



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

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

PRISCILA MAYLANA MODESTO DE JESUS

**NUTRIÇÃO E PRODUÇÃO DE PILOCARPINA EM PLANTAS DE
JABORANDI**

**BELÉM-PA
2023**



30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61

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

PRISCILA MAYLANA MODESTO DE JESUS

**NUTRIÇÃO E 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

62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99

PRISCILA MAYLANA MODESTO DE JESUS

**NUTRIÇÃO E 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 grau de Doutora em Agronomia. Área de concentração: Agronomia.

Orientador: Profº. Drº Silvio Junio Ramos
Data da aprovação: 28 de Julho de 2023

BANCA EXAMINADORA

Profº. Drº Silvio Junio Ramos – Presidente
Instituto tecnológico Vale -ITV

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

Drª. Milena Maria Tomaz de Oliveira - 2º Examinador
University of Nebraska- Lincoln, EUA

Drº Hozano de Souza Lemos Neto - 3º Examinador
Universidade Federal do Piauí -UFPI

Drª Edna Santos de Souza - 4º Examinador
Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará- UNIFESSPA

AGRADECIMENTOS

100
101
102
103
104

105

106
107

108

109
110

111
112

113
114
115

116
117

118

119
120

121
122

123

124
125
126

À 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. Silvio Junio Ramos, pela orientação e apoio durante o período de doutorado.

Ao Dr. Cecílio Frois Caldeira Junior, 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.

À 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.

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

127

RESUMO

128 As espécies do gênero *Pilocarpus*, popularmente conhecido como Jaborandi, são plantas
129 que produzem a substância pilocarpina (alcaloide), utilizada na indústria farmacêutica.
130 No Pará, a espécie *Pilocarpus microphyllus* é a mais importante, por possuir a maior
131 concentração de pilocarpina, podendo ser encontrada nas proximidades da Floresta
132 Nacional dos Carajás (FLONA). O seu cultivo em áreas plantadas ainda é complexo, pois
133 a principal dificuldade é entender os fatores que favorecem a maior produção desta
134 substância, permeando também aspectos nutricionais ainda pouco esclarecidos. Neste
135 contexto, esta pesquisa tem como objetivo avaliar os nutrientes que influenciam a
136 produção de pilocarpina em plantas de jaborandi. Para isto, foram conduzidos duas
137 pesquisas, na primeira foram realizadas coletas de plantas de *P. microphyllus* e solo em
138 áreas da Floresta Nacional de Carajás, onde foram correlacionados os parâmetros
139 químicos do solo e teores de nutrientes foliares com a produção de pilocarpina. E no
140 segundo ensaio, plantas de jaborandi foram submetidas a cinco doses de N (0; 90; 180;
141 270 e 360 mg/kg⁻¹ de N), com dez repetições. As características avaliadas foram
142 biomassa, teor de pilocarpina, trocas gasosas e teores de nutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S,
143 Fe, Mn, Zn e Cu). Os resultados encontrados no primeiro estudo mostram que por meio
144 da análise multivariada, o modelo que melhor previu a produção de pilocarpina foi
145 composto por N foliar, Mg foliar, Fe do solo (preditores positivos), S do solo e P foliar
146 (preditores negativos). Quanto aos efeitos das doses de nitrogênio, os resultados apontam
147 que o maior aporte nitrogenado acarretou contínuo ganho no rendimento de biomassa,
148 maior absorção de nutrientes (Fe, Zn e N), e mesmo que muitos parâmetros de trocas
149 gasosas tenham sido alterados, as plantas de jaborandi foram capazes de manter os
150 processos metabólicos. Foram detectadas presença de pilocarpina em toda a parte da
151 planta, destacando o tecido foliar com a maior quantidade de pilocarpina e sugerindo uma
152 possível rota biossintética, iniciada na raiz, sendo estimulada pela presença marcante do
153 ferro e nitrogênio radicular.

154 **Palavras-chave:** Nutrição de plantas. *P. microphyllus*. Pilocarpina.

155

156

157

158

159

ABSTRACT

160 Species of the genus *Pilocarpus*, popularly known as Jaborandi, are plants that produce
161 the substance pilocarpine (alkaloid), used in the pharmaceutical industry. In Pará, the
162 species *Pilocarpus microphyllus* is the most important, as it has the highest concentration
163 of pilocarpine, and can be found near the Carajás National Forest (FLONA). Its
164 cultivation in planted areas is still complex, since the main difficulty is to understand the
165 factors that favor the greater production of this substance, also permeating nutritional
166 aspects that are still unclear. In this context, this research aims to evaluate the nutrients
167 that influence pilocarpine production in jaborandi plants. For this, two surveys were
168 carried out, in the first one collection of *P. microphyllus* plants and soil in areas of the
169 National Forest of Carajás were carried out, where the chemical parameters of the soil
170 and levels of foliar nutrients were correlated with the production of pilocarpine. And in
171 the second test, jaborandi plants were submitted to five doses of N (0; 90; 180; 270 and
172 360 mg/kg-1 of N), with ten repetitions. The characteristics evaluated were biomass,
173 pilocarpine content, gas exchange and nutrient content (N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Zn
174 and Cu). The results found in the first study show that through multivariate analysis, the
175 model that best predicted pilocarpine production was composed of leaf N, leaf Mg, soil
176 Fe (positive predictors), soil S and leaf P (negative predictors). As for the effects of
177 nitrogen doses, the results indicate that the highest nitrogen input led to a continuous gain
178 in biomass yield, greater nutrient absorption (Fe, Zn and N), and even though many gas
179 exchange parameters have been altered, jaborandi plants were able to maintain metabolic
180 processes. The presence of pilocarpine was detected in all parts of the plant, highlighting
181 the leaf tissue with the highest amount of pilocarpine, suggesting a possible biosynthetic
182 route, initiated in the root, being stimulated by the marked presence of iron and root
183 nitrogen.

184

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

186

187

188

189

190

SUMÁRIO

191		
192		
193	1. CONTEXTUALIZAÇÃO	8
194	REFERÊNCIAS	11
195	INTRODUCTION	17
196	MATERIAL AND METHODS	19
197	RESULTS	22
198	DISCUSSION	27
199	CONCLUSION	35
200	RESUMO	43
201	MATERIAL E MÉTODOS	46
202	Localização e caracterização da área experimental	47
203	Condições de cultivo	47
204	<i>Trocas gasosas</i>	49
205	<i>Análise de Clorofila Total</i>	49
206	Análise estatística	50
207	RESULTADOS	50
208	DISCUSSÃO	56
209	CONCLUSÃO	59
210	REFERÊNCIAS	60
211		
212		
213		
214		
215		
216		
217		
218		
219		
220		
221		
222		

223 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

224 As espécies do gênero *Pilocarpus*, conhecidas popularmente como jaborandi, com
225 16 espécies distribuídas entre Sul e centro da América Latina, Floresta Amazônica, Piauí
226 e o Maranhão (Allevato et al. 2019; Amaral et al. 2021). Todas as espécies do gênero
227 produzem a pilocarpina em quantidade bem variada, e esse composto é alcalóide
228 amplamente usado na fabricação de medicamentos para o tratamento de glaucoma
229 (Xingqi et al. 2019), síndrome de Sjögren (Felberg; Dantas; Sato, 2022), presbiopia (Price
230 et al. 2021), xerostomia (Tanaka et al. 2022) e, recentemente, estudos experimentais usam
231 a substância para o tratamento de epilepsia (Lévesque et al. 2021) e depressão (Shen et
232 al. 2019).

233 A alta demanda por fármacos oriundos da pilocarpina, aliada ao expressivo valor
234 econômico da espécie, configuram a planta medicinal com maior contribuição na receita
235 do Brasil, além de gerar fonte de renda para comunidades locais na região do Pará (Costa,
236 2017). Apesar da sua importância, a oferta de matéria prima é muito escassa e não
237 acompanha o consumo do mercado, e com poucos estudos acerca da maior produção de
238 pilocarpina por planta.

239 Apesar de todas as espécies do gênero produzirem pilocarpina, a espécie
240 *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew, é a mais importante dentre as demais,
241 decorrente da alta concentração de pilocarpina em suas folhas (Lima et al. 2017). Seu
242 local de maior ocorrência é na Floresta Nacional dos Carajás (Brasil, Pará), representando
243 a maior população residual, derivadas de fortes pressões ambientais que ajudaram a
244 inserir-lá na lista das espécies ameaçadas de extinção (Caldeira et al. 2017; Moreira et al.
245 2021).

246 Nas proximidades da Floresta nacional dos Carajás (FLONA) que compreende o
247 complexo da serra dos Carajás, a espécie pode ser encontrada nos campos rupestres
248 ferruginosos (Cangas) e dentro da floresta (Caldeira et al. 2017; Pirani; Devecchi, 2018).
249 O solo de canga é caracterizado pelo alto teor do ferro (57 à 62%), seguido de Zn, Cu e
250 Mn, os quais conferem acidez e limitação nutricional. Contudo, é habitat de várias
251 espécies endêmica, sobretudo, plantas evoluídas com capacidade de adaptação singular
252 (Oliveira mota et al. 2018; Paz et al. 2020).

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

259 Em literatura anteriores, é reportado a necessidade do aporte estressor para
260 indução da síntese da pilocarpina (Ramakrishna; Ravishankar, 2011). Já Avancini et al.
261 (2003), mencionam o aumento do teor da pilocarpina quando tratadas com ácido salicílico
262 e metiljasmonato, em mudas de jaborandi. Quando nos referimos a nutriente, uma das
263 poucas informações a respeito da relação nutriente-pilocarpina é citada também por
264 Avancini et al. (2003), afirmando que a administração equilibrada de nutrientes ajuda a
265 conservar o teor de pilocarpina no jaborandi, porém a ausência de nitrogênio e potássio
266 decrescem a biossíntese da substância.

267 O fornecimento de nutrientes é destinado para o desenvolvimento pleno da planta,
268 participando do metabolismo primário, assim como, em condições estressoras podem
269 promover a síntese de metabolitos secundários, uma vez que, muitos deles compõe a
270 estrutura de substratos comuns dos metabolismos (Neto; Lopes, 2007). No caso de
271 limitação nutricional, ocorre uma série de alterações bioquímicas e metabólicas que
272 objetivam atenuar os impactos do estresse, induzindo também a produção de metabolitos
273 secundários (Jakovljević; Topuzović; Stanković, 2019). Esse fato pode ser comprovado
274 pela interdependência encontrada na produção de metabolitos secundários com a fração
275 carbono/nutrientes, comumente encontrado em solos empobrecidos nutricionalmente
276 (Neto; Lopes, 2007).

277 A biossíntese dos metabolitos secundários pode ser mediada pela especificidade
278 de nutrientes, como as maiores quantidade de flavonoides observados em plantas de
279 *Manilkara zapota L*, na ausência de potássio (Costa et al. 2017) e a maior produção de
280 vinblastina e vincristina em plantas de *Catharanthus roseus* sob restrição do nitrogênio
281 (Singh et al. 2015). A presença de elevadas concentrações de alguns metais pode ser
282 responsáveis pela produção de metabolitos secundários, descritas comumente para ferro
283 (Moradbeygi et al. 2020), cobre e zinco (Kulbat-warycha et al. 2020).

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

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310 **REFERÊNCIAS**

- 311 ALLEVATO, Daniella M.; GROppo, Milton; KIYOTA, Eduardo; MAZZAFERA,
312 Paulo; NIXON, Kevin C. Evolution of phytochemical diversity in *Pilocarpus* (Rutaceae).
313 *Phytochemistry*, vol. 163, no. May, p. 132–146, 2019.
314 <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.03.027>.
- 315 AMARAL, Genilda Canuto; PEZZOPANE, José Eduardo Macedo; DE SOUZA NÓIA
316 JÚNIOR, Rogério; FONSECA, Mariana Duarte Silva; TOLEDO, João Vitor; XAVIER,
317 Talita Miranda Teixeira; DA SILVA OLIVEIRA, Breno; MARTÍNEZ, Manuel
318 Fernández; DA COSTA JERÔNIMO JÚNIOR, Roberto Antônio; DE OLIVEIRA
319 GONÇALVES, Elzimar. Ecophysiology of *Pilocarpus microphyllus* in response to
320 temperature, water availability and vapour pressure deficit. *Trees - Structure and*
321 *Function*, vol. 35, no. 2, p. 543–555, 1 Apr. 2021. [https://doi.org/10.1007/s00468-020-](https://doi.org/10.1007/s00468-020-02055-x)
322 [02055-x](https://doi.org/10.1007/s00468-020-02055-x).
- 323 AVANCINI, Graziela; ABREU, Ilka N.; SALDAÑA, Marleny D.A.; MOHAMED,
324 Rahoma S.; MAZZAFERA, Paulo. Induction of pilocarpine formation in jaborandi leaves
325 by salicylic acid and methyljasmonate. *Phytochemistry*, vol. 63, no. 2, p. 171–175, 2003.
326 [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00102-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00102-X).
- 327 BERNI, Roberto; LUYCKX, Marie; XU, Xuan; LEGAY, Sylvain; HAUSMAN, Jean-
328 Francois; LUTTS, Stanley; CAI, Giampiero; GUERRIERO, Gea. Reactive oxygen
329 species and heavy metal stress in plants: Impact on the cell wall and secondary
330 metabolism ☆. 2018. DOI 10.1016/j.envexpbot.2018.10.017. Available at:
331 <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.10.017>. Accessed on: 10 May 2022.
- 332 BRASIL, E. C.; VIEGAS, I. Influência da adubação com nitrogênio, fósforo e potássio
333 na formação de mudas de jaborandi. Embrapa Amazônia Oriental-Comunicado Técnico
334 (INFOTECA-E), 1999.
- 335 CALDEIRA, Cecilio Frois; GIANNINI, Tereza Cristina; RAMOS, Silvio Junio;
336 VASCONCELOS, Santelmo; MITRE, Simone Kuster; PIRES, Jakeline Prata de Assis;
337 FERREIRA, Gracialda Costa; OHASHI, Selma; MOTA, José Aroudo; CASTILHO,
338 Alexandre; SIQUEIRA, Jose Oswaldo; FURTINI NETO, Antonio Eduardo.
339 Sustainability of Jaborandi in the eastern Brazilian Amazon. *Perspectives in Ecology and*

340 Conservation, vol. 15, no. 3, p. 161–171, 1 Jul. 2017.
341 <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2017.08.002>.

342 COSTA, Laíse Nascimento; MORAIS, Patrícia Lígia Dantas; LEITE, Grazianny Andrade
343 Leite; ALMEIDA, Maria Lucilania Bezerra; MIRANDA, Maria Raquel Alcântara;
344 FERNANDES, Paula Lidiane de Oliveira. Influência da adubação potássica na qualidade
345 e no potencial antioxidante do sapoti em diferentes estádios de desenvolvimento 1. Rev.
346 Ceres, Viçosa, vol. 64, p. 419–425, 2017. [https://doi.org/10.1590/0034-](https://doi.org/10.1590/0034-737X201764040011)
347 [737X201764040011](https://doi.org/10.1590/0034-737X201764040011).

348 FELBERG, Sergio; DANTAS, Paulo Elias Correa; SATO, Elcio Hideo. Pilocarpina oral
349 no tratamento do olho seco de pacientes com síndrome de Sjögren. Arquivos Brasileiros
350 de Oftalmologia, vol. 85, no. 3, p. 1–8, 2022. [https://doi.org/10.5935/0004-](https://doi.org/10.5935/0004-2749.20220069)
351 [2749.20220069](https://doi.org/10.5935/0004-2749.20220069).

352 HASANUZZAMAN, Mirza; FUJITA, Masayuki; OKU, Hirosuke; NAHAR, Kamrun;
353 HAWRYLAK-NOWAK, Barbara. Plant nutrients and abiotic stress tolerance. Plant
354 Nutrients and Abiotic Stress Tolerance, , p. 1–590, 2018. [https://doi.org/10.1007/978-](https://doi.org/10.1007/978-981-10-9044-8)
355 [981-10-9044-8](https://doi.org/10.1007/978-981-10-9044-8).

356 JAKOVLJEVIĆ, Dragana; TOPUZOVIĆ, Marina; STANKOVIĆ, Milan. Nutrient
357 limitation as a tool for the induction of secondary metabolites with antioxidant activity in
358 basil cultivars. 2019. DOI 10.1016/j.indcrop.2019.06.025. Available at:
359 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.06.025>.

360 KULBAT-WARYCHA, Kamila; GEORGIADOU, Egli C.; MAŃKOWSKA, Dorota;
361 SMOLIŃSKA, Beata; FOTOPOULOS, Vasileios; LESZCZYŃSKA, Joanna. Response
362 to stress and allergen production caused by metal ions (Ni, Cu and Zn) in oregano
363 (*Origanum vulgare* L.) plants. Journal of Biotechnology, vol. 324, p. 171–182, 20 Dec.
364 2020. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2020.10.025>.

365 LÉVESQUE, Maxime; BIAGINI, Giuseppe; DE CURTIS, Marco; GNATKOVSKY,
366 Vadym; PITSCH, Julika; WANG, Siyan; AVOLI, Massimo. The pilocarpine model of
367 mesial temporal lobe epilepsy: Over one decade later, with more rodent species and new
368 investigative approaches. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, vol. 130, no. June,
369 p. 274–291, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.08.020>.

370 LIMA, David Fernandes; DE LIMA, Luiza Ianny; ROCHA, Jefferson Almeida; DE
371 ANDRADE, Ivanilza Moreira; GRAZINA, Liliana Gonçalves; VILLA, Caterina;
372 MEIRA, Liliana; VÉRAS, Leiz Maria Costa; AZEVEDO, Iábita Fabiana Sousa; BIASE,
373 Adriele Giaretta; COSTA, Joana; OLIVEIRA, Maria Beatriz P.P.; MAFRA, Isabel; DE
374 SOUZA DE ALMEIDA LEITE, José Roberto. Seasonal change in main alkaloids of
375 jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth), an economically important
376 species from the Brazilian flora. *PLoS ONE*, vol. 12, no. 2, p. 1–19, 2017.
377 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170281>.

378 MORADBEGYI, Hanieh; JAMEI, Rashid; HEIDARI, Reza; DARVISHZADEH, Reza.
379 Investigating the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense by applying iron
380 oxide nanoparticles in *Dracocephalum moldavica* L. plant under salinity stress. *Scientia*
381 *Horticulturae*, vol. 272, p. 109537, 15 Oct. 2020.
382 <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2020.109537>.

383 MOREIRA, Ruanny Karen Vidal Pantoja Portal; LAMEIRA, Osmar Alves; CAMPELO,
384 Meiciane Ferreira; RAMIRES, Allan Cristiam Santos. Estudo fenológico do
385 germoplasma de *Pilocarpus microphyllus* Stapf Ex Wardleworth correlacionado com
386 elementos climáticos. *Research, Society and Development*, vol. 10, no. 5, p.
387 e7710514626, 2021. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14626>.

388 MOTA, Nara Furtado Oliveira; WATANABE, Mauricio Takashi Coutinho; ZAPPI,
389 Daniela Cristina; HIURA, Alice Lima; PALLOS, Julieta; VIVEROS, Raquel Stauffer;
390 GIULIETTI, Ana Maria; VIANA, Pedro Lage. Amazon canga: The unique vegetation of
391 Carajás revealed by the list of seed plants. *Rodriguesia*, vol. 69, no. 3, p. 1435–1488,
392 2018. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201869336>.

393 NETO, Leonardo Gobbo; LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: fatores de influência
394 no conteúdo de metabólitos secundários. *Química nova*, v. 30, p. 374-381, 2007.

395 OLIMAT, Suleiman. Pilocarpine Alkaloid A Review. vol. 0990, no. 4, p. 161–164, 2020.
396 <https://doi.org/10.36349/easjpp.2020.v02i04.009>.

397 OROZCO-CASTILLO, José Agustín; CRUZ-ORTEGA, Rocío; MARTINEZ-
398 VÁZQUEZ, Mariano; GONZÁLEZ-ESQUINCA, Alma Rosa. Aporphine alkaloid
399 contents increase with moderate nitrogen supply in *Annona diversifolia* Saff.

400 (Annonaceae) seedlings during diurnal periods. *Natural Product Research*, vol. 30, no.
401 19, p. 2209–2214, 2016. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1143826>.

402 PAZ, Anat; GAGEN, Emma J.; LEVETT, Alan; ZHAO, Yitian; KOPITTKKE, Peter M.;
403 SOUTHAM, Gordon. Biogeochemical cycling of iron oxides in the rhizosphere of plants
404 grown on ferruginous duricrust (canga). *Science of the Total Environment*, vol. 713, p.
405 136637, 2020. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.136637. Available at:
406 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136637>.

407 PEREIRA, Renata Junqueira; CARDOSO, Maria das Graças. Metabólitos secundários
408 vegetais e benefícios antioxidantes. ***Journal of biotechnology and biodiversity***, v. 3, n.
409 4, 2012.

410 PIRANI, José Rubens; DEVECCHI, Marcelo Fernando. Flora das cangas da serra dos
411 carajás, Pará, Brasil: Rutaceae. *Rodriguesia*, vol. 69, no. 1, p. 209–217, 2018.
412 <https://doi.org/10.1590/2175-7860201869119>.

413 PRICE, Francis W.; HOM, Milton; MOSHIRFAR, Majid; EVANS, David; LIU, Haixia;
414 PENZNER, Jeff; ROBINSON, Michael R.; LEE, Sungwook; WIRTA, David L.
415 Combinations of Pilocarpine and Oxymetazoline for the Pharmacological Treatment of
416 Presbyopia. *Ophthalmology Science*, vol. 1, no. 4, p. 100065, 2021. DOI
417 10.1016/j.xops.2021.100065. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.xops.2021.100065>.

418 RAMAKRISHNA, Akula; RAVISHANKAR, Gokare Aswathanarayana. Influence of
419 abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior*,
420 vol. 6, no. 11, p. 1720–1731, 2011. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>.

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

424 SHEN, Yijun; PENG, Weifeng; CHEN, Qinglan; HAMMOCK, Bruce D.; LIU, Junyan;
425 LI, Dongyang; YANG, Jun; DING, Jing; WANG, Xin. Anti-inflammatory treatment with
426 a soluble epoxide hydrolase inhibitor attenuates seizures and epilepsy-associated
427 depression in the LiCl-pilocarpine post-status epilepticus rat model. *Brain, Behavior, and*
428 *Immunity*, vol. 81, no. June, p. 535–544, 2019. DOI 10.1016/j.bbi.2019.07.014. Available
429 at: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.07.014>.

430 SINGH, Aradhana; PANDEY, Bhanu; KUMARI, Sumita; AGRAWAL, Madhoolika.
431 Nitrogen availability modulates CO₂-induced responses of *Catharanthus roseus*: Biomass
432 allocation, carbohydrates and alkaloids profile. *Journal of Applied Research on Medicinal
433 and Aromatic Plants*, vol. 2, no. 4, p. 160–167, 1 Dec. 2015.
434 <https://doi.org/10.1016/J.JARMAP.2015.07.002>.

435 TANAKA, Akiko; NAKANO, Hiroyuki; YONETO, Kunio; YONETO, Chika;
436 FURUBAYASHI, Tomoyuki; SUZUKI, Kei; OKAE, Azusa; UENO, Takaaki;
437 SAKANE, Toshiyasu. Topical Xerostomia Treatment with Hyaluronate Sheets
438 Containing Pilocarpine. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 45, p. 403–408,
439 2022.

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

443 XINGQI, Wang; YONG, Zhang; XING, Li; YANG, Wang; JIE, Huang; RONGFENG,
444 Hu; SHUANGYING, Gui; XIAOQIN, Chu. Cubic and hexagonal liquid crystal gels for
445 ocular delivery with enhanced effect of pilocarpine nitrate on anti-glaucoma treatment.
446 *Drug Delivery*, vol. 26, no. 1, p. 952–964, 2019.
447 <https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1667451>

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459 **Prediction of pilocarpine production from soil attributes and the nutritional status**
460 **of *Pilocarpus microphyllus***

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

462 DOI: 10.1080/01904167.2022.2155549

463

464 Priscila Maylana Modesto de Jesus¹ Cecílio Frois Caldeira² Markus Gastauer² Paula Godinho Ribeiro²

465 Silvio Junio Ramos²

466

467 ¹ Universidade Federal Rural da Amazônia, Programa de Pós graduação em Agronomia, Belém (PA),

468 Brasil. orcid.org/0000-0002-3144-1832

469 ² Instituto Tecnológico Vale, Belém (PA), Brasil. orcid.org/0000-0001-5909-8418¹

470 ² Instituto Tecnológico Vale, Belém (PA), Brasil. orcid.org/0000-0003-4762-3515²

471 ² Instituto Tecnológico Vale, Belém (PA), Brasil. orcid.org/0000-0002-9599-0902³

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

473

474 **Corresponding author**

475 **Name:** Silvio Junio Ramos

476 **Email:** silvio.ramos@itv.org

477

ABSTRACT

478 Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*), an endemic species of the Brazilian flora threatened
479 with extinction, is the only natural source of pilocarpine, an alkaloid widely used in the
480 pharmaceutical industry. This compound is extracted from the leaf tissue and may be
481 affected by edaphic and nutritional variations. The aim of this study was to correlate soil
482 chemical parameters and leaf nutrient contents with pilocarpine production in *Pilocarpus*
483 *microphyllus* plants collected from areas of the Carajás National Forest. In samples
484 collected from 83 plants, pilocarpine, leaf nutrients (N, P, K, S, Mg, Ca, B, Zn, Cu, Fe,
485 and Mn), and soil chemical attributes (P, K, S, Mg, Ca, B, Zn, Cu, Fe, Mn, organic matter

486 (OM), pH, and Al) were evaluated. The mean values of pilocarpine varied between 0.4%
487 and 2.2% of the leaf dry matter, which are rare. In general, the soils presented low nutrient
488 availability, marked acidity, and very high Fe and Mn values. In the leaves, low
489 concentrations of N, P, and K and high leaf concentrations of Fe (2239.13 mg kg⁻¹) and
490 Mn (2095.46 mg kg⁻¹) were observed, which suggested that *P. microphyllus* is a metal
491 accumulator species. Through multivariate analysis, the model that best predicted
492 pilocarpine production was composed of leaf N, leaf Mg, soil Fe (positive predictors),
493 soil S, and leaf P (negative predictors). The nutritional management for large-scale
494 cultivation of *P. microphyllus* should be focused mainly on the amounts of N, Fe, and
495 Mg.

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

497 INTRODUCTION

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

507 *Pilocarpus microphyllus* is an understory shrub with a preference for hot and
508 humid climates that grows in soils with low fertility, rocky outcrops, and secondary
509 vegetation, in addition, it is an endangered species (Caldeira et al. 2017; Homma, 2003).
510 Brazil is the only pilocarpine producing country and responsible for supplying world

511 demand (Ibge, 2018). In this context is the Carajás National Forest in the state of Pará,
512 which is home to one of the largest remaining populations of *P. microphyllus* and one of
513 the few areas where the species is still found (Amaral et al. 2021; Caldeira et al. 2017;
514 Homma, 2003).

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

522 Some abiotic factors, such as low temperatures and water limitation, hinder the
523 growth of jaborandi seedlings, but the effect of these factors on the synthesis of
524 pilocarpine is unknown (Amaral et al. 2021). In turn, the use of growth regulators and
525 balanced nutritional conditions induce the production of pilocarpine in seedlings of this
526 species (Avancini et al. 2003). Despite these results, plants tend to produce higher
527 concentrations of pilocarpine under natural conditions (Sandhu et al. 2006) than under
528 controlled conditions, as well as when they have an adequate supply of nutrients, such as
529 N, P, and K (Avancini et al. 2003).

530 The synthesis of secondary metabolic compounds is usually associated with
531 stressors that accelerate the evolutionary process in some plants, as this is linked to the
532 defense/adaptation model of each species (Cao et al. 2020; Ramakrishna and Ravishankar
533 2011). The production of these metabolites is cumulative and arises from common
534 substrates of the primary metabolism; for example, the carbon derived from

535 photosynthesis is destined, in large part, for the synthesis of these substances
536 (Ramakrishna and Ravishankar 2011).

537 Soil nutrients are still poorly studied variables in the production of pilocarpine.
538 These elements can act as stressors (in their absence or excess) and even contribute to the
539 structure of this alkaloid molecule, as nitrogen does. Pilocarpine is thought to be derived
540 from the amino acid histidine plus carbon atoms of threonine and/or acetyl-CoA, along
541 with other imidazole alkaloids, which are molecules rich in nitrogen (Sawaya et al. 2011).
542 This relationship between nitrogen and alkaloids was also reported by Mishra et al.
543 (2019). These authors found a significant increase of 860 mg L⁻¹ of alkaloids in
544 *Catharanthus roseus* when the supply of nitrogen and phosphorus increased. Some other
545 micronutrients, such as Cu, Fe, Mo, and Mn, may influence the biosynthetic process of
546 metabolites because they are enzymatic activators (Isah 2019).

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

555

556 **MATERIAL AND METHODS**

557 Plant material

558 *P. microphyllus* plants were sampled in the Carajás National Forest (CNF), state
559 of Pará, Brazil (6°6'29" S, 50° 18'16" W). The region has average altitude of 700 m and

560 a predominance of dense evergreen forest and the following soils classes: Haplic
561 Cambisols (Inceptisols), Red-Yellow Latosols (Oxisols), Red Yellow Argisol (Oxisols),
562 Plintosols (Ultisols) and Litholic Neosols (Entisols Litholic). In addition, a small part of
563 CNF consists of rocky vegetation with endemic species adapted to soils with low natural
564 fertility and outcrops of ferruginous rocks, also known as canga (Gastauer et al. 2020;
565 Souza-Filho et al. 2019).

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

576 Pilocarpine extraction

577 Pilocarpine was extracted and quantified by the company Anidro do Brasil
578 Extrações Ltda. The extraction process consisted of initially weighing 5 g of ground
579 leaves and placing them in a 250 mL Erlenmeyer flask with 80 mL of chloroform and 10
580 mL of 10% ammonia solution to increase the pH to 10. This solution was stirred on a
581 shaker table for 15 minutes, after which 10 mL of chloroform and 50 mL of 5% H₂SO₄
582 solution were added with the aid of a separating funnel. After stirring, the solution was
583 filtered through the separating funnel, and cotton was added to the inside of the funnel.
584 After extraction of the alkaloids from the chloroform fraction, the acidic fraction of the

585 solution was homogenized, and an aliquot was removed for high-performance liquid
586 chromatography (HPLC) analysis. The sample dilution for HPLC was 1:10 with the
587 effluent under chromatographic conditions (column: LiChroCART RP-Select B 5 μm
588 Lichrospher Art. 50839; effluent: 5% KH_2PO_4 ; pH = 2.5 with 85% H_3PO_4 ; column
589 temperature: 50 ° C; attenuation: 7; flow rate: 1 mL min^{-1} ; UV: 216 nm; paper speed: 2.5
590 mm min^{-1}). The pilocarpine contents were determined according to the standard curve of
591 pilocarpine (pilocarpine hydrochloride). The sample dilution values were based on the
592 desiccation loss subtraction (%), that is, moisture difference.

593

594 Analysis of soil and leaf nutrients

595 The soil sample analyzed consisted of three subsamples collected with the aid of
596 “shovel” in the 0-20 cm depth from each area where the leaves of *P. microphyllus* were
597 collected, totaling 83 soil samples. Soil samples were air-dried and analyzed for soil
598 texture by the pipette method principle (Teixeira, 2017). The following soil chemical
599 attributes were determined: pH (1:2.5 soil:water ratio), organic matter ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0.0835
600 mol L^{-1} , H_2SO_4 50%), nitrogen (H_2SO_4 0.5 mol L^{-1}), Al (KCl 1 mol L^{-1}), exchangeable
601 Ca and Mg (KCl 1 mol L^{-1}), K and P (Mehlich-I, 0.05 mol L^{-1} , 0.0125 mol L^{-1} H_2SO_4), S
602 ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 0,01 mol L^{-1}), B (Hot water), and Fe, Mn, Cu, and Zn (DTPA solution pH
603 7.3 (0.005 mol L^{-1} of DTPA + 0.1 mol L^{-1} of triethanolamine + 0.01 mol L^{-1} of CaCl_2),
604 all methods followed Teixeira (2017). Soil attributes were classified according to the
605 general recommendations suggested for soils from Pará (Embrapa 2020) using the mean
606 values of the samples.

607 A total of 2 g of the leaf sample was digested in nitroperchloric acid and then
608 determined the contents of P (colorimetry), K (flame photometry), Ca and Mg (atomic
609 absorption), S (turbidimetry), Cu, Fe, Zn, and Mn (atomic-absorption spectrometry). The

610 N determination followed sulfuric solubilization using the Kjeldahl method, and B, dry
611 solubilization using the colorimetry method (Malavolta et al, 1997).

612 Data analysis

613 The data were analyzed in R (R core team 2016), the correlation coefficients
614 (Pearson) between the soil chemical attributes, the leaf nutrient content, and the leaf
615 pilocarpine content were calculated, and correlograms containing the graphical
616 representations were drawn. Variables that had a correlation coefficient with pilocarpine
617 content greater than 0.10 or less than -0.10 were selected to build the first model to predict
618 pilocarpine content. Variables with autocorrelation values lower than 2 were selected,
619 with ranking performed by the "vif" function of the R "MuMIn" package. Eleven
620 variables were selected (soil: S, Fe, Al, pH; leaf: N, P, S, Ca, Mg, Cu, Zn) and 1486
621 models were generated by combining a maximum of six predictive variables, to avoid
622 overfitting, using the stepwise model technique with the R "MuMIn" package (Barton
623 2016). The models were ranked according to Akaike's information criterion (AIC), and
624 those with lower AIC were selected; the selection threshold was a ΔAIC (difference in
625 AIC relative to the best model) lower than 2, which was determined by the "dredge"
626 function of the MuMIn package (Barton 2016). A total of 15 models were selected
627 through this method, and the models combined between four and six predictive variables.
628 From the leaf pilocarpine content estimated by the model with the best AIC, we calculated
629 the ratio of observed pilocarpine values to the expected/estimated values.

630

631 RESULTS

632 The soils collected near the rhizosphere of *P. microphyllus* plants were
633 predominantly acidic, with low nutrient availability (P, Ca, Mg, and B), high levels of
634 metallic micronutrients (Table 1), and higher levels of sand and silt than clay (Figure 1).

635 There was a wide variation in the physical properties of these soils where the *P.*
 636 *microphyllus* plants grew in the CNF (Table 2), and the soils varied in fertility (Figure 2),
 637 which was confirmed by the high standard deviation of the samples (Table 1).

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

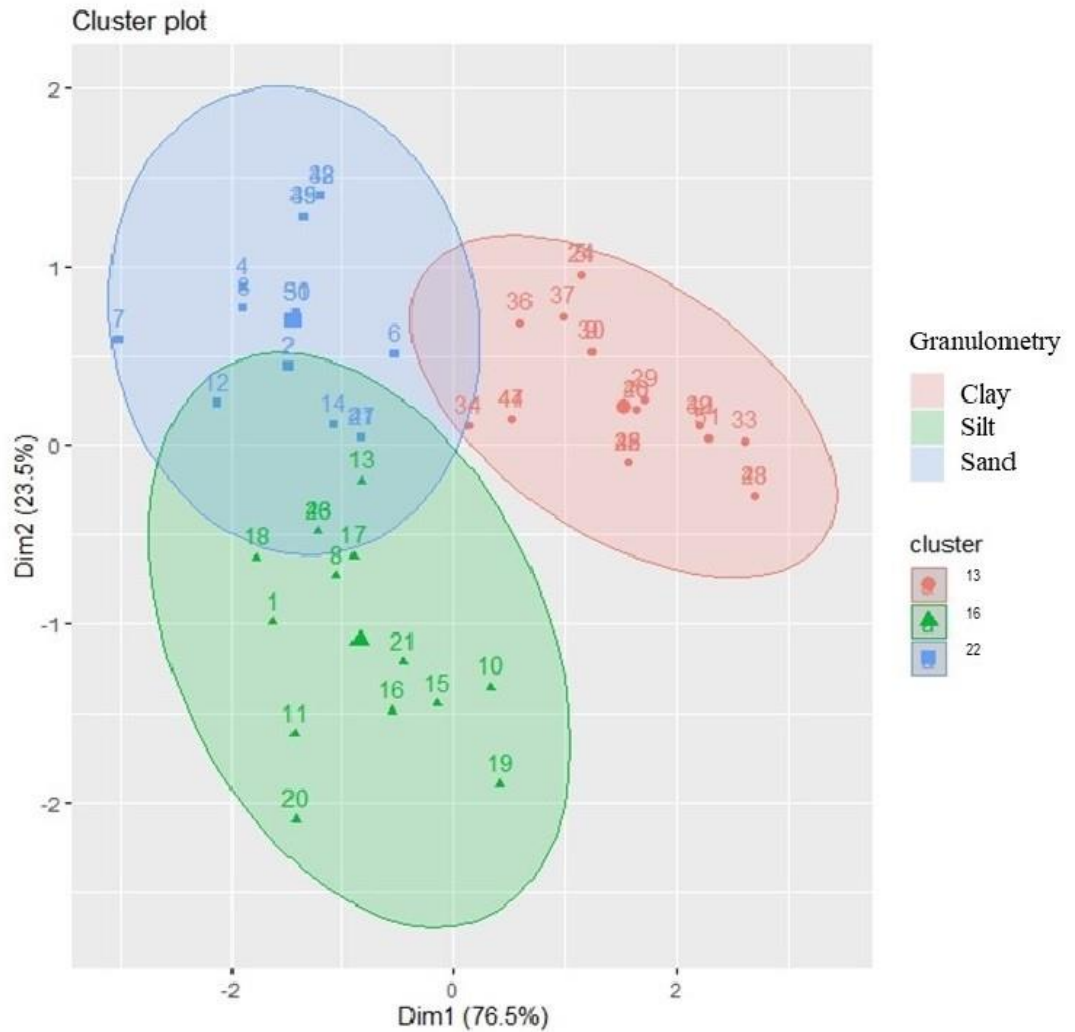
Attributes	Soil		Leaf	
	Mean ^c	Classification ^a	Mean	Classification ^b
pH	4.27±0.38	-	-	-
N	-	-	22.71 (g kg ⁻¹) ±3.51	Low
P (mg dm ⁻³)	6.77± 5.36	Low	1.03 (g kg ⁻¹) ±0.37	Low
K (mg dm ⁻³)	93.91±62.05	High	9.79 (g kg ⁻¹) ±4.50	Low
S (mg dm ⁻³)	20.45±13.81	Low	1.94 (g kg ⁻¹) ±0.55	Good
Ca (cmol _c dm ⁻³)	1.47±2.07	Low	9.03 (g kg ⁻¹) ±2.78	Good
Mg (cmol _c dm ⁻³)	0.61±0.93	Low	4.25 (g kg ⁻¹) ±1.27	High
Al (cmol _c dm ⁻³)	1.34±0.88	High	-	-
H+Al (cmol _c dm ⁻³)	16.42±10.70	-	-	-
m (%) ^d	44.35±23.23	-	-	-
OM (%)	15.95±11.65	-	-	-
B (mg dm ⁻³)	0.36±0.27	Low	67.29(mg kg ⁻¹) ±23.94	Good
Zn (mg dm ⁻³)	2.28±1.89	High	37.75(mg kg ⁻¹) ±12.63	High
Fe (mg dm ⁻³)	455.45±264.4	High	2239.13 (mg kg ⁻¹) ±1979.89	Very high
Mn (mg dm ⁻³)	104.88±119.2	High	2095.46 (mg kg ⁻¹) ±1697.65	Very high
Cu (mg dm ⁻³)	0.89±0.70	Average	12.37 (mg kg ⁻¹) ±4.36	Good
Sand (%)	54±18.9	Sandy loam		
Clay (%)	19±12.4			
Silt (%)	25±11.0			

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

644 ^c Mean (± SD)

645 ^d Aluminum saturation

646



647

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

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

654 The leaf contents of the nutrients S, Zn, Cu, Mn, and Fe were positively
 655 correlated with their levels available in the soil. Other elements, such as K and B, had
 656 negative correlations between their respective values in soil and leaf (Figure 3). In
 657 general, leaf pilocarpine levels showed better correlations with the concentrations of
 658 nutrients found in the leaves (Figure 3), although all correlation coefficients were weak.

659 Among the soil properties, Fe and Al were positively correlated with pilocarpine, as were
 660 pH and S (Figure 3). Thus, these variables were chosen as predictors for the composition
 661 of the leaf pilocarpine model.

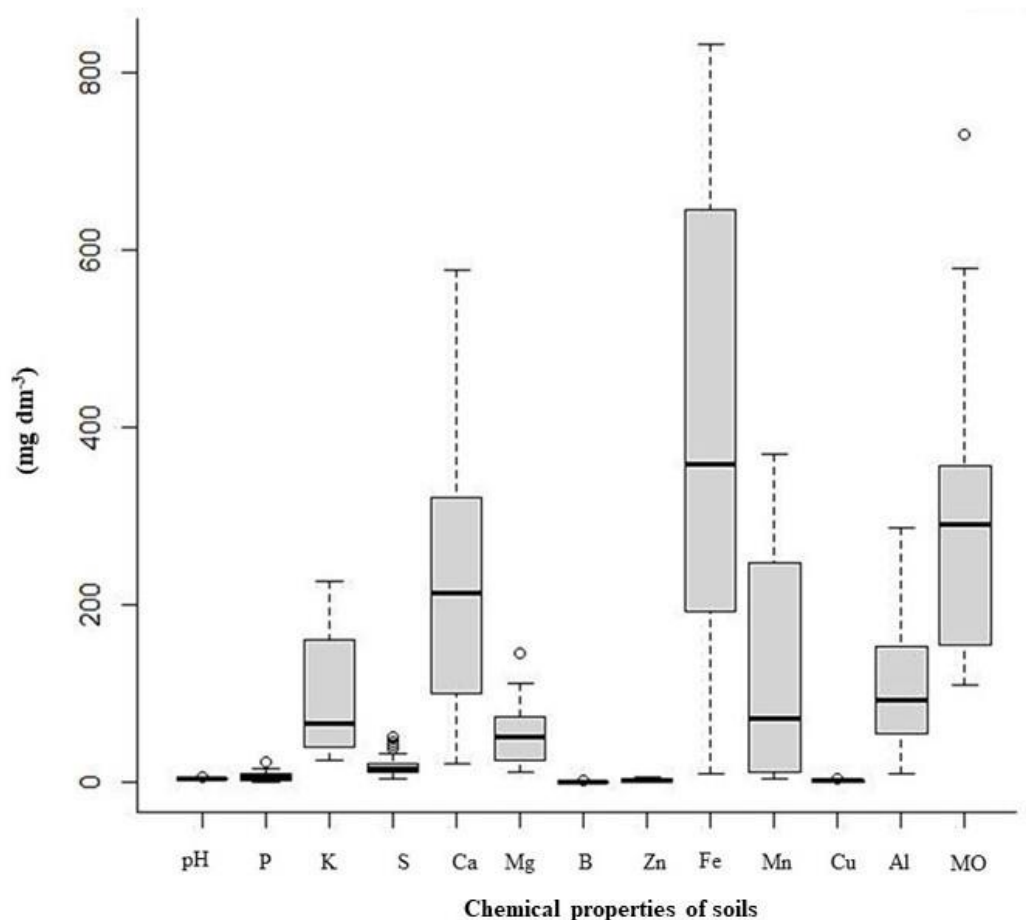
662 To build the model, 13 soil (S, Fe, Al, pH, organic matter (OM), Zn) and leaf
 663 (N, P, S, Ca, Mg, Cu, Zn) variables were pre-selected, but two soil variables (OM and
 664 Zn) were eliminated due to their autocorrelation (data not shown). The models were
 665 ranked on their prediction ability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

670 **Table 2** Granulometria classification of soil physical properties of soils collected in
 671 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
	88.0	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
	52	33	15
Sandy Clay Loam	47	36	17
	58.9	33	8.1
	48.4	33	18.6
Silt Loam	17	35	48
Clay	35.9	47	17.1

672 Through multivariate analysis, the models that made better predictions
673 suggested that higher pilocarpine contents were mainly associated with higher leaf N and
674 Mg and soil Fe, as well as lower leaf P and soil S (Figure 4). The leaf pilocarpine contents
675 estimated by the model with the best AIC (Table 3) showed a correlation coefficient equal
676 to 0.53 (Figure 4). The model proposed in the present study had the limitation of
677 underestimating pilocarpine values in the higher range. Pilocarpine varied from 0.5 to
678 2.2% contents in these *P. microphyllus* accessions.



679

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

682

DISCUSSION

683

684

685

686

687

688

689

690

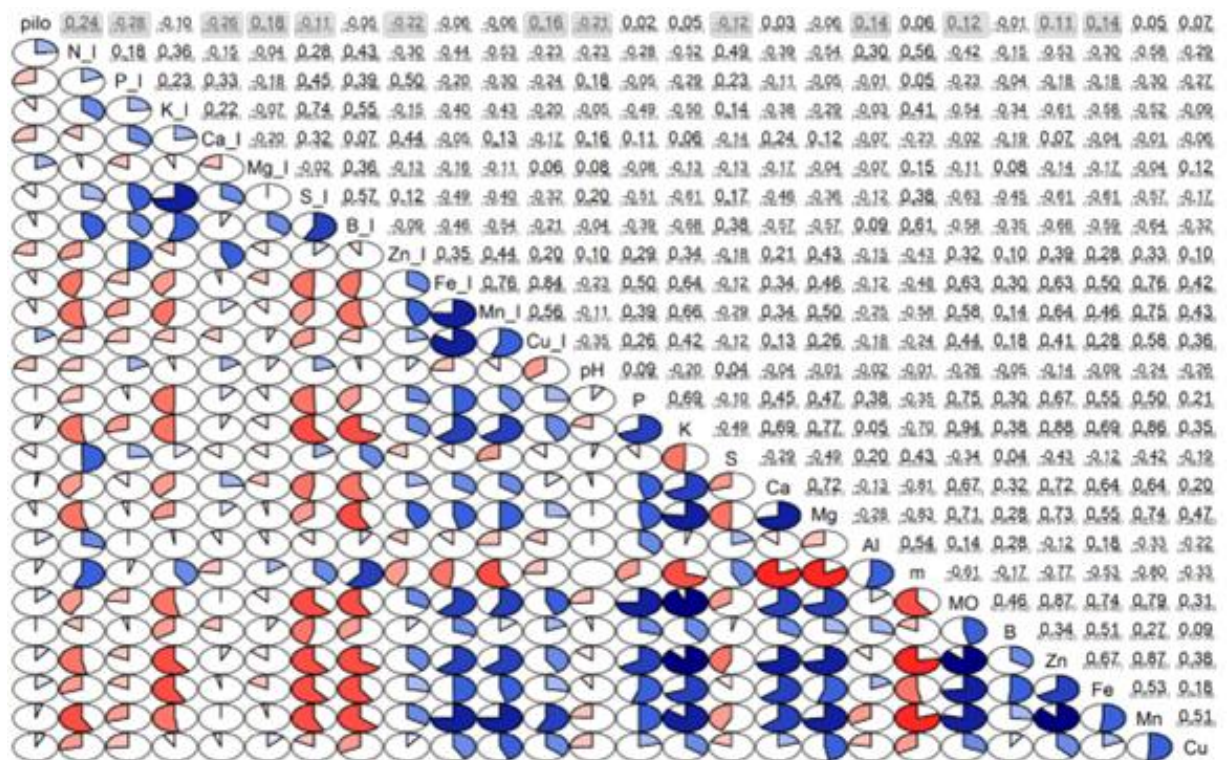
A diversity of textural classes of the collected soils (seven classes) was observed, with a predominance of the loam-sand classes followed by the loam class, which has low cation exchange capacity and water retention. These soils, associated with the limited availability of nutrients, may have affected 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).

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

699 The high Fe and Mn values available in the soils were reflected in the high
700 concentrations of these elements in the leaves. Although these high values of leaf Fe and
701 Mn were within the critical levels of toxicity for many crops, such as Fe in the tree species
702 *Eugenia uniflora* (Jucoski et al. 2016) and Mn in soybean (Santos et al. 2017), these
703 concentrations might not affect the species of this study. If true, *P. microphyllus* could be
704 considered a hyperaccumulating plant of these elements, since its average leaf contents
705 (2870.73 and 2510.84 mg kg⁻¹, for Fe and Mn, respectively) were higher than the 200 mg
706 kg⁻¹ Mn and 300 mg kg⁻¹ Fe found in the hyperaccumulators *Mimosa somnians* and
707 *Dioclea crenata*, respectively (Skirycz et al. 2014). In parallel to the accumulation of
708 metals in the leaves, Fe, Mn, Cu, Zn, and S were also high in soil. However, the only soil
709 variables included in the pilocarpine prediction models were soil Fe and S. Iron might
710 contribute to the biosynthesis of pilocarpine because it plays an important role in the
711 mechanisms that control secondary metabolism (Isah 2019).

712 The high levels of soil Fe may compete with the absorption of other nutrients
713 but boost the formation of pilocarpine. Metals may have effects on biosynthetic pathways
714 of secondary metabolism, acting directly or indirectly as a source of activation of some
715 pathways (Isah 2019; Li et al. 2013). The importance of metal stress on the production of

716 secondary metabolites is evidenced in the medicinal plants *Panax ginseng* and *Panax*
 717 *quinquefolius* when exposed to a high iron supply, which induces them to synthesize
 718 secondary metabolites (Wang et al. 2021), though this increase depends on the species
 719 and nature of the metal as well as its concentration (Maleki et al. 2017). These specificities
 720 are essential to the biosynthesis of the secondary metabolites, since enzymatic activation
 721 and the redox function of some micronutrients defines their production (Isah 2019).



722
 723 **Figure 3** Correlograms of pilocarpine contents in jaborandi leaves (*P. microphyllum*), foliar nutrients and
 724 in the soil of the collection sites. The upper panel presents the correlation values (Pearson) and the lower
 725 panel the representation of these correlations, where the slice and the color intensity indicate the correlation
 726 value. Correlations of pilocarpine with the other variables having values greater than 0.10 or less than –
 727 0.10 are highlighted in the upper line (grey background) and were used as predictive variables for the
 728 proposed model.

729 The production of pilocarpine was more significantly associated and directly
 730 proportional to the leaf N and Mg levels. This suggests that despite the low fertility of the
 731 collected soils, the *P. microphyllum* absorbed Mg e N in quantities that cause nutritional
 732 stress, which contributed to the biosynthesis of the active compound. It is important to

733 emphasize that Mg plays a central role in chlorophyll atoms and in protein synthesis and
 734 is also important in the metabolism of N and, consequently, in the accumulation of
 735 alkaloids (Gerendás and Führs 2013). A greater input of Mg also results in higher levels
 736 of some alkaloids, such as scopolamine in *Atropa belladonna* L. (Hank et al. 2004).
 737 Although there are few studies on the role of Mg associated with the production of
 738 alkaloids, to produce these compounds, a high energy demand is necessary and a higher
 739 photosynthetic rate may boost their synthesis (Tatagiba et al. 2017).

740 **Table 3** Ranking of 15 linear models according to AIC criterion for prediction of leaf pilocarpine content
 741 according to the concentrations of nutrients in the soil and leaves. The models were created from two soil
 742 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
 743 grouped with at most six variables.

Model	Intercept	S	Fe	N_L	P_L	S_L	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	-	-0.00895	0.00034	0.05080	-	-	8	78.62360	0.89681
	0.05866				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	-	-0.00881	0.00048	0.04834	-	0.07911	8	79.42776	1.70098
	0.03983				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 _L	Mg _L	Cu _L	Zn _L	-	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	-	-	0.04962	0.01164	-	-	8	78.62360	0.89681
								0.05866	
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	-	-	0.05399	-	-	-	8	79.42776	1.70098
								0.03983	
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	-	-	-	-

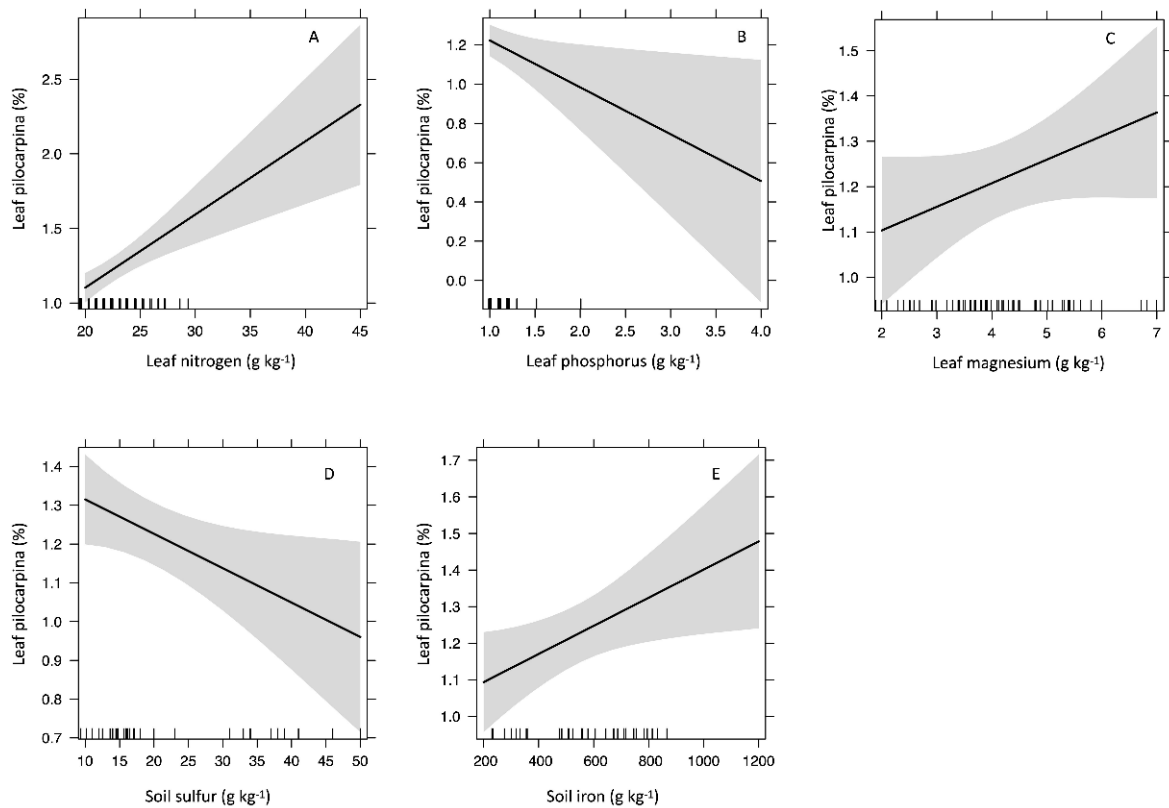
744

745 The positive correlation between N and pilocarpine indicates the direct role of
746 this nutrient in the synthesis of the studied compound and is probably linked to
747 biosynthesis by the L-histidine pathway (Debnath et al. 2018). A positive relationship
748 between N and pilocarpine has also been found in the *in vitro* cultivation of *P.*
749 *microphyllus* calluses under different proportions of N (Abreu et al. 2005) and in the
750 cultivation of *P. microphyllus* seedlings in nutrient solution (Avancini et al. 2003).

751 Alkaloids have a complex constitution capable of yielding numerous compounds of the
752 same biogenetic origin, the nitrogenous molecules (Bribi 2018).

753 Although this study did not quantify N forms in the soil, the N supply pathway
754 in the study areas was exclusively through organic matter. These plants found in the
755 natural environment depend on the decomposition of organic matter for nutrient
756 availability (Latifmanesh et al. 2020) and the absorption of these elements affects their
757 leaf content. Thus, it reinforces the existence of factors related to possible interactions of
758 N with other nutrients in the absorption process, as well as the increase in the energy input
759 for the assimilation and production of organic nitrogen molecules (Giorgi 2009; Isah
760 2019).

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



772

773 **Figure 4** Projection of the effect of each predictive variable on leaf pilocarpine content

774 according to the best linear model selected by the AIC method. The variables with the

775 best prediction were leaf nitrogen (a), leaf phosphorus (b), leaf magnesium (c), soil

776 sulfur (d), and soil iron (e). The uncertainty of the model (gray band) increased due to

777 too few data at certain nutrient concentrations.

778

779

780

781

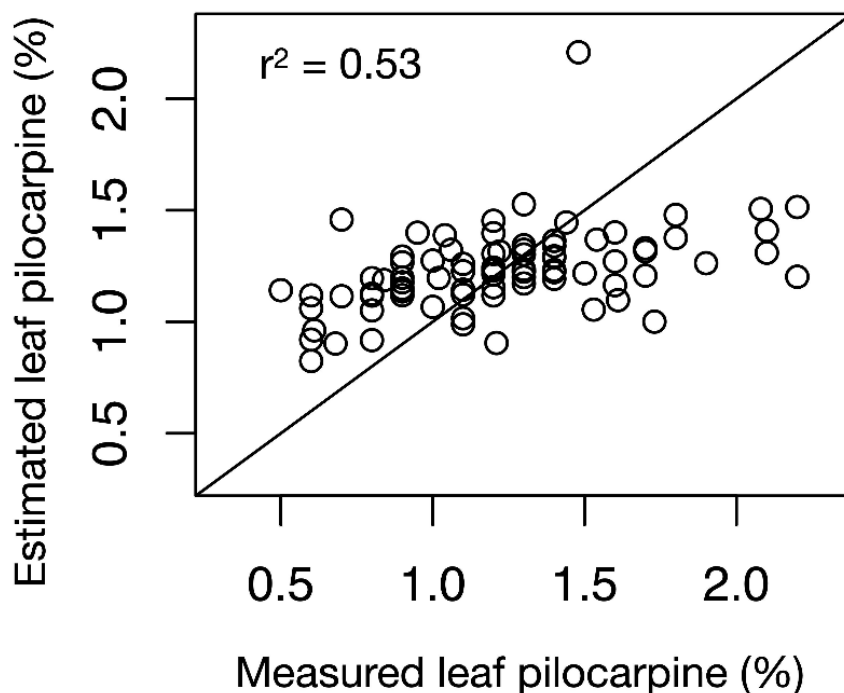
782

783

784

785

786



787

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

790 Sulfur is known for having a negative relationship with the levels of metabolites
 791 from shikimic acid (secondary metabolism) (Gobbo-Neto and Lopes 2007). The nutrient
 792 also acts in the structures and precursor routes of some indole alkaloids (Zhang et al.
 793 2020). Sulfur plays a role in stress tolerance, it acts in the structural maintenance of
 794 proteins and makes up part of glutathione, an antioxidant that mitigates stress (Rabêlo et
 795 al. 2017). Therefore, S may be associated with lower production of pilocarpine because
 796 it is supposedly part of the response to oxidative stress and thus does not contribute as
 797 much to the production of the secondary metabolite in question.

798 The model proposed in the present study may underestimate pilocarpine
 799 concentrations in the higher range of values, which can be considered a primary or
 800 approximate result. However, it still tells us the predictor variables related to soil fertility
 801 and leaf levels, and indicates that there is a significant correlation between the parameters
 802 analyzed and the production of pilocarpine. The high values of leaf Mg and soil Fe

803 eventually behaved in a relevant manner within the best prediction model. The high
804 amount of Fe in the soils of the CNF is natural (Viana et al. 2016), and as discussed above,
805 it is an extremely important variable for the production of pilocarpine, which opens the
806 possibility of future studies on this micronutrient.

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

816 **CONCLUSION**

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

825 The study is a pioneer in linking nutrients of soil and leaf with pilocarpine
826 content, which can support nutritional management in large-scale cultivation. In addition,
827 it is an endangered species in which it has great medicinal importance, requiring research

828 to indicate the management and conservation of the species. Understanding these
829 nutritional requirements is especially relevant because of the higher demand for natural
830 pilocarpine, but further experiments with the application of these elements in controlled
831 conditions is necessary to evaluate the optimal dose for pilocarpine production.

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

835

836 **Declaration**

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

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

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

841

842 **REFERENCES**

843 Abreu IN, Choi YH, Sawaya ACHF, Eberlin MN, Mazzafera P, Verpoorte R
844 (2011) Metabolic alterations in different developmental stages of *Pilocarpus*
845 *microphyllus*. *Planta Medica* 77: 293-300. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250314>.

846 Abreu IN, Sawaya ACHF, Eberlin MN, Mazzafera P (2005) Production of
847 pilocarpine in callus of jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* stapf). *In Vitro Cellular &*
848 *Developmental Biology* 41:806-811. <https://doi.org/10.1079/IVP2005711>.

849 Allevato DM, Groppo M, Kiyota E, Mazzafera P, Nixon KC (2019) Evolution
850 of phytochemical diversity in *Pilocarpus* (Rutaceae). *Phytochemistry* 163:132-146.
851 <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.03.027>.

852 Amaral GC, Pezzopane JEM, Júnior RSN, Fonseca MDS, Toledo JV, Xavier
853 TMT, Oliveira BS, Martínez MF, Júnior RACJ, Gonçalves EO (2021) Ecophysiology of
854 *Pilocarpus microphyllus* in response to temperature, water availability and vapour

855 pressure deficit. *Trees - Structure and Function* 35: 543-555.
856 <https://doi.org/10.1007/s00468-020-02055-x>.

857 Avancini G, Abreu IN, Saldaña MDA, Mohamed RS, Mazzafera P (2003)
858 Induction of pilocarpine formation in jaborandi leaves by salicylic acid and
859 methyljasmonate. *Phytochemistry* 63:171-175. [https://doi.org/10.1016/S0031-](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00102-X)
860 [9422\(03\)00102-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00102-X).

861 Barbosa AC, Queiroz RS, Motta MMS, Portes AJF (2018) Pseudophakic Vision
862 with residual ametropia after pilocarpine 2% instillation. *Revista Brasileira de*
863 *Oftalmologia* 77:349-352. [https://doi.org/ 10.5935/0034-7280.20180076](https://doi.org/10.5935/0034-7280.20180076).

864 Barton K (2016) MuMIn: Multi-Model Inference. R package version 1.15.6.
865 available <https://rdrr.io/cran/MuMIn/man/MuMIn-package.html> Accessed 12 August 2020

866 Bribi N (2018) Pharmacological activity of Alkaloids: A Review Intestinal anti-
867 inflammatory activity of alkaloids in DNBS, DSS and Acetic Acid Models View project
868 Pharmacological activity of Alkaloids: A Review. *Asian Journal of Botany* 1: 1-6 .
869 <https://doi.org/10.63019/ajb.v1i2.467>.

870 Caldeira CF, Giannini TC, Ramos SJ, Vasconcelos S, Mitre SK, Pires JPA,
871 Ferreira GC, Ohashi S, Mota JA, Castilho A, Siqueira JO, Furtini Neto AE (2017)
872 Sustainability of Jaborandi in the eastern Brazilian Amazon. *Perspectives in Ecology and*
873 *Conservation* 15:161-171. <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2017.08.002>.

874 COSTA FG (2017) Os folheiros do jaborandi: Organização, parcerias e seu lugar
875 no extrativismo amazônico. Paco Editorial, Belém.

876 Cao Y, Li K, Li Y, Zhao X, Wang L (2020) MYB transcription factors as
877 regulators of secondary metabolism in plants. *Biology* 9:1-16.
878 <https://doi.org/10.3390/biology9030061>.

879 Debnath B, Somraj W, Das M, Goswami S, Kumar M, Maiti D, Manna K (2018)

880 Role of plant alkaloids on human health : A review of biological activities. *Materials*
881 *Today Chemistry* 9:56-72. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.05.001>.

882 Embrapa (2020) *Recomendação de Calagem e Adubação para o Estado do Pará*.
883 Belém.

884 Faquin V (2002) *Diagnose do estado nutricional das plantas*, 1^a ed. Lavras,
885 Lavras, pp 38-43

886 Gastauer M, Sarmiento PSM, Santos VCA, Caldeira CF, Ramos SJ, Teodoro
887 GS, Siqueira JO (2020) Vegetative functional traits guide plant species selection for
888 initial mineland rehabilitation. *Ecological Engineering* 148:1-11.
889 <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2020.105763>.

890 Gerendás J, Führs H (2013) The significance of magnesium for crop quality.
891 *Plant and Soil* 368: 101-128. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1555-2>.

892 Gobbo-neto L, Lopes NP (2007) Plantas medicinais: fatores de influência no
893 conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova* 30:374-381.
894 <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>

895 Giorgi A, Mingozi M, Madeo M, Speranza G, Cocucci M (2009) Effect of
896 nitrogen starvation on the phenolic metabolism and antioxidant properties of yarrow
897 (*Achillea collina* Becker ex Rchb.). *Food Chemistry* 114:204-211.
898 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.039>

899 Hank H, László I, Bálványos I, Kursinszki L, Kovács G, Szoke É, Tóth E (2004)
900 Effect of magnesium on the growth and alkaloid production of hairy root cultures. *Acta*
901 *Horticulturae* 597:271-274. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.597.39>.

902 Haridasan M (2008) Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome
903 in acid soils. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 20: 183-195.
904 <https://doi.org/10.1590/s1677-04202008000300003>.

905 Homma A. K. O (2003) O extrativismo de folhas de Jaborandi no município de
906 Parauapebas, Estado do Pará. In: Extrativismo vegetal na Amazônia, Belém, pp 120-123

907 IBGE (2018) Produção da extração vegetal e da Silvicultura (PEVS). Available
908 www2.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=292&z=t&o=18.

909 Accessed 20 Abril 2020

910 Isah T (2019) Stress and defense responses in plant secondary metabolites
911 production. *Biological research* 52: 2-25. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3>.

912 Jucoski GO, Cambraia J, Ribeiro C, Alves JO (2016) Excess iron on growth and
913 mineral composition in *Eugenia uniflora* L. *Revista Ciência Agronômica* 47:720-728.
914 <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20160086>

915 Latifmanesh H, Deng A; Li L, Chen Z, Zheng Y, Bao, Zheng C, Zhang W (2020)
916 How incorporation depth of corn straw affects straw decomposition rate and C&N release
917 in the wheat-corn cropping system. *Agriculture, Ecosystems and Environment*,
918 300:07000. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.107000>.

919 Li X, Wang S, Guo L, Huang L (2013) Effect of cadmium in the soil on growth,
920 secondary metabolites and metal uptake in *Salvia miltiorrhiza*. *Toxicological and*
921 *Environmental Chemistry* 95: 1525–1538. [https://doi.org/](https://doi.org/10.1080/02772248.2014.887717)
922 [10.1080/02772248.2014.887717](https://doi.org/10.1080/02772248.2014.887717).

923 Mahajan M, Kuiry R, Pal PK (2020) Understanding the consequence of
924 environmental stress for accumulation of secondary metabolites in medicinal and
925 aromatic plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 18:
926 100255. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2020.100255>.

927 Maleki M, Ghorbanpour M, Kariman K (2017) Physiological and antioxidative
928 responses of medicinal plants exposed to heavy metals stress. *Plant Gene* 11: 247-254.
929 <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.04.006>.

930 Malavolta E, Vitti GC, Oliveira SA. Avaliação do estado nutricional das plantas.
931 Princípios e aplicações. 2.ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa
932 e Fosfato, 1997.

933 Mishra MRM, Srivastava RK, Akhtar N (2019) Effect of Nitrogen, Phosphorus
934 and Medium pH to Enhance Alkaloid Production from *Catharanthus roseus* Cell
935 Suspension Culture. *International Journal of Secondary Metabolite* 6:137-153.
936 <https://doi.org/10.21448/ijsm.559679>.

937 Nile C, Falleni M, Cirasola D, Alghamdi A, Anderson OF, Delaney C, Ramage
938 G, Ottaviano E, Tosi D, Bulfamante G, Morace G, Borghi E (2019) Repurposing
939 Pilocarpine Hydrochloride for Treatment of *Candida albicans* Infections. *mSphere*
940 4: e00689-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00689-18>

941 Pereira EG, Saraiva AG, Dias AC, Ferreira NDS, Lima BR, Fernandes EC,
942 Buc,her CA Fernandes MS (2020) O metabolismo de nitrogênio em plantas de arroz é
943 severamente afetado pela deficiência de cálcio e magnésio. *Brazilian Journal of*
944 *Development* 6:15353–15361. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n3-419>.

945 R Core team (2016) R: A Language and Environment for Statistical Computing.
946 Vienna, Austria.

947 Raulino WNC, Freire FJ, Assunção EAA, Ataíde KMP, Silva HV, Silva ACF
948 (2020) Nutrition of tree species in tropical dry forest and rainforest environments. *Revista*
949 *Ceres* 67:1-11. <https://doi.org/10.1590/0034-737X202067010010>.

950 Rabêlo FH S, Azevedo RA, Monteiro FA (2017) The proper supply of S
951 increases amino acid synthesis and antioxidant enzyme activity in Tanzania guinea grass
952 used for Cd phytoextraction. *Water, Air, & Soil Pollution* 228:1-17.
953 <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3563-6>.

954 Ramakrishna A, Ravishankar GA (2011) Influence of abiotic stress signals on

955 secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior* 6:1720-1731.
956 <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>.

957 Sandhu SS, Abreu IN, Colombo CA, Mazzafera P (2006) Pilocarpine content
958 and molecular diversity in Jaborandi. *Scientia Agricola* 63: 478-482.
959 <https://doi.org/10.1590/S0103-90162006000500010>.

960 Santos EF, Kondo JMS, Paixão AP, Júnior E F, Lavres J, Campos M, Reis AR
961 (2017) Physiological highlights of manganese toxicity symptoms in soybean plants: Mn
962 toxicity responses. *Plant Physiology and Biochemistry* 113: 6-19.
963 <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.01.022>.

964 Sawaya AC H F, Abreu IN, Andreazza NL, Mazzafera P (2011) Pilocarpine and
965 related alkaloids in *Pilocarpus* Vahl (Rutaceae) In: Cassiano N M (ed) *Alkaloids:*
966 *Properties, applications and pharmacological effects*, 1^a ed. United Kingdom, pp 63-80.

967 Skiryecz A; Castilho A, Chaparro C, Carvalho N, Tzotzos G, Siqueira JO (2014)
968 Canga biodiversity, a matter of mining. *Frontiers in Plant Science* 5: 653.
969 <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00653>.

970 Souza-Filho PWM, Giannini TC, Jaffé R, Giuliatti AM, Santos DC, Nascimento
971 WR, Guimarães JTF, Costa MF, Imperatriz-fonseca VL, Siqueira JO (2019) Mapping and
972 quantification of ferruginous outcrop savannas in the Brazilian Amazon: A challenge for
973 biodiversity conservation. *PLoS ONE* 14: e0211095.
974 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211095.g001>

975 Tatagiba SD, Peloso AF, Rodrigues FÁ (2017) Ganho De Desempenho
976 Fotossintético Promovido Pelo Aumento Na Concentração Foliar De Magnésio Em
977 Arroz. *Revista Univap* 22:749. <https://doi.org/10.18066/revistaunivap.v22i40.1532>.

978 Teixeira PC, Donagemma GK, Fontana A, Teixeira WG (2017). *Manual de*
979 *métodos de análise de solo* (3. ed.). Brasília, DF: Embrapa.

980 Viana PL, Mota NFO, Gil ASB, Salino A, Zappi DC, Harley R M, Ilkiu-borges
981 AL, Secco RS, Almeida TE, Watanabe MTC, Santos JUM, Trovó M, Maurity C, Giuliatti
982 AM (2016) Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: História, área de estudos
983 e metodologia. *Rodriguesia* 67: 1107-1124. [https://doi.org/10.1590/2175-](https://doi.org/10.1590/2175-7860201667501)
984 7860201667501.

985 Vieira MC, Perez VB, Heredia ZNA, Santos MC, Peloso IAO, Pessoa SM
986 (2011) Nitrogênio e fósforo no desenvolvimento inicial da guavira [*Campomanesia*
987 *adamantium* (Cambess.) O. Berg] cultivada em vasos. *Revista Brasileira de Plantas*
988 *Medicinais* 13:542-549. <https://doi.org/10.1590/s1516-05722011000500007>.

989 Watanabe M, Yamada C, Komagata Y, Kikuchi H, Hosono H, Itagaki F(2018)
990 New low-dose liquid pilocarpine formulation for treating dry mouth in Sjögren's
991 syndrome: clinical efficacy, symptom relief, and improvement in quality of life. *Journal*
992 *of Pharmaceutical Health Care and Sciences* 4:1-6. [https://doi.org/10.1186/s40780-018-](https://doi.org/10.1186/s40780-018-0099-x)
993 0099-x

994 Wang Q, Jin Q, Ma Y, Zhang S, Zhang L, Liu Z, Zhang Y (2021) Iron toxicity-
995 induced regulation of key secondary metabolic processes associated with the quality and
996 resistance of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*. *Ecotoxicology and Environmental*
997 *Safety* 224:112648. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112648>.

998 Zhang D, Ruan D, Li J, Chen Z, Zhu W, Guo F, Chen K, Li Y, Wang R (2020)
999 Four undescribed sulfur-containing indole alkaloids with nitric oxide inhibitory activities
1000 from *Isatis tinctoria* L. roots. *Phytochemistry* 174:112337.
1001 <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112337>.

1002 Zur E (2020) Low-dose Pilocarpine Spray to Treat Xerostomia. *International*
1003 *journal of pharmaceutical compounding*, 24:104–108.

1004

1005 **NITROGÊNIO AUMENTA A PRODUÇÃO DE PILOCARPINA DE UMA**
1006 **ESPÉCIE DE PLANTA AMAZÔNICA AMEAÇADA**

1007 **RESUMO**

1008 As plantas do gênero *Pilocarpus*, sintetizam moléculas nitrogenadas, chamadas de
1009 pilocarpina, importante para o tratamento de doenças. A espécie *Pilocarpus microphyllus*
1010 se destaca por possuir a maior concentração de pilocarpina, e pela grande expressão
1011 econômica. Embora dada importância, na literatura é inexistente dados que associam
1012 nitrogênio na biossíntese de pilocarpina, nutrição e rendimento de biomassa. Neste
1013 contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de concentrações de N no solo
1014 sobre rendimento de biomassa, respostas fisiológicas, concentrações de nutrientes e de
1015 pilocarpina nos órgãos da planta. Para isto, foi adotado o delineamento inteiramente
1016 casualizado, com cinco tratamentos variando de doses baixa a elevadas (0; 90; 180; 270
1017 e 360 mg/kg⁻¹ de N), e dez repetições. As plantas foram alocadas em vasos com solo
1018 oriundo de floresta primária, sob casa de vegetação, com uso de sombrite (50%) e
1019 monitoramento de temperatura e umidade. As características avaliadas foram: Biomassa,
1020 teor de pilocarpina, trocas gasosas e teores de nutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Zn
1021 e Cu). Os resultados apontam que o maior aporte nitrogenado configurou em ganho
1022 contínuo de rendimento de biomassa, produção de pilocarpina e maior absorção de
1023 nutrientes (Fe, N, Ca, Mg e Zn), e mesmo que muitos parâmetros de trocas gasosas
1024 tenham sido alterados no maior suprimento nitrogenado, as plantas foram capazes de
1025 manter os processos metabólicos. Foram detectadas presença de pilocarpina em toda a
1026 parte da planta, destacando o tecido foliar com a maior quantidade de pilocarpina (62,5%)
1027 na planta, sugerindo uma tendência biossintética na raiz, potencializada pela presença
1028 marcante do ferro e nitrogênio radicular, translocando-se para o local de maior aporte
1029 (folhas). Os resultados do presente estudo, enfatizam o manejo nutricional voltado a
1030 aplicação de nitrogênio e ferro no cultivo do jaborandi, por estimularem a síntese de
1031 pilocarpina.

1032

1033 **Palavras-chave:** Nutrientes. *P. microphyllus*. Metabolito secundário.

1034

1035

1036 **NITROGEN BOOSTS PILOCARPINE PRODUCTION FROM A**
1037 **THREATENED AMAZONIAN PLANT SPECIES**

1038 **ABSTRACT**

1039 Plants of the genus *Pilocarpus*, also known as Jaborandi, synthesize the substance
1040 pilocarpine, made up of nitrogenous molecules, with applicability in the production of
1041 various drugs. The species *Pilocarpus microphyllus* stands out for having the highest
1042 concentration of pilocarpine (1%), configuring great economic expression. Although
1043 given importance, in the literature there is no data that associate nitrogen in the
1044 biosynthesis of pilocarpine, nutrition and biomass yield. In this context, the aim of this
1045 study was to evaluate whether different nitrogen doses affect biomass and pilocarpine in
1046 jaborandi plants. For this, a completely randomized design was adopted, with five
1047 treatments ranging from low to high doses (0; 90; 180; 270 and 360 mg/kg-1 of N), and
1048 ten replications. The plants were placed in vases with soil from primary forest, under a
1049 greenhouse, using shade (50%) and temperature and humidity monitoring. The evaluated
1050 characteristics were: Biomass, pilocarpine content, gas exchange and nutrient content (N,
1051 P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Zn and Cu). The results indicate that the greater nitrogen input
1052 configured a continuous gain in biomass yield, pilocarpine production and greater
1053 absorption of nutrients (Fe, Zn and N), and even though many gas exchange parameters
1054 have been disturbed, under these conditions, the plants of jaborandi were able to maintain
1055 the metabolic processes. The presence of pilocarpine was detected in all parts of the plant,
1056 highlighting the leaf tissue with the highest amount of pilocarpine (62,5%) and suggesting
1057 a possible biosynthetic route, initiated in the root, stimulated by the strong presence of
1058 iron and nitrogen. The results of the present study emphasize nutritional management
1059 aimed at the application of nitrogen and iron in jaborandi cultivation, as they stimulate
1060 pilocarpine synthesis.

1061 **Key Words:** Nutrients. *P. microphyllus*. Secondary metabolite.

1062

1063

INTRODUÇÃO

A flora nativa brasileira acomoda plantas com grande potencial terapêutico, sendo catalogadas nos diferentes ecossistemas, movimentando a receita de comunidades locais e da indústria farmacêutica mundial (Monteiro et al., 2022; Newman; Cragg, 2020). A Floresta Amazônica é responsável por abrigar a maior diversidade biológica do mundo, estimando 15.000 plantas com propriedades fitoterápicas, e grande parte classificadas como endêmicas (Skirycz 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 nos dias de hoje 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% desta produção exportada, constituindo-se, portanto, como a espécie de maior destaque no setor.

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% (Caldeira et al. 2017; Sawaya et al. 2011; Abreu et al. 2007).

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 visando a obtenção de níveis elevados de biomassa,

associado a maiores concentrações de pilocarpina nas folhas. No entanto, existem poucas informações demonstrando a relação entre as respostas fisiológicas, nutricionais e biomassa vegetal, 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), no aumento da biossíntese de pilocarpina no jaborandi.

Quando nos referimos ao N, uma das poucas informações são citadas por Jesus et al. (2022) 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 alcalóide 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 os efeitos de concentrações de N no solo sobre rendimento de biomassa, respostas fisiológicas, concentrações de nutrientes e de pilocarpina nos órgãos da planta.

MATERIAL E MÉTODOS

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, Para, Brasil. As mudas de jaborandi foram produzidas em bandejas de polipropileno de 50 células, com capacidade volumétrica de 0,022 L, medindo 5cm de altura e 3cm de largura, 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 dois meses. A seleção de plântulas para o estudo foi realizada em função do número de folhas (4 folhas) e vigor.

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 6,37m. 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 acompanhadas a temperatura e umidade relativa, utilizando um termo higrômetro instalado no interior da casa de vegetação, e tela sombrite 50%. A temperatura média 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).

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 (1:2.5, relação solo:CaCl₂), Ca e Mg trocáveis (KCl 1 mol L⁻¹), K e P (Mehlich-I, 0,05 mol L⁻¹; 0,0125 mol L⁻¹ H₂SO₄) e Al (KCl 1 mol L⁻¹), todos os métodos seguiram Teixeira (2017). Apresentando os seguintes valores: pH=4.7; Ca= 1.87 cmol_c/dm³; Mg= 0.30 cmol_c/dm³; P=29.26 mg/dm³; K= 0.05 cmol_c/dm³; Al = 0.23 cmol_c/dm³ e H+Al= 6.7.

Foram adicionados 2.800 kg dm³ de solo em vasos com capacidade para 3L (150 cm x 150 cm), para posterior transplântio das plantas. A adubação foi realizada segundo Brasil e Viegas (1999), usando como fontes de nutrientes, cloreto de potássio (100mg/kg), superfosfato simples (120mg/kg) 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 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 Nim. Em casos extremos foi aplicado o Decis 25 EC na concentração de 0.3 mL/L

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos, constituído por doses de nitrogênio (0; 90; 180; 270 e 360 mg dm³), e 10 repetições. A dose tomada como base (180 mg/kg⁻¹), foi oriunda dos resultados obtidos por Brasil e Viegas (1999), para o cultivo do jaborandi.

Material vegetal

As plantas foram coletadas após seis meses a partir da data do transplântio, onde foram avaliados os parâmetros 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 - cm² planta⁻¹) obtida por meio de um integrador de área foliar modelo LI-3100 (LI-COR, Lincoln, NE, USA); Peso foliar, calculado pelo produto da massa seca foliar dividido pela área foliar

Também foram obtidas a massa seca da folha (MSF - g planta⁻¹); massa seca da raiz (MSR - g planta⁻¹) e massa seca do caule (MSC - g planta⁻¹). Determinadas pelo fracionamento de cada parte da planta, com posterior alocação em sacos de papel, seguido da conservação em estufa com circulação forçada de ar, a 65 °C, até atingirem massa constante. Em seguida foi realizada a pesagem usando a balança analítica de precisão

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 NH₄OH 10% (2 gotas) por 15 min, em seguida, foram adicionados 0.3mL de CHCl₃, que foram homogeneizados por 1 min, utilizando o agitador (Basic K40-2810-Kasvi). O CHCl₃ foi recuperado por centrifugação e o precipitado reextraído com 0.3 mL de CHCl₃. As frações de CHCl₃ foram reunidas e extraídas duas vezes, com 0.3 mL de

H₂SO₄ a 2%. Os extratos ácidos reunidos foram neutralizados para pH 12, com auxílio de NH₄OH, em seguida foram extraídos duas vezes usando 0.3 mL de CHCl₃. Foram reunidas as frações orgânicas e secas com fluxo de ar, esse extrato foi dissolvido em 0,2mL de fase móvel, filtrado em membrana 0,45µm e injetado no HPLC. Usou-se a Coluna Shim-pack VP-ODS (250x4,6 mm, 4,6µm, Shimadzu), para separação de pilocarpina. E para eluição foram utilizadas 13,5 ml de H₃PO₄, 3 ml de trietilamina em 850 ml de MilliQ H₂O (pH 3 ajustado com NaOH) e 112 ml de MetOH. O fluxo foi de 1 mL/min e a detecção foi operada no comprimento de onda de 212 nm.

Trocas gasosas

Um dia antes de encerrar o cultivo das plantas, ou seja, no 179º dia após o transplântio, foi realizada análise de trocas gasosas em folhas completamente desenvolvidas e sem sinais de danificação. 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 fotossíntese líquida (A , µmol CO₂ m⁻² s⁻¹), condutância estomática (g_s , mol m⁻² s⁻¹), concentração intercelular de CO₂ (C_i , µmol mol⁻¹), eficiência instantânea de carboxilação (A/C_i) - obtida pela razão entre A e C_i , relação entre concentração intercelular de CO₂ e a concentração de CO₂ no ambiente- obtida pela razão entre C_i e C_a , transpiração (E , mmol H₂O m⁻² s⁻¹) e eficiência do uso da água ($iWUE$, mol CO₂ mmol H₂O)- obtida pela razão entre A e E .

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 Lichtenthaler (1987), sendo os resultados das concentrações expressos em base de massa de matéria fresca (mg g⁻¹ MF).

Nutrição

Foram destinadas 1g de cada amostra para a digestão em 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).

Analise 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 RStudio v.4.0.2 (R Core Team, 2020).

RESULTADOS

O fornecimento de N em plantas de jaborandi afetou significativamente as características de crescimento e desenvolvimento 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, o peso específico das folhas foi reduzido à medida que se elevou as concentrações de N no solo (Figura 1S).

As concentrações de N afetaram o acúmulo de biomassa no jaborandi. A biomassa total, do caule e da folha responderam positivamente a entrada de N, com máximas respostas obtidas na maior concentração testada (360 mg dm^{-3}) que incrementou em 65% da biomassa total, 72% do caule e 72% da folha quando se compara com os resultados obtidos no tratamento sem N. Em geral, baixos suprimentos de N prejudicaram o acúmulo de biomassa na planta. A biomassa radicular não foi afetada pelas concentrações de N no solo (Figura1).

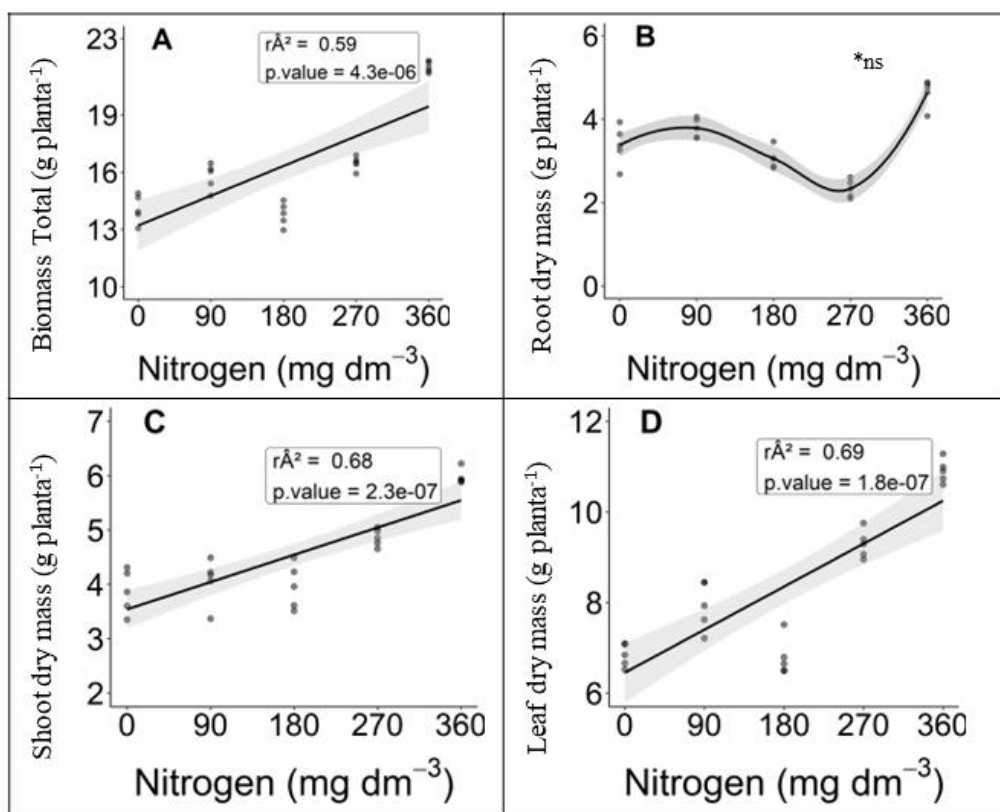


Figura 1. Biomassa seca total, massa seca de raiz, caule e folha de plantas de jaborandi submetidas a diferentes concentrações de nitrogênio. Belém, 2023. *ns: não significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.

Alterações significativas do conteúdo de pilocarpina analisadas nos diferentes órgãos das plantas de jaborandi foram verificadas (Figura 2). As concentrações de pilocarpina cresceram proporcionalmente ao aumento da concentração de N em todas as partes da planta, com máximas respostas na maior concentração testada (360 mg dm^{-3}) (Figura 2). A ausência e baixos suprimentos 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 raiz (15,6%).

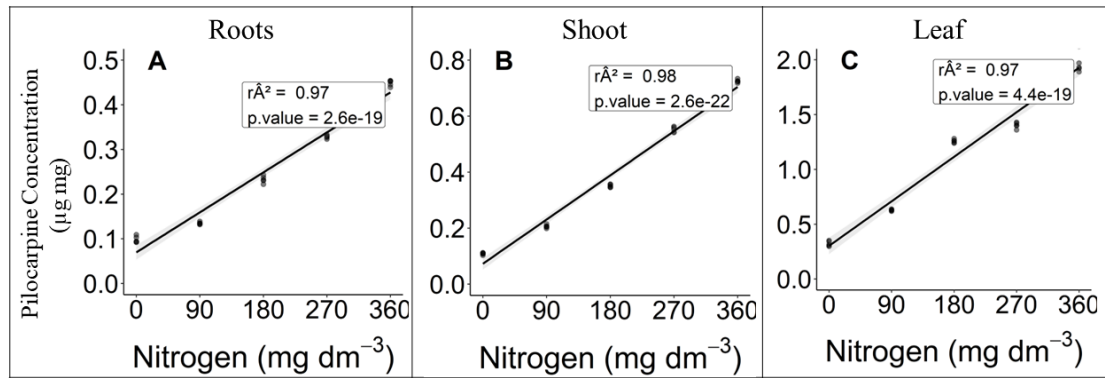


Figura 2. Teor de pilocarpina na raiz (A), caule (B) e folha (C) de plantas de jaborandi submetidas a diferentes concentrações de nitrogênio. Belém, 2023.

Os parâmetros fisiológicos e as trocas gasosas foram afetadas pelo suprimento de N. A elevação da resposta de *A* foi verificada com a elevação do fornecimento de N, sendo a maior resposta estimada na concentração de 248 mg dm⁻³ de N, com incremento de 73% em relação a ausência de N (Figura 3A). A *gs* demonstrou padrão de respostas semelhante a fotossíntese líquida, obtendo máxima taxa de abertura do poro estomático com a concentração estimada de 189 mg dm⁻³ de N, contribuindo 71% em relação a ausência de N, diminuiu com aumento adicional do nutriente (Figura 3B). A *iWUE* apresentou comportamentos distintos nas faixas de concentrações de N testada, exibindo um padrão de declínio e elevação de sua eficiência, sendo a maior resposta verificada na maior concentração de N testada (360 mg dm⁻³), com incrementos de 26%, se comparada a ausência de N (Figura 3C). Enquanto que a *A/Ci*, demonstrou resposta linear crescente, atingindo incrementos de 90% (Figura 3D). Respostas quadráticas foram observadas para concentração de clorofila, *E* e *Ci*, com máxima resposta estimada na concentração de 239, 197 e 144 mg dm⁻³ de N, contribuindo 73%, 78% e 3% respectivamente, quando comparada ao tratamento sem N. Já a relação *Ci/Ca* não sofreram alteração com o suprimento de N (Figura 2S).

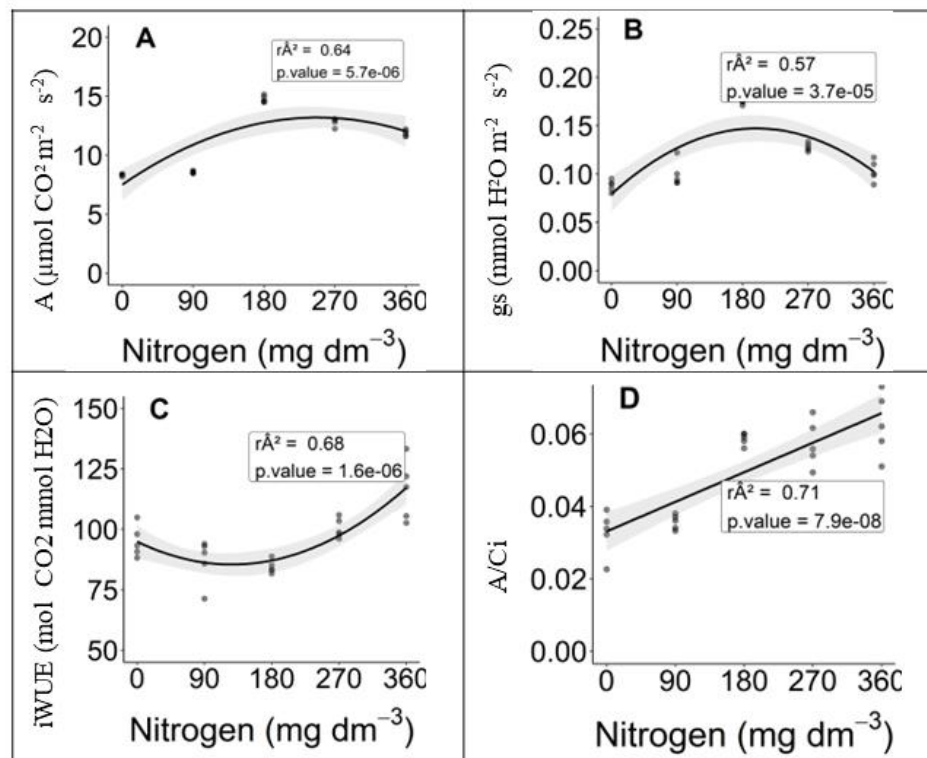


Figura 3. Fotossíntese líquida (A), condutância estomática (B) e eficiência de uso da água (C) e relação A/Ci (D) em plantas de jaborandi submetidas a diferentes concentrações de nitrogênio. Belém, 2023

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⁻³ de N, responsável por incrementos de 58%, se comparada ao tratamento sem N. Na raiz, 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 ao suprimento de N (Figura 4D, E, F; N, O, P; Q, R e S). 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 concentrações estimadas de 244 e 187 mg dm⁻³ de N, com incrementos de 41% e 140%, respectivamente (Figura 4H e L).

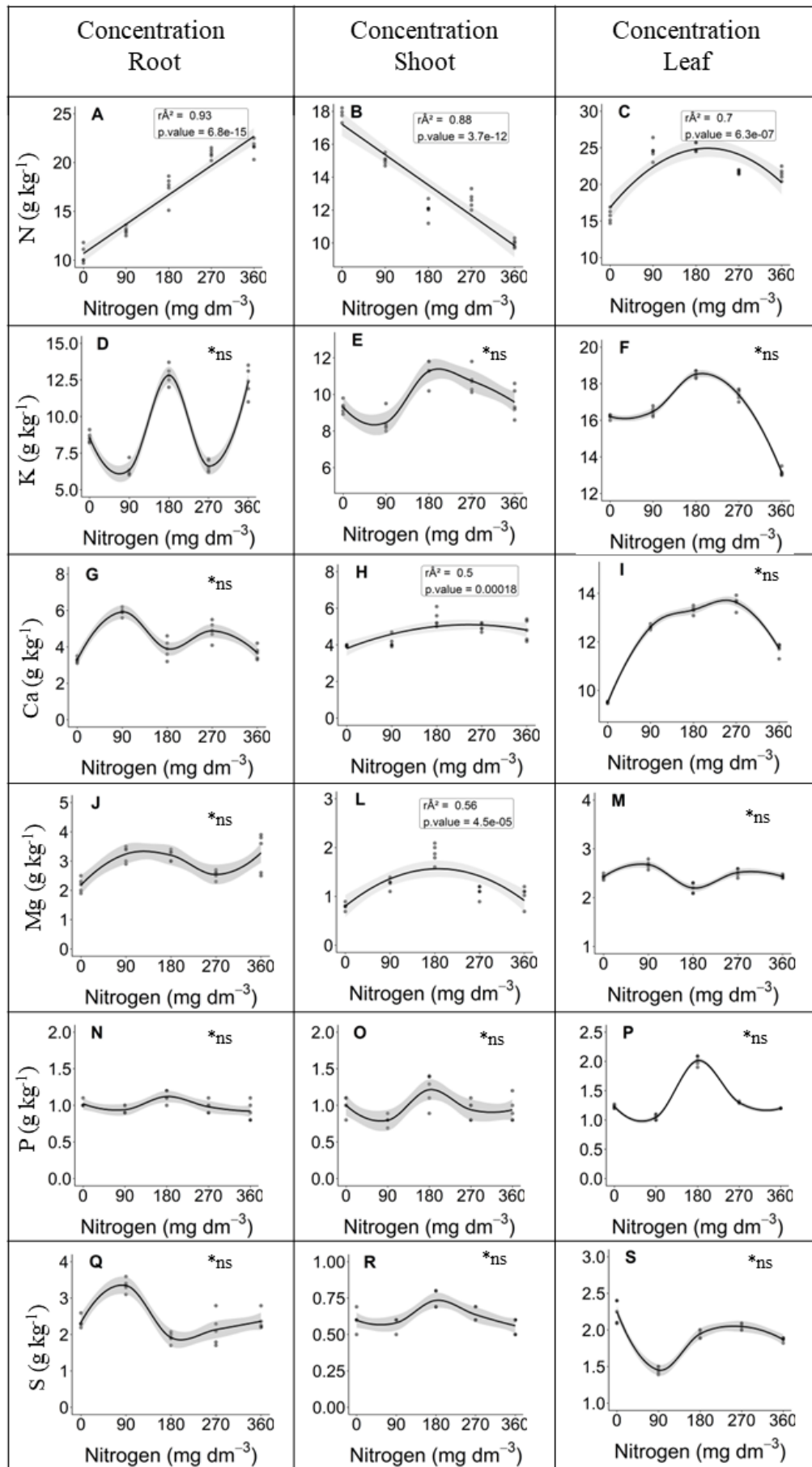


Figura 4. Concentração de N, K, Ca, Mg, P e S em raiz caule e folhas de plantas de jaborandi submetidas a diferentes concentrações de N. Belém,2023.* ns: não significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.

As concentrações dos micronutrientes Fe, Zn e Cu em plantas de jaborandi sofreram alterações significativas pelo nível 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 comportamento distintos com o fornecimento de N, no entanto, as maiores concentrações de Fe observadas foi com a maior aporte de N testado (360 mg dm^{-3}), com incrementos de 26% em relação a ausência 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 concentração estimada de 186 mg dm^{-3} de N, contribuindo com 79% em relação a ausência de N, enquanto que a raiz apresentou curva com resposta linear, obtendo maior acúmulo de Fe com a maior suprimento de N (360 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 concentra estimada de 183 mg dm^{-3} de N, responsável por 121% quando comparada ao tratamento sem N (Figura 5 H).

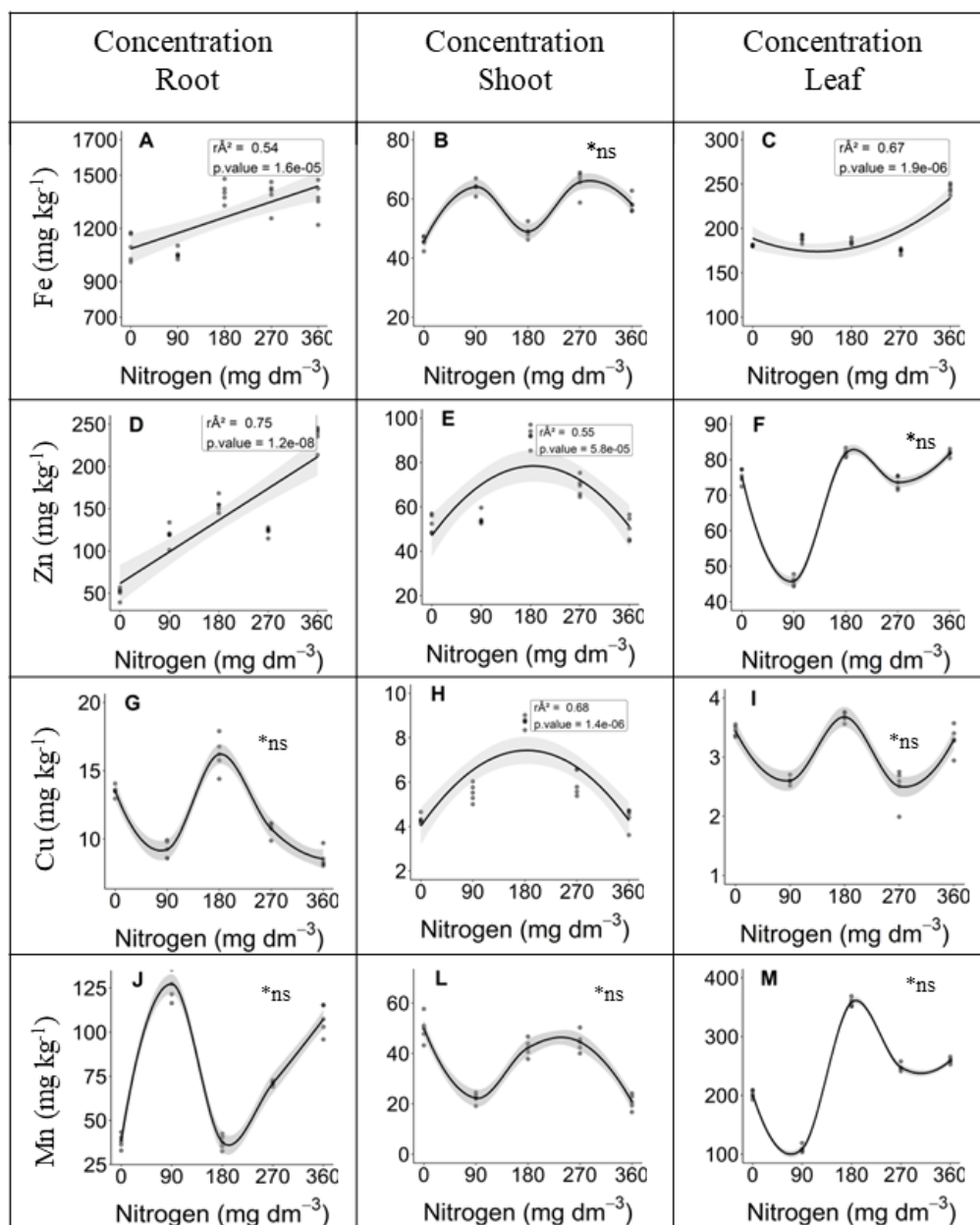


Figura 5. Concentração de Fe, Zn, Cu e Mn em folhas, caule e raízes de plantas de jaborandi submetidas a diferentes concentrações de N. Belém, 2023. *ns: não significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.

DISCUSSÃO

Na literatura é muito difundido o efeito do N no crescimento de plantas, e em todos os estágios de desenvolvimento, dada sua função estrutural em compostos que fazem parte do metabolismo vegetal (Camut et al., 2021; Liang et al., 2022). A administração de N, favoreceu o acúmulo de biomassa sendo atribuída ao desenvolvimento significativo dos parâmetros de crescimento (Singh et al., 2015). As trocas gasosas possivelmente auxiliaram no ganho de biomassa, embora se tenha

observado uma queda em concentrações elevadas de N, para muitas variáveis. Sendo evidenciada pela crescente taxa de eficiência instantânea de carboxilação, indicando consumo de CO₂ e produção de açúcares capazes de promover acúmulo de biomassa.

O alto nível de N beneficiou a maior disponibilidade e absorção do nutriente, que compõe proteínas importante no processo de carboxilação, auxiliando no crescimento na planta (Mu; Chen, 2021). Esse ganho de biomassa não ocasionou redução da concentração de pilocarpina, resultados diferentes de literaturas anteriores que sustentam o desbalanço entre biomassa e biossíntese de alcaloides, como em plantas de *Crassocephalum crepidioides* (Schramm et al., 2021). Para o jaborandi, o incremento de biomassa gerou acúmulo de N, podendo estar relacionado a maior capacidade de fotossíntese (Singh et al., 2015). E também conservando o N, 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 gs 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 CO₂ permanecerá sendo assimilado e consumindo a quantidade de CO₂ interno, embora ocorra o fechamento estomático (Lemos neto et al. 2020).

Neste sentido, concentrações de N variando entre 150 a 200 mg dm⁻³ foram responsáveis pelas maiores taxas de trocas gasosas, contudo, sob abastecimento mais elevado de N não houveram efeitos prejudiciais ao incremento de biomassa, fixação do carbono e teor de pilocarpina. Sugerindo que altas suplementações de N, propostas neste estudo, são capazes de fornecer condições favoráveis ao cultivo de plantas de jaborandi.

A elevada oferta de N além de contribuir para o ganho de biomassa e demais variáveis supracitadas, obteve 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 µg/mg), são superiores que os citados por Avancini et al. (2003), reportando menos que 1 µg/mg de massa seca. Sugerindo que o excesso nitrogenado, testado nesta pesquisa (360 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).

As poucas literaturas encontradas quantificam pilocarpina somente nas folhas, em razão da maior concentração, valor comercial e características de crescimento do jaborandi. Configurando a fonte mais sustentável de manejo e conservação da espécie ameaçada de extinção, neste sentido, a presença de pilocarpina em toda a planta, traz 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 são fatores altamente relacionados ao desenvolvimento e metabolismo de vegetais (Saloner; Bernstein, 2021). O abastecimento, essencialmente, de macronutriente nas folhas sugerem uma demanda em processos vitais em plantas de jaborandi, e o sinergismo do N com moléculas de K (Hou et al., 2019), P (Jiaying et al., 2022) e Ca (Xing et al., 2021), comumente reportados em outras espécies vegetais. 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 (Saloner; Bernstein, 2020; White, 2002; 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 de planta de jaborandi e a biossíntese de pilocarpina. Podendo também ajudar na conservação do teor do alcalóide, como verificadas em plantas de jaborandi cultivadas em solução nutritiva (Avancini et al. 2003). Contudo, neste presente estudo foi evidenciado que o processo de absorção dos nutrientes ocasionados por concentrações nitrogenadas, pode ter beneficiado os processos metabólicos ligados a síntese de pilocarpina.

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 estimuladas pela atividade enzimática e o processo redox, comumente, efetuados por metais (De Jesus et al., 2022; Isah, 2019)

O maior fornecimento de N (360 mg dm^{-3}), 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 uma pequena translocação para as folhas (30%). A maior concentração reportada nessa pesquisa, cerca de 1500 mg kg^{-1} , foram abaixo das encontradas por Jesus et al. (2022), quantificando valores médios de $2.239,13 \text{ mg kg}^{-1}$ de Fe foliar, em plantas de jaborandi coletadas em ambiente natural. Ainda nesta pesquisa foi destacada a relação positiva entre concentração de Fe no solo e produção de pilocarpina, já em nosso presente estudo, a relação entre altos teores de Fe nas plantas e a biossíntese de alcaloides, pode sinalizar 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).

CONCLUSÃO

Elevadas concentrações de N, favorecem maiores rendimentos de biomassa, produção de pilocarpina e absorção de nutrientes (Fe, N, Ca, Mg e Zn). E mesmo que

muitos parâmetros de trocas gasosas tenham sido perturbados, nestas condições (360 mg dm⁻³), as plantas de jaborandi foram capazes de manter os processos metabólicos.

A presença de pilocarpina na planta, nos informa uma tendência do processo biossintético na raiz, potencializada pela presença marcante do ferro e nitrogênio radicular, translocando-se para o local de maior aporte (folhas). Fato ainda não esclarecido por literaturas anteriores e que merece estudos complementares.

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 nitrogênio e ferro para o cultivo do jaborandi.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-MAGEED, T. A. et al. Exogenous Micronutrients Modulate Morpho-physiological 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.
- 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.

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, X.; CHEN, Y. **The physiological response of photosynthesis to nitrogen deficiency. Plant Physiology and Biochemistry** Elsevier Masson s.r.l., , 1 jan. 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.

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 CO₂-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.
- SKIRYCZ, 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^2) da regressão linear de plantas de jaborandi, submetidas a diferentes concentrações de N. Belém, 2023.

Root					
Variáveis	I	A	B	p-valor	R^2
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
Shoot					
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***	-0.0009042***	5.829e-05	0.5504
Mass	3.5408000***	0.0055689***		2.285e-07	0.6816
Pilocarpine	7.280e-02***	1.753e-03***		2.2e-16	0.9838
Leaf					
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

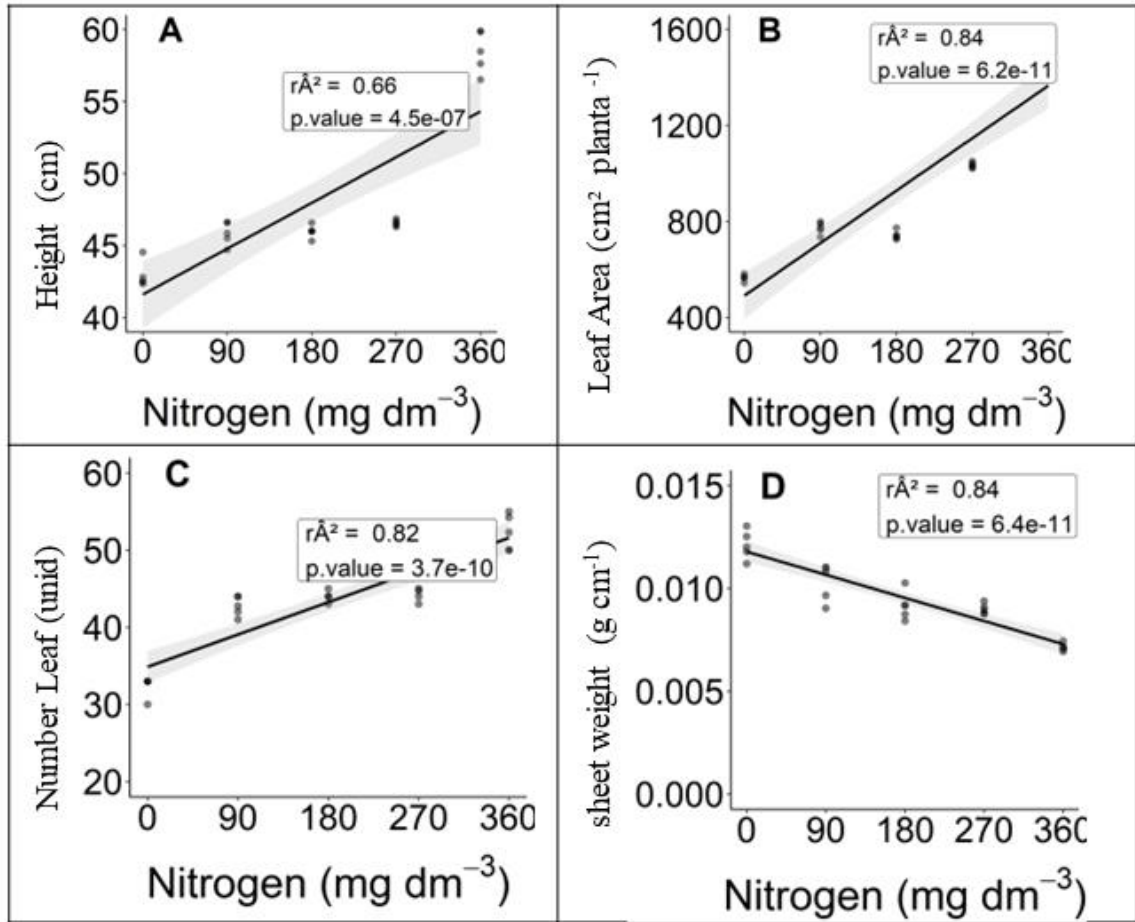


Figura 1S. Altura(A), Área foliar (B), número de folhas (C) e peso específico da folha (D), de plantas de jaborandi submetidas a diferentes concentrações de nitrogênio. Belém,2023.

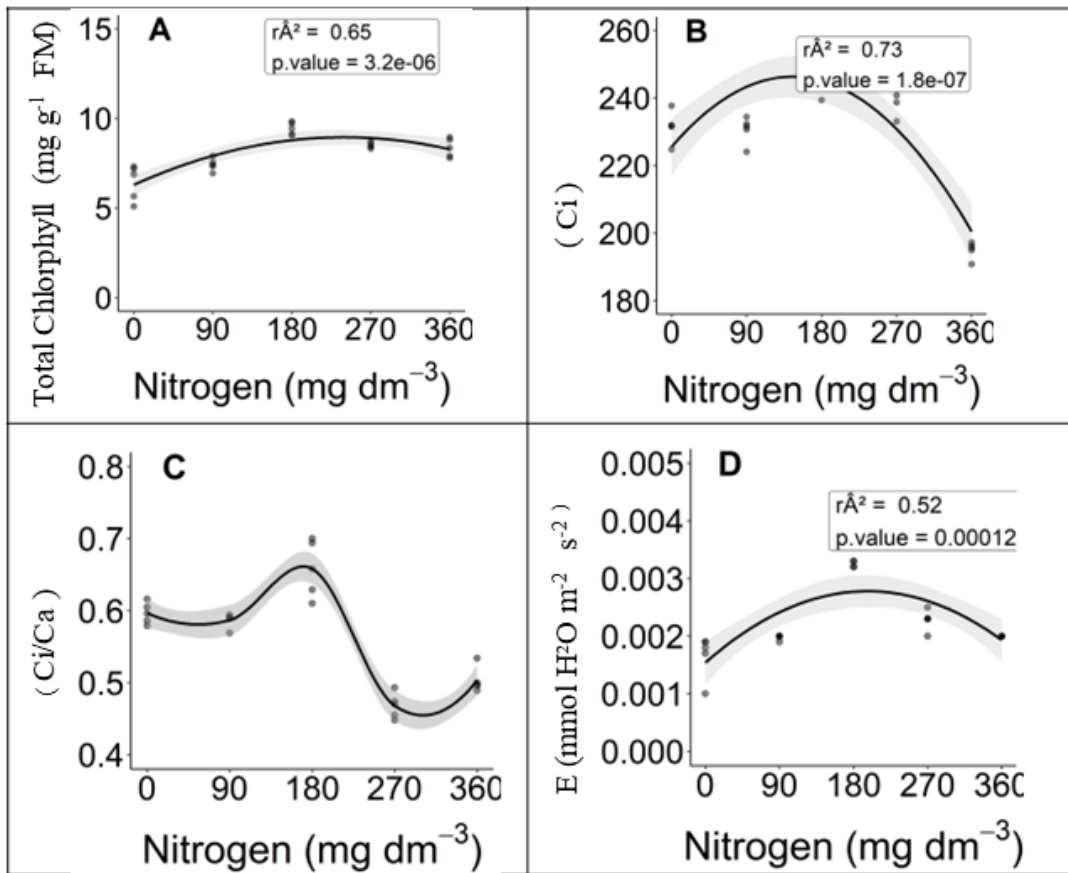


Figura 2S. Clorofila total(A), Ci (B), Ci/Ca (C) e transpiração (D) de plantas de jaborandi submetidas a diferentes concentrações de nitrogênio. Belém,2023. *ns: não significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.