



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA- UFRA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**PRISCILA MAYLANA MODESTO DE JESUS**

**MANEJO NUTRICIONAL NA PRODUÇÃO DE PILOCARPINA EM PLANTAS DE  
JABORANDI.**

**BELÉM-PA**

**2023**

**PRISCILA MAYLANA MODESTO DE JESUS**

**MANEJO NUTRICIONAL NA PRODUÇÃO DE PILOCARPINA EM PLANTAS DE  
JABORANDI.**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Agronomia.

Área de concentração: Agronomia

Orientador: Prof. Dr. Silvio Junio Ramos

**BELÉM-PA**

**2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia  
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

JESUS, PRISCILA MAYLANA MODESTO DE JESUS  
MANEJO NUTRICIONAL NA PRODUÇÃO DE PILOCARPINA EM PLANTAS DE JABORANDI /  
PRISCILA MAYLANA MODESTO DE JESUS JESUS. - 2024.  
70 f. : il.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA), Campus Universitário de  
Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém, 2024.  
Orientador: Prof. Dr. SILVIO JUNIO RAMOS RAMOS

1. Nutrientes. 2. P. microphyllus. 3. Alcalóide.. I. RAMOS, SILVIO JUNIO RAMOS, *orient.* II. Título

---

CDD 631.422

**PRISCILA MAYLANA MODESTO DE JESUS**

**MANEJO NUTRICIONAL NA PRODUÇÃO DE PILOCARPINA EM PLANTAS DE JABORANDI.**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Doutora em Agronomia.

Área de concentração: Agronomia.

Data da aprovação: 28/07/2023

**BANCA EXAMINADORA**

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** SILVIO JUNIO RAMOS  
Data: 20/11/2023 11:09:18-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Silvio Junio Ramos – Presidente  
Instituto tecnológico Vale -ITV

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** MARIO LOPES DA SILVA JUNIOR  
Data: 20/11/2023 08:13:48-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Mário Lopes da Silva Júnior - 1º Examinador  
Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA

*Milena Maria Tomaz de Oliveira*

---

Dr<sup>a</sup>. Milena Maria Tomaz de Oliveira - 2º Examinador  
University of Nebraska- Lincoln, EUA

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** HOZANO DE SOUZA LEMOS NETO  
Data: 30/11/2023 15:10:13-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Hozano de Souza Lemos Neto - 3º Examinador  
Universidade Federal do Piauí -UFPI

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** EDNA SANTOS DE SOUZA  
Data: 11/12/2023 10:59:23-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edna Santos de Souza - 4º Examinador  
Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará- UNIFESSPA

## AGRADECIMENTOS

A Deus, e a minha padroeira Nossa Senhora de Nazaré por me sustentar e me dá forças em dias difíceis, na certeza que dias melhores chegariam. Sem essa fé, nada conseguiria fluir em minha caminhada.

Ao Prof. Dr. Sílvio Júnio Ramos, pela orientação e apoio durante o período de doutorado.

Ao Dr. Cecílio Frois Caldeira Júnior, por sua disposição e contribuições essenciais para execução desta pesquisa.

À equipe do Instituto Tecnológico Vale, pelo comprometimento e valioso suporte.

Ao Prof. Dr. Mário Lopes da Silva Junior, por disponibilizar espaços para condução e coleta de dados desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Cândido Ferreira de Oliveira Neto, pelo acesso ao laboratório de Biodiversidade em plantas superiores e demais espaços.

A todos os servidores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Pgagro) da Universidade Federal Rural da Amazônia, pelos ensinamentos e amparo nos momentos de dúvidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por meio da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos membros da banca examinadora, pela disposição e colaboração.

À minha equipe de trabalho Keila Beatriz, Yan Cardoso, Gabriel Monteiro, Stefany Figueiredo e Alyam Coelho, que foram essenciais para a realização desse trabalho.

Ao meu querido amigo, Drº Italo Marlone, pela amizade, apoio e incentivo durante esses longos anos de amizade.

Aos meus amigos do setor da Horta da UFRA, Senhor Edeilson Barbosa (Deco), José Maria (Alex) e Raimundo da Rosa (Dico) pelo suporte em todos os momentos desse doutorado.

À minha família e meu companheiro Gustavo Vieira, que foram incansáveis nessa missão.

## RESUMO

As espécies do gênero *Pilocarpus*, popularmente conhecido como Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*), são plantas que produzem a substância pilocarpina (alcaloide), utilizada para fabricação de medicamentos destinados, principalmente, ao tratamento de glaucoma. No Pará, essa espécie é a mais importante, por possuir a maior concentração de pilocarpina, podendo ser encontrada nas proximidades da Floresta Nacional dos Carajás (FLONA). O seu cultivo em áreas plantadas ainda é complexo, pois a principal dificuldade é entender os fatores que favorecem a maior produção desta substância, permeando também o manejo nutricional ainda pouco estudado. Neste contexto, objetivou-se avaliar o manejo nutricional na produção de pilocarpina em plantas de jaborandi. Para isto, foram conduzidos dois experimentos, no primeiro foram realizadas coletas de plantas de *P. microphyllus* e solo em áreas da Floresta Nacional de Carajás, onde foram correlacionados os parâmetros químicos do solo e teores de nutrientes foliares com a produção de pilocarpina. E no segundo, plantas de jaborandi foram submetidas a cinco doses de nitrogênio - N (0; 90; 180; 270 e 360 mg kg<sup>-1</sup> de N), com dez repetições. As características avaliadas foram a biomassa, teor de pilocarpina, trocas gasosas e teores de nutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Zn e Cu). No primeiro estudo, percebe-se por meio da análise multivariada, o modelo que melhor previu a produção de pilocarpina foi composto por N foliar, Mg foliar, Fe do solo (preditores positivos), S do solo e P foliar (preditores negativos). Quanto aos efeitos das doses de N, o maior aporte nitrogenado acarretou contínuo ganho no rendimento de biomassa, maior absorção de nutrientes (Fe, Zn e N), e eficiência instantânea de carboxilação. Foram detectadas presença de pilocarpina em toda a planta, com maior concentração nas folhas, sugerindo uma possível rota biossintética, iniciada na raiz, sendo estimulada pela presença marcante do Fe e N radicular.

**Palavras-chave:** Nutrientes; *P. microphyllus*; Alcalóide.

## ABSTRACT

Species of the genus *Pilocarpus*, popularly known as Jaborandi, are plants that produce the substance pilocarpine (alkaloid), used in the pharmaceutical industry. In Pará, the species *Pilocarpus microphyllus* is the most important, as it has the highest concentration of pilocarpine, and can be found near the Carajás National Forest (FLONA). Its cultivation in planted areas is still complex, since the main difficulty is to understand the factors that favor the greater production of this substance, also permeating nutritional aspects that are still unclear. In this context, this research aims to evaluate the nutrients that influence pilocarpine production in jaborandi plants. For this, two surveys were carried out, in the first one collection of *P. microphyllus* plants and soil in areas of the National Forest of Carajás were carried out, where the chemical parameters of the soil and levels of foliar nutrients were correlated with the production of pilocarpine. And in the second test, jaborandi plants were submitted to five doses of N (0; 90; 180; 270 and 360 mg kg<sup>-1</sup> of N), with ten repetitions. The characteristics evaluated were biomass, pilocarpine content, gas exchange and nutrient content (N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Zn and Cu). The results found in the first study show that through multivariate analysis, the model that best predicted pilocarpine production was composed of leaf N, leaf Mg, soil Fe (positive predictors), soil S and leaf P (negative predictors). As for the effects of nitrogen doses, the results indicate that the highest nitrogen input led to a continuous gain in biomass yield, greater nutrient absorption (Fe, Zn and N), and even though many gas exchange parameters have been altered, jaborandi plants were able to maintain metabolic processes. The presence of pilocarpine was detected in all parts of the plant, highlighting the leaf tissue with the highest amount of pilocarpine, suggesting a possible biosynthetic route, initiated in the root, being stimulated by the marked presence of iron and root nitrogen.

**Key Words:** Nutrients; *P. microphyllus*; Alkaloid.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### 2. PREDICTION OF PILOCARPINE PRODUCTION FROM SOIL ATTRIBUTES AND THE NUTRITIONAL STATUS OF PILOCARPUS MICROPHYLLUS

Figure 1 - Classification of soil physical properties (granulometry) of soils collected in plots of jaborandi (*P. microphyllus*) accessions in FLONA of Carajás. ....25

Figure 2- Values of chemical properties of soils collected in plots of jaborandi (*P. microphyllus*) accessions in FLONA of Carajás .....28

Figure 3 - Correlograms of pilocarpine contents in jaborandi leaves (*P. microphyllus*), foliar nutrients and in the soil of the collection sites. The upper panel presents the correlation values (Pearson) and the lower panel the representation of these correlation, where the slice and the color intensity indicate the correlation value. Correlations of pilocarpine with the other variables having values greater than 0.10 or less than – 0.10 are highlighted in the upper line (grey background) and were used as predictive variables for the proposed model..... 30

Figure 4 - Projection of the effect of each predictive variable on leaf pilocarpine content according to the best linear model selected by the AIC method. The variables with the best prediction were leaf nitrogen (a), leaf phosphorus (b), leaf magnesium (c), soil sulfur (d), and soil iron (e). The uncertainty of the model (gray band) increased due to too few data at certain nutrient concentrations. ....33

Figure 5 - Leaf pilocarpine levels quantified in samples of *P. microphyllus* leaves and estimated by the linear model that showed the best AIC (model 1 of Table 3).....34

### 3. NITROGÊNIO AUMENTA A PRODUÇÃO DE PILOCARPINA EM PLANTAS DE JABORANDI

Figura 1 - Biomassa seca total, massa seca de raiz, caule e folha de plantas de jaborandi submetidas a diferentes concentrações de nitrogênio. Belém, 2023. \*ns: não significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.....50

Figura 2 - Teor de pilocarpina na raiz (A), caule (B) e folha (C) de plantas de jaborandi submetidas a diferentes concentrações de nitrogênio. Belém, 2023.....51



Figura 3 - Fotossíntese líquida (A, A), condutância estomática (gs, B), eficiência de uso da água (iWUE, C) e eficiência instantânea de carboxilação (A/Ci, D) em plantas de jaborandi submetidas a diferentes concentrações de nitrogênio. Belém, 2023.....	52
Figura 4 - Concentração de N, K, Ca, Mg, P e S em raiz, caule e folhas de plantas de jaborandi submetidas a diferentes concentrações de N. Belém, 2023.* ns: não significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.....	53
Figura 5 - Concentração de Fe, Zn, Cu e Mn em folhas, caule e raízes de plantas de jaborandi submetidas a diferentes concentrações de N. Belém, 2023. *ns: não significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.....	55
Figura 6- Gráficos de componentes principais mostrando a projeção das variáveis nutricionais, biomassa e teor de pilocarpina na planta (A), na raiz(B), no caule (C) e folha (D) de jaborandi cultivado sob concentrações de nitrogênio. Belém, PA, 2023.....	56
Figura 1S - Altura (A), Área foliar (B), número de folhas (C) e peso específico da folha (D), de plantas de jaborandi submetidas a diferentes concentrações de nitrogênio. Belém, 2023.....	67
Figura 2S - Clorofila total(A), Ci (B), Ci/Ca (C) e transpiração (D) de plantas de jaborandi submetidas a diferentes concentrações de nitrogênio. Belém, 2023. *ns: não significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.....	68

## LISTA DE TABELAS

### 2. PREDICTION OF PILOCARPINE PRODUCTION FROM SOIL ATTRIBUTES AND THE NUTRITIONAL STATUS OF PILOCARPUS MICROPHYLLUS

Table 1- Mean values and standard deviations of the physical and chemical properties of the soils collected in the plots and means of nutrients found in the leaves of the jaborandi (*P. microphyllus*) accessions in the Carajás National Forest (FLONA, for its name in portuguese).  
.....24

Table 2- Granulometria classification of soil physical properties of soils collected in plots of jaborandi (*P. microphyllus*) accessions in FLONA of Carajás .....26

Table 3- Ranking of 15 linear models according to AIC criterion for prediction of leaf pilocarpine content according to the concentrations of nutrients in the soil and leaves. The models were created from two soil variables (S and Fe) and seven leaf variables ( $N_L$ ,  $P_L$ ,  $S_L$ ,  $Ca_L$ ,  $Mg_L$ ,  $Cu_L$ , and  $Zn_L$ ), and each model was grouped with at most six variables. .... 31

### 3. NITROGÊNIO AUMENTA A PRODUÇÃO DE PILOCARPINA EM PLANTAS DE JABORANDI

Tabela 1S - Intercepto (I), coeficiente a (A), coeficiente b (B), p-valor e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) da regressão linear de plantas de jaborandi, submetidas a diferentes concentrações de N. Belém, 2023.....66

## SUMÁRIO

<b>1. CONTEXTUALIZAÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>15</b>
<b>3. PREDICTION OF PILOCARPINE PRODUCTION FROM SOIL ATTRIBUTES AND THE NUTRITIONAL STATUS OF <i>PILOCARPUS MICROPHYLLUS</i></b> .....	<b>19</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1 INTRODUCTION</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2 MATERIAL AND METHODS</b> .....	<b>22</b>
3.2.1 Plant material.....	22
3.2.2 Pilocarpine extraction .....	22
3.2.3 Analysis of soil and leaf nutrients .....	23
3.2.4 Data analysis.....	23
<b>3.3 RESULTS</b> .....	<b>24</b>
<b>3.4 DISCUSSION</b> .....	<b>29</b>
<b>3.5 CONCLUSION</b> .....	<b>35</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>36</b>
<b>4. NITROGÊNIO AUMENTA A PRODUÇÃO DE PILOCARPINA EM PLANTAS DE JABORANDI</b> .....	<b>42</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>42</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>43</b>
<b>4.1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>4.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>45</b>
4.2.1 Origem das sementes e produção de mudas .....	45
4.2.2 Localização e caracterização da área experimental .....	46
4.2.3 Condições de cultivo .....	46
4.2.4 Material vegetal .....	47
4.2.5 Extração da pilocarpina .....	47
4.2.6 Trocas gasosas .....	48
4.2.7 Análise de Clorofila Total .....	48
4.2.8 Teor de nutrientes minerais .....	48
4.2.9 Análise estatística .....	49
<b>4.3 RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>

<b>4.4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>4.5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>63</b>
<b>5 CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>70</b>

## 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

As espécies do gênero *Pilocarpus*, conhecidas popularmente como jaborandi, com 16 espécies distribuídas entre Sul e centro da América Latina, Floresta Amazônica, Piauí e o Maranhão (ALLEVATO *et al.*, 2019; AMARAL *et al.*, 2021). Todas as espécies do gênero produzem a pilocarpina em quantidade bem variada, e esse composto é alcaloide amplamente usado na fabricação de medicamentos para o tratamento de glaucoma (XINGQI *et al.*, 2019), síndrome de Sjögren (FELBERG; DANTAS; SATO, 2022), presbiopia (PRICE *et al.*, 2021), xerostomia (TANAKA *et al.*, 2022) e, recentemente, estudos tem usado a substância para o tratamento de epilepsia (LÉVESQUE *et al.*, 2021) e depressão (SHEN *et al.*, 2019).

A alta demanda por fármacos oriundos da pilocarpina, aliada ao expressivo valor econômico da espécie, configuram a planta medicinal com maior contribuição na receita do Brasil, além de gerar fonte de renda para comunidades locais na região do Pará (COSTA, 2017). Apesar da sua importância, a oferta de matéria prima é muito escassa e não acompanha o consumo do mercado, e com poucos estudos acerca da maior produção de pilocarpina por planta.

Apesar de todas as espécies do gênero produzirem pilocarpina, a espécie *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew, é a mais importante dentre as demais, decorrente da alta concentração de pilocarpina em suas folhas (LIMA *et al.*, 2017). Seu local de maior ocorrência é na Floresta Nacional dos Carajás (Pará, Brasil), representando a maior população residual, derivadas de fortes pressões ambientais que ajudaram a inseri-la na lista das espécies ameaçadas de extinção (CALDEIRA *et al.*, 2017; MOREIRA *et al.*, 2021).

De acordo com Caldeira *et al.* (2017), a espécie *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew, tem preferência por regiões de baixas altitudes, precipitação anual entre 1300–1700 mm, e temperaturas variando de 25.5 a 27 °C. Entretanto, estudos recentes apontam que a espécie pode suportar temperaturas de até 34 °C, sem restrição hídrica (AMARAL *et al.*, 2021). A floração e frutificação ocorrem o ano todo, contudo, é altamente regulada pela precipitação pluviométrica, a maior disponibilidade de água favorece o florescimento e os períodos mais secos, a frutificação (MOREIRA *et al.*, 2021). A coleta

das folhas para extração da pilocarpina, é efetuada na estação seca que variam de acordo com a região.

Nas proximidades da Floresta Nacional dos Carajás (FLONA) que compreende o complexo da serra dos Carajás, a espécie pode ser encontrada nos campos rupestres ferruginosos (Cangas) e dentro da floresta (CALDEIRA *et al.*, 2017; PIRANI; DEVECCHI, 2018). O solo de canga é caracterizado pelo alto teor do ferro (57 a 62%), seguido de Zn, Cu e Mn, além de acidez e limitação nutricional. Contudo, é habitat de várias espécies endêmica, sobretudo, plantas evoluídas com capacidade de adaptação singular (OLIVEIRA MOTA *et al.*, 2018; PAZ *et al.*, 2020).

O conjunto de fatores intrínsecos do jaborandi e a ausência de informações técnicas dificultam o manejo nutricional da espécie visando a produção de pilocarpina. Apesar do uso histórico da pilocarpina, a elucidação completa da rota biossintética é baseada em suposições, e quais os principais fatores que a estimulam, são poucos estudados. Neste sentido, a compreensão de tais fatores é necessária para apoiar o desenvolvimento de técnicas de cultivos que promovam aumento do composto na planta.

Estudos tem sugerido a necessidade do aporte estressor para indução da síntese da pilocarpina (RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011). Já Avancini *et al.* (2003), mencionam o aumento do teor da pilocarpina quando tratadas com ácido salicílico e metiljasmonato, como indutores de estresse, em mudas de jaborandi. Quanto à nutrição de plantas, uma das poucas informações a respeito da relação nutriente-pilocarpina é citada pelos mesmos autores. Segundo os mesmos, a administração equilibrada de nutrientes auxilia na conservação do teor de pilocarpina no jaborandi, porém a ausência de nitrogênio e potássio decrescem a biossíntese da substância.

O fornecimento de nutrientes é destinado para o desenvolvimento pleno da planta e processos metabólicos essenciais no metabolismo primário, assim como, em condições estressoras podem promover a síntese de metabolitos secundários, uma vez que, muitos deles compõem a estrutura de substratos comuns dos metabolismos (NETO; LOPES, 2007). No caso de limitação nutricional, ocorre uma série de alterações bioquímicas e metabólicas que objetivam atenuar os impactos do estresse, induzindo também a produção de metabolitos secundários (JAKOVLJEVIĆ; TOPUZOVIĆ; STANKOVIĆ, 2019). Esse fato pode ser comprovado pela interdependência encontrada na produção de

metabolitos secundários com a fração carbono/nutrientes, comumente encontrado em solos com deficiência nutricional (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A biossíntese dos metabolitos secundários pode ser mediada pela especificidade de nutrientes, como as maiores quantidades de flavonoides observados em plantas de *Manilkara zapota L* na ausência de potássio (COSTA *et al.*, 2017). A presença de elevadas concentrações de alguns metais pode ser responsável pela produção de metabolitos secundários, descritas comumente para ferro, para a espécie *Dracocephalum moldavica* (MORADBEYGI *et al.*, 2020), e plantas de *Origanum vulgare*, para cobre e zinco (KULBAT-WARYCHA *et al.*, 2020).

O nitrogênio é fundamental no metabolismo primário pela formação de aminoácidos heterocíclicos, como triptofano, prolina e histina, que são chaves para biossíntese de alcalóides (GAO *et al.*, 2022). Portanto, sua disponibilidade afeta a síntese de muitos compostos nitrogenados, por exemplo, a produção de vinblastina e vincristina em plantas de *Catharanthus roseus*, sob restrição nitrogenada (SINGH *et al.*, 2015). Por outro lado, a oferta contínua do nutriente pode favorecer o aumento de alguns alcalóides, como reportados em plantas de *Papaver somniferum L.*, no aumento de morfina proporcionada pela maior suplementação nitrogenada (LOSÁK; RICHTER, 2004). Neste sentido, a síntese de alcalóides relacionados a fertilização com N, são dependentes de fatores intrínsecos a espécie de planta.

Para o jaborandi, essa relação nutrientes-pilocarpina precisa ser melhor esclarecida, pois, como sugerido anteriormente (Avancini *et al.*, 2003), a adição de nutrientes mantém a concentração de pilocarpina. Por outro lado, não se sabe como os diferentes nutrientes e suas concentrações afetam a produção do composto, principalmente nas espécies encontradas em ambiente natural. Neste contexto, o estudo sobre o manejo da nutrição mineral em plantas de jaborandi é fundamental para a cultura, além de tornar conhecido os nutrientes que estejam correlacionados com a maior produção de pilocarpina em plantas de *P. microphyllum* oriundas da região da Floresta Nacional dos Carajás.

## 2. REFERÊNCIAS

- ALLEVATO, D. M.; GROPPPO, M.; KIYOTA, E.; MAZZAFERA, P.; NIXON, K. C. Evolution of phytochemical diversity in *Pilocarpus* (Rutaceae). **Phytochemistry**, v. 163, p. 132–146, 2019.
- AMARAL, G. C.; PEZZOPANE, J. E. M.; DE SOUZA NÓIA JÚNIOR, R.; FONSECA, M. D. S.; TOLEDO, J. V.; XAVIER, T. M. T.; DA SILVA OLIVEIRA, B.; MARTÍNEZ, M. F.; DA COSTA JERÔNIMO JÚNIOR, R. A.; DE OLIVEIRA GONÇALVES, E. Ecophysiology of *Pilocarpus microphyllus* in response to temperature, water availability and vapour pressure deficit. **Trees - Structure and Function**, v. 35, no. 2, p. 543–555, 1 Apr. 2021.
- AMARAL, G. C., PEZZOPANE, J. E. M., DE SOUZA NÓIA JÚNIOR, R., MARTÍNEZ, M. F., FONSECA, M. D. S., GIBSON, E. L., ... & XAVIER, T. M. T. *Pilocarpus microphyllus* seedling growth threatened by climate change: an ecophysiological approach. **Theoretical and Applied Climatology**, v.147, p.1-15, 2022.
- AVANCINI, G.; ABREU, I. N.; SALDAÑA, M. D.A.; MOHAMED, R. S.; MAZZAFERA, P. Induction of pilocarpine formation in jaborandi leaves by salicylic acid and methyljasmonate. **Phytochemistry**, v. 63, no. 2, p. 171–175, 2003.
- BRASIL, E. C.; VIEGAS, I. Influência da adubação com nitrogênio, fósforo e potássio na formação de mudas de jaborandi. **Embrapa Amazônia Oriental-Comunicado Técnico** (INFOTECA-E), 1999.
- CALDEIRA, C. F.; GIANNINI, T. C.; RAMOS, S. J.; VASCONCELOS, S.; MITRE, S. K.; PIRES, J. P. A.; FERREIRA, G. C.; OHASHI, S.; MOTA, J. A.; CASTILHO, A.; SIQUEIRA, J. O.; FURTINI NETO, A. E. Sustainability of Jaborandi in the eastern Brazilian Amazon. **Perspectives in Ecology and Conservation**, v. 15, no. 3, p. 161–171, 1 Jul. 2017.
- COSTA, L. N.; MORAIS, P. L. D.; LEITE, G. A. L.; ALMEIDA, M. L. B.; MIRANDA, M. R. A.; FERNANDES, P. L. O. Influência da adubação potássica na qualidade e no potencial antioxidante do sapoti em diferentes estádios de desenvolvimento. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 64, p. 419–425, 2017.



FELBERG, S.; DANTAS, P. E. C.; SATO, E. H. Pilocarpina oral no tratamento do olho seco de pacientes com síndrome de Sjögren. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 85, no. 3, p. 1–8, 2022.

GAO, B., YANG, B., FENG, X., & LI, C. Recent advances in the biosynthesis strategies of nitrogen heterocyclic natural products. **Natural Product Reports**, v.39(1), p.139-162.2022

HASANUZZAMAN, M.; FUJITA, M.; OKU, H.; NAHAR, K.; HAWRYLAK-NOWAK, B. Plant nutrients and abiotic stress tolerance. **Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance**, p. 1–590, 2018.

JAKOVLJEVIĆ, D.; TOPUZOVIĆ, M.; STANKOVIĆ, M. Nutrient limitation as a tool for the induction of secondary metabolites with antioxidant activity in basil cultivars. **Industrial Crops and Products**, v. 138, p. 111462, 2019.

KULBAT-WARYCHA, K.; GEORGIADOU, E. C.; MAŃKOWSKA, D.; SMOLIŃSKA, B.; FOTOPOULOS, V.; LESZCZYŃSKA, J. Response to stress and allergen production caused by metal ions (Ni, Cu and Zn) in oregano (*Origanum vulgare* L.) plants. **Journal of Biotechnology**, v 324, p. 171–182, 2020.

LÉVESQUE, M.; BIAGINI, G.; DE CURTIS, M.; GNATKOVSKY, V.; PITSCH, J.; WANG, S.; AVOLI, M. The pilocarpine model of mesial temporal lobe epilepsy: Over one decade later, with more rodent species and new investigative approaches. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 130, no. June, p. 274–291, 2021.

LIMA, D. F.; DE LIMA, L. I.; ROCHA, J. A.; DE ANDRADE, I. M.; GRAZINA, L. G.; VILLA, C.; MEIRA, L.; VÉRAS, L. M. C.; AZEVEDO, I. F. S.; BIASE, A. G.; COSTA, J.; OLIVEIRA, M. B.P.P.; MAFRA, I.; DE SOUZA DE ALMEIDA LEITE, J. R. Seasonal change in main alkaloids of jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth), an economically important species from the Brazilian flora. **PLoS ONE**, v. 12, no. 2, p. 1–19, 2017.

LOSAK, T.; RICHTER, R. Split nitrogen doses and their efficiency in poppy (*Papaver somniferum* L.) nutrition. **growth**, v. 600, p. 49, 2004.

MORADBEGYI, H.; JAMEI, R.; HEIDARI, R.; DARVISHZADEH, R. Investigating the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense by applying iron oxide nanoparticles

in *Dracocephalum moldavica* L. plant under salinity stress. **Scientia Horticulturae**, v. 272, p. 109537, 2020.

MOREIRA, R. K. V. P. P.; LAMEIRA, O. A.; CAMPELO, M. F.; RAMIRES, A. C. S. Estudo fenológico do germoplasma de *Pilocarpus microphyllus* Stapf Ex Wardleworth correlacionado com elementos climáticos. **Research, Society and Development**, v. 10, no. 5, p. e7710514626, 2021.

MOTA, N. F. O.; WATANABE, M. T. C.; ZAPPI, D. C.; HIURA, A. L.; PALLOS, J.; VIVEROS, R. S.; GIULIETTI, A. M.; VIANA, P. L. Amazon canga: The unique vegetation of Carajás revealed by the list of seed plants. **Rodriguesia**, v. 69, no. 3, p. 1435–1488, 2018.

NETO, L. G.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

OLIMAT, S. Pilocarpine Alkaloid A Review. **EAS Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.2, no. 4, p. 161–164, 2020.

OROZCO-CASTILLO, J. A.; CRUZ-ORTEGA, R.; MARTINEZ-VÁZQUEZ, M.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. Aporphine alkaloid contents increase with moderate nitrogen supply in *Annona diversifolia* Saff. (Annonaceae) seedlings during diurnal periods. **Natural Product Research**, v. 30, no. 19, p. 2209–2214, 2016.

PAZ, A.; GAGEN, E. J.; LEVETT, A.; ZHAO, Y.; KOPITTKE, P. M.; SOUTHAM, G. Biogeochemical cycling of iron oxides in the rhizosphere of plants grown on ferruginous duricrust (canga). **Science of the Total Environment**, v. 713, p. 136637, 2020.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 3, n. 4, 2012.

PIRANI, J. R.; DEVECCHI, M. F. Flora das cangas da serra dos carajás, pará, brasil: Rutaceae. **Rodriguesia**, v. 69, no. 1, p. 209–217, 2018.

PRICE, F. W.; HOM, M.; MOSHIRFAR, M.; EVANS, D.; LIU, H.; PENZNER, J.; ROBINSON, M. R.; LEE, S.; WIRTA, D. L. Combinations of Pilocarpine and Oxymetazoline for the Pharmacological Treatment of Presbyopia. **Ophthalmology Science**, v. 1, no. 4, p. 100065, 2021.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling and Behavior**, v. 6, no. 11, p. 1720–1731, 2011.

ROY, A. A review on the alkaloids an important therapeutic compound from plants Antibacterial studies of medicinal plant View project. **International Journal of Plant Biotechnology**, v. 3, no. 2, p. 1–9, 2017.

SHEN, Y.; PENG, W.; CHEN, Q.; HAMMOCK, B. D.; LIU, J.; LI, D.; YANG, J.; DING, J.; WANG, X. Anti-inflammatory treatment with a soluble epoxide hydrolase inhibitor attenuates seizures and epilepsy-associated depression in the LiCl-pilocarpine post-status epilepticus rat model. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 81, no. June, p. 535–544, 2019.

SINGH, A.; PANDEY, B.; KUMARI, S.; AGRAWAL, M. Nitrogen availability modulates CO<sub>2</sub>-induced responses of *Catharanthus roseus*: Biomass allocation, carbohydrates and alkaloids profile. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, no. 4, p. 160–167, 1 Dec. 2015.

TANAKA, A.; NAKANO, H.; YONETO, K.; YONETO, C.; FURUBAYASHI, T.; SUZUKI, K.; OKAE, A.; UENO, T.; SAKANE, T. Topical Xerostomia Treatment with Hyaluronate Sheets Containing Pilocarpine. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 45, p. 403–408, 2022.

VIEGAS, I. Sintomas de deficiências de macronutrientes em plantas de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Starf.). **Embrapa Amazônia Oriental-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 1998.

XINGQI, W.; YONG, Z.; XING, L.; YANG, W.; JIE, H.; RONGFENG, H.; SHUANGYING, G.; XIAOQIN, C. Cubic and hexagonal liquid crystal gels for ocular delivery with enhanced effect of pilocarpine nitrate on anti-glaucoma treatment. **Drug Delivery**, v. 26, no. 1, p. 952–964, 2019.

### 3. PREDICTION OF PILOCARPINE PRODUCTION FROM SOIL ATTRIBUTES AND THE NUTRITIONAL STATUS OF *PILOCARPUS MICROPHYLLUS*

**\*Artigo publicado na Journal of Plant Nutrition, v. 46, n. 10, p. 2393-2406, 2023.**

DOI: 10.1080/01904167.2022.2155549

Priscila Maylana Modesto de Jesus<sup>1</sup> Cecílio Frois Caldeira<sup>2</sup> Markus Gastauer<sup>2</sup> Paula Godinho Ribeiro<sup>2</sup>  
Silvio Junio Ramos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural da Amazônia, Programa de Pós graduação em Agronomia, Belém (PA), Brasil. [orcid.org/0000-0002-3144-1832](https://orcid.org/0000-0002-3144-1832)

<sup>2</sup> Instituto Tecnológico Vale, Belém (PA), Brasil. [orcid.org/0000-0001-5909-8418](https://orcid.org/0000-0001-5909-8418)<sup>1</sup>

<sup>2</sup> Instituto Tecnológico Vale, Belém (PA), Brasil. [orcid.org/0000-0003-4762-3515](https://orcid.org/0000-0003-4762-3515)<sup>2</sup>

<sup>2</sup> Instituto Tecnológico Vale, Belém (PA), Brasil. [orcid.org/0000-0002-9599-0902](https://orcid.org/0000-0002-9599-0902)<sup>3</sup>

<sup>2</sup> Instituto Tecnológico Vale, Belém (PA), Brasil. <https://orcid.org/0000-0003-0660-1248><sup>4</sup>

#### Corresponding author

**Name:** Silvio Junio Ramos

**Email:** [silvio.ramos@itv.org](mailto:silvio.ramos@itv.org)

#### ABSTRACT

Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*), an endemic species of the Brazilian flora threatened with extinction, is the only natural source of pilocarpine, an alkaloid widely used in the pharmaceutical industry. This compound is extracted from the leaf tissue and may be affected by edaphic and nutritional variations. The aim of this study was to correlate soil chemical parameters and leaf nutrient contents with pilocarpine production in *Pilocarpus microphyllus* plants collected from areas of the Carajás National Forest. In samples collected from 83 plants, pilocarpine, leaf nutrients (N, P, K, S, Mg, Ca, B, Zn, Cu, Fe, and Mn), and soil chemical attributes (P, K, S, Mg, Ca, B, Zn, Cu, Fe, Mn, organic matter (OM), pH, and Al) were evaluated. The mean values of pilocarpine varied between 0.4% and 2.2% of the leaf dry matter, which are rare. In general, the soils presented low nutrient availability, marked acidity, and very high Fe and Mn values. In the leaves, low concentrations of N, P, and K and high leaf concentrations of Fe (2239.13 mg kg<sup>-1</sup>) and Mn (2095.46 mg kg<sup>-1</sup>) were observed, which suggested that *P. microphyllus* is a metal

accumulator species. Through multivariate analysis, the model that best predicted pilocarpine production was composed of leaf N, leaf Mg, soil Fe (positive predictors), soil S, and leaf P (negative predictors). The nutritional management for large-scale cultivation of *P. microphyllus* should be focused mainly on the amounts of N, Fe, and Mg.

**Keywords:** Jaborandi, Plant nutrition, Pilocarpine, Alkaloid

### 3.1 INTRODUCTION

Pilocarpine is an imidazole alkaloid with pharmacological properties that is used in several drugs. Since 1879, this substance has been used in ophthalmology, especially in patients with glaucoma, and it is an effective, low-cost, and easy-to-apply agent (BARBOSA *et al.*, 2018). Pilocarpine and its derivatives are also used to treat other pathologies, such as xerostomia (ZUR, 2020), Sjögren's syndrome (WATANABE *et al.*, 2018), and infections by *Candida albicans* (NILE *et al.*, 2019). The only natural source of pilocarpine are plants of the genus *Pilocarpus* (popularly known as jaborandi). In this sense, *Pilocarpus microphyllus* (Rutaceae) is the species exploited for this purpose and the one with the greatest socioeconomic importance.

*Pilocarpus microphyllus* is an understory shrub with a preference for hot and humid climates that grows in soils with low fertility, rocky outcrops, and secondary vegetation, in addition, it is an endangered species (CALDEIRA *et al.*, 2017; HOMMA, 2003). Brazil is the only pilocarpine producing country and responsible for supplying world demand (IBGE, 2018). In this context is the Carajás National Forest in the state of Pará, which is home to one of the largest remaining populations of *P. microphyllus* and one of the few areas where the species is still found (AMARAL *et al.*, 2021; CALDEIRA *et al.*, 2017; HOMMA, 2003).

The main difficulty in the production of pilocarpine in cultivated plants is understanding the factors that favor greater production of this substance. The species *P. microphyllus* underwent adaptive evolution under environmental pressures, which might have altered the production of secondary metabolites and may favor or inhibit the synthesis of alkaloids (ABREU *et al.*, 2011). It is noteworthy that the species originating from the Amazon, northern Brazil, and Central America have the greatest heterogeneity of alkaloids and enzymatic inputs (ALLEVATO *et al.*, 2019).

Some abiotic factors, such as low temperatures and water limitation, hinder the growth of jaborandi seedlings, but the effect of these factors on the synthesis of

pilocarpine is unknown (AMARAL *et al.*, 2021). In turn, the use of growth regulators and balanced nutritional conditions induce the production of pilocarpine in seedlings of this species (AVANCINI *et al.*, 2003). Despite these results, plants tend to produce higher concentrations of pilocarpine under natural conditions (SANDHU *et al.*, 2006) than under controlled conditions, as well as when they have an adequate supply of nutrients, such as N, P, and K (AVANCINI *et al.*, 2003).

The synthesis of secondary metabolic compounds is usually associated with stressors that accelerate the evolutionary process in some plants, as this is linked to the defense/adaptation model of each species (CAO *et al.*, 2020; RAMAKRISHNA AND RAVISHANKAR 2011). The production of these metabolites is cumulative and arises from common substrates of the primary metabolism; for example, the carbon derived from photosynthesis is destined, in large part, for the synthesis of these substances (RAMAKRISHNA AND RAVISHANKAR 2011).

Soil nutrients are still poorly studied variables in the production of pilocarpine. These elements can act as stressors (in their absence or excess) and even contribute to the structure of this alkaloid molecule, as nitrogen does. Pilocarpine is thought to be derived from the amino acid histidine plus carbon atoms of threonine and/or acetyl-CoA, along with other imidazole alkaloids, which are molecules rich in nitrogen (SAWAYA *et al.*, 2011). This relationship between nitrogen and alkaloids was also reported by Mishra *et al.* (2019). These authors found a significant increase of 860 mg L<sup>-1</sup> of alkaloids in *Catharanthus roseus* when the supply of nitrogen and phosphorus increased. Some other micronutrients, such as Cu, Fe, Mo, and Mn, may influence the biosynthetic process of metabolites because they are enzymatic activators (ISAH 2019).

Studies of plants in a natural environment may help us understand the dynamics of nutrients and their influence on the pilocarpine content, since edaphic factors can direct the production of this compound. Our hypothesis is that soil chemical attributes and leaf nutrient contents affect pilocarpine production. The aim of the present study is to correlate soil chemical parameters and leaf nutrient contents with pilocarpine production in *P. microphyllus* plants collected from areas of the Carajás National Forest. With that, we hope to improve the knowledge about the nutritional management for large-scale cultivation of *P. microphyllus* aiming to increase its pilocarpine content.

## 3.2 MATERIAL AND METHODS

### 3.2.1 Plant material

*P. microphyllus* plants were sampled in the Carajás National Forest (CNF), state of Pará, Brazil (6°6'29" S, 50° 18'16" W). The region has average altitude of 700 m and a predominance of dense evergreen forest and the following soils classes: Haplic Cambisols (Inceptisols), Red-Yellow Latosols (Oxisols), Red Yellow Argisol (Oxisols), Plintosols (Ultisols) and Litholic Neosols (Entisols Litholic). In addition, a small part of CNF consists of rocky vegetation with endemic species adapted to soils with low natural fertility and outcrops of ferruginous rocks, also known as canga (GASTAUER *et al.*, 2020; SOUZA-FILHO *et al.*, 2019).

*P. microphyllus* leaves were collected in 83 plants distributed along the site in the CNF where the species shows natural occurrence. Sampling was carried out during the dry season, period where leaves are harvest to extract pilocarpine commercially due to higher pilocarpine content. Also, samples were collected from young leaves full developed, i.e., avoiding meristem damages. The leaves were cut by using scissors and first allowed to dry at room temperature. Then, the leaves were dried in an oven at 65°C with forced-air circulation until reaching constant weight, and ground in a Wiley mill with a 5-mm sieve. After drying and grinding the leaf samples, 5g of the dry material were randomly removed for pilocarpine analysis and after that, part of the material was also collected randomly for determinate of nutrient analyses.

### 3.2.2 Pilocarpine extraction

Pilocarpine was extracted and quantified by the company Anidro do Brasil Extrações Ltda. The extraction process consisted of initially weighing 5 g of ground leaves and placing them in a 250 mL Erlenmeyer flask with 80 mL of chloroform and 10 mL of 10% ammonia solution to increase the pH to 10. This solution was stirred on a shaker table for 15 minutes, after which 10 mL of chloroform and 50 mL of 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution were added with the aid of a separating funnel. After stirring, the solution was filtered through the separating funnel, and cotton was added to the inside of the funnel. After extraction of the alkaloids from the chloroform fraction, the acidic fraction of the solution was homogenized, and an aliquot was removed for high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis. The sample dilution for HPLC was 1:10 with the effluent under chromatographic conditions (column: LiChroCART RP-Select B 5 µm Lichrospher Art.

50839; effluent: 5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH = 2.5 with 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ; column temperature: 50 ° C; attenuation: 7; flow rate: 1 mL  $\text{min}^{-1}$ ; UV: 216 nm; paper speed: 2.5 mm  $\text{min}^{-1}$ ). The pilocarpine contents were determined according to the standard curve of pilocarpine (pilocarpine hydrochloride). The sample dilution values were based on the desiccation loss subtraction (%), that is, moisture difference.

### 3.2.3 Analysis of soil and leaf nutrients

The soil sample analyzed consisted of three subsamples collected with the aid of “shovel” in the 0-20 cm depth from each area where the leaves of *P. microphyllus* were collected, totaling 83 soil samples. Soil samples were air-dried and analyzed for soil texture by the pipette method principle (Teixeira, 2017). The following soil chemical attributes were determined: pH (1:2.5 soil:water ratio), organic matter ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  0.0835 mol  $\text{L}^{-1}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  50%), nitrogen ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5 mol  $\text{L}^{-1}$ ), Al ( $\text{KCl}$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ ), exchangeable Ca and Mg ( $\text{KCl}$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ ), K and P (Mehlich-I, 0.05 mol  $\text{L}^{-1}$ , 0.0125 mol  $\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), S ( $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$  0,01 mol  $\text{L}^{-1}$ ), B (Hot water), and Fe, Mn, Cu, and Zn (DTPA solution pH 7.3 (0.005 mol  $\text{L}^{-1}$  of DTPA + 0.1 mol  $\text{L}^{-1}$  of triethanolamine + 0.01 mol  $\text{L}^{-1}$  of  $\text{CaCl}_2$ ), all methods followed Teixeira (2017). Soil attributes were classified according to the general recommendations suggested for soils from Pará (EMBRAPA 2020) using the mean values of the samples.

A total of 2 g of the leaf sample was digested in nitroperchloric acid and then determined the contents of P (colorimetry), K (flame photometry), Ca and Mg (atomic absorption), S (turbidimetry), Cu, Fe, Zn, and Mn (atomic-absorption spectrometry). The N determination followed sulfuric solubilization using the Kjeldahl method, and B, dry solubilization using the colorimetry method (MALAVOLTA *et al.*, 1997).

### 3.2.4 Data analysis

The data were analyzed in R (R CORE TEAM 2016), the correlation coefficients (Pearson) between the soil chemical attributes, the leaf nutrient content, and the leaf pilocarpine content were calculated, and correlograms containing the graphical representations were drawn. Variables that had a correlation coefficient with pilocarpine content greater than 0.10 or less than -0.10 were selected to build the first model to predict pilocarpine content. Variables with autocorrelation values lower than 2 were selected, with ranking performed by the "vif" function of the R "MuMIn" package. Eleven variables were selected (soil: S, Fe, Al, pH; leaf: N, P, S, Ca, Mg, Cu, Zn) and 1486 models were generated by combining a maximum of six predictive variables, to avoid



overfitting, using the stepwise model technique with the R “MuMIn” package (Barton 2016). The models were ranked according to Akaike’s information criterion (AIC), and those with lower AIC were selected; the selection threshold was a  $\Delta$ AIC (difference in AIC relative to the best model) lower than 2, which was determined by the “dredge” function of the MuMIn package (Barton 2016). A total of 15 models were selected through this method, and the models combined between four and six predictive variables. From the leaf pilocarpine content estimated by the model with the best AIC, we calculated the ratio of observed pilocarpine values to the expected/estimated values.

### 3.3 RESULTS

The soils collected near the rhizosphere of *P. microphyllus* plants were predominantly acidic, with low nutrient availability (P, Ca, Mg, and B), high levels of metallic micronutrients (Table 1), and higher levels of sand and silt than clay (Figure 1). There was a wide variation in the physical properties of these soils where the *P. microphyllus* plants grew in the CNF (Table 2), and the soils varied in fertility (Figure 2), which was confirmed by the high standard deviation of the samples (Table 1).

Table 1- Mean values and standard deviations of the physical and chemical properties of the soils collected in the plots and means of nutrients found in the leaves of the jaborandi (*P. microphyllus*) accessions in the Carajás National Forest (FLONA, for its name in portuguese).

Attributes	Soil		Leaf	
	Mean <sup>c</sup>	Classification <sup>a</sup>	Mean	Classification <sup>b</sup>
pH	4.27±0.38	-	-	-
N	-	-	22.71 (g kg <sup>-1</sup> ) ±3.51	Low
P (mg dm <sup>-3</sup> )	6.77± 5.36	Low	1.03 (g kg <sup>-1</sup> ) ±0.37	Low
K (mg dm <sup>-3</sup> )	93.91±62.05	High	9.79 (g kg <sup>-1</sup> ) ±4.50	Low
S (mg dm <sup>-3</sup> )	20.45±13.81	Low	1.94 (g kg <sup>-1</sup> ) ±0.55	Good
Ca (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	1.47±2.07	Low	9.03 (g kg <sup>-1</sup> ) ±2.78	Good
Mg (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0.61±0.93	Low	4.25 (g kg <sup>-1</sup> ) ±1.27	High
Al (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	1.34±0.88	High	-	-
H+Al (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	16.42±10.70	-	-	-
m (%) <sup>d</sup>	44.35±23.23	-	-	-
OM (%)	15.95±11.65	-	-	-
B (mg dm <sup>-3</sup> )	0.36±0.27	Low	67.29(mg kg <sup>-1</sup> ) ±23.94	Good
Zn (mg dm <sup>-3</sup> )	2.28±1.89	High	37.75(mg kg <sup>-1</sup> ) ±12.63	High
Fe (mg dm <sup>-3</sup> )	455.45±264.4	High	2239.13 (mg kg <sup>-1</sup> ) ±1979.89	Very high
Mn (mg dm <sup>-3</sup> )	104.88±119.2	High	2095.46 (mg kg <sup>-1</sup> ) ±1697.65	Very high

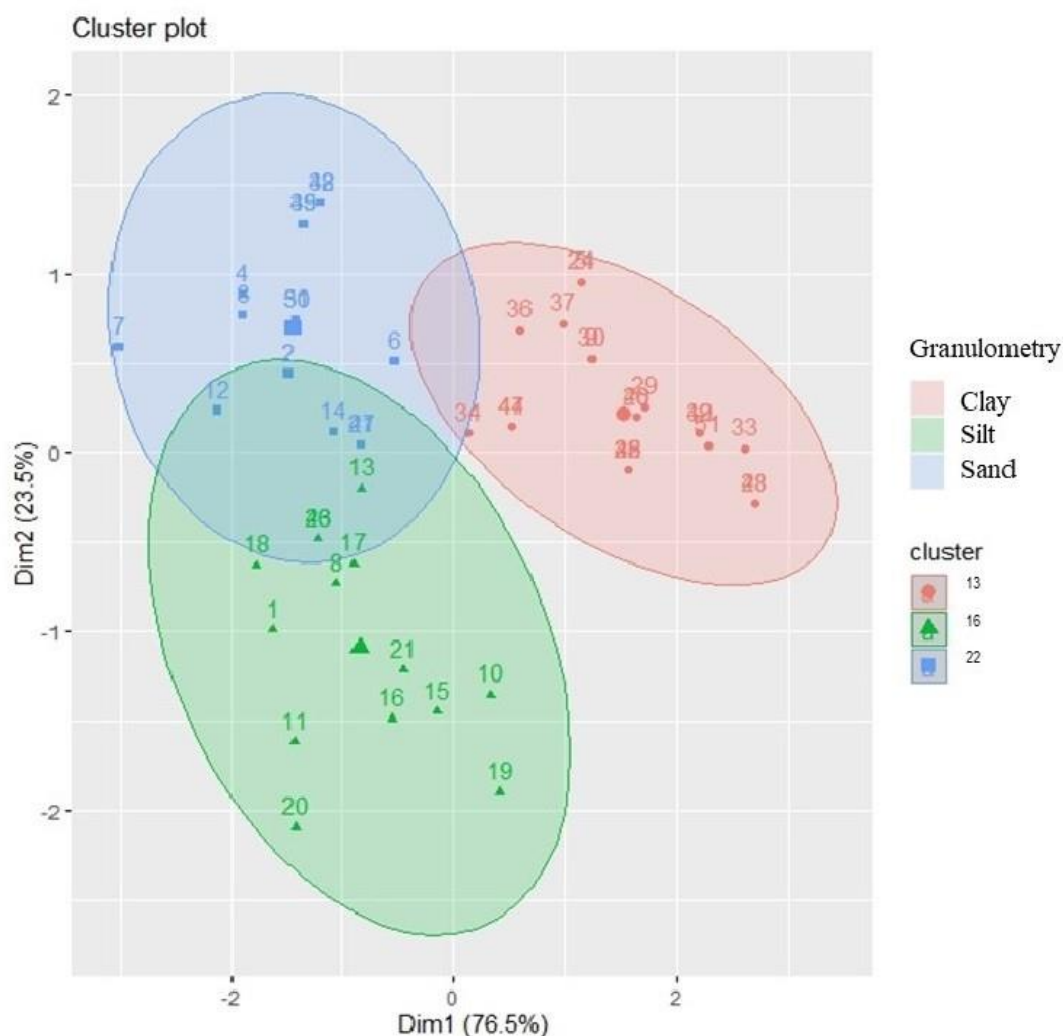
Cu (mg dm <sup>-3</sup> )	0.89±0.70	Average	12.37 (mg kg <sup>-1</sup> ) ±4.36	Good
Sand (%)	54±18.9	Sandy loam		
Clay (%)	19±12.4			
Silt (%)	25±11.0			

<sup>a</sup> Soil properties were classified according to the general recommendations suggested for soils from Pará (Embrapa 2020) using the mean values of the samples. <sup>b</sup> The concentrations of leaf nutrients were classified based on the sample means and according to the reference values for rubber trees (Faquin 2002).

<sup>c</sup> Mean (± SD)

<sup>d</sup> Aluminum saturation

Figure 1 - Classification of soil physical properties (granulometry) of soils collected in plots of jaborandi (*P. microphyllus*) accessions in FLONA of Carajás.



The leaf N, P, and K contents were considered low. The other leaf nutrients showed high or good values, except for Fe and Mn, which had very high concentrations compared to the values of the species grown understorey, such as rubber tree (FAQUIN 2002) (no citations were found for their leaf content *P. microphyllus*) (Table 1).

The leaf contents of the nutrients S, Zn, Cu, Mn, and Fe were positively correlated with their levels available in the soil. Other elements, such as K and B, had negative correlations between their respective values in soil and leaf (Figure 3). In general, leaf pilocarpine levels showed better correlations with the concentrations of nutrients found in the leaves (Figure 3), although all correlation coefficients were weak. Among the soil properties, Fe and Al were positively correlated with pilocarpine, as were pH and S (Figure 3). Thus, these variables were chosen as predictors for the composition of the leaf pilocarpine model.

To build the model, 13 soil (S, Fe, Al, pH, organic matter (OM), Zn) and leaf (N, P, S, Ca, Mg, Cu, Zn) variables were pre-selected, but two soil variables (OM and Zn) were eliminated due to their autocorrelation (data not shown). The models were ranked on their prediction ability according to the AIC (Akaike's information criterion). The most representative model was composed of five predictive variables (Model 1), which were leaf N, P, and Mg and soil S and Fe. Soil S and leaf N were the variables that appeared in all selected models, while soil Fe and leaf P appeared in 13 and 11 models, respectively. Soil Al and pH were not in any of these 15 models (Table 3).

Table 2- Granulometria classification of soil physical properties of soils collected in plots of jaborandi (*P. microphyllus*) accessions in FLONA of Carajás

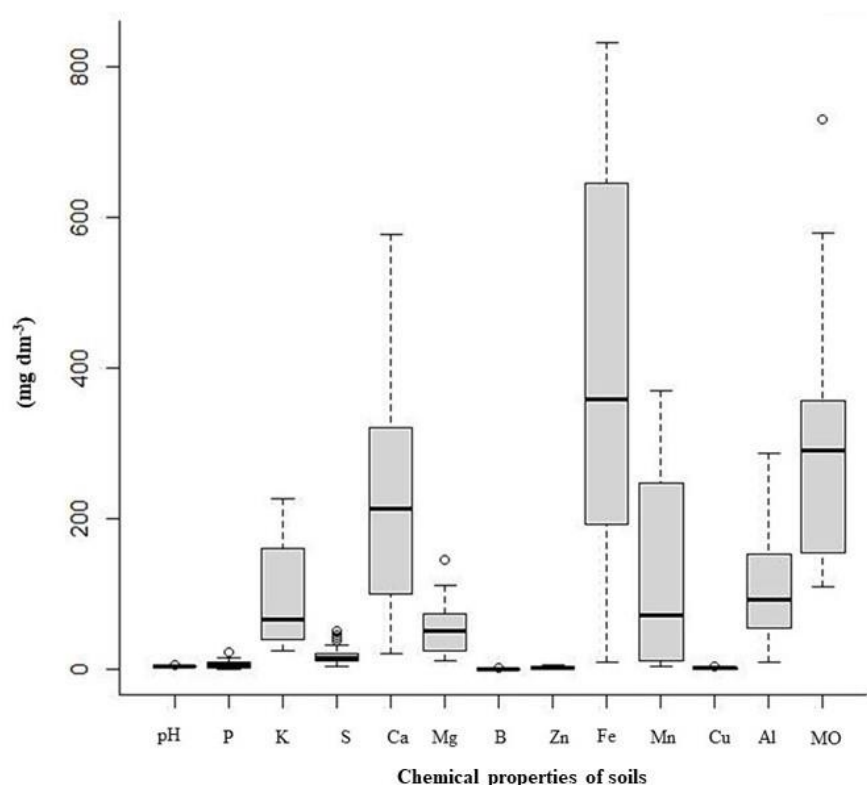
Classification	Granulometry (%)		
	Sand	Clay	Silt
Sandy loam	69	4.0	27
	70	7.0	23
	74	10	16
	69	4.0	27
	74	10	16
	75	7.0	18
	76	6.0	18
	70	7.0	23
	62	10	28
	67	7.0	26
	74	10	16
	75	7.0	18
	61	15	24

	74	10	16
	61	15	24
	30	26	43
	31	25	44
	48	19	33
	44	27	29
	41	26	33
	44	25	31
	37	23	40
Loam	40	16	44
	56	18	26
	38	18	44
	44	25	31
	40	16	44
	38	18	44
	37	23	40
	88	4.0	8.0
	87	2.0	11
Loamy sand	82	4.0	14
	82	4.0	14
	88	4.0	8
	83	4.0	13
	33.8	39	27.2
	41	33	26
	36	43	21
Clay Loam	28	32	40
	43	32	26
	32	37	31
	39	32	29
	39	32	29
	58	29	13
Sandy Clay Loam	52	33	15
	47	36	17

	58.9	33	8.1
	48.4	33	18.6
Silt Loam	17	35	48
Clay	35.9	47	17.1

Through multivariate analysis, the models that made better predictions suggested that higher pilocarpine contents were mainly associated with higher leaf N and Mg and soil Fe, as well as lower leaf P and soil S (Figure 4). The leaf pilocarpine contents estimated by the model with the best AIC (Table 3) showed a correlation coefficient equal to 0.53 (Figure 4). The model proposed in the present study had the limitation of underestimating pilocarpine values in the higher range. Pilocarpine varied from 0.5 to 2.2% contents in these *P. microphyllus* accessions.

Figure 2- Values of chemical properties of soils collected in plots of jaborandi (*P. microphyllus*) accessions in FLONA of Carajás



### 3.4 DISCUSSION

A diversity of textural classes of the collected soils (seven classes) was observed, with a predominance of the loam-sand classes followed by the loam class, which has low cation exchange capacity and water retention. These soils, associated with the limited availability of nutrients, may have affected the synthesis of pilocarpine in the plants evaluated in this study. These edaphic conditions did not prevent the growth of *P. microphyllus*, which might have adaptation mechanisms, or the nutritional levels that characterize toxicity or deficiency in *P. microphyllus* may be different from those of cultivated plants (HARIDASAN 2008).

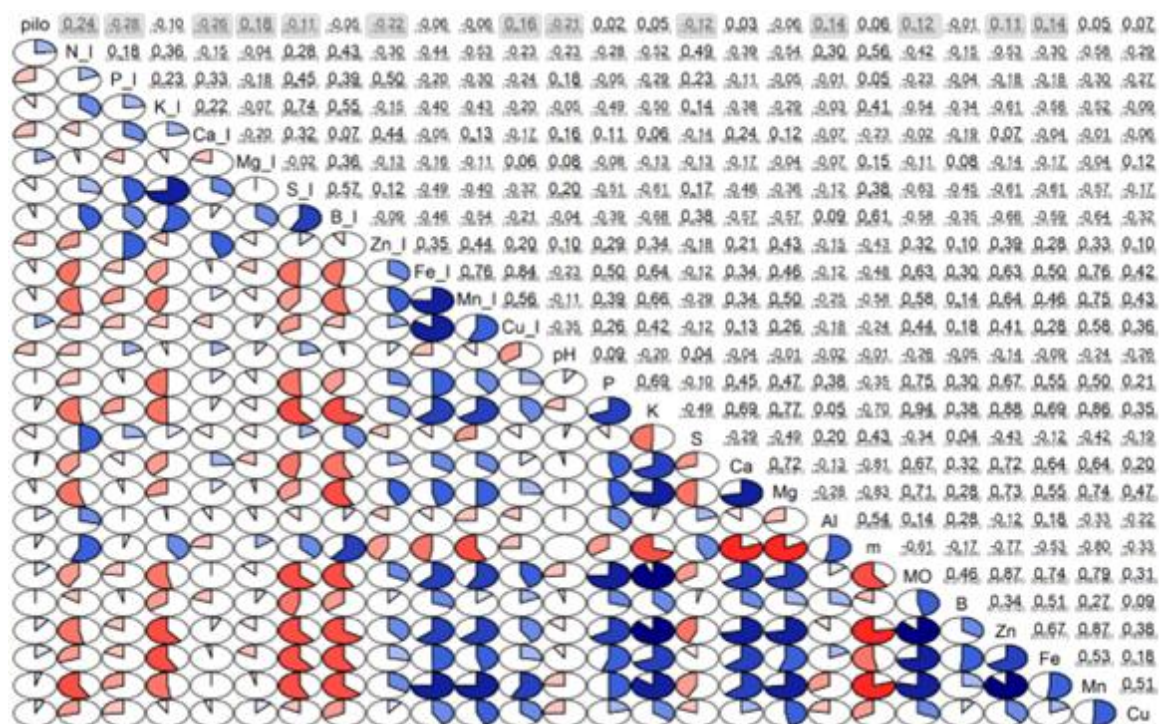
*P. microphyllus* had low leaf N and K when compared to the values mentioned for the species *Pilocarpus spicatus*, which is found in a natural environment (RAULINO *et al.*, 2020). Species found in natural environments may exhibit variability in leaf nutrient levels due to the effects of local edaphoclimatic factors. These lower leaf contents may contribute to the synthesis of pilocarpine, suggesting that some substrates are directed to the synthesis of secondary metabolites and little is directed to primary metabolism. Under these conditions, the species prefers to produce secondary metabolites because it is in a stressful environment (RAMAKRISHNA AND RAVISHANKAR 2011).

The high Fe and Mn values available in the soils were reflected in the high concentrations of these elements in the leaves. Although these high values of leaf Fe and Mn were within the critical levels of toxicity for many crops, such as Fe in the tree species *Eugenia uniflora* (JUCOSKI *et al.*, 2016) and Mn in soybean (SANTOS *et al.*, 2017), these concentrations might not affect the species of this study. If true, *P. microphyllus* could be considered a hyperaccumulating plant of these elements, since its average leaf contents (2870.73 and 2510.84 mg kg<sup>-1</sup>, for Fe and Mn, respectively) were higher than the 200 mg kg<sup>-1</sup> Mn and 300 mg kg<sup>-1</sup> Fe found in the hyperaccumulators *Mimosa somnians* and *Dioclea crenata*, respectively (SKIRYCZ *et al.*, 2014). In parallel to the accumulation of metals in the leaves, Fe, Mn, Cu, Zn, and S were also high in soil. However, the only soil variables included in the pilocarpine prediction models were soil Fe and S. Iron might contribute to the biosynthesis of pilocarpine because it plays an important role in the mechanisms that control secondary metabolism (ISAH 2019).

The high levels of soil Fe may compete with the absorption of other nutrients but boost the formation of pilocarpine. Metals may have effects on biosynthetic pathways

of secondary metabolism, acting directly or indirectly as a source of activation of some pathways (ISAH 2019; LI *et al.*, 2013). The importance of metal stress on the production of secondary metabolites is evidenced in the medicinal plants *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* when exposed to a high iron supply, which induces them to synthesize secondary metabolites (WANG *et al.*, 2021), though this increase depends on the species and nature of the metal as well as its concentration (MALEKI *et al.*, 2017). These specificities are essential to the biosynthesis of the secondary metabolites, since enzymatic activation and the redox function of some micronutrients defines their production (ISAH 2019).

Figure 3 - Correlograms of pilocarpine contents in jaborandi leaves (*P. microphyllus*), foliar nutrients and in the soil of the collection sites. The upper panel presents the correlation values (Pearson) and the lower panel the representation of these correlation, where the slice and the color intensity indicate the correlation value. Correlations of pilocarpine with the other variables having values greater than 0.10 or less than -0.10 are highlighted in the upper line (grey background) and were used as predictive variables for the proposed model.



The production of pilocarpine was more significantly associated and directly proportional to the leaf N and Mg levels. This suggests that despite the low fertility of the collected soils, the *P. microphyllus* absorbed Mg e N in quantities that cause nutritional stress, which contributed to the biosynthesis of the active compound. It is important to emphasize that Mg plays a central role in chlorophyll atoms and in protein synthesis and

is also important in the metabolism of N and, consequently, in the accumulation of alkaloids (GERENDÁS AND FÜHRS 2013). A greater input of Mg also results in higher levels of some alkaloids, such as scopolamine in *Atropa belladonna* L. (HANK *et al.*, 2004). Although there are few studies on the role of Mg associated with the production of alkaloids, to produce these compounds, a high energy demand is necessary and a higher photosynthetic rate may boost their synthesis (TATAGIBA *et al.*, 2017).

Table 3- Ranking of 15 linear models according to AIC criterion for prediction of leaf pilocarpine content according to the concentrations of nutrients in the soil and leaves. The models were created from two soil variables (S and Fe) and seven leaf variables (N<sub>L</sub>, P<sub>L</sub>, S<sub>L</sub>, Ca<sub>L</sub>, Mg<sub>L</sub>, Cu<sub>L</sub>, and Zn<sub>L</sub>), and each model was grouped with at most six variables.

Model	Intercept	S	Fe	N <sub>L</sub>	P <sub>L</sub>	S <sub>L</sub>	df	AICc	delta
1	0.11810	-0.00887	0.00038	0.04906	-	-	7	77.72679	0.00000
					0.23875				
2	0.00632	-0.01063	0.00045	0.04575	-	-	8	78.17558	0.44880
3	0.42408	-0.00949	0.00032	0.04870	-	-	6	78.22948	0.50270
					0.27028				
4	0.63727	-0.01034	0.00031	0.04612	-	-	7	78.26502	0.53823
					0.20929				
5	-0.05866	-0.00895	0.00034	0.05080	-	-	8	78.62360	0.89681
					0.21749				
6	0.33584	-0.00965	0.00037	0.04691	-	-	8	78.62786	0.90107
					0.19353				
7	0.29382	-0.01148	0.00040	0.04501	-	-	7	78.69638	0.96959
8	0.21724	-0.00955	0.00028	0.05060	-	-	7	78.84362	1.11683
					0.24566				
9	0.46969	-0.01050	0.00046	0.04436	-	0.11957	8	79.14587	1.41909
					0.25450				
10	0.19576	-0.01063	0.00051	0.04348	-	-	7	79.30961	1.58283
11	0.44111	-	-	0.04582	-	-	6	79.401116	1.67347
		0.000923			0.26223				
12	0.43808	-0.01030	0.00028	0.04802	-	-	8	79.41302	1.68623
					0.19462				
13	-0.03983	-0.00881	0.00048	0.04834	-	0.07911	8	79.42776	1.70098
					0.27762				
14	0.24479	-0.01099	0.00041	0.04508	-	-	7	79.54232	1.81553
15	0.97181	-0.00998	-	0.03985	-	-	6	79.72231	1.99553
					0.23281				
	Total	15	13	15	11	2	-	-	-
Model	Intercept	Ca <sub>L</sub>	Mg <sub>L</sub>	Cu <sub>L</sub>	Zn <sub>L</sub>	-	df	AICc	delta



1	0.11810	-	0.05202	-	-	-	7	77.72679	0.00000
2	0.00632	-	0.5192	0.01760	-	-	8	78.17558	0.44880
									0.00707
3	0.42408	-	-	-	-	-	6	78.22948	0.50270
4	0.63727	-0.02187	-	-	-	-	7	78.26502	0.53823
5	-0.05866	-	0.04962	0.01164	-	-	8	78.62360	0.89681
6	0.33584	-0.01784	0.4456	-	-	-	8	78.62786	0.90107
7	0.29382	-	-	0.01936	-	-	7	78.69638	0.96959
									0.00778
8	0.21724	-	-	0.01262	-	-	7	78.84362	1.11683
9	0.46969	-	-	-	-	-	8	79.14587	1.41909
		0.027337							
10	0.19576	-	0.05820	-	-	-	7	79.30961	1.58283
									0.00638
11	0.44111	-	-	0.01589	-	-	6	79.401116	1.67347
12	0.43808	-0.01958	-	0.01079	-	-	8	79.41302	1.68623
13	-0.03983	-	0.05399	-	-	-	8	79.42776	1.70098
14	0.24479	-0.02698	0.05046	-	-	-	7	79.54232	1.81553
15	0.97181	-0.02303	-	-	-	-	6	79.72231	1.99553
Total		6	7	6	3	-	-	-	-

The positive correlation between N and pilocarpine indicates the direct role of this nutrient in the synthesis of the studied compound and is probably linked to biosynthesis by the L-histidine pathway (DEBNATH *et al.*, 2018). A positive relationship between N and pilocarpine has also been found in the *in vitro* cultivation of *P. microphyllus* calluses under different proportions of N (ABREU *et al.*, 2005) and in the cultivation of *P. microphyllus* seedlings in nutrient solution (AVANCINI *et al.*, 2003). Alkaloids have a complex constitution capable of yielding numerous compounds of the same biogenetic origin, the nitrogenous molecules (BRIBI 2018).

Although this study did not quantify N forms in the soil, the N supply pathway in the study areas was exclusively through organic matter. These plants found in the natural environment depend on the decomposition of organic matter for nutrient availability (LATIFMANESH *et al.*, 2020) and the absorption of these elements affects their leaf content. Thus, it reinforces the existence of factors related to possible interactions of N with other nutrients in the absorption process, as well as the increase in the energy input for the assimilation and production of organic nitrogen molecules (GIORGI 2009; ISAH 2019).

Among the nutrients that showed a negative effect on pilocarpine content, leaf P can be highlighted. Similar results were found in *in vitro* culture (ABREU *et al.*, 2005). These authors demonstrated that until the eighth day of P omission, pilocarpine level was considerably higher than the complete nutrient solution. In addition, it is suggested that much of the P acquired by the plant is involved in the primary metabolism pathways, which require many energy (ATP) to perform the vital processes of the plant, and perhaps little is intended for the synthesis of secondary metabolites (VIEIRA *et al.*, 2011). Phosphorus has a greater influence on known routes, such as the synthesis of terpenes by the isopentenyl diphosphate and/or methylerythritol phosphate pathways, which does not apply to the biosynthetic pilocarpine pathway in which only assumptions are described (MAHAJAN *et al.*, 2020).

Figure 4 - Projection of the effect of each predictive variable on leaf pilocarpine content according to the best linear model selected by the AIC method. The variables with the best prediction were leaf nitrogen (a), leaf phosphorus (b), leaf magnesium (c), soil sulfur (d), and soil iron (e). The uncertainty of the model (gray band) increased due to too few data at certain nutrient concentrations.

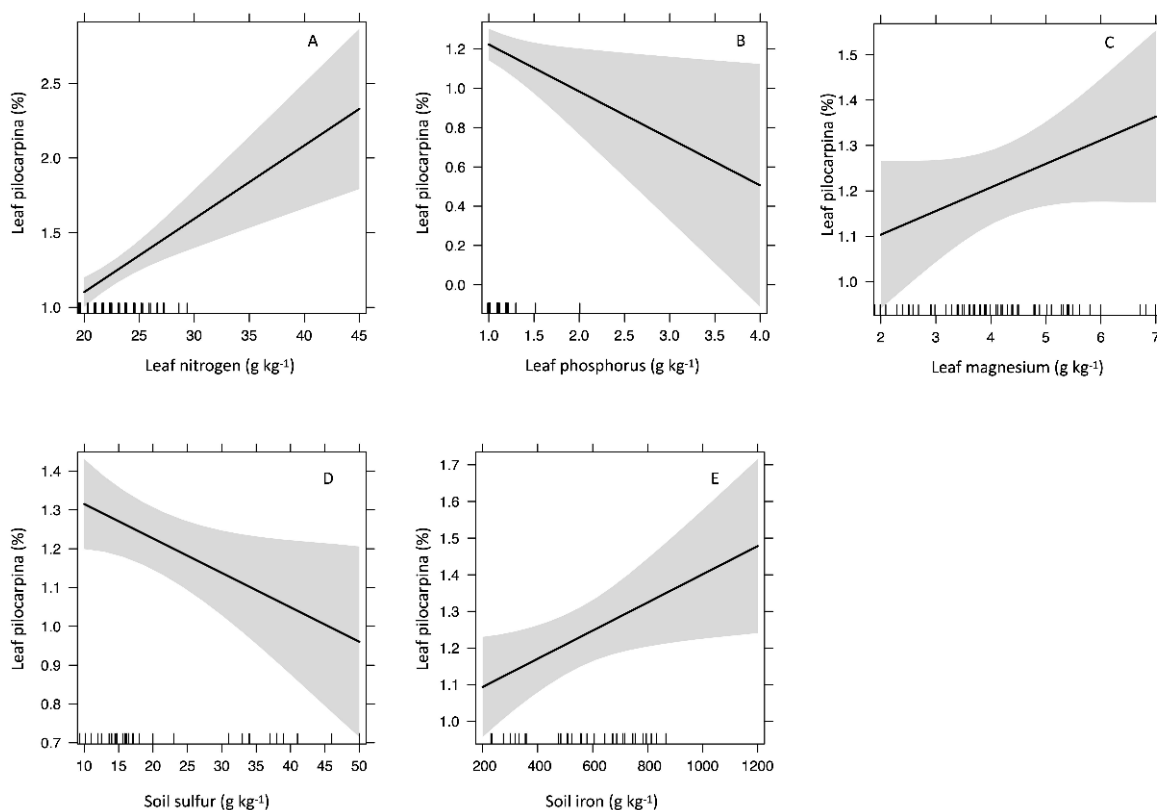
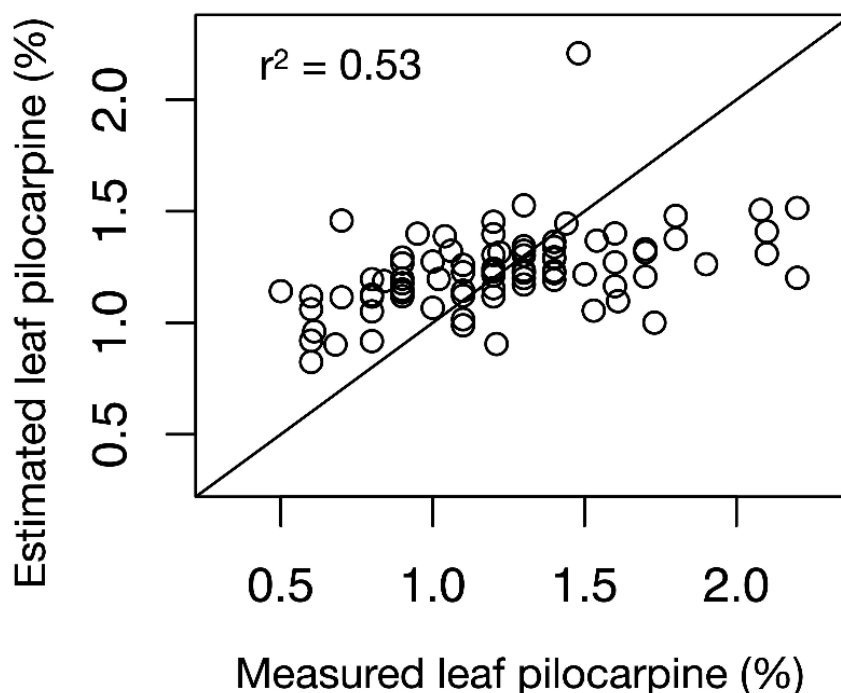


Figure 5 - Leaf pilocarpine levels quantified in samples of *P. microphyllus* leaves and estimated by the linear model that showed the best AIC (model 1 of Table 3).



Sulfur is known for having a negative relationship with the levels of metabolites from shikimic acid (secondary metabolism) (GOBBO-NETO and LOPES 2007). The nutrient also acts in the structures and precursor routes of some indole alkaloids (ZHANG *et al.*, 2020). Sulfur plays a role in stress tolerance, it acts in the structural maintenance of proteins and makes up part of glutathione, an antioxidant that mitigates stress (RABÊLO *et al.*, 2017). Therefore, S may be associated with lower production of pilocarpine because it is supposedly part of the response to oxidative stress and thus does not contribute as much to the production of the secondary metabolite in question.

The model proposed in the present study may underestimate pilocarpine concentrations in the higher range of values, which can be considered a primary or approximate result. However, it still tells us the predictor variables related to soil fertility and leaf levels, and indicates that there is a significant correlation between the parameters analyzed and the production of pilocarpine. The high values of leaf Mg and soil Fe eventually behaved in a relevant manner within the best prediction model. The high amount of Fe in the soils of the CNF is natural (VIANA *et al.*, 2016), and as discussed above, it is an extremely important variable for the production of pilocarpine, which opens the possibility of future studies on this micronutrient.

The nutrients that composed the best model (leaf N and Mg and soil Fe) play roles in nitrogen fixation and go into chlorophyll (PEREIRA *et al.*, 2020). This indicates that the predictive variables are linked to factors common to nitrogen metabolism and suggests a strong influence of the nutrients (Figure 1A), as observed in the biosynthesis of alkaloids (MISHRA *et al.*, 2019). The quantification of the pilocarpine content in this study by the predictive model suggests that the value of pilocarpine obtained (grams of the compound per gram of leaf dry matter = 2%) is higher than the 1.0% found in species (COSTA 2017). This may be related to the wide variation in soil fertility found in the region, which consequently influenced the leaf contents of nutrients and pilocarpine.

### 3.5 CONCLUSION

The levels of pilocarpine found in plants collected in the Carajás National Forest were highly variable (0.4 to 2.2%) and some values are considered very high and have rarely been observed. The results of the present study validate the correlations of leaf contents and soil chemical attributes with pilocarpine production. The best model for pilocarpine prediction consisted of leaf N, leaf Mg, soil Fe (positive correlation), soil S, and leaf P (negative correlation). This suggests that nutritional management for large-scale cultivation of the species and increased pilocarpine production should be focused mainly on N, Fe, and Mg contents.

The study is a pioneer in linking nutrients of soil and leaf with pilocarpine content, which can support nutritional management in large-scale cultivation. In addition, it is an endangered species in which it has great medicinal importance, requiring research to indicate the management and conservation of the species. Understanding these nutritional requirements is especially relevant because of the higher demand for natural pilocarpine, but further experiments with the application of these elements in controlled conditions is necessary to evaluate the optimal dose for pilocarpine production.

**Acknowledgments:** The authors are grateful for the funding for this study provided by the Brazilian agencies CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil), and of the Instituto Tecnológico Vale (ITV).

#### **Declaration**

**Funding:** The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose

**Data availability statement:** The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

**Conflict of Interest:** The authors declare no competing interests

## REFERENCES

ABREU, I.N.; CHOI, Y.H.; SAWAYA, A.C.H.F; EBERLIN, M.N.; MAZZAFERA, P. V. R. Metabolic alterations in different developmental stages of *Pilocarpus microphyllus*. **Planta Medica**, v. 77, p.293-300, 2011.

ABREU, I.N.; SAWAYA, A.C.H.F.; EBERLIN, M.N.; MAZZAFERA, P. Production of pilocarpine in callus of jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* stapf). **In Vitro Cellular & Developmental Biology**. v. 41, p.806-811,2005.

ALLEVATO, D.; GROppo, M.; KIYOTA, E.; MAZZAFERA, P.; NIXON, K.C. Evolution of phytochemical diversity in *Pilocarpus* (Rutaceae). **Phytochemistry**. v.163, p.132-146. 2019

AMARAL, G.C; PEZZOPANE, J.E.M.; JÚNIOR, R.S.N.; FONSECA, M.D.S.; TOLEDO, J.V.; XAVIER, T.M.T; OLIVEIRA, B.S.; MARTÍNEZ, M.F.; JÚNIOR, R.A.C.J.; GONÇALVES, E.O. Ecophysiology of *Pilocarpus microphyllus* in response to temperature, water availability and vapour pressure deficit. **Trees - Structure and Function**. v.35, P. 543-555, 2021

AVANCINI, G.; ABREU, I.; SALDAÑA, M.D.A.; MOHAMED, R.S.; MAZZAFERA, P. Induction of pilocarpine formation in jaborandi leaves by salicylic acid and methyljasmonate. **Phytochemistry**, v. 63, p.171-175, 2003.

BARBOSA, A.C.; QUEIROZ, R.S.; MOTTA, M.M.S.; PORTES, A.J.F. Pseudophakic Vision with residual ametropia after pilocarpine 2% instillation. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v.77, p.349-352, 2018.

BARTON K. (2016) MuMIn: Multi-Model Inference. R package version 1.15.6.

BRIBI, N. Pharmacological activity of Alkaloids: A Review Intestinal anti-inflammatory activity of alkaloids in DNBS, DSS and Acetic Acid Models View project Pharmacological activity of Alkaloids: A Review. **Asian Journal of Botany**, v. 1, p.1-6 ,2018.

CALDEIRA, C.F.; GIANNINI, T.C.; RAMOS, S.J.; VASCONCELOS, S.; MITRE,

S.K.; PIRES, J.P.A.; FERREIRA, G.C.; OHASHI, S.; MOTA, J.A.; CASTILHO, A.; SIQUEIRA, J.O.; FURTINI NETO, A.E. Sustainability of Jaborandi in the eastern Brazilian Amazon. **Perspectives in Ecology and Conservation**, v. 15, p.161-171, 2017.

COSTA, F.G. **Os folheiros do jaborandi: Organização, parcerias e seu lugar no extrativismo amazônico**. Paco Editorial, Belém,2017.

CAO, Y.; LI, K.; LI, Y.; ZHAO, X.; WANG, L. MYB transcription factors as regulators of secondary metabolism in plants. **Biology**, v.9, p.1-16,2020.

DEBNATH, B.; SOMRAJ, W.; DAS, M.; GOSWAMI, S.; KUMAR, M.; MAITI, D.; MANNA, K. Role of plant alkaloids on human health : A review of biological activities. **Materials Today Chemistry**, v. 9, p.56-72, 2018

EMBRAPA. **Recomendação de Calagem e Adubação para o Estado do Pará**. Belém.2020.

FAQUIN, V. **Diagnose do estado nutricional das plantas**, 1<sup>a</sup> ed. Lavras, Lavras, pp 38-43,2002.

GASTAUER, M.; SARMENTO, P.S.M.; SANTOS, V.C.A.; CALDEIRA, C.F.; RAMOS, S.J.; TEODORO, G.S.; SIQUEIRA, J.O. Vegetative functional traits guide plant species selection for initial mineland rehabilitation. **Ecological Engineering**, v. 148, p.1-11, 2020.

GERENDÁS, J.; FÜHRS, H. The significance of magnesium for crop quality. **Plant and Soil**, v. 368, p. 101-128, 2013.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p.374-381, 2007.

GIORGI, A.; MINGOZZI, M.; MADEO, M.; SPERANZA, G.; COCUCCHI, M. Effect of nitrogen starvation on the phenolic metabolism and antioxidant properties of yarrow (*Achillea collina* Becker ex Rchb.). **Food Chemistry**, v.114, p. 204-211, 2009.

HANK, H.; LÁSZLÓ, I.; BÁLVÁNYOS, I.; KURSINSZKI, L.; KOVÁCS, G.; SZOKE, É.; TÓTH, E. Effect of magnesium on the growth and alkaloid production of hairy root cultures. **Acta Horticulturae**, v. 597, p.271-274, 2004.

HARIDASAN, M. Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.20, p. 183-195, 2008.

HOMMA A. K. O. **O extrativismo de folhas de Jaborandi no município de Parauapebas, Estado do Pará.** In: Extrativismo vegetal na Amazônia, Belém, pp 120-123, 2003.

IBGE (2018) Produção da extração vegetal e da Silvicultura (PEVS). Available [www2.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=292&z=t&o=18](http://www2.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=292&z=t&o=18). Accessed 20 April 2020

ISAH, T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. **Biological research**, v. 52, p. 2-25, 2019.

JUCOSKI, G.O.; CAMBRAIA, J.; RIBEIRO, C.; ALVES, J.O. Excess iron on growth and mineral composition in *Eugenia uniflora* L. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, p.720-728, 2016.

LATIFMANESH, H.; DENG, A.; LI, L.; CHEN, Z.; ZHENG, Y.; BAO, ZHENG, C.; ZHANG, W. How incorporation depth of corn straw affects straw decomposition rate and C&N release in the wheat-corn cropping system. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 300, p.07000, 2020.

LI, X.; WANG, S.; GUO, L.; HUANG, L. Effect of cadmium in the soil on growth, secondary metabolites and metal uptake in *Salvia miltiorrhiza*. **Toxicological and Environmental Chemistry**, v. 95, p. 1525–1538, 2013.

MAHAJAN, M.; KUIRY, R.; PAL, P.K. Understanding the consequence of environmental stress for accumulation of secondary metabolites in medicinal and aromatic plants. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 18, p. 100255, 2020.

MALEKI, M.; GHORBANPOUR, M.; KARIMAN, K. Physiological and antioxidative responses of medicinal plants exposed to heavy metals stress. **Plant Gene**, v. 11, p. 247-254, 2017.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional**

**das plantas.** Princípios e aplicações. 2.ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e Fosfato, 1997.

MISHRA, M.R.M.; SRIVASTAVA, R.K.; AKHTAR, N. Effect of Nitrogen, Phosphorus and Medium pH to Enhance Alkaloid Production from *Catharanthus roseus* Cell Suspension Culture. **International Journal of Secondary Metabolite**, v. 6, p.137-153, 2019.

NILE, C.; FALLENI, M.; CIRASOLA, D.; ALGHAMDI, A.; ANDERSON, O.F.; DELANEY, C.; RAMAGE, G.; OTTAVIANO, E.; TOSI, D.; BULFAMANTE, G.; MORACE, G.; BORGHI, E. Repurposing Pilocarpine Hydrochloride for Treatment of *Candida albicans* Infections. **mSphere**, v. 4, p.00689-18, 2019.

PEREIRA, E.G.; SARAIVA, A.G.; DIAS, A.C.; FERREIRA, N.D.S.; LIMA, B.R.; FERNANDES, E.C.; BUC; HER, C.A.; FERNANDES, M.S. O metabolismo de nitrogênio em plantas de arroz é severamente afetado pela deficiência de cálcio e magnésio. **Brazilian Journal of Development**, v.6, p.15353–15361, 2020.

R CORE TEAM (2016) R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria.

RAULINO, W.N.C.; FREIRE, F.J.; ASSUNÇÃO, E.A.A.; ATAIDE, K.M.P.; SILVA, H.V.; SILVA, A.C.F. Nutrition of tree species in tropical dry forest and rainforest environments. **Revista Ceres**, v. 67, p.1-11, 2020.

RABÊLO, F.H.S.; AZEVEDO, R.A.; MONTEIRO, F.A. The proper supply of S increases amino acid synthesis and antioxidant enzyme activity in Tanzania guinea grass used for Cd phytoextraction. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 228, p.1-17, 2017.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G.A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling and Behavior**, v. 6, p.1720-1731, 2011.

SANDHU, S.S.; ABREU, I.N.; COLOMBO, C.A.; MAZZAFERA, P. Pilocarpine content and molecular diversity in *Jaborandi*. **Scientia Agricola**, v. 63, p. 478-482, 2006.

SANTOS, E.F.; KONDO, J.M.S.; PAIXÃO, A.P.; JÚNIOR, E.F.; LAVRES, J.; CAMPOS, M.; REIS, A.R. Physiological highlights of manganese toxicity symptoms in



soybean plants: Mn toxicity responses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.113, p. 6-19, 2017.

SAWAYA, A.C.H.F.; ABREU, I.N.; ANDREAZZA, N.L.; MAZZAFERA, P. Pilocarpine and related alkaloids in *Pilocarpus* Vahl (Rutaceae) In: Cassiano N M (ed) *Alkaloids: Properties, applications and pharmacological effects*, 1<sup>a</sup> ed. United Kingdom, pp 63-80, 2011.

SKIRYCH, A.; CASTILHO, A.; CHAPARRO, C.; CARVALHO, N.; TZOTZOS, G.; SIQUEIRA, J.O. Canga biodiversity, a matter of mining. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 653, 2014.

SOUZA-FILHO, P.W.M.; GIANNINI, T.C.; JAFFÉ, R.; GIULIETTI, A.M.; SANTOS, D.C.; NASCIMENTO, W.R.; GUIMARÃES, J.T.F.; COSTA, M.F.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; SIQUEIRA, J.O. Mapping and quantification of ferruginous outcrop savannas in the Brazilian Amazon: A challenge for biodiversity conservation. **PLoS ONE**, v. 14, p. 0211095, 2019.

TATAGIBA, S.D.; PELOSO, A.F.; RODRIGUES, FÁ. Ganho De Desempenho Fotossintético Promovido Pelo Aumento Na Concentração Foliar De Magnésio Em Arroz. **Revista Univap**, v. 22, p. 749, 2017.

TEIXEIRA, P.C.; DONAGEMMA, G.K.; FONTANA, A.; TEIXEIRA, W.G. **Manual de métodos de análise de solo** (3. ed.). Brasília, DF: Embrapa.2017.

VIANA, P.L.; MOTA, N.F.O.; GIL, A.S.B.; SALINO, A.; ZAPPI, D.C.; HARLEY, R. M.; ILKIU-BORGES, A.L.; SECCO, R.S.; ALMEIDA, T.E.; WATANABE, M.T.C.; SANTOS, J.U.M.; TROVÓ, M.; MAURITY, C.; GIULIETTI, A.M. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: História, área de estudos e metodologia. **Rodriguesia**, v. 67, p. 1107-1124, 2016.

VIEIRA, M.C.; PEREZ, V.B.; HEREDIA, Z.N.A.; SANTOS, M.C.; PELLOSO, I.A.O.; PESSOA, S.M. Nitrogênio e fósforo no desenvolvimento inicial da guavira [*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg] cultivada em vasos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p.542-549, 2011.

WATANABE, M.; YAMADA, C.; KOMAGATA, Y.; KIKUCHI, H.; HOSONO, H.;

ITAGAKI, F. New low-dose liquid pilocarpine formulation for treating dry mouth in Sjögren's syndrome: clinical efficacy, symptom relief, and improvement in quality of life. **Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences**, v. 4, p.1-6, 2018.

WANG, Q.; JIN, Q.; MA, Y.; ZHANG, S.; ZHANG, L.; LIU, Z.; ZHANG, Y. Iron toxicity-induced regulation of key secondary metabolic processes associated with the quality and resistance of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.224, p.112648, 2021.

ZHANG, D.; RUAN, D.; LI, J.; CHEN, Z.; ZHU, W.; GUO, F.; CHEN, K.; LI, Y.; WANG, R. Four undescribed sulfur-containing indole alkaloids with nitric oxide inhibitory activities from *Isatis tinctoria* L. roots. **Phytochemistry**, v. 174, p.112337, 2020.

ZUR, E. Low-dose Pilocarpine Spray to Treat Xerostomia. **International journal of pharmaceutical compounding**, v.24, p.104–108, 2020.

#### 4. NITROGÊNIO AUMENTA A PRODUÇÃO DE PILOCARPINA EM PLANTAS DE JABORANDI

##### RESUMO

As plantas do gênero *Pilocarpus*, sintetizam moléculas nitrogenadas, chamadas de pilocarpina, importante para o tratamento de várias doenças. A espécie *Pilocarpus microphyllus* se destaca por possuir a maior concentração de pilocarpina, e pela grande importância econômica. Embora dada importância, é inexistente informações que associam nitrogênio na biossíntese de pilocarpina, nutrição e rendimento de biomassa. Neste contexto, o objetivo foi avaliar os efeitos de concentrações de N no solo sobre rendimento de biomassa, respostas fisiológicas, concentrações de nutrientes e de pilocarpina em jaborandi. Para isto, foi adotado o delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (0; 90; 180; 270 e 360 mg kg<sup>-1</sup> de N), e dez repetições. As plantas foram alocadas em vasos com solo oriundo de floresta primária, sob casa de vegetação, com uso de sombrite (50%) e monitoramento de temperatura e umidade do ar. As características avaliadas foram: biomassa, teor de pilocarpina, trocas gasosas e teores de nutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Zn e Cu). O maior aporte nitrogenado configurou em ganho contínuo de rendimento de biomassa, produção de pilocarpina e maior absorção de nutrientes (Fe, N, Ca, Mg e Zn), e mesmo que os parâmetros de trocas gasosas, exceto a eficiência instantânea de carboxilação, tenham sido alterados no maior suprimento nitrogenado, as plantas foram capazes de manter os processos metabólicos. Foram detectadas presença de pilocarpina em toda a planta, com a maior concentração (62,5%) nas folhas, sugerindo uma tendência biosintética na raiz, potencializada pela presença marcante do ferro e nitrogênio radicular, translocando-se para o local de maior aporte (folhas). O manejo nutricional voltado a aplicação de nitrogênio e ferro no cultivo do jaborandi, estimulam a síntese de pilocarpina.

**Palavras-chave:** Nutrientes. *P. microphyllus*. Metabolito secundário.

## NITROGEN BOOSTS PILOCARPINE PRODUCTION FROM A THREATENED AMAZONIAN PLANT SPECIES

### ABSTRACT

Plants of the genus *Pilocarpus*, also known as Jaborandi, synthesize the substance pilocarpine, made up of nitrogenous molecules, with applicability in the production of various drugs. The species *Pilocarpus microphyllus* stands out for having the highest concentration of pilocarpine (1%), configuring great economic expression. Although given importance, in the literature there is no data that associate nitrogen in the biosynthesis of pilocarpine, nutrition and biomass yield. In this context, the aim of this study was to evaluate whether different nitrogen doses affect biomass and pilocarpine in jaborandi plants. For this, a completely randomized design was adopted, with five treatments ranging from low to high doses (0; 90; 180; 270 and 360 mg kg<sup>-1</sup> of N), and ten replications. The plants were placed in vases with soil from primary forest, under a greenhouse, using shade (50%) and temperature and humidity monitoring. The evaluated characteristics were: Biomass, pilocarpine content, gas exchange and nutrient content (N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Zn and Cu). The results indicate that the greater nitrogen input configured a continuous gain in biomass yield, pilocarpine production and greater absorption of nutrients (Fe, Zn and N), and even though many gas exchange parameters have been disturbed, under these conditions, the plants of jaborandi were able to maintain the metabolic processes. The presence of pilocarpine was detected in all parts of the plant, highlighting the leaf tissue with the highest amount of pilocarpine (62,5%) and suggesting a possible biosynthetic route, initiated in the root, stimulated by the strong presence of iron and nitrogen. The results of the present study emphasize nutritional management aimed at the application of nitrogen and iron in jaborandi cultivation, as they stimulate pilocarpine synthesis.

**Key Words:** Nutrients. *P. microphyllus*. Secondary metabolite.

## 4.1 INTRODUÇÃO

A flora nativa brasileira acomoda plantas com grande potencial terapêutico, catalogadas nos diferentes ecossistemas, o que movimenta a receita de comunidades locais e da indústria farmacêutica mundial (NEWMAN; CRAGG, 2020; MONTEIRO *et al.*, 2022). A Floresta Amazônica é responsável por abrigar a maior diversidade biológica do mundo, estimando 15.000 espécies de plantas com propriedades fitoterápicas, e grande parte classificadas como endêmicas (SKIRY CZ *et al.*, 2016). Contudo, o aumento da vulnerabilidade ambiental ocasionou uma forte erosão genética de plantas medicinais, tornando muitas espécies ameaçadas (BRAGA, 2021).

As espécies do gênero *Pilocarpus*, ou jaborandi, são nativas do Brasil ocorrendo nos estados do Pará, Maranhão e Piauí (CALDEIRA *et al.*, 2017). Suas folhas são historicamente usadas pela comunidade indígena, e atualmente é empregada como ingrediente farmacêutico ativo (IFA) nos tratamentos de glaucoma (XINGQI *et al.*, 2019); presbiopia (PRICE *et al.*, 2021) e xerostomia (TANAKA *et al.*, 2022), isso devido a presença do fármaco chamado pilocarpina, principal composto encontrado na espécie.

Atualmente, a planta é responsável por gerar renda para as comunidades locais extrativistas. Segundo IBGE (2021), foram produzidas 300 toneladas de folhas secas, sendo 90% exportada para países europeus, para finalização do produto e posterior revenda mundial. As folhas, constituindo-se, portanto, como o produto de maior destaque no setor dos produtos derivados da extração vegetal.

A expressiva relevância da espécie associada a exploração insustentável das folhas do jaborandi, ausência de planos de manejos e pressões sob os ecossistemas, reduziram mais de 50% das populações naturais, questões estas que foram fundamentais por colocar cinco espécies do gênero na Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (IBAMA, 2008). Neste sentido, a espécie *P. microphyllus* Stapf ex Wardlew, ganha destaque pela maior disposição geográfica, prevista, e conteúdo significativo de pilocarpina foliar, cerca de 0,5 a 1% (ABREU *et al.*, 2007; SAWAYA *et al.*, 2011; CALDEIRA *et al.*, 2017).

A elevada demanda por fármacos derivados da pilocarpina, e a possível expansão no uso para novos tratamentos, como *Candida albicans* (NILE *et al.*, 2019) e dermatite atópica (ROH *et al.*, 2022) não acompanham a disponibilidade do material vegetal oriundo de áreas nativa, provocando a necessidade de áreas de cultivo, bem como de

protocolos de manejo nutricional visando a obtenção de níveis elevados de biomassa, associado a maiores concentrações de pilocarpina nas folhas. No entanto, existem poucas informações quanto as respostas fisiológicas, o acúmulo de biomassa vegetal, a biossíntese de pilocarpina e a composição nutricional, em especial ao aporte de nitrogênio (N), uma vez que este é considerado o nutriente mais limitante para o crescimento e desenvolvimento das plantas, por ser fundamental na formação de moléculas como clorofilas, proteínas e ácidos nucleicos (UEDA *et al.*, 2017).

De Jesus *et al.* (2022) cita que por meio de predições verificaram a relação positiva entre N foliar e biossíntese de pilocarpina, observando concentrações superiores a 2%, em plantas de ocorrência espontânea. Avancini *et al.* (2003), determinaram que a administração equilibrada de N conserva o conteúdo de pilocarpina no tecido foliar, quando cultivadas em ambiente controlado, enquanto que o baixo suprimento de N reduziu em 68% o acúmulo de matéria seca (BRASIL e VIEGAS 1999; VIEGAS,1998). Contudo, informações técnicas sobre o efeito de diferentes concentrações de N e os impactos na absorção dos nutrientes e sua relação na produção da substância, ainda não foram devidamente esclarecidas.

Considerando que a pilocarpina é um alcaloide imidazólicos, rico em N, sintetizada pela enzima L-histina (ABREU *et al.*, 2007), bem como o impacto do N sobre o acúmulo de biomassa no jaborandi, este estudo tem por hipótese que aporte de N induz mudanças nutricionais e fisiológicas que atuam de forma positiva no acúmulo de biomassa e síntese de pilocarpina no jaborandi. Para isto, objetivou-se avaliar os efeitos de concentrações de N no solo sobre rendimento de biomassa, respostas fisiológicas, concentrações de nutrientes e de pilocarpina nos órgãos da planta.

## **4.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1 Origem das sementes e produção de mudas**

As sementes de *Pilocarpus microphyllus* foram obtidas de coletas em ambiente de ocorrência natural na Floresta Nacional de Carajás, Pará, Brasil. As mudas de jaborandi foram produzidas em bandejas de polipropileno de 50 células, com capacidade volumétrica de 0,0125 L e dimensões de 9 cm x 4.8 cm x 1.8 cm, cada célula. Elas foram preenchidas com substrato orgânico na proporção 2:1 (fibra de coco e composto orgânico). As bandejas foram irrigadas manualmente com um borrifador de pressão e colocadas sob uma área com sombrite (50%), sendo irrigadas quinzenalmente com

solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), a 25% da concentração iônica, até completarem 60 dias. A seleção de plântulas para o estudo foi realizada em função do número de folhas (quatro folhas) e vigor.

#### 4.2.2 Localização e caracterização da área experimental

O estudo foi desenvolvido na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), campus Belém, em casa de vegetação localizada na área do Instituto De Ciências Agrárias, com as seguintes coordenadas geográficas 48° 26' 14'' W e 1° 27' 22'' S, e altitude de 6,37 m. O clima da região é classificado como Af, com predominância de chuvas acima de 60 mm em todos os meses do ano (ALVARES *et al.*, 2013).

No trabalho foram medidas a temperatura e umidade relativa do ar, utilizando um termo higrômetro instalado no interior da casa de vegetação, e tela sombrite 50%. As temperaturas médias máxima e mínima verificada foram de 35,8 °C e 25,5 °C, e para umidade os valores médios constatados foram de 97,5% (máximo) e 44,6% (mínimo).

#### 4.2.3 Condições de cultivo

Antes da instalação do experimento, foi realizada a coleta de solo em floresta primária, na camada de 0-20 cm de profundidade. As amostras de solo foram secas ao ar e analisadas quanto os seguintes atributos químicos do solo: pH em água pela relação solo: água de 1:2.5; Ca, Mg e Al extraídos com KCl 1 mol L<sup>-1</sup>, sendo Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> quantificados por titulação com 0,0125 mol L<sup>-1</sup> EDTA, e Al<sup>3+</sup> por titulação com 0,025 mol L<sup>-1</sup> NaOH; K e P disponíveis extraídos pela solução de Mehlich-I, 0,05 mol L<sup>-1</sup> HCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> + 0,0125 mol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sendo K quantificado por fotometria de chama e P por colorimetria, todos os métodos seguiram conforme Teixeira (2017). A amostra obteve os seguintes valores: pH=4.7; Ca = 1,87 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Mg= 0,30 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; P=29,26 mg dm<sup>-3</sup>; K= 0,05 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Al = 0,23 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> e H+Al= 6,7. Na análise granulométrica foram determinadas as frações areia, silte e argila, pelo princípio do método da pipeta (EMBRAPA 1997). Determinados pelos seguintes valores: Argila (7.4 %); Silte (15.2 %) e Areia (77.4 %), classificando o solo como Franco Arenoso.

Após a homogeneização do solo coletado foram adicionados 2,8 kg de solo em vasos com capacidade para 3 L (15 cm x 17.5 cm x 17.5 cm), para posterior transplântio das mudas. A adubação foi realizada segundo Brasil e Viegas (1999), usando como fontes de nutrientes, cloreto de potássio (100 mg dm<sup>-3</sup>), superfosfato simples (120 mg dm<sup>-3</sup>) e o

nitrogênio aplicado na forma de ureia. O fósforo foi aplicado de uma única vez, no ato da implantação do experimento, enquanto que o nitrogênio e potássio foram parcelados em quatro aplicações. Os micronutrientes foram adicionados no primeiro mês, em forma de solução nutritiva proposta por Hoagland e Arnon (1950).

A irrigação foi efetuada de forma manual utilizando 433ml de água destilada, com turno de rega intercalados (1 dia), determinada pela capacidade de campo a 50%, esta obtida pela metodologia proposta pela Embrapa (1979). E quando necessário, foi efetuado o controle de pragas com catação manual ou com extrato de folha de *Azadirachta indica* (Nim). Em casos de maior densidade populacional foi aplicado o Decis 25 EC na concentração de 0,3 mL L<sup>-1</sup>.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos, constituído por doses de nitrogênio (0; 90; 180; 270 e 360 mg dm<sup>-3</sup>), e 10 repetições. A dose tomada como base (180 mg dm<sup>-3</sup>), foi oriunda dos resultados obtidos por Brasil e Viegas (1999), para o cultivo do jaborandi.

#### 4.2.4 Material vegetal

As plantas foram coletadas aos 180 dias após o transplântio, onde foram avaliados o número de Folhas (NF): Determinada por contagem simples; Altura (cm): Determinada a partir de uma régua, medindo-se onde o caule toca o solo até o ápice da planta; Área Foliar (AF - cm<sup>2</sup> planta<sup>-1</sup>) obtida por meio de um integrador de área foliar modelo LI-3100 (LI-COR, Lincoln, NE, USA); Peso específico foliar, calculado pelo produto da massa seca foliar dividido pela área foliar.

Também foram analisadas a massa seca da folha (MSF - g planta<sup>-1</sup>); massa seca da raiz (MSR - g planta<sup>-1</sup>) e massa seca do caule (MSC - g planta<sup>-1</sup>). Determinadas pelo fracionamento de cada parte da planta, com posterior alocação em sacos de papel, e colocados para secagem em estufa com circulação de ar forçada, a 65 °C, até atingirem massa constante. Utilizou-se para a pesagem uma balança analítica de precisão (0,001 g).

#### 4.2.5 Extração da pilocarpina

Após o fracionamento das partes da planta e secagem, elas foram trituradas em moinho do tipo Willey, passadas em peneiradas de 20 mesh e armazenadas em sacos de papel. Para extração da pilocarpina foram utilizadas 50 mg de amostra de folhas, caule e



raiz, cada amostra foi transferida para um recipiente de vidro onde foi umedecido com  $\text{NH}_4\text{OH}$  10% (2 gotas) por 15 min, em seguida, foram adicionados 0,3 mL de  $\text{CHCl}_3$ , que foram homogeneizados por 1 min, utilizando o agitador (Basic K40-2810-Kasvi). O  $\text{CHCl}_3$  foi recuperado por centrifugação e o precipitado extraído com 0,3 mL de  $\text{CHCl}_3$ . As frações de  $\text{CHCl}_3$  foram reunidas e extraídas duas vezes, com 0,3 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 2%. Os extratos ácidos reunidos foram neutralizados para pH 12, com auxílio de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , em seguida foram extraídos duas vezes usando 0,3 mL de  $\text{CHCl}_3$ . Foram reunidas as frações orgânicas e secas com fluxo de ar, esse extrato foi dissolvido em 0,2 mL de fase móvel, filtrado em membrana 0,45  $\mu\text{m}$  e injetado no HPLC. Usou-se a Coluna Shim-pack VP-ODS (250x4,6 mm, 4,6 $\mu\text{m}$ , Shimadzu), para separação de pilocarpina. E para eluição foram utilizadas 13,5 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 3 mL de trietilamina em 850 mL de MilliQ  $\text{H}_2\text{O}$  (pH 3 ajustado com  $\text{NaOH}$ ) e 112 mL de  $\text{MeOH}$ . O fluxo foi de 1  $\text{mL min}^{-1}$  e a detecção foi operada no comprimento de onda de 212 nm.

#### 4.2.6 Trocas gasosas

Aos 179 dias após o transplante, foi realizada análise de trocas gasosas em folhas completamente expandidas e saudáveis. As avaliações foram realizadas pela manhã, entre as 9:00 e 11:00 h, com o equipamento LI-6400 XTR (Licor, NE, USA) sendo as informações coletadas nas folhas do terço médio das plantas. Avaliou-se a taxa de assimilação líquida ( $A$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ), eficiência instantânea de carboxilação ( $A/C_i$ ) - obtida pela razão entre  $A$  e  $C_i$ , relação entre concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  e a concentração de  $\text{CO}_2$  no ambiente - obtida pela razão entre  $C_i$  e  $C_a$ , transpiração ( $E$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e eficiência do uso da água ( $i\text{WUE}$ ,  $\text{mol CO}_2 \text{ mmol H}_2\text{O}$ ) - obtida pela razão entre  $A$  e  $g_s$ .

#### 4.2.7 Análise de Clorofila Total

Durante o período de coleta foram separadas amostras frescas das folhas de jaborandi, pertencentes ao terço médio, para a quantificação da clorofila total. A determinação do teor do pigmento foi feita conforme metodologia de Lichthenthaler (1987), sendo os resultados expressos em  $b$  ( $\text{mg g}^{-1} \text{ MF}$ ).

#### 4.2.8 Teor de nutrientes minerais

Foram destinadas 1g de cada amostra para a digestão em solução de ácido nitroperclórico, para determinação dos teores de P (calorimetria), K (fotometria de chama), Ca e Mg (absorção atômica), S (turbidimetria), Cu, Fe, Zn e Mn (espectrometria

de absorção atômica) e N seguiu-se à solubilização sulfúrica pelo método de Kjeldahl, obedecendo a metodologia proposta pela Malavolta (1997).

#### 4.2.9 Análise estatística

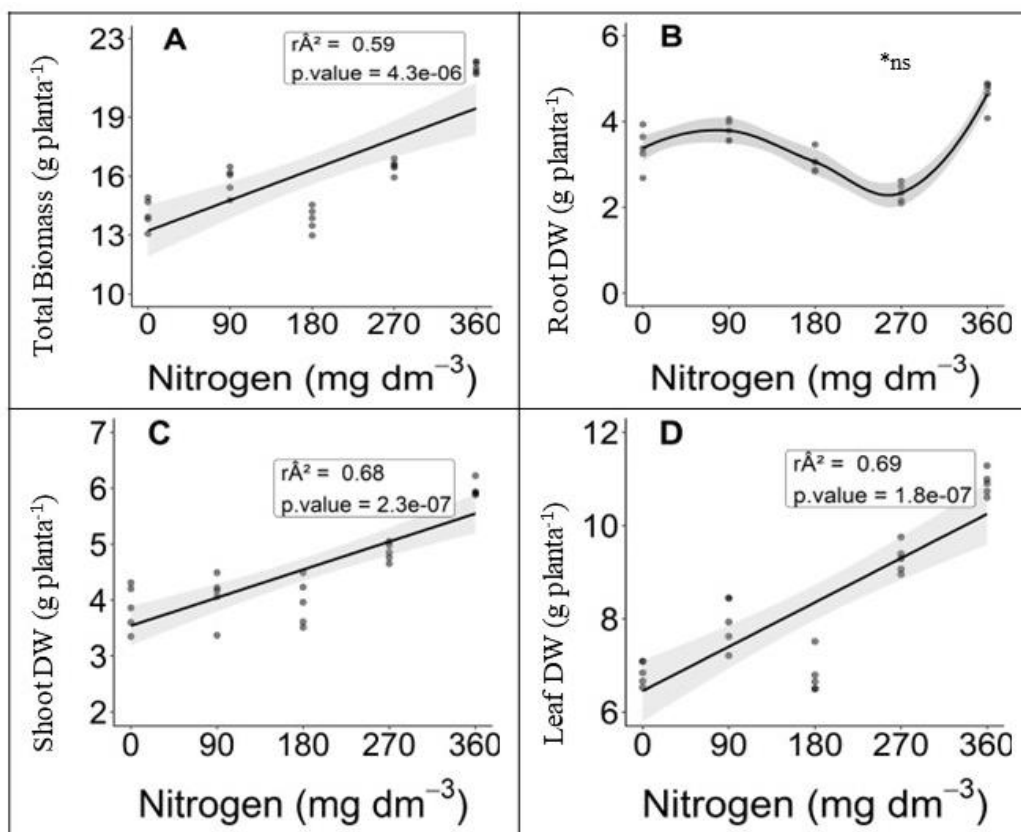
Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e ao teste de homogeneidade de variâncias de Bartlett e, quando dentro dos padrões de normalidade e homogeneidade, foram sujeitos à análise de variância, e se significativos, destinados a análise de regressão estipulando representações com  $R^2 \geq 50\%$  e significância de todos os coeficientes a 5% de probabilidade, com seus parâmetros testados via teste t. Os dados foram averiguados por meio do software R v.4.3.1 (R CORE TEAM, 2020).

### 4.3 RESULTADOS

O fornecimento de N em plantas de jaborandi afetou significativamente as características de crescimento, Ecofisiologia, bioquímica e nutricional das plantas, observando-se, em geral, incrementos com aumento das concentrações de N. Respostas lineares crescentes foram verificadas na altura, área foliar e número de folhas das plantas. Por outro lado, a massa específica das folhas foi reduzida à medida que se elevou as doses de N no solo (Figura 1S).

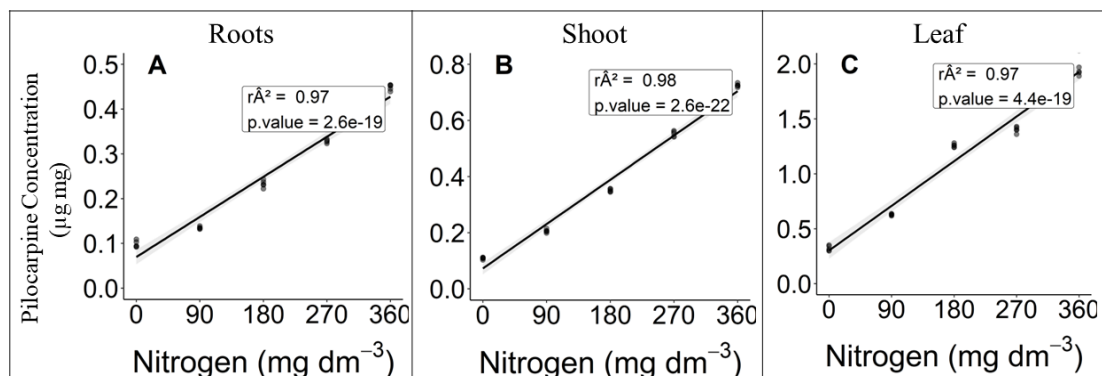
As doses de N afetaram o acúmulo de biomassa no jaborandi. A biomassa total, do caule e da folha responderam positivamente ao incremento de N, com máximas respostas obtidas na maior dose testada ( $360 \text{ mg dm}^{-3}$ ) que incrementou em 65% da biomassa total, 72% do caule e 72% da folha quando se compara com o tratamento de baixo N ( $0 \text{ mg dm}^{-3}$ ). Em geral, baixos suprimentos de N prejudicaram o acúmulo de biomassa na planta. A biomassa radicular não foi afetada pelas doses de N no solo (Figura 1A, B, C e D).

Figura 1 - Biomassa seca total, massa seca de raiz, caule e folha de plantas de jaborandi submetidas a diferentes concentrações de nitrogênio. Belém, 2023. \*ns: não significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.



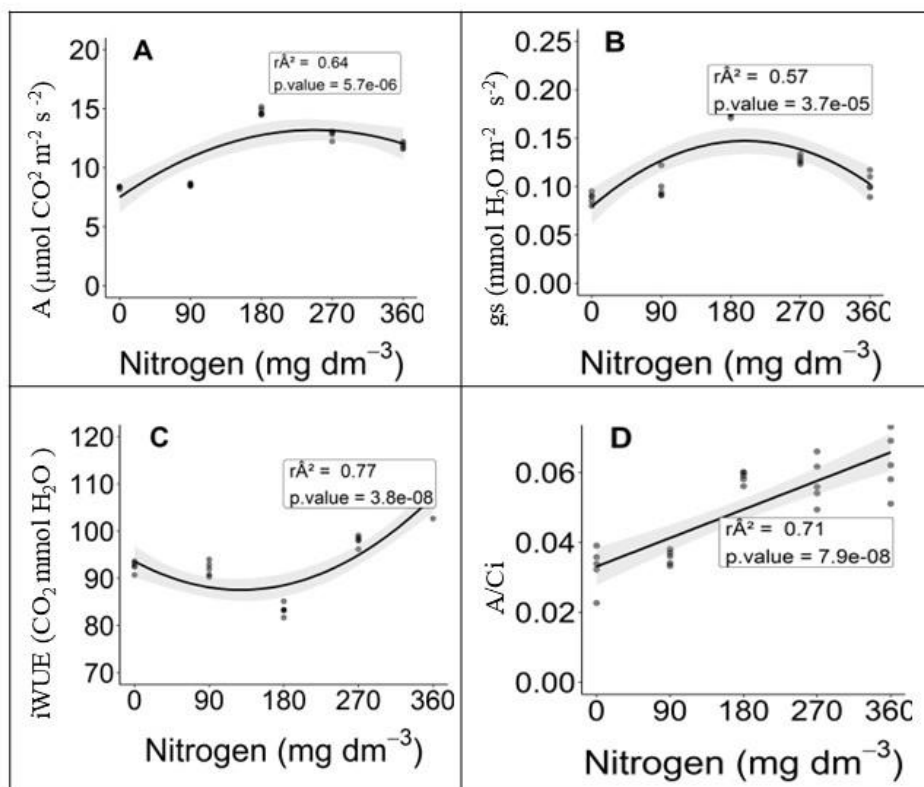
Alterações significativas do conteúdo de pilocarpina analisadas nos diferentes órgãos das plantas de jaborandi foram verificadas (Figura 2). As doses de pilocarpina cresceram proporcionalmente ao aumento da dose de N em todas as partes da planta, com máximas respostas na maior dose testada (360 mg dm<sup>-3</sup>) (Figura 2). As baixas doses de N foram insuficientes para estimular a biossíntese de pilocarpina independente do órgão analisado. Em relação a distribuição do conteúdo de pilocarpina nos diferentes órgãos, verificou-se que a folha apresentou maior quantidade de pilocarpina (62,5%), seguida do caule (21,9%) e da raiz (15,6%).

Figura 2 - Teor de pilocarpina na raiz (A), caule (B) e folha (C) de plantas de jaborandi submetidas a diferentes concentrações de nitrogênio. Belém, 2023



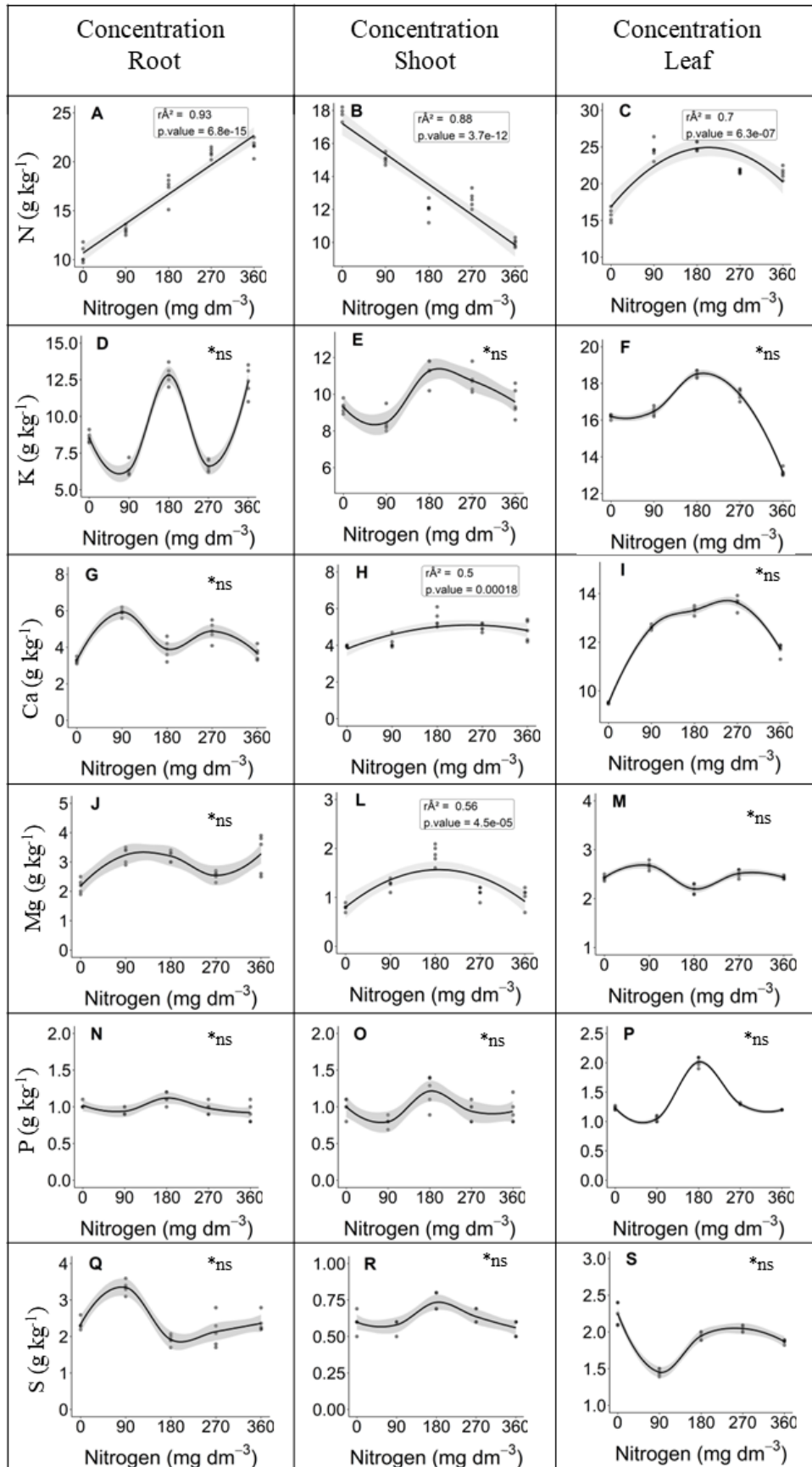
As trocas gasosas foram afetadas pelo suprimento de N, havendo incremento de A com a elevação do fornecimento de N, sendo a maior resposta estimada na concentração de 248 mg dm<sup>-3</sup> de N, com incremento de 73% em relação a menor dose de N (Figura 3A). A *g<sub>s</sub>* demonstrou padrão de respostas semelhante a fotossíntese líquida, obtendo máxima taxa de abertura estomática com a dose estimada de 189 mg dm<sup>-3</sup> de N, contribuindo 71% em relação a ausência de N, reduzindo após doses adicionais do nutriente (Figura 3B). A *iWUE* apresentou comportamentos distintos nas faixas de doses de N testada, exibindo um padrão de declínio e elevação de sua eficiência, sendo a maior resposta verificada na maior dose de N testada (360 mg dm<sup>-3</sup>), apresentando incrementos de 26% se comparada a baixa dose de N (Figura 3C), enquanto que a *A/C<sub>i</sub>*, demonstrou resposta linear crescente, atingindo incrementos de 90% (Figura 3D). Respostas quadráticas foram observadas para concentração de clorofila, *E* e *C<sub>i</sub>*, com máxima resposta estimada na concentração de 239, 197 e 144 mg dm<sup>-3</sup> de N, contribuindo em 73%, 78% e 3% respectivamente, quando comparada a resposta obtida no tratamento sem N. Já a relação *C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>* não sofreram alteração com a dose menor de N (Figura 2S).

Figura 3 - Fotossíntese líquida (A,A), condutância estomática (gs, B), eficiência de uso da água (iWUE, C) e eficiência instantânea de carboxilação (A/Ci, D) em plantas de jaborandi submetidas a diferentes concentrações de nitrogênio. Belém, 2023



O aumento do fornecimento de N no solo resultou em alterações na absorção e translocação de N nos diferentes órgãos da planta de jaborandi, observando-se concentrações de N na folha, de forma quadrática, e por meio da derivada do modelo estimou-se respostas máximas na concentração de 204 mg dm<sup>-3</sup> de N, responsável por incrementos de 58% em relação ao tratamento com menor N. Na raiz, as concentrações obtiveram resposta lineares e crescentes, enquanto que no caule ocorreu redução de forma linear (Figura 4A, B e C). Os conteúdos de K, P e S não sofreram variações significativas em relação as doses de N (Figura 4). Os macronutrientes Ca e Mg tiveram seus conteúdos aumentados apenas no caule com a elevação do N no solo, sendo que as máximas respostas foram obtidas nas doses estimadas de 244 e 187 mg dm<sup>-3</sup> de N, com incrementos de 41% e 140%, respectivamente, em relação ao tratamento com baixo N (Figura 4H e L).

Figura 4 - Concentração de N, K, Ca, Mg, P e S em raiz, caule e folhas de plantas de jaborandi submetidas a diferentes concentrações de N. Belém, 2023.\* ns: não significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.



As concentrações dos micronutrientes Fe, Zn e Cu em plantas de jaborandi sofreram alterações significativas pela dose de N fornecido, enquanto que o Mn não exibiu efeitos aparentes independente do órgão analisado. As concentrações de Fe na folha e na raiz tiveram comportamentos distintos com o fornecimento de N, no entanto, as maiores concentrações de Fe observadas foi com a maior aporte de N testado ( $360 \text{ mg dm}^{-3}$ ), com incrementos de 26% em relação a menor dose de N. Destaca-se que a maior concentração de Fe foi observada na raiz que exibiu comportamento linear ao fornecimento de N, enquanto que as folhas demonstraram repostas quadráticas. O conteúdo de Fe no caule não sofreu influência quanto a variações de N (Figura 5 A, B e C).

As concentrações de Zn na planta de jaborandi sofreram modificações apenas no caule e na raiz, sendo que as maiores concentrações foram observadas na raiz. O caule apresentou comportamento quadrático com máximo acúmulo obtido na dose estimada de  $186 \text{ mg dm}^{-3}$  de N, contribuindo com 79% em relação ao tratamento sem o fornecimento de N, enquanto que a raiz um ajuste linear crescente, com maior acúmulo de Zn na maior dose testada de N ( $360 \text{ mg dm}^{-3}$ ) (Figura 5 E e D).

A concentração de Cu foi afetada apenas no caule das plantas com aumento do suprimento de N, observando comportamento de acúmulo quadrático com máxima resposta obtida na dose estimada de  $183 \text{ mg dm}^{-3}$  de N, responsável por 121% quando comparada ao tratamento com menor N (Figura 5 H).

Figura 5 - Concentração de Fe, Zn, Cu e Mn em folhas, caule e raízes de plantas de jaborandi submetidas a diferentes concentrações de N. Belém, 2023. \*ns: não significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.

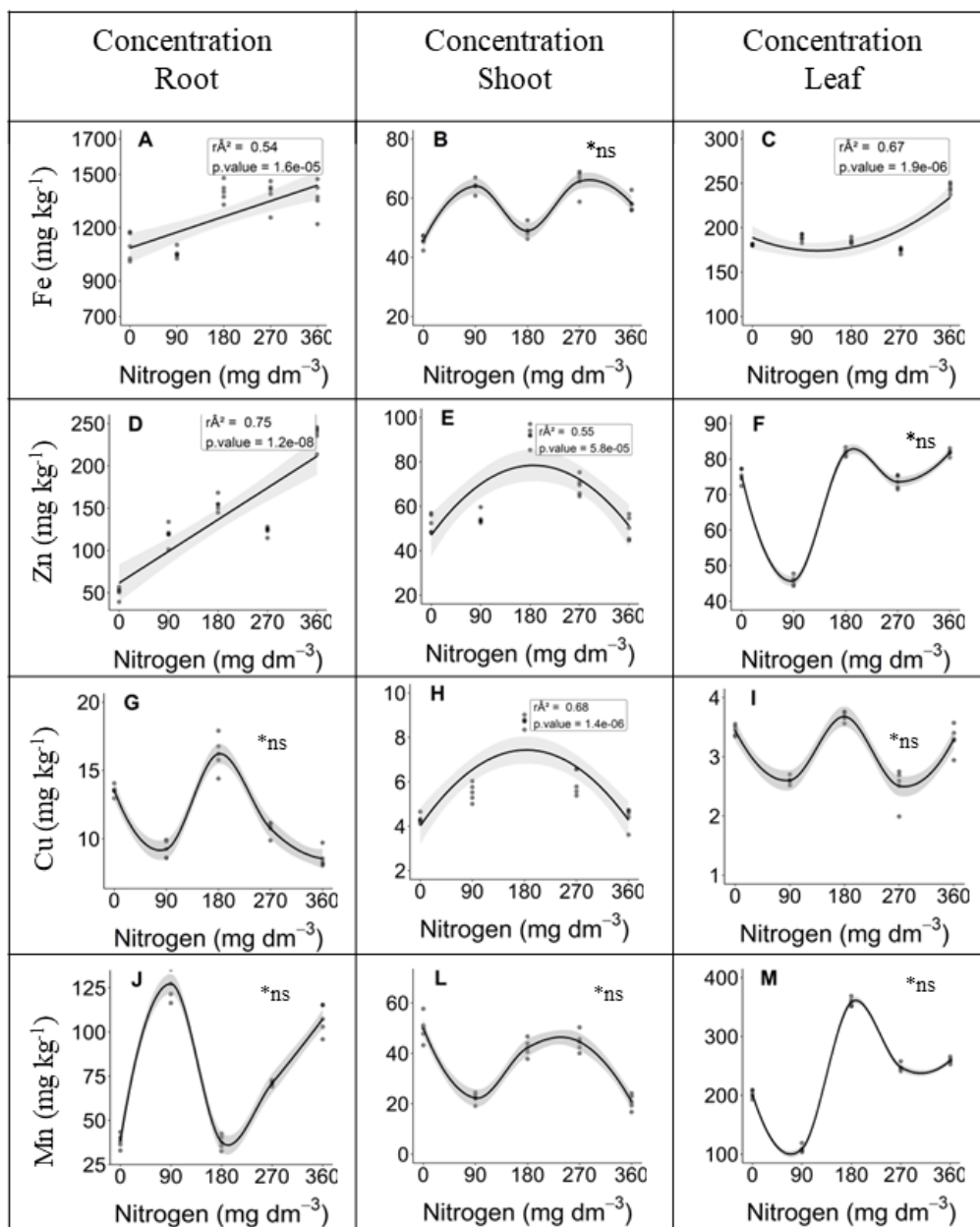
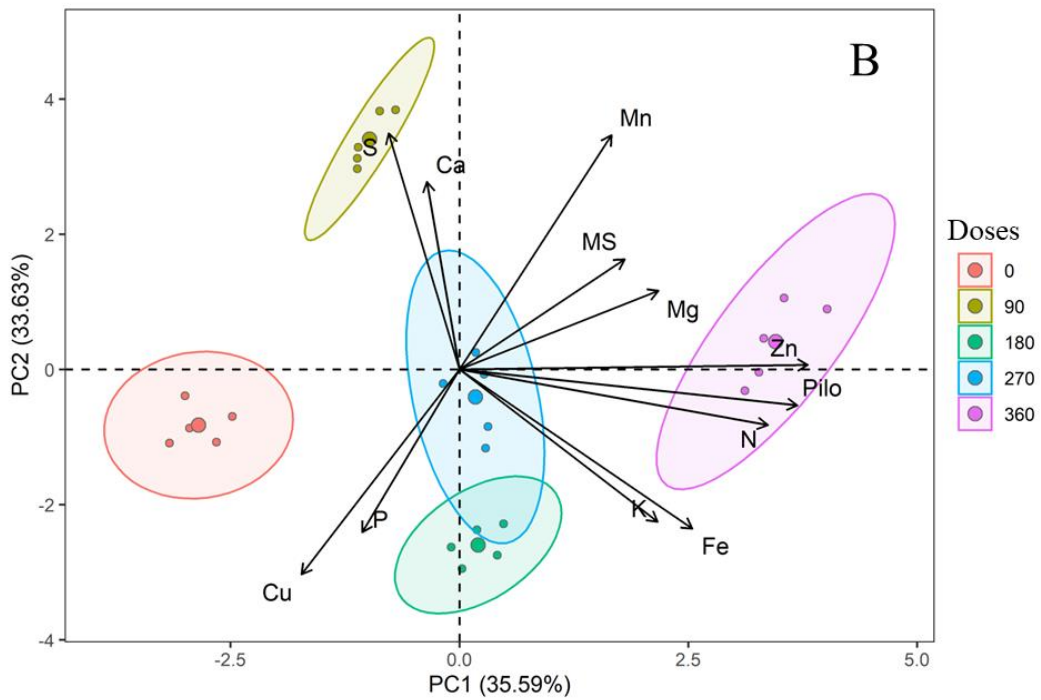
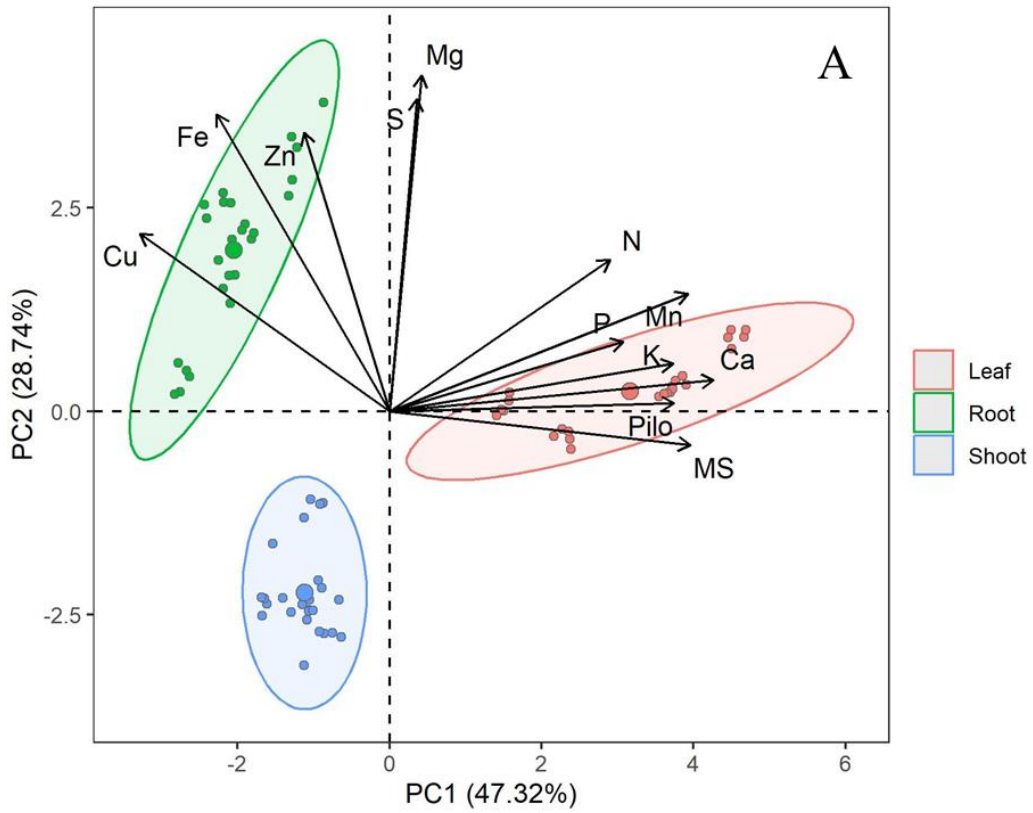
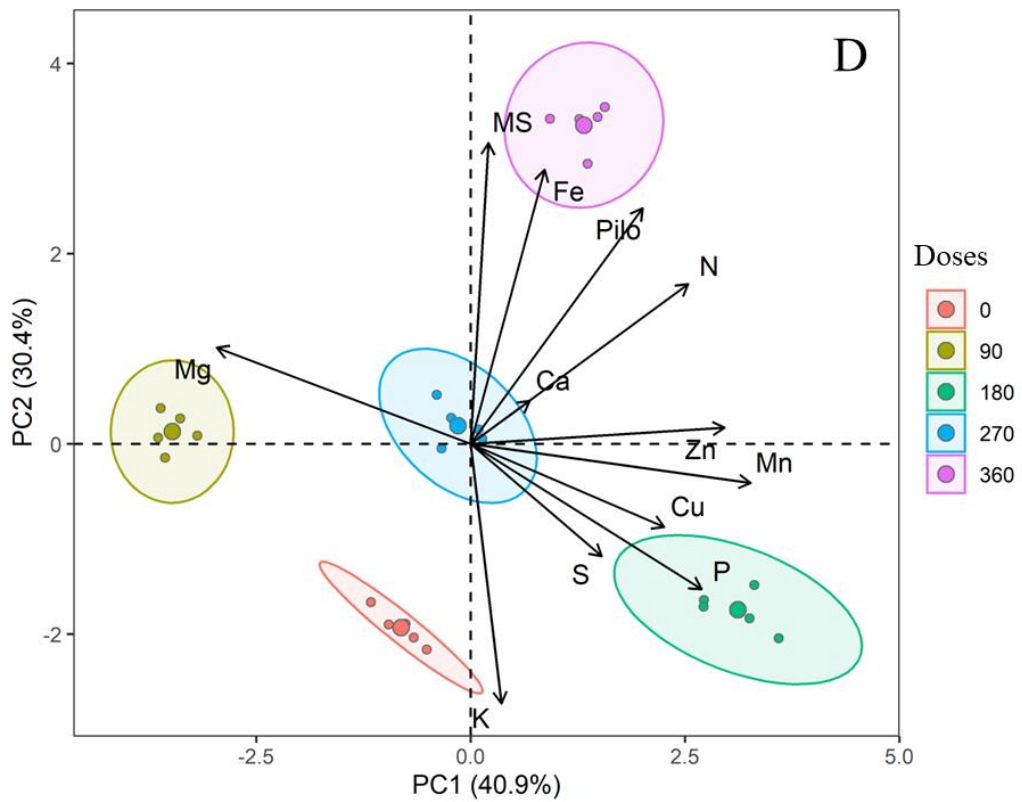
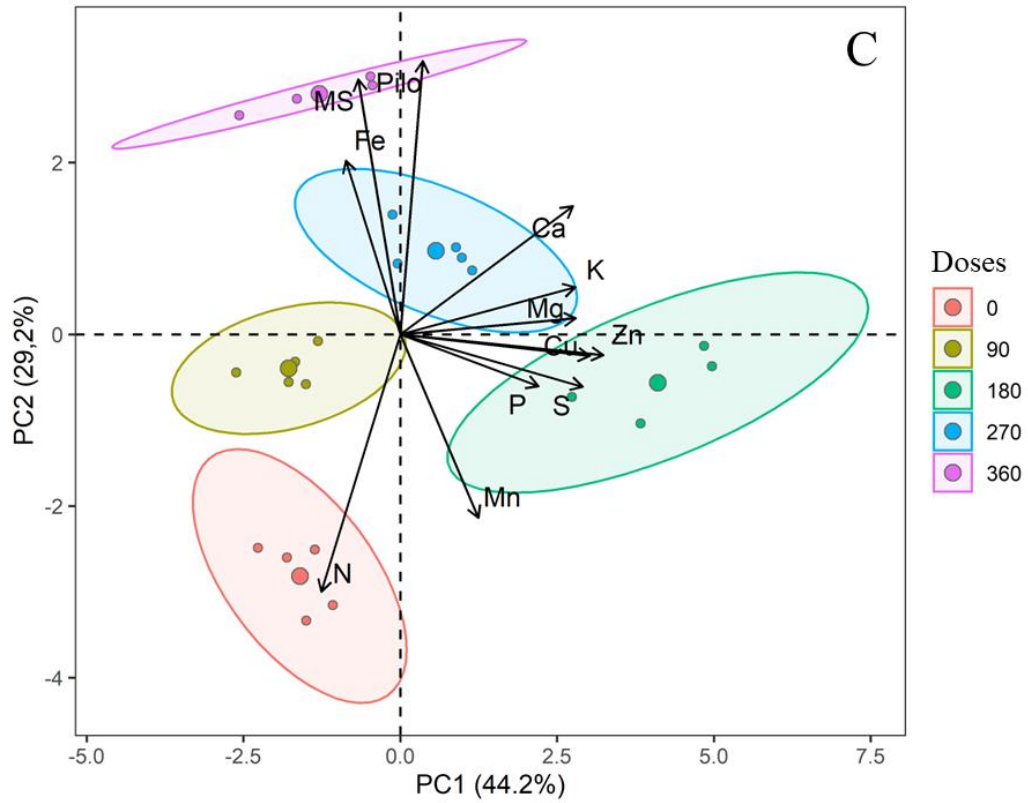




Figura 6- Gráficos de componentes principais mostrando a projeção das variáveis nutricionais, biomassa e teor de pilocarpina na planta (A), na raiz(B), no caule (C) e folha (D) de jaborandi cultivado sob concentrações de nitrogênio. Belém, PA, 2023.





Com objetivo de estabelecer correlação entre as concentrações de N foliares e demais características avaliadas neste trabalho, foi realizada uma análise de componentes

principais (ACP) na planta. Os resultados contidos na figura 6A, demonstram que a PC1(47.32%) e a PC2(28.74%), foram responsáveis por 76% da variância. Observa-se uma tendência de concentrar teores de macronutrientes no órgão foliar, e micronutrientes na zona radicular, exceto para o manganês.

Para averiguar como a suplementação nitrogenada pode influenciar a formação de grupos de variáveis, foram também efetuadas análises de componentes principais, de forma fragmentada. Nas raízes (Figura 6B), a PC1(35.78%) e a PC2(33.52%), foram responsáveis por 70% da variância. No caule (Figura 6C), a PC1(44.2%) e a PC2(29.2%) corresponderam a 73% da variância. E nas folhas (Figura 6D), a PC1(40.93%) e a PC2(30.38%) equivaleram a 71% da variância.

Em geral, observa-se que à medida que se adiciona nitrogênio no solo há uma tendência em absorver nutrientes e acumular matéria seca, independente do órgão da planta. Ressaltamos também que na maior dose (360 mg dm<sup>3</sup> de N), foi manifestada a presença de um grupo composto por teor de pilocarpina, ferro, nitrogênio e matéria seca, em todas os fragmentos da planta, com exceção apenas do N no caule.

#### **4.4 DISCUSSÃO**

O efeito do N no crescimento de plantas, em todos os estágios de desenvolvimento, dada sua função estrutural em compostos que fazem parte do metabolismo primário, assim como na síntese de alcaloides vinculados aos aminoácidos como triptofano, tirosina e lisina (CUI *et al.*, 2019 KHAIL, 2017). No presente estudo, a administração de N favoreceu o acúmulo de biomassa sendo atribuída ao desenvolvimento significativo dos parâmetros de crescimento. As trocas gasosas exerceram influência no ganho de biomassa, embora se tenha observado queda nas concentrações elevadas de N.

A alta dose de N beneficiou a maior disponibilidade e absorção de nutriente, que compõe proteínas vinculadas aos tilacóides e captadoras de luz, importantes no processo de carboxilação, auxiliando no crescimento na planta (MU; CHEN, 2021). O ganho de biomassa não ocasionou redução da concentração de pilocarpina, sugerindo uma relação diretamente proporcional, diferente de outras plantas produtoras de alcaloides, como plantas de *Crassocephalum crepidioides*, que sob privação de N ocorreu aumento do alcalóide jacobina, em detrimento da biomassa (SCHRAMM *et al.*, 2021). A potencial

biossíntese ocasionada pelo fornecimento de N indicam a conservação do mesmo, em forma de proteínas, possivelmente associadas a compostos úteis para a síntese de pilocarpina (CAO *et al.*, 2020; NOWACKI *et al.*, 1976).

Apesar da maior biomassa e consumo total de água, plantas que receberam maiores doses de N aumentaram a eficiência de uso da água. O fechamento estomático acompanhado de redução nas taxas de assimilação do carbono e concentração de clorofila, em maiores níveis de N, não resultaram em perda de biomassa. Possivelmente o maior aporte de biomassa e consequente área foliar, levou ao aceleração do consumo de água no solo afetando a  $g_s$  e gerando aumento da  $iWUE$  (CABRERA-BOSQUET *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2020). Essa regulação da perda de água permitiu a manutenção de processos fotossintéticos capazes de estimular a produção de biomassa, sendo apoiados no aumento linear da eficiência de carboxilação. Se o maquinário fotossintético do cloroplasto estiver íntegro para o funcionamento, o  $CO_2$  permanecerá sendo assimilado e consumindo a quantidade de  $CO_2$  interno, embora ocorra o fechamento estomático (LEMOS NETO *et al.*, 2020).

A elevada oferta de N além de contribuir para o ganho de biomassa e demais variáveis supracitadas, proporcionou efeito positivo na concentração de pilocarpina em todas as partes da planta, sobretudo, em maiores concentrações no tecido foliar. Os teores de pilocarpina em nosso estudo ( $2 \mu\text{g mg}^{-1}$ ), são superiores que os citados por Avancini *et al.* (2003), reportando menos que  $1 \mu\text{g mg}^{-1}$  de massa seca. Sugerindo que a maior dose de nitrogênio testado nesta pesquisa ( $360 \text{ mg dm}^{-3}$ ) foi benéfico para composição de substratos estruturais de pilocarpina e também na participação das rotas metabólicas secundárias (BIRCHFIELD; MCINTOSH, 2020; CORRÊA *et al.*, 2022).

Os poucos estudos encontrados quantificaram pilocarpina somente nas folhas, em razão da maior concentração, valor comercial e características de crescimento do jaborandi, configurando-se como a fonte mais sustentável de manejo e conservação da espécie ameaçada de extinção (CALDEIRA *et al.*, 2017; PINHEIRO *et al.*, 2002). No entanto, como verificado neste estudo, a presença de pilocarpina em toda a planta fornece significativas informações que sinalizam uma possível compreensão dos seus locais biossintéticos e acúmulo do produto, podendo ocorrer em locais distintos (WINK, 1990).

De forma geral, existem apenas alguns relatos científicos supondo que a constituição das moléculas precursoras de pilocarpina (L-histidina) seja nas raízes, com

posterior exportação para as folhas e transformação em pilocarpina (BROCHMANN–HANSSEN *et al.*, 1975). Em contrapartida, estudos com raízes modificadas apontam que todo esse processo biossintético pode acontecer na zona radicular (COURTOIS *et al.*, 1996). Com o nosso estudo presume-se a biossíntese de pilocarpina no sistema radicular, fundamentada nas potenciais concentrações de Fe e N no compartimento, mediando processos biossintéticos (Fe) e compondo moléculas de pilocarpina (N), desta forma, redistribuindo-as para as folhas por ser o local de maior capacidade de alocação.

Sabe-se que a nutrição mineral de plantas está altamente relacionada ao desenvolvimento e metabolismo de vegetais (SALONER; BERNSTEIN, 2021). Os resultados de nosso estudo apontam que o abastecimento, essencialmente, de macronutriente nas folhas sugerem uma demanda em processos vitais em plantas de jaborandi, e o sinergismo do N com íons de K (HOU *et al.*, 2019), P (JIAYING *et al.*, 2022) e Ca (XING *et al.*, 2021), é comumente reportados em outras espécies cultivadas. Entretanto, sob excesso de N, esses nutrientes podem ter sofrido o efeito de diluição, constatado pela desproporcionalidade entre acúmulo de biomassa e absorção de nutrientes (WHITE, 2002; SALONER; BERNSTEIN, 2020; ZHANG *et al.*, 2021;).

A estrutura delineada pela resposta a suplementação nitrogenada favorecendo a absorção de nutrientes, também revela uma estreita relação entre *status* nutricional da planta de jaborandi e a biossíntese de pilocarpina, bem como na conservação do teor do alcaloide, como verificado anteriormente nesta espécie (AVANCINI *et al.*, 2003).

Para os micronutrientes, destaca-se Fe, Zn e Cu apresentando valores elevados em todos os órgãos da planta, com maior alocação nas raízes, seguida das folhas. Sugerindo uma otimização no funcionamento dos processos fotossintéticos, ativação enzimática e transporte de elétrons, que conseqüentemente acarretam ganho de biomassa (ABD EL-MAGEED *et al.*, 2021). Para tanto, a biossíntese de metabólitos secundários também pode ser estimulada pela atividade enzimática e o processo redox, comumente, efetuados por metais (DE JESUS *et al.*, 2022; ISAH, 2019)

O maior fornecimento de N, proporcionou valores expressivos de Fe nos tecidos vegetais, indicando uma provável potencialização na síntese de pilocarpina. Nota-se a preferência em concentrar altas quantidades de ferro na raiz (50%) com translocação para as folhas (30%). A maior concentração reportada nessa pesquisa, cerca de 1.500 mg kg<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>, foram abaixo das encontradas por DE JESUS *et al.*, (2022), quantificando valores médios de 2.239,13 mg kg<sup>-1</sup> de Fe foliar, em plantas de jaborandi coletadas em ambiente natural. Ainda neste estudo foi destacada a relação positiva entre concentração de Fe no solo e produção de pilocarpina, encontrando também maior teor de ferro no tecido foliar. Em nosso estudo, foi verificada relação entre altos teores de Fe nas plantas e a biossíntese de alcaloides, sinalizando sua participação em processos de oxidação e redução mediados por múltiplas enzimas, capazes de serem moduladas por citocromos contendo heme proteínas, nas quais são constituídos por íons de Fe (BHAMBHANI; KONDHARE; GIRI, 2021).

A tendência de um grupo formado por teores de pilocarpina, ferro, nitrogênio e matéria seca, na maior dose de N, independente do órgão analisado pela PCA, induzem a correlação entre essas variáveis com teor de pilocarpina, reforçando que a síntese de pilocarpina foi altamente dependente das doses de N no solo. O favorecimento da absorção de N, conseqüentemente resultou em acúmulo de biomassa garantindo maior capacidade de alocação de pilocarpina.

A relevante presença de teores de ferro, indicam que o jaborandi pode ter desenvolvido um mecanismo para entrada exacerbada de Fe, condição importante na síntese de pilocarpina. Ressalta-se que a espécie usada nesta pesquisa é oriunda da Floresta Nacional dos Carajás, na qual, apresenta solos com alta quantidade de ferro (CALDEIRA *et al.*, 2017; PIRANI; DEVECCHI, 2018). Tais circunstâncias, sugerem a capacidade do jaborandi de sobreviver em ambientes inóspitos, alocando grande quantidade de ferro em seus tecidos. Essa estratégia pode estar ligada a produção de pilocarpina, uma vez que, houve a presença significativa do ferro em todas as PCA's, junto com o teor de pilocarpina.

A elevada demanda por fármacos oriundo da pilocarpina, e a expansão para outros tratamentos, fundamenta a importância do aporte nutricional apropriado para a produção do composto, sugerindo por meio deste estudo, o manejo nutricional voltado a aplicação de N e Fe para o cultivo do jaborandi.

## 4.5 CONCLUSÃO

Suplementações elevadas de nitrogênio ( $360 \text{ mg dm}^{-3}$ ), favorecem a síntese de pilocarpina, rendimentos de biomassa, produção de pilocarpina, absorção de nutrientes (Fe, N, Ca, Mg e Zn), eficiência instantânea de carboxilação e de uso da água.

A maior concentração de pilocarpina foi encontrada nas folhas ( $0,2 \mu\text{g mg}^{-1}$ ), seguida do caule ( $0,8 \mu\text{g mg}^{-1}$ ) e da raiz ( $0,5 \mu\text{g mg}^{-1}$ ). Sugerindo uma tendência de biosíntese do alcalóide no sistema radicular, potencializada pela presença marcante do ferro e nitrogênio radiculares, transportada via caule para o local de maior aporte (folhas), condição esta, ainda não esclarecida e que merece estudos complementares.

## REFERÊNCIAS

ABD EL-MAGEED, T. A. et al. Exogenous Micronutrients Modulate Morphophysiological Attributes, Yield, and Sugar Quality in Two Salt-Stressed Sugar Beet Cultivars. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 21, n. 2, p. 1421–1436, 1 jun. 2021.

BHAMBHANI, S.; KONDHARE, K. R.; GIRI, A. P. Diversity in chemical structures and biological properties of plant alkaloids. **Molecules**, v. 26, n. 11, 2021.

BIRCHFIELD, A. S.; MCINTOSH, C. A. Metabolic engineering and synthetic biology of plant natural products – A minireview. **Current Plant Biology**, v. 24, n. July, p. 100163, 2020.

CABRERA-BOSQUET, L. et al. Water and nitrogen conditions affect the relationships of  $\Delta^{13}\text{C}$  and  $\Delta^{18}\text{O}$  to gas exchange and growth in durum wheat. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 6, p. 1633–1644, abr. 2009.

CAMUT, L. et al. Nitrate signaling promotes plant growth by upregulating gibberellin biosynthesis and destabilization of DELLA proteins. **Current Biology**, v. 31, n. 22, p. 4971- 4982.e4, 2021.

CAO, Y. WEN et al. UPLC-Triple TOF-MS/MS based metabolomics approach to reveal the influence of nitrogen levels on *Isatis indigotica* seedling leaf. **Scientia Horticulturae**, v. 266, n. February, p. 109280, 2020.

CORRÊA, P. L. C. et al. Effect of Nitrogen Sources on Photosynthesis and Biosynthesis of Alkaloids and Leaf Volatile Compounds in *Annona sylvatica* A. St.-Hil. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 956–970, 2022.

CUI, Gaochang et al. Response of carbon and nitrogen metabolism and secondary metabolites to drought stress and salt stress in plants. **Journal of Plant Biology**, v. 62, p. 387-399, 2019.

DE JESUS, P. M. M. et al. Prediction of pilocarpine production from soil attributes and the nutritional status of *Pilocarpus microphyllus*. **Journal of Plant Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–14, 2022.



HOU, W. et al. Interactive effects of nitrogen and potassium on photosynthesis and photosynthetic nitrogen allocation of rice leaves. **BMC Plant Biology**, v. 19, n. 1, p. 1–13, 2019.

INDICADORES, I. B. G. E. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/16/0?tipo=grafico&indicador=12741>>. Acesso em, v. 1, 2020.

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

KHALIL, A. Role of biotechnology in alkaloids production. **Catharanthus roseus: current research and future prospects**, p. 59-70, 2017.

JIAYING, M. et al. Functions of Nitrogen, Phosphorus and Potassium in Energy Status and Their Influences on Rice Growth and Development. **Rice Science**, v. 29, n. 2, p. 166–178, 2022.

LI, L. et al. Effects of water deficit and nitrogen application on leaf gas exchange, phytohormone signaling, biomass and water use efficiency of oat plants. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 183, n. 6, p. 695–704, 1 dez. 2020.

LIANG, B. et al. **Effect of different dwarfing interstocks on the vegetative growth and nitrogen utilization efficiency of apple trees under low-nitrate and drought stress. Scientia Horticulturae**, 2022.

MONTEIRO, W. P. et al. Genetic diversity and structure of an endangered medicinal plant species (*Pilocarpus microphyllus*) in eastern Amazon: implications for conservation. **Conservation Genetics**, v. 23, n. 4, p. 745–758, 2022.

MU, Xiaohuan; CHEN, Yanling. The physiological response of photosynthesis to nitrogen deficiency. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 158, p. 76-82, 2021.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

NILE, C. et al. Repurposing Pilocarpine Hydrochloride for Treatment of *Candida albicans* Infections. **mSphere**, v. 4, n. 1, 27 fev. 2019.

- NOWACKI, E. et al. Effect of Nitrogen Nutrition on Alkaloid Metabolism in Plants. **Biochemie und Physiologie der Pflanzen**, v. 169, n. 3, p. 231–240, 1976.
- PINHEIRO, Claudio Urbano B. Extrativismo, cultivo e privatização do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm.; Rutaceae) no Maranhão, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, p. 141-150, 2002.
- PRICE, F. W. et al. Combinations of Pilocarpine and Oxymetazoline for the Pharmacological Treatment of Presbyopia. **Ophthalmology Science**, v. 1, n. 4, p. 100065, 2021.
- ROH, W. S. et al. Pilocarpine as a treatment option for dupilumab-related eye manifestations. **JAAD international**, p. 126–127, 2022.
- SALONER, A.; BERNSTEIN, N. Response of Medical Cannabis (*Cannabis sativa* L.) to Nitrogen Supply Under Long Photoperiod. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. November, 2020.
- SALONER, A.; BERNSTEIN, N. Nitrogen supply affects cannabinoid and terpenoid profile in medical cannabis (*Cannabis sativa* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 167, 1 set. 2021.
- SINGH, A. et al. Nitrogen availability modulates CO<sub>2</sub>-induced responses of *Catharanthus roseus*: Biomass allocation, carbohydrates and alkaloids profile. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, n. 4, p. 160–167, 1 dez. 2015.
- SKIRYCYZ, A. et al. Medicinal Bioprospecting of the Amazon Rainforest: A Modern Eldorado?. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 10, p. 781–790, 2016.
- TANAKA, A. et al. Topical Xerostomia Treatment with Hyaluronate Sheets Containing Pilocarpine. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 45, p. 403–408, 2022.
- WHITE, P. J. Ion Uptake Mechanisms of Individual Cells and Roots: Short-Distance Transport. **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**, p. 6–78, 2002.
- XING, Y. et al. Role of calcium as a possible regulator of growth and nitrate nitrogen metabolism in apple dwarf rootstock seedlings. **Scientia Horticulturae**, v. 276, n. April 2020, p. 109740, 2021.

XINGQI, W. et al. Cubic and hexagonal liquid crystal gels for ocular delivery with enhanced effect of pilocarpine nitrate on anti-glaucoma treatment. **Drug Delivery**, v. 26, n. 1, p. 952–964, 2019.

ZHANG, X. et al. Nutritional quality degradation: A potential risk due to nutrient dilution effects in film-mulched maize. **Agricultural Water Management**, v. 257, n. August, p. 107133, 2021.

WINK, 1990. Physiology of secondary products formation in plants In secondary products of plant tissue culture (CHARLWOOD BV, RHODES MJC, editors). Clarendon press, oxford.

COURTOIS, D.; PETIARD, V.; TOUCHE, A. (1996). **Pilocarpine production process**. USPTO.5, 569, 593.

UEDA, Y.; KONISHI, M.; YANAGISAWA, S. Molecular basics of the nitrogen response in plants. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 64, n. 4, p. 329-341, 2017

## Material Suplementar

Tabela 1S - Intercepto (I), coeficiente a (A), coeficiente b (B), p-valor e coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) da regressão linear de plantas de jaborandi, submetidas a diferentes concentrações de N. Belém, 2023.

<b>Root</b>					
Variáveis	I	A	B	p-valor	R <sup>2</sup>
N	10.678800***	0.033338***		6.753e-15	0.9287
Fe	1085.8724***	0.9788***		1.558e-05	0.5441
Zn	61.46640***	0.41626***		1.185e-08	0.753
Pilocarpine	6.968e-02***	9.940e-04***		2.2e-16	0.9704
<b>Shoot</b>					
N	17.202000***	-0.020453***		3.668e-12	0.877
Ca	3.804e+00***	1.060e-02***	-2.168e-05**	0.0001816	0.5015
Mg	7.998e-01***	8.172e-03***	-2.182e-05***	4.483e-05	0.561
Cu	4.022e+00***	3.715e-02***	-1.013e-04***	1.443e-06	0.6788
Zn	46.9734857***	0.3369648***	-	5.829e-05	0.5504
Mass	3.5408000***	0.0055689***	0.0009042***	2.285e-07	0.6816
Pilocarpine	7.280e-02***	1.753e-03***		2.2e-16	0.9838
<b>Leaf</b>					
N	1.685e+01 ***	7.919e-02***	-1.938e-04***	6.326e-07	0.702
K	1.564e+01 ***	3.295e-02***	-1.074e-04***	5.939e-09	0.805
Ca	9.574e+00***	3.920e-02***	-9.210e-05***	2.2e-16	0.9668
Fe	1.888e+02***	-2.473e-01***	1.038e-03	1.937e-06	0.6701
Mass	6.451600***	0.010538**		1.836e-07	0.6876
leafArea	491.2816***	2.4274***		6.248e-11	0.8428
Nbleaf	34.877600***	0.046471***		3.682e-10	0.8168
height	41.605200***	0.035273***		4.474e-07	0.6628
A	7.499e+00***	4.585e-02***	-9.240e-05***	5.713e-06	0.636
gs	7.915e-02***	6.831e-04***	-1.718e-06***	3.691e-05	0.5687
Ci	2.255e+02***	2.871e-01***	-9.908e-04***	1.773e-07	0.7345
E	1.539e-03***	1.258e-05***	-3.192e-08***	0.0001247	0.5182
A_Ci	3.305e-02***	9.062e-05***		7.89e-08	0.7093
Cl_T	6.293e+00***	2.213e-02***	-4.619e-5***	3.218e-06	0.6545

iWUE	94.8489302***	-0.1482347**	0.0005841***	1.615e-06	0.6755
WUE	-591.74***	156.21***		5.831e-07	0.6551
Biomass Total	13.21280 ***	0.01731 ***		4.348e-06	0.5908
LMA	1.178e-02***	-1.248e-05***		6.417e-11	0.8424
Pilocarpine	0.3023600***	0.0045136***		2.2e-16	0.9691

Figura 1S - Altura (A), Área foliar (B), número de folhas (C) e peso específico da folha (D), de plantas de jaborandi submetidas a diferentes concentrações de nitrogênio. Belém, 2023.

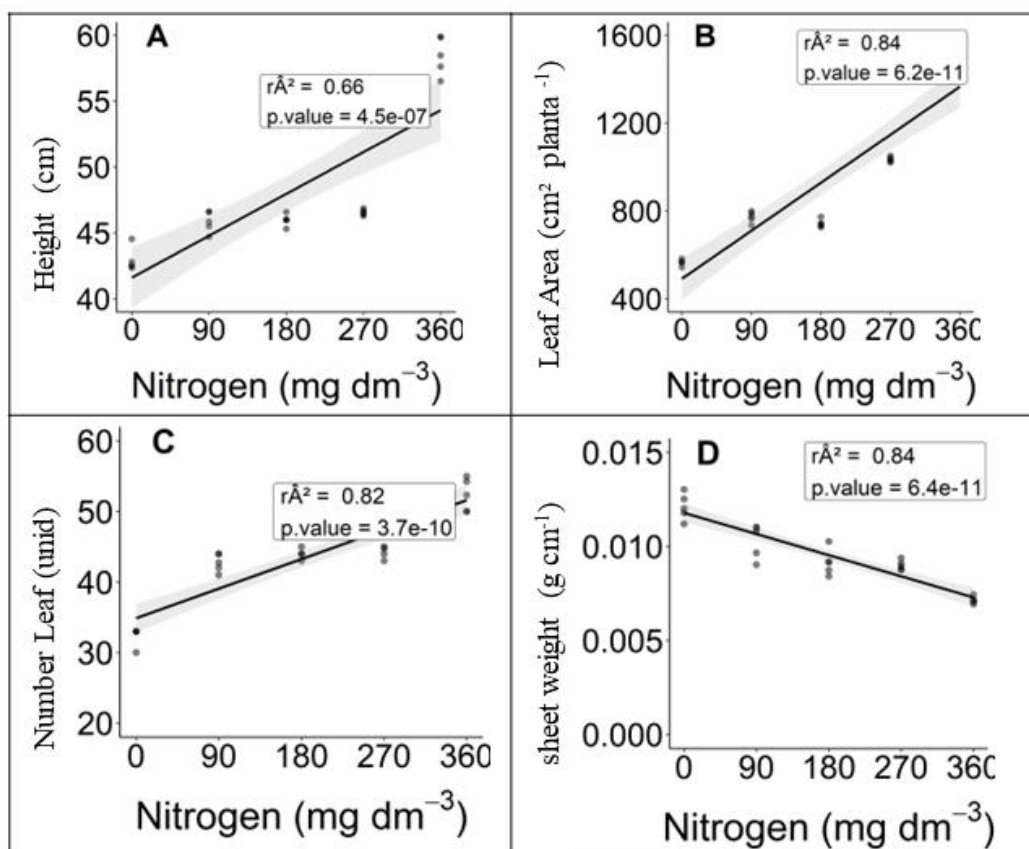
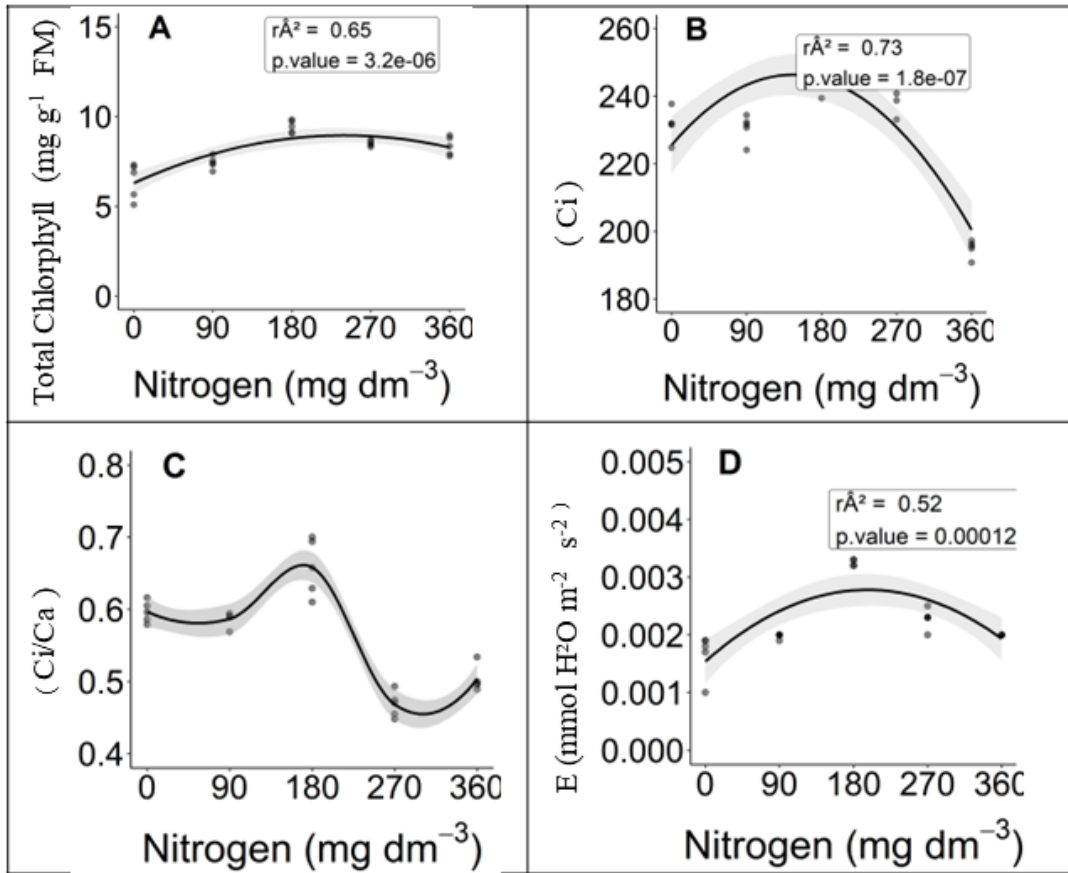


Figura 2S - Clorofila total(A), Ci (B), Ci/Ca (C) e transpiração (D) de plantas de jaborandi submetidas a diferentes concentrações de nitrogênio. Belém, 2023. \*ns: não significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.



## 5 CONCLUSÃO GERAL

Os estudos são pioneiros na verificação da relação entre teores de nutrientes e produção de pilocarpina, sinalizando os principais nutrientes que foram compostos por ferro, manganês e nitrogênio. Observou-se também o mecanismo da espécie *P. microphyllus*, em absorver elevadas quantidades de ferro, necessárias para a produção da pilocarpina.

O jaborandi é uma planta com alto potencial econômico e farmacêutico, e esses estudos demonstram a importância da nutrição mineral para *P. microphyllus*. Perfazendo também a demanda de estudos complementares afim de construir o manejo voltado a conservação da espécie.