (Przybylska e Obrępalska-Stęplowska, 2020). Os receptores localizados nas membranas celulares vegetais, chamados receptores de reconhecimento padrão (“pattern recognition receptors” – PRRs), geralmente do tipo quinases (“receptor-like kinase” - RLKs), reconhecem moléculas derivadas de microrganismos, chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (“pathogen-associated molecular pattern” - PAMPs) ou padrões moleculares associados à lesão (“damage-associated molecular patterns” - DAMPs) (Hou *et al.*, 2019). Quando os nematoides invadem e migram dentro das raízes das plantas, fragmentos da parede celular são gerados na forma de oligogalacturonídeos (OGs) que podem atuar como padrões moleculares associadas aos danos e ativar respostas de defesa do hospedeiro (Shah e Mahamood, 2017).

Esse reconhecimento dispara uma resposta de defesa conhecida como PTI (“PAMP-triggered immunity” – PTI). Alguns patógenos possuem a capacidade de suprimir a PTI produzindo moléculas denominadas efetores. A resposta relacionada devido à ação desses efetores é chamada de suscetibilidade disparada por efetores

(“effector-triggered susceptibility” - ETS) levando à ativação da imunidade inata resultante do reconhecimento de macromoléculas estranhas (Manohar *et al.*, 2020; Sato, Kadota e Shirasu, 2019).

A imunidade desencadeada por padrão de danos moleculares é um mecanismo de defesa universal contra patógenos, pragas e plantas parasitas e, por isso, impulsiona a diversificação dos padrões moleculares (Przybylska e Obrępalska-Stęplowska, 2020; Ranf, 2017).

Entretanto, as plantas resistentes podem reconhecer esses padrões moleculares ativando a imunidade disparada por efetores (“effector-triggered immunity” – ETI). De modo geral, das vias de respostas ETI e PTI são parecidas, mas a ETI é ativada mais rapidamente e mediada por um único gene de resistência *R*. Por isso, está relacionada à resistência da planta, com interação incompatível. Já a PTI é mediada por diversos genes e as respostas são tardias, possibilitando a infecção do patógeno, assim, com a interação compatível (Choi *et al.*, 2016; Manohar *et al.*, 2020).

Recentemente, os cientistas identificaram vários efetores secretados por nematoides de raiz, destinados a facilitar o parasitismo ao suprimirem a resposta imune de seus hospedeiros (Ibrahim *et al.*, 2019). Esses parasitas de plantas produzem uma família conservada de feromônios com função de regular o desenvolvimento e a comunicação do fitonematoide com outros organismos (Klessig *et al.*, 2019), atuando como uma assinatura que elicia as repostas imunológicas da planta (Manohar *et al.*, 2020).

Num estudo publicado por Manosalva *et al.* (2015), foi descoberto o ascarosídeo mais abundante secretado por diferentes espécies de fitonematoides, o ascr #18. Ascarosídeos são os únicos PAMPs descritos até agora que ativam as respostas iniciais de imunidade desencadeada por padrão e são reconhecidos pelas plantas como padrões moleculares de reconhecimento de nematoides (“nematode-associated molecular patterns” - NAMPs) (Przybylska e Obrępalska-Stęplowska, 2020). Este PAMP induz a ativação de: a) proteínas quinases ativadas por mitógeno (substância que desencadeia a mitose), b) vias de sinalização de defesa mediada por ácido salicílico e ácido jasmônico; c) expressão do gene de defesa e proteção a um amplo espectro de patógenos (Klessig *et al.*, 2019).

Na figura 10, está apresentado o esquema de reconhecimento de ascr#18 derivado de nematoides ativando a imunidade acionada por padrão (PTI) em plantas.

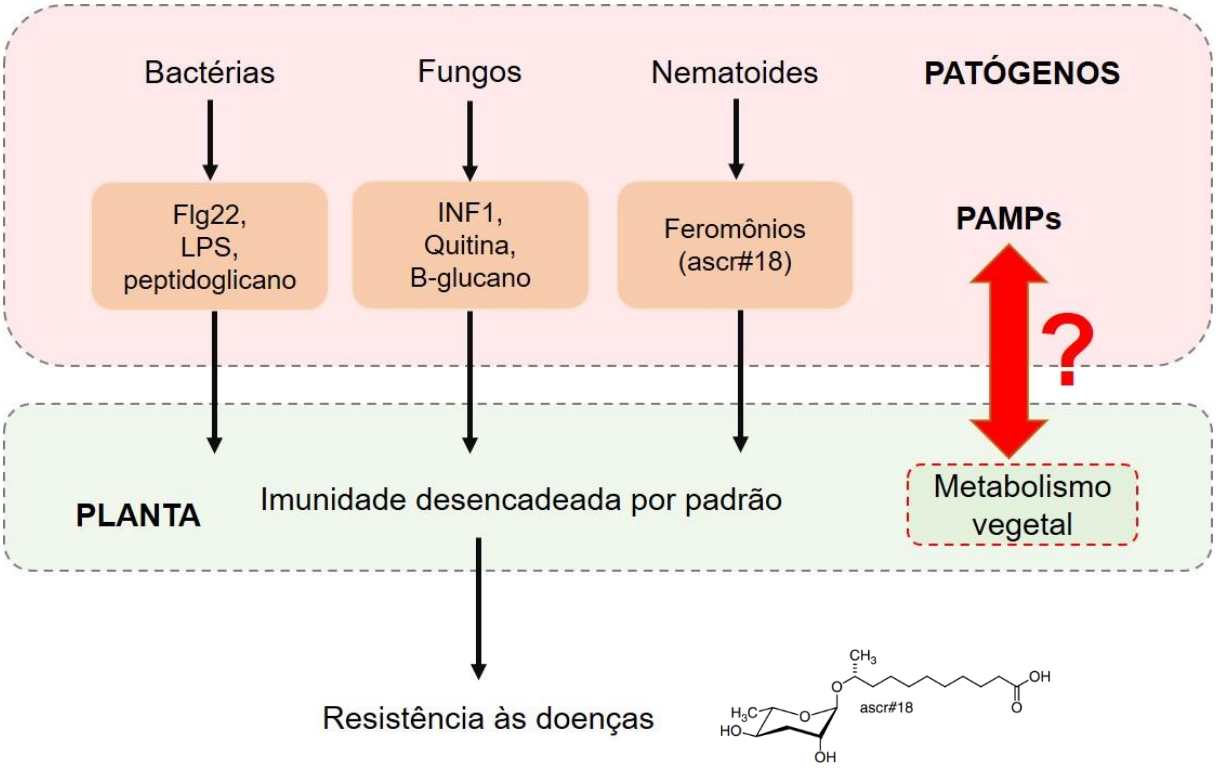


Figura 10 – O reconhecimento de ascr #18 derivado de nematoides ativa a imunidade acionada por padrão (PTI) em plantas, semelhante aos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) derivados de outros micro-organismos (Manohar *et al.*, 2020).

É importante ressaltar que um tratamento com ascr #18 aumentou a resistência a nematoides de raiz em *Arabidopsis* (Sato, Kadota e Shirasu, 2019). Já em *Arabidopsis* mutante defeituosa em duas acil-CoA oxidases peroxissomais não metaboliza ascr #18 e não repele nematoides, indicando que tanto as plantas, quanto os nematoides, conservam peroxisomal β-oxidação para editar ascarosídeos e mudar sua mensagem (Manohar *et al.*, 2020). No estudo de Kaloshian e Teixeira (2019), ascr#18 mostrou-se como ascarosídeo mais abundante no estágio infeccioso de juvenis de cinco espécies de nematoides parasitas de plantas, desencadeando ainda uma explosão de espécies reativas de oxigênio e indução de genes de defesa nas raízes, sugerindo a ativação de respostas de defesa pela presença de eliciadores.

O repertório de efetores de nematoide de raiz putativos é extremamente grande, não se restringindo apenas ao efetores proteicos, mas também secretam metabólitos secundários, glicolipídios, hormônios análogos a fim de alterar as funções da planta e, assim, vencer as barreiras de defesas. A elucidação da função efetora e a identificação em grande escala de alvos hospedeiros durante o parasitismo permanecem grandes desafios (Mejias *et al.*, 2019).

Na Figura 11, estão apresentadas as vias induzidas durante a resposta da planta à infecção por nematoides.

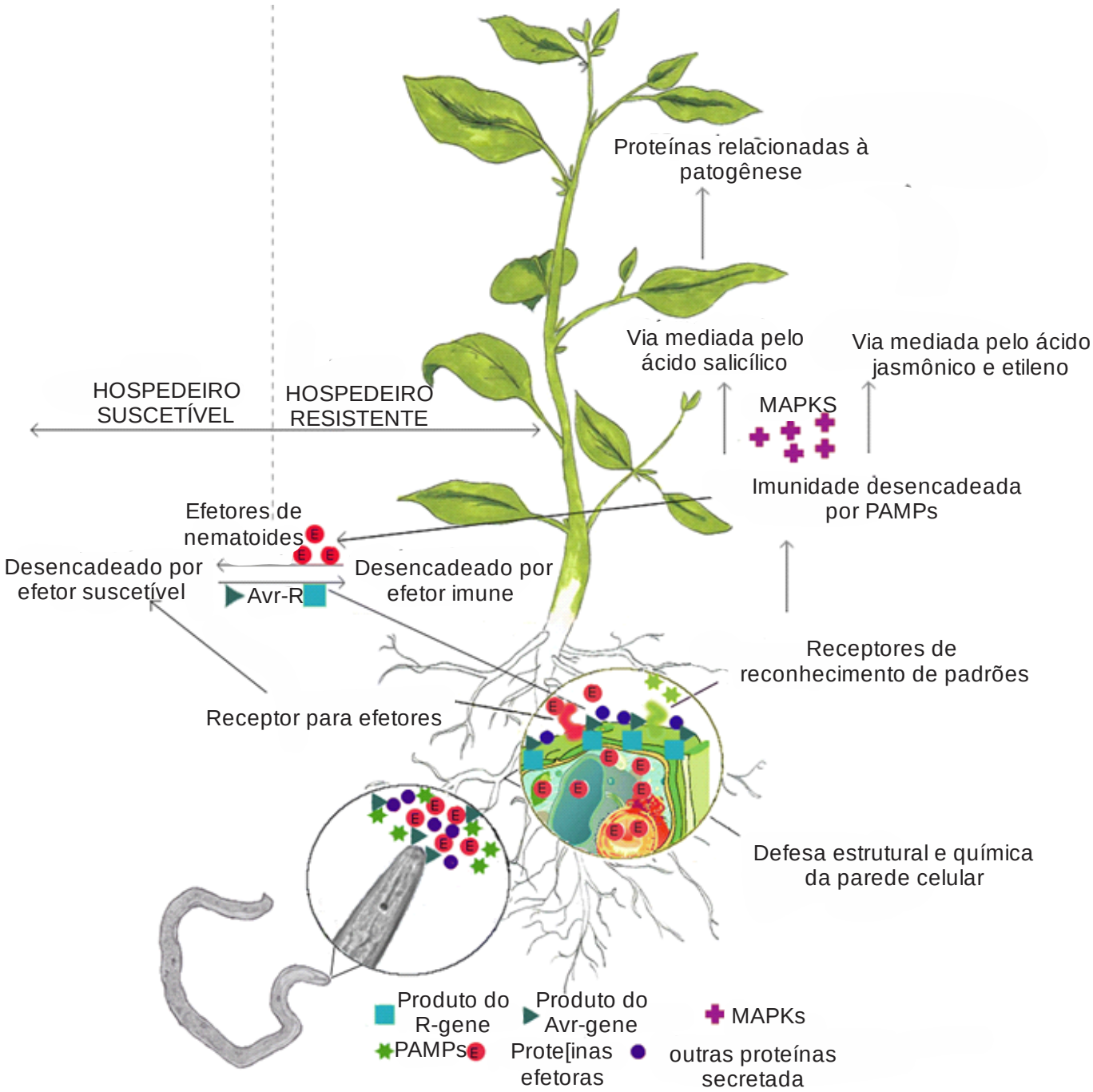


Figura 11 - Esquema das vias induzidas durante a resposta da planta à infecção por nematoides (Przybylska e Obrępalska-Stęplowska, 2020).

Quanto à sua composição em tecidos vegetais, os metabólitos secundários podem se apresentar como compostos pré-formados, presentes de forma biologicamente ativa; como compostos pré-formados induzidos, presentes em tecidos saudáveis e induzidos em resposta ao ataque de fitopatógenos. Como mecanismos de defesa, as raízes das plantas podem liberar metabólitos com atividade repelente ou nematicida afim de evitar a penetração do parasito; esses metabólitos estão presentes de forma constitutiva nos tecidos; e após a penetração, a planta pode responder induzindo fitoalexinas e fitoanticipinas no local de infecção (Basaid *et al.*, 2020; Desmedt *et al.*, 2020).

Pela percepção quimiossensorial, os nematoides localizam seu hospedeiro por meio de sinais de exsudato de raiz, indicando que metabólitos específicos atuam como atrativos ou repelentes, estimulando ou inibindo a incubação de ovos, ou exibindo propriedades nematicidas. Metabólitos secundários vegetais, incluindo derivados de ácidos graxos, terpenoides e fenólicos (flavonoides, taninos) contribuem de forma independente ou conjunta para muitos processos biológicos (Ntalli *et al.*, 2020; Sikder e Vestergård, 2020).

1.3.1. Metabolismo de plantas

O metabolismo vegetal compreende um processo energético que responde aos estímulos externos capaz de produzir metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são acumulados constitutivamente nas células vegetais que englobam os compostos essenciais para crescimento, desenvolvimento e reprodução, como açúcares, aminoácidos, nucleotídeos e lipídios. Os metabólitos secundários (especializados ou especiais), detectados em determinados tecidos, órgãos, estágios de desenvolvimento e sob condições específicas de cada espécie, têm papel fundamental na manutenção e proteção, e ainda desempenham funções importantes na polinização, efeitos alelopáticos e sinalização entre os organismos (Basaid *et al.*, 2020; Castro-Moretti *et al.*, 2020; Fang, Fernie e Luo, 2019).

A adaptação das plantas às diversas condições ambientais resultou na evolução de vias metabólicas secundárias, onde produtos da fotossíntese são canalizados para a produção de uma variedade de biomoléculas (Tetali, 2019). Muitos destes são constitutivos, e outros induzidos a partir do tecido ferido, e estão ligados

aos metabólitos primários por blocos de construção e enzimas biossintéticas. Geralmente são classificados de acordo com suas vias e estruturas (Jain; Khatana e Vijayvergia, 2019; Godswill, 2019; Vuolo, Lima e Maróstica Junior, 2018). O número de metabólitos secundários relatados no dicionário de produtos naturais chega a 8.182 flavonoides, 33.000 terpenoides e 16.000 alcaloides (Jain, Khatana e Vijayvergia, 2019).

Na Figura 12 é possível observar que muitos dos metabólitos primários mostram sobreposição funcional com os secundários.

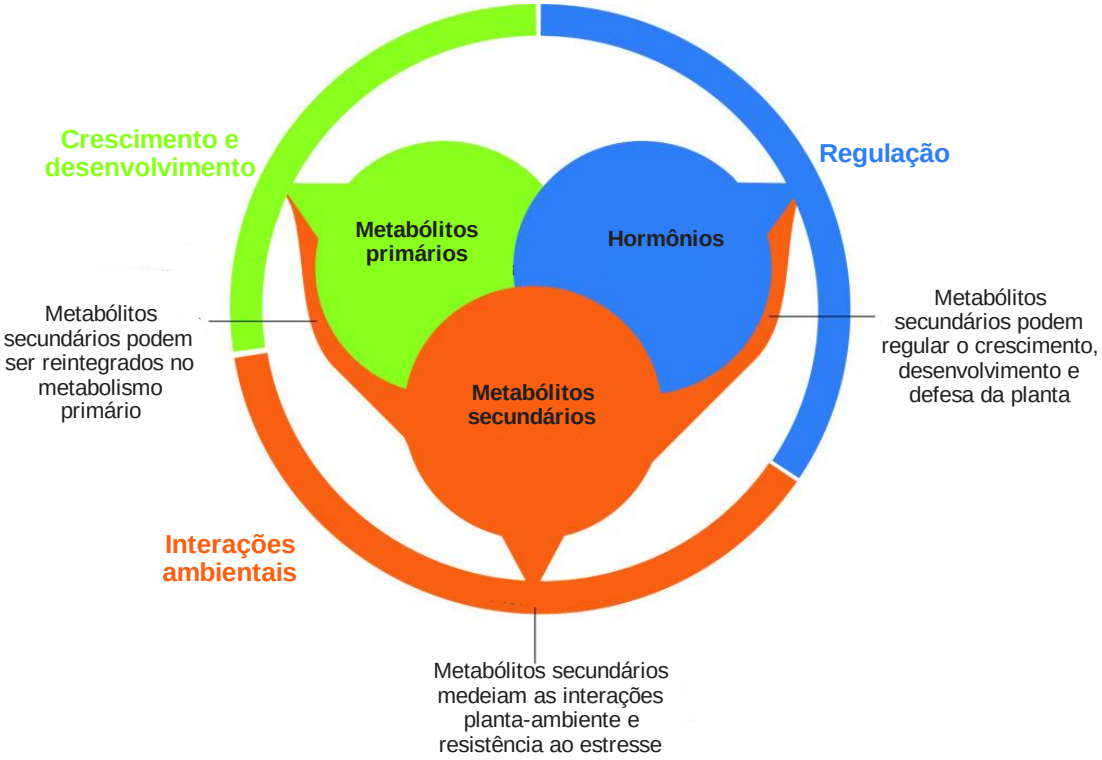


Figura 12 - Compostos de baixo peso molecular em plantas são funcionalmente classificados como metabólitos primários, metabólitos secundários ou hormônios (Erb e Kliebenstein, 2020).

Devido ao grande potencial dos metabólitos na defesa de plantas, muitos estudos têm sido relacionados ao teste de extratos vegetais na atividade contra nematoides do gênero *Meloidogyne*. Destaca-se o efeito das atividades biológicas nematicida e antioxidante de extratos de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) e *Zingiber officinale* (gengibre) contra *M. incognita*, devido sua maior quantidade de metabólitos secundários, como compostos fenólicos totais e flavonoides incluindo ácido gálico e quercetina sobre a mortalidade juvenil do fitoparasita (Ibrahim e Hussein, 2017). O extrato de *Chromolaena odorata* (erva-do-sião) mostrou-se mais eficaz em inibir a

eclosão dos ovos e o crescimento de juvenis J2 de *M. incognita* (Jamir, Simon e Lal, 2018). A inibição máxima na eclosão dos ovos e mortalidade de J2 de *M. javanica* foi causada pelo extrato do fruto de *Capsicum frutescens* (pimenta malagueta) (Ami e Shingaly, 2020).

A atividade nematicida também foi estudada a partir de extratos das ervas daninhas: *Argemone mexicana*, *Achyranthes aspera*, *Ricinus communis*, *Acalypha indica, Parthenium hysterophorus* e *Trianthema portulacastrum*, que foram testadas contra a eclosão de ovos e na mortalidade de *M. incognita*. Houve uma diminuição gradual na eclosão dos ovos e aumento da taxa de mortalidade de J2 do nematoide, proporcional ao aumento da concentração do extrato das folhas e do tempo de exposição (Khan *et al.*, 2017). Plantas de *Abelmoschus esculentus* (quiabo) inoculadas com *M. incognita* foram tratadas com extratos de: *Allium sativum* (alho), *Capsicum frutescens* (pimenta malagueta) e *Cinnamomum zeylanicum* (canela) apresentando redução do número de galhas na raiz e no número de larvas (Ayvar *et al.*, 2018). Dentre a análise da atividade nematicida dos metabólitos secundários, o β-citronelol apresentou as maiores taxas de mortalidade em juvenis J2 de *M. incógnita* (Ochoa-Fuentes *et al.*, 2013).

A partir do metabolismo da glicose são formados praticamente todos os metabólitos primários e secundários. Primeiro a glicose é convertida em moléculas de ácido pirúvico que podem entrar na via do ácido chiquímico para formar os metabólitos secundários aromáticos (alcalóides, ligninas e lignanas, cumarinas e taninos hidrossolúveis) ou o piruvato continua sendo oxidado até a formação de moléculas de acetil-coenzima A (acetil-CoA). Estas podem seguir para a via do ácido cítrico, a do mevalonato e a condensação do acetato. Na via do ciclo do ácido cítrico, serão formados os alcaloides, na via do mevalonato origina os terpenoides e os esterois, e a condensação do acetato resulta nas acetogeninas. Uma combinação de uma unidade do ácido chiquímico e uma ou mais unidades do acetato, ou derivados destes, pode resultar na produção dos flavonoides e dos taninos condensados (Buchbauer e Hemetsberger, 2015).

Os metabólitos secundários com maior importância provêm das vias do acetato-malonato, do ácido chiquímico, acetato-mevalonato (MVA) e metileritritol-fosfato (MEP) (Galdeano e Kleingesinds, 2013). Na Figura 13 tem-se uma visão geral das vias dos metabólitos secundários. É possível acessar o mapa completo através do link: Biossíntese dos metabólitos secundários de plantas.

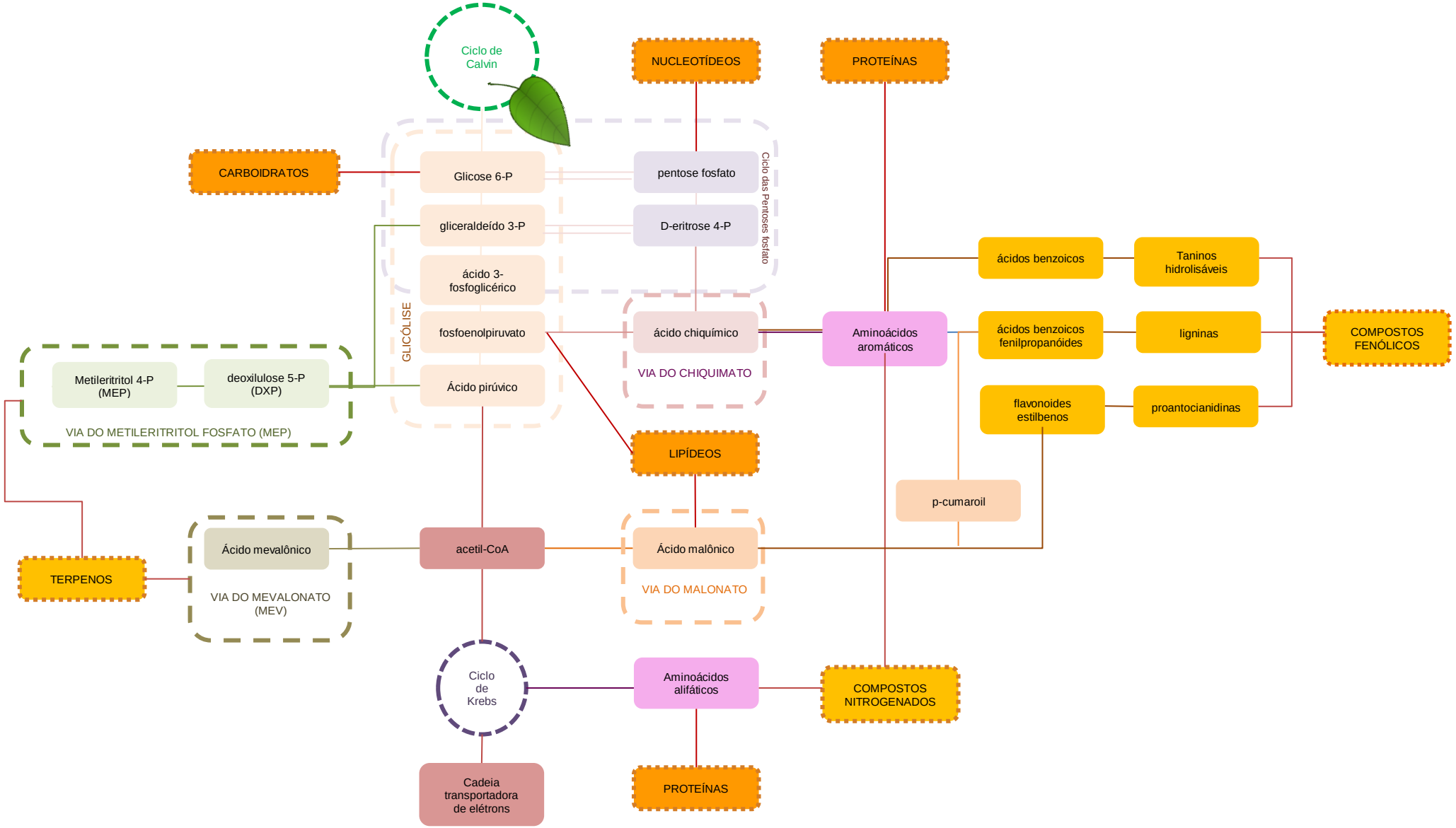


Figura 13 - Esquema geral das vias de biossíntese do metabolismo vegetal secundário e suas conexões com o metabolismo primário (Dewick, 2015).

As diferentes subclasses de policetídeos aromáticos dependem do tipo de molécula utilizada como iniciadora da extensão da cadeia carbônica pela malonil-CoA: se acetil-CoA, ocorrerá a biossíntese das cromonas e das antraquinonas; se for um ácido graxo, haverá a biossíntese dos ácidos anarcádicos; se hexanoil-CoA, a produção de canabinoides; se benzoil-CoA, a biossíntese das bifenilas, dibenzofuranos, benzofenonas e xantonas; se p-cumaroil-CoA, os flavonoides e estilbenos. Estes são considerados compostos de biossíntese mista por utilizarem, como precursores, compostos provenientes da via do ácido chiquímico (benzoil-CoA e p-cumaroil-CoA) e sofrerem extensão da cadeia carbônica através da via do acetato-malonato (Dewick, 2015).

A seguir está apresentado um esquema com a visão geral da via biossintética do acetato-malonato (Figura 14).

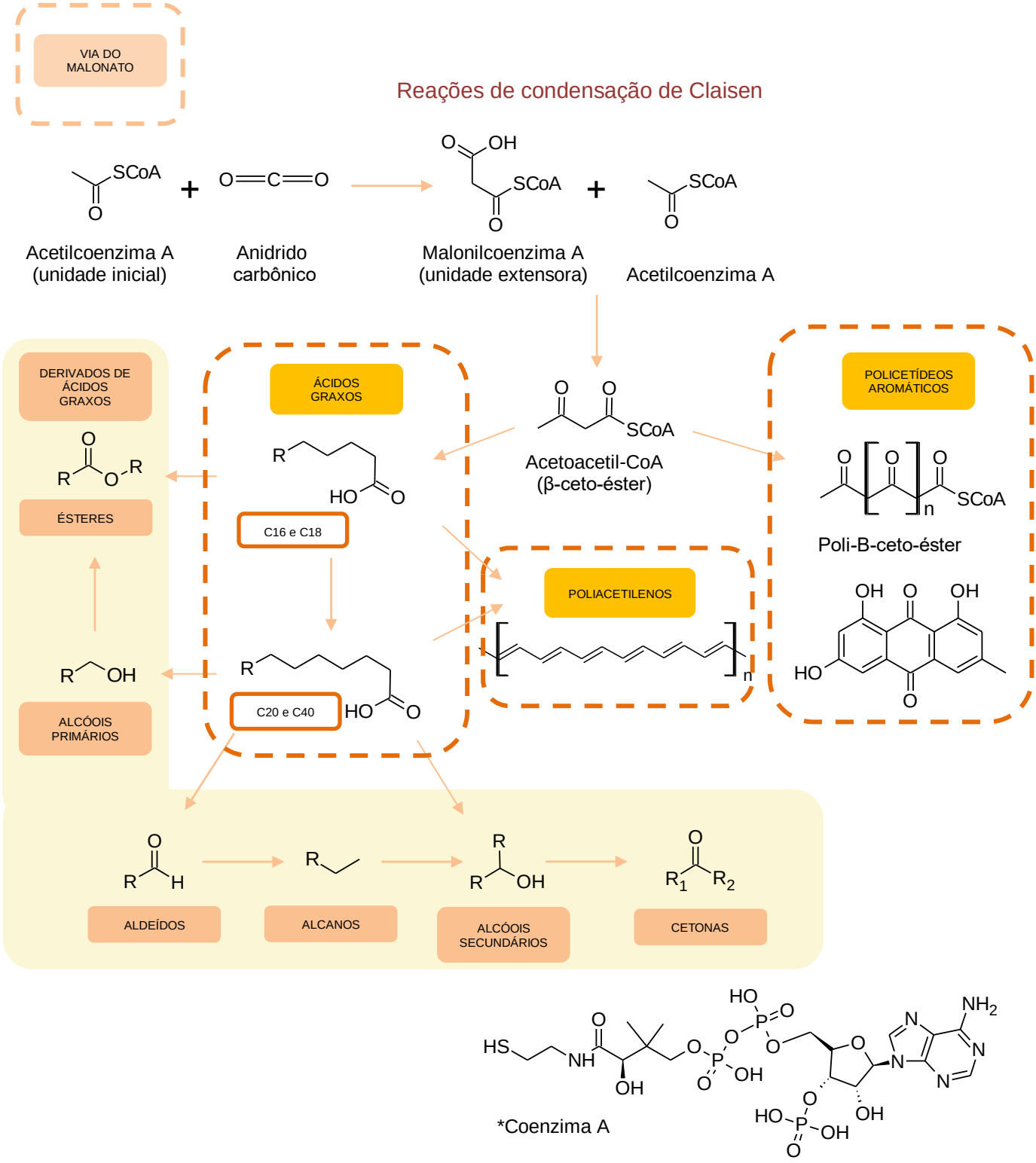


Figura 14 – Esquema da via biossintética do acetato-malonato (Dewick, 2015).

O ácido chiquímico (ou ácido 3,4,5-trihidroxi-1-ciclohexeno-1-carboxílico), originalmente obtido das sementes de anis estrelado chinês (*Illicium religiosum* Sieb.), é um intermediário hidroaromático envolvido na síntese de metabólitos aromáticos em plantas e microrganismos e não está presente em mamíferos (Ghosh, Chisti e Banerjee, 2012). O ácido chiquímico exibe atividade antioxidante, anticoagulante e antitrombótico, antibacteriano, anti-inflamatório, agente analgésico e há relatos sobre a síntese de agentes anticâncer, antibacterianos, hormônios ou herbicidas à base de ácido chiquímico. O corismato é atualmente a matéria-prima para a síntese do antiviral, Oseltamivir (Tamiflu®), procurado como uma defesa contra a gripe aviária (Dewick, 2015; Estévez e Estévez, 2012; Ghosh, Chisti e Banerjee, 2012). Também fornece precursores para a biossíntese de ácido fólico (folato), ligninas e a maioria dos alcaloides de plantas e microrganismos (Estévez e Estévez, 2012).

A via do chiquimato pode ser chamada de via do ácido corísmico, ou corismato, visto que esse composto é o intermediário chave e de ramificação para a maioria dos compostos secundários produzidos em plantas. A maioria dos compostos aromáticos vegetais provem dessa via (Seigler, 1998).

A seguir está apresentado um esquema com a visão geral da via biossintética do chiquimato (Figura 15).

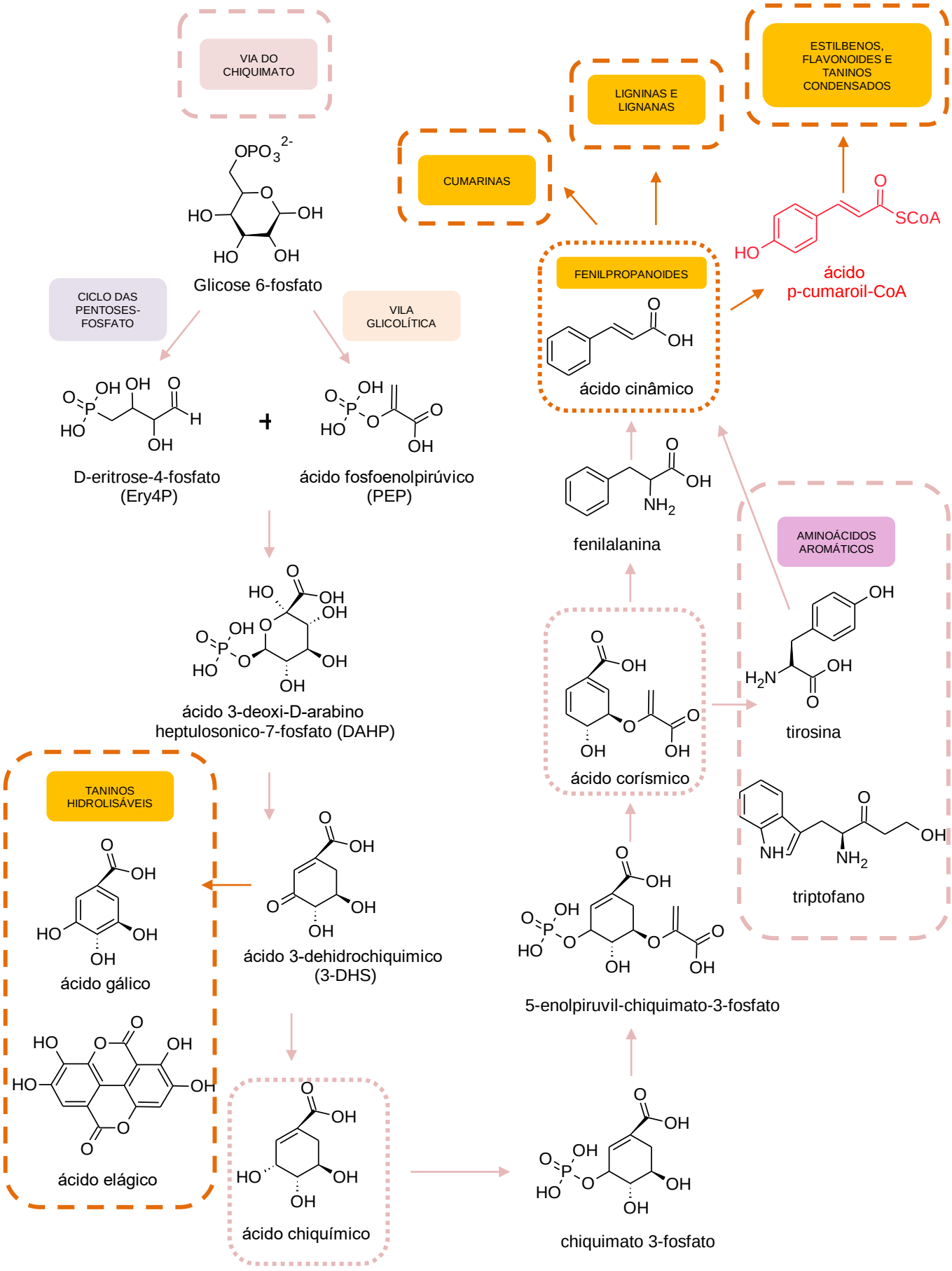


Figura 15 - Esquema da via biossintética do chiquimato (Dewick, 2015).

Na via dos fenilpropanoides, o ácido cinâmico é a molécula de partida para a síntese de cumarinas, ligninas e lignanas, e também para biossíntese dos flavonoides, estilbenos e taninos condensados que se dá pela condensação de cumaroil-CoA (via do chiquimato) com três moléculas de malonil-CoA (via do acetato-malonato) (Dewick, 2015).

As cumarinas, assim como os taninos, que exibem toxicidade contra herbívoros, possuem importante ação contra herbívoros, e seu efeito tóxico está relacionado à sua capacidade de se ligar e desnaturar as proteínas. As fitoalexinas, são sintetizadas nas plantas em resposta à infecção por microrganismos e nematoides. Alguns têm uma estrutura típica para terpenóides ou estilbenos (Kulbat, 2016). Os flavonoides podem ocorrer na forma livre (agliconas) e como glicosídeos, e diferem em seus substituintes (tipo, número e posição) e na sua insaturação (Pinheiro e Justino, 2012).

A estrutura dos flavonoides baseia-se em um anel aromático, contendo um ou mais substituintes hidroxila (Vuolo, Lima e Maróstica Junior, 2018) sua medição pode ocorrer facilmente por meio de espectrofotometria devido à existência de duas bandas UV-Vis, características em flavonoides (banda I, na faixa de 300 a 550 nm, proveniente do anel B, e banda II, na faixa de 240 a 285 nm, surgindo do anel A) (Pinheiro e Justino, 2012).

Os flavonoides compõem uma grande classe de metabólitos em plantas, atuando como nematicidas, nemastáticos (inibindo o movimento), repelentes e inibidores de incubação de ovos, principalmente os da classe dos flavonois (kaempferol, quercetina e miricetina), isoflavonoides e pterocarpanos (medicarpina e glicolina). Kaempferol inibe a eclosão de ovos; kaempferol, quercetina e miricetina são repelentes e nemastático para juvenis de *Meloidogyne*; e medicarpina também inibe a motilidade. Possuem ainda ação antioxidante, evitando o dano oxidativo às células, protegem as plantas de estresse biótico e abiótico, atuam como filtro UV, atuando como moléculas-sinal, compostos alelopáticos, fitoalexinas, agentes desintoxicantes, compostos de defesa antimicrobianos, e têm forte potencial contra nematoides. Esses compostos também têm um efeito bioquímico que inibe algumas enzimas, como a aldose redutase, xantina oxidase, fosfodiesterase, ATPase, lipoxigenase, ciclooxigenase (Jain, Khatana e Vijayvergia, 2019; Sato, Kadota e Shirasu, 2019).

A seguir está apresentado um esquema com a visão geral da via dos flavonoides, estilbenos e taninos condensados (Figura 16).

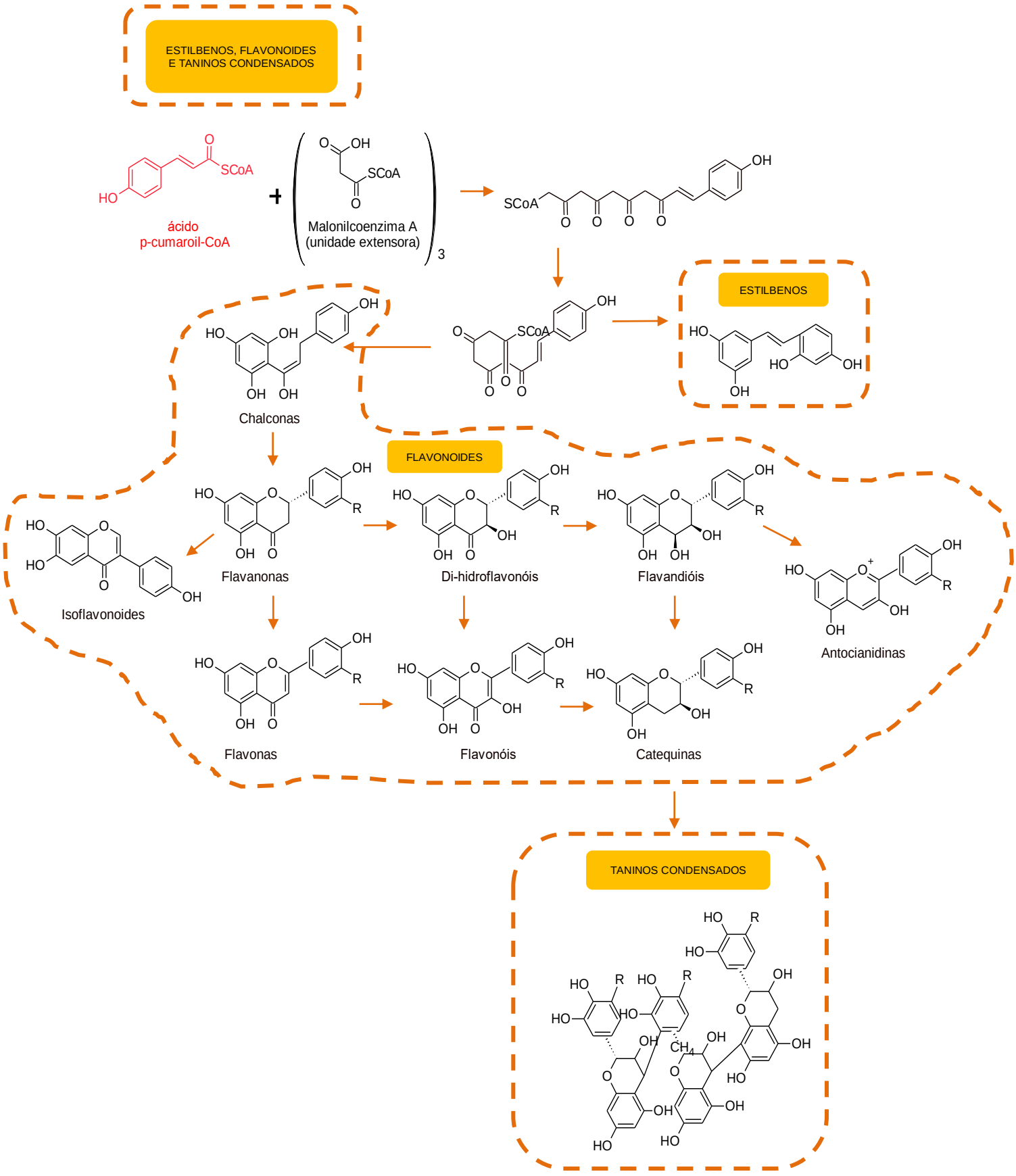


Figura 16 - Biossíntese dos flavonoides, estilbenos e taninos condensados pelas vias do chiquimato e acetato-malonato (adaptado de Dewick, 2015; Estévez e Estévez, 2012) .

Os terpenos (ou terpenoides), sintetizados pelas vias do ácido mevalônico (MVA) e do 2-metil-eritritol-4-fosfato (MEP) ou via do 1-desoxilulose-5-fosfato (DXP), ocorrem predominantemente na natureza como hidrocarbonetos, álcoois e seus glicosídeos, éteres aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos e ésteres e possuem atividade anti-helmíntica (Mirza *et al.*, 2020; Salha, Ben, Abderrabba e Labidi, 2019).

Os terpenos formam classes estrutural e funcionalmente diferentes de compostos pelo acoplamento de diferentes números de unidades de isopreno (5-carbono-base; C5), enquanto os terpenoides representam os terpenos contendo oxigênio e as principais classes estruturais dos terpenos são: monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), hemiterpenos (C5), diterpenos (C20), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) (Srivastavaa e Singh, 2019).

A via do MEP fornece os precursores para a síntese de monoterpenos, carotenoides, apocarotenoides e a cadeia lateral de clorofilas, tocoferois e prenilquinonas, enquanto a via do MVA, para a formação de triterpenos, sesquiterpenos, fitosterois, ubiquinona, vitamina D e metabólitos primários importantes para a integridade celular (Felipe e Bicas, 2017; Simkin *et al.*, 2011). Os monoterpenos (MTs) são os componentes mais abundantes em óleos essenciais, cerca de 90% da composição (Salha, Ben, Abderrabba e Labidi, 2019).

Os terpenos são constituintes de compostos do metabolismo secundário função na transdução de sinal, reprodução, comunicação, aclimatação, mecanismos de defesa, atrativos de polinização, inibidores de herbívoros, inseticidas e repelentes, compostos antibacterianos, alelopáticos e moléculas tóxicas, antioxidantes, termotolerantes e fotomoléculas de proteção superior (Tetali, 2019).

A seguir está apresentado um esquema com a visão geral das vias MVA e MEP na biossíntese dos terpenos (Figura 17).

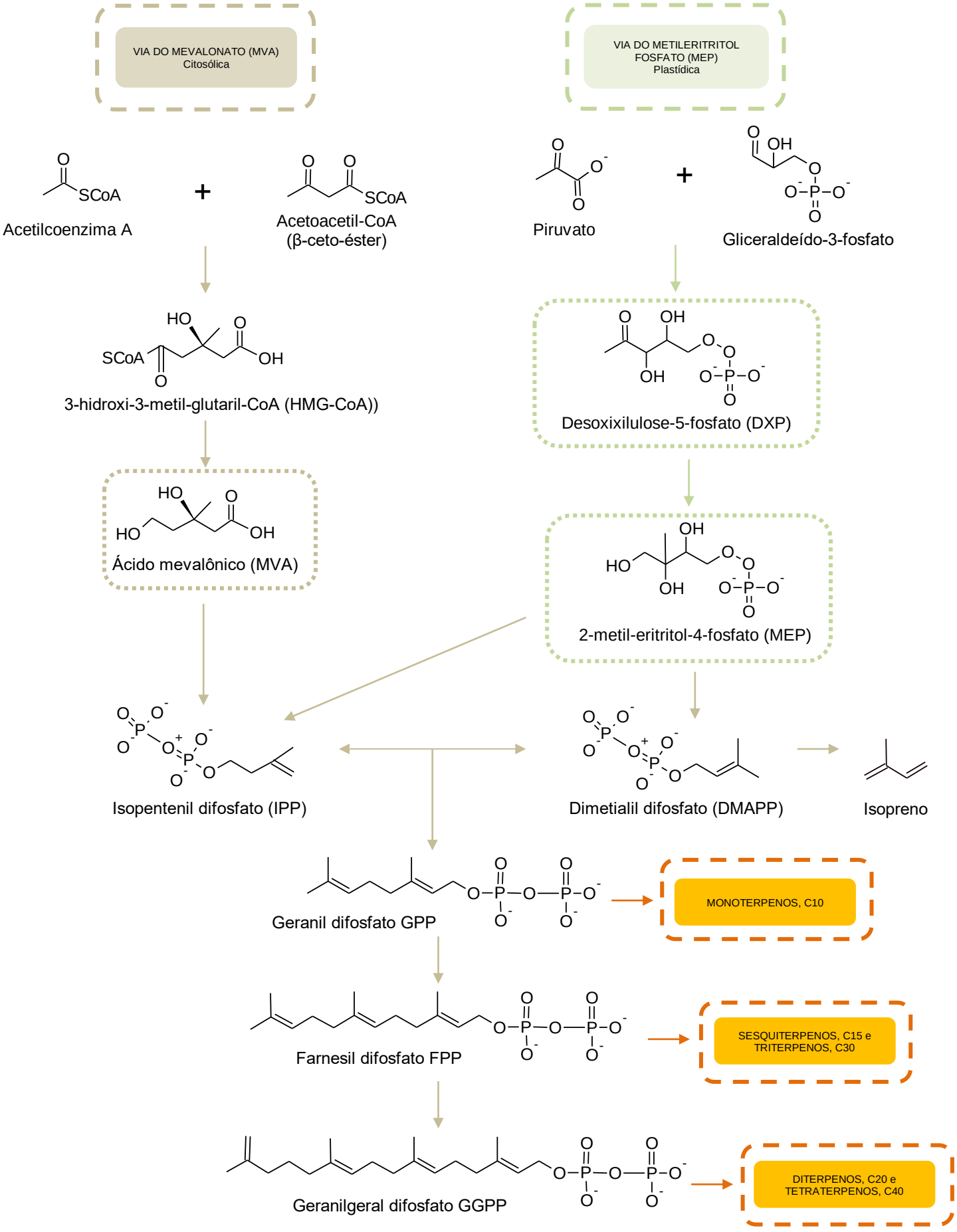


Figura 17 - Esquema das vias MVA e MEP na biossíntese dos terpenos (adaptado de Dewick, 2015).

Os óleos essenciais (OE) são constituídos principalmente por fenilpropanoides e terpenoides, sendo estes os mais abundantes (Buchbauer e Hemetsberger, 2015). Os terpenoides (ou isoprenoides) possuem a capacidade de se difundir facilmente através da membrana celular para induzir reações biológicas na defesa vegetal contra fitopatógenos (Srivastavaa e Singh, 2019). A família das mirtáceas (*Myrtaceae*) se destaca como importante produtora de óleos essenciais (Basaid *et al.*, 2020).

O parasitismo dos nematoides está relacionado aos efetores produzidos pelas glândulas de nematoides (secreções), que manipulam a maquinaria celular e alteram as funções das células da planta hospedeira. Sugere-se que componentes de OEs afetem o sistema nervoso dos nematoides, agindo sobre acetilcolinesterase, uma enzima necessária para a degradação da acetilcolina, que é um principal neurotransmissor no sistema nervoso central. Além disso, alguns aldeídos, como o formaldeído, podem acarretar mudanças irreversíveis nas estruturas das proteínas localizadas na superfície de nematoides (Basaid *et al.*, 2020).

Importantes na defesa de plantas, estão também os metabólicos do grupo dos compostos nitrogenados reconhecidos por sua atividade anti-herbivoria, sendo as três classes mais importantes: os alcaloides, glucosinolatos e glicosídeos cianogênicos. Essas substâncias são formadas a partir de aminoácidos aromáticos e alifáticos (Galdeano e Kleingesinds, 2013) que participam não apenas da absorção do nitrogênio, mas também como precursores de compostos especializados, incluindo hormônios e pigmentos (Castro-Moretti *et al.*, 2020).

Alcaloides são compostos heterocíclicos de nitrogênio derivados de aminoácidos como triptofano, tirosina e lisina. Como metabólitos secundários, sugere-se que desempenham um papel defensivo na planta contra herbívoros e patógenos (Jain, Khatana e Vijayvergia, 2019). Os alcaloides são classificados de acordo com o sistema heterocíclico que contém o átomo de nitrogênio (Himanshu, Jadon e Kishor, 2020) o que não inclui nitrogênio em uma ligação amida ou peptídica (Bribi, 2018; Dahariya *et al.*, 2020).

A seguir está apresentado um esquema com a visão geral da biossíntese dos aminoácidos (Figura 18), ressalte-se que os aminoácidos alifáticos são sintetizados pelo Ciclo de Krebs e os aromáticos, pela via do chiquimato.

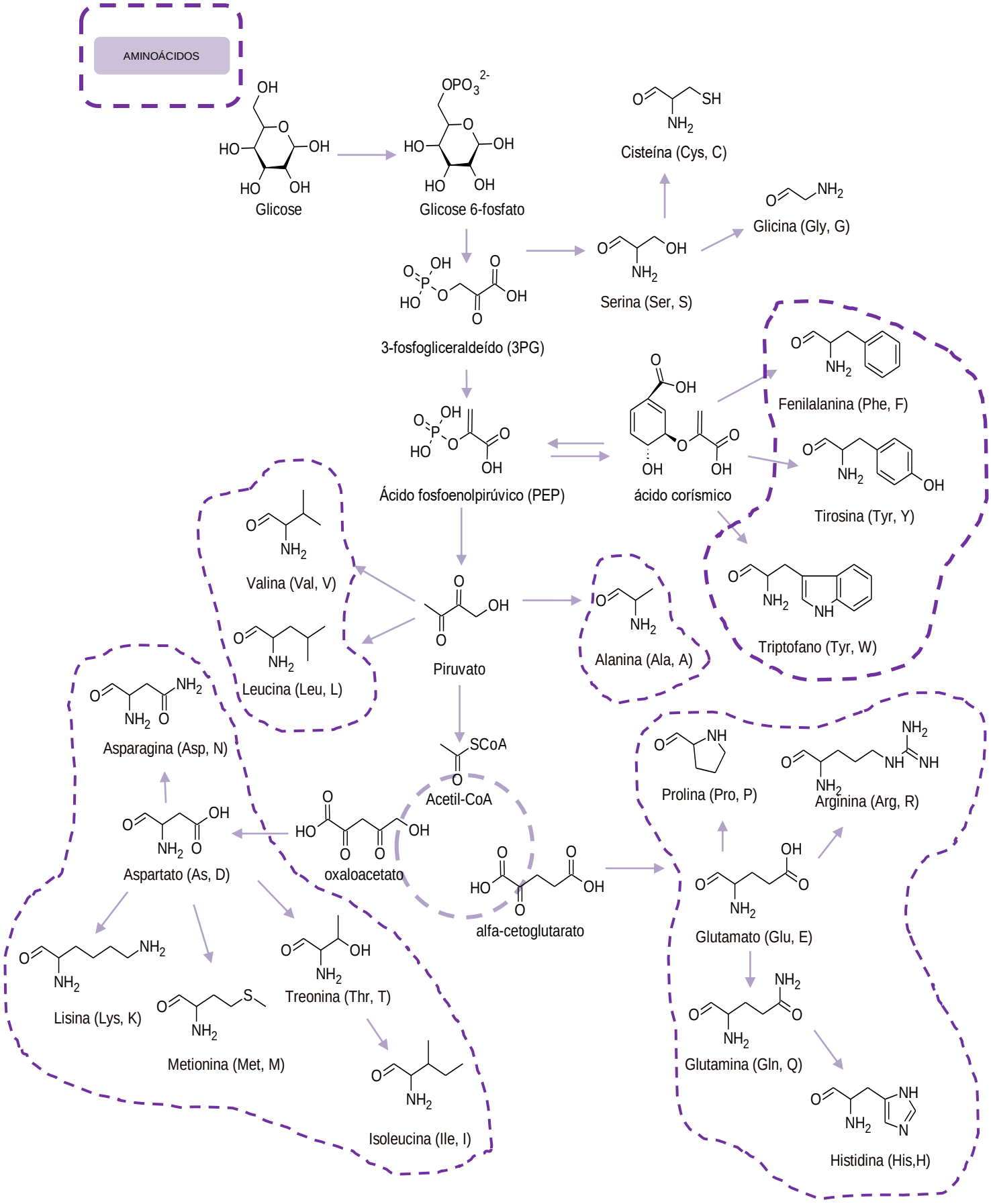


Figura 18 - Esquema da biossíntese dos aminoácidos precursores dos metabolitos nitrogenados (Lehninger e Nelson, 2018).

Estima-se que existam cerca de 400 mil espécies de plantas vasculares na Terra, sendo o Reino Vegetal o responsável pela síntese de 200 mil a 1 milhão de metabólitos, muitos dos quais ainda a ser explorados (Wang *et al.*, 2019), já que foram descritos apenas cerca de 5 mil, em Angiospermas (Galdeano e Kleingesinds, 2013).

A metabolômica é amplamente empregada no estudo de plantas infectadas para compreender seus mecanismos de defesa, analisando as informações obtidas, no metaboloma, após a perturbação em um sistema biológico com modificação em pequenos metabólitos moleculares (Chen, Ma e Chen, 2019). Num trabalho de metabolômica comparativa descrito por Manohar *et al.* (2020), os autores revelaram que uma *Arabidopsis* mutante defeituosa em duas acil-CoA oxidases peroxissomais não foi capaz de metabolizar ascr #18 e com isso não repele nematodos.

Assim, a metabolômica apresenta grande potencial para o estudo de resistência e suscetibilidade de plantas (Castro-Moretti *et al.*, 2020). Poucas informações relacionadas com as respostas moleculares de *Psidium* spp. ao nematoide-das-galhas da goiabeira estão disponíveis. A prospecção de metabólitos secundários induzidos em *Psidium* spp., resistentes e suscetíveis, inoculados e não inoculados com *M. enterolobii*, pode ser uma abordagem a ser utilizada com esse objetivo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este estudo objetivou a prospecção de moléculas do metabólito secundário que apresentem potencial para o controle de *M. enterolobii* em *Psidium* spp. suscetíveis, resistentes e imunes a este nematoide.

2.2. Objetivos específicos

- Preparar mudas de *P. guajava* (suscetível), de *P. guineense* (resistente) e de *P. cattleianum* (imune) para as análises metabolômicas;
- Realizar a análise dos perfis metabolômicos de raízes de *Psidium* spp. submetidas às condições controle e teste obtidos a partir da espectrometria de massas acoplada a cromatografia em fase líquida (LC-MS);
- Determinar os metabólitos secundários diferencialmente produzidos em *Psidium* spp. suscetíveis, resistentes e imunes, inoculados e não inoculados com *M. enterolobii*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material Biológico

Mudas de *P. guineense* (resistente ao nematoide), de *P. guajava* (suscetível ao nematoide – “Paluma”) e de *P. cattleianum* (imune ao nematoide) foram obtidas pela germinação de sementes e mantidas em casa de vegetação na Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, (Latitude: 9°09'S, Longitude 40°22'W, numa altitude de 365,5m) com os devidos tratos culturais com irrigação diária e manual, utilizando substrato à base de solo e areia sem proporção definida.

Aos 30 dias após o plantio, foi realizada a inoculação pela aplicação da suspensão calibrada para conter 10.000 ovos e juvenis de segundo estádio em duas perfurações com 2 cm de profundidade, a 2 cm do caule da muda. Após a inoculação, as perfurações foram preenchidas com o próprio solo da parcela experimental, seguida de uma irrigação leve.

Após 20 dias da inoculação (DAI), no Laboratório de Nematologia da Embrapa Semiárido, foi realizada a coleta de amostras de folhas, caules e de raízes, tendo estas sido lavadas em água corrente para remoção do substrato. As amostras foram liofilizadas, devidamente acondicionadas e transportadas para o Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP), Campos dos Goytacazes, RJ, onde foram realizadas as etapas subsequentes do estudo. Foram preparados *pools* de amostras de raízes das três espécies de estudo, com e sem infecção ao nematoide, totalizando seis amostras (Apêndices A, B e C).

3.2. Análise de perfis metabolômicos por espectrometria de massas acoplada a cromatografia em fase líquida (LC-MS)

3.2.1. Extração de metabólitos secundários

A etapa de extração foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais e Ensaios Biológicos, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LaProNEB-UFRJ).

Para cada condição teste, pesou-se em tubo de vidro, 100 mg de pó de amostra e foram adicionados 2 mL de solvente, mantendo sob agitação, em vórtex, por 15 segundos. O tubo foi então submetido a repouso e o sobrenadante vertido para outro

previamente pesado vazio e seco (peso inicial).

Esse procedimento foi realizado três vezes para cada solvente, na seguinte ordem de afinidade química: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol.

Em seguida, deixou-se secar a amostra, a temperatura ambiente, sob fluxo de ar e o material seco foi ressolubilizado no respectivo solvente de extração. Com auxílio de pipeta Pasteur, para retirada de partículas do pó excedentes, as amostras foram filtradas em funil de vidro e algodão e retransferidas para o frasco original. Ao final da extração de metabólitos, foram obtidos frascos para cada condição teste em quatro frações para cada solvente. Realizou-se novamente a pesagem dos frascos após secagem (peso final). Nesta metodologia de extração, o solvente hexano teve função de limpeza inicial para retirada de ceras vegetais. Ao final, os extratos obtidos para análise foram: diclorometanólico, acetólico e metanólico.

Com isso, a massa de extrato bruto foi calculada e preparada a solução solvente (1:1 metanol/água) para ressolubilização do material extraído a fim de se obter uma concentração final de 1 mg de extrato seco/1 mL solução solvente. Com auxílio de pipeta, 1 mL de cada solução foi transferida para um tubo *vial* utilizando uma membrana descartável de PVDF e disponibilizada para injeção no LC-MS.

3.2.2. Método analítico em LC-MS

Os extratos das amostras para identificação dos metabólitos secundários foram analisados em equipamento de cromatografia líquida (*Dionex Ultimate* 3000) acoplado ao Espectrômetro de Massas (Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap), ambos da marca ThermoFisher Scientific em coluna Ascentis Express C18 (100 mm x 4.6 mm x 2.7 µm) com pré-coluna; vazão de 0.5 ml-min; modo de eluição gradiente: 0-1 min - 15%B; 1-16 min - 15-95%B; 16-21 min- 95%B; 21-22 min- 95-15% B; 22-30 min- 15%. A fase móvel A formiato de amônio 0,1% em água (p/v) e a fase móvel B, acetonitrila com ácido fórmico 0,1% (p/v); temperatura do forno a 40° C; ionização do spray de 3,9 kV; temperatura do capilar a 300 °C, full scan positivo e negativo e energia de colisão normalizada (NCE) com elevação de 35-50%; Este experimento foi realizado sob a coordenado pelo Professor Dr. Rafael Garrett da Costa no setor metabolômica do Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LBCD-LADETEC/IQ-UFRJ).

3.2.3. Processamento e tratamento dos dados cromatográficos

Após a obtenção das impressões digitais metabólicas, os dados foram convertidos de raw para mzML através do software Proteowizard. Os cromatogramas foram alinhados, centralizados e normalizados. Foi realizada a remoção de ruídos e fixação de linha de base apropriada, extração e exportação no software mzMine (versão 2.53)

A análise dos perfis metabolômicos e identificação das substâncias foram realizadas em colaboração com a Professora Michelle Frazão Muzitano, do Laboratório de Produtos Bioativos da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LPBio – UFRJ).

3.2.4. Identificação dos metabólitos

Neste estudo foram comparados os agrupamentos por dendrograma dos metabólitos extraídos por solventes por ordem crescente de polaridade (Figura 19) em amostras analisadas para cada espécie de *Psidium*, sem infecção e após 20 dias de infecção pelo nematoide em que o nível de similaridade é medido ao longo do eixo horizontal e as diferentes observações são listadas ao longo do eixo vertical.

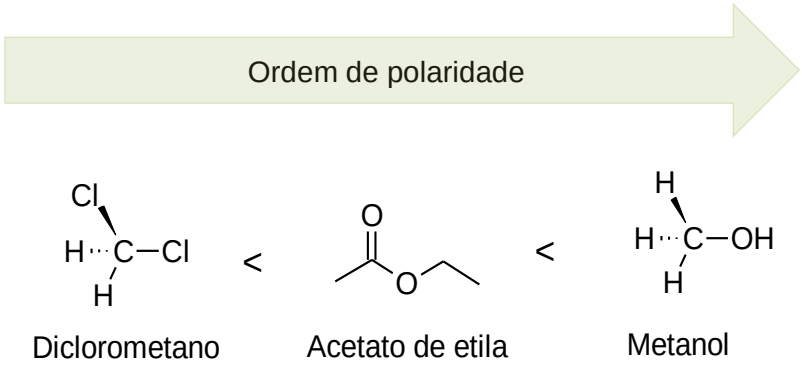


Figura 19 - Ordem crescente de polaridade dos solventes químicos utilizados na extração dos metabólitos.

O dendrograma é um diagrama de árvore que emprega um método quantitativo e exibe agrupamentos de acordo com seus níveis de similaridade. Com sua ordenação hierárquica ascendente, se assemelha aos ramos de uma árvore que se vão dividindo noutros sucessivamente (Arief *et al.*, 2017).

Molecular Networking (redes moleculares) é um método que calcula a similaridade espectral entre a fragmentação de espectrometria de massas, e os resultados são apresentados na forma de redes moleculares. Além disso, permite busca automática em uma biblioteca de espectros acelerando o processo de anotação de metabólitos. Neste trabalho, na plataforma GNPS online (gnps.ucsd.edu) foram carregados os dados e as redes moleculares visualizadas no Cytoscape, buscando agrupamentos de metabólitos diferencialmente produzidos, com base em suas naturezas químicas, estruturais ou relacionadas a eventuais conexões em suas rotas de síntese e atuação.

Os dados foram processados no programa The Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS) e geradas redes moleculares através do software Cytoscape. Com o auxílio dos dados gerados e apresentados na tabela 1, comparando dados espectrais com a literatura através da busca pela fórmula molecular das substâncias no Scifinder, foram identificados os metabólitos.

Por meio de análise dos cromatogramas no programa XCMS Online, foi possível obter tabelas para cada espécie e condição teste com dados de massa molecular do íon precursor e fragmentos de massa. Com isso, foi realizada análise no programa MetaboloAnalyst 5.0 para obtenção de mapas de calor (heatmap). Através de visualização dos cromatogramas no programa mMass, arquivos foram exportados e comparados por bibliotecas NIST para identificação (Gouveia *et al.*, 2019).

4. RESULTADOS

4.1. Comparação por dendrograma do perfil analítico das extrações

Na figura 20 estão as representações gráficas por dendrogramas das extrações metanólicas, acetólicas e diclorometanólicas das espécies *P. guajava* (A), *P.* guineense (B) e *P. cattleianum* (C), infectadas e não infectadas.

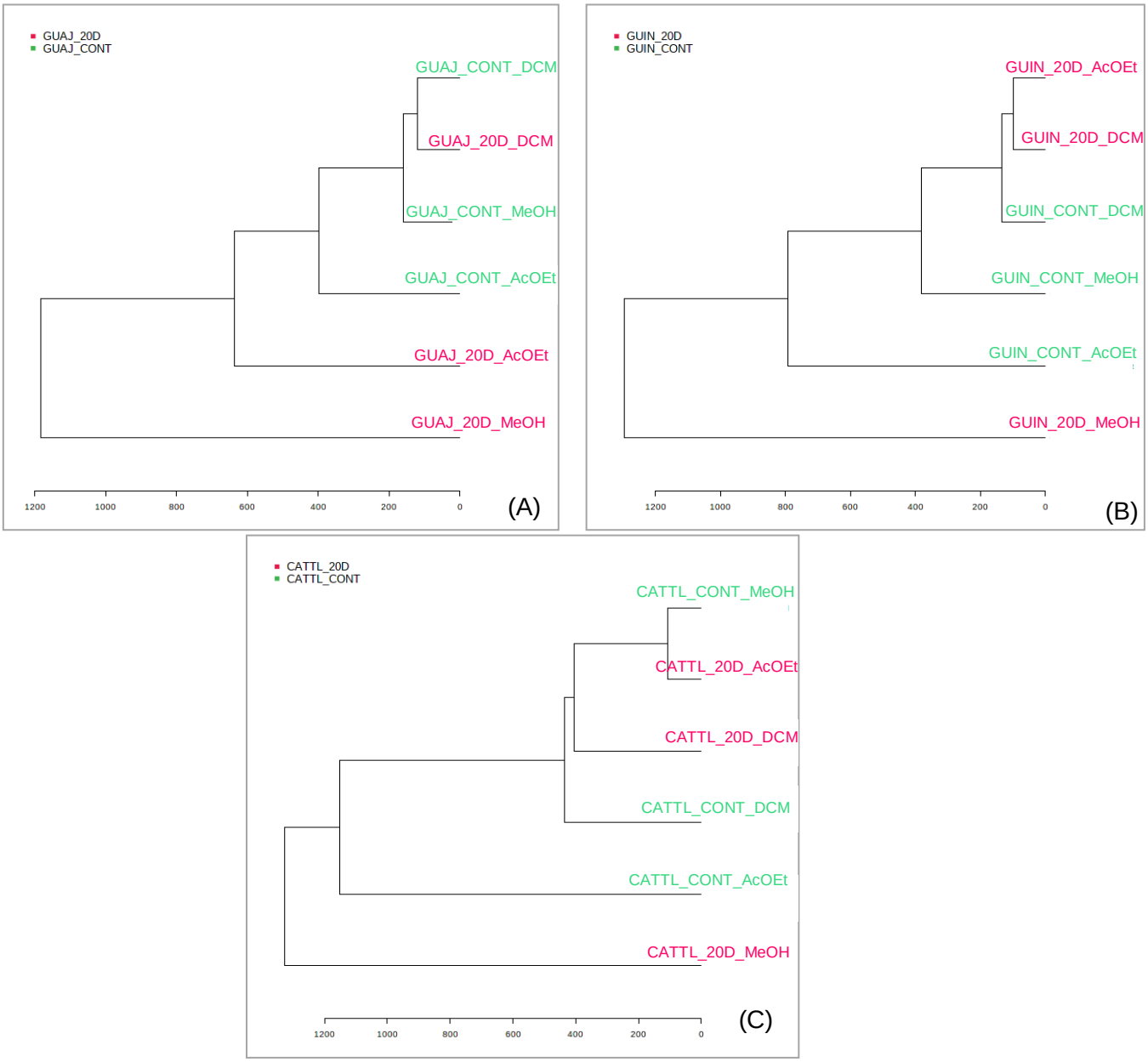


Figura 20 – Dendrogramas para comparação do perfil analítico das extrações com solventes diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH): *P. guajava* (A), *P. guineense* (B) e *P.* cattleianum (C). Em verde tem-se as amostras sem infecção ao nematoide (controle) e vermelho após 20 dias de infecção ao *M. enterolobii*. Gráficos obtidos após tratamento de dados no XCMS Online e gerados no Software MetaboloAnalyst.

4.2. Análises por molecular networking e identificação por buscas no Scifinder

Na figura 21 estão todas as representações gráficas das redes obtidas em Cytoscape, nas quais foram destacados quatro agrupamentos diferencialmente gerados, nomeados de **(A)**, **(B)**, **(C)** e **(D)**, dispostos na figura 22.

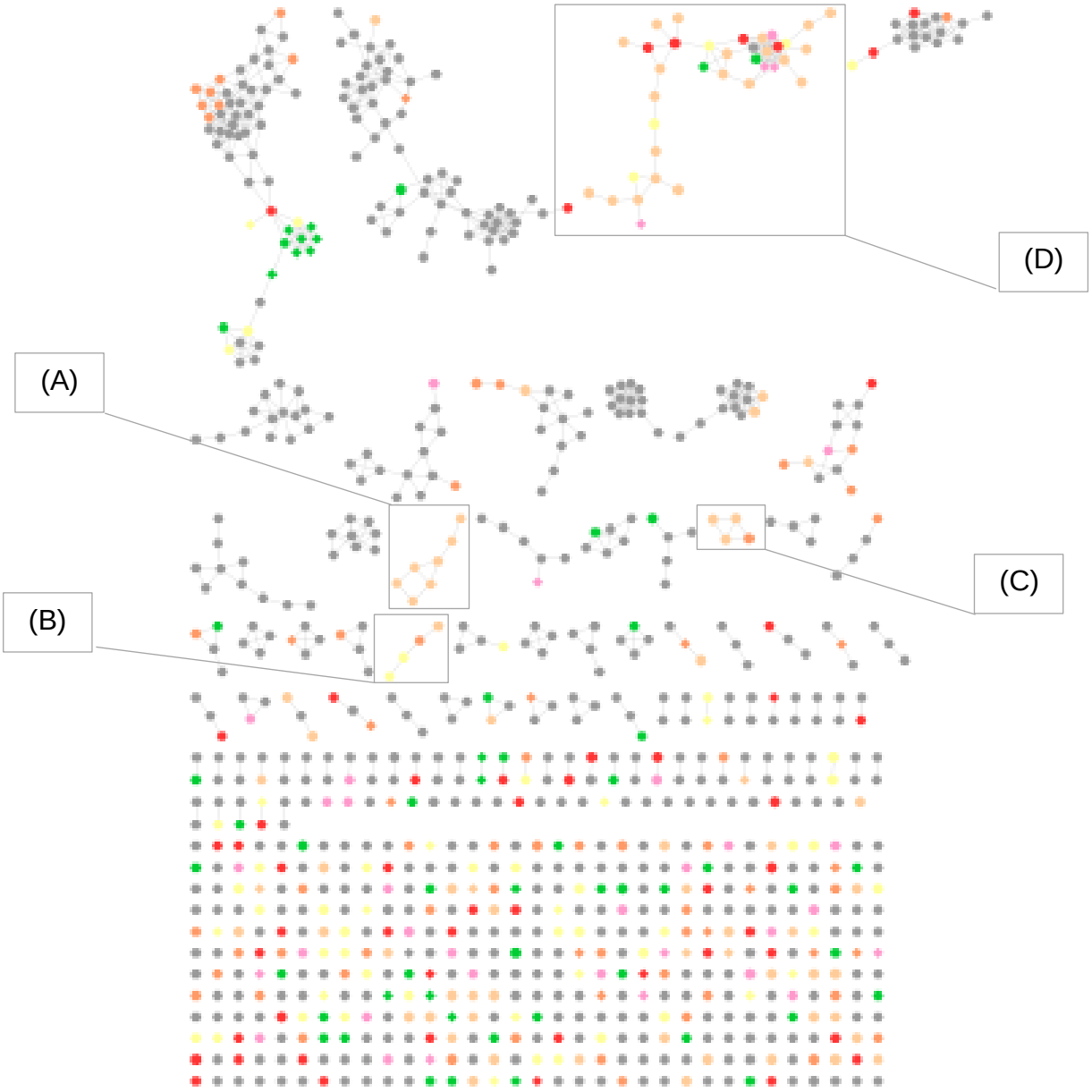


Figura 21 – Representações gráficas de redes moleculares (*molecular networking*) obtidas por análise de dados em *Cytoscape* destacando os agrupamentos A, B C e D diferencialmente expressos das espécies resistente e imune; diamante – apenas controle; elipse – apenas após 20 dias de infecção; hexágono – em amostras controle e após 20 dias de infecção; amarelo – *P. cattleianum*; rosa – *P. guajava*; alaranjado claro – *P. guineense*; verde – *P. cattleianum* e *P. guajava*; vermelho – *P. guineense* e *P. cattleianum*; alaranjado escuro – *P. guineense* e *P. guajava*; e cinza – para as três espécies *Psidium*; os números mostrados nos nodos referem-se à massa molecular da respectiva substância química.

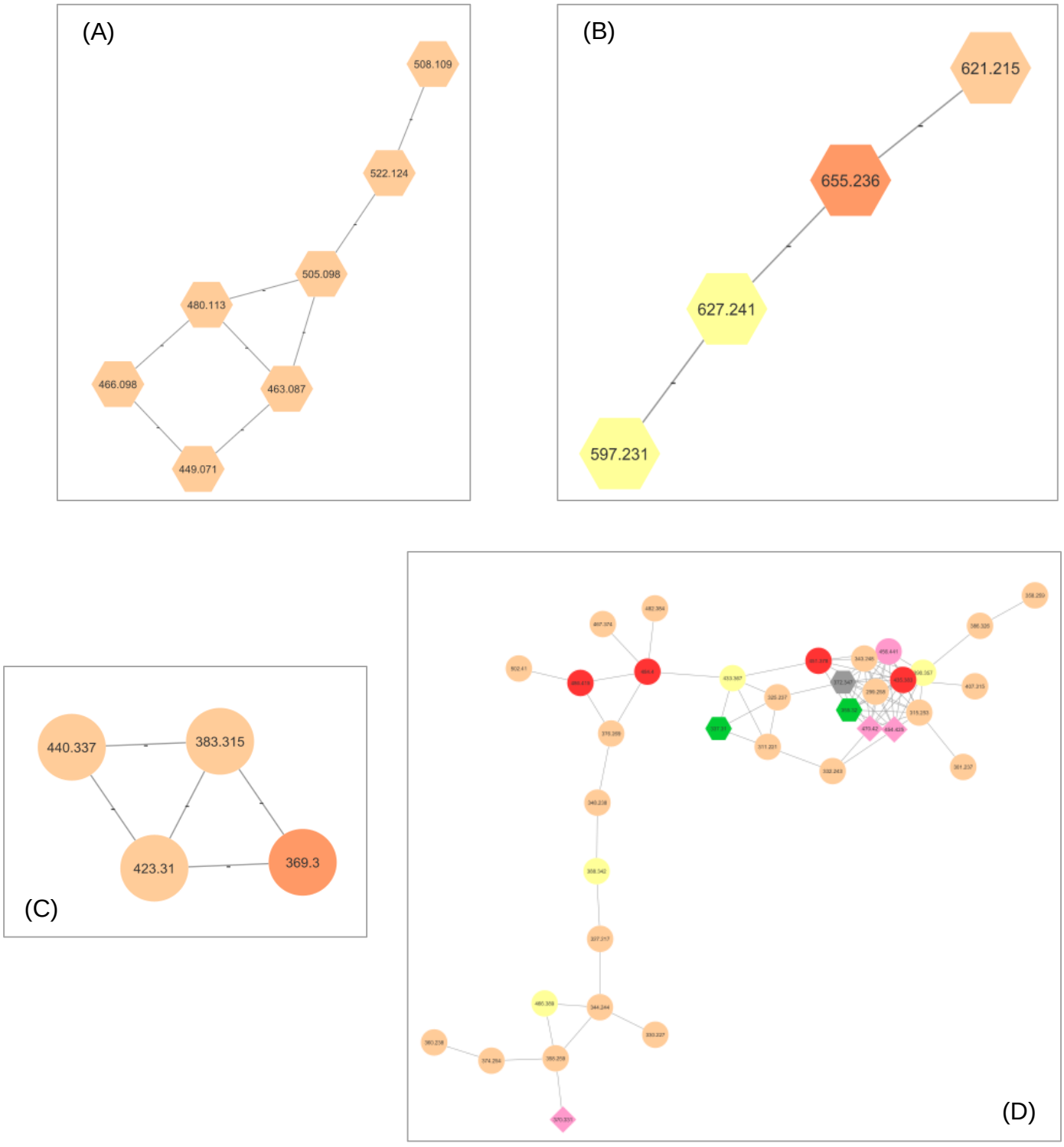


Figura 22 – Representações gráficas de redes moleculares (*molecular networking*) dos agrupamentos: A - substâncias 1 a 7, B – substâncias 8 a 11, C – substâncias 12 a 15, D – substâncias 16 a 40; diamante – apenas controle; elipse – apenas após 20 dias de infecção; hexágono – em amostras controle e após 20 dias de infecção; amarelo – *P. cattleianum*; rosa – *P. guajava*; alaranjado claro – *P. guineense*; verde – *P. cattleianum* e *P. guajava*; vermelho – *P. guineense* e *P. cattleianum*; alaranjado escuro – *P. guineense* e *P. guajava*; e cinza – para as três espécies *Psidium*; os números mostrados nos nodos referem-se à massa molecular da respectiva substância química.

Tabela 1 – Dados dos agrupamentos obtidos em Molecular networking gerados pelo software Cytoscape

Agrupamento	Identificação da substância	Rt (min)	Tempo da coleta	Solvente de extração	Espécie	Massa do precursor	Fragmentos	Fórmula (SIRIUS)	Aduto	Pontuação (%)
A	(1)	13,16	CON, 20D	metanol	GUI	466,098	303,01; 285,00; 129,05; 85,03	C20H19NO12	[M+H]+	99.704
	(2)	13,68	CON, 20D	metanol	GUI	449,071	303,01; 285,00; 257,01; 129,05; 85,03; 71,05	C20H16O12	[M+H]+	99.279
	(3)	14,80	CON, 20D	metanol	GUI	480,113	317,03; 285,00; 129,05; 85,03; 71,05	C21H21NO12	[M+H]+	99.995
	(4)	14,83	CON, 20D	metanol, acetato, dicloro	GUI	463,087	317,03; 302,01; 285,00; 257,01; 129,05; 85,03; 71,05	C21H18O12	[M+H]+	99.997
	(5)	16,26	CON, 20D	metanol	GUI	508,109	395,04; 303,01; 285,00; 189,08; 129,05; 111,04; 83,05; 69,02	C22H21NO13	[M+H]+	99.917
	(6)	17,62	CON, 20D	metanol, acetato, dicloro	GUI	522,124	317,03; 285,00; 189,08; 129,05; 111,04; 83,05; 69,04	C23H23NO13	[M+H]+	95.174
	(7)	17,65	CON, 20D	metanol, acetato	GUI	505,098	317,03; 285,00; 257,01; 189,08; 129,05; 111,04; 83,05	C23H20O13	[M+H]+	99.949

Tabela 1 (continuação)

B	(8)	11,49	CON, 20D	metanol	GUI	621,215	395,15; 381,11; 249,07; 232,07; 218,05; 205,05	C28H38O14	[M+Na]+	98.790
	(9)	12,77	CON, 20D	metanol	CAT	597,231	399,14; 385,13; 204,08; 175,04; 67,50	C30H38O11	[M+Na]+	98.607
	(10)	13,60	CON, 20D	metanol	CAT	627,241	429,15; 232,07; 218,05; 205,05	C28H44O13	[M+K]+	91.790
	(11)	14,00	CON, 20D	metanol, acetato	GUA, GUI	655,236	429,15; 415,14; 245,08; 232,07; 218,05; 205,05	C30H34N6O11	[M+H]+	60.946
C	(12)	24,88	20D	dicloro	GUI	423,31	297,24; 279,23; 169,12; 95,09; 85,07; 81,07	C30H46O	[M+H]+	99.990
	(13)	24.99	20D	dicloro	GUI	440,337	297,24; 279,23; 233,23; 183,14; 95,09; 85,07; 81,07	C25H45NO5	[M+H]+	99,78
	(14)	25,13	20D	acetato, dicloro	GUA, GUI	369,3	324,33; 297,24; 279,23; 169,12; 135,12; 109,10; 95,09; 81,07; 69,07;57,07	C22H40O4	[M+H]+	100
	(15)	25,44	20D	dicloro	GUI	383,315	297,24; 279,23; 261,22; 233,23; 183,14; 95,09; 81,07	C23H42O4	[M+H]+	99.736

Tabela 1 (continuação)

	(16)	18,45	20D	dicloro	GUI	348,238	153,13; 135,12; 99,08; 91,06	C17H33NO6	[M+H]+	99.515
	(17)	18,68	20D	dicloro	GUI	360,238	175,10; 169,12; 151,11; 115,08; 83,09	C18H33NO6	[M+H]+	99.961
	(18)	20,22	20D	dicloro	GUI	330,227	277,18; 175,10; 153,13; 139,11; 121,10; 95,09	C17H31NO5	[M+H]+	99.999
	(19)	20,49	20D	dicloro	GUI	327,217	175,07; 153,13; 135,12; 99,08	C18H30O5	[M+H]+	99.997
	(20)	21,69	20D	dicloro	GUI	344,244	175,10; 153,13; 135,12; 89,06; 69,05	C18H33NO5	[M+H]+	98.008
D	(21)	22,42	20D	dicloro	GUI	358,259	323,22; 189,11; 153,13; 135,12; 69,05	C19H35NO5	[M+H]+	99.681
	(22)	23,21	20D	metanol	CAT	388,342	171,14; 153,13; 135,12; 99,08; 85,07; 81,07	C22H45NO4	[M+H]+	100
	(23)	20,06	20D	dicloro	GUI	301,237	240,23; 173,15; 155,14; 137,13; 129,09; 83,09	C17H32O4	[M+H]+	100
	(24)	20,20	20D	dicloro	GUI	376,269	189,11; 155,14; 137,13; 99,08; 95,09; 81,07	C19H37NO6	[M+H]+	99.347
	(25)	20,39	20D	dicloro	GUI	358,259	187,10; 155,14; 137,13; 123,08; 95,09; 88,08; 81,07	C19H35NO5	[M+H]+	100

Tabela 1 (continuação)

	(26)	20,68	20D	dicloro	GUI	332,243	155,14; 137,13; 127,11; 123,12; 95,09; 81,07	C17H33NO5	[M+H]+	99.963
	(27)	20,91	20D	dicloro	GUI	315,253	173,15; 155,14; 137,13; 95,09; 81,07	C18H34O4	[M+H]+	99.999
	(28)	21,27	20D	dicloro	GUI	311,221	275,20; 175,10; 155,14; 137,13; 95,09; 81,07	C18H30O4	[M+H]+	100
	(29)	21,48	20D	dicloro	GUI	343,248	189,11; 155,14; 137,13; 95,09; 81,07	C19H34O5	[M+H]+	99.997
	(30)	22,18	20D	dicloro	GUI	325,237	189,11; 155,14; 137,13; 95,09; 81,07	C19H32O4	[M+H]+	99.995
D	(31)	22,54	20D	metanol	CAT	390,357	305,91; 155,14; 137,13; 95,09; 81,07	C22H47NO4	[M+H]+	100
	(32)	23,07	CON,20D	acetato, dicloro	GUI, CAT	330,264	243,18; 199,11; 155,14; 139,11; 137,11; 95,09; 93,07; 81,07; 69,07;	C18H35NO4	[M+H]+	99.998
	(33)	23,50	CON	acetato	GUA	353,305	153,13; 83,05	C22H40O3	[M+H]+	99.999
	(34)	23,98	CON, 20D	metanol, acetato	GUA, CAT	355,32	155,14; 137,13; 95,09; 81,07; 71,05	C22H42O3	[M+H]+	100
	(35)	24,15	20D	metanol	CAT	433,367	297,24; 279,23; 183,14; 153,13; 137,13; 95,09; 81,07	C28H48O3	[M+H]+	99.981

Tabela 1 (continuação)

	(36)	24,69	20D	dicloro	GUI	386,326	215,16; 197,15; 155,14; 137,13; 95,09; 88,08; 81,07	C22H43NO4	[M+H]+	100
	(37)	24,75	20D	dicloro	GUI	407,315	263,24; 245,23; 127,07; 109,07; 85,07; 81,07	C25H42O4	[M+H]+	99.999
D	(38)	24,80	20D	dicloro	GUI	299,258	155,14; 137,13; 95,09; 81,07	C18H34O3	[M+H]+	99.998
	(39)	25,55	CON	acetato	GUA	470,42	263,24; 245,23; 173,15; 155,14; 137,13; 95,09; 81,07	C28H55NO4	[M+H]+	100
	(40)	25,66	20D	metanol	CAT	466,389	279,23; 153,13; 83,05; 69,07	C28H51NO4	[M+H]+	99.950

**P. guajava* – GUA, **P. guineense* - GUI; **P. cattleianum* - CAT; *Controle (sem infecção) – CON; *20 dias após a infecção – 20D

A substância $C_{20}H_{16}O_{12}$ **(2)**, de precursores de MM 449,071 [M+H]+ e fragmentos 303,01; 285,00; 257,01; 129,05; 85,03; 71,05, quando comparando-se seus dados espectrais com a literatura via busca pela fórmula molecular no Scifinder, apresentou similaridade às substâncias: ácido elágico-ramnosídeo, de *Nymphaea alba* (Bakr *et al.*, 2017); compostos fenólicos de *Eucalyptus* spp. e de cortiça industrial (Bakr *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2012, 2013); ácido metilelágico-pentose, descrito em *Eucalyptus globulus* (Santos *et al.*, 2011); ácido 3-metilelágico-3′-O-β-D-xilopiranosídeo com efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios obtidos a patir de *Poncianella pyramidalis* (Moraes *et al.*, 2020); eschweilenol C (um derivado do ácido elágico) avaliando os efeitos antimaláricos da *Terminalia albida* e suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, e de *Eugenia moraviana,* com atividade antioxidante e anti-leishmania (Camara *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2020); e ácido elágico-desoxihexosídeo, num estudo dos componentes fenólicos de *P. guajava* (Díaz-de-Cerio *et al.*, 2016).

O ácido elágico-ramnosídeo é um isômero de posição do eschweilenol C, no qual há apenas a mudança na configuração absoluta do C1 da ramnose. Portanto, os dois são ramnosídeos de ácido elágico. A alpha-L-ramnose é a mais comum na natureza, sugerindo que a substância **(2)** se trata do ácido elágico 3-O-α-ramnopiranosideo.

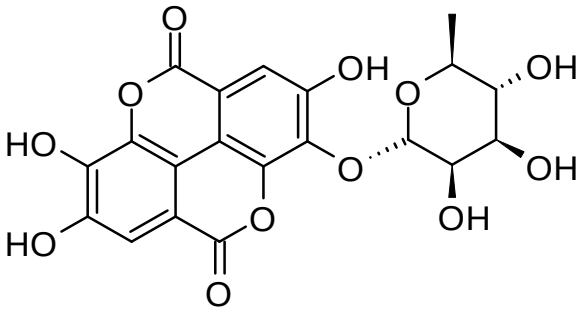
A substância $C_{21}H_{18}O_{12}$ **(4)**, de precursores de MM 463,087 [M+H]+ e fragmentos de 317,03; 302,01; 285,00; 257,01; 129,05; 85,03; 71, 05 apresenta similaridade com ácido 4-O-metilelágico 3-O-L-ramnopiranosídeo, apresentado no estudo de fenólicos de folhas de *Canarium pimelae* com atividade antioxidante (Wu *et al.*, 2017). Apresenta estrutura semelhante à substância **(2)** que possui apenas 14 unidades de massa a mais, indicativa de uma metila. Apenas com o espectro de massas não é possível afirmar a posição dessa metila na estrutura do ácido elágico.

Não foram encontradas referências de substâncias com origem em produtos naturais para as moléculas $C_{20}H_{19}NO_{12}$ **(1),** $C_{21}H_{21}NO_{12}$ **(3)**, $C_{22}H_{21}NO_{13}$ **(5)** e $C_{23}H_{23}NO_{13}$ **(6)**. A substância **(1)** apresenta semelhança à **(2)**, com diferença de 17 unidades de massa. Pela comparação da fórmula molecular tem-se um indicativo de ser uma aminação no açúcar, pois a aglicona, um agrupamento não glicídico que forma parte de um glicosídeo, é a mesma da substância 2. Da mesma forma, a substância **(3)** em relação a **(4)**.

A substância $C_{23}H_{20}O_{13}$ **(7)**, de precursor de MM 505, 098 [M+H]+ e fragmentos

de 317,03; 285,00; 257,01; 189,08; 129,05; 111,04; 83,05 apresentou similaridade com ácido O-metilelágico correlacionado com acetil-ramnose, derivado do ácido elágico dos frutos de *Eucalyptus globulus* Labill (Guo e Yang, 2005) com estrutura semelhante à substância **(4)**, mas com a ramnose acetilada.

Com isso, sugere-se que o agrupamento **(A)** é formado por substâncias da classe dos taninos hidrolisáveis, tendo o ácido elágico como seu representante (Figura 23). Essas moléculas foram diferencialmente produzidas na espécie resistente, *P. guineense*, antes e após a infecção ao nematoide *M. enterolobii* e extraídas na fração metanólica.



Ácido elágico-ramnosídeo

Figura 23 - Estrutura química do ácido elágico correlacionado com ramnose pertencente a classe dos taninos hidrolisáveis, representante do agrupamento (A).

No agrupamento **(B)**, iniciado pela substância $C_{28}H_{38}O_{14}$ **(8)**, de precursores de MM 621,215 [M+Na]+ e fragmentos de 395,15; 381,11; 249,07; 232,07; 218,05; 205,05 apresentou similaridade às substâncias: lignana, descrita em estudo de perfis de ervas chinesas (Chen *et al.*, 2016); dendromonilisídeo E, de extrato de *Ilex pubescens* e no estudo metabolômico de *Dendrobium officinale* (Fang *et al.*, 2020; Yang, J. *et al.*, 2020); picraquassiosídeo C, no estudo do gênero botânico *Plantago* (Zhou *et al.*, 2013); lignanas bioativas dos rizomas de *Acorus gramineus* ligraminol B (Kim, Kim, *et al.*, 2011); isoeleutosídeo C, policetídeo de *Eleutherine bulbosa* (Gallo *et al.*, 2010); e glucopiranosídeos (Sun *et al.*, 2015; Takara *et al.*, 2003).

A substância $C_{30}H_{38}O_{11}$ **(9)**, de precursores de MM 597,231 [M+Na]+ e fragmentos de 399,14; 385,13; 204,08; 175,04; 67,50 apresentou similaridade à substância leptolepisol B, dentre os sete novos sesquineolignanos neuroprotetores isolados das sementes de *Crataegus pinnatifida* (Cheng *et al.*, 2019); dentre novos

lignanos das raízes de *Datura metel* (Yang *et al.*, 2018); e lignanas isoladas das raízes de *Solanum melongena* (Yang *et al.*, 2020).

Não foram encontradas referências de substâncias com origem em produtos naturais para as moléculas $C_{28}H_{44}O_{13}$ **(10)** e $C_{30}H_{34}NO_{11}$ **(11).** Neste agrupamento, a substância **(8)** está presente em *P. guineense*, enquanto a substância **(9)** obtida de *P. cattleianum.* Nesse grupo, a substância **(11)**, não identificada, pertence as espécies *P. guajava* e *P. guineense* representando um nodo de conexão entre as substâncias (8) e (9). A partir dos dados encontrados na literatura, sugere-se que as moléculas desse cluster pertencem à classe das lignanas. Vale ressaltar que todas as substâncias desse grupo estão presentes no extrato metanólico nos tempos controle e após 20 dias de infecção ao nematoide, assim como no agrupamento (A). Na figura 24 estão dispostas as estruturas químicas de lignanas sugeridas para este agrupamento.

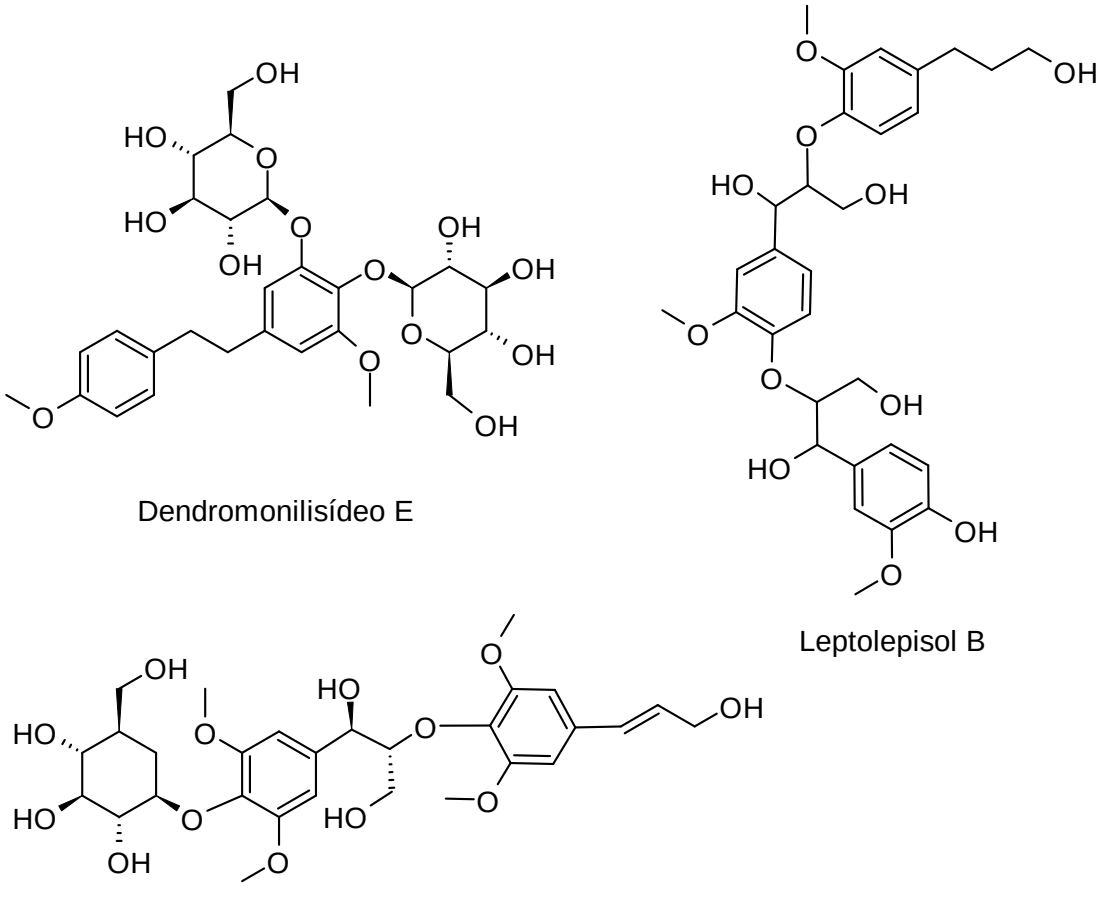
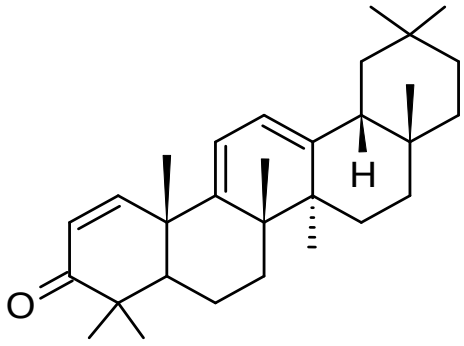


Figura 24 - Estruturas químicas do dendromonilisídeo E, picraquassiosídeo C e leptolepisol B pertencentes a classe das lignanas, representantes do agrupamento (B).

No agrupamento **(C)**, iniciado pela substância $C_{30}H_{46}O$ **(12)**, de precursores de MM 423,31 [M+H]+ e fragmentos de 297,24; 279,23; 169,12; 95,09; 85,07; 81,07 apresentou similaridade às substâncias: calotroprocerol A, novo triterpeno do tipo ursano da casca da raiz de *Calotropis procera* (Ibrahim *et al.*, 2012)*;* cornusalterin D, triterpenóide tirucallane de *Cornus walteri* (Kim, Choi, *et al.*, 2011); cucurbita-1,5,22,24-tetraen-3-ol, triterpenóide antioxidante de *Momordica charantia* (Liu *et al.*, 2010)*;* taraxast-1,20(30)-dien-3-ona, triterpeno de *Sida acuta* (Chen *et al.*, 2007); 3,4-secocicloartano, triterpeno do exsudato de *Gardenia urvillei* (Mai *et al.*, 2016)*;* olean-9(11),12-dien-3-one, de resina *Cola nítida,* com efeito inibitório a *Trypanosoma cruzi* (Frankenberger *et al.*, 2018)*.*

A substância $C_{22}H_{40}O_4$ **(15)**, de precursores de MM 383,315 [M+H]+ e fragmentos de 324,33; 297,24; 279,23; 169,12; 135,12; 109,10; 95,09; 81,07; 69,07; 57,07 apresentou similaridade às substâncias: 3-metil-3-hidroxi-2-hexadec-7-enil-4-oxopentanoato, sesquiterpenóide citotóxico de *Zygogynum* spp. (Winteraceae), da floresta tropical da Caledônia (Allouche *et al.*, 2009).

Nesse grupo, todas as substâncias estão presentes em *P. guineense*, apenas nas amostras obtidas após 20 dias de infecção. Não foram encontradas referências de substâncias com origem em produtos naturais para a molécula $C_{25}H_{45}NO_5$ **(13).** A molécula **(14)**, não identificada, pertencente também a *P. guajava,* sugerindo que biologicamente essas duas espécies apresentam similaridade. É importante destacar que as substâncias desse cluster foram obtidas em frações diclorometanólicas, sugerindo sua natureza química apolar. Com a análise dos dados obtidos, estima-se que esse agrupamento pertença a classe dos terpenos. Na figura 25 está a estrutura química da oleana-9(11), 12-dien-3-ona representante do agrupamento **(C)**.



Oleana-9(11),12-dien-3-ona

Figura 25 - Estrutura química da oleana-9(11), 12-dien-3-ona pertencente a classe dos terpenos, representante do agrupamento (C).

Quanto ao agrupamento **(D)**, não foram encontradas referências de substâncias com origem em produtos naturais para as moléculas **(16)** a **(40)**. Dentre essas, apenas **(33)**, **(34)** e **(39)** pertencem a espécie suscetível, *P. guajava*. As demais, estão presentes nas espécies resistente e imune, *P. guineense* e *P. cattleianum*, respectivamente.

A maior parte das substâncias foram produzidas em *P. guineense* após a infecção ao nematoide e extraídas em fração diclorometano, demostrando a afinidade química apolar destas moléculas. As substâncias **(22)**, **(31)**, **(35)** e **(40)** estão presentes apenas na fração metanólica de *P. cattleianum*; substâncias **(33)** e **(39),** estão presentes na fração acetólica de *P. guajava*; substância **(32)** está em frações de diclorometano e acetato de etila, nas espécies *P. guineense* e *P. cattleianum* e substância **(34)** está presente nas frações de metanol e acetato de etila de ambas as espécies *P. guajava* e *P. cattleianum*.

4.3. Análises por sobreposição dos cromatogramas com identificação por bibliotecas NIST

Nas imagens abaixo estão apresentadas as sobreposições dos cromatogramas das frações diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) obtidas das amostras de raízes das espécies *P. guajava* (Figura 26), *P. guineense* (Figura 27) e *P. cattleianum* (Figura 28), nas condições controle (sem infecção, em verde) e após 20 dias de infecção pelo nematoide *M. enterolobii* (em vermelho). Os dados cromatográficos apresentados serão detalhados nessa e na próxima sessão.

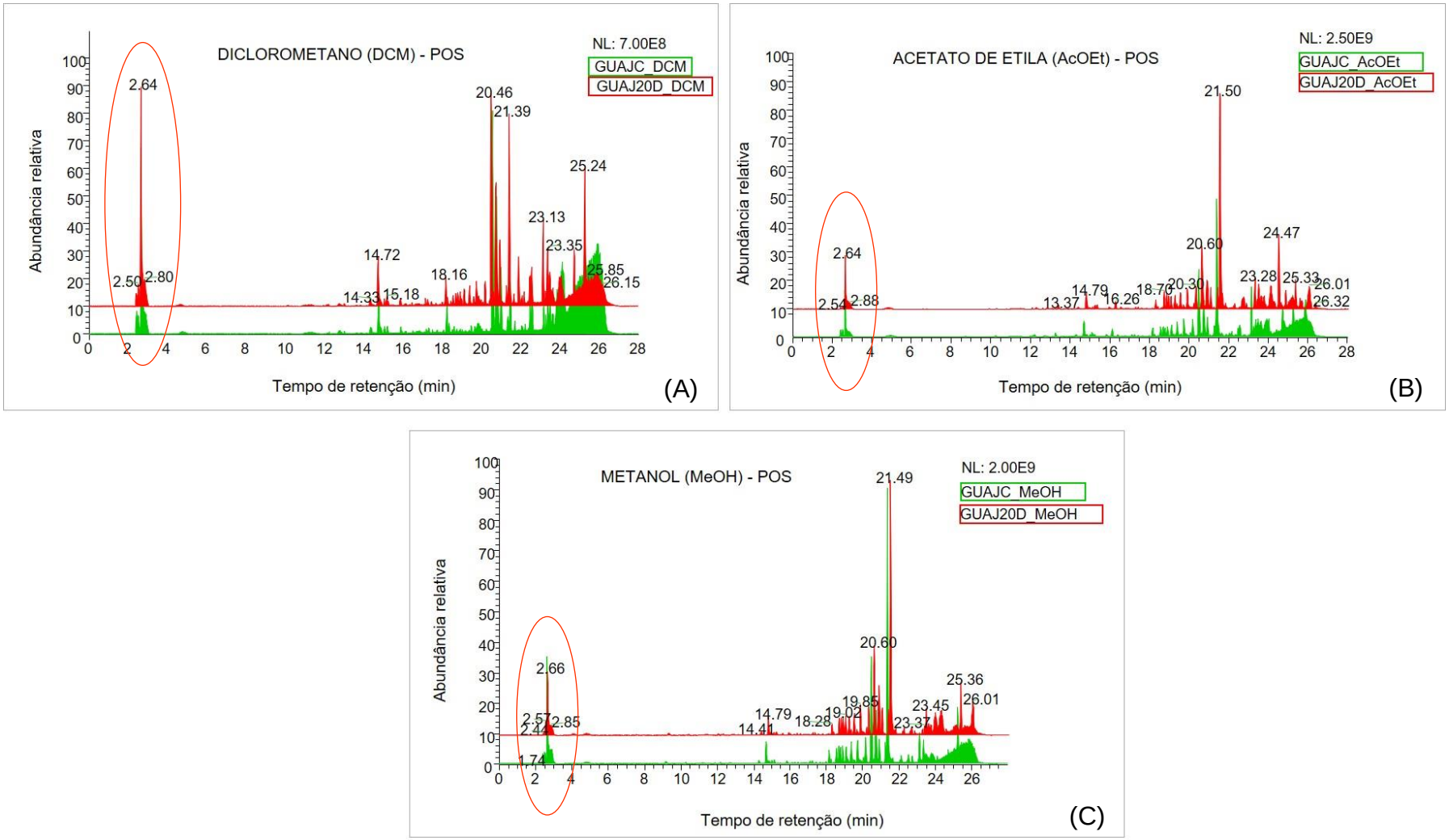


Figura 26 – Perfil comparativo dos cromatogramas das frações diclorometano (DCM) (A), acetato de etila (AcOEt) (B) e metanol (MeOH) (C) obtidas por análise de *P. guajava* nas condições controle (GUAJC, em verde) e após 20 dias de infecção (GUAJ20D, em vermelho) em LC-MS.

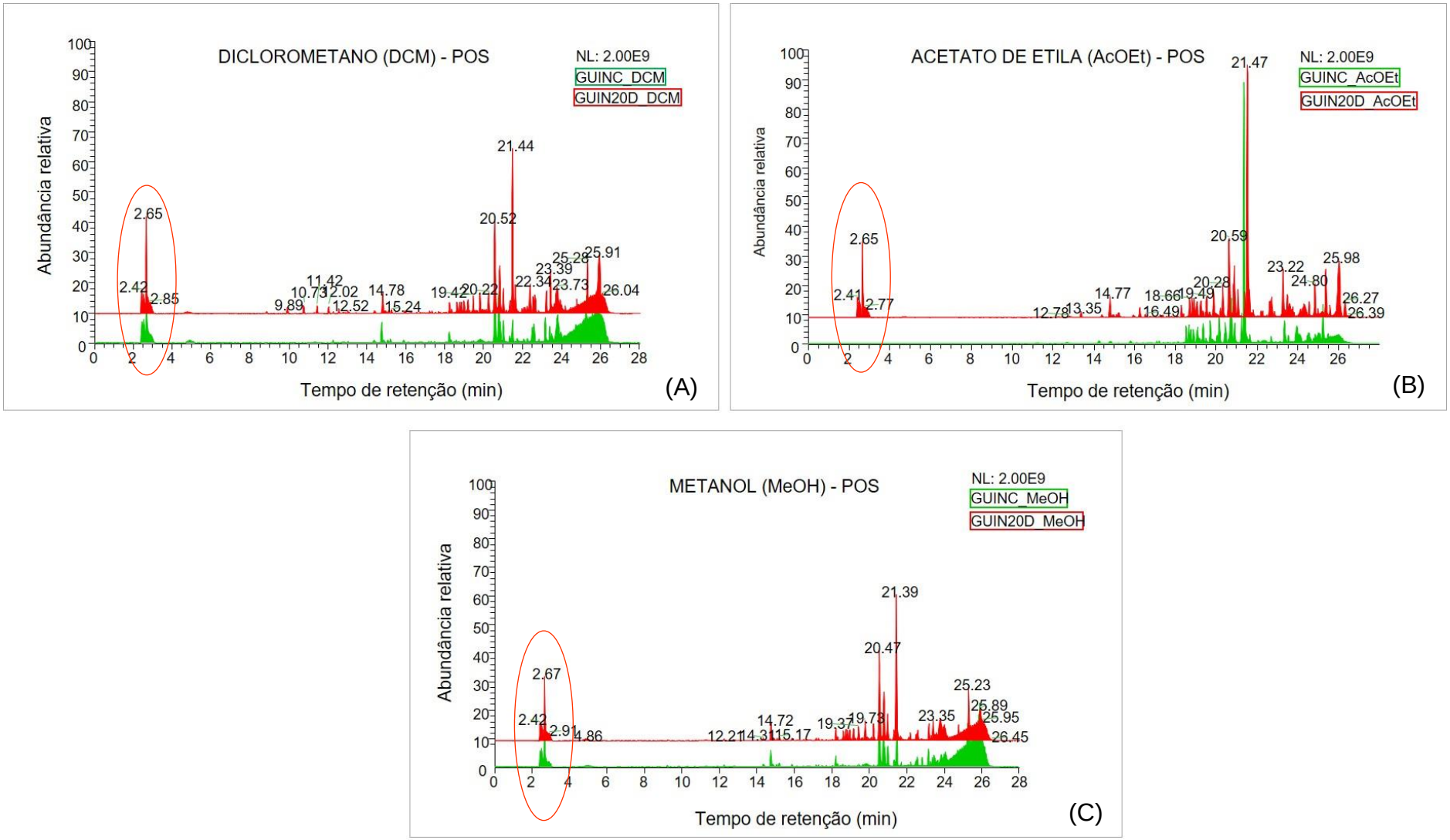


Figura 27 – Perfil comparativo dos cromatogramas das frações diclorometano (DCM) (A), acetato de etila (AcOEt) (B) e metanol (MeOH) (C) obtidas por análise de *P. guineense* nas condições controle (GUINC, em verde) e após 20 dias de infecção (GUIN20D, em vermelho) em LC-MS.

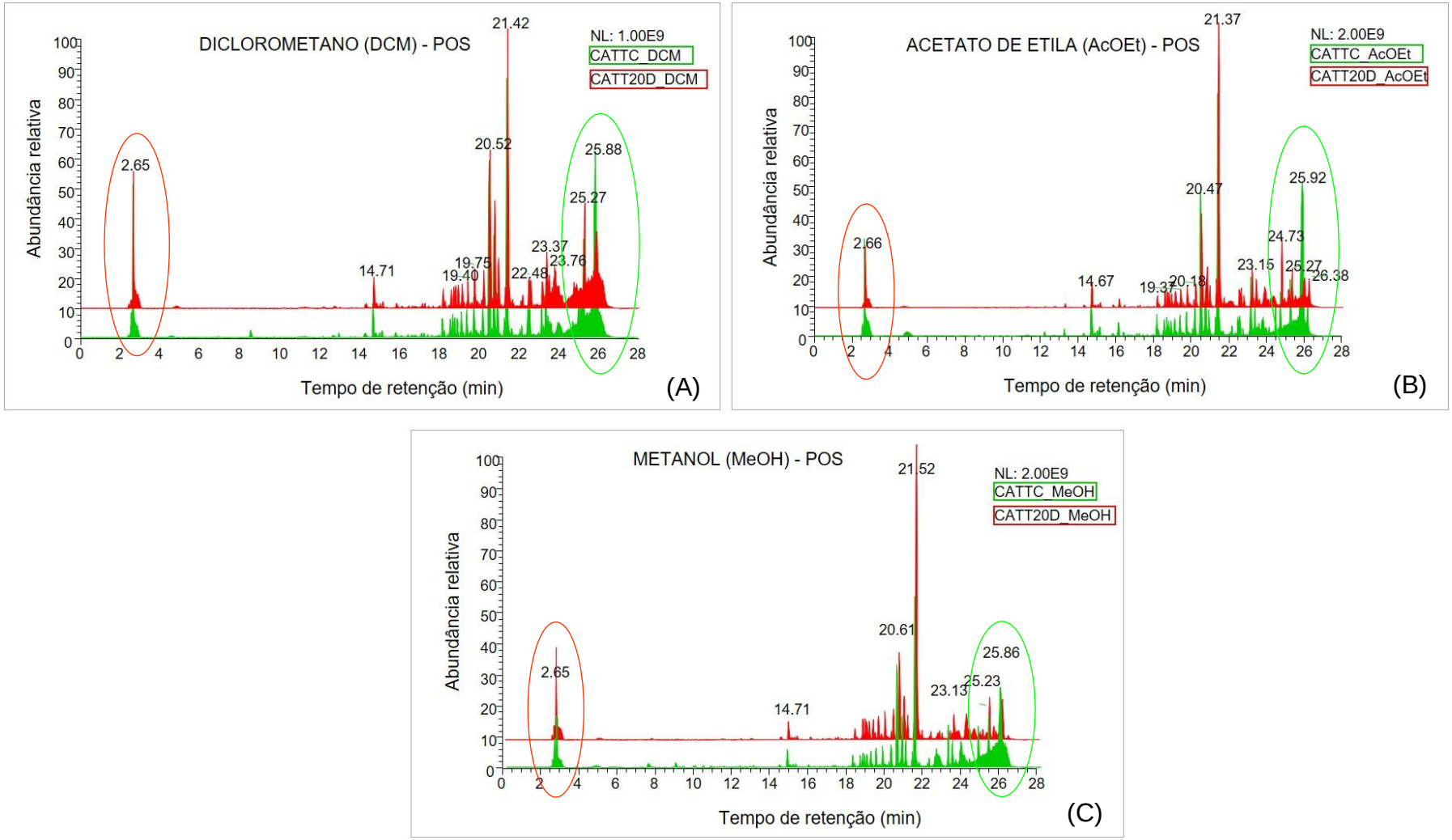
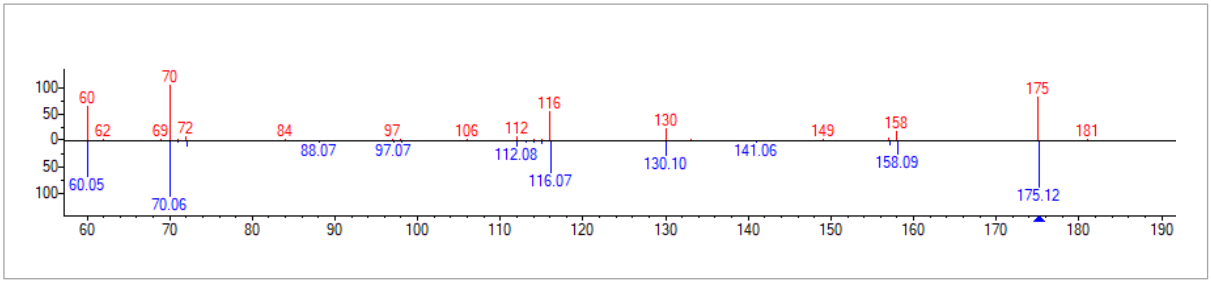
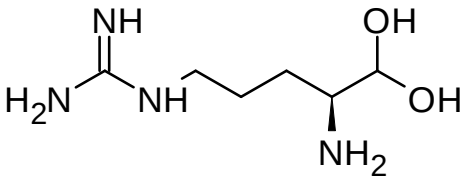


Figura 28 – Perfil comparativo dos cromatogramas das frações diclorometano (DCM) (A), acetato de etila (AcOEt) (B) e metanol (MeOH) (C) obtidas por análise de *P. cattleianum* nas condições controle (CATTC, em verde) e após 20 dias de infecção (CATT20D, em vermelho) em LC-MS.

Nas três espécies de estudo, pode-se observar um pico expresso no tempo de 2.64 – 2.67 min (marcado em círculo vermelho, nas figuras 26, 27 e 28), indicando o aumento da produção dessa substância após o tempo de infecção. Na figura 29 tem-se os espectros dos fragmentos obtidos dessa substância (em vermelho, da amostra e em azul, das bibliotecas NIST), sugerindo L-arginina de íon precursor de MM 175 e estrutura molecular $C_6H_{14}N_4O_2$.



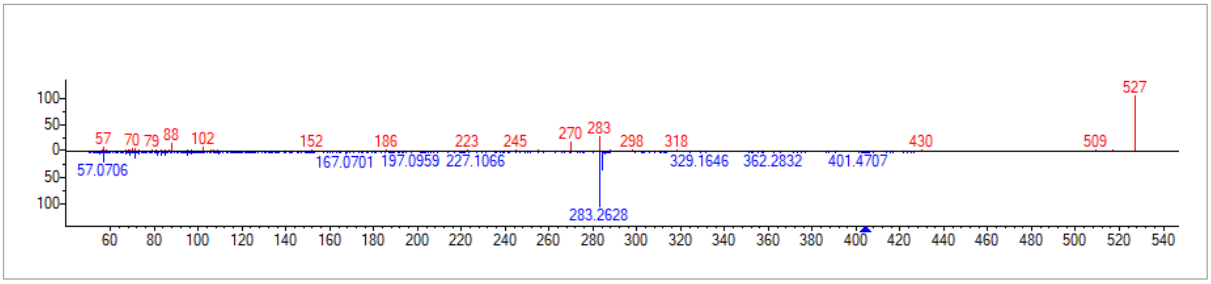


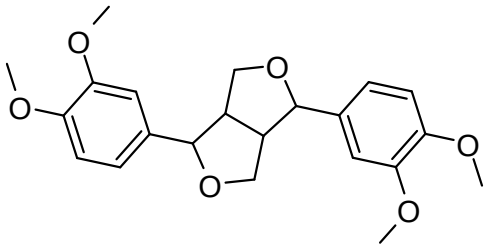
L-arginina

Figura 29 – Imagens espectrais dos fragmentos de massa obtidos, apresentados em vermelho, da substância retira entre 2.64 – 2.67 min, seguidos pela estrutura química da substância L-arginina (C6H14N4O2), identificada por fragmentos em azul comparados com bibliotecas NIST.

Nos gráficos, os longos picos apresentados entre 21.42 – 21.50 min, de acordo com análise dos fragmentos, indicam haver um acúmulo de substâncias de diferentes massas moleculares.

Em *P. cattleianum*, observa-se um pico diferencialmente expresso no tempo retenção de 25.86 – 25.92 min (marcado em círculo verde, na figura 28), indicando a redução da produção dessa substância após o tempo de infecção. Na figura 30, tem-se os espectros dos fragmentos obtidos dessa substância (em vermelho, da amostra e em azul, das bibliotecas NIST), sugerindo ser eudesmina de íon precursor de MM 527 e estrutura molecular $C_{22}H_{26}O_6$.





Eudesmina

Figura 30 – Imagens espectrais dos fragmentos de massa obtidos, apresentados em vermelho, da substância retira entre 25.86 - 25.92 min, seguidos pela estrutura química da substância eudesmina (C22H26O6), identificada por fragmentos em azul comparados com bibliotecas NIST.

4.4. Análises por heatmap com identificação por bibliotecas NIST

Nas figuras 31, 32 e 33 estão as representações gráficas por heatmap obtidas com as cinquenta substâncias extraídas em solvente diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), com maiores picos de intensidade espectrais correlacionadas às concentrações. Nos três gráficos para cada espécie *Psidium*, observa-se que houve uma alteração do metaboloma das três espécies de estudo, no qual algumas substâncias tiveram os picos aumentados após os 20 dias de infecção, enquanto outras reduzidas.

Na figura 31, *P. guajava*, na fração diclorometanólica (A), 32%; na fração acetólica (B), 44%; e na fração metanólica, 32% das substâncias tiveram um aumento na intensidade do pico após o período de infecção pelo nematoide.

Nas três extrações (DCM, AcOEt e MeOH), as substâncias M174T22_1 e M174T22_2, presentes apenas em *P. guajava* (espécie suscetível), apresentaram diminuição após o período de infecção ao nematoide *M. enterolobii*. Nessa mesma espécie, M194T3_3 apresentou aumento na mesma condição teste.

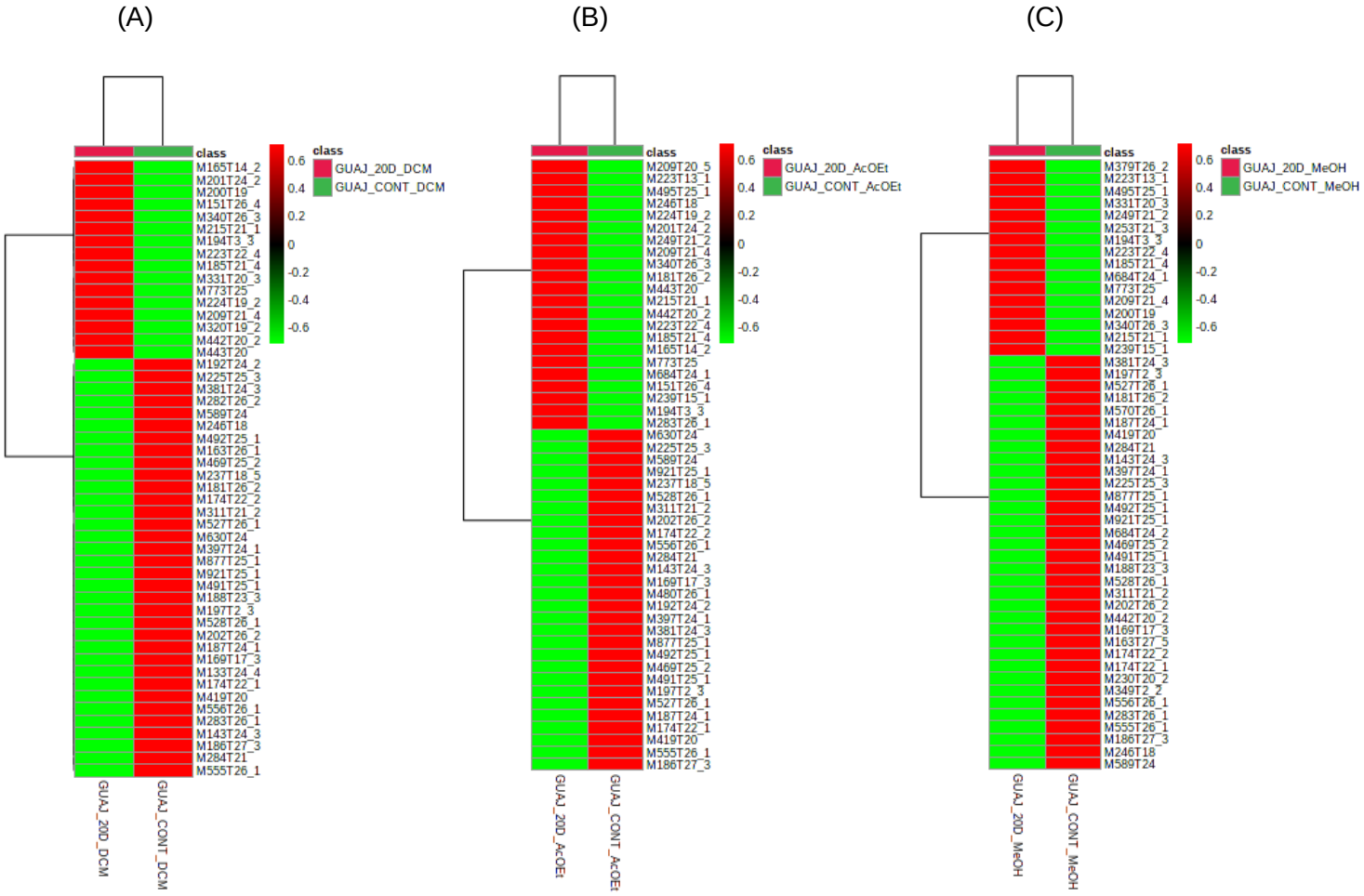


Figura 31 – Representações gráficas por *heatmap* obtidas pelo software *MetaboloAnalyst 5.0* com as cinquenta substâncias com maiores picos de intensidade de amostras extraídas em diclorometano (DCM) (A), acetato de etila (AcOEt) (B) e metanol (MeOH) (C) obtidas por análise de *P. guajava* nas condições controle (GUAJ_CONT, em verde) e após 20 dias de infecção (GUAJ_20D, em vermelho).

Na figura 32, *P. guineense*, na fração diclorometanólica (A), 52%; na fração acetólica (B), 42%; e na fração metanólica, 68%, das substâncias tiveram um aumento na intensidade do pico após o período de infecção pelo nematoide.

Em *P. guineense* (espécie resistente), M303T22_4 e M303T24_3, referentes à fração AcOEt apresentaram aumento após período de infecção. Aumentos após a infecção também foram registrados para as substâncias M171T8 e M171T3_4 e M166T20 e M166T26_5, da fração DCM, M171T3_4, da fração AcOEt; M166T26_5, da fração MeOH. Na fração MeOH, não houve aparecimento de substâncias com íon precursor de MM 171 dentre os picos majoritários, bem como íon precursor de MM 166 na fração AcOEt. Nas três frações dessa espécie, as substâncias M128T21 e M128T25_2 apresentaram redução na mesma condição teste pós-infecção.

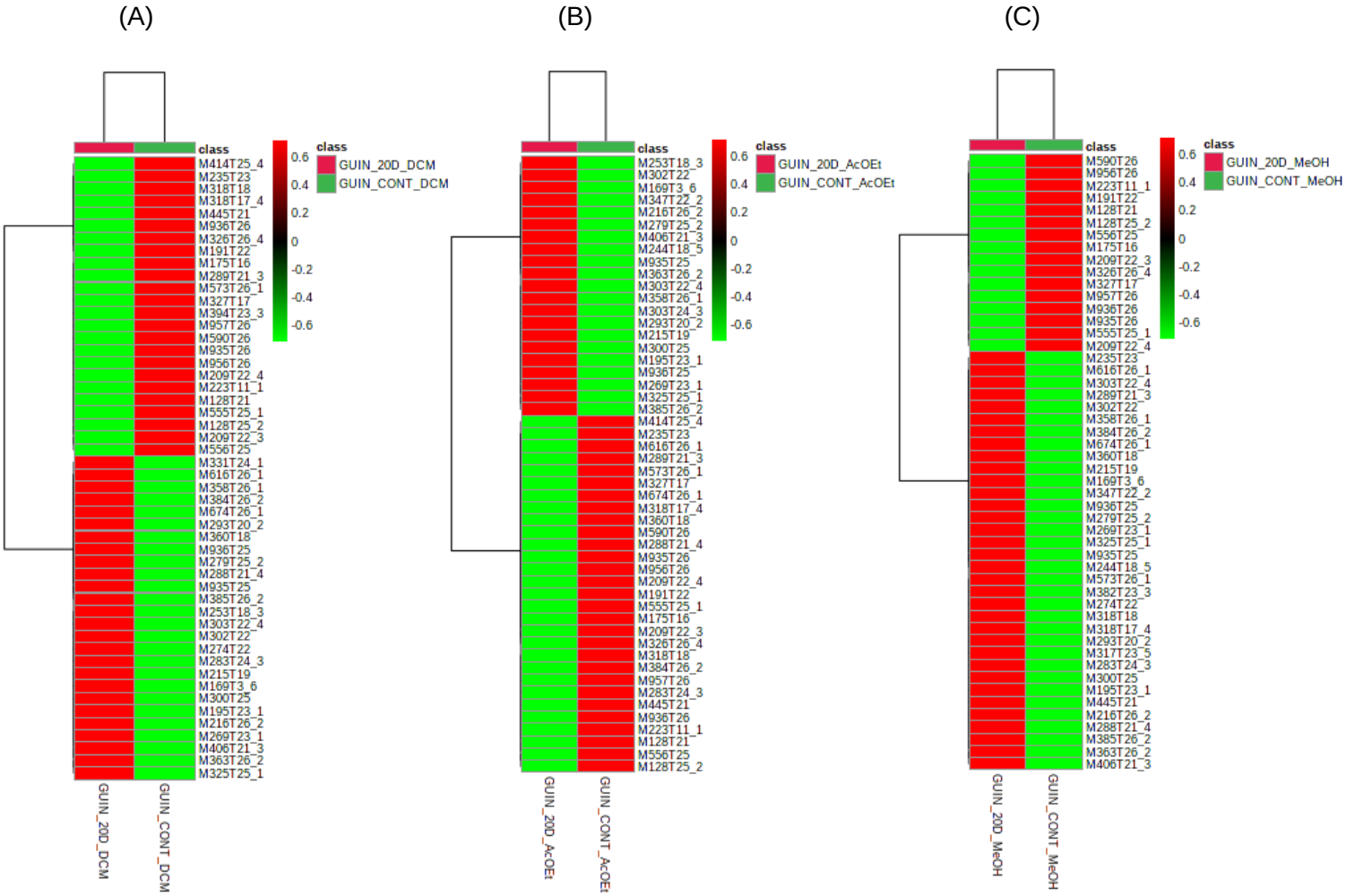


Figura 32 – Representações gráficas por *heatmap* obtidas pelo software *MetaboloAnalyst 5.0* com as cinquenta substâncias com maiores picos de intensidade de amostras extraídas em diclorometano (DCM) (A), acetato de etila (AcOEt) (B) e metanol (MeOH) (C) obtidas por análise de *P. guineense* nas condições controle (GUIN_CONT, em verde) e após 20 dias de infecção (GUIN_20D, em vermelho).

Na figura 33, *P. cattleianum*, na fração diclorometanólica (A), 52%; na fração acetólica (B), 44%; e na fração metanólica, 48% das substâncias tiveram um aumento na intensidade do pico após o período de infecção pelo nematoide.

Em *P. cattleianum* (espécie imune), as substâncias M155T20_1 e M155T23_1, da fração DCM, M155T27_1, da fração AcOEt, e M155T23_1, da fração MeOH, apresentaram aumento após a infecção.

Nessa espécie, as seguintes substâncias também apresentaram queda de produção após a infecção: na fração DCM, M149T21_3; na fração AcOEt, M211T24_2 e M211T23_2; na fração MeOH, M211T24_2 e M211T23_2, M149T21_3, M149T23_1

e M149T15_1. Na fração DCM, as substâncias com íon precursor de MM 211 e na fração AcOEt, de MM 149, não apareceram dentre os picos majoritários.

Também apresentaram diminuição após a infecção ao nematoide na fração DCM de *P. cattleianum*, M156T26, M156T23_1 e M156T23_2; na fração AcOEt, M156T23_1 e M156T26 e na fração MeOH, M156T26.

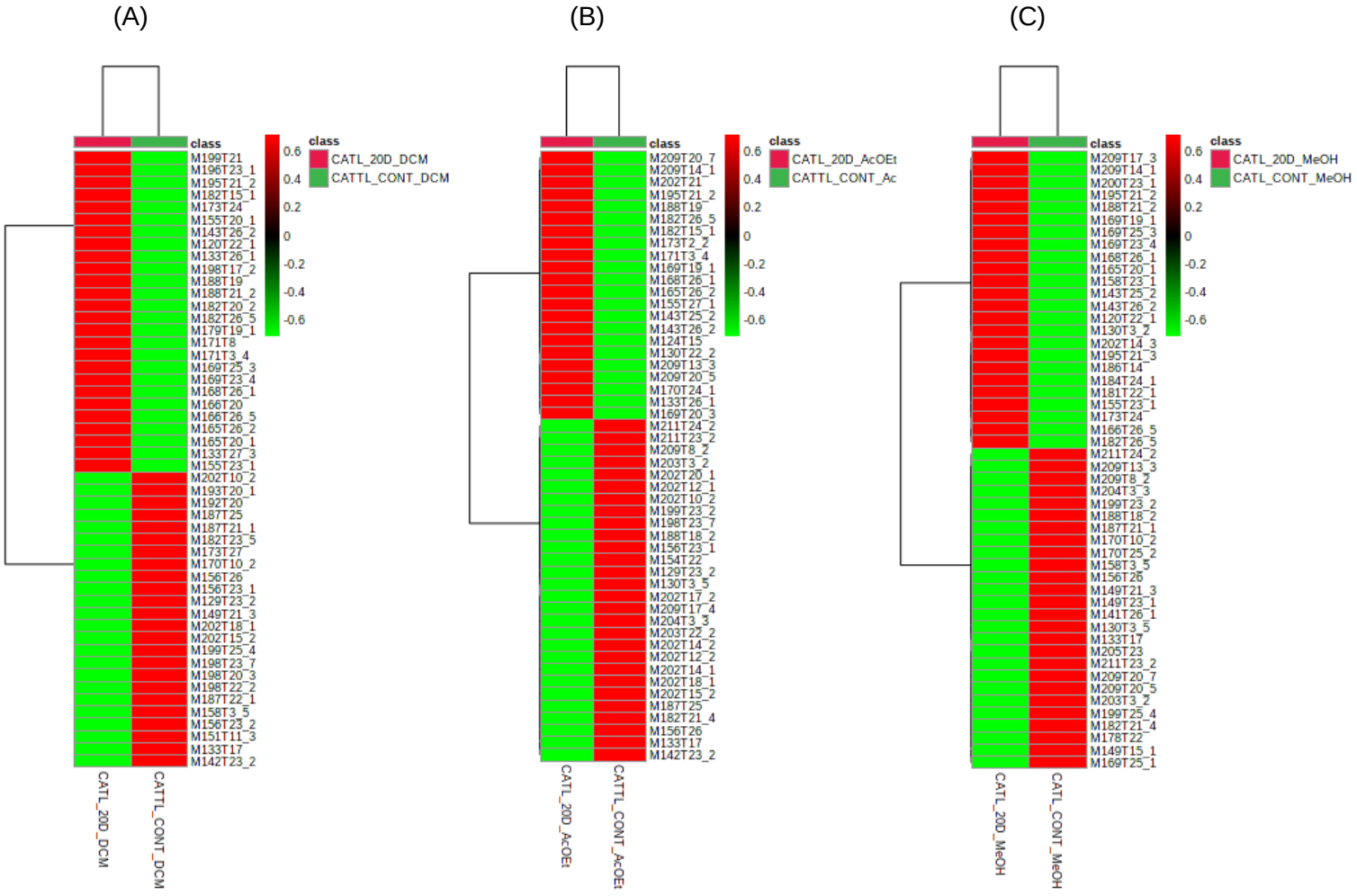


Figura 33 – Representações gráficas por *heatmap* obtidas pelo software *MetaboloAnalyst* com as cinquenta substâncias com maiores picos de intensidade de amostras extraídas em diclorometano (DCM) (A), acetato de etila (AcOEt) (B) e metanol (MeOH) (C) obtidas por análise de *P. cattleianum* condições controle (CATTL_CONT, em verde) e após 20 dias de infecção (CATTL_20D, em vermelho).

Nas três frações, M195T21_2 apresentou aumento em *P. cattleianum* e M195T23_1 aumento em *P. guineense.* Na fração MeOH de *P. guineense*, também houve aumento na produção de M195T21_3.

Nas três frações, M169T3_6 em *P. guineense* apresentou aumento após o período de infecção. Em *P. cattleianum*, na fração DCM, M169T25_3 e M169T23_4; na fração AcOEt, M169T19_1 e M169T20_3; na fração MeOH, M169T19_1, M169T25_3 e M169T23_4; também apresentaram aumento pela infecção. Enquanto M169T17_3 apresentou diminuição em *P. guajava* nas três frações de extração.

Nas três frações, M143T26_2 apresentou aumento em *P. cattleianum* e redução de M143T24_3 em *P. guajava.* Nas frações AcOEt e MeOH, também houve aumento de M143T25_2 em *P. cattleianum*.

Nas três frações de *P. guajava*, M223T22_4 apresentou aumento na produção após a infecção. Nas frações AcOEt e MeOH dessa espécie, teve ainda aumento na produção de M223T13_1. Nas três frações de extração, M223T11_1 apresentou redução em *P. guineense* após o período de infecção.

5. DISCUSSÃO

Com os dados obtidos através de análise em LC-MS das extrações com solventes diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) de amostras de raízes das espécies *P. guajava* (suscetível), *P. guineense* (resistente) e *P. cattleianum* (imune), em condições controle (sem infecção) e após 20 dias de infecção pelo nematoide *M. enterolobii,* foram realizadas comparações por dendrogramas.

Assim, com a análise dos ramos formados pelos grupos de amostras, observou-se que os metabólitos secundários após a infecção (produzidos ou suprimidos) são em maioria de natureza química polar. As amostras CONT e 20D se diferenciaram quando analisados os extratos em MeOH (metanol) e AcOEt (acetato de etila), tendo em vista, que não estão em ramos próximos no dendrograma. Já as amostras em DCM (diclorometano) possuem similaridade, mostrando que os metabólitos produzidos em decorrência da infecção possivelmente não possuem afinidade por esse solvente, sendo, portanto, de caráter mais polar. Essa observação ocorre também para as outras duas espécies, onde os ramos das amostras DCM CONT e 20D estão mais próximos no dendrograma, e, portanto, com maior similaridade. Como resumo, podemos dizer que há diferença no padrão de metabólitos produzidos pelos grupos controle e infectado, em todas as três espécies, e essa diferença pode ser notada após extração com metanol e acetato de etila.

Com as redes moleculares geradas, foi possível identificar agrupamentos de substâncias diferencialmente expressas nas espécies resistente e imune. O agrupamento **(A)** é formado por substâncias de *P. guineense* obtidas em extração metanólica e identificadas de **(1)** a **(7)**; sugere-se que estas substâncias pertençam à classe dos taninos hidrolisáveis, cujo maior representante é o ácido elágico. O resultado indica a natureza polar dos metabólitos que possivelmente estejam relacionados com a defesa vegetal.

Os taninos são compostos polifenólicos presentes em vários tecidos vegetais, desempenhando funções de proteção a herbivoria e regulando o crescimento da planta. As vias biossintéticas dos taninos hidrolisáveis (THs) incluem a biossíntese de um dos intermediários, os elagitaninos (ou ácido elágico) (Chen *et al.*, 2018). Estas moléculas sintetizadas na via do chiquimato são fortes inibidores de proteases

digestivas (Gallardo *et al.*, 2019). Alguns estudos têm mostrado que os taninos reduzem a taxa de eclosão, inativam *Meloidogyne spp*. e consequentemente reduzem o número de galhas (Fonseca *et al.*, 2017; Maistrello, Vaccari e Sasanelli, 2010; Misiha *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2018).

O agrupamento **(B)** é formado, em sua maioria, por substâncias de *P. guineense* e *P. cattleianum* obtidas em extrações com metanol e acetato de etila e identificadas de **(8)** a **(11)**, pertencentes à classe das lignanas, indicando mais uma vez a natureza polar de metabólitos relacionados à defesa vegetal.

Os lignanos formam os blocos de construção das paredes celulares das plantas. Dentre esses, estão as lignanas, um subgrupo de polifenóis não flavonóides que possuem atividade inseticidas e que surgiu durante a coevolução de plantas e insetos a partir dos mecanismos naturais de defesa vegetal, fornecendo a proteção contra fitopatologias (Lüttge, 2019).

A síntese de lignina aumenta a defesa de planta às infecções por RKN e diminui densidades populacionais do nematoide (Ismael e Mahmood, 2020). Estudo recente demonstrou que, no tomate, as respostas aos oligogalacturonídeos (OGs) desencadeiam a resistência sistêmica aumentada aos patógenos. Com isso, ocorre a regulação das vias de sinalização por ácido jasmônico (JA), ácido abscísico (ABA) e etileno (ET), e a ativação das principais vias metabólicas para a biossíntese de metabólitos antimicrobianos, como alcalóides, flavonóides e lignanos (Gamir *et al.*, 2021). El-Sherif *et al.* (2015) realizou um estudo em que sementes de pimenta, alho, milho e gergelim foram adicionados no solo de plantio de plantas de tomate, cultivadas sob o estresse da infecção por *M. incognita*. Com as sementes de gergelim moídas, ricas em lignanos, os autores observaram os valores máximos de comprimento de planta, massa fresca e massa seca total da parte aérea. Ainda obtiveram a maior porcentagem de redução no número de massas de ovo e galhas do nematoide.

O agrupamento **(C)** é formado, em sua maioria, por substâncias de *P. guineense* obtidas em extrações de diclorometano e acetato de etila e identificadas, de **(12)** a **(15)**, como um grupo de terpenos, tendo as oleanas como representantes. O resultado indica que essa categoria de moléculas apolares também está relacionada a defesa vegetal. Os terpenos possuem função importante na defesa da planta contra estresses bióticos e abióticos. Os principais voláteis identificados de plantas após a herbivoria incluem terpenóides voláteis, fenilpropanóide volátil (indólicos), derivados de ácido graxo e compostos nitrogenados. Níveis elevados de

terpenos em plantas, responsáveis pela atração após um ataque de herbívoros, são documentados em muitas espécies de plantas. Um dos exemplos de defesa indireta de plantas é a liberação da mistura de voláteis, que atraem os carnívoros dos herbívoros, após ataque desses herbívoros (Aljbory e Chen, 2018; Singh e Sharma, 2015).O terpeno geraniol apresentou atividade nematicida em diferentes estágios da vida do nematoide das galhas *M. javanica.* O contato direto com esse terpeno causou a morte de todos os juvenis J2 e inibiu a eclosão dos ovos (Nasiou e Giannakou, 2018).

No estudo de Yang *et al.* (2016), exsudatos radiculares extraídos de três porta-enxertos de tomate com níveis variados de resistência a nematoides suprimiram o tempo de incubação do ovo de *M. incognita* e do estágio em J2, aumentando ainda a mortalidade. A composição de exsudatos radiculares apresenta metabólitos bioativos que variam substancialmente entre diferentes espécies de plantas e que podem conduzir feedbacks na interação planta-solo, modificando, com isso, as comunidades microbianas (Hu *et al.*, 2018).

Numa análise inicial com a sobreposição dos cromatogramas obtidos, visualmente tem destaque o pico expresso referente à substância retida em 2.64 – 2.67 minutos, nas três espécies e extrações, com aumento após o período de infecção pelo nematoide. Através de busca nas bibliotecas NIST, sugere-se que se trata de L-arginina. Esse aminoácido é precursor do óxido nítrico, e de poliaminas, ambas moléculas capazes de desempenhar funções importantes na regulação dos processos de desenvolvimento, bem como em respostas aos estresses bióticos e abiótico. O catabolismo de arginina atua mobilizando estoques de nitrogênio para o desenvolvimento vegetal e a mecanismos de defesa contra o estresse. No entanto, os níveis de arginina em tecidos vegetais parecem ser regulados por uma infinidade de mecanismos (Winter *et al.*, 2015).

Como a produção de arginina foi aumentada nas três espécies de *Psidium* (desde a suscetível à imune) após a infecção, sugere-se que o aumento esteja vinculado a eventos relativos ao desenvolvimento vegetal e não a processo de resposta específica ao estresse da infecção.

Ainda na análise inicial com a sobreposição dos cromatogramas, um pico expresso referente à substância retida em 25.86 – 25.92 minutos, apenas em *P. cattleianum* (espécie imune), apresentou redução em sua produção após o período de infecção ao nematoide. Com as buscas realizadas em bibliotecas, indica ser a

lignana eudesmina. O dado está de acordo com análises realizadas através das redes moleculares, as quais sugerem a relação de lignanas aos mecanismos de defesa nas espécies resistente e imune ao fitopatógeno. Essa substância, pertencente ao grupo das lignanas, reduziu a viabilidade do período larval de *Anticarsia gemmatalis* (patógeno de cultura de soja) dando origem a adultos malformados (Nascimento *et al.*, 2004).

As lignanas são biossintetizadas a partir da via dos fenilpropanóides, na rota do ácido chiquímico, sugerindo que a regulação deste caminho esteja envolvida na resistência dessa espécie contra o nematoide *M. enterolobii*.

No estudo de Francine *et al.* (2016), o extrato da raiz de *Syzygium guineense* (Myrtaceae), espécie rica polifenóis e triterpenos, exibiu atividade larvicida com 100% de mortalidade das larvas de *Aedes albopictus*, após 8 dias de tratamento a 200 mg/L, enquanto o extrato do fruto de *Zanthoxylum heitzii* (Rutaceae), que apresenta eudesmina em sua composição química, apresentou 83,33% de mortalidade na mesma concentração.

Devido a atividade antibiótica de eudesmina, esperava-se que houvesse o aumento na produção dessa substância em *P. cattleianum* após a infecção ao nematoide, visto que essa espécie é imune ao fitopatógeno. No entanto, a redução de eudesmina sugere que precursores da via do chiquimato de biossíntese dessa substância, tenham sido destinados à regulação de outros caminhos metabólicos importantes para a resistência ao parasita. Essa hipótese é corroborada pelos resultados obtidos nas redes moleculares, em que a regulação de lignanas se mostra envolvida nos mecanismos de defesa das espécies resistente e imune.

Com os mapas de calor gerados com os cinquentas picos espectrais majoritários para cada grupo de análise, observou-se a alteração no metaboloma das plantas após a infecção pelo *Meloidogyne enterolobii*, com substâncias sendo produzidas e suprimidas nas três espécies de estudo. Isso indica a resposta vegetal frente ao estresse biótico. Muitas dessas substâncias foram apresentadas através dos códigos de massa do íon precursor e tempo de retenção, devido à dificuldade em extrair os fragmentos de massas e às buscas nas bibliotecas NIST.

Os processos de estresse e a resposta de defesa vegetal estimulam mudanças metabólicas que podem resultar na biossíntese de compostos bioativos. O acúmulo de um metabólito secundário na planta em níveis mais altos pode indicar a expressão de genes específicos e o incremento das vias metabólicas para sua biossíntese nas

células (Isah, 2019). Estudos realizados com diferentes metabólitos vegetais, incluindo alcalóides, flavonóides e compostos fenólicos, relatam o potencial em combater os patógenos (Zaynab *et al.*, 2018).

Com isso, nesse trabalho é possível sugerir que os metabólitos secundários estão envolvidos nos mecanismos de defesa vegetal de espécies *Psidium* contra nematoide *M. enterolobii* principalmente pela regulação das vias do chiquimato com taninos hidrolisáveis e lignanas, mevalonato e metileritritolfosfato com os terpenos.

6. CONCLUSÃO

Nesse estudo, comparando os perfis metabólicos de amostras de raízes de plantas das espécies *P. guajava* (espécie suscetível), *P. guineense* (espécie resistente) e *P. cattleianum* (espécie imune), cultivadas sob condições controle (sem infecção) e após 20 dias de infecção pelo nematoide *M. enterolobii*, tem-se que:

- Por análise dos ramos formados pelos grupos de amostras em dendrogramas, conclui-se que os metabólitos secundários após a infecção (produzidos ou suprimidos) são em maioria de natureza química polar;
- Através das redes moleculares, foi possível confirmar a natureza química polar das substâncias reguladas após a infecção, com agrupamentos de taninos hidrolisáveis e lignanas nas espécies *P. guineense* e *P. cattleianum*. Também foi identificado um agrupamento e substâncias apolares, pertencente a classe dos terpenos, presentes nas espécies resistente e imune;
- Na sobreposição dos cromatogramas foi possível identificar um pico aumentado nas três espécies após a infecção, correspondente a L-arginina, e um pico diferencialmente expresso em *P. cattleianum*, suprimido após a infecção, identificado como eudesmina;
- Com os mapas de calor gerados com os cinquentas picos espectrais majoritários para cada grupo de análise, observou-se alteração no metaboloma das plantas após a infecção pelo *M. enterolobii*, com substâncias sendo produzidas e suprimidas nas três espécies de estudo.

6.1. Perspectivas futuras

- Laborar as etapas de plantio de mudas de *Psidium* spp. e inoculação com ovos e juvenis do nematoide *M. enterolobii*, buscando *n* significativos para testes analíticos e estatísticos;

- Após preparo de amostras através de estratégia bulk, identificar proteínas diferencialmente reguladas através de proteômica *bottom-up shotgun* a partir de extratos de raízes das espécies submetidas às diferentes condições de infestação pelo nematoide; e realizar análise dos perfis metabolômicos de raízes de espécies submetidas às condições controle e teste;
- Medir enzimas relacionadas com o estresse oxidativo e metabolismo fenólico dos extratos de raízes submetidas às condições controle e teste.

REFERÊNCIAS

ALJBORY, Z.; CHEN, M. S. Indirect plant defense against insect herbivores: a review. **Insect Science**, v. 25, n. 1, p. 2–23, 2018.

ALLOUCHE, N.; APEL, C.; MARTIN, M. T.; DUMONTET, V.; GUÉRITTE, F.; LITAUDON, M. Cytotoxic sesquiterpenoids from Winteraceae of Caledonian rainforest. **Phytochemistry**, v. 70, n. 4, p. 546–553, 2009.

AMI, S. N.; SHINGALY, S. G. A. Influence of Some Plant Extracts on Vitality of Eggs And Second Stage Juveniles of Root – Knot Nematode Meloidogyne Javanica. **The Journal of The University of Duhok**, v. 22, n. 2, p. 159–165, 2020.

ANTONIO, C.; SANTOS, F. Produção de mudas do BRS Guaraçá: porta-enxerto de goiabeira resistente ao nematoide-das-galhas. **Embrapa Semiárido**, 2020.

ARIEF, V. N.; DELACY, I. H.; BASFORD, K. E.; DIETERS, M. J. Application of a dendrogram seriation algorithm to extract pattern from plant breeding data. **Euphytica**, v. 213, n. 4, p. 1–11, 2017.

AYVAR, S.; DÍAZ, J.; ALVARADO, O.; VELÁZQUEZ, I.; PELÁEZ, A.; TEJEDA, M. Actividad nematicida de extractos botánicos contra Meloidogyne incognita (KOFOID Y WHITE) EN OKRA (Hibiscus esculentus L. Moench). **Biotecnia**, v. 20, n. 1, p. 13–19, 2018.

BAKR, R. O.; EL-NAA, M. M.; ZAGHLOUL, S. S.; OMAR, M. M. Profile of bioactive compounds in Nymphaea alba L. leaves growing in Egypt: Hepatoprotective, antioxidant and anti-inflammatory activity. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2017.

BASAID, K.; CHEBLI, B.; MAYAD, E. H.; FURZE, J. N.; BOUHARROUD, R.; KRIER, F.; BARAKATE, M.; PAULITZ, T. Biological activities of essential oils and lipopeptides applied to control plant pests and diseases: a review. **International Journal of Pest Management**, v. 0, n. 0, p. 1–23, 2020.

BELLÉ, C.; RAMOS, R. F.; BALARDIN, R. R.; KASPARY, T. E.; ANTONIOLLI, Z. I. Reproduction of Meloidogyne enterolobii on weeds found in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, 2019.

BHATI, S. S.; PARASHAR, A. First Report and Morphological Description of Meloidogyne enterolobii Infecting First Report and Morphological Description of Meloidogyne enterolobii Infecting Guava (Psidium guajava L .) in Transitional Plain of Luni Basin of Rajasthan. n. September, 2020.

BOZBUGA, R.; LILLEY, C. J.; KNOX, J. P.; URWIN, P. E. Host-specific signatures of the cell wall changes induced by the plant parasitic nematode, Meloidogyne incognita. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

BRIBI, N. Pharmacological activity of aporphinoid alkaloids. A review. **Asian Journal**

of Botany, v. 1, 2018.

BUCHBAUER, G.; HEMETSBERGER, S. Use of essential oils in agriculture. **Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications, Second Edition**, n. March 2016, p. 670–706, 2015.

CAMARA, A. *et al.* Terminalia albida treatment improves survival in experimental cerebral malaria through reactive oxygen species scavenging and anti-inflammatory properties. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p. 1–15, 2019.

CASTRO-MORETTI, F. R.; GENTZEL, I. N.; MACKEY, D.; ALONSO, A. P. Metabolomics as an emerging tool for the study of plant–pathogen interactions. **Metabolites**, v. 10, n. 2, p. 1–23, 2020.

CASTRO, J. M. DA C. E; RIBEIRO, J. M.; JÚNIOR, P. M. R.; ALMEIDA, E. J. DE; SOUSA, A. D. DE; OLIVEIRA, P. G. DE. Reproduction of the guava root-knot nematode in Psidium accesses. **Comunicata Scientiae**, v. 8, n. 1, p. 149–154, 2016.

CHANDNANI, Y.; ROY, M.; ROY, S.; ROOPALI, B.; DUTTA, G. K. Phytochemical Screening of Leaf Extracts of Azadirachta indica and Psidium guajava. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 9, n. 9, p. 2852–2857, 2020.

CHAO, I. C.; CHEN, Y.; GAO, M. H.; LIN, L. G.; ZHANG, X. Q.; YE, W. C.; ZHANG, Q. W. Simultaneous determination of α-glucosidase inhibitory triterpenoids in psidium guajava using HPLC-DAD-ELSD and pressurized liquid extraction. **Molecules**, v. 25, n. 6, 2020.

CHEN, C. R.; CHAO, L. H.; PAN, M. H.; LIAO, Y. W.; CHANG, C. I. Tocopherols and Triterpenoids from Sida acuta. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 54, n. 1, p. 41–45, 2007.

CHEN, F.; MA, R.; CHEN, X. L. Advances of metabolomics in fungal pathogen–plant interactions. **Metabolites**, v. 9, n. 8, 2019.

CHEN, H. *et al.* Molecular mechanisms of tannin accumulation in Rhus galls and genes involved in plant-insect interactions. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

CHEN, J.; SHI, Z.; SONG, Y.; GUO, X.; ZHAO, M.; TU, P.; JIANG, Y. Source attribution and structure classification-assisted strategy for comprehensively profiling Chinese herbal formula: Ganmaoling granule as a case. **Journal of Chromatography A**, v. 1464, p. 102–114, 2016.

CHENG, Z. Y.; LOU, L. L.; YANG, P. Y.; SONG, X. Y.; WANG, X. B.; HUANG, X. X.; SONG, S. J. Seven new neuroprotective sesquineolignans isolated from the seeds of Crataegus pinnatifida. **Fitoterapia**, v. 133, n. January, p. 225–230, 2019.

CHIAMOLERA, F. M.; MARTINS, A. B. G.; SOARES, P. L. M.; CUNHA-CHIAMOLERA, T. P. L. DA. Reaction of potential guava rootstocks to Meloidogyne enterolobii. **Revista Ceres**, v. 65, n. 3, p. 291–295, 2018.

CHITRA JAIN; SHIVANI KHATANA; REKHA VIJAYVERGIA. Bioactivity of secondary

metabolites of various plants: A review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 10, n. 2, p. 494–504, 2019.

CHOI, H. W.; MANOHAR, M.; MANOSALVA, P.; TIAN, M.; MOREAU, M.; KLESSIG, D. F. Activation of Plant Innate Immunity by Extracellular High Mobility Group Box 3 and Its Inhibition by Salicylic Acid. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 3, p. 1–21, 2016.

COSTA, R. G.; SILVA, N. V. DA; MEDEIROS, G. R. DE; MELO, A. A. S. DE; BISPO, S. V.; CAVALCANTI, M. C. DE A. The use of guava byproduct in the production of feedlot sheep in Brazil: impacts on the productive and economic performance. **Brazilian Journal of Animal Science**, v. 48, 2019.

COYNE, D. L.; NICOL, J. M.; CLAUDIUS-COLE, B. **Nematologia prática: Um guia de campo e de laboratório**. [s.l: s.n.].

DAHARIYA, S.; PRASHANTH, N.; DIVAKAR, K.; BAADHE, R. R. A Review on Pharmacological Activities of Alkaloids. **World Journal of current medical and phasmaceutical research**, n. August, p. 230–234, 2020.

DESMEDT, W.; MANGELINCKX, S.; KYNDT, T.; VANHOLME, B. A Phytochemical Perspective on Plant Defense Against Nematodes. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. November, 2020.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 3rd Edition**. [s.l: s.n.]. v. 1

DÍAZ-DE-CERIO, E.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; VERARDO, V.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; SEGURA-CARRETERO, A. Determination of guava (Psidium guajava L.) leaf phenolic compounds using HPLC-DAD-QTOF-MS. **Journal of Functional Foods**, v. 22, p. 376–388, 2016.

EL-SHERIF, A.; GAD, S.; KHALIL, A.; MOHAMEDY, R. Influnce of four differente grounded seeds on controlling Meloidogyne incognita infecting tomato plant under greenhouse conditions. **Journal of Plant Protection and Pathology**, v. 6, n. 6, p. 885–898, 2015.

EMMANOEL, J.; BEZERRA, F.; LEDERMAN, I. E.; FRANCISCO, J.; CAMPOS, D. O.; ELINORE, C.; PROENÇA, B. Psidium spp. Araçá. **Plantas para o Futuro - Região Centro-Oeste**, p. 294–314, 2013.

ERB, M.; KLIEBENSTEIN, D. J. Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy. **Plant Physiology**, v. 184, n. 1, p. 39–52, 2020.

ESALQ/USP, C. DE E. A. EM E. A.; CNA, C. DA A. E P. DO B. **PIB do agronegócio brasileiro**. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>.

ESSE, H. P. VAN; REUBER, T. L.; DOES, D. VAN DER. Genetic modification to improve disease resistance in crops. **New Phytologist**, v. 225, n. 1, p. 70–86, 2020.

ESTÉVEZ, A. M.; ESTÉVEZ, R. J. A Short Overview on the Medicinal Chemistry of (—

)-Shikimic Acid. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 14, p. 1443–1454, 2012.

FANG, C.; FERNIE, A. R.; LUO, J. Exploring the Diversity of Plant Metabolism. **Trends in Plant Science**, v. 24, n. 1, p. 83–98, 2019.

FANG, X.; LI, Y.; ZHENG, Y.; WANG, Y.; FENG, S.; MIAO, M. Ethanol extracts from Ilex pubescens promotes cerebral ischemic tolerance via modulation of TLR4-MyD88/TRIF signaling pathway in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 256, n. February, p. 112680, 2020.

FELIPE, L. DE O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 2, 2017.

FELIX, S.; PEREIRA, C.; MENDES, M. Aspectos característicos , químicos e funcionais da espécie Psidium guajava L .: um estudo bibliográfico. n. September, 2020.

FERNANDES, C. DE F.; JUNIOR, J. R. V.; SILVA, D. S. G. DA; REIS, N. D.; JUNIOR, H. A. Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. **Embrapa Rondonia**, v. 1, p. 14 p., 2009.

FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. **Nematologia de plantas: fundamentos e importância**. [s.l.] Sociedade Brasileira de Nematologia, 2016.

FERREIRA, F. B. P. *et al.* Chemical composition, antileishmanial and antioxidant activity of Eugenia moraviana (Myrtaceae) fruit extract. **Medicinal Chemistry Research**, v. 29, n. 9, p. 1621–1631, 2020.

FILHO, F. DE H. B. A crise econômica de 2014/2017. **Estudos avançados**, v. 31, n. 89, p. 51–60, 2017.

FILHO, J. V. DE A.; DALLAGNOL, L. J. **Resistência genética de plantas a patógenos**. Pelotas, RS - Brasil: Editora UFPel, 2018.

FONSECA, W. L.; ALMEIDA, F. A. DE; LEITE, M. L. T.; RAMBO, A. P. P.; PETTER, F. A.; OLIVEIRA, A. M. DE; CARVALHO, R. M.; NETO, F. DE A.; PEREIRA, F. F. Bioactivity of aqueous extracts of Anadenanthera macrocarpa to Meloidogyne incognita in cotton crop. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 2, p. 156–161, 2017.

FRANCINE, T. N.; PROSPER CABRAL, B. N.; CONSTANT ANATOLE, P.; BRUNO, M. M.; PAULINE, N.; JEANNE, N. Y. Larvicidal activities of hydro-ethanolic extracts of three Cameroonian medicinal plants against Aedes albopictus. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 11, p. 931–936, 2016.

FRANKENBERGER, L.; D. MORA, T.; SIQUEIRA, C. D. DE; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; MORAES, M. H. DE; BIAVATTI, M. W.; STEINDEL, M.; SANDJO, L. P. UPLC-ESI-QTOF-MS2 characterisation of Cola nitida resin fractions with inhibitory effects on NO and TNF-α released by LPS-activated J774 macrophage and on Trypanosoma cruzi and Leishmania amazonensis. **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 6, p. 577–589, 2018.

FRANZON, R. C.; SOUSA-SILVA, L. Z. DE O. C. C. E. B. P. J. C. Araçás do gênero Psidium: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. **Araçás do Gênero Psidium: principais espécies, ocorrência, descrição e usos**, p. 48, 2009.

GALDEANO, D. M.; KLEINGESINDS, C. **Microrganismos x Planta: guerra ou parceria?** [s.l: s.n.].

GALLARDO, A.; MORCUENDE, D.; SOLLA, A.; MORENO, G.; PULIDO, F.; QUESADA, A. Regulation by biotic stress of tannins biosynthesis in Quercus ilex: Crosstalk between defoliation and Phytophthora cinnamomi infection. **Physiologia Plantarum**, v. 165, n. 2, p. 319–329, 2019.

GALLO, F. R.; PALAZZINO, G.; FEDERICI, E.; IURILLI, R.; GALEFFI, C.; CHIFUNDERA, K.; NICOLETTI, M. Polyketides from Eleutherine bulbosa. **Natural Product Research**, v. 24, n. 16, p. 1578–1586, 2010.

GAMIR, J.; MINCHEV, Z.; BERRIO, E.; GARCÍA, J. M.; LORENZO, G. DE; POZO, M. J. Roots drive oligogalacturonide-induced systemic immunity in tomato. **Plant Cell and Environment**, v. 44, n. 1, p. 275–289, 2021.

GHOSH, S.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production of shikimic acid. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1425–1431, 2012.

GODSWILL, C. Medicinal Plants: the Medical, Food, and Nutritional Biochemistry and Uses. **International Journal of Advanced Academic Research | Sciences**, v. 5, n. 11, p. 2488–9849, 2019.

GOUVEIA, A. S. *et al.* Análise da via metabólica por cromatografia líquida (uhplc) acoplada à espectrometria de massa de alta resolução (LC/ MS) v.2. **Protocols.io**, v. 2, 2019.

GUO, Q. M.; YANG, X. W. A new ellagic acid derivative from the fruits of Eucalyptus globulus Labill. **Pharmazie**, v. 60, n. 9, p. 708–710, 2005.

HALBRENDT, J. M.; MONDIA, J. A. **Crop rotation and other cultural pratices**. Wallingford: Nematology: advances and perspectives, 2004.

HIMANSHU, J.; JADON, B.; KISHOR. A review article on: plant alkaloids. **International Journal of Pharmaceutical Erudition**, v. 4, n. 04, 2020.

HOOGEN, J. VAN DEN *et al.* Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. **Nature**, v. 572, n. 7768, p. 194–198, 2019.

HOU, S.; LIU, Z.; SHEN, H.; WU, D. Damage-associated molecular pattern-triggered immunity in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. May, 2019.

HU, L. *et al.* Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2018.

IBRAHIM, D.; HUSSEIN, R. Phytochemical Screening and Nematicidal Activity of Cinnamon and Ginger Extracts Against Root-knot Nematode (Meloidogyne incognita)

Infecting Tomato. **Egyptian Journal of Agronematology**, v. 16, n. 2, p. 63–84, 2017.

IBRAHIM, H. M. M.; AHMAD, E. M.; MARTÍNEZ-MEDINA, A.; ALY, M. A. M. Effective approaches to study the plant-root knot nematode interaction. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 141, n. May, p. 332–342, 2019.

IBRAHIM, S. R. M.; MOHAMED, G. A.; SHAALA, L. A.; BANULS, L. M. Y.; GOIETSENOVEN, G. VAN; KISS, R.; YOUSSEF, D. T. A. New ursane-type triterpenes from the root bark of Calotropis procera. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 3, p. 490–495, 2012.

ISAH, T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. **Biological research**, v. 52, n. 1, p. 39, 2019.

ISMAEL, J. H. S.; MAHMOOD, A. A. Integrated management of root-knot nematode (Meloidogyne spp.) in cucumber (cucumis sativus l.) and its effect on nematode population density, plant growth and yield in Sulaimani Governorate, Kurdistan, Iraq. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 18, n. 3, p. 4709–4741, 2020.

JAIN, C.; KHATANA, S.; VIJAYVERGIA, R. Bioactivity of secondary metabolites of various plants: A review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 10, n. 2, p. 494–504, 2019.

JAMIR, L. L.; SIMON, S. D.; LAL, A. A. Effect of selected botanicals against Alterania solani and Meloidogyne Effect of selected botanicals against Alternaria solani and Meloidogyne incognita (J2). **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. June, p. 2522–2527, 2018.

JESUS, M. DE; GAZA, J. T.; JUNIO, H.; NELLAS, R. Docking molecular de metabólitos secundários de Psidium guajava L. e Piper nigrum L. para COVID-19 Associated Receptors ACE2, Spike Protein RBD e TMPRSS2. **ChemRxiv**, p. 1–27, 2020.

JONES, J. T.; HAEGEMAN, A.; DANCHIN, E. G. J.; GAUR, H. S.; HELDER, J.; JONES, M. G. K.; KIKUCHI, T.; MANZANILLA-LÓPEZ, R.; PALOMARES-RIUS, J. E.; WESEMAEL, W. M. L.; PERRY, R. N. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 9, p. 946–961, 2013.

KALOSHIAN, I.; TEIXEIRA, M. Advances in plant_nematode interactions with emphasis on the notorious nematode genus Meloidogyne. **Phytopathology**, v. 109, n. 12, p. 1988–1996, 2019.

KAMATH, J.; RAHUL, N.; ASHOK KUMAR, C.; LAKSHMI, SM. *Psidium guajava* L: A review. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 2, n. 1, p. 9, 2008.

KHAN, A.; ASIF, M.; TARIQ, M.; REHMAN, B.; PARIHAR, K.; SIDDIQUI, M. A. Phytochemical Investigation, Nematostatic and Nematicidal Potential of Weeds Extract Against the Root-knot Nematode, Meloidogyne incognita In Vitro. **Asian Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 2, p. 38–46, 2017.

KIM, K. H.; CHOI, S. U.; KIM, Y. C.; LEE, K. R. Tirucallane triterpenoids from cornus walteri. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 1, p. 54–59, 2011.

KIM, K. H.; KIM, H. K.; CHOI, S. U.; MOON, E.; KIM, S. Y.; LEE, K. R. Bioactive lignans from the rhizomes of acorus gramineus. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 10, p. 2187–2192, 2011.

KLESSIG, D. F. *et al.* Nematode ascaroside enhances resistance in a broad spectrum of plant–pathogen systems. **Journal of Phytopathology**, v. 167, n. 5, p. 265–272, 2019.

KULBAT, K. The role of phenolic compounds in plant resistance. **Biotechnology and Food Sciences**, v. 80, n. 2, p. 97–108, 2016.

LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; MORETZSOHN, M. C.; ROBERTS, P. A.; BALLÉN-TABORDA, C.; BORBA, T. C. O.; VALDISSER, P. A.; VIANELLO, R. P.; ARAÚJO, A. C. G.; GUIMARÃES, P. M.; BERTIOLI, D. J. Genetic mapping of resistance to Meloidogyne arenaria in arachis stenosperma: A new source of nematode resistance for peanut. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 6, n. 2, p. 377–390, 2016.

LEHNINGER, A.; NELSON, D. L. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7ª ed. [s.l: s.n.].

LIU, C. H.; YEN, M. H.; TSANG, S. F.; GAN, K. H.; HSU, H. Y.; LIN, C. N. Antioxidant triterpenoids from the stems of Momordica charantia. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 751–756, 2010.

LUQUINE, L.; BARBOSA, D.; FEREIRA, C.; ROCHA, L.; HADDAD, F.; AMORIM, E. First report of the root-knot nematode Meloidogyne enterolobii on bananas in Brazil. **Plant Disease**, p. 1–3, 2018.

LÜTTGE, U. The role of the shikimate and the phenylpropanoid pathways in root-knot nematode infection. **Progress in Botany**, v. 81, p. 305–335, 2019.

MAI, H. L.; GRELLIER, P.; PROST, E.; LEMOINE, P.; POULLAIN, C.; DUMONTET, V.; DEGUIN, B.; VO, T. B. H.; MICHEL, S.; GROUGNET, R. Triterpenes from the exudate of Gardenia urvillei. **Phytochemistry**, v. 122, p. 193–202, 2016.

MAISTRELLO, L.; VACCARI, G.; SASANELLI, N. Effect of chestnut tannins on the root-knot nematode Meloidogyne javanica. **Helminthologia**, v. 47, n. 1, p. 48–57, 2010.

MANOHAR, M.; TENJO-CASTANO, F.; CHEN, S.; ZHANG, Y. K.; KUMARI, A.; WILLIAMSON, V. M.; WANG, X.; KLESSIG, D. F.; SCHROEDER, F. C. Plant metabolism of nematode pheromones mediates plant-nematode interactions. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020.

MANOSALVA, P. *et al.* Conserved nematode signalling molecules elicit plant defenses and pathogen resistance. **Nature Communications**, v. 6, p. 1–8, 2015.

MEJIAS, J.; TRUONG, N. M.; ABAD, P.; FAVERY, B.; QUENTIN, M. Plant Proteins and Processes Targeted by Parasitic Nematode Effectors. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 2019.

MIRANDA, G. B.; SOUZA, R. M. DE; GOMES, V. M.; FERREIRA, T. DE F.; ALMEIDA,

A. M. Avaliação de acessos de Psidium spp. quanto à resistência a Meloidogyne enterolobii. **Bragantia**, v. 71, p. 52–58, 2012.

MIRZA, Z.; SOTO, E. R.; HU, Y.; NGUYEN; THANH-THANH; KOCH, D.; OSTROFF; AROIAN, R.; R., G. Anthelmintic Activity of Yeast Particle-Encapsulated Terpenes. **Molecules**, p. 1–13, 2020.

MISIHA, P.; ALY, A.; TOHAMY, M.; ATIA, M. Eco-friendly management of root-knot nematode and root rot disease infecting pepper plants by application compost and tea compost. **Zagazig Journal of Agricultural Research**, v. 46, n. 4, p. 1053–1065, 2019.

MOORE, M. R.; BRITO, J. A.; QIU, S.; ROBERTS, C. G.; COMBEE, L. A. First report of Meloidogyne enterolobii infecting Japanese blue berry tree (Elaeocarpus decipiens) in Florida, USA. **Journal of Nematology**, v. 52, n. 1, p. 2–4, 2020.

MORAES, S. Z. DA C. DE *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effect of Poincianella pyramidalis (Tul.) L.P. Queiroz. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 254, n. January, 2020.

MOURA, A. P.; FILHO, M. M.; GUIMARÃES, J. A.; LIZ, R. S. Manejo integrado de pragas do tomateiro para processamento industrial. **Embrapa**, p. 1415–3033, 2014.

NASCIMENTO, I. R.; MURATA, A. T.; BORTOLI, S. A.; LOPES, L. M. X. Insecticidal activity of chemical constituents from Aristolochia pubescens against Anticarsia gemmatalis larvae. **Pest Management Science**, v. 60, n. 4, p. 413–416, 2004.

NASIOU, E.; GIANNAKOU, I. O. Effect of geraniol, a plant-based alcohol monoterpene oil, against Meloidogyne javanica. **European Journal of Plant Pathology**, v. 152, n. 3, p. 701–710, 2018.

NGBOLUA, K.-N.; LUFULUABO, L. G.; MOKE, L. E.; BONGO, G. N.; LIYONGO, C. I.; ASHANDE, C. M.; SAPO, B. S.; ZOAWE, B. G.; MPIANA, P. T. A review on the Phytochemistry and Pharmacology of Psidium guajava L. (Myrtaceae) and Future direction. **Discovery Phytomedicine**, v. 5, n. 2, p. 7–13, 2018.

NTALLI, N.; ADAMSKI, Z.; DOULA, M.; MONOKROUSOS, N. Nematicidal amendments and soil remediation. **Plants**, v. 9, n. 4, p. 1–20, 2020.

OCHOA-FUENTES, Y. M.; ALEJANDRO–ROJAS, G.; ORTIZ, J. C. D.-; CERNA-CHAVEZ, E.; AGUIRRE-URIBE, A.; LANDEROS-FLORES, J.; CEPEDA-SILLER, M. Evaluación in vitro de la actividad nematicida de limoneno, isotiocianato de alilo, eucaliptol, β-citronelol y azadiractina sobre Meloidogyne incognita (Nematoda, Meloidogynidae). **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 01, n. 01, p. 1689–1699, 2013.

OLIVEIRA, P. G. DE; QUEIRÓZ, M. A. DE; CASTRO, J. M. DA C.; RIBEIRO, J. M.; OLIVEIRA, R. S. DE; SILVA, M. J. L. DA. Reaction of Psidium spp. accessions to different levels of inoculation with Meloidogyne enterolobii. **Revista Caatinga**, v. 32, p. 419–428, 2019.

PANDEY, P.; SENTHIL-KUMAR, M. Plant-pathogen interaction in the presence of abiotic stress: What do we know about plant responses? **Plant Physiology Reports**,

v. 24, n. 4, p. 541–549, 2019.

PEREIRA, K. C.; LUIZ, P.; SOARES, M.; MAIA, J. Desenvolvimento de cultivares de goiabeira inoculadas com Meloidogyne enterolobii. **Nematropica**, v. 46, p. 54–59, 2016.

PINHEIRO, P. F.; JUSTINO, G. C. Structural Analysis of Flavonoids and Related Compounds - A Review of Spectroscopic Applications. **Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**, 2012.

PRABHU, S.; POORNIAMMAL, R.; MUTHIAH, C.; KUMAR, J. S. Guava Root Knot Nematode (Meloidogyne enterolobii) - A Menace in Guava Cultivation. **Biotica Research Today 2(10):**, v. 2, p. 996–998, 2020.

PRZYBYLSKA, A.; OBRĘPALSKA-STĘPLOWSKA, A. **Plant defense responses in monocotyledonous and dicotyledonous host plants during root-knot nematode infectionPlant and Soil**, 2020.

RANF, S. Sensing of molecular patterns through cell surface immune receptors. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 38, p. 68–77, 2017.

REN, Z.; CHEN, X.; LUAN, M.; GUO, B.; SONG, Z. First Report of Meloidogyne enterolobii on Industrial Hemp (Cannabis sativa) in China . **Plant Disease**, p. 2019, 2020.

RIBEIRO, J. M.; CASTRO, J. M. DA C. E; PINTO, M. DOS S. T.; FERNANDES, K. V. S.; SCORTECCI, K. C.; PEDROSA, E. M. R. Recursos genéticos, biológicos e bioquímicos para o manejo de Meloidogyne enterolobii em goiabeira. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Semiárido**, v. 286, p. 1–33, 2018a.

___. Recursos genéticos, biológicos e bioquímicos para o manejo de Meloidogyne enterolobii em goiabeira. **Embrapa Semiárido**, v. 286, p. 25, 2018b.

RIBEIRO, M. **Embrapa lança primeiro porta-enxerto para goiabeira resistente ao nematoide-das-galhas**.

RIBEIRO, R. M.; GOMES, V. M.; VIANA, A. P.; SOUZA, R. M. DA; SANTOS, P. R. DOS. Selection of interspecific psidium spp. Hybrids resistant to meloidogyne enterolobii. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 41, n. 1, p. 1–11, 2019.

SALAZAR, D. M.; MELGAREJO, P.; MARTÍNEZ, R.; MARTÍNEZ, J. J.; HERNÁNDEZ, F.; BURGUERA, M. Phenological stages of the guava tree (Psidium guajava L.). **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 2, p. 157–161, 2006.

SALHA, G. BEN; ABDERRABBA, M.; LABIDI, J. A status review of terpenes and their separation methods. **Reviews in Chemical Engineering**, 2019.

SANTOS, S. A. O.; FREIRE, C. S. R.; DOMINGUES, M. R. M.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P. Characterization of phenolic components in polar extracts of eucalyptus globulus labill. Bark by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 17, p. 9386–9393, 2011.

SANTOS, S. A. O.; VILLAVERDE, J. J.; FREIRE, C. S. R.; DOMINGUES, R. M. M.; NETO, C. P.; SILVESTRE, A. J. D. Phenolic composition and antioxidant activity of Eucalyptus grandis, E. urograndis (E. grandis×E. urophylla) and E. maidenii bark extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 39, n. 1, p. 120–127, 2012.

SANTOS, S. A. O.; VILLAVERDE, J. J.; SOUSA, A. F.; COELHO, J. F. J.; NETO, C. P.; SILVESTRE, A. J. D. Phenolic composition and antioxidant activity of industrial cork by-products. **Industrial Crops and Products**, v. 47, p. 262–269, 2013.

SATO, K.; KADOTA, Y.; SHIRASU, K. Plant Immune Responses to Parasitic Nematodes. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. September, p. 1–14, 2019.

SATYA KUMAR, S. R. First Report on the Root-Knot Nematode Meloidogyne enterolobii (Yang and Eisenback, 1988) Infecting Guava (Psidium guajava) in Udham Singh Nagar of Uttarakhand. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 4, p. 1720–1724, 2018.

SEIGLER, D. S. Shikimic Acid Pathway. **Plant Secondary Metabolism**, p. 94–105, 1998.

SHAH, M. M.; MAHAMOOD, M. **Nematology - Concepts, Diagnosis and Control**. [s.l.] Intech, 2017.

SIKDER, M. M.; VESTERGÅRD, M. Impacts of Root Metabolites on Soil Nematodes. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. January, p. 1–18, 2020.

SILVA, A. L. DA *et al.* **A cultura da goiaba**. Brasília, DF: [s.n.].

SILVA, F. DE J.; RIBEIRO, R. C. F.; XAVIER, A. A.; SANTOS NETO, J. A.; SILVA, C. M. DA; MIZOBUTSI, E. H. Management of meloidogyne javanica in Okra using compost of pequi fruit waste. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n. 7, p. 258, 2018.

SIMKIN, A. J.; GUIRIMAND, G.; PAPON, N.; COURDAVAULT, V.; THABET, I.; GINIS, O.; BOUZID, S.; GIGLIOLI-GUIVARC'H, N.; CLASTRE, M. Peroxisomal localisation of the final steps of the mevalonic acid pathway in planta. **Planta**, v. 234, n. 5, p. 903–914, 2011.

SINGH, B.; SHARMA, R. A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 129–151, 2015.

SINGH, N. Emerging problem of guava decline caused by Meloidogyne enterolobii and Fusarium oxysporum f.sp. psidii. **Indian Phytopathology**, v. 73, n. 2, p. 373–374, 2020.

Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA.

SOARES, M. R. C.; LOPES, A. P. M.; DIAS-ARIEIRA, C. R. First Report on Meloidogyne enterolobii in Morus celtidifolia in Paraná State, Brazil. **Plant Disease**, 2018.

SOUZA, A. D. DE; PEDROSA, E. M. R.; ULISSES, C.; CASTRO, J. M. DA C. E;

RIBEIRO, J. M. Penetration, development and reproduction of Meloidogyne enterolobii on Psidium species and induced cellular responses in the roots. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 2, p. 753–763, 2016.

SOUZA, R. R. C. DE; SANTOS, C. A. F.; COSTA, S. R. DA. Field resistance to Meloidogyne enterolobii in a Psidium guajava × P. guineense hybrid and its compatibility as guava rootstock. **Fruits**, v. 73, n. 2, p. 118–124, 2018.

SREEKAVYA, G.; MUTHUVEL, I.; RAJANGAM, J.; PRABHU, S. Comparative Study on Histopathological Changes caused by Meloidogyne enterolobii in Psidium gujava and Psidium cattleianum Guava Species. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 8, n. 05, p. 2198–2203, 2019.

SRIVASTAVAA, A. K.; SINGH, V. K. Review Article Biological Action of Essential Oils (Terpenes). **International Journal of Biological & Medical Research**, v. 10, n. 3, p. 6854–6859, 2019.

SUN, J.; XUN, H.; YU, J.; TANG, F.; YUE, Y. DE; GUO, X. F. Chemical constituents and antibacterial properties of Indocalamus latifolius McClure leaves, the packaging material for “Zongzi”. **Molecules**, v. 20, n. 9, p. 15686–15700, 2015.

SUN, Y. F.; LONG, H. B.; LU, F. P. First Report of the Root-Knot Nematode Meloidogyne enterolobii Infecting Mulberry in China. **Plant Disease**, 2019.

TAKARA, K.; MATSUI, D.; WADA, K.; ICHIBA, T.; CHINEN, I.; NAKASONE, Y. New Phenolic compounds from kokuto, non-centrifuged cane sugar. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, n. 2, p. 376–379, 2003.

TETALI, S. D. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. **Planta**, v. 249, n. 1, p. 1–8, 2019.

TYLENCHIDA, N.; ÁLVAREZ-ORTEGA, S.; BRITO, J. A.; SUBBOTIN, S. A. Multigene phylogeny of root- knot nematodes and molecular characterization of Meloidogyne nataliei Golden , Rose & Bird , 1981. n. January, p. 1–11, 2019.

VUOLO, M. M.; LIMA, V. S.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R. **Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

WANG, S.; ALSEEKH, S.; FERNIE, A. R.; LUO, J. The Structure and Function of Major Plant Metabolite Modifications. **Molecular Plant**, v. 12, n. 7, p. 899–919, 2019.

WATANABE, H. **Mercado das Cultivares de goiaba de mesa no mercado atacadista da CEAGESP**. [s.l: s.n.].

WINTER, G.; TODD, C. D.; TROVATO, M.; FORLANI, G.; FUNCK, D. Physiological implications of arginine metabolism in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. JULY, p. 1–14, 2015.

WU, J.; FANG, X.; YUAN, Y.; DONG, Y.; LIANG, Y.; XIE, Q.; BAN, J.; CHEN, Y.; LV, Z. UPLC/Q-TOF-MS profiling of phenolics from Canarium pimela leaves and its vasorelaxant and antioxidant activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 6, p. 716–723, 2017.

YANG, B. Y.; LUO, Y. M.; LIU, Y.; YIN, X.; ZHOU, Y. Y.; KUANG, H. X. New lignans from the roots of Datura metel L. **Phytochemistry Letters**, v. 28, n. August, p. 8–12, 2018.

YANG, B. Y.; YIN, X.; LIU, Y.; SUN, Y.; GUAN, W.; ZHOU, Y. Y.; KUANG, H. X. Terpenes and lignans from the roots of Solanum melongena L. **Natural Product Research**, v. 34, n. 3, p. 359–368, 2020.

YANG, G.; ZHOU, B.; ZHANG, X.; ZHANG, Z.; WU, Y.; ZHANG, Y.; LÜ, S.; ZOU, Q.; GAO, Y.; TENG, L. Effects of tomato root exudates on Meloidogyne incognita. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–16, 2016.

YANG, J.; HAN, X.; WANG, H. Y.; YANG, JIAN; KUANG, Y.; JI, K. Y.; YANG, Y.; PANG, K.; YANG, S. X.; QIN, J. C.; WANG, H. P. Comparison of metabolomics of Dendrobium officinale in different habitats by UPLC-Q-TOF-MS. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 89, n. November 2019, p. 104007, 2020.

ZAYNAB, M.; FATIMA, M.; ABBAS, S.; SHARIF, Y.; UMAIR, M.; ZAFAR, M. H.; BAHADAR, K. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 124, n. July, p. 198–202, 2018.

ZHANG, W.; ZHAO, L.; ZHOU, J.; YU, H.; ZHANG, C.; LV, Y.; LIN, Z.; HU, S.; ZOU, Z.; SUN, J. Enhancement of oxidative stress contributes to increased pathogenicity of the invasive pine wood nematode. **The Royal Society**, v. 374, n. 1767, 2019.

ZHOU, Q.; LU, W.; NIU, Y.; LIU, J.; ZHANG, X.; GAO, B.; AKOH, C. C.; SHI, H.; YU, L. **Identification and quantification of phytochemical composition and anti-inflammatory, cellular antioxidant, and radical scavenging activities of 12 Plantago species**. [s.l: s.n.]. v. 61

ZHUO, K.; HU, M. X.; LIAO, J. L.; RUI, K. First Report of Meloidogyne enterolobii on Ginger (Zingiber officinale) in China. **Plant Disease**, v. 94, n. 2, 2018.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Indivíduos de *P. guajava* nas condições teste

(A)

(B)

(C)

Figura 34 – Plantas de *P. guajava* analisadas neste estudo: Indivíduos controle (sem infecção) (A); Indivíduos após 20 dias de infecção por ovos e J2 de *M. enterolobii* (B); Raízes de indivíduos infectados evidenciando a formação das galhas (C).

APÊNDICE B - Indivíduos de *P. guineense* nas condições teste

(A)

(B)

Figura 35 - Plantas de *P. guineense* analisadas neste estudo: Indivíduos controle (sem infecção) (A); e Indivíduos após 20 dias de infecção por ovos e J2 de *M. enterolobii* (B).

APÊNDICE C - Indivíduos de *P. cattleianum* nas condições teste

(A)

(B)

Figura 36 - Plantas de *P. cattleianum* analisadas neste estudo: Indivíduos controle (sem infecção) (A); e Indivíduos após 20 dias de infecção por ovos e J2 de *M. enterolobii* (B).