



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

**Crescimento vegetativo e fitoquímica de *Zephyranthes irwiniana* (Ravenna) Nic. García
cultivada *in vitro* e em casa de vegetação**

Bertholdo Dewes Neto

Brasília, 20 de dezembro de 2023



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

Bertholdo Dewes Neto

**Crescimento vegetativo e fitoquímica de *Zephyranthes irwiniana* (Ravenna) Nic. García
cultivada *in vitro* e em casa de vegetação**

Dissertação de mestrado
submetida ao Departamento de
Botânica da Universidade de
Brasília como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre
em Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Christopher
William Fagg

Coorientadora: Dra. Kicia Karinne
Pereira Gomes-Copeland

Brasília, 20 de dezembro de 2023

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

Bertholdo Dewes Neto / Matrícula: 020/111060

**Crescimento vegetativo e fitoquímica de *Zephyranthes irwiniana* (Ravenna) Nic. García
cultivada *in vitro* e em casa de vegetação**

Banca examinadora:

Prof. Christopher Willian Fagg, PhD

Presidente da Banca (BOT-UnB)

João Dutra Victor Gomes, PhD

Membro interno da Banca Examinadora

Cláudia Masrouah Jamal, PhD

Membro externo da Banca Examinadora

Cristiane da Silva Ferreira, PhD

Membro suplente da Banca Examinadora

Brasília, 20 de dezembro de 2023

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo a Deus e seus fiéis trabalhadores do bem, que por inúmeras vezes cuidaram de mim por amor.

A minha esposa, meu filho e meus familiares, que viveram e compartilharam todas as minhas experiências ao longo dessa jornada.

Ao meu orientador Christopher William Fagg que com seu enorme coração abraçou o ser humano que sou e se dispôs a dar tudo o que precisei.

A minha coorientadora Kicia Karinne Pereira Gomes-Copeland que muito contribuiu com seus conhecimentos acadêmicos.

A todos os funcionários e professores da UnB que de alguma forma contribuíram para realização desse estudo, em especial as técnicas dos laboratórios, a professora Damaris Silveira e Sueli Maria Gomes.

Ao Departamento de Botânica e seus membros, por compartilharem suas experiências e dedicaram seu tempo ao ensino de tantos.

Aos Laboratório de Produtos Naturais e Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ciências da Saúde – UnB, seus membros e alunos de pós-graduação, que me ajudaram e cederam o espaço necessário para realizar a pesquisa.

Aos membros da banca que disponibilizaram tempo e dedicação para contribuir com esse trabalho.

Ao CNPq, FAPDF e aos recursos financeiros da pós-graduação da UnB.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuem para que a ciência brasileira possa dar muito mais do que recebe.

“As pessoas educam para a competição e esse é o princípio de qualquer guerra. Quando educarmos para cooperarmos e sermos solidários uns com os outros, nesse dia estaremos a educar para a paz.”

Maria Montessori

RESUMO

A família Amaryllidaceae J. St.-Hil. é conhecida pelo potencial ornamental e pela capacidade de sintetizar diversos alcaloides, como a galantamina, um potente medicamento utilizado no tratamento dos sintomas da Doença de Alzheimer - DA. No entanto, algumas espécies dessa família possuem baixa taxa de multiplicação e estão em situação de vulnerabilidade ou risco de extinção. Diante desse conjunto de fatores, é importante o desenvolvimento de métodos de propagação sustentáveis para domesticação, produção de biomassa e metabólitos secundários de Amaryllidaceae. O objetivo desse trabalho foi analisar, pela primeira vez, o crescimento vegetativo e a fitoquímica de compostos potenciais para o tratamento da DA, em resposta às variações da concentração de sacarose e do uso do carvão ativado no meio de cultura, da espécie *Zephyranthes irwiniana* (Ravenna) Nic. García, propagada por semente, *in vitro* e em casa de vegetação. Após 120 dias da germinação *in vitro*, os bulbilhos resultantes foram separados em 6 tratamentos (T1-T6) e colocados em meio básico MS (4,4 gL⁻¹) e Phytigel (1,5gL⁻¹) para um segundo cultivo, onde os tratamentos T1-T2, T3-T4, e T5-T6, foram suplementados, respectivamente, com 30gL⁻¹, 45gL⁻¹ e 60gL⁻¹ de sacarose, e os tratamentos T2, T4 e T6, com 1,0gL⁻¹ de carvão ativado. Foi utilizado ANOVA e teste de Tukey (5%) para análises estatísticas. Após 150 dias do segundo cultivo *in vitro* e 270 dias do cultivo em casa de vegetação, constatou-se que o incremento de biomassa dos indivíduos cultivados em casa de vegetação foi superior aos indivíduos cultivados *in vitro*, no entanto, tiveram os menores rendimentos de extração etanólica. No cultivo *in vitro*, o aumento da concentração de sacarose influenciou positivamente no aumento da biomassa seca e fresca, e no número de raízes, não influenciando o número de folhas e tamanho das folhas e raízes. O carvão ativado (CA) influenciou positivamente no tamanho das folhas e das raízes, e negativamente no número de raízes, não influenciando o incremento de biomassa fresca e seca, nem o número de folhas. As análises por CG-EM indicaram grande variação na abundância de α -terpenil-acetato, linoleato de etila, clionasterol e licorina entre os tratamentos, sendo as concentrações máximas foram, respectivamente, 53,06% (Folha, T2), 38,68% (Bulbo, T7), 14,34% (Raiz, T6) e 2,57% (Folha, T5). Testes de histolocalização utilizando o reagente de Dragendorff indicaram a presença de alcaloides no clorênquima das folhas, principalmente nos bordos foliares, e nos catafilos dos bulbos, próximos a epiderme voltada para parte externa do bulbo. Por fim, o presente estudo forneceu novas evidências de que a constituição do meio de cultura influencia diretamente e é eficaz para obter melhores resultados no crescimento vegetativo e na fitoquímica.

Palavras-chave: Alzheimer, Amaryllidaceae, carvão ativado, sacarose

ABSTRACT

The Amaryllidaceae J. St.-Hil. Family is known for its ornamental potential and ability to synthesize several alkaloids, such as galantamine, a potent medication used to treat the symptoms of Alzheimer's Disease - AD. However, some species of this family have a low rate of multiplication and are vulnerable or at risk of extinction. Given these factors, it is important to develop sustainable propagation methods for domestication, biomass and secondary metabolites production of Amaryllidaceae. The objective of this work was to analyze, for the first time, the vegetative growth and phytochemistry of potential compounds for the treatment of AD, in response to variations in sucrose concentration and the use of activated carbon in the culture medium of the species *Zephyranthes irwiniana* (Ravenna) Nic. García, propagated by seed, *in vitro* and in a greenhouse. After 120 days of *in vitro* germination, the resulting bulbils were separated into 6 treatments (T1-T6) and placed in basic medium MS (4.4 gL⁻¹) and Phytigel (1.5gL⁻¹) for a second culture, where the treatments T1-T2, T3-T4, and T5-T6 were supplemented, with 30gL⁻¹, 45gL⁻¹ and 60gL⁻¹ of sucrose, respectively, and treatments T2, T4 and T6, with 1.0gL⁻¹ of activated charcoal ANOVA and Tukey's test (5%) were used for statistical analyses. After 150 days of the second *in vitro* cultivation and 270 days of the cultivation in a greenhouse, it was observed that the biomass increases of the individuals grown in a greenhouse was higher than the individuals cultivated *in vitro*, however, they had the lowest ethanolic extraction yields. *In vitro* cultivation, the increase in sucrose concentration positively influenced the increase in dry and fresh biomass, and in the number of roots, not influencing the number of leaves and size of leaves and roots. Activated charcoal (AC) had a positive influence on leaf and root size, and a negative influence on the number of roots, not influencing the increase of fresh and dry biomass, nor the number of leaves. GC-MS analyses indicated great variation in the abundance of α -terpenyl-acetate, ethyl linoleate, clionasterol and lycorine between treatments, with the maximum concentrations was 53.06% (Leaf, T2), 38.68% (Bulb, T7), 14.34% (Root, T6) and 2.57% (Leaf, T5), respectively. Histolocalization tests using the Dragendorff reagent indicated the presence of alkaloids in the chlorenchyma of the leaves, mainly on the leaf edges, and in the cataphylls of the bulbs, close to the epidermis facing the outer part of the bulb. Finally, the present study provided new evidence that the constitution of the culture medium directly influences and is effective to obtain better results in vegetative growth and phytochemistry.

Keywords: Alzheimer's, Amaryllidaceae, activated charcoal, sucrose

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Zephyranthes irwiniana</i> (Ravenna) Nic. García.	5
Figura 2: Estrutura básica dos alcaloides (benzyl-1-phenylethylamine) (JIN; YAO, 2019).....	10
Figura 3: Sementes da espécie <i>Zephyranthes irwiniana</i> (Ravenna) Nic. García.....	11
Figura 4: Germinação de sementes em casa de vegetação.	12
Figura 5: Germinação de sementes <i>in vitro</i>	13
Figura 6: Cultivo <i>in vitro</i>	14
Figura 7: Metodologia do cultivo <i>in vitro</i>	17
Figura 8: Indivíduos após colheita.....	19
Figura 9: Dados das condições de cultivo em casa de vegetação.....	23
Figura 10: Biomassa seca	26
Figura 11: Biomassa fresca.....	27
Figura 12: Sacarose x biomassa fresca	28
Figura 13: Sacarose x biomassa seca.....	28
Figura 14: Número de raízes.....	29
Figura 15: Comprimento da maior folha	33
Figura 16: Comprimento da maior raiz	34
Figura 17: Número de folhas	35
Figura 18: Gráfico de percentagem de rendimento da extração etanólica por tratamento	36
Figura 19: Teste de Tukey (5%): diferença entre as médias dos rendimentos % do bulbo, folha e raiz.	38
Figura 20: Extratos etanólicos brutos. (a) Folha, (b) bulbo e (c) raiz.....	38
Figura 21: Estrutura química dos compostos selecionados	40
Figura 22: Espectro de massa do α -terpenil-acetato	42
Figura 23: Abundância relativa do α -terpenil acetato de cada extrato etanólico.....	43
Figura 24: Pico do composto α -terpenil acetato no cromatograma de cada extrato etanólico.	43
Figura 25: Espectro de massa do linoleato de etila.....	44
Figura 26: Abundância relativa do linoleato de etila de cada extrato etanólico.....	45
Figura 27: Pico do composto linoleato de etila no cromatograma de cada os extrato etanólico.	45
Figura 28: Espectro de massa do clionasterol.....	46
Figura 29: Abundância relativa do clionasterol de cada extrato etanólico.....	47
Figura 30: Pico do composto clionasterol no cromatograma de cada extrato etanólico.	47

Figura 31: Espectro de massa da licorina.	48
Figura 32: Pico do composto licorina no cromatograma de cada o extrato etanólicos do bulbo e da folha.	48
Figura 33: Folha da espécie <i>Z. irwiniana</i> em detalhes (secção transversais)	50
Figura 34: Folha da espécie <i>Z. irwiniana</i> (secção transversais)	51
Figura 35: Bulbo da espécie <i>Z. irwiniana</i> (secção transversais)	51
Figura 36: Bulbo da espécie <i>Z. irwiniana</i> em detalhes (secção transversais)	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição dos meios de cultura por tratamento.	15
Tabela 2: Dados do cultivo.	24
Tabela 3: Tabela de resultados da análise de variância (ANOVA) e dos testes de Tukey (5%) e Scott-Knott (5%).	31
Tabela 4: Tabela de rendimento da extração etanólica do bulbo, folha e raiz de cada tratamento...	37
Tabela 5: Compostos identificados nos cromatogramas dos extratos etanólicos.	41
Tabela 6: Intensidade da reação histoquímica nas folhas e bulbos frescos da <i>Zephyranthes irwiniana</i>	53

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE – Acetilcolinesterase

BuChE – Butirilcolinesterase

CA – Carvão ativado

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CIT – Corrente iônica total

DA – Doença de Alzheimer

EtOH – Etanol

FDA – *Food and Drug Administration*

IPCC – *Intergovernmental Panel on Climate Change* (Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas)

IR – Índice de Retenção (Kovats)

IUCN – *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources* (União Internacional para Conservação da natureza)

MeOH – Metanol

MS – Meio de cultura Murashige e Skoog

NaOCl – Hipoclorito de Sódio

PVC – Policloreto de vinila

VU – Vulnerável

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Família Amaryllidaceae	2
1.2. O gênero <i>Zephyranthes</i> e a espécie <i>Zephyranthes irwiniana</i> (Ravenna) Nic. García	3
1.3. Propagação da <i>Zephyranthes irwiniana</i> (Ravenna) Nic. García em sistemas artificiais.....	6
1.4. Influência do método de propagação na fitoquímica de Amaryllidaceae	8
1.5. Alcaloides da família Amaryllidaceae	9
2. METODOLOGIA	11
2.1. Material vegetal.....	11
2.2. Germinação e cultivo em casa de vegetação.....	11
2.3. Germinação <i>in vitro</i>	12
2.4. Micropropagação dos bulbilhos	13
2.5. Análise estatística.....	15
2.5.1. Características avaliadas.....	18
2.5.2. Extração Química e CG-EM	20
2.5.2.1. Preparo do material vegetal	20
2.5.2.2. Extração química dos compostos.....	20
2.5.2.3. Análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).....	21
2.5.2.4. Histolocalização de alcaloides na folha e no bulbo	21
2.5.3 Análise estatística	22
3. RESULTADOS	22
3.1. Propagação em casa de vegetação	22

3.2. Propagação <i>in vitro</i>	25
3.2.1. Influência da sacarose e do carvão ativado	25
3.2.2. Extração.....	36
3.2.3. Perfil fitoquímico CG-EM	39
3.2.3.1. α -terpenil acetato	42
3.2.3.2. Linoleato de etila	44
3.2.3.3. Clionasterol.....	46
3.2.3.4. Licorina.....	48
3.2.4. Histolocalização de alcaloides na folha e no bulbo.....	49
4. DISCUSSÃO	53
4.1. Influência da sacarose e do carvão ativado no crescimento vegetativo.....	53
4.2. Influência da sacarose e do carvão ativado na fitoquímica.....	56
4.3. Histolocalização dos alcaloides na folha e bulbo.....	60
5. CONCLUSÃO	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
7. ANEXOS	74
7.1. CROMATOGRAMAS.....	74
7.1.1. Folha.....	74
7.1.2. Bulbo	76
7.1.3. Raiz.....	78
7.2. MANUSCRITO	740

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais e os compostos diretamente derivados continuam a desempenhar um importante papel na descoberta e desenvolvimento de medicamentos (NEWMAN; CRAGG, 2016) e a influência desses compostos é muito significativa, especialmente nas áreas das doenças infecciosas e Doença de Alzheimer - DA (JIN; YAO, 2019). O Alzheimer é uma doença neurodegenerativa e a causa mais comum da demência, caracterizada pela perda de memória, principalmente em lembrar de informações aprendidas recentemente, juntamente com o fracasso em adquiri-las (NG; OR; IP, 2015; AKILO *et al.*, 2018). Existem algumas hipóteses, que associadas umas às outras, procuram explicar as causas da DA (AKILO *et al.*, 2018). Uma delas é a hipótese colinérgica, que propõe que a DA é causada pelo resultado da redução da síntese do neurotransmissor acetilcolina no cérebro (CONTESTABILE, 2011), baseada na descoberta de que uma perda na atividade colinérgica é comumente observada em pacientes com DA (CRAIG; HONG; MCDONALD, 2011). Essa redução da acetilcolina está fortemente correlacionada com as perdas das funções cognitivas, e teoricamente, processos que inibem a ação da enzima acetilcolinesterase (AChE), que quebra a molécula da acetilcolina, deveriam resultar no aumento da memória e da cognição em pacientes com DA (CRAIG; HONG; MCDONALD, 2011). No entanto, estudos posteriores demonstraram que as atividades de inibição da AChE falharam em curar a DA, mas o uso de alcaloides provenientes de plantas da família Amaryllidaceae, principalmente a galantamina, demonstraram-se potentes medicamentos ao atenuar os sintomas da doença (NG; OR; IP, 2015).

A família Amaryllidaceae, além de ser conhecida pelo potencial ornamental, destaca-se pela capacidade de sintetizar diversos alcaloides. Devido essa propriedade e da limitação da ação do alcaloide galantamina, que é efetiva apenas nos estágios leves a moderado da DA, o desenvolvimento de pesquisas para detectar novos inibidores de AChE em Amaryllidaceae, ou potencializar os já conhecidos, é incentivado e muito importante (CORTES *et al.*, 2015a). Ainda, algumas espécies dessa família são pouco representadas, possuem baixa taxa de multiplicação (ZARAGOZA-PUCHOL *et al.*, 2021) e estão em situação de vulnerabilidade ou risco de extinção (IUCN, 2022), devido ao avanço de atividades que, dentro outras, alteram a cobertura do solo em áreas de ocorrência natural, o que torna urgente o desenvolvimento de pesquisas que visam a conservação e preservação dessas espécies. A exemplo disso, tem-se a espécie *Zephyranthes irwiniana* (Ravenna) Nic. García, que não possui estudos sobre propagação nem fitoquímica, e ainda, compõe a Lista de Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção, classificada com vulnerável (VU), conforme a Portaria MMA nº 148, de 7 de junho de 2022 (BRASIL, 2022).

Nesse cenário atual, é importante o desenvolvimento de métodos de propagação *in vitro* para domesticação e produção de biomassa de Amaryllidaceae (ZARAGOZA-PUCHOL *et al.*, 2021), que

possuem características fitoquímicas desejáveis, principalmente em relação a biossíntese de compostos que possuam potencial para tratar a DA. Em estudos recentes com espécies de Amaryllidaceae, foi observado que os métodos de propagação podem alterar a fitoquímica, sendo mais comuns, aqueles que variam a concentração da sacarose no meio de cultura na cultura de tecidos (KOIRALA *et al.*, 2022). No entanto, a cultura de tecidos demanda um maior aporte de recursos por possuir protocolos e infraestrutura mais complexa (DATTA; CHAKRABORTY; JANAKIRAM, 2017), o que estimula a busca por métodos de propagação com melhor custo-benefício que produzam, os mesmos ou melhores, resultados esperados para o composto ou espécie alvo, por exemplo, a propagação por sementes.

Diante desse conjunto de fatores, o objetivo desse trabalho foi analisar, pela primeira vez, o crescimento vegetativo e a fitoquímica de compostos potenciais para o tratamento da DA, em resposta às variações da concentração de sacarose e do uso do carvão ativado no meio de cultura, da espécie *Zephyranthes irwiniana*, propagada por semente, *in vitro* e em casa de vegetação. Os resultados apresentados nesse trabalho poderão contribuir com os estudos futuros, fornecendo evidências de que as variações do meio de cultura nele utilizado, podem influenciar na fitoquímica, e conseqüentemente, aprimorar a biossíntese de compostos de interesse.

1.1. Família Amaryllidaceae

A família Amaryllidaceae J. St.-Hil. apresenta distribuição cosmopolita (MEEROW; SNIJAM, 1998) principalmente nas regiões subtropicais e tropicais (AMARAL-LOPES; CAVALCANTI, 2015), sendo esta última predominante (MEEROW *et al.*, 2000), ocupando diferentes habitats. A família apresenta dois centros de diversidade localizados na África do Sul e na região Andina (MEEROW; SNIJAM, 1998), e alguns gêneros distribuídos no Mediterrâneo e em regiões temperadas da Ásia (BASTIDA; LAVILLA; VILADOMAT, 2006).

Ito *et al.* (1999) sugerem que a família surgiu na África e em seguida difundiu-se para outros continentes, sendo a América do Sul o centro secundário de diversidade, migrando posteriormente para a América do Norte (MEEROW *et al.*, 2000) pelo istmo do Panamá (GENTRY, 1982; GRAHAM, 1995; RAVEN; AXELROD, 1974) ou pelas ilhas do Caribe (MEEROW *et al.*, 2000). No Brasil, a família está representada por cerca de 13 gêneros, 132 espécies e duas variedades, e o bioma Cerrado, por 28 espécies distribuídas em 5 gêneros (FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2022).

A classificação taxonômica mais recente divide-se em três subfamílias: Agapanthoideae Endl., Allioideae Herb. e Amaryllidoideae Burnett (CHASE; REVEAL; FAY, 2009),

compreendendo 82 gêneros (WFO, 2022) e cerca de 1100 espécies (JIN; YAO, 2019). No entanto, muitas alterações taxonômicas foram realizadas desde a descrição da família, de forma que ainda não há um modelo estável, limites precisos, bem definidos e difundidos no meio científico, havendo controvérsias entre autores quanto a quantidade de gêneros (AMARAL-LOPES; CAVALCANTI, 2015).

A principal importância econômica da família é o uso ornamental, comumente chamada de “amarilis”, incluindo variedades como *Narcissus pseudonarcissus* L., *Galanthus nivalis* L. e *Leucojum aestivum* L. que possuem flores altamente vistosas (BASTIDA; LAVILLA; VILADOMAT, 2006) e de importância significativa para a indústria da floricultura (NAIR; VAN STADEN, 2013).

Outra importância é o reconhecido potencial medicinal. As plantas dessa família têm sido usadas como fitoterápicos por milhares de anos e os alcaloides dos seus extratos são objetos de investigação química há aproximadamente 200 anos (BASTIDA; LAVILLA; VILADOMAT, 2006). Segundo Nair e Staden (2013), mais de 50 táxons são conhecidos por seu uso contra doenças infecciosas e talvez um número ainda maior são usados na remediação de condições inflamatórias.

Até o ano de 2017, mais de 600 estruturas diversas de alcaloides foram isoladas de plantas de Amaryllidaceae, onde descobriu-se possuir uma grande variedade de atividades biológicas, incluindo antitumorais, bactericidas, antifúngicas, antimaláricas, antivirais, analgésicas e inibidoras de atividades colinesterásicas (JIN; YAO, 2019).

1.2. O gênero *Zephyranthes* e a espécie *Zephyranthes irwiniana* (Ravenna) Nic. García

García e Meerow (2019) descreveram o gênero *Zephyranthes* apresentando estigma trífido a obscuramente trilobado (excepcionalmente capitado em *Zephyranthes capitata*, mas depois vermelho perigônio e tubular e *Hippeastrum mirum*, mas depois escapa com um única flor séssil); paraperigone geralmente um anel de fímbrias, mas às vezes ausentes; número cromossômico geralmente $2n = 12, 18, 22$ (excepcionalmente $2n = 16$ em alguns populações de *Zephyranthes bifida*) e poliplóides variações desses números, mais frequentemente múltiplos de 6; tépalas geralmente com menos de 6 cm de comprimento; válvulas espata também fundido em um tubo ou solto da base; número cromossômico $2n = 12, 18$ (raramente $2n = 14, 16$) e múltiplos de 6 e 9. Ainda, dividiram em cinco subgêneros, *Z.* subg. *Zephyranthes*, *Z.* subg. *Eithea*, *Z.* subg. *Habranthus*, *Z.* subg. *Myostemma* e *Z.* subg. *Neorhodophiala*.

Atualmente, esse gênero possui aproximadamente 173 espécies, das quais 150 pertencem ao subgênero *Zephyranthes*, que está amplamente distribuído na região Neotropical, ocorrendo também em regiões subtropicais a temperadas, de centro da Argentina até o sul dos Estados Unidos e ainda, nas Ilhas caribenhas (GARCÍA: MEEROW, 2019).

García e Meerow (2019) descrevem esse subgênero apresentando plantas com 4–50 cm de altura. Bulbo globoso ou ovóide, às vezes oblongo-piriforme. Folhas geralmente anuais, às vezes persistente, geralmente linear, raramente lorado, canaliculado ou plana, às vezes carnuda, vários tons de verde, às vezes glauco ou pruinoso, venação paralela, 10–30(–60) cm de comprimento, (1–)2–9(–13) mm de largura, ápice atenuado-agudo obtuso ou arredondado. Escapo fistuloso, cilíndrico a filiforme, 2–30 cm de comprimento, às vezes completamente subterrâneo na antese e incluído no pseudopesco do bulbo, 1–6 mm de largura abaixo da espata, às vezes pruinose. Válvulas espata 2 com margens fundido a partir da base em um tubo de vários comprimentos, membranoso, marcescente, bífida ou fenestrada em direção ao ápice, às vezes inteiro, 0,8–3(–5,5) cm de comprimento. Inflorescência de flor única, raramente com 2 flores, flores subtendidas por um filiforme-lanceolado bractéola. Flores ligeiramente a fortemente zigomorfas ou actinomórfico, acenando para patente, geralmente pedicelado, pedicelo até 6 cm de comprimento, às vezes sésseis. Périgo amplamente infundibuliforme a hipocrateriforme ou campanulado a rotáceo, raramente aparecendo labiado com três tépalas superiores refletidas e os três inferiores declinam e se contorcem proximalmente, formando um pseudolabelo, que envolve os estames e o estilete; tépalas oblanceolado a elíptico ou oval, raramente estreito e lanceolado ou falcado, geralmente branco a rosa, menos frequentemente amarelo ou vermelho, raramente lilás, às vezes listrado ou com base basal clara a escura, (0,6–)2–5(–7) cm de comprimento, (2–)4–13(–16) mm de largura, quase livre para a base para se conectar formando um tubo geralmente de 2–4 mm longo, mas até 13 cm de comprimento, portanto obsoleto para representar mais de $\frac{3}{4}$ do comprimento da flor, ápice refletido para reto. Parapérigo, se presente, um anel fimbriado com 0,3–2 mm de comprimento. Filamentos geralmente filiforme, declinado-ascendente e 4-seriado, ou reto e 2 seriados, às vezes ambas as séries do mesmo comprimento. Estigma obscuramente trilobado (isto é, capitato-trilobado) a trifido, cada um lóbulo <0,5–4(–7) mm de comprimento. Cápsula globosa-tricocósa, às vezes lateralmente ou apicalmente deprimido. Sementes semielípticas a quase triangular, plano, às vezes com asas oblíquas, papiráceo, preto. $2n = 12, 14, 20, 24, 28, 30, 32, 36, 38, 48, 54, 60, 72, 110$ e outras variantes.

A espécie *Zephyranthes irwiniana* (Ravenna) Nic. García (FIGURA 1) pertence ao subgênero *Zephyranthes* e, recentemente, teve seu nome alterado por García *et al.* (2019) e García e Meerow (2020), identificada anteriormente por *Habranthus irwinianus* Ravenna. Alguns autores já apontavam uma grande dificuldade de separar morfologicamente os gêneros *Habranthus* e *Zephyranthes*

(AMARAL-LOPES; CAVALCANTI, 2015; DUTILH; ASSIS, 2005), devido à similaridade na estrutura floral, ocorrência simpátrica e falta de caracteres satisfatórios para separar os dois gêneros (AMARAL-LOPES; CAVALCANTI, 2015). Amaral-Lopes e Cavalcanti (2015) descrevem a espécie apresentando bulbos globosos, 1,5–2,2 × 1–2,5 cm, colo 7–25 mm compr. Folhas verdes, com base vinácea, filiformes, ca. 15 × 0,1 cm, ápice agudo; nervuras ca. 10. Escapos (4,5–)6–15(–24) × 0,1–0,3 cm; brácteas vináceas, 1,7–3,3 cm compr.; bractéolas quando presentes filiformes; pedicelo verde-vináceos, 1,5– 3,5(–5) cm compr. Flores infundibuliformes, 3-5 cm compr.; tubo do hipanto 1,5–3(–4) mm compr.; tépalas róseas a lilases, oblanceoladas; verticilo externo com 15–20(–23) nervuras principais, ápice agudo, região papilar em faixa longitudinal, distribuindo-se por todo o ápice; tépala superior sem cintura, 2,3–3,9(–5,3) × 0,5–1,2 cm, tépalas laterais inferiores 2,5–4,2(–4,8) × (0,5–)0,8–1,5 cm; verticilo interno com 6–13 nervuras principais, ápice agudo; tépalas laterais superiores 2,1–3,6(–5) × 0,3–0,7(–1,4) cm, tépala inferior 2,1–3,9 (–5,4) × 0,3–0,6(–1) cm; paraperigônio presente, formado por segmentos setiformes eretos, pareados e flanqueando os filetes na base; filetes em 4 comprimentos diferentes, anteras oblongas, 2-4 mm compr.; ovário fortemente oboval; estigma trilobado. Fruto não visto. Segundo Dutilh *et al.* (2022), o fruto é obovóide comprimido, ca. 1,2 cm diâm, e as sementes elípticas, ca. 4 mm compr.

Z. irwiniana é facilmente reconhecida pelas flores com tépalas rosa ou lilás, apêndices setiformes eretos e pelas folhas filiformes. Está distribuída pela região sul da Cadeia do Espinhaço, nas proximidades de Belo Horizonte, com disjunções na Serra da Canastra e Ibitipoca, geralmente em campos areno-pedregosos ligados a solos ferrosos, com canga (DUTILH *et al.*, 2022). Ainda, segundo Amaral-Lopes e Cavalcanti (2015), a espécie também está distribuída na Bahia, Goiás, Pernambuco, São Paulo e Minas Gerais, em formações de campo, campo limpo e cerrado rupestre, principalmente em solos-pedregosos, entre 500-1500 metros de altitude. Pereira *et al.* (2022) atesta também a ocorrência da espécie no Tocantins e no Maranhão.



Figura 1: *Zephyranthes irwiniana* (Ravenna) Nic. García.

1.3. Propagação da *Zephyranthes irwiniana* (Ravenna) Nic. García em sistemas artificiais

Além da produção de alimentos, as plantas são usadas desde a antiguidade em todas as partes do mundo, devido suas propriedades medicinais e atualmente, aproximadamente 80% da população mundial depende de compostos derivados de plantas para a manutenção da saúde e bem-estar (CHANDRAN *et al.*, 2020). Esse aumento da demanda pelos produtos naturais tem resultado na necessidade de encontrar estratégias para potencializar a produção de bioativos sem afetar as populações nativas de espécies (ATANOSOV *et al.*, 2015).

Por outro lado, as estratégias de produção convencionais, como a produção em campos abertos, contribuem para a conversão do uso do solo, retirando a vegetação nativa para produção de algumas poucas espécies, e essa conversão permanente de paisagens naturais, para produção em larga escala de grãos ou pastagens, altera o clima regional por meio dos seus efeitos no equilíbrio energético e hídrico (FOLEY *et al.*, 2005). Além disso, essa rápida conversão de terras ameaça a implementação de importantes serviços ecossistêmicos e tem um alto custo ambiental, incluindo a fragmentação, perda da biodiversidade, espécies invasoras, erosão, poluição da água e do solo (KLINK; MACHADO, 2005).

Nas últimas décadas, as savanas tropicais de todo o mundo estiveram entre os biomas mais afetados pela supressão da vegetação nativa e o Cerrado está ficando mais seco e quente devido a essa perda de *habitat* (HOFMANN *et al.*, 2021). Segundo Borghetti *et al.* (2021), as temperaturas sazonais são os primeiros determinantes da extensão do Cerrado e uma mudança nesse padrão pode impactar significativamente o potencial germinativo de espécies nativas, e conseqüentemente, a regeneração da vegetação, causando perdas irreparáveis nesse bioma que foi identificado como um hotspot dos mais ricos e mais ameaçados do mundo (MITTERMEIER *et al.*, 1999).

O Relatório Especial do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas - IPCC de 2018, estimou que a mudança na média global da temperatura superficial atingirá 1,5°C acima do nível pré-industrial entre os anos de 2030 e 2052 (IPCC, 2018). Todo esse cenário atual evidencia a necessidade de desenvolver e aprimorar técnicas de produção de plantas, e por isso, pesquisadores desenvolvem e avaliam intensamente as técnicas de propagação em massa objetivando a alta capacidade de produção, viabilidade econômica e responsabilidade ambiental para produção de produtos naturais, dentre eles os alcaloides (PAVLOV *et al.*, 2007; GEORGIEV *et al.*, 2009; JUANVICEDO *et al.*, 2019; PTAK *et al.*, 2020; KOIRALA *et al.*, 2022).

As técnicas de propagação em massa são estratégias biotecnológicas aplicadas como alternativas que substituem a obtenção de produtos naturais por meio do extrativismo, do plantio ou da biossíntese química. Tais estratégias oferecem muitas vantagens, como a produção da espécie ou

composto alvo de forma sustentável, incluindo o cultivo de plantas ou partes delas em sistemas artificiais ou a biologia sintética de hospedeiros heterólogos para produção, isto é, engenharia metabólica (KOIRALA *et al.*, 2022). Ainda, quando comparados ao sistema de produção convencional, permitem o controle dos fatores ambientais como as oscilações diárias e sazonais de temperatura, umidade, incidência luminosa e outros. Esse controle oferece a oportunidade de analisar os efeitos dessas diferentes variáveis na produção de metabólitos secundários (CARBONE *et al.*, 2009).

A propagação *in vitro* é um desses sistemas artificiais e uma importante ferramenta biotecnológica para a produção massiva de plantas (US-CAMAS *et al.*, 2014) que permite a produção de compostos bioativos de plantas sob condições estáveis e controladas num curto período de tempo. As técnicas de cultura *in vitro* de células e tecidos vegetais são as bases de vários programas de micropropagação e melhoramento, sendo importantes ainda para a pesquisa científica (US-CAMAS *et al.*, 2014). Segundo Costa *et al.* (2019), essas técnicas são uma alternativa interessante em estudos de bioprospecção e favoráveis à conservação e não degradação das espécies. Este sistema fornece todos os nutrientes, energia e água, necessários para a planta ou explante crescerem em meio de cultura (PHILLIPS; GARDA, 2019). As composições mais comuns de meios de cultivo foram propostas principalmente por Murashige e Skoog (1962) e Gamborg *et al.* (1968) com os meios MS e B5, respectivamente, a depender dos objetivos inerentes ao estudo, o meio de cultivo poderá ser alterado pela adição de reguladores de crescimento, em estágios particulares do crescimento ou maturação (PHILLIPS; GARDA, 2019), pela alteração na concentração e composição dos componentes do meio basal (GREENWAY *et al.*, 2012), ou ainda, pelo uso de carvão ativado (THOMAS, 2008).

Muitos estudos têm avaliado a influência da composição do meio de cultura no desenvolvimento das plântulas, como a variação do tipo e concentração do carboidrato (THERON; JACOBS, 1996; TAHCHY *et al.*, 2011; JUAN-VICEDO *et al.*, 2019; PTAK *et al.*, 2020; KOIRALA *et al.*, 2022). Os carboidratos que atuam como um importante agente que pode afetar positivamente a biossíntese de metabólitos secundários, e até regulando a expressão de um número significativo de genes (PTAK *et al.*, 2020), sendo a sacarose a fonte de carbono amplamente utilizada nas pesquisas.

Conforme metodologia proposta por Murashige e Skoog (1962), a concentração de sacarose no meio de cultura é de 30gL^{-1} , entretanto, a literatura científica apresenta dados onde foram avaliados os efeitos da variação da concentração do carboidrato no meio de cultura (SELLÉS *et al.*, 1997; TAHCHY *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2019;) em espécies da família Amaryllidaceae, mostrando-se promissores no que diz respeito à produção de metabólitos secundários de interesse. Dados sobre propagação e cultivo de Amaryllidaceae a partir de sementes são escassos e muitos trabalhos que

utilizam sistemas artificiais, optam pela cultura de tecidos de plantas e não pela germinação convencional de sementes (HUANG; OKUBO; UEMOT 1990, BERKOV *et al.* 2021, KHONAKDARI *et al.* 2020, PRIYADHARSHINI; MANOKARI; SHEKHAWAT, 2020).

Outro componente frequentemente utilizado para promover o crescimento e desenvolvimento celular é o carvão ativado (CA), que pode ser atribuído principalmente por sua capacidade adsorção de substâncias inibitórias, no entanto, ele promove uma diminuição na concentração de reguladores de crescimento e outros suplementos orgânicos (THOMAS, 2008). Por fim, ressalta-se que o estudo de propagação de Amaryllidaceae cultivadas em sistemas artificiais tem apresentado resultados positivos na produção de alcaloides (GEORGIEV *et al.*, 2020).

1.4. Influência do método de propagação na fitoquímica de Amaryllidaceae

As plantas que produzem flores possuem uma diversidade incomparável de mecanismos para realizar a reprodução sexuada e assexuada, muitas vezes simultaneamente (BARRETT, 2015). A reprodução sexuada maximiza a diversidade genética, facilitando o melhoramento genético que pode permitir o aumento da produção de alcaloides demandados pela indústria farmacêutica (HERRANZ *et al.*, 2020). Assim, investigar a propagação por sementes e entender o processo germinativo é essencial.

A crescente demanda por produtos de origem vegetal estimulou nas últimas décadas o desenvolvimento de técnicas para a produção em massa de plantas (HUANG; OKUBO; UEMOTO, 1990; KHONAKDARI *et al.*, 2020), visando a produção e o aumento de metabólitos de interesse. Dessa forma, considerando a importância do potencial econômico global da galantamina e o status criticamente ameaçado de algumas espécies de Amaryllidaceae (IUCN, 2022), há uma urgente necessidade para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas que promovam isto, até para a conservação de germoplasma dessas espécies (PRIYADHARSHINI; MANOKARI; SHEKHAWAT, 2020).

Algumas espécies de Amaryllidaceae não são abundantes e apresentam pequena taxa de multiplicação natural (HERRANZ *et al.*, 2020; ZARAGOZA-PUCHOL *et al.*, 2021). Assim, a extração de compostos bioativos a partir de produções convencionais é atualmente inviável dados os motivos supracitados. Além disto, em condições naturais, o crescimento de plantas e sua capacidade de biossintetizar metabólitos secundários variam ao longo do ano e são influenciados por fatores ambientais bióticos e abióticos, fatores esses que afetam a síntese e acúmulo de alcaloides (MU *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2020). Portanto, é essencial desenvolver métodos alternativos de propagação para

espécies de Amaryllidaceae (ZARAGOZA-PUCHOL *et al.*, 2021). Dentre as técnicas de propagação para Amaryllidaceae, destacam-se a propagação por sementes *ex situ* (HERRANZ *et al.*, 2020), germinação *in vitro* de sementes (COSTA *et al.*, 2019) e a micropropagação de células, tecidos e cultura de órgãos vegetais (ZARAGOZA-PUCHOL *et al.*, 2021). Todas elas colaboram para a promoção da compreensão e controle das condições de crescimento, mecanismos de defesa e resposta da planta, podendo, inclusive, ser úteis para aumentar a produção de biomassa, melhorando os rendimentos dos bioativos (KOIRALA *et al.*, 2022).

Khonakdari *et al.* (2020) obtiveram sucesso na biossíntese da galantamina para a espécie *Narcissus tazetta* L. micropropagada *in vitro*, e aponta que o protocolo de sucesso de cultura *in vitro* de plantas como *N. tazetta* pode ser uma boa maneira de alcançar uma produção máxima de medicamentos para outros fins farmacêuticos e de exploração comercial. Cada vez mais, os recentes desenvolvimentos científicos, avanços tecnológicos e tendências de pesquisa indicam claramente que os produtos naturais estarão entre as fontes mais importantes de novos medicamentos também no futuro (ATANASOV *et al.*, 2015).

1.5. Alcaloides da família Amaryllidaceae

A família Amaryllidaceae possui uma característica particular que consiste na presença de um grupo exclusivo de alcaloides, que foram isolados de plantas de todos os gêneros dessa família (BASTIDA; LAVILLA; VILADOMAT, 2006). Os arranjos da estrutura química altamente específicos e o amplo espectro de atividades biológicas levaram a numerosos estudos químicos e farmacológicos desse grupo de alcaloides (ANDRADE *et al.*, 2012a).

Desde o isolamento do primeiro alcaloide, licorina, de *Narcissus pseudonarcissus* L. em 1877, um progresso substancial foi observado nos estudos de plantas de Amaryllidaceae (BASTIDA; LAVILLA; VILADOMAT, 2006). De julho 2015 a junho de 2017, um total de 44 novos alcaloides foram isolados e identificados de diferentes espécies de plantas dessa família, incluindo os gêneros *Hymenocallis* Salisb., *Zephyranthes* Herb., *Nerine* Herb., *Crinum* L., *Hippeastrum* Herb. e *Lycoris* Herb. (JIN; YAO, 2019).

Estudos recentes indicam uma busca crescente do conhecimento do uso e potencial dos alcaloides extraídos de Amaryllidaceae (CORTES *et al.*, 2015b; GASCA *et al.*, 2020; GEORGIEV; IVANOV; PAVLOV, 2020; BERKOV *et al.*, 2021; LÓPEZ; MARTÍNEZ; HERNÁNDEZ, 2021; NAIR; VAN STADEN, 2018, 2021; ZARAGOZA-PUCHOL *et al.*, 2021), alguns dos quais abordam espécies nunca estudadas anteriormente (ORTIZ *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2019). Os alcaloides

galantamina, licorina, crinina, cherilina, buflavina são derivados de uma estrutura básica denominada benzyl-1-phenylethylamine, conhecida como alcaloide tipo-beladina (FIGURA 2). Os demais alcaloides são derivações desses cinco anteriores (JIN; YAO, 2019). A nomenclatura e a quantidade de tipos de fórmulas esqueléticas básicas dos alcaloides em Amaryllidaceae, também conhecidos como tipos estruturais, subgrupos, tipos de anéis ou séries, têm variado ao longo dos anos (GHOSAL; SAINI; RAZDAN, 1985; BASTIDA; LAVILLA; VILADOMAT, 2006; JIN, 2009; BERKOV *et al.*, 2021; ZARAGOZA-PUCHOL *et al.*, 2021).

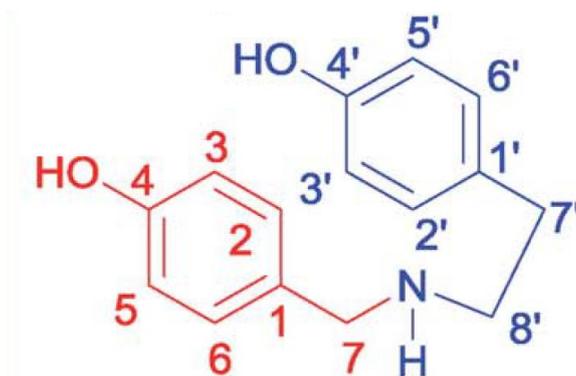


Figura 2: Estrutura básica dos alcaloides (benzyl-1-phenylethylamine) (JIN; YAO, 2019)

Algumas espécies brasileiras de Amaryllidaceae demonstraram capacidade de produzir uma grande quantidade de galantamina e montanina, alcaloides inibidores de AChE (ANDRADE *et al.*, 2016). Estudos anteriores demonstraram que grandes concentrações de galantamina foram identificadas nas espécies *Hippeastrum papilio* (Ravenna) Van Scheepen (ANDRADE *et al.*, 2011) e *Hippeastrum glaucescens* Herb (GASCA *et al.*, 2020), e uma fraca inibição de AChE e nenhuma inibição de BuChE foi constatada para a espécie *Hippeastrum reticulatum* Herb (TALLINI *et al.*, 2017). Andrade *et al.* (2011) isolaram um novo alcaloide de *Hippeastrum papilio* (Ravenna) Van Scheepen e Giordani *et al.* (2008) analisaram qualitativamente a atividade anticolinesterásica de três espécies de *Hippeastrum* nativas do Brasil (*H. morelianum* Lem., *H. psittacinum* (Ker Gawl.) Herb. e *H. santacatarina* (Traub) Dutilh), obtendo resultados positivos.

Em relação a presença de alcaloides nas espécies do gênero *Zephyranthes*, o tipo licorina são comumente encontrados (REYES-CHILPA *et al.* 2011), e recentemente, estudos identificaram uma grande variedade de alcaloides presença numa mesma espécie, como por exemplo, vinte e seis tipos de alcaloides para a espécie *Zephyranthes candida* (Lindl.) Herb (ZHAN *et al.*, 2023), vinte tipos para a espécie *Zephyranthes citrina* Baker (KOHELOVÁ *et al.*, 2021), dezessete tipos para a espécie *Zephyranthes grandiflora* Lindl. (KATOCH *et al.*, 2012), dentre outros (CENTENO-BETANZOS *et al.*, 2022; REYES-CHILPA *et al.*, 2011).

2. METODOLOGIA

2.1. Material vegetal

As plantas matrizes de *Z. irwiniana* foram obtidas da Coleção de Germoplasma de Amaryllidaceae da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN, por meio da Dra. Taciana Barbosa Cavalcanti, e posteriormente, essas plantas foram propagadas e cultivadas pelo Prof. Dr. Christopher William Fagg, Universidade de Brasília – UnB, que forneceu as sementes para esse estudo, e o voucher Fagg CW 2556 foi depositado no herbário da Universidade de Brasília - UB. As sementes foram armazenadas em sacos fechados de papel pardo a temperatura ambiente até o momento da semeadura.

Para a germinação *in vitro* e em casa e vegetação foram utilizadas sementes obtidas de frutos coletados em 03/2021 e 10/2020, respectivamente. Após a coleta dos frutos, foi observado uma média de 78 sementes/fruto, das quais foram eliminadas as sementes não viáveis, identificadas por meio do tamanho diminuto e tecido de reserva reduzido (FIGURA 3).

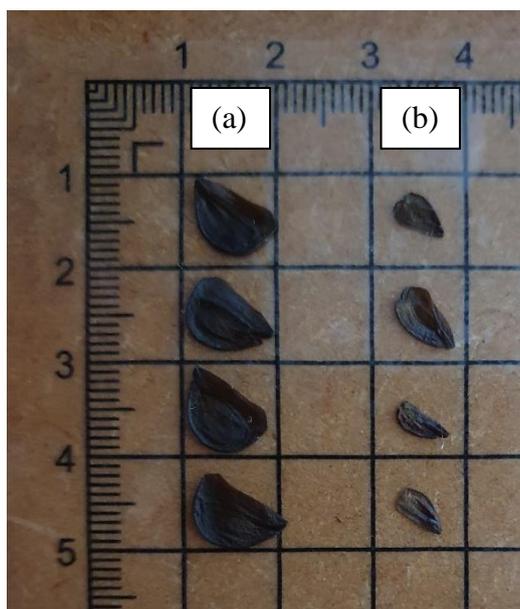


Figura 3: Sementes da espécie *Zephyranthes irwiniana* (Ravenna) Nic. García. (a) Sementes viáveis e (b) sementes inviáveis com tamanho e endosperma reduzidos ou inexistente. Cada quadrado possui 1,0 cm².

2.2. Germinação e cultivo em casa de vegetação

A germinação das sementes de *Z. irwiniana* foi realizada em junho de 2021, utilizando 162 tubetes de 280 cm³ (190 mm x 63 mm) com substrato comercial Bioplant Plus[®], contendo uma semente por tubete (FIGURAS 3a, 3b e 3c). Após a semeadura, os tubetes foram colocados na casa

de vegetação do Centro de Referência em Conservação da Natureza e Recuperação de Áreas Degradadas, localizado na Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro (Lat: 15°46'16.56"S e Long: 47°52'3.78"O), coberta com tela Sombrite® 50%, sob condições naturais de temperatura e luminosidade. O início da germinação foi observado por meio da emissão da primeira folha. As regas foram realizadas uma vez ao dia por meio de sistema automático, programado para irrigar todos os dias durante 40 minutos às 7:00 horas do período matutino. A temperatura e umidade do ar foram registradas diariamente com data logger HOBO® MX2302, com frequência de mensuração a cada minuto, para o cálculo mensal da média, máxima e mínima de ambos. As plântulas resultantes da germinação foram cultivadas por um período de 270 dias até a coleta em março de 2022.



Figura 4: Germinação de sementes de *Z. irwiniana* em casa de vegetação. (a) Tubetes após a semeadura em casa e vegetação. (b) Início da emissão da folha após a germinação em casa de vegetação. (c) Desenvolvimento da planta em casa de vegetação.

2.3. Germinação *in vitro*

Em junho de 2021, a germinação *in vitro* das sementes de *Z. irwiniana* foi realizada no Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ciências da Saúde – UnB. Foi utilizado meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) da Sigma-Aldrich M5519, suplementado com 3% de sacarose (Macron Fine Chemicals™) e 0,15% de Phytigel®. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8. Em seguida, foi distribuído em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, onde foram fechados com tampa de papel alumínio e suas bordas protegidas com filme transparente de PVC comercial. Depois, o meio foi esterilizado em autoclave a 120 °C, durante 20 minutos. Foram desinfetadas 154 sementes com uma solução de etanol (70%) por 1 minuto, seguida de imersão em solução comercial de hipoclorito de sódio (2–2,5%) por 8 minutos e, posteriormente, lavadas por três vezes com água

destilada e estéril. Após isto, as sementes foram inoculadas e mantidas em sala de crescimento com intensidade de iluminação de $50 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, por um fotoperíodo de 12 horas, fornecida por lâmpada fluorescente da marca OSRAM Duluxstar “Daylight” 12W 50/80Hz, por 120 dias (FIGURAS 4a, 4b e 4c). O início da germinação foi observado a partir da emergência radicular.

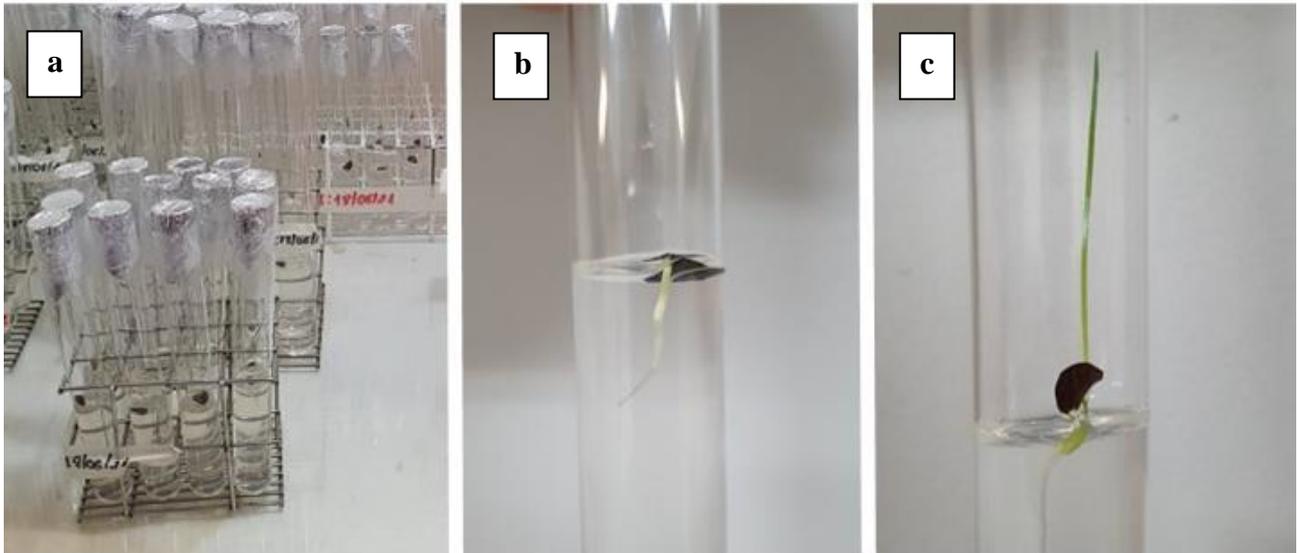


Figura 5: Germinação de sementes de *Z. irwiniana in vitro*. (a) Tubos de ensaio após a inoculação de semente em cultivo *in vitro* em câmara de cultivo. (b) Emissão da raiz em cultivo *in vitro*. (c) Desenvolvimento da plântula em cultivo *in vitro*.

2.4. Micropropagação dos bulbilhos

Após 120 dias da germinação *in vitro* das sementes de *Z. irwiniana*, os tubos de ensaio foram separados aleatoriamente em 6 grupos, cada um com 25 tubos de ensaio, identificados com a numeração de 1 a 6, seguidos por uma letra de A-Y, onde o número representa o tratamento e a letra a plântula dentro do tratamento. Após a identificação de cada tubo de ensaio, as plântulas foram coletadas e seccionadas em três partes, bulbilho, raiz e folha. Neste primeiro momento, as folhas e raízes foram descartadas, e os bulbilhos inseridos no meio de cultura, conforme tratamento e repetindo a identificação anterior de cada plântula para os novos tubos de ensaio. Essa identificação foi pensada para que cada plântula fosse avaliada individualmente ao final do experimento. Por fim, os tubos de ensaio foram fechados e colocados na sala de crescimento (FIGURAS 4 e 5).

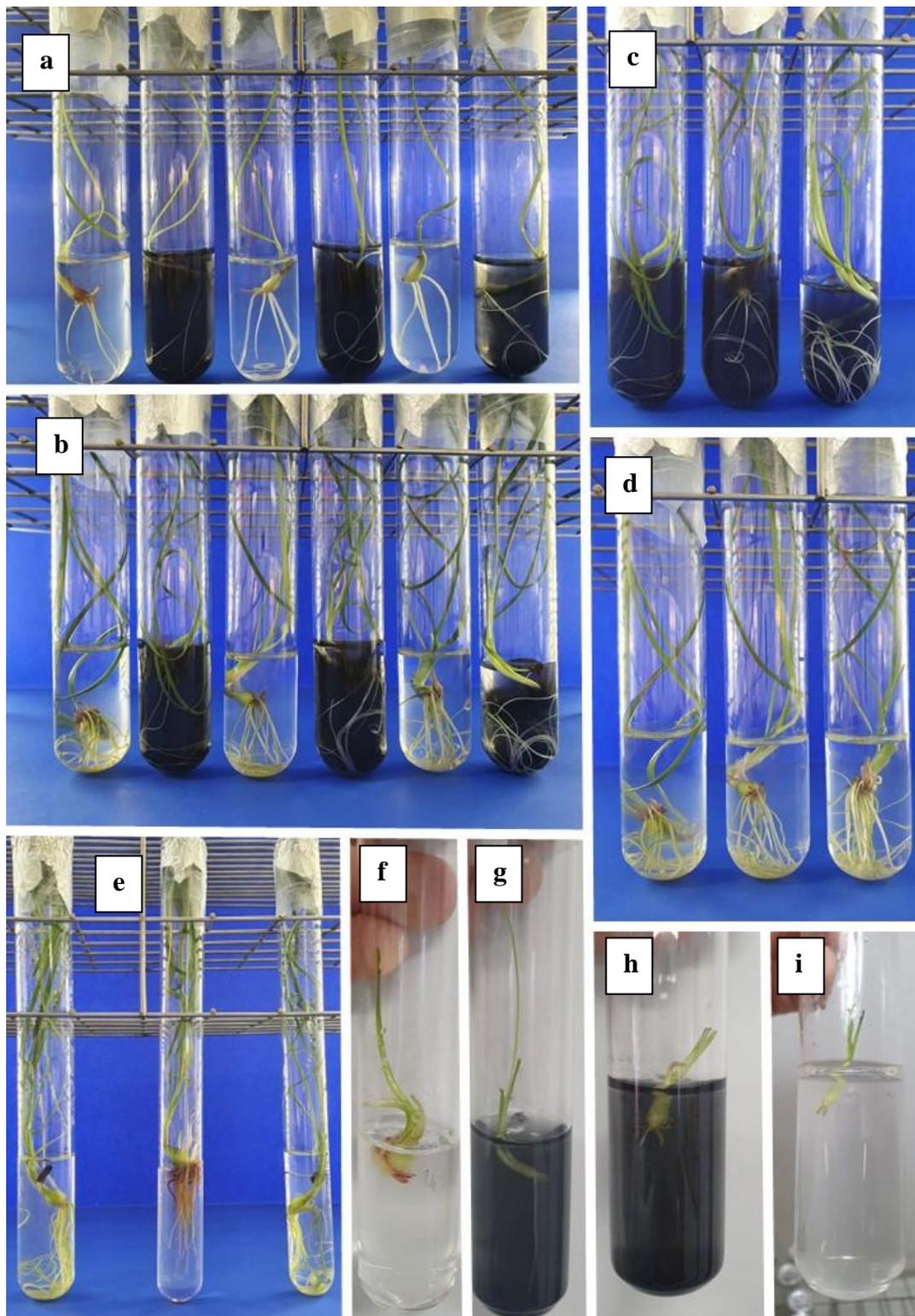


Figura 6: Cultivo *in vitro* de *Z. irwiniana*. (a) Plântulas após um mês e (b) após 5 meses da micropropagação por bulbilhos (na ordem esquerda para direita: T1-T6). Desenvolvimento das plântulas dos tratamentos (c) com CA (T2, T4, T6) e (d) sem CA (T1, T3 e T5) após 5 meses da micropropagação. (e) Plântulas propagadas por sementes após 9 meses de cultivo. (f, g) Desenvolvimento das plântulas micropropagados após 5 dias da inoculação dos bulbilhos. (h, i) Micropropagação de bulbilhos no dia da inoculação.

2.5. Análise estatística

Foi utilizado um experimento fatorial de 2 fatores em um delineamento inteiramente casualizado com 25 repetições, onde um fator é quantitativo com 3 níveis, sendo a variação da concentração da sacarose no meio de cultura e o outro fator é qualitativo com 2 níveis, sendo a presença ou ausência do carvão ativado no meio de cultura, totalizando 6 tratamentos.

Foi utilizado meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) da Sigma-Aldrich M5519, suplementado com 0,15% de Phytigel®, sacarose na concentração indicada para cada tratamento e carvão ativado quando indicado. Os meios dos tratamentos T1-2, T3-4 e T5-6 foram suplementados com as respectivas concentrações de sacarose de 30gL⁻¹, 45gL⁻¹ e 60gL⁻¹ (Macron Fine Chemicals TM), e ainda, os meios do tratamento T2, T4 e T6 foram também suplementados com 1,0gL⁻¹ de carvão ativado (TABELA 1). O principal objetivo do uso do carvão ativado foi escurecer o meio de cultura, e assim, diminuir a incidência de luz no bulbo e raiz, para avaliar sua influência. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8. Em seguida, foi distribuído na quantidade de 20mL em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, onde foram fechados com tampa de papel alumínio e suas bordas protegidas com filme transparente de PVC comercial. Posteriormente, os tubos de ensaio contendo o meio de cultura foram esterilizados em autoclave a uma temperatura de 121°C, sob pressão de 1,5 atm, por um período de 20 minutos. Após isto, os bulbilhos foram inoculados e mantidos em sala de crescimento com intensidade de iluminação de 50 µmolm⁻²s⁻¹, por um fotoperíodo de 12 horas, fornecida por lâmpada fluorescente da marca OSRAM Duluxstar “Daylight” 12W 50/80Hz.

Tabela 1: Composição dos meios de cultura por tratamento.

Tratamento	Composição (g/1000mL)			
	MS médio basal	Phytigel®	Sacarose	Carvão Ativado
T1	4,4	1,5	30,0	Não
T2	4,4	1,5	30,0	1,0
T3	4,4	1,5	45,0	Não
T4	4,4	1,5	45,0	1,0
T5	4,4	1,5	60,0	Não
T6	4,4	1,5	60,0	1,0

As plântulas foram cultivadas por um período de 150 dias, e ao término desse período, em março de 2022, as etapas seguintes foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais da Faculdade de Ciências da Saúde – UnB. Todas as plântulas e plantas cultivadas, *in vitro* e em casa de vegetação, respectivamente, foram coletadas e lavadas com água corrente para retirar o excesso de substrato e meio de cultura. Em seguida, cada plântula foi avaliada, e posteriormente, colocada para secar em estufa de secagem de circulação e renovação de ar, ajustada na temperatura constante de 40°C, por um período de 5 dias, para obter a biomassa seca de cada plântula (FIGURA 6).

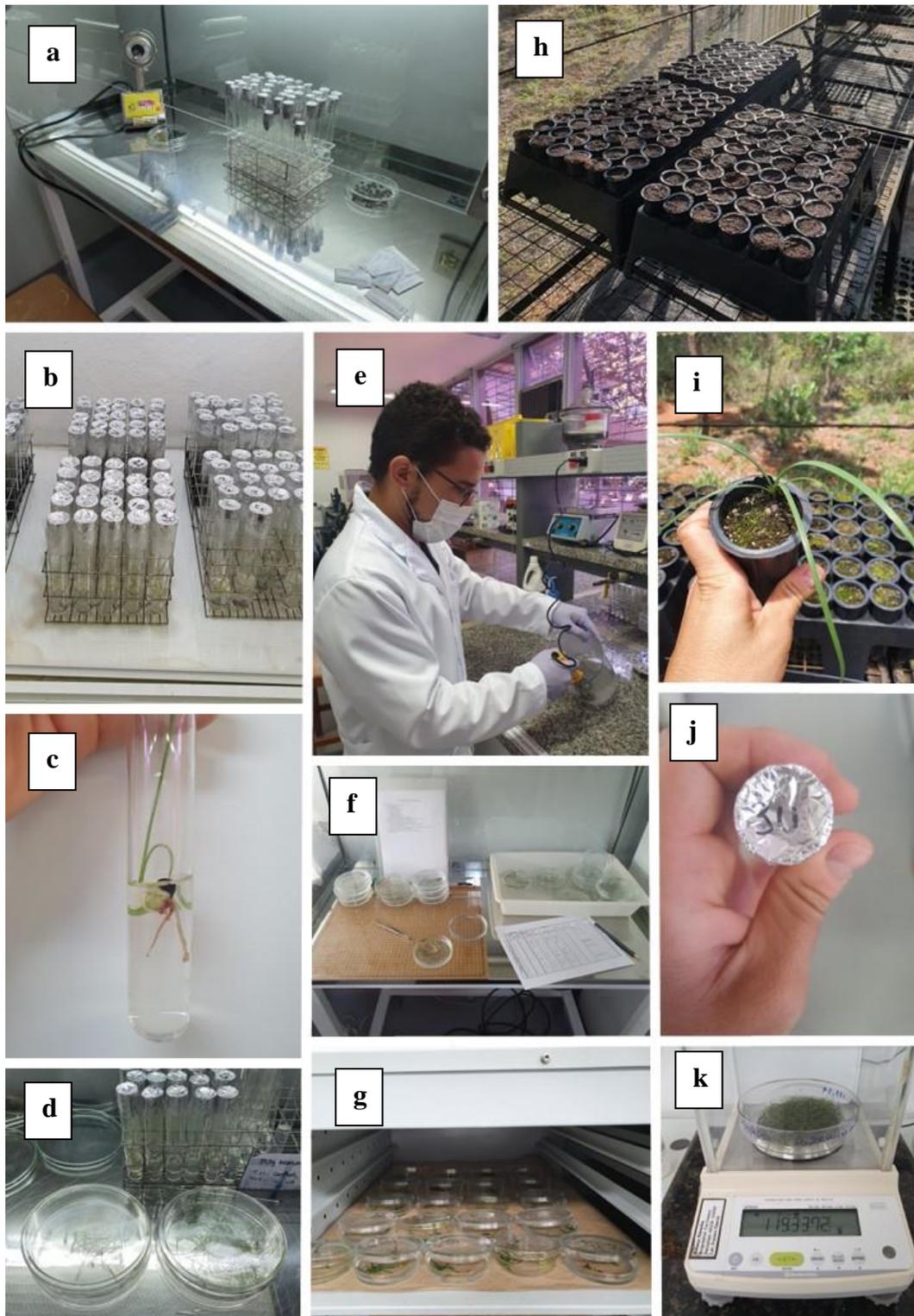


Figura 7: Metodologia do cultivo *in vitro* de *Z. irwiniana*. (a) Materiais em câmara de fluxo de ar vertical usada para desinfecção das sementes e semeadura nos tubos de ensaio. (b) Tubos de ensaio na câmara de cultivo. (c) Plântula em cultivo *in vitro*. (d) Materiais em câmara de fluxo de ar vertical durante o prepara dos bulbilhos para micropropagação. (e) Preparação do meio de cultura. (f) Materiais usados durante o processo de coleta de dados referente ao cultivo *in vitro* e em casa de vegetação. (g) Plântulas em processo de secagem individual em estufa de secagem de circulação e

renovação de ar. (h) Tubetes após a semeadura em casa de vegetação. (i) Planta em desenvolvimento em substrato comercial em casa de vegetação. (j) Identificação do tubo de ensaio (3U) no cultivo *in vitro*. (k) Balança analítica usada para auferir a biomassa fresca, seca e o do extrato etanólico bruto.

2.5.1. Características avaliadas

Foram avaliadas, ao término do cultivo, o comprimento da raiz e folha principal, o número de raízes e folhas, e a biomassa fresca e seca total de cada indivíduo. Para medir o comprimento foi utilizada uma prancheta com marcações quadriculadas de precisão milimétrica (1,0 mm), onde cada quadrado possui 10 mm de comprimento de lado. As medidas foram tomadas colocando a raiz e a folha de forma que ficassem esticadas ao máximo, sem romper. A quantidade de raízes e folhas foi realizada por meio de contagem simples. Em relação aos indivíduos que apresentaram bulbilhos além do bulbo principal (FIGURA 7), esses foram mensurados individualmente (comprimento e quantidade de raiz e folha), no entanto, para obter a biomassa fresca e seca, foram pesados juntos, pois originaram da mesma semente. Para obter a biomassa fresca e seca, cada indivíduo foi pesado utilizando uma balança analítica da marca SHIMADZU ATX224® (0,0001g).

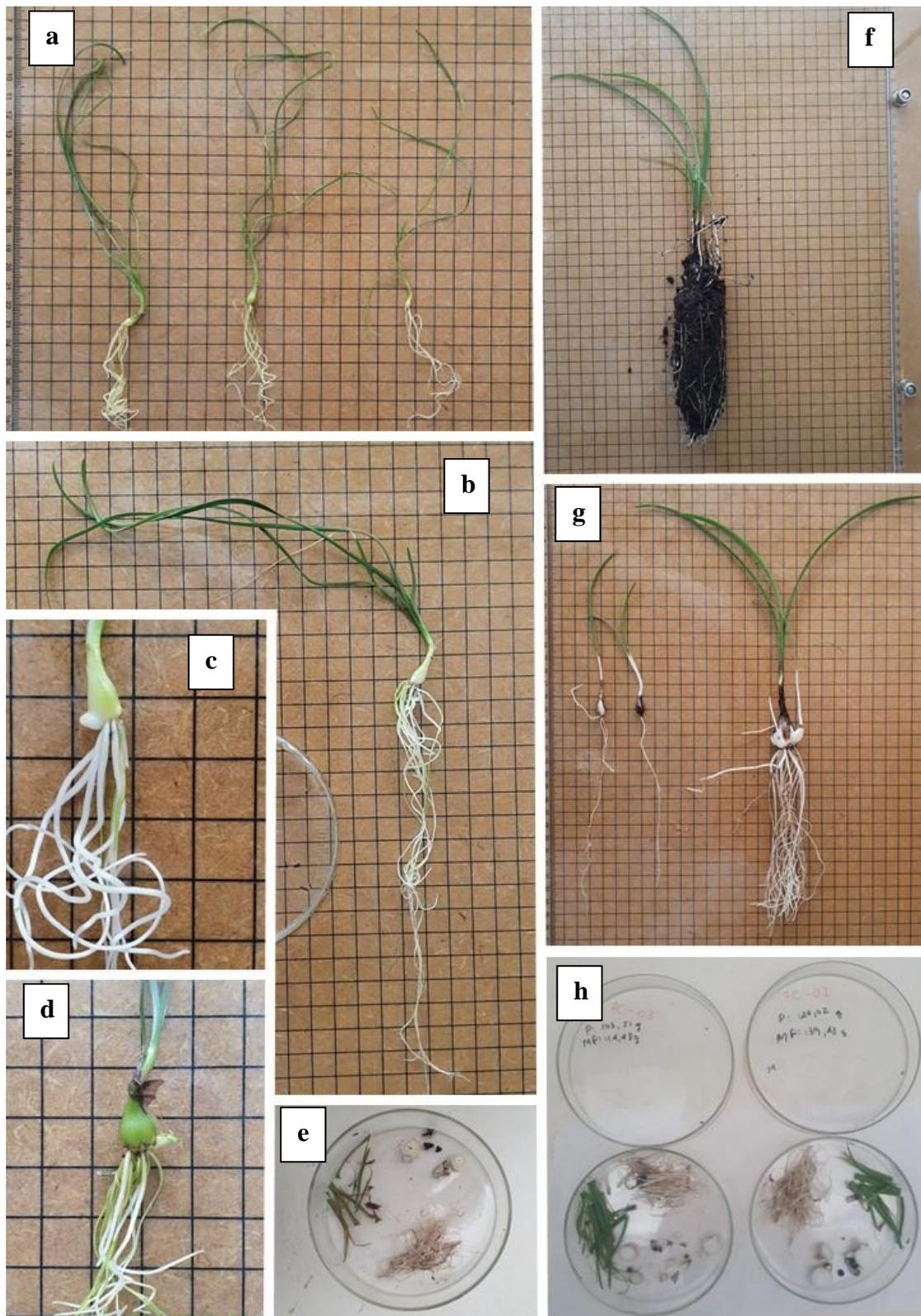


Figura 8: Indivíduos de *Z. irwiniana* após colheita. (a) Bulbilhos originados após a propagação por bulbilho *in vitro*. (b) Prancha quadriculada (1 cm²) utilizada na mensuração dos tamanhas da raiz e folha principal, com destaque para indivíduo cultivado *in vitro*. (c, d) Destaque da emissão de bulbilhos em um indivíduo cultivado *in vitro*. (e, h) Placa de petri contendo raiz, bulbo e folha separadas, em processo de secagem em estufa de secagem de circulação e renovação de ar. (f)

Planta após colheita propagada por semente e cultivada em casa de vegetação utilizando tubetes. (g)
Planta com bulbilhos originadas de uma mesma semente, durante cultivo em casa de vegetação.

2.5.2. Extração Química e CG-EM

2.5.2.1. Preparo do material vegetal

As plantas cultivadas em casa de vegetação e *in vitro* foram coletadas e levadas para o Laboratório de Produtos Naturais da Faculdade de Ciência da Saúde – UnB, para execução das etapas seguintes, e essas foram lavadas superficialmente com água corrente para retirar o substrato e o meio de cultura. Após a lavagem e retirada do excesso de água, cada indivíduo foi pesado utilizando uma balança analítica da marca SHIMADZU ATX224[®] (0,0001g) e em seguida, separadas as folhas e raízes do bulbo. A próxima etapa foi a secagem individual do material em estufa de secagem de circulação e renovação de ar, ajustada na temperatura constante de 40°C, por um período de 5 dias. Após a secagem completa do material, foi realizada novamente a pesagem de cada indivíduo para obter a biomassa seca e o rendimento de secagem individual. Os indivíduos de cada tratamento foram agrupados e posteriormente separados em 3 recipientes, contendo raiz, folha e bulbo, respectivamente.

2.5.2.2. Extração química dos compostos

Após a separação do material seco em raiz, bulbo e folha de cada tratamento, foram contabilizados 21 recipientes, 3 para cada tratamento (T1-T6: *in vitro* e T7: casa de vegetação). A primeira extração foi realizada com hexano e cada recipiente recebeu a quantidade suficiente para o material seco ficar totalmente submerso por um período de 72 horas. Ao término desse período, o resultante foi concentrado e seco, utilizando um rota-evaporador para remover o solvente e obter os extratos hexânicos. Após 3 repetições, os extratos hexânicos foram armazenados à temperatura de -20°C. Em seguida, foi realizada a segunda extração utilizando etanol (100% EtOH). Cada recipiente recebeu a quantidade suficiente para o material vegetal ficar totalmente submerso (aprox. 60 mL) por um mesmo período de 72 horas e o resultante foi concentrado e seco, utilizando um rota-evaporador para remover o solvente e obter o extrato etanólico bruto. Após 3 repetições, os extratos etanólicos foram armazenados a temperatura de -20°C e o material vegetal restante foi descartado. Devido à pequena quantidade de material obtido na extração com etanol (extrato bruto), não foi

possível realizar posteriormente a extração ácido-base para obtenção das frações hexano, acetato de etila e acetato de etila:metanol.

2.5.2.3. Análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

Os extratos etanólicos brutos obtidos na etapa anterior foram dissolvidos em 1,5mL de metanol (100% MeOH), e em seguida, foram retiradas de cada amostra a quantidade necessária para que cada *vials* tivesse 8000 ppm de extrato em 1,5 mL de metanol. Após, cada amostra foi filtrada em algodão comum, para retirada de partes sólidas e impurezas, etapa necessária para o preparo do extrato ser analisado no CG-EM. O resultante do filtrado foi injetado diretamente dentro do aparelho de CG-EM (Perkins Elmer Clarus® SQ 8 GC/MS) operando em modo EI a 70 eV. A coluna Sapiens-X5 MS (30 m x 0,25 mm, espessura do filme de 0,25 µm) foi usada. A programação da temperatura foi: 12 min a 100 °C, 100-180 °C a 15 °C.min⁻¹, 180-300 °C a 5 °C.min⁻¹ e 10 min a 300 °C. A temperatura do injetor e do detector foi 280°C e 250°C, respectivamente, e o fluxo de gás de 1,0 mL.min⁻¹ com gás hélio (He). Não foi aplicada divisão e o volume do injetor foi de 1 µL.

O espectro de massa foi analisado utilizando o software AMDIS 2.73 (NIST) (WA, USA), e o IR foi calculado com uma mistura de padrões alcanos lineares (C₉-C₃₆) conforme a metodologia de Gama *et al.* (2017). A proporção de cada composto presente nos extratos e frações analisados pelo CG-EM foi expresso como uma porcentagem da área do pico do composto em função da corrente iônica total (CIT).

Os compostos foram identificados através da comparação de seus espectros de massa e índices de retenção (IR) de Kovats com a base de dados do *National Institute of Standards and Technology* - NIST e com as bases de dados contendo informações de alcaloides isolados de *Amaryllidaceae* e identificados por meio dos registros da literatura, que estão continuamente sendo atualizadas e revisadas.

2.5.2.4. Histolocalização de alcaloides nas folhas e bulbos

Os testes histoquímicos com os reativos de Dragendorff (SVENDSEN; VERPOORTE, 1983) e Wagner (FURR; MAHLBERG, 1981) foram feitos em seções frescas de folhas e bulbos, cortadas à mão, de 4 indivíduos do tratamento T1 (30g.L⁻¹ de sacarose sem carvão ativado). O reagente de Dragendorff permite detectar o azoto terciário ou quaternário, não revelando as amins primárias e secundárias, a não ser que se encontrem em concentração muito elevada. O preparo da solução *stock* de Reagente de Dragendorff foi feito com 25,0 mL Nitrato de Bismuto a 12,5% em Ácido Acético a 25%, 10,0 mL de Iodeto de Potássio a 40%. Para o uso, foram retirados 5,0 mL da solução, e

suplementado com 10,0 mL de Ácido Acético, perfazendo com água destilada até 100,0 mL. Após o preparo do reagente para o uso, os cortes anatômicos ficaram em contato com o reagente por um período de 5 a 10 min, e em seguida, lavados rapidamente com Nitrito de Sódio a 5% e após, lavados em água destilada. O preparo do reagente de Wagner foi realizado utilizando 2,0g de Iodeto de Potássio e 1,27 g de Iodo, dissolvidos em 100,0 mL de água destilada. Os cortes anatômicos ficaram em contato com o reagente por um período de 5 a 10 min e em seguida, lavados com águas destilada. A presença de alcaloide foi identificada pela coloração castanho-avermelhado para ambos os reagentes. Para o controle, foram utilizadas secções frescas das folhas e bulbos, cortadas à mão, dos mesmos 4 indivíduos do tratamento T1 sem contato com o reagente de Dragendorff e Wagner.

As lâminas com as secções transversais foram observadas e as imagens registradas utilizando o fotomicroscópio AXIOSKOP-ZEISS acoplado ao sistema digital de captura de imagens com Software LAES. Os procedimentos para estudos em microscopia óptica foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal da UnB.

2.5.3 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey e Scoot-Kinott a 5% de probabilidade e 95% de confiabilidade. Para amostras únicas foi utilizado o teste *t* a 5% de probabilidade e 95% de confiabilidade. As análises de variância (ANOVA) foram feitas utilizando o programa Sisvar (FERREIRA, 2019) e os testes *t* foram feitos utilizando o *software* Graph Pad Prism® 9.0.

3. RESULTADOS

3.1. Propagação em casa de vegetação

O início da germinação em casa de vegetação ocorreu após 20 dias da semeadura. Somente 11 sementes germinaram do total de 162, representando 6,79% do total. Foram registradas a temperatura e a umidade relativa do ar (FIGURA 7), sendo o período do dia mais quente foi registrado entre as 08:00 e 16:00 horas, com médias de temperaturas para máxima, média e mínima, respectivamente de 35,47°C, 26,12°C e 19,14°C. As médias de temperatura máxima e mínima registrada durante o experimento foi de 26,66°C e 12,91°C, respectivamente. A temperatura máxima, média e mínima registrada foi de 44,91°C, 20,03°C e 6,13°C, respectivamente. A umidade relativa do ar máxima, média e mínima registrada foram, respectivamente, 99%, 67% e 17%.

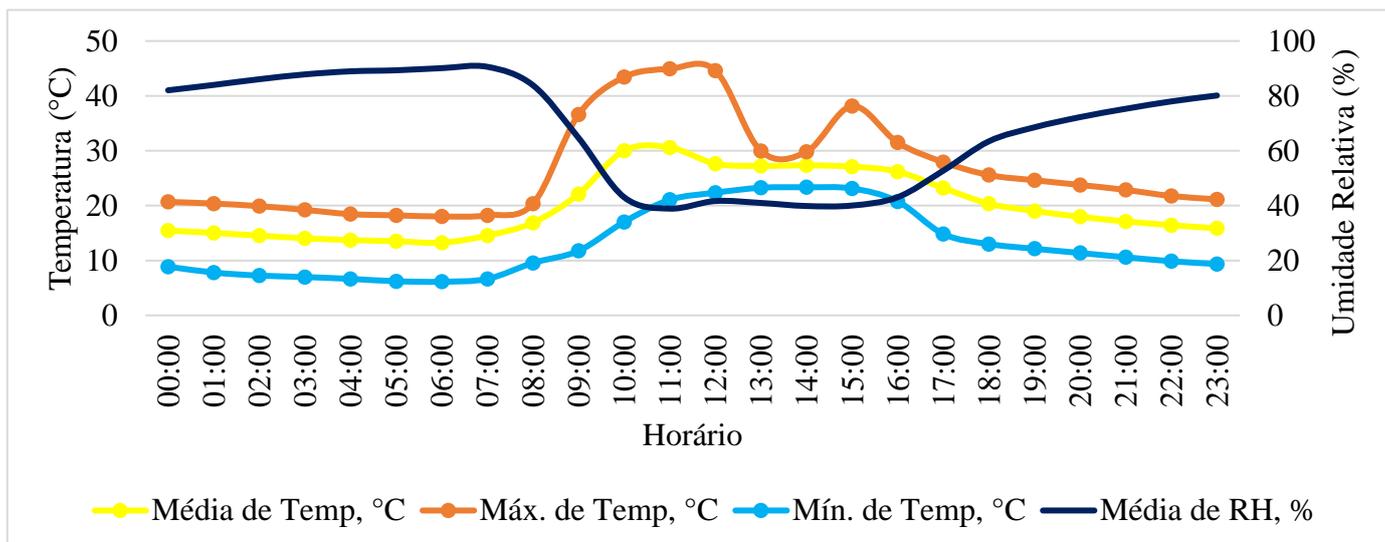


Figura 9: Dados das condições de cultivo em casa de vegetação.

Em relação ao crescimento vegetal, devido à baixa taxa de germinação, apenas 7 indivíduos foram avaliados. O número e o comprimento médio das folhas foram 1,95 e 9,38cm, respectivamente, e para a raiz, 4,86 e 14,73cm. A biomassa fresca e seca média foi 6,54g e 1,05g, respectivamente.

Tabela 2: Dados do cultivo. Trat.: Tratamento. T1: 30 gL⁻¹ de sacarose. T2: 30 gL⁻¹ de sacarose e 1,0 gL⁻¹ de CA. T3: 45 gL⁻¹ de sacarose. T4: 45 gL⁻¹ de sacarose e 1,0 gL⁻¹ de CA. T5: 60 gL⁻¹ de sacarose. T6: 60 gL⁻¹ de sacarose e 1,0 gL⁻¹ de CA. Biomassa fresca (BF) e seca (BS). Rend. (%) BS/BF: Rendimento de secagem em estufa. Ext. EtOH (g): Biomassa dos extratos etanólicos brutos resultante da extração da biomassa seca. Rend. (%) Ext. EtOH: Rendimento da extração etanólica.

Trat.	Quantidade (unid)				Comprimento (cm)				Biomassa (g)				Biomassa Fresca Total (g)	Biomassa Seca Total (g)	Rend. (%) BS/BF	Parte do Vegetal	Biomassa Seca (g)	Ext. EtOH (g)	Rend. (%) Ext. EtOH/MS
	Raiz		Folha		Raiz		Folha		Fresca (BF)		Seca (BS)								
	Méd	s	Méd	s	Méd	s	Méd	s	Méd	s	Méd	s							
T1	6,38	2,69	3,81	0,81	14,29	5,91	19,08	2,74	0,5010	0,3080	0,0418	0,0257	10,5200	0,8773	8,34%	Bulbo	0,2535	0,0390	15,39%
																Folha	0,4295	0,1276	29,71%
																Raiz	0,1943	0,0551	28,36%
T2	4,57	1,21	3,9	0,62	19,57	4,32	21,48	2,56	0,4039	0,1814	0,0502	0,0286	8,4816	1,0551	12,44%	Bulbo	0,1274	0,0233	18,28%
																Folha	0,7343	0,2159	29,40%
																Raiz	0,1934	0,0597	30,87%
T3	8,59	2,2	3,64	0,58	1701	2,9	19	2,29	0,6591	0,3482	0,0632	0,323	14,4992	1,3903	9,59%	Bulbo	0,2391	0,0460	19,24%
																Folha	0,4637	0,2166	46,71%
																Raiz	0,6875	0,1637	23,81%
T4	7,24	2,88	4,1	0,77	20,12	3,44	21,8	1,85	0,6620	0,3814	0,0549	0,0311	13,9025	1,1528	8,29%	Bulbo	0,2285	0,0447	19,56%
																Folha	0,6430	0,1730	26,91%
																Raiz	0,2813	0,0822	29,22%
T5	12,21	2,88	6,63	0,6	14,64	1,71	17,24	2,22	0,7062	0,3597	0,0905	0,0505	13,4173	1,7199	12,82%	Bulbo	0,6412	0,0861	13,43%
																Folha	0,5712	0,1828	32,00%
																Raiz	0,5075	0,1136	22,38%
T6	9,58	2,85	4,42	0,51	20,59	3,51	21,84	1,84	0,9632	0,5189	0,1095	0,0614	18,3004	2,0809	11,37%	Bulbo	0,4566	0,0202	4,42%
																Folha	1,0110	0,2233	22,09%
																Raiz	0,6134	0,0959	15,63%
T7	4,86	5,47	1,95	0,8	14,73	5,06	9,38	5,91	6,5457	4,2104	1,0588	0,688	45,8200	7,4116	16,18%	Bulbo	5,8373	0,1077	1,85%
																Folha	0,5336	0,0713	13,36%
																Raiz	1,0407	0,0722	6,94%

3.2. Propagação *in vitro*

3.2.1. Influência da sacarose e do carvão ativado

As primeiras sementes *in vitro* germinaram após o 5º dia de inoculação, e ao todo, germinaram 154 sementes, representando 96,86% do total. Após 5 meses de cultivo *in vitro*, constatou-se que o aumento da concentração de sacarose influenciou significativamente no aumento médio da biomassa seca por indivíduo sem interação significativa do carvão ativado (sacarose-biomassa: 30gL⁻¹, 0,045g; 45gL⁻¹, 0,059g; 60gL⁻¹, 0,100g) (FIGURA 10 e 13). Ainda, influenciou no aumento médio da biomassa fresca por indivíduo (sacarose-biomassa: 30gL⁻¹, 0,438; 45gL⁻¹, 0,656; 60gL⁻¹, 0,834g) (FIGURA 11 e 12) e no número de raízes (sacarose-nº de raízes: 30gL⁻¹, 5,34; 45gL⁻¹, 7,97; 60gL⁻¹, 10,89) (FIGURA 12). Para biomassa fresca e número de raízes, houve interação significativa do carvão ativado apenas na concentração de 60gL⁻¹ de sacarose.

Para biomassa fresca, o carvão ativado influenciou positivamente, pois o tratamento T6 com CA apresentou uma média da biomassa fresca por indivíduo de 0,962g, significativamente maior que o valor de 0,705g para o tratamento T5, no entanto, para número médio de raízes por indivíduo foi o inverso, o tratamento T6 apresentou o valor de 9,56 raízes, significativamente menor que o valor de 12,22 raízes encontrado para o tratamento T5. As variáveis número de folhas e comprimento da maior folha e da maior raiz não foram influenciadas pela concentração de sacarose (TABELA 3).

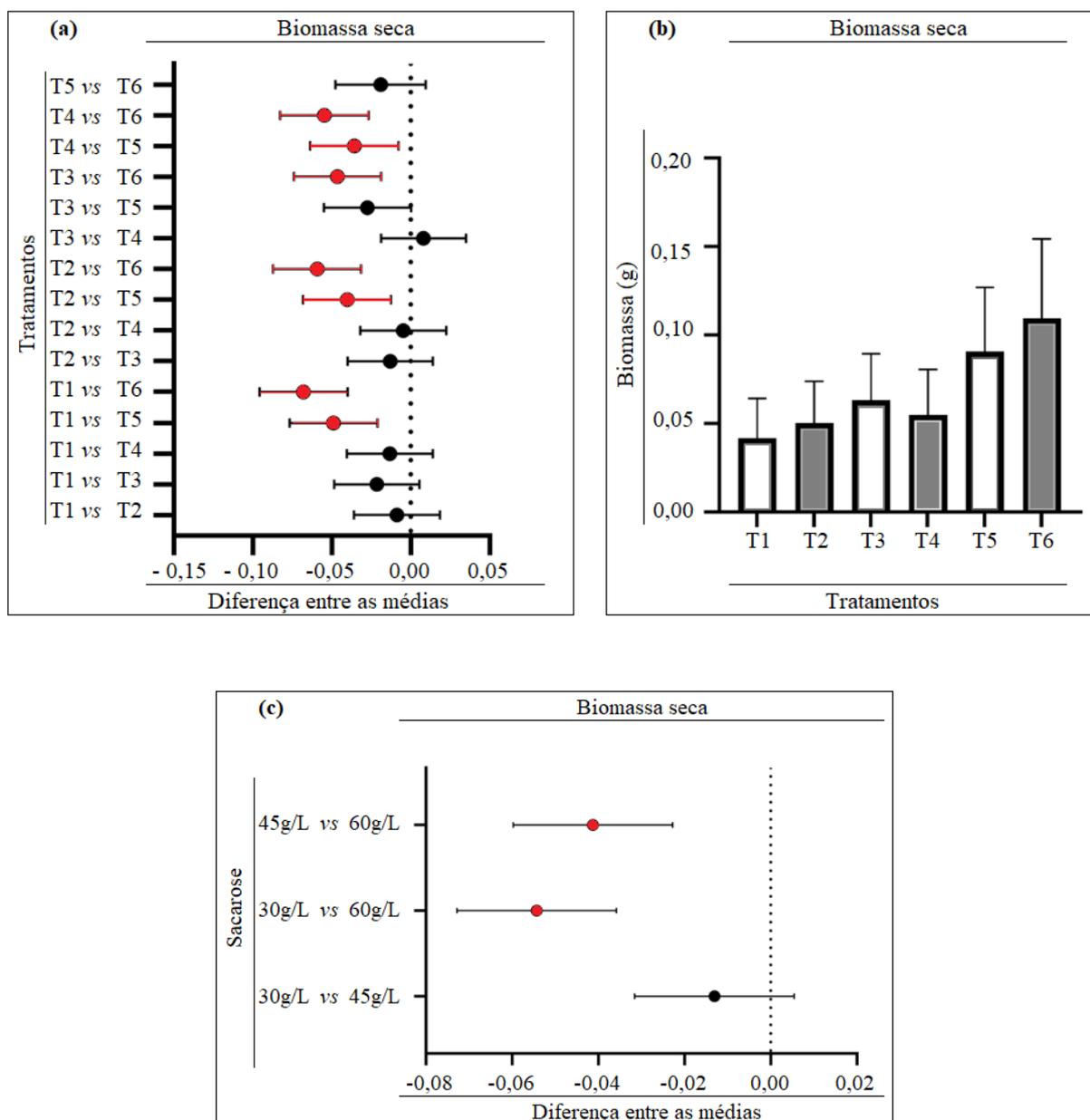


Figura 10: Biomassa seca: (a) Teste de Tukey (5%): diferença entre as médias dos tratamentos. (b) Valor médio da biomassa seca (g) por tratamento. (c) Teste de Tukey (5%): diferença entre as médias dos tratamentos com a mesma concentração de sacarose (gL^{-1}). Colunas brancas: tratamento sem CA / Colunas cinzas: tratamento com CA. Pontos pretos: diferenças entre as médias não significativa ($\rho > 0,05$), pontos vermelhos: diferenças entre as médias significativa ($\rho < 0,05$). Barras: Intervalo de confiança (95%).

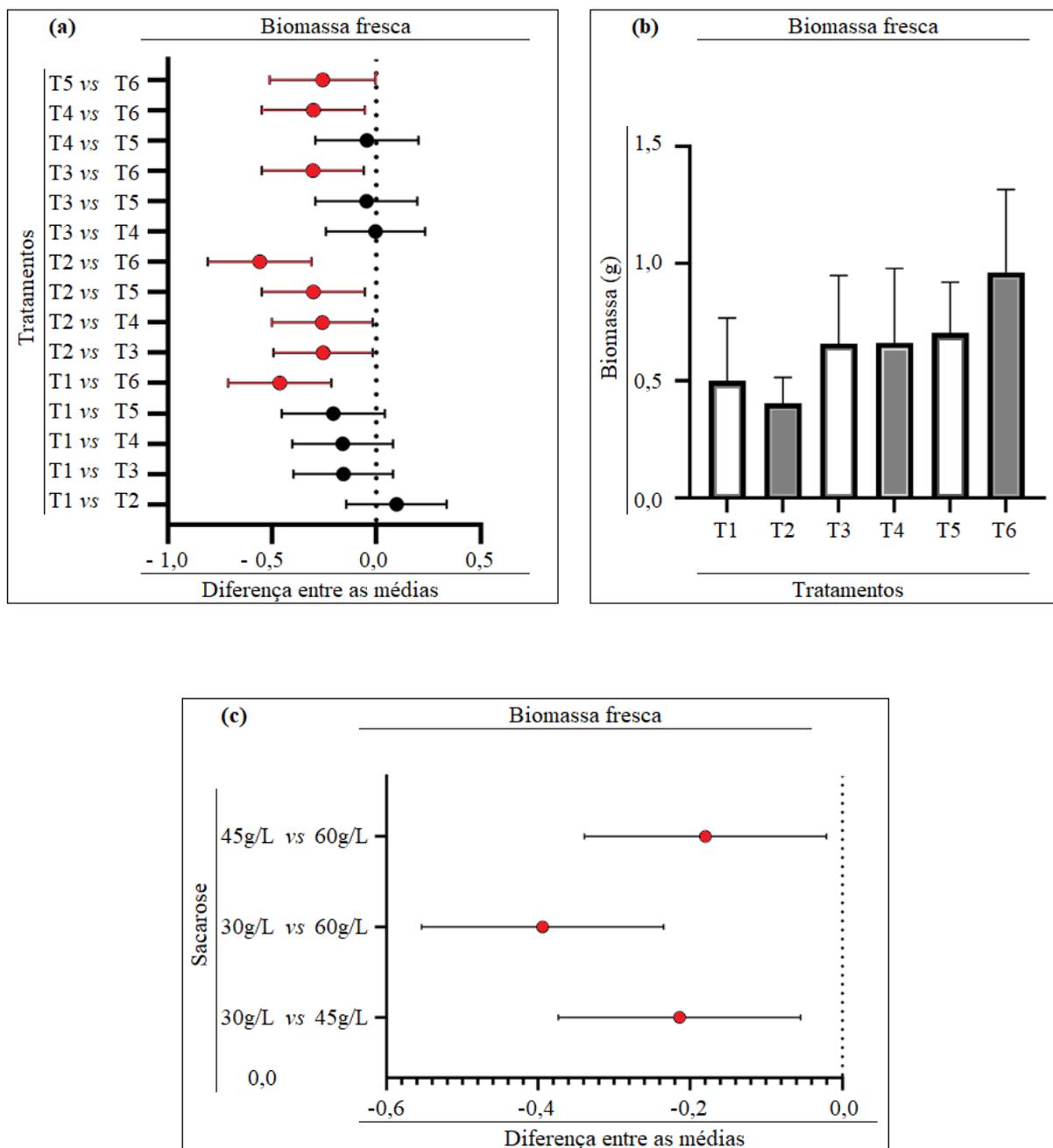


Figura 11: Biomassa fresca: (a) Teste de Tukey (5%): diferença entre as médias dos tratamentos. (b) Valor médio da biomassa fresca (g) por tratamento. (c) Teste de Tukey (5%): diferença entre as médias dos tratamentos com a mesma concentração de sacarose (gL^{-1}). Colunas brancas: tratamento sem CA / Colunas cinzas: tratamento com CA. Pontos pretos: diferenças entre as médias não significativa ($\rho > 0,05$), pontos vermelhos: diferenças entre as médias significativa ($\rho < 0,05$). Barras: Intervalo de confiança (95%).

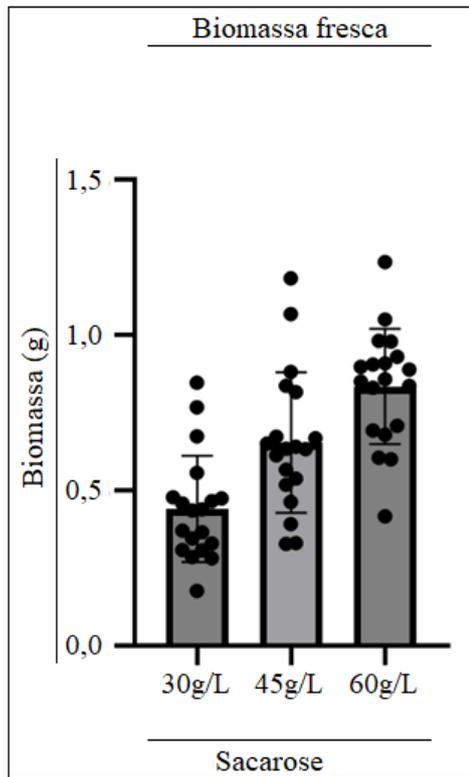


Figura 12: Sacarose x biomassa fresca: (a) Biomassa fresca (g) média das plântulas por concentração de sacarose. Os pontos pretos são valores individuais por plântulas e as barras são o intervalo de confiança (95%).

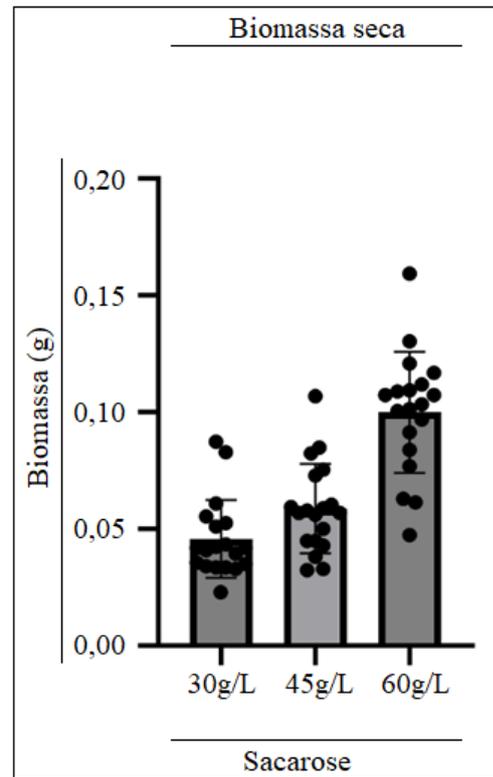


Figura 13: Sacarose x biomassa seca: (b) Biomassa seca (g) média das plântulas por concentração de sacarose. Os pontos pretos são valores individuais por plântulas e as barras são o intervalo de confiança (95%).

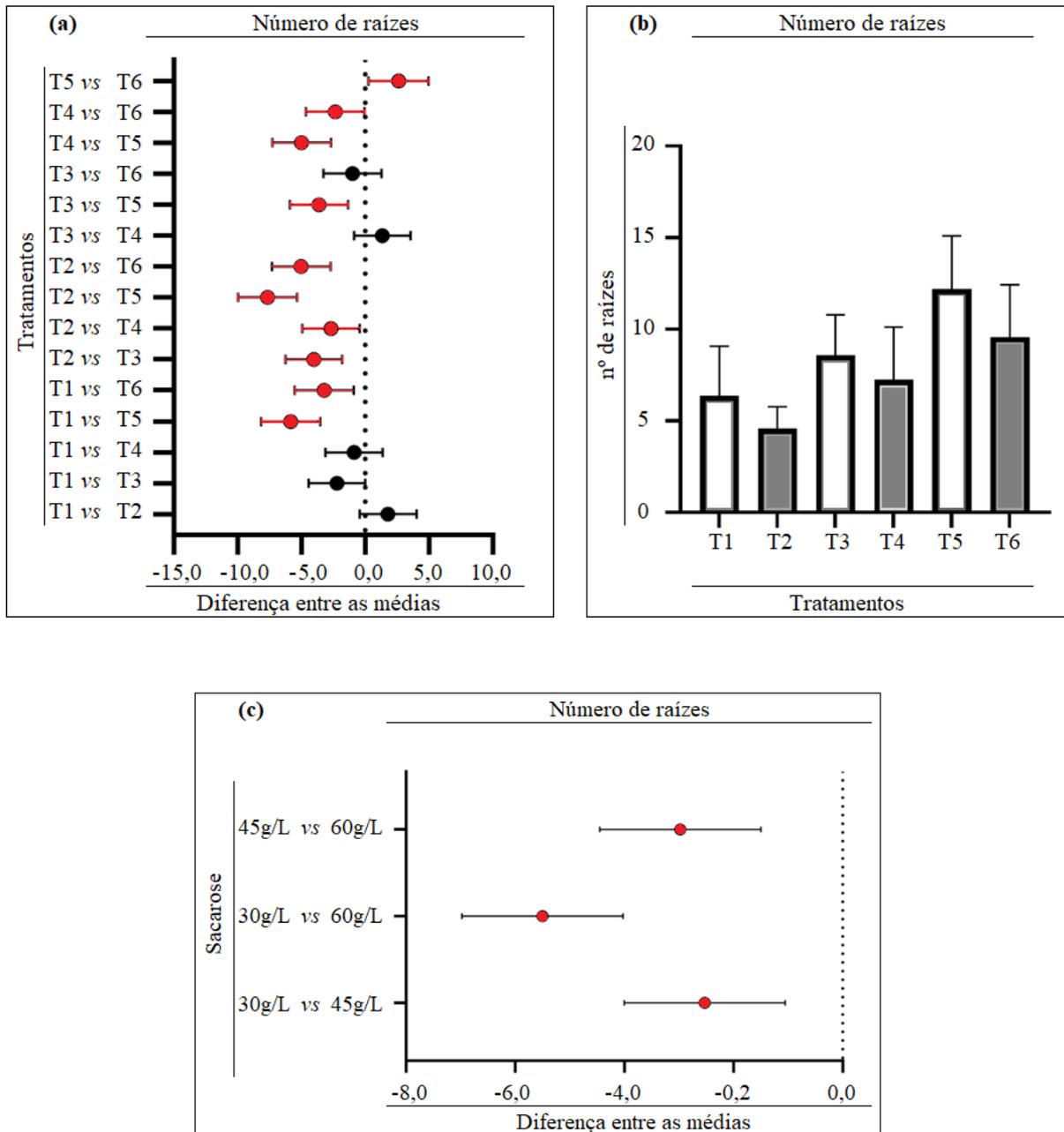


Figura 14: Número de raízes: (a) Número médio de raízes por tratamento. (b) Teste de Tukey (5%): diferença entre as médias dos tratamentos. (c) Teste de Tukey (5%): diferença entre as médias dos tratamentos com a mesma concentração de sacarose (gL^{-1}). Colunas brancas: tratamento sem CA / Colunas cinzas: tratamento com CA. Pontos pretos: diferenças entre as médias não significativa ($\rho > 0,05$), pontos vermelhos: diferenças entre as médias significativa ($\rho < 0,05$). Barras: Intervalo de confiança (95%).

Tabela 3: Tabela de resultados da análise de variância (ANOVA) e dos testes de Tukey (5%) e Scott-Knott (5%). A quantidade de asteriscos (*) sobrescritos as letras a e b, quando diferentes, indicam diferenças significativas pelo teste estatístico ($p < 0,05$). Continuação na próxima página.

		Teste Estatístico			Desdobramento do Sacarose dentro de cada nível de Carvão Ativado						Desdobramento do Carvão Ativado dentro de cada nível de Sacarose						
		Médias	Tukey 5%	Scott-Knott 5%	Sac. (g/L)	CA	Tratamento	Médias	Tukey 5%	Scott-Knott 5%	Sac. (g/L)	CA	Tratamento	Médias	Tukey 5%	Scott-Knott 5%	
Número de folhas	Sacarose (g/L)	30,00	3,7778	a*	b*	60,00		T05	3,6110	a*	b*	30,00	Não	T01	3,6667	a*	b*
		45,00	3,8611	a*	b*	45,00	Não	T03	3,6112	a*	b*	45,00	Sim	T02	3,8888	a*	b*
		60,00	4,0228	a*	b*	30,00		T01	3,6667	a*	b*	60,00	Não	T03	3,6112	a*	b*
	CA	Não	3,6296	a*	b*	30,00		T02	3,8888	a*	b*	60,00	Sim	T04	4,1110	a**	b**
		Sim	4,1481	a**	b**	45,00	Sim	T04	4,1110	a*	b*	60,00	Sim	T06	4,4443	a**	b**
						60,00		T06	4,4443	a*	b*						
Número de raízes	Sacarose (g/L)	30,00	5,3333	a*	b*	30,00		T01	6,1110	a*	b*	30,00	Sim	T02	4,5557	a*	b*
		45,00	7,9722	a**	b**	45,00	Não	T03	8,3333	a**	b**	45,00	Não	T01	6,1110	a*	b*
		60,00	10,8889	a***	b***	60,00		T05	12,2222	a***	b***	45,00	Sim	T04	7,6110	a*	b*
	CA	Sim	7,2408	a*	b*	30,00		T02	4,5557	a*	b*	60,00	Não	T03	8,3333	a*	b*
		Não	8,8888	a**	b**	45,00	Sim	T04	7,6110	a**	b**	60,00	Sim	T06	9,5557	a*	b*
						60,00		T06	9,5557	a**	b***	60,00	Não	T05	12,2222	a**	b**
Comp. da maior folha	Sacarose (g/L)	60,00	19,5333	a*	b*	60,00		T05	17,1332	a*	b*	30,00	Não	T01	18,8943	a*	b*
		30,00	20,2471	a*	b*	30,00	Não	T01	18,8943	a**	b**	30,00	Sim	T02	21,5998	a**	b**
		45,00	20,3277	a*	b*	45,00		T03	18,9055	a**	b**	45,00	Não	T03	18,9055	a*	b*
	CA	Não	18,3110	a*	b*	30,00		T02	21,5998	a*	b*	60,00	Sim	T04	21,7498	a**	b**
		Sim	21,7610	a**	b**	45,00	Sim	T04	21,7498	a*	b*	60,00	Não	T05	17,1332	a*	b*
						60,00		T06	21,9333	a*	b*	60,00	Sim	T06	21,9333	a**	b**
Comp. da maior raiz	Sacarose (g/L)	30,00	16,8306	a*	b*	30,00		T01	13,7055	a*	b*	30,00	Não	T01	13,7055	a*	b*
		60,00	17,6417	a*	b*	60,00	Não	T05	14,5888	a*a**	b*	30,00	Sim	T02	19,9557	a**	b**
		45,00	18,1888	a*	b*	45,00		T03	16,5500	a**	b**	45,00	Não	T03	16,5500	a*	b*
	CA	Não	14,9481	a*	b*	45,00		T04	19,8277	a*	b*	60,00	Sim	T04	19,8277	a**	b**
		Sim	20,1593	a**	b**	30,00	Sim	T02	19,9557	a*	b*	60,00	Não	T05	14,5888	a*	b*
						60,00		T06	20,6945	a*	b*	60,00	Sim	T06	20,6945	a**	b**
Biomassa fresca	Sacarose (g/L)	30,00	0,4388	a*	b*	30,00		T01	0,4738	a*	b*	30,00	Sim	T02	0,4037	a*	b*
		45,00	0,6558	a**	b**	45,00	Não	T03	0,6388	a*a**	b**	30,00	Não	T01	0,4738	a*	b*
		60,00	0,8333	a***	b***	60,00		T05	0,7050	a**	b**	45,00	Não	T03	0,6388	a*	b*
	CA	Não	0,6059	a*	b*	30,00		T02	0,4037	a*	b*	45,00	Sim	T04	0,6727	a*	b*
		Sim	0,6793	a*	b*	45,00	Sim	T04	0,6727	a**	b**	60,00	Não	T05	0,7050	a*	b*
						60,00		T06	0,9617	a***	b***	60,00	Sim	T06	0,9617	a**	b**

Tabela 3: Tabela de resultados da análise de variância (ANOVA) e dos testes de Tukey (5%) e Scott-Knott (5%). A quantidade de asteriscos (*) sobrescritos as letras a e b, quando diferentes, indicam diferenças significativas pelo teste estatístico ($p < 0,05$).

Biomassa seca	Sacarose (g/L)	30,00	0,0453	a*	b*	30,00	T01	0,0403	a*	b*	30,00	Não	T01	0,0403	a*	b*			
		45,00	0,0590	a*	b*		45,00	Não	T03	0,0622		a*	b**	45,00	Sim	T02	0,0502	a*	b*
		60,00	0,1003	a**	b**		60,00	T05	0,0912	a**		b***	60,00	Sim	T04	0,0558	a*	b*	
	CA	Não	0,0646	a*	b*	30,00	T02	0,0502	a*	b*	45,00	Não	T03	0,0622	a*	b*			
		Sim	0,0718	a*	b*	45,00	Sim	T04	0,0558	a*	b*	60,00	Não	T05	0,0912	a*	b*		
						60,00	T06	0,1093	a**	b**	60,00	Sim	T06	0,1093	a*	b*			
Rendimento secagem	Sacarose (g/L)	45,00	0,0913	a*	b*	30,00	T01	0,0927	a*	b*	30,00	Não	T01	0,0927	a*	b*			
		30,00	0,1102	a**	b**	45,00	Não	T03	0,0992	a*	b*	30,00	Sim	T02	0,1277	a**	b**		
		60,00	0,1190	a**	b**	60,00	T05	0,1258	a**	b**	45,00	Não	T03	0,0835	a*	b*			
	CA	Não	0,1059	a*	b*	45,00	T04	0,0835	a*	b*	45,00	Sim	T04	0,0992	a*	b*			
		Sim	0,1078	a*	b*	60,00	Sim	T06	0,1122	a**	b**	60,00	Não	T05	0,1122	a*	b*		
						30,00	T02	0,1277	a**	b**	60,00	Sim	T06	0,1259	a*	b*			

O carvão ativado (CA) influenciou positivamente no comprimento da maior folha (com CA: 21,76cm; sem CA: 18,31cm) (FIGURA 15) e da maior raiz (com CA: 20,15cm; sem CA: 14,94cm) (FIGURA 16) em todos os níveis da concentração de sacarose, sem a interação significativa da sacarose dentro dos níveis de CA. O CA também influenciou positivamente o número de folhas, com interação significativa para a concentração de sacarose de 45,0gL⁻¹ (T3: 3,61; T4: 4,11) e 60,0 gL⁻¹ (T5: 3,61; T6: 4,44), no entanto, não houve interação significativa da sacarose dentro dos níveis de CA (FIGURA 17). O número de raízes foi influenciado negativamente pelo CA (com CA: 7,24cm; sem CA: 8,88cm), interagindo significativamente com a sacarose apenas na concentração de 60gL⁻¹ (T5: 12,22; T6: 9,55) (FIGURA 14). Não houve influência do uso do CA na média da biomassa fresca e seca por indivíduo.

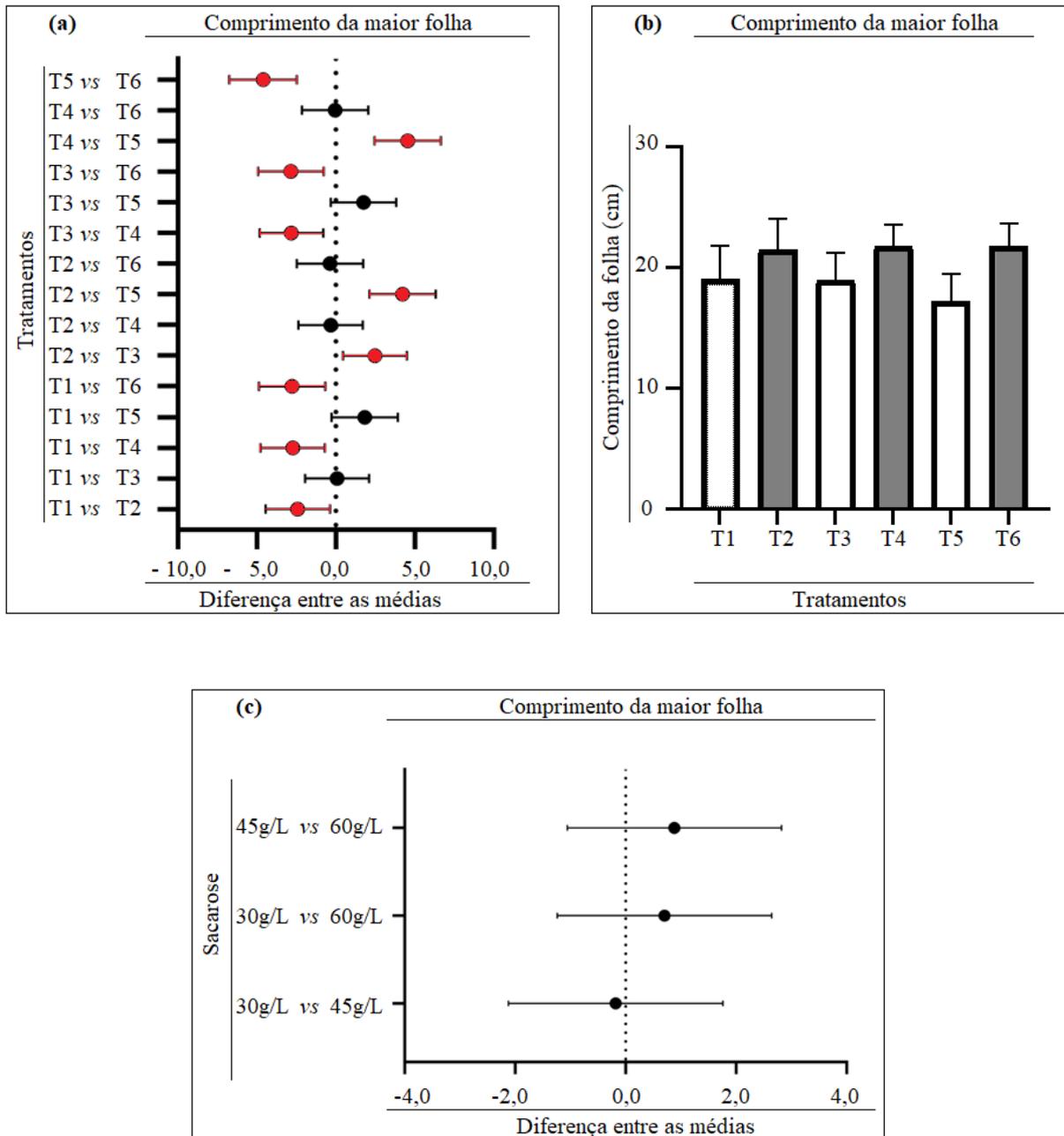


Figura 15: Comprimento da maior folha: (a) Comprimento (cm) médio da maior folha por tratamento. (b) Teste de Tukey (5%): diferença entre as médias dos tratamentos. (c) Teste de Tukey (5%): diferença entre as médias dos tratamentos com a mesma concentração de sacarose (gL^{-1}). Colunas brancas: tratamento sem CA / Colunas cinzas: tratamento com CA. Pontos pretos: diferenças entre as médias não significativa ($p > 0,05$), pontos vermelhos: diferenças entre as médias significativa ($p < 0,05$). Barras: Intervalo de confiança (95%).

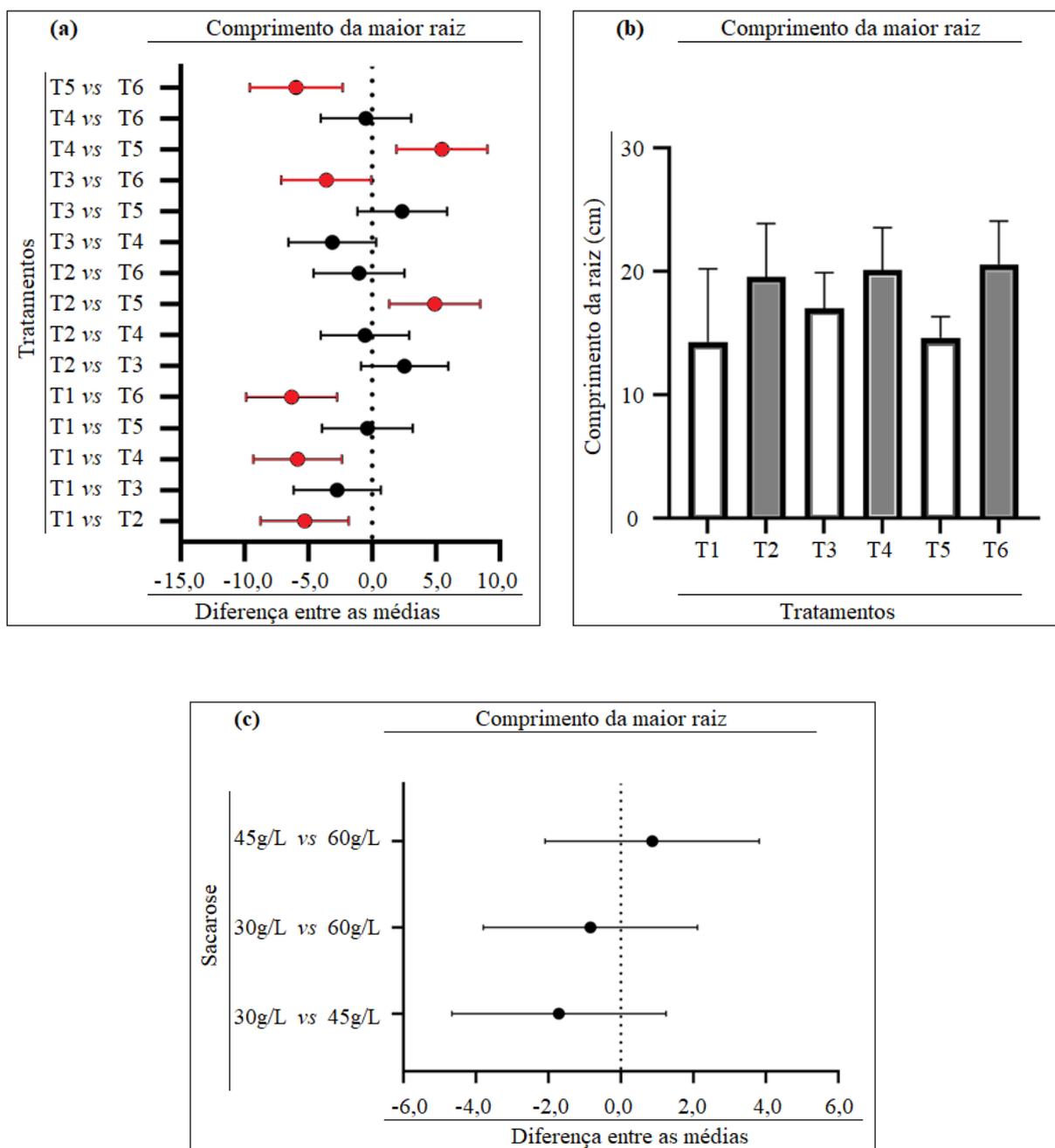


Figura 16: Comprimento da maior raiz: (a) Comprimento (cm) médio da maior raiz por tratamento. (b) Teste de Tukey (5%): diferença entre as médias dos tratamentos. (c) Teste de Tukey (5%): diferença entre as médias dos tratamentos com a mesma concentração de sacarose (gL^{-1}). Colunas brancas: tratamento sem CA / Colunas cinzas: tratamento com CA. Pontos pretos: diferenças entre as médias não significativa ($\rho > 0,05$), pontos vermelhos: diferenças entre as médias significativa ($\rho < 0,05$). Barras: Intervalo de confiança (95%).

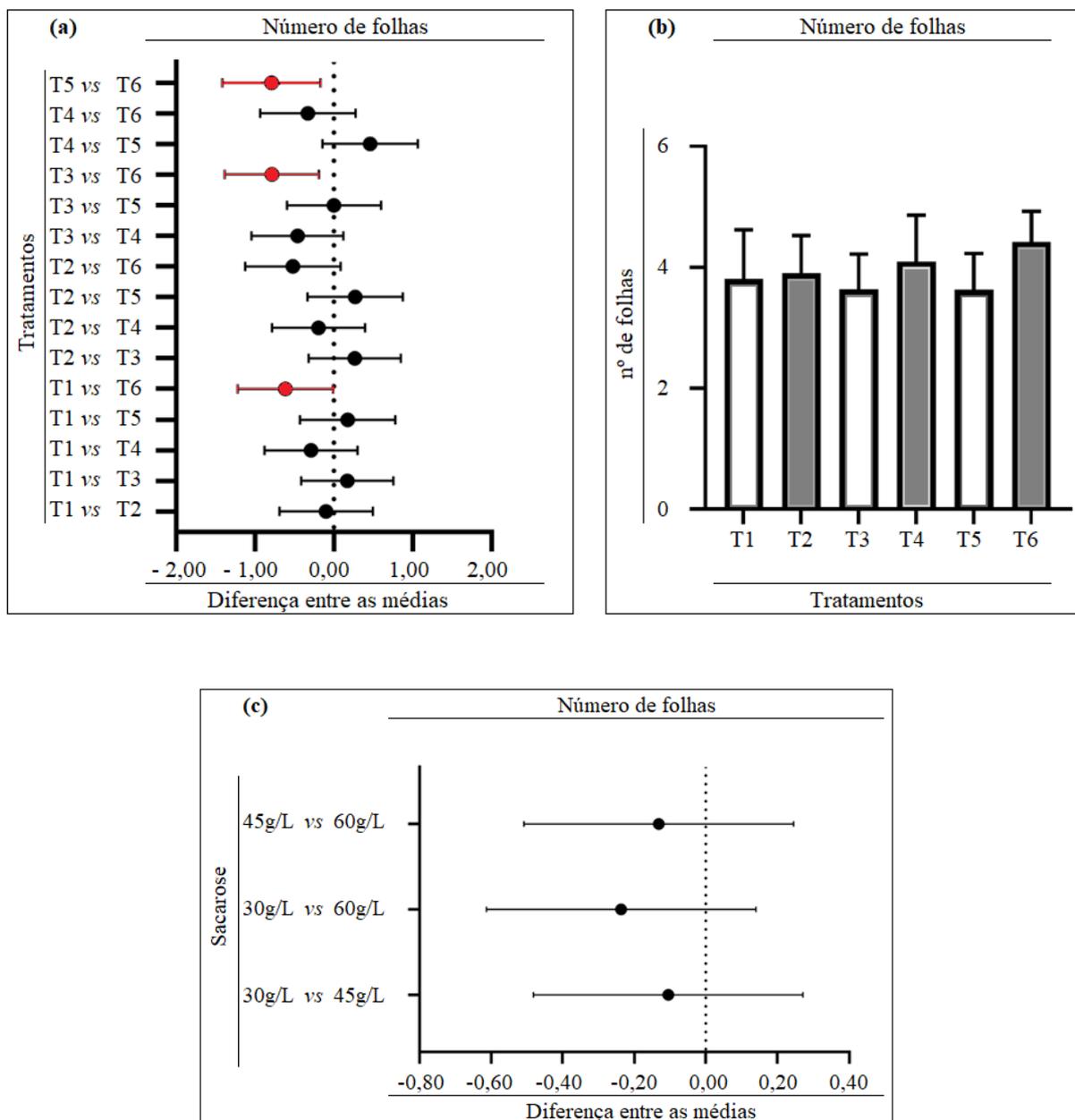


Figura 17: Número de folhas: (a) Número médio de folhas por tratamento. (b) Teste de Tukey (5%): diferença entre as médias dos tratamentos. (c) Teste de Tukey (5%): diferença entre as médias dos tratamentos com a mesma concentração de sacarose (gL^{-1}). Colunas brancas: tratamento sem CA / Colunas cinzas: tratamento com CA. Pontos pretos: diferenças entre as médias não significativa ($\rho > 0,05$), pontos vermelhos: diferenças entre as médias significativa ($\rho < 0,05$).

3.2.2. Extração

O rendimento percentual da extração etanólica está demonstrado na figura 19 e na tabela 4. O tratamento T7 apresentou os menores rendimentos percentuais para o bulbo (1,85%), folha (13,36%) e raiz (6,94%), todos fora do intervalo de confiança. Os melhores rendimentos obtidos para produção de extrato etanólico da folha foram dos tratamentos sem CA, sendo o tratamento T3 (46,71%) significativamente superior a todos os tratamentos. Com exceção do tratamento T3 e T7, os demais tratamentos apresentaram rendimentos estatisticamente iguais (FIGURA 18).

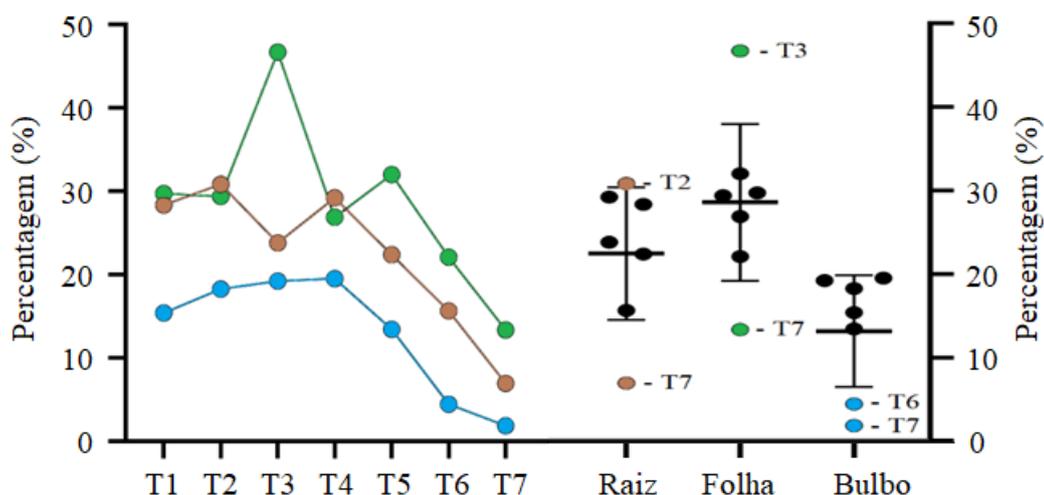


Figura 18: Gráfico de percentagem de rendimento da extração etanólica por tratamento. Linha azul: Bulbo. Linha verde: Folha. Linha marrom: Raiz. As barras são o intervalo de confiança (95%).

Tabela 4: Tabela de rendimento da extração etanólica do bulbo, folha e raiz de cada tratamento. T1: 30 gL⁻¹ de sacarose. T2: 30 gL⁻¹ de sacarose e 1,0 gL⁻¹ de CA. T3: 45 gL⁻¹ de sacarose. T4: 45 gL⁻¹ de sacarose e 1,0 gL⁻¹ de CA. T5: 60 gL⁻¹ de sacarose. T6: 60 gL⁻¹ de sacarose e 1,0 gL⁻¹ de CA. Ext. EtOH: Extrato etanólico. Rend. (%) Ext. EtOH/MS: Rendimento da extração etanólica.

	Parte do Vegetal	Biomassa Seca (g)	Ext. EtOH (g)	Rend. (%) Ext. EtOH/MS
T1	Bulbo	0,2535	0,0390	15,39%
	Folha	0,4295	0,1276	29,71%
	Raiz	0,1943	0,0551	28,36%
T2	Bulbo	0,1274	0,0233	18,28%
	Folha	0,7343	0,2159	29,40%
	Raiz	0,1934	0,0597	30,87%
T3	Bulbo	0,2391	0,0460	19,24%
	Folha	0,4637	0,2166	46,71%
	Raiz	0,6875	0,1637	23,81%
T4	Bulbo	0,2285	0,0447	19,56%
	Folha	0,6430	0,1730	26,91%
	Raiz	0,2813	0,0822	29,22%
T5	Bulbo	0,6412	0,0861	13,43%
	Folha	0,5712	0,1828	32,00%
	Raiz	0,5075	0,1136	22,38%
T6	Bulbo	0,4566	0,0202	4,42%
	Folha	1,0110	0,2233	22,09%
	Raiz	0,6134	0,0959	15,63%
T7	Bulbo	5,8373	0,1077	1,85%
	Folha	0,5336	0,0713	13,36%
	Raiz	1,0407	0,0722	6,94%

A produção de extrato para o bulbo apresentou resultados semelhantes para todos os tratamentos, com exceção do T6 (4,42%) e T7 (1,85%), que tiveram valores bem abaixo da média, fora do intervalo de confiança. Os resultados para os bulbos, quando comparados com os obtidos para as folhas, apresentaram rendimento significativamente inferior, no entanto, a produção de extrato etanólico para raiz foi semelhante ao bulbo e a folha (FIGURA 19).

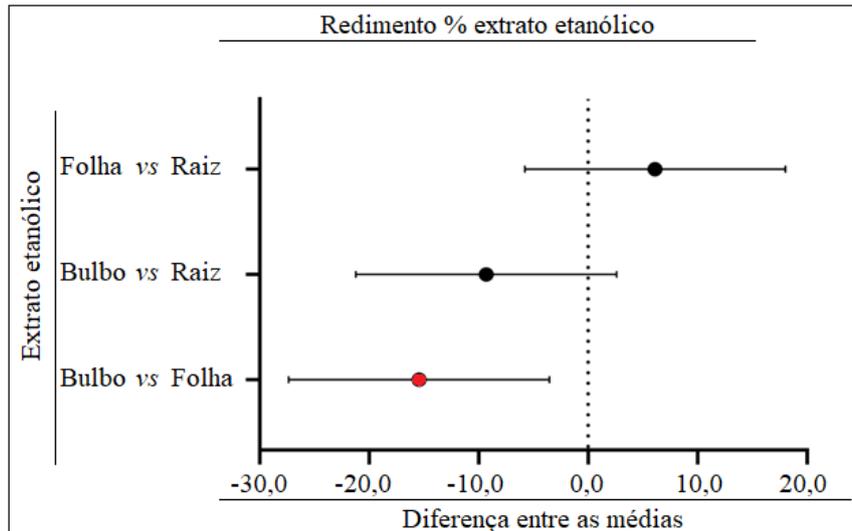


Figura 19: Teste de Tukey (5%): diferença entre as médias dos rendimentos % do bulbo, folha e raiz. Pontos pretos: diferenças entre as médias não significativa ($p > 0,05$), pontos vermelhos: diferenças entre as médias significativa ($p < 0,05$). Barras: intervalo de confiança (95%).

Os extratos foliares apresentaram uma coloração verde/marrom, enquanto os extratos dos bulbos e da raiz apresentaram coloração próxima do incolor (FIGURA 20).

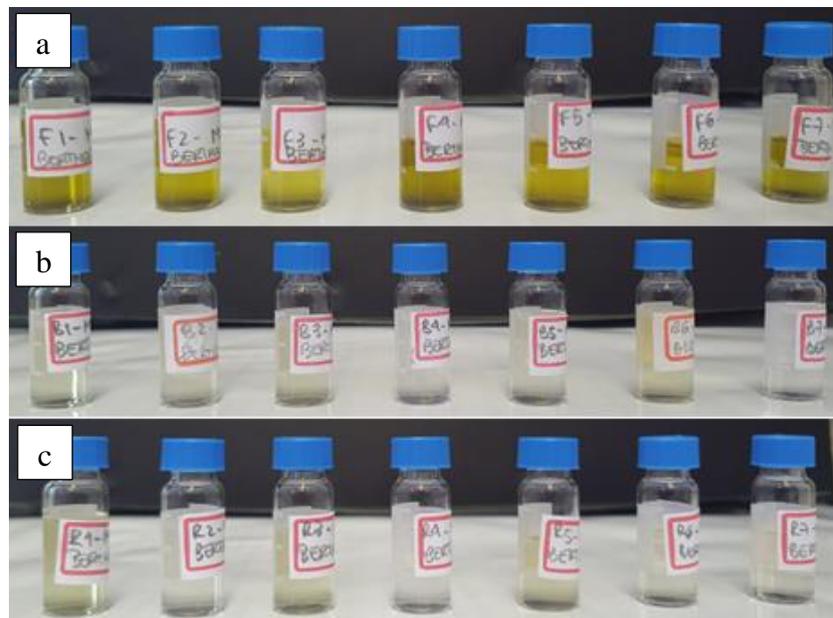


Figura 20: Extratos etanólicos brutos. (a) Folha, (b) bulbo e (c) raiz.

Os tratamentos com menor concentração de sacarose por litro apresentaram um melhor rendimento percentual de extração, observando uma tendência de queda nos cultivos com mais de 45gL^{-1} de sacarose. Estatisticamente, os tratamentos T1, T2, T3, T4, T5 e T6 apresentaram valores

semelhantes, com uma leve diferença positiva para raiz no T2 e uma grande diferença positiva para folha no T3. Inversamente, o T6 apresentou uma leve diferença negativa para o bulbo.

Os melhores resultados obtidos foram dos tratamentos T3 e T2, respectivamente para folha e raiz. Para a raiz, houve interação significativa do carvão ativado com a concentração de 30gL^{-1} de sacarose e para folha, o carvão ativado interagiu com a sacarose influenciando negativamente no rendimento da extração do T4. A concentração de sacarose não influenciou significativamente o rendimento da extração do bulbo, apenas quando interagiu com o CA no tratamento T6.

3.2.3. Perfil fitoquímico CG-EM

Os cromatogramas dos extratos brutos etanólicos de cada tratamento dos bulbos (B1-B7), folhas (F1-F7) e raízes (R1-R7), descritos no item 7. (ANEXOS), apresentaram, após o processamento, a quantidade de picos que variaram respectivamente entre 37(B5) e 60(B6), 13(F3) e 80(F7) e 32(R4) e 58(R1). A caracterização do perfil químico de todos os extratos revelou 15 potenciais compostos para identificação quando foram comparados com o índice de retenção Kovats e o espectro de massa com a base de dados do NIST (TABELA 5). Demais picos não tiveram uma resolução satisfatória para comparação com a mesma base de dados, apresentando baixa similaridade dos seus espectros de massa e IR Kovats fora do intervalo de confiança. No entanto, dos 15 potenciais compostos, apenas o linoleato de etila e o α -terpenil-acetato apresentaram o espectro de massa com similaridade maior que 90% com os dados da base NIST. Para análise, foram selecionados os compostos α -terpenil-acetato, linoleato de etila, clionasterol e licorina (FIGURA 21), pois foram detectados em ao menos 80% dos extratos, com exceção da licorina que foi selecionada por ser um potencial alcaloide para o tratamento da DA. Ainda, esses compostos apresentaram um IR Kovats dentro do intervalo de confiança e espectro de massa com similaridade maior que 80%, e o mais importante, possuem características de interesse medicinal conforme a literatura científica.

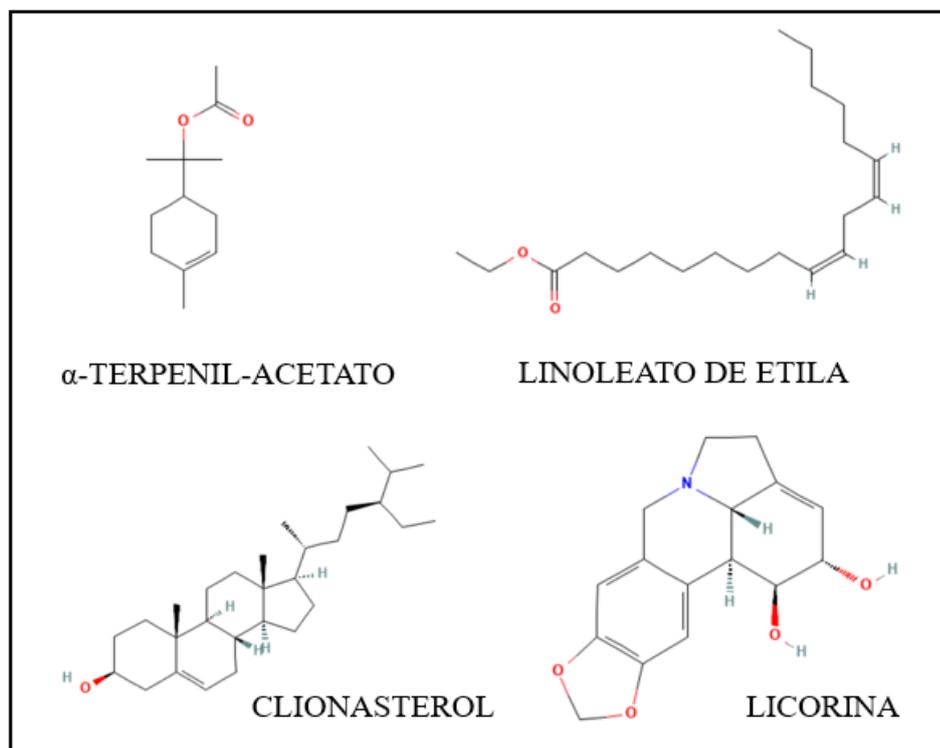


Figura 21: Estrutura química dos compostos selecionados (Fonte: NCBI, PubChem)

Tabela 5: Compostos identificados nos cromatogramas dos extratos etanólicos.

Extrato com a melhor resolução do pico do composto						Fragmentação de massas (Intensidade relativa)	Nome do composto (NIST)
Tratamento	Parte do Vegetal	Tempo de retenção (min)	Match (NIST)	Índice de Retenção	Índice de Retenção (NIST)		
T3	Raiz	14,86	910	1351	1350 ± 3	121 (100), 93 (62), 43 (47), 136 (39), 67 (28), 68 (22), 107 (20), 91 (17), 79 (16), 77 (15)	α-Terpenil acetato
T1	Folha	15,69	783	1390	1396 ± 2	88 (100), 101 (51), 70 (29), 73 (39), 157 (25), 41 (25), 61 (24), 155 (22), 60 (21), 43 (20)	Decanoato de etila
T2	Folha	17,27	569	1499	1499 ± 8	55 (100), 107 (97), 189 (96), 81 (88), 79 (82), 105 (73), 108 (57), 121 (55), 133 (54), 161 (41)	Naftaleno, 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-1,8a-dimetil-7-(1-metiletenil)-, [1S-(1α,7α,8α)]-
T1	Bulbo	18,34	847	1590	1595 ± 2	88 (100), 101 (38), 73 (26), 70 (23), 41 (21), 43 (20), 55 (18), 69 (14), 57 (13), 160 (12)	Dodecanoato de etila
T1	Folha	21,43	738	1832	1837 ± 5	68 (100), 69 (70), 82 (63), 95 (56), 57 (53), 67 (49), 71 (44), 81 (40), 55 (38), 41 (36)	Neofitadieno
T6	Bulbo	22,70	730	1922	1926 ± 2	74 (100), 87 (47), 43 (15), 75 (14), 143 (11), 227 (9), 83 (6), 59 (5), 129 (5), 171 (5)	Hexadecanoato de metila
T2	Bulbo	23,21	722	1956	1968 ± 7	60 (100), 43 (92), 41 (81), 55 (65), 129 (64), 69 (61), 83 (47), 213 (33), 185 (28), 256 (27)	n-Hexadecanoato
T6	Bulbo	23,71	846	1990	1993 ± 3	88 (100), 70 (27), 43 (23), 41 (19), 55 (18), 57 (16), 69 (15), 89 (15), 157 (15), 241 (11)	Hexadecanoato de etila
T7	Raiz	25,24	646	2090	2092 ± 4	81 (100), 67 (70), 68 (47), 41 (41), 82 (33), 96 (31), 69 (28), 79 (27), 64 (24), 109 (21)	Linoleato de metila
T1	Folha	25,30	694	2095	2098 ± 3	79 (100), 67 (83), 95 (56), 108 (48), 80 (48), 93 (47), 55 (43), 69 (28), 77 (28), 107 (26)	α-Linolenato de metila

T7	Raiz	26,27	940	2156	2162 ± 6	67 (100), 81 (94), 95 (57), 82 (48), 55 (48), 79 (43), 41 (42), 68 (42), 69 (35), 109 (32)	Linoleato de etila
T5	Folha	26,37	553	2163	2171 ± 13	79 (100), 95 (82), 81 (62), 108 (40), 41 (40), 44 (32), 55 (29), 93 (25), 149 (17), 119 (16)	α-Linolenato de etila
T5	Bulbo	29,31	769	2353	2374 ± 25	59 (100), 72 (79), 41 (31), 55 (30), 69 (24), 43 (22), 83 (15), 67 (14), 81 (13), 126 (12)	Octadecanamida
T5	Folha	34,88	853	2734	2747 - N/A	226 (100), 250 (62), 227 (52), 287 (23), 268 (19), 286 (16), 228 (10), 240 (6), 269 (6), 270 (5)	Licorina
T7	Folha	42,29	818	3310	3321 ± 31	43 (100), 107 (88), 145 (82), 414 (77), 55 (77), 81 (75), 161 (72), 95 (72), 213 (68), 93 (66)	Clionasterol

3.2.3.1. α -terpenil acetato

Na identificação do composto por meio comparativo do IR Kovats, o α -terpenil-acetato apresentou índice no valor de 1351, dentro do IC do IR NIST (1350 ± 3) e uma similaridade de 0,910 no espectro de massa (FIGURA 22).

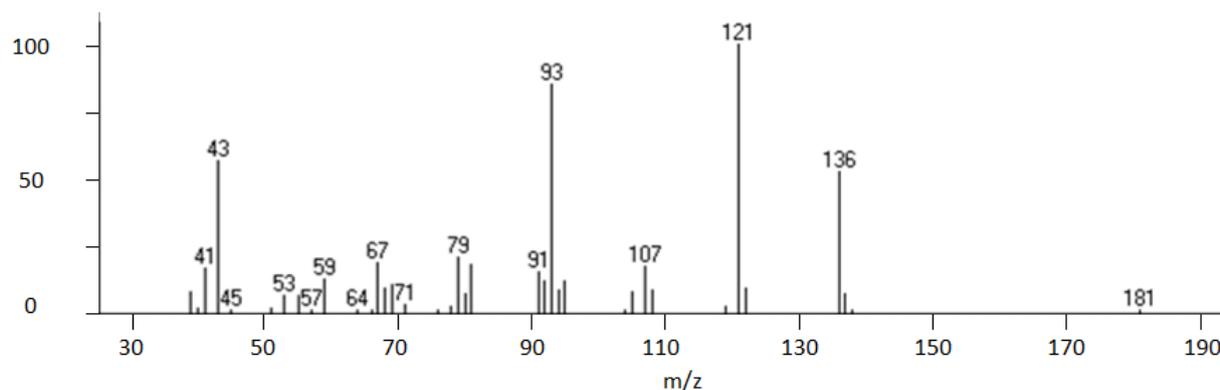


Figura 22: Espectro de massa do α -terpenil-acetato

O extrato etanólico do tratamento T2 (Sacarose 30gL^{-1} e $1,0\text{g}$ de CA) apresentou o maior percentual de área no cromatograma de α -terpenil-acetato, sendo $10,70\%$ e $53,06\%$, respectivamente para bulbo e folha, no entanto, o extrato da raiz não apresentou diferença entre os demais tratamentos. Os resultados desse estudo demonstram que a abundância de α -terpenil-acetato variou devido ao tratamento com sacarose e CA, havendo interação positiva significativa entre ambos no tratamento T2 para folha e bulbo, e negativa no T3 para raiz, pois o extrato sem CA apresentou valor superior ao extrato com CA (T4). Foi observado que a abundância de α -terpenil-acetato decresceu da folha para o bulbo e do bulbo para raiz no T2, e o inverso ocorreu com o T3, onde houve um aumento da abundância nesse sentido. O tratamento controle T7 (substrato em casa de vegetação) não apresentou vantagem na produção quando comparado ao tratamento *in vitro*, e esse, demonstrou ser uma opção promissora para aumentar a produção desse composto (FIGURAS 23 e 24).

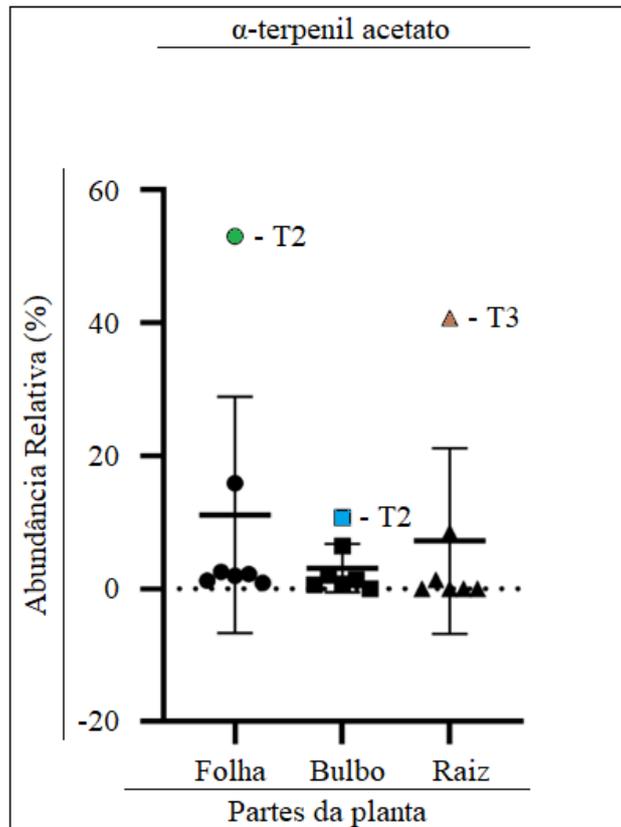


Figura 23: Abundância relativa do α -terpenil acetato de cada extrato etanólico. Pontos coloridos: resultado significativo ($p < 0,05$), pontos pretos: resultado não significativo ($p > 0,05$). Barras verticais: intervalo de confiança (95%).

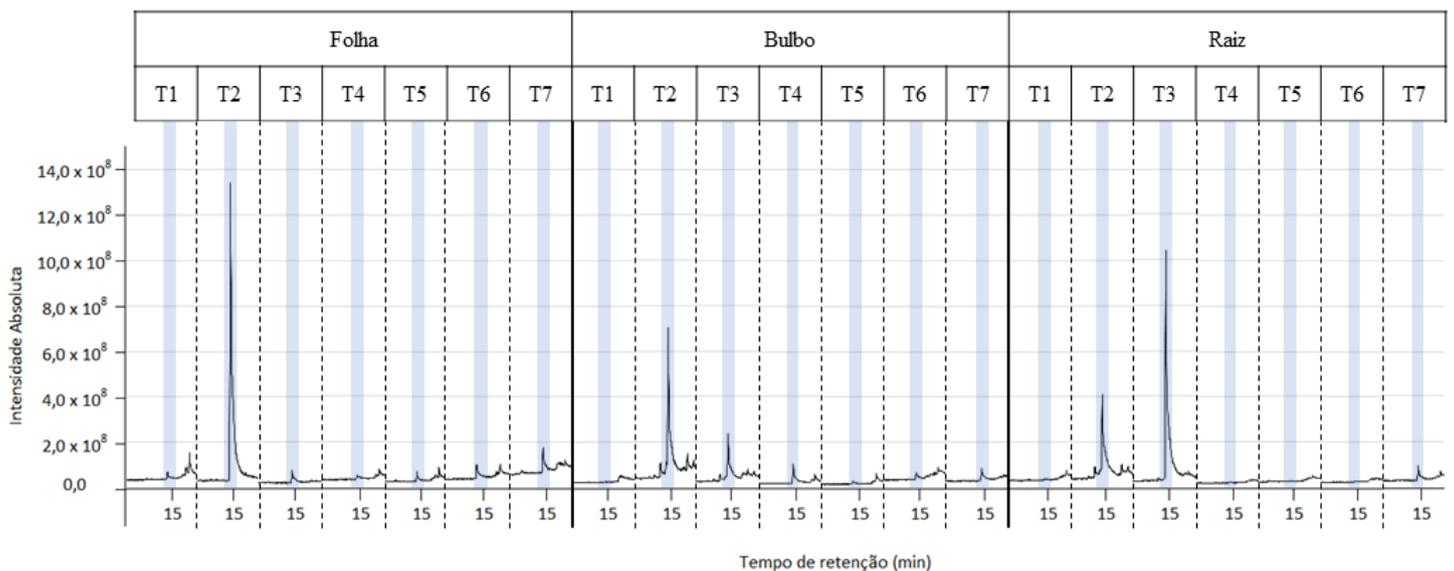


Figura 24: Pico do composto α -terpenil acetato no cromatograma de cada extrato etanólico (coluna azul).

3.2.3.2. Linoleato de etila

Na identificação do composto por meio comparativo do IR Kovats, o linoleato de etila apresentou índice no valor de 2156, dentro do IC da base de dados do NIST (2162 ± 6) e uma similaridade no espectro de massa de 0,934 (FIGURA 25). O cromatograma dos picos está apresentado na figura 24.

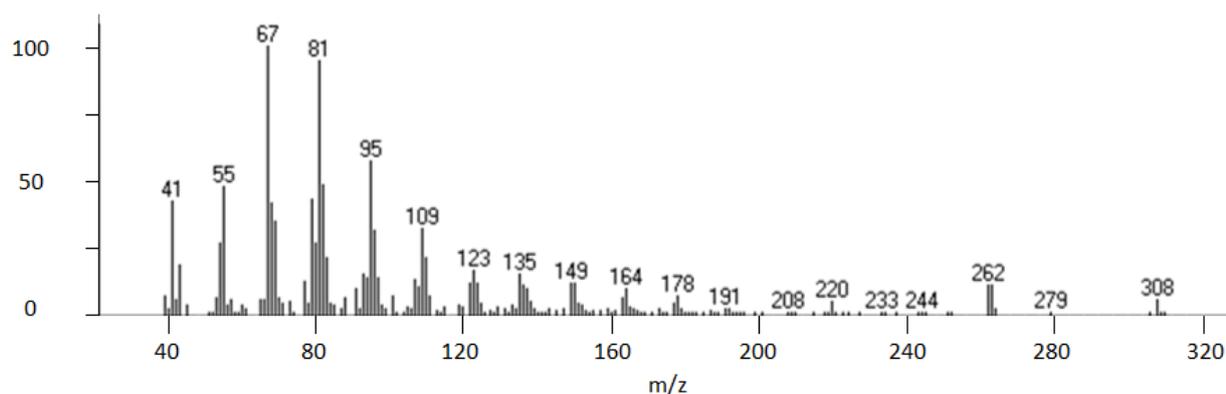


Figura 25: Espectro de massa do linoleato de etila.

O extrato etanólico bruto do tratamento controle T7 (substrato em casa de vegetação) apresentou o maior percentual de área para o bulbo e raiz, respectivamente, 38,68% e 38,41%, em comparação aos demais tratamentos (T1-T6), e esses, não apresentaram diferença significativa entre eles (FIGURA 23). Não foi identificado o composto no extrato foliar e radicular do T2 (sacarose 30gL^{-1} e 1,0g de CA) e no extrato foliar do T3 (sacarose 45gL^{-1} sem CA). Os extratos foliares apresentaram uma abundância que variou entre 1,59% e 6,98%, muito abaixo das abundâncias máximas encontradas para o bulbo e raiz. Isso sugere que a folha não é promissora para a extração desse composto. Para os demais extratos, não houve diferença significativa quando analisados e comparados dentro da mesma parte da planta (FIGURAS 26 e 27).

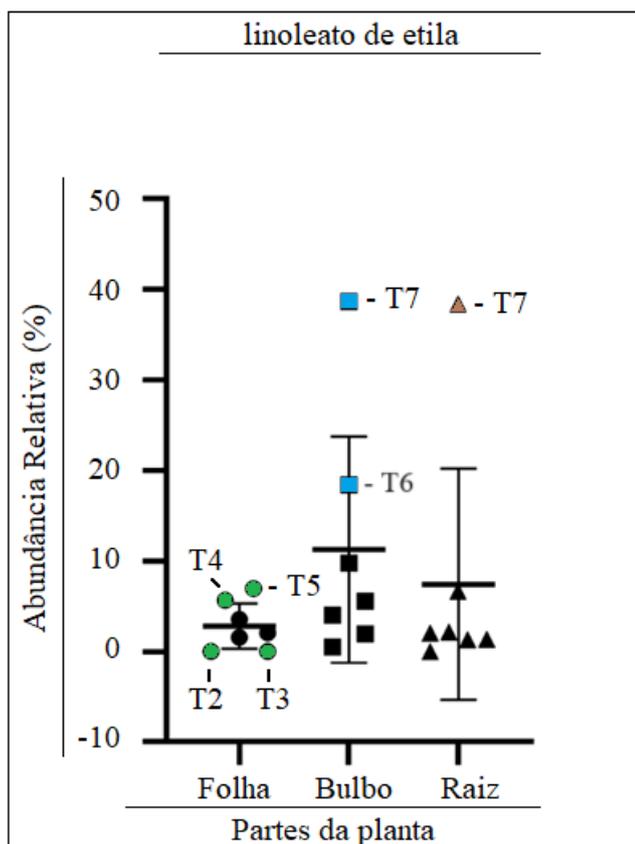


Figura 26: Abundância relativa do linoleato de etila de cada extrato etanólico. Pontos coloridos: resultado significativo ($p < 0,05$), pontos pretos: resultado não significativo ($p > 0,05$). Barras verticais: intervalo de confiança (95%).

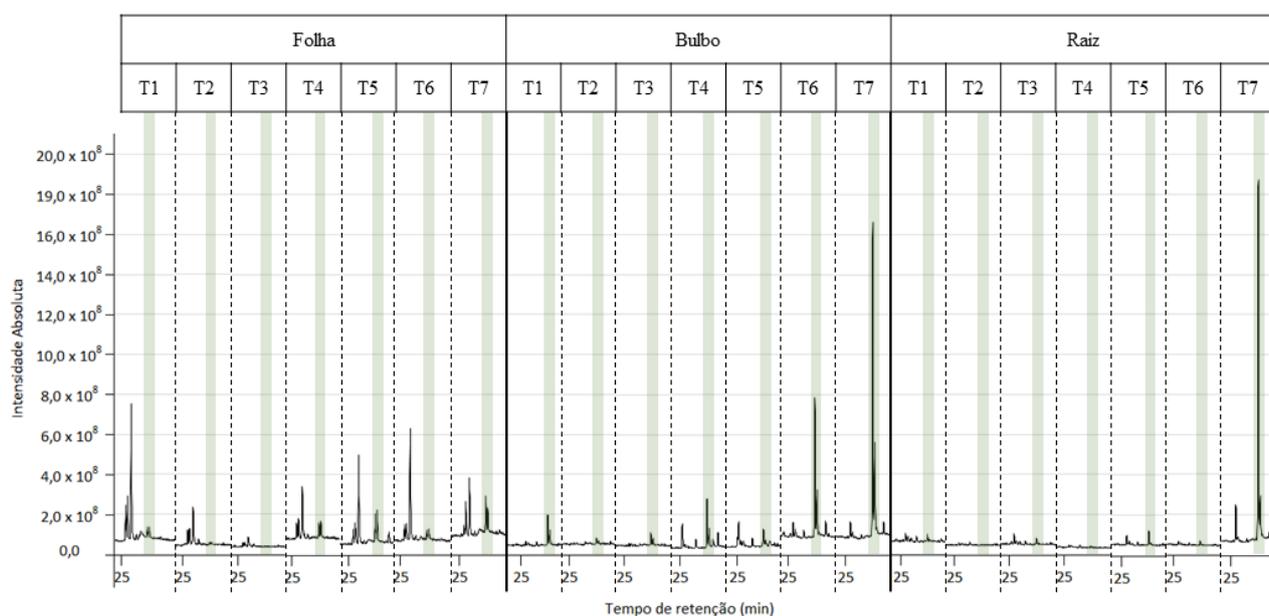


Figura 27: Pico do composto linoleato de etila no cromatograma de cada os extratos etanólico (coluna verde).

3.2.3.3. Clionasterol

Na identificação do composto por meio comparativo do IR Kovats, o clionasterol apresentou índice no valor de 3310, dentro do IC da base de dados do NIST (3321 ± 31) e uma similaridade no espectro de massa de 0,818 (FIGURA 26). Os extratos da raiz apresentaram as duas maiores abundâncias relativas de 14,34% e 13,94%, respectivamente para o T6 e T4, sendo significativamente superior aos demais extratos. Os tratamentos T2 e T5 apresentaram as menores abundâncias e ambas foram do intervalo de confiança. Os demais tratamentos foram estatisticamente iguais.

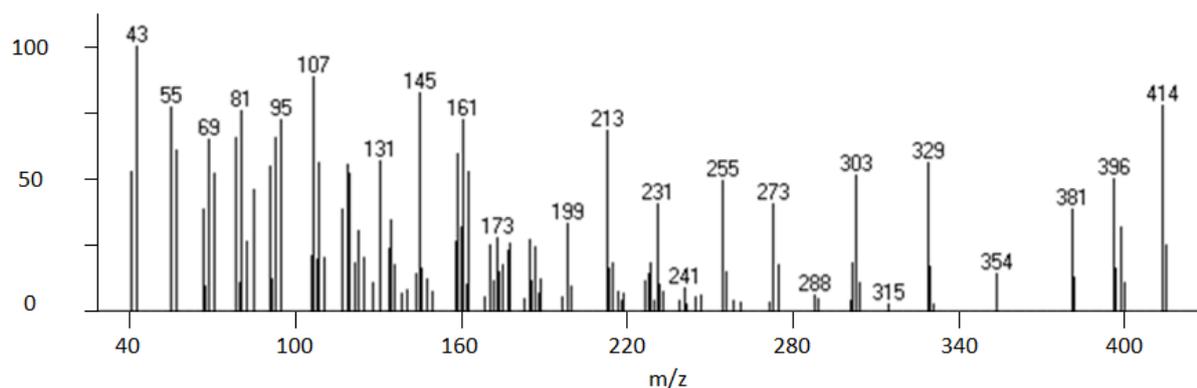


Figura 28: Espectro de massa do clionasterol.

Para o bulbo, os tratamentos T2-T5 apresentaram abundância relativa entre 1,00% e 2,00% e os valores significativamente superior foram obtidos nos tratamentos T1 (5,60%) e T6 (4,58%). No geral, o tratamento T6 apresentou os melhores resultado, pois para o bulbo e raiz foi estatisticamente superior aos demais e para folha, apresentou a segunda maior abundância. O tratamento controle T7 apresentou a maior abundância dos extratos etanólicos foliar, de 11,62%, no entanto, apresentou a menor abundância para raiz (0,73%). Interessante que o tratamento T1 também apresentou bons resultados em termos gerais, semelhante ao T6, no entanto a composição dos meios de cultura difere na concentração de sacarose e no uso do CA. O T6 foi superior apenas no extrato da raiz e o T1 no extrato da folha e bulbo (FIGURAS 29 e 30).

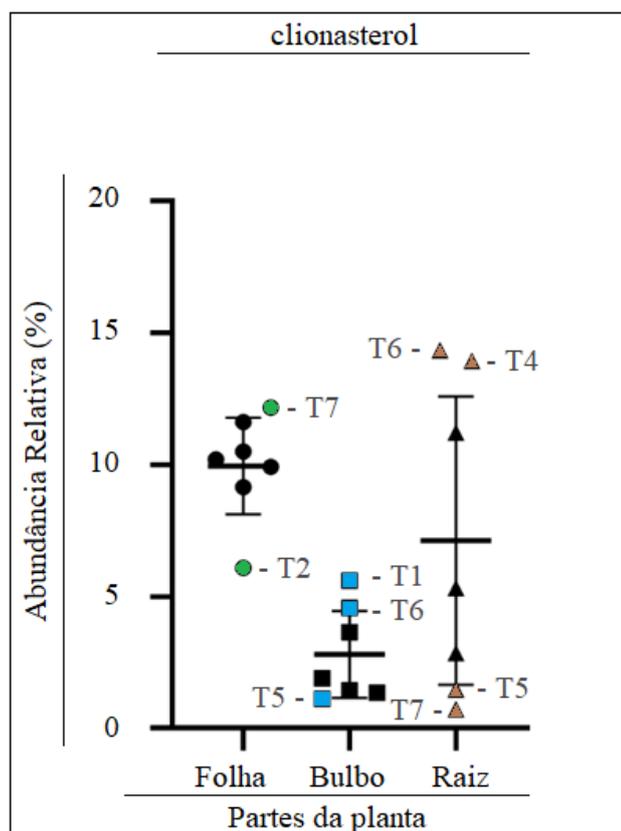


Figura 29: Abundância relativa do clionasterol de cada extrato etanólico. Pontos coloridos: resultado significativo ($p < 0,05$), pontos pretos: resultado não significativo ($p > 0,05$). Barras verticais: intervalo de confiança (95%).

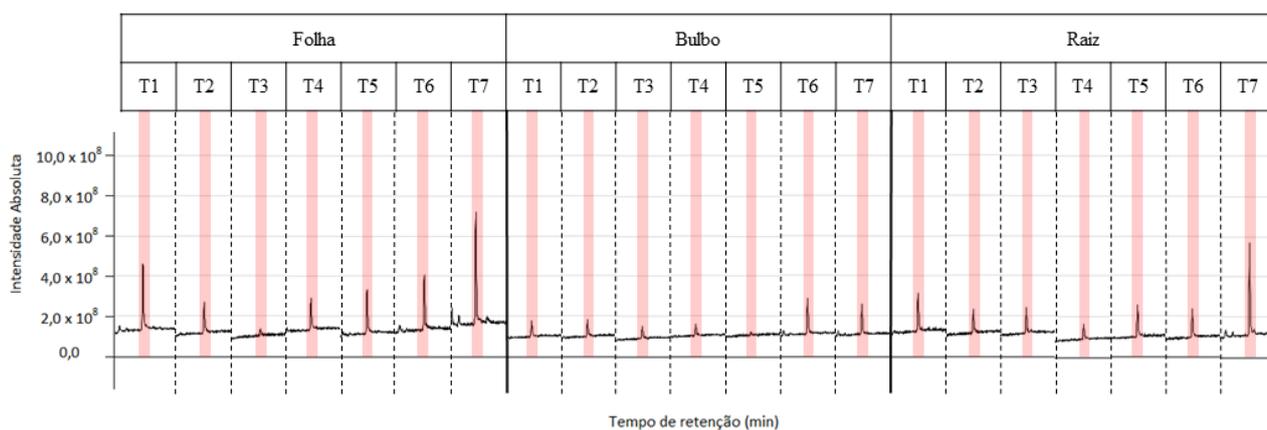


Figura 30: Pico do composto clionasterol no cromatograma de cada extrato etanólico (coluna rosa).

3.2.3.4. Licorina

Na identificação do composto por meio comparativo do IR Kovats, a licorina apresentou índice no valor de 2734, fora do IC da base de dados do NIST (2747 N/A) e uma similaridade no espectro de massa de 0,853 (TABELA 6). O espectro de massa da licorina está destacado na figura 31.

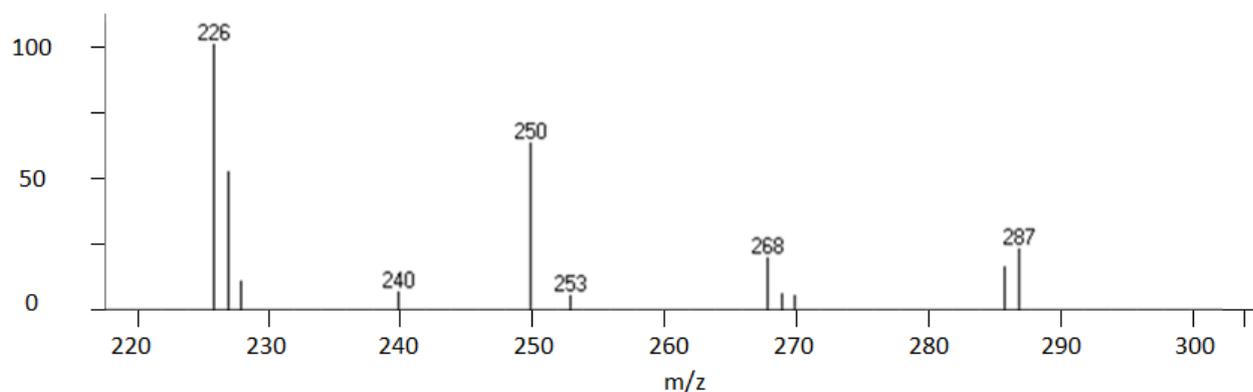


Figura 31: Espectro de massa da licorina.

Foram identificados o alcaloide licorina no bulbo dos tratamentos T1, T3, T6 e T7, apresentando respectivamente, uma abundância relativa de 0,74%, 0,32%, 1,09% e 0,59%, e na folha dos tratamentos T1, T5, T6 e T7, respectivamente, 0,87%, 2,57%, 0,86%, 0,54%. Não foram detectados alcaloide nos extratos radiculares (FIGURA 32).

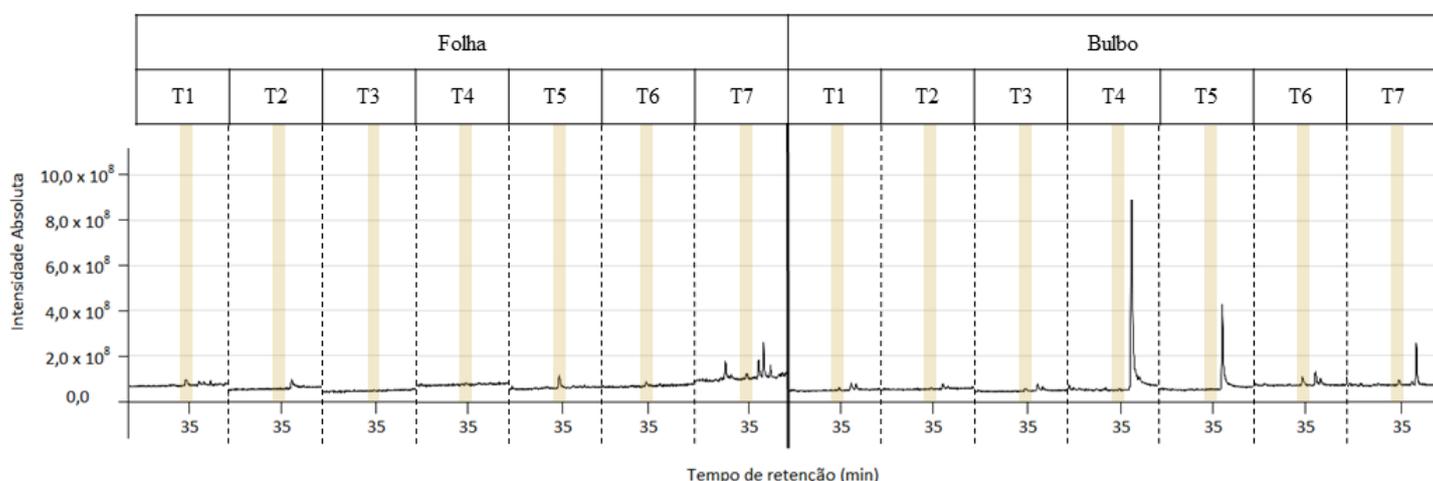


Figura 32: Pico do composto licorina no cromatograma de cada o extrato etanólicos do bulbo e da folha (coluna amarela).

Os tratamentos T1, T6 e T7 apresentaram valores próximos de abundância relativa para o bulbo e folha, no entanto para folha, o T5, quando comparado ao T6, apresentou um valor muito

superior, indicando que o CA interagiu negativamente com a concentração de 60gL⁻¹ de sacarose. O mesmo ocorreu na concentração de 30gL⁻¹ de sacarose, pois não foi detectada a licorina no T2 em nenhuma parte do vegetal. Ainda, o tratamento que apresentou a maior abundância relativa foi o extrato foliar do T5.

Para o bulbo, o CA interagiu positivamente com a concentração de 60gL⁻¹ de sacarose, pois detectado a licorina no T6, mas não no T5. O contrário aconteceu na concentração de 30 e 45gL⁻¹. A melhor concentração de sacarose foi de 60gL⁻¹ para o bulbo e para folha, apresentando respectivamente 1,09% (T6) e 2,57% (T5) de abundância relativa.

3.2.4. Histolocalização de alcaloides nas folhas e bulbos

Os testes histoquímicos nos indivíduos do tratamento T1 (*in vitro*) com os reagentes de Dragendorff e Wagner foram positivos para folha e bulbo, onde observou-se a formação de uma coloração vermelha acastanhado em ambos, indicando a presença de alcaloides. Os grânulos de coloração marrom escura evidenciam a presença de grãos de amido nos bulbos. Nas folhas, os alcaloides foram detectados apenas nas células do clorênquima do tipo paliçádico e esponjoso, presente em diversas células nas margens foliares, logo abaixo da epiderme adaxial (FIGURA 33). Uma menor intensidade da presença de alcaloides foi detectada nas células do clorênquima que acompanham a epiderme adaxial e abaxial (FIGURA 34). Não foram detectados alcaloides no parênquima esponjoso, nos feixes vasculares, nem em outras estruturas presentes na folha.

No bulbo, foi observado uma forte presença de alcaloides na região adjacente a epiderme que está voltada para o exterior de cada catafilo, decrescendo à medida que o catafilo atinge posições mais extremas do bulbo, ou seja, mais distante do centro bulboso. (FIGURA 35 e 36). Essa região é composta por parênquima de reserva amilífero e foi observado que a concentração dos grãos de amidos organiza-se de forma semelhante aos alcaloides no catafilo, ou seja, regiões do catafilo com maior concentração de alcaloide são as mesmas que apresentam as maiores concentrações de grãos de amido (FIGURA 36). A tabela 6 apresenta a intensidade da presença dos alcaloides conforme o teste histoquímico utilizado.

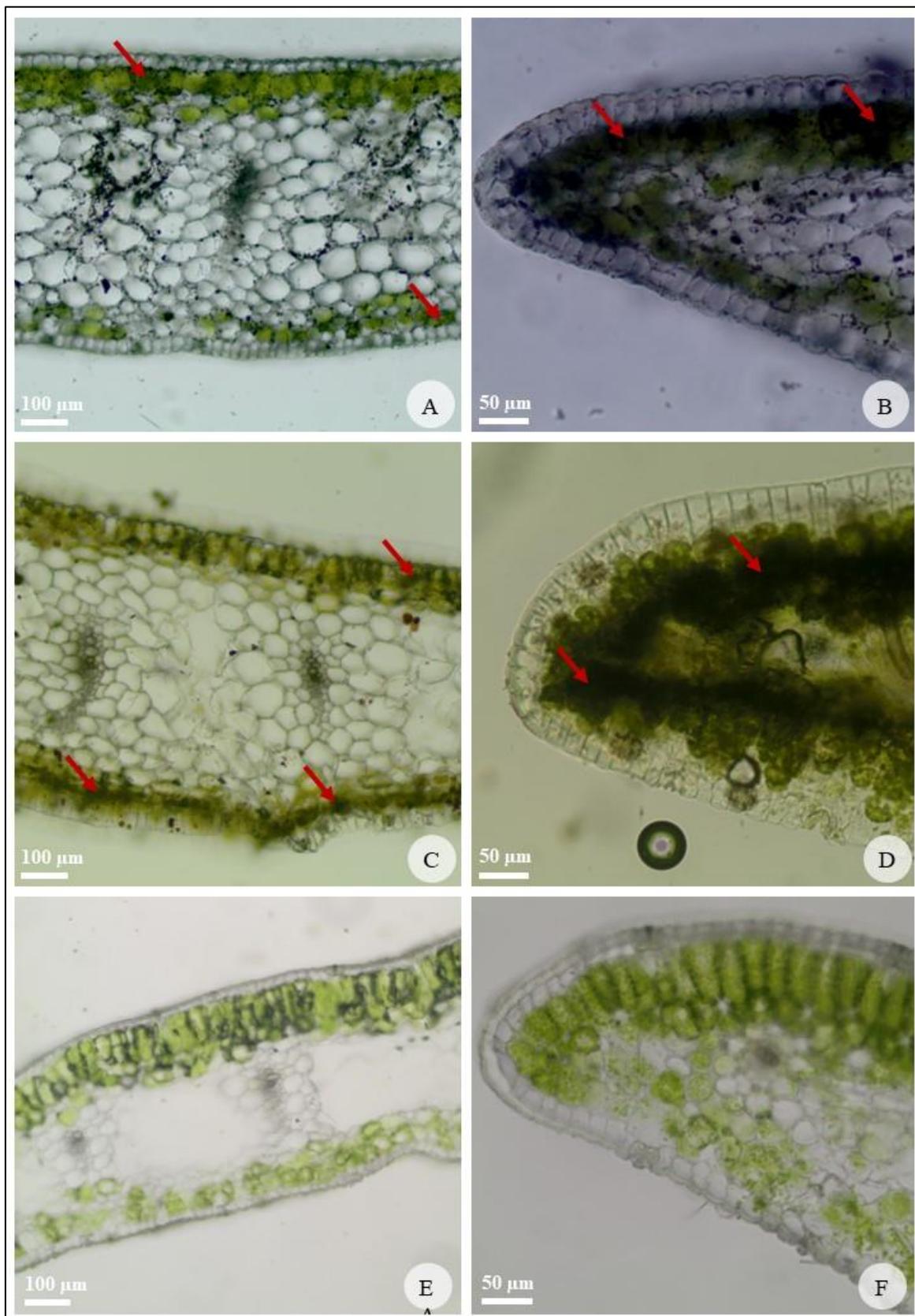


Figura 33: Reações histoquímicas nas folhas frescas da *Zephyranthes irwiniana* em detalhes (secção transversais). As setas vermelhas indicam a presença dos alcaloides. **A, B** – Teste de Dragendorff. **C, D** – Teste com reagente de Wagner. **E, F** – Controle (sem reagentes).

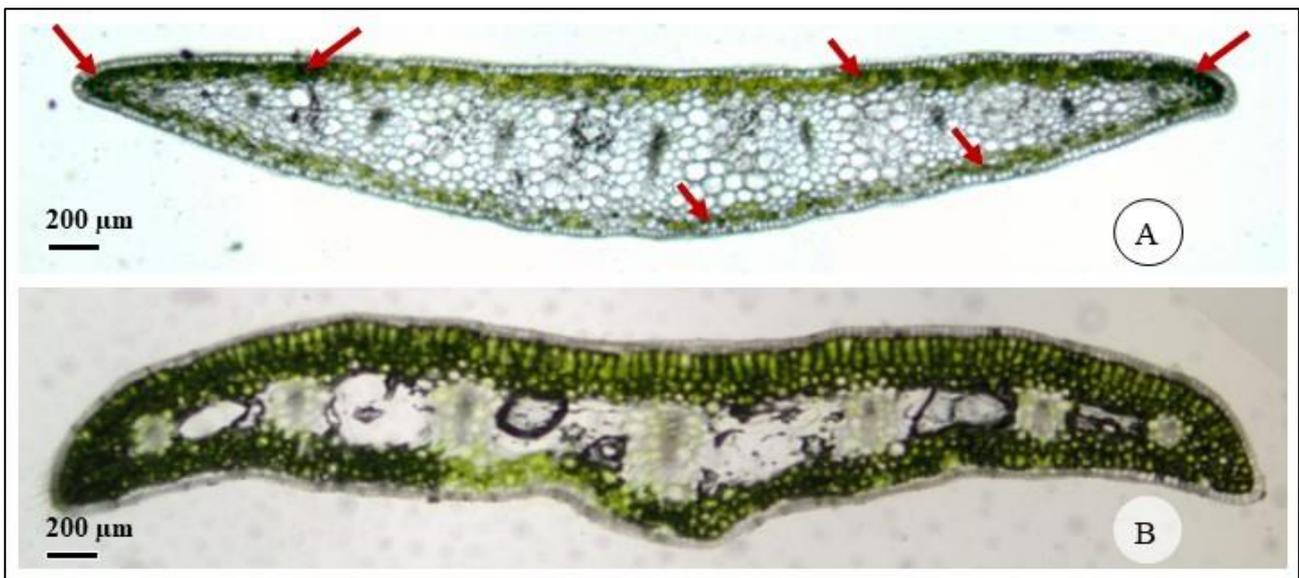


Figura 34: Reações nas folhas frescas da *Zephyranthes irwiniana* (secção transversais) submetidas a testes histoquímicos. As setas vermelhas indicam a presença dos alcaloides. **A** – Dragendorff. **B** – Controle (sem reagente).

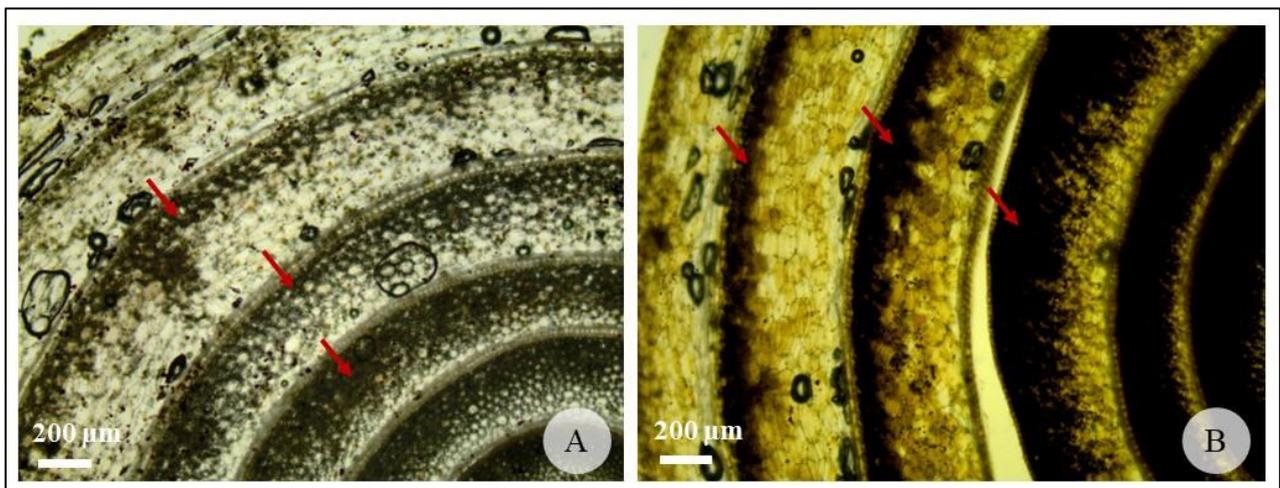


Figura 35: Reações nos bulbos frescos da *Zephyranthes irwiniana* (secção transversais) submetidas a testes histoquímicos. As setas vermelhas indicam a região com maior intensidade de alcaloides. **A** – Dragendorff. **B** – Teste com reagente de Wagner.

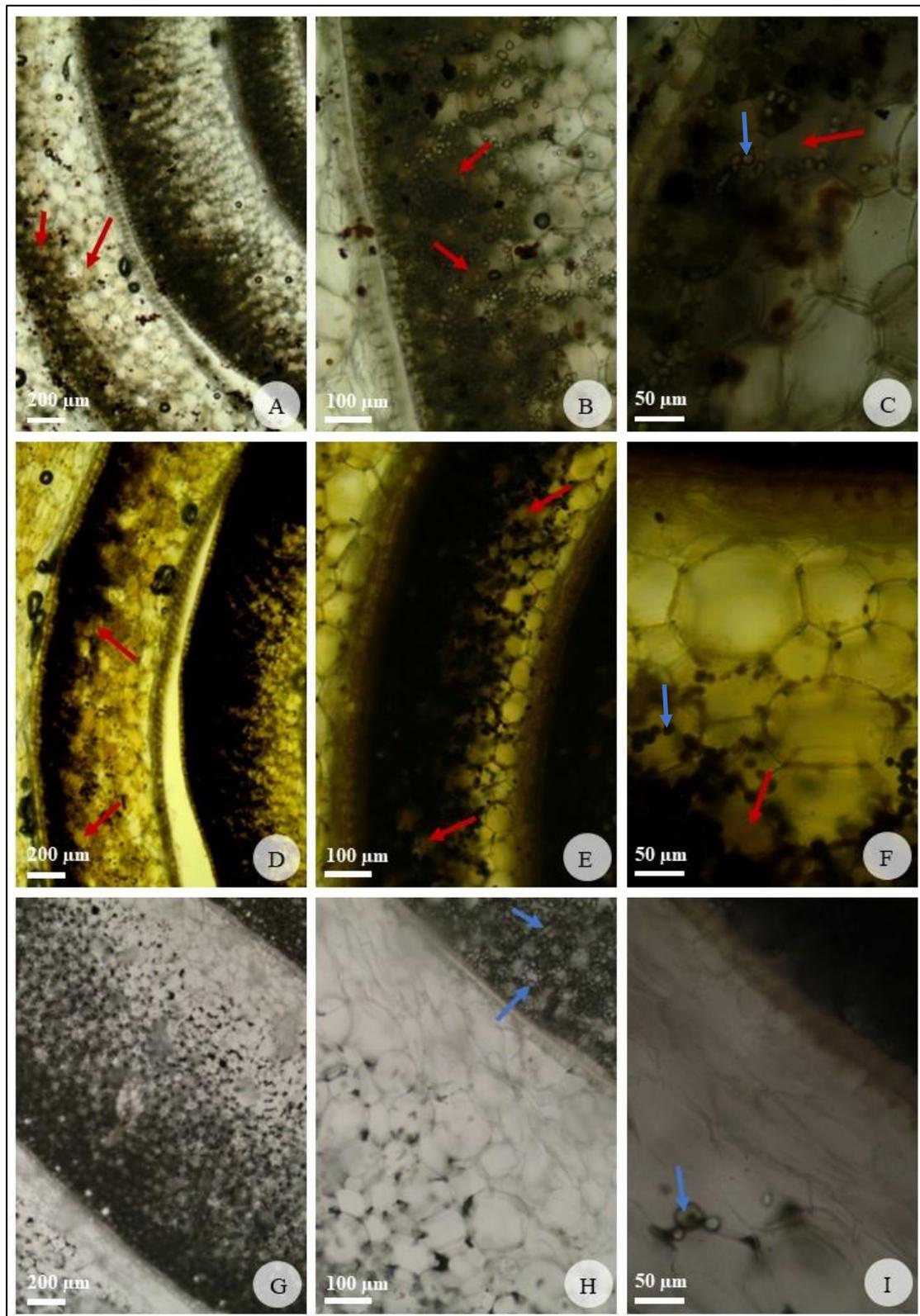


Figura 36: Reações nos bulbos frescos da *Zephyranthes irwiniana* (secção transversais) submetidas a testes histoquímicos. As setas vermelhas indicam a presença dos alcaloides. As setas azuis indicam os grãos de amido. **A, B, C** – Bulbo fresco submetida ao teste histoquímico com o reagente de Dragendorff. **D, E, F** – Bulbo fresco submetida ao teste histoquímico com o reagente de Wagner. **G, H, I** – Controle (sem reagente).

Tabela 6: Intensidade da reação histoquímica nas folhas e bulbos frescos da *Zephyranthes irwiniana*. A quantidade de sinais (+) indicam a intensidade da reação.

Composto	Teste	Folhas	Bulbos
Alcaloide	Drangendorff	+	+
	Wagner	+	++

4. DISCUSSÃO

4.1. Influência da sacarose e do carvão ativado no crescimento vegetativo

O presente estudo mostrou que a concentração de sacarose e o uso do CA no meio de cultura influenciam significativamente o crescimento vegetativo e, principalmente, a fitoquímica da *Z. irwiniana*. Os indivíduos propagados em casa de vegetação tiveram baixa taxa de germinação (6,79%), muito inferior a obtida no cultivo *in vitro* (96,86%). Os resultados obtidos na propagação *in vitro* mostraram-se muito promissores, sendo uma estratégia eficiente para propagação da espécie *Z. irwiniana*, e a baixa taxa de germinação registrada na propagação em casa de vegetação está em acordo com Herranz *et al.* (2020), que afirmam que a família Amaryllidaceae possui uma pequena taxa de multiplicação natural. Em relação ao sucesso germinativo obtido na propagação *in vitro*, esse foi superior ao observado para outras espécies de Amaryllidaceae. Rodrigues *et al.* (2020) observaram que a germinação *in vitro* de sementes sem tegumento de *Hippeastrum x hybridum* foi maior do que com tegumento, germinando respectivamente 90% e 28%. Herranz *et al.* (2013a, b) observaram uma taxa de germinação entre 70-80% para a espécie *Narcissus alcaracensis* S. Ríos, D. Rivera, Alcaraz & Obón e 80% para *Narcissus hispanicus* Gouan após tratamento a frio em sementes frescas. O presente estudo observou que mesmo sem tratamento, as sementes de *Z. irwiniana* tiveram uma taxa de germinação *in vitro* maior que outras espécies de Amaryllidaceae, e isso pode ser uma vantagem em relação aos custos de produção, quando comparado a propagação de espécies que produzem o mesmo metabólito secundário de interesse.

O incremento de biomassa dos indivíduos cultivados em casa de vegetação foi superior aos indivíduos cultivados *in vitro*, com destaque para o bulbo que representou, em média, 78,8% da biomassa total (raiz, folha e bulbo). A biomassa fresca e seca total, obtida pela soma dos indivíduos cultivados em casa de vegetação, foi muito superior quando comparadas as obtidas em todos os tratamentos do cultivo *in vitro*, independente da concentração de sacarose e do uso do CA no meio de cultura. Esses resultados são ainda mais significativos quando comparamos a quantidade de indivíduos utilizados para obter a biomassa total por tratamento, que foi de 7 indivíduos no cultivo

em casa de vegetação e uma média de 21 indivíduos para cada tratamento cultivado *in vitro*. Dessa forma, o presente estudo sugere que a germinação e cultivo em casa de vegetação é mais vantajoso em termos de incremento de biomassa do que *in vitro*, principalmente se o alvo for o bulbo. Isso indica que a luminosidade é fundamental para o crescimento vegetativo dessa espécie, e novos estudos poderão avaliar o uso da germinação *in vitro*, que apresentou uma elevada taxa de germinação nesse estudo, seguido do cultivo em casa de vegetação, e verificar se é mais eficiente para o incremento de biomassa do que as metodologias aqui testadas.

A influência da sacarose no crescimento vegetativo observada no presente estudo está em acordo com a literatura. A melhor produtividade de biomassa observada foi obtida utilizando a concentração de 60gL^{-1} de sacarose, que influenciou positivamente também o número de raízes. Ainda, essa concentração não influenciou negativamente as outras variáveis. Juan-Vicedo *et al.* (2019) observaram um aumento na produção de biomassa da espécie *Lapiedra martinezii* Lag. (Amaryllidaceae) relacionado com a maior concentração de sacarose, sendo que o maior aumento na produção de biomassa encontrado também foi para concentração de 60gL^{-1} de sacarose sem carvão ativado. Outros estudos também observaram que uma maior concentração de sacarose no meio de cultura melhorou o desenvolvimento de bulbos em cultivares e espécies de Amaryllidaceae (STAIKIDOU *et al.*, 2005; BERKOV *et al.*, 2009 a, b). No entanto, esses estudos avaliaram apenas a produção de biomassa relacionada a variação da concentração de sacarose, diferente do presente estudo, que avaliou também o tamanho das folhas e raízes principais, o número de folhas e raízes e, principalmente, a influência da interação da sacarose com o CA no crescimento vegetativo e na fitoquímica de espécie de Amaryllidaceae. Ao avaliar se a interação da sacarose na concentração de 60gL^{-1} com o CA foi significativa, observou-se que foi positiva para a produção de biomassa seca e negativa para o número de raízes. Interessante destacar que a extração de metabólitos secundários é realizada da biomassa seca, e o uso do CA resultou num aumento significativo de incremento dessa biomassa seca, mostrando que usar CA no meio de cultura juntamente com 60gL^{-1} pode ser uma alternativa melhor do que a utilizada convencionalmente (60gL^{-1} sem CA) na propagação de espécie de Amaryllidaceae para produção de metabólitos secundários.

Outros estudos observaram que a melhor concentração de sacarose no meio de cultura para incremento de biomassa foi 90gL^{-1} (SELLÉS *et al.*, 1997; PTAK *et al.*, 2020). Essa concentração não foi testada nesse estudo, sendo interessante testar a interação do CA com a concentração de sacarose de 90gL^{-1} em estudos posteriores, visto que houve interação significativa e positiva na concentração de 60gL^{-1} para o incremento da biomassa seca.

Diferente da sacarose, o carvão ativado não influenciou no incremento de biomassa fresca e seca, no entanto, apresentou influência significativa e positiva no número de folhas e no comprimento

das folhas e raízes sem a interação significativa das concentrações de sacarose. Poucos estudos anteriores avaliaram a influência do CA no crescimento vegetativo *in vitro* de Amaryllidaceae, e os resultados obtidos no presente estudo mostram que o uso do CA podem influenciar positivamente no crescimento vegetativo e na fitoquímica, sendo assim, importante avaliar seu efeito também em outras espécies de interesse. Tahchy *et al.* (2011) observaram que a adição de carvão ativado em culturas de tecido *in vitro* de três espécies de Amaryllidaceae (*Narcissus pseudonarcissus* L., *Galanthus elwesii* Hook. f., e *Leucojum aestivum* L.) não foi benéfica em nenhuma concentração utilizada (0,0, 5,0 e 10,0 gL⁻¹), apresentando sempre um efeito negativo na sobrevivência, calosidade e organogênese. Ainda, observaram que a concentração de CA no meio nutritivo diminui a taxa de formação de bulbo e raiz. Juan-Vicedo *et al.* (2019) não observaram diferenças das características morfométricas entre as plântulas da espécie *Lapiedra martinezii* cultivadas *in vitro* com CA e espécimes selvagens, encontrando estabilidade dos materiais produzidos *in vitro*. Ao contrário desses estudos, o presente estudo observou que o uso do CA resultou na produção de folhas e raízes com comprimento maior e, no caso do número de folhas, estimulou a produção. Esses resultados indicam que o uso do CA pode ser uma alternativa vantajosa quando o objetivo da propagação for a produção de mudas para comercialização, visto que as espécies de Amaryllidaceae, geralmente, apresentam potencial ornamental. Assim, o uso do CA deve depender dos objetivos propostos, pois foi positiva para o comprimento das folhas e raízes, mas negativo para o número de raízes. Estudos anatômicos poderão fornecer novas informações sobre a influência da sacarose e do CA na morfologia da espécie *Z. irwiniana* micropropagada *in vitro*.

As plantas propagadas em casa de vegetação, mesmo apresentando o melhor incremento em biomassa quando comparados as plântulas propagadas *in vitro*, tiveram os menores rendimentos de extração etanólica. Isso sugere que a produtividade de biomassa não resultou numa maior produtividade de metabólitos, ainda, no cultivo *in vitro*, os tratamentos com menor concentração de sacarose por litro apresentaram um melhor rendimento percentual de extração, observando uma tendência de queda nos cultivos com mais de 45gL⁻¹ de sacarose. Quando o objetivo é a produção de metabólitos secundários, melhorar o rendimento de extração é muito importante para aprimorar eficiência de todo o processo, e altos rendimentos resultam num custo menor da produção de biomassa vegetal, pois utiliza-se menos indivíduos para obter a mesma quantidade de extrato. Nesse aspecto, o cultivo *in vitro* mostrou-se a melhor alternativa para produção de extratos etanólicos brutos, com destaque para a folha, que apresentou os melhores rendimentos de extração nos cultivos que não utilizaram o CA. Possivelmente, esses resultados estão relacionados a alta capacidade do CA de adsorção de reguladores de crescimento de plantas e outros compostos orgânicos (PAN; STADEN,

1998), por ser constituído por uma rede muito fina de poros e uma área de superfície extraordinariamente grande (BAKER *et al.*, 2000).

4.2. Influência da sacarose e do carvão ativado na fitoquímica

Estudos anteriores investigaram o perfil fitoquímico de espécies vegetais (ORTIZ *et al.*, 2012; TALLINI *et al.*, 2018; MORENO *et al.*, 2020) ou a variação desse perfil e da abundância relativa do composto alvo para a mesma espécie, variando o método de propagação e extração, a composição do meio de cultura ou parte vegetal utilizada (SELLÈS *et al.*, 1997; COSTA *et al.*, 2019; FERDAUSI *et al.*, 2020; PTAK *et al.*, 2020). Diferente desses, o presente estudo utilizou o CA para avaliar se a interação com a sacarose em diferentes concentrações resultaria na variação das abundâncias relativas para o mesmo composto alvo. As variações observadas no perfil químico dos cromatogramas dos extratos etanólicos brutos do presente estudo, revelaram a influência da sacarose e do CA na biossíntese de metabólitos, mostrando que afetaram a abundância relativa dos compostos α -terpenil-acetato, linoleato de etila, clionasterol e licorina, na folha, no bulbo e na raiz.

O α -terpenil-acetato é um éster monoterpeno e um metabólito secundário (VAIČIULYTĖ *et al.*, 2021), encontrado em óleos essenciais de plantas como a *Elettaria cardamomum* (L.) Maton (KASKOOS *et al.*, 2006; CHOWDHURY; KUMAR, 2020), entre outras (USAI *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2007). Esse composto é estudado quanto à atividade anticolinesterásica e atividade antioxidante, além disso, as propriedades de ancoragem molecular, físico-químicas e ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) também foram determinadas para prever se ele é oralmente ativo e possui propriedades medicamentosas do sistema nervoso central (SNC) (CHOWDHURY; KUMAR, 2020). Ainda, recentemente, foram conduzidos estudos de inibição do vírus SARS-CoV-2 (KUMAR *et al.*, 2021).

Em relação ao potencial anticolinesterásico do α -terpenil-acetato, Chowdhury e Kumar, (2020) concluíram em seu estudo que o esse composto se liga a múltiplos alvos de drogas implicados na Doença de Alzheimer e ainda, demonstrou ser anticolinesterásico, antioxidante, antiamiloidogênico e potencial neuroprotetor, podendo ser usado como uma pista para desenvolver uma nova terapia, segura e eficaz para a DA.

Vaičiulytė *et al.* (2021) encontraram uma abundância relativa máxima de 64,22% para as partes aéreas da espécie *Thymus pulegioides* L. e no estudo de Michet *et al.* (2008) foi relatado uma variação entre 64,8-88,0%, também para as partes aéreas, sendo, o α -terpenil-acetato, o composto dominante do óleo essencial para essa espécie selvagem. Alam *et al.* (2019) encontraram para três

variedades de frutos de *E. cardamomum* uma abundância relativa entre 41,42-55,36%. Para a espécie *Z. irwiniana*, foi registrado nesse estudo uma abundância relativa máxima de 53,06% no extrato foliar de indivíduos cultivados na concentração de 30gL⁻¹ de sacarose e 1,0gL⁻¹ de CA. Esse resultado sugere que a interação do CA nessa concentração de sacarose é muito vantajosa para a produção de α -terpenil-acetato, pois foi muito superior a abundância relativa obtida nos outros extratos, com potencial para replicar em cultivos *in vitro* de diferentes espécies que objetivam a produção desse composto.

O linoleato de etila (sinônimo: éster etílico do ácido linoleico) é uma gordura insaturada obtida pela esterificação do ácido linoleico e etanol, catalisada pelo ácido sulfúrico (HUANG X.; ZHAO Y.; HOU Z., 2021) e encontrado nos óleos essenciais de plantas como *Scutellaria edelbergii* Rech. F. (SHAH *et al.*, 2021), *Tiliacora trianda* (Colebr.) Diels (MAKINDE *et al.*, 2019), e fungos, como *Phellinus linteus* (KWON *et al.*, 2020). Esse composto possui muitas funções fisiológicas, como o aumento da imunidade, redução do colesterol e do nível de lipídeos no sague e matéria prima para de um medicamento altamente eficaz na prevenção e tratamento de doenças crônicas, como trombose cerebral e aterosclerose (KOO *et al.*, 2014). Kissling *et al.* (2005), utilizando extratos etanólicos dos bulbos de *Crinum x powellii*, identificaram o linoleato de etila como o responsável pela inibição da acetilcolinesterase. Ainda, o linoleato de etila apresenta propriedades antibactericidas e anti-inflamatórias (PARK *et al.*, 2014).

Estudos anteriores encontraram uma abundância de 15,86% nos extratos etanólicos de *Phellinus linteus* (fungo) (KWON *et al.*, 2020) e de 19,67% para extratos hexânicos de óleo cru de *Scutellaria edelbergii* Rench. f. (SHAH *et al.*, 2021). Aly *et al.* (2022) encontraram valores muito inferiores (0,83%) para extratos hexânicos das folhas de *Psidium guajava* L. Esses resultados são inferiores aos obtidos no presente estudo, que foram de 38,68% e 38,41%, respectivamente para o bulbo e raiz, nos extratos etanólicos brutos dos indivíduos propagados em casa de vegetação. Diferente do composto α -terpenil-acetato, o linoleato de etila foi mais abundante nos indivíduos propagados em casa de vegetação, mostrando uma inviabilidade da propagação *in vitro* para produção desse composto nas condições estabelecidas nesse estudo. Ainda, não foram verificadas nesse estudo a influência da concentração de sacarose e do uso do CA na alteração da abundância desse composto, visto que apresentaram valores estatisticamente iguais para o bulbo e raiz, com exceção dos extratos foliares, mas esses não se mostraram viáveis para o isolamento e comercialização do composto, pois apresentaram baixa abundância, variando entre 1,59% e 6,98% nos tratamentos.

O clionasterol (sinônimo: γ -sitosterol) é um membro da classe dos fitosteróis, triterpeno encontrado em plantas como o morango (*Fragaria x ananassa* 'Camarosa') (ANTUNES *et al.*, 2019), *Momordica angustisepala* Harms (SHEHU *et al.*, 2019), *Leptadenia reticulata* (Retz.) Wight & Arn.

(GODARA *et al.*, 2019), dentre outras. Esse composto possui múltiplas bioatividades, como por exemplo, anti-inflamatória, controle da diabete (SUNDARRAJ *et al.*, 2012), agente antitumoral (BALAMURUGAN; STALIN; IGNACIMUTHU, 2012), antioxidante (ALY *et al.*, 2022), bactericida e fungicida (CERQUEIRA *et al.*, 2003). Ainda, estudos recentes relatam que o clionasterol é um importante agente na inibição enzimática da acetilcolinesterase (ALY *et al.*, 2022; SHAHID *et al.*, 2023) e butirilcolinesterase (KHOPA *et al.*, 2023), apresentando os melhores resultados no acoplamento molecular, quando comparados a outros compostos, indicando ser um potencial medicamento para o tratamento da DA.

A espécie *Z. irwiniana* apresentou resultados promissores para produção de clionasterol, com abundância relativa de 14,34% no extrato radicular de indivíduos cultivados *in vitro*, com 30gL⁻¹ de sacarose com carvão ativado. Aly *et al.* (2022) encontraram uma abundância relativa de 3,90% no extrato hexânicos do óleo essencial da espécie *Psidium guajava* L., sendo inferior ao valor máximo registrados para *Z. irwiniana* no presente estudo. Outros estudos apresentaram diferentes concentração de clionasterol nos extratos vegetais de diferentes espécies, de 5,42% para extrato etanólico de sementes *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. (KHOPA *et al.*, 2023), de 12,54% para extrato metanólico da raiz de *Leptadenia reticulata* (Retz.) Wight & Arn. (GODARA *et al.*, 2019), de 19,45% para extrato metanólico das folhas de *Momordica angustisejala* Harms (SHEHU *et al.*, 2019) e de 15,32% para extrato metanólico das folhas de *Drynaria laurentii* (Christ) Hieron. (SHEHU *et al.*, 2022).

Resultados melhores foram obtidos por Marrelli *et al.* (2022) para extratos etanólicos fracionados com *n*-hexano de *Allium cepa* L. var. Tropea, obtendo uma abundância relativa de 29,4%. Para a espécie *Z. irwiniana*, mesmo que os extratos da raiz tenham apresentado melhores resultados, para produção comercial, a melhor opção é a utilização de folhas coletadas de indivíduos desenvolvidos em casa de vegetação, pois apresentaram uma abundância relativa de 11,62%, próxima ao máximo obtido, com a vantagem de utilizar o indivíduo de forma sustentável, coletando apenas as partes aéreas.

A licorina é um alcaloide natural com imenso potencial terapêutico (ROY *et al.*, 2018), isolados de bulbos e folhas de plantas da família Amaryllidaceae (TASKER; COWFER; HERGENROTHER, 2018). Os resultados de estudos anteriores mostram que dentre os grupos de alcaloides extraídos dessa família, os representantes dos grupos galantamina e licorina apresentaram um potencial inibitório da AChE significativamente superior aos demais (BORES *et al.*, 1996; ELGORASHI *et al.*, 2006; MCNULTY *et al.*, 2010; CORTES *et al.*, 2015b). Ainda, outras propriedades como atividade antitumoral, bactericida, antiparasita (ROY *et al.*, 2018), anticâncer (EVIDENTE; KORNIENKO, 2009) foram descritas. Estudos anteriores também produziram uma

série de estruturas derivadas para explorar a relação entre sua estrutura e atividade biológica (TASKER; COWFER; HERGENROTHER, 2018; MCNULTY *et al.*, 2010). Esses fatos motivam fortemente a triagem de alcaloides de Amaryllidaceae, compreendendo diferentes tipos estruturais para sua atividade inibitória da AChE e demais atividades biológicas.

Alguns estudos classificam a licorina como um dos principais alcaloides em termos de abundância relativa nas folhas de espécies de Amaryllidaceae (BESSA *et al.*, 2017; TALLINI *et al.*, 2018; BERKOV *et al.*, 2021), e nos bulbos. Dentre esses, Andrade *et al.* (2012b) encontraram 2,35% para *Narcissus broussonetii* Lag. e em estudo posterior, encontraram 9,26% para *Hippeastrum aulicum* (Ker Gawl.) Herb. e 41,89% para *Hippeastrum calyptratum* (Ker Gawl.) Herb. (ANDRADE *et al.*, 2014), todos em frações de acetato de etila de bulbos. A melhor abundância relativa da licorina obtida no presente estudo para espécie *Z. irwiniana* foi nas folhas dos indivíduos propagados em meio de cultura com concentração de 60gL⁻¹ de sacarose e sem o uso do CA, que foi de 2,57%. Paiva *et al.* (2020) encontraram nos extratos obtidos dos bulbos de *Z. irwiniana* os alcaloides galantamina e pseudolicorina, nas concentrações de 41,7 ± 0,9 e 372,6 ± 28,2 µgg⁻¹, respectivamente, entretanto, apenas o alcaloide licorina foi detectado no presente estudo. Em acordo com Tasker *et al.* (2018), não foi detectado no presente estudo a licorina nos extratos etanólicos radiculares.

Estudos anteriores identificaram a licorina e outros alcaloides nos bulbos e nas partes aéreas das espécies *Zephyranthes concolor* (Lindl.) Benth. & Hook. f. (REYES-CHILPA *et al.*, 2011), *Zephyranthes grandiflora* Lindl. (KATOCH *et al.*, 2012), *Zephyranthes robusta* (Herb.) Baker (KULHÁNKOVÁ *et al.*, 2013), *Zephyranthes candida* (Lindl.) Herb. (ZHAN *et al.*, 2023; ZHAN *et al.*, 2017; SHITARA *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2012), *Zephyranthes citrina* Baker (KOHELOVÁ *et al.*, 2021), no entanto, esses estudos objetivaram, em comum, a identificação e elucidação estrutural dos alcaloides dessas espécies e não a abundância relativa nos bulbos e nas folhas.

Ortiz *et al.* (2012) encontram diferentes abundâncias para licorina em fração clorofórmica básica de bulbos de *Zephyranthes jamesonii* (Baker) Nic. García & S.C. Arroyo quando comparando o local de coleta. Semelhante resultado encontraram Centeno-Betanzos *et al.* (2022) nas frações de acetato de etila dos bulbos de *Zephyranthes Alba* Flagg, G. Lom. Sm. & García-Mend. e *Zephyranthes fosteri* Traub, onde a abundância relativa da licorina variou também conforme o local de coleta, respectivamente, de 4,28 - 8,45% e 46,36 - 88,82%.

Esses resultados e os obtidos no presente estudo indicam que a produção de licorina é variável e depende do substrato ou meio de cultura em que o indivíduo está crescendo, sendo a propagação *in vitro* uma alternativa viável com maior produtividade da licorina, pois os indivíduos propagados em casa de vegetação apresentaram as menores abundâncias relativas em relação aos demais tratamentos.

4.3. Histolocalização dos alcaloides nas folhas e bulbos

A localização histoquímica dos alcaloides, nas folhas e no bulbo, sintetizados pela espécie *Z. irwiniana*, antes desconhecida, foi apresentada nesse estudo. Determinar a localização de compostos secundário nos tecidos vegetais pode fornecer uma melhor compreensão do papel e dos locais de síntese e acumulação desses compostos (GOMEZ *et al.*, 2019), no entanto, dados sobre a histolocalização de alcaloides em Amaryllidaceae são escassos, havendo essa lacuna nos conhecimentos sobre metabólitos secundários dessa família.

Em acordo com os resultados obtidos nos extratos etanólicos brutos, os testes histoquímicos com reativo de Dragendorff e Wagner identificaram uma presença mais intensa de alcaloides nas células do clorênquima das margens foliares e nos bulbos. Resultados semelhantes foram obtidos para algumas espécies da família Fabaceae, propondo que os tecidos verdes, particularmente o mesófilo paliádico das folhas, são a principal fonte de alcaloides (GOMEZ *et al.*, 2019). Silva *et al.* (2013) observaram que quase todas as células do mesófilo das folhas de *Crinum americanum* L. apresentaram conteúdo alcaloídico, diferente da espécie *Z. irwiniana*, que apenas as células clorenquimáticas apresentaram alcaloide.

5. CONCLUSÃO

Em síntese, o presente estudo forneceu novas evidências de que a constituição do meio de cultura influencia diretamente no crescimento vegetal e na fitoquímica. Sua grande contribuição é que as variações na concentração da sacarose e o uso do CA poderão ser testadas para outras espécies de interesse comercial, visto que os resultados obtidos para *Z. irwiniana* são promissores, principalmente quanto a possibilidade do aumento na produção de biomassa e da abundância dos metabólitos secundários, conforme o ajuste do meio de cultura. Indivíduos propagados em casa de vegetação apresentaram um maior incremento de biomassa, principalmente do bulbo, e uma maior abundância relativa do linoleato de etila. Indivíduos propagados *in vitro* apresentaram uma maior abundância relativa do α -terpenil-acetato (53,06% - extrato foliar: 30gL⁻¹ de sacarose, com CA) e do clionasterol (14,34% - extrato radicular: 60gL⁻¹ de sacarose, com CA). Ainda para os indivíduos propagados *in vitro*, a melhor produtividade de biomassa observada foi obtida utilizando a concentração de 60gL⁻¹ de sacarose com carvão ativado, sem influenciar negativamente outras variáveis. Assim, o uso do CA deve depender dos objetivos propostos, pois foi positiva para o comprimento das folhas e raízes, mas negativo para o número de raízes.

Novos estudos são necessários para elucidar os mecanismos de interação entre a sacarose e o CA no crescimento vegetativo e na fitoquímica, pois não está claro como funcionam essas interações, principalmente em relação a fitoquímica, que não apresentou um padrão nos resultados obtidos. Ainda, a presença de outros compostos inibidores da AChE na espécie *Z. irwiniana* poderá ser uma alternativa para desenvolver novos medicamentos, explorando a sinergia molecular entre os compostos, testando e avaliando diferentes proporções e concentrações que melhorem a eficiência de ação e reduza ao máximo as possibilidades de reações adversas nos tratamentos da DA.

Por fim, os resultados demonstram que ajustes no meio de cultura é eficaz para obter os melhores resultados no crescimento vegetal e na fitoquímica, conforme o objetivo estabelecido. No entanto, este é um processo complexo e requer mais pesquisas para definir as relações entre a biossíntese de compostos bioativos e a otimização do meio de cultura (PAVLOV *et al.*, 2007).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKILO, O. D. *et al.* Hypothesis: apo-lactoferrin–Galantamine Proteo-alkaloid Conjugate for Alzheimer’s disease Intervention. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 1957–1963, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jcmm.13484>

ALAM, A.; MAJUMDAR, R. S.; ALAM, P. Development of HPTLC method for determination of α -terpinyl acetate, and evaluation of antioxidant properties of essential oils in *Elettaria cardamomum*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 10, p. 2139-2145, 2019.

ALY, S. H. *et al.* Chemical Constituents, Antioxidant, and Enzyme Inhibitory Activities Supported by In-Silico Study of n-Hexane Extract and Essential Oil of Guava Leaves. **Molecules**, v. 27, n. 24, p. 8979, 2022.

AMARAL-LOPES, A. C.; CAVALCANTI, T. B. Habranthus (Amaryllidaceae) do Brasil. **Rodriguesia**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 203–220, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2175-7860201566112>

ANDRADE, J. P. *et al.* Alkaloids from *Hippeastrum papilio*. **Molecules**, [s. l.], v. 16, p. 7097–7104, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules16087097>

ANDRADE, J. P. *et al.* Alkaloids from the *Hippeastrum* genus: Chemistry and biological activity. **Revista latinoamericana de química**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 83–98, 2012a. Disponível em: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-59432012000200004&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 3 maio 2021.

- ANDRADE, J. P. *et al.* Bioactive alkaloid extracts from *Narcissus broussonetii*: Mass spectral studies. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 70, p. 13-25, 2012b.
- ANDRADE, J. P. *et al.* Crinine-type alkaloids from *Hippeastrum aulicum* and *H. calyptratum*. **Phytochemistry**, v. 103, p. 188-195, 2014.
- ANDRADE, J. P. *et al.* The Brazilian Amaryllidaceae as a source of acetylcholinesterase inhibitory alkaloids. **Phytochemistry Reviews**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 147–160, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9411-7>
- ANTUNES, A. C. N. *et al.* Untargeted metabolomics of strawberry (*Fragaria x ananassa* ‘Camarosa’) fruit from plants grown under osmotic stress conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 15, p. 6973-6980, 2019.
- ATANASOV, Atanas G. *et al.* Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.
- BAKER, F. S. *et al.* Activated carbon. **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**, 2000.
- BALAMURUGAN, R.; STALIN, A.; IGNACIMUTHU, S. Molecular docking of γ -sitosterol with some targets related to diabetes. **European journal of medicinal chemistry**, v. 47, p. 38-43, 2012.
- BARRETT, S. C. H. Influences of clonality on plant sexual reproduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 112, n. 29, p. 8859–8866, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1501712112>
- BASTIDA, J.; LAVILLA, R.; VILADOMAT, F. Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. **The Alkaloids**, [s. l.], v. 63, p. 87–179, 2006. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1099-4831\(06\)63003-4](https://doi.org/10.1016/S1099-4831(06)63003-4)
- BERKOV, S. *et al.* Plant sources of galanthamine: phytochemical and biotechnological aspects. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 23, n. 2, p. 1170-1176, 2009a.
- BERKOV, S. *et al.* Alkaloid synthesis and accumulation in *Leucojum aestivum in vitro* cultures. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 3, p. 359-364, 2009b.
- BERKOV, S. *et al.* *In vitro* propagation and biosynthesis of Sceletium-type alkaloids in *Narcissus pallidulus* and *Narcissus* cv. Hawera. **South African Journal of Botany**, [s. l.], v. 136, p. 190–194, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.036>
- BESSA, C. D. P. B. *et al.* Identification of alkaloids from *Hippeastrum aulicum* (Ker Gawl.) Herb. (Amaryllidaceae) using CGC-MS and ambient ionization mass spectrometry (PS-MS and LS-MS).

Journal of the Brazilian Chemical Society, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 819–830, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20160234>

BORES, G. M. *et al.* Pharmacological evaluation of novel Alzheimer's disease therapeutics: acetylcholinesterase inhibitors related to galanthamine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 277, n. 2, p. 728-738, 1996.

BORGHETTI, F. *et al.* The firewall between Cerrado and Amazonia: Interaction of temperature and fire govern seed recruitment in a Neotropical savanna. **Journal of Vegetation Science**, v. 32, n. 1, p. e12988, 2021.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Gabinete do Ministro. Portaria MMA nº 148, de 7 de junho de 2022. Altera os Anexos da Portaria nº 443, de 17 de dezembro de 2014, da Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014, e da Portaria nº 445, de 17 de dezembro de 2014, referentes à atualização da Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 08 jun. 2022. p. 74. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-mma-n-148-de-7-de-junho-de-2022-406272733>.

CARBONE, F. *et al.* Developmental, genetic and environmental factors affect the expression of flavonoid genes, enzymes and metabolites in strawberry fruits. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, n. 8, p. 1117-1131, 2009.

CENTENO-BETANZOS, L. Y. *et al.* Microsatellites, morphological, and alkaloids characterization of *Zephyranthes fosteri* and *Z. alba* (Amaryllidaceae): Allopatric populations. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 101, p. 104398, 2022.

CERQUEIRA, F. *et al.* Clionasterol: A potent inhibitor of complement component C1. **Planta medica**, v. 69, n. 02, p. 174-176, 2003.

CHANDRAN, H. *et al.* Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. **Biotechnology Reports**, v. 26, p. e00450, 2020.

CHASE, M. W.; REVEAL, J. L.; FAY, M. F. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, [s. l.], v. 161, p. 132–136, 2009. Disponível em: <https://academic.oup.com/botlinnean/article/161/2/132/2418404>

CHOWDHURY, S.; KUMAR, S. Alpha-terpinyl acetate: A natural monoterpene from *Elettaria cardamomum* as multi-target directed ligand in Alzheimer's disease. **Journal of Functional Foods**, v. 68, p. 103892, 2020.

- CONTESTABILE, A. The history of the cholinergic hypothesis. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 221, n. 2, p. 334–340, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.044>
- CORTES, N. *et al.* Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five Amaryllidaceae plants. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 102, p. 222–228, 2015a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.09.022>
- CORTES, N. *et al.* Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five Amaryllidaceae species: A comparative study. **Life Sciences**, [s. l.], v. 122, p. 42–50, 2015b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.12.011>
- COSTA, G. G. P. *et al.* Influence of *in vitro* micropropagation on lycorine biosynthesis and anticholinesterase activity in *Hippeastrum goianum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 262–265, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.02.001>
- CRAIG, L. A.; HONG, N. S.; MCDONALD, R. J. Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 1397–1409, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.03.001>
- DATTA, S. K.; CHAKRABORTY, Debasis; JANAKIRAM, T. Low cost tissue culture: an overview. **The Journal of Plant Science Research**, v. 33, n. 2, p. 181-199, 2017.
- DUTILH, J. H. A.; ASSIS, M. C. 2005. Liliaceae s.l In: Wanderley, M.G.L.; Shepherd, G.J.; Melhem, T.S. & Giuliatti, A.M. (eds.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. RiMa, São Paulo. Pp. 244-256.
- DUTILH, J. H. A. *et al.* *Zephyranthes* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB608962>. Acesso em: 07 set. 2022
- ELGORASHI, E. E. *et al.* Quantitative structure–activity relationship studies on acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. **South African Journal of Botany**, v. 72, n. 2, p. 224-231, 2006.
- EVIDENTE, A.; KORNIENKO, A. Anticancer evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives. **Phytochemistry Reviews**, v. 8, p. 449-459, 2009.
- FERDAUSI, A. *et al.* Galanthamine production in tissue culture and metabolomic study on Amaryllidaceae alkaloids in *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton. **Industrial crops and products**, v. 144, p. 112058, 2020.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A computer analysis system for fixed effect split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**, [S.l.], v. 37, n. 4, p. 529-535, dec. 2019. ISSN 1983-0823. Disponível em: <https://doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450>

FLORA E FUNGA DO BRASIL. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 07 set. 2022.

FOLEY, J. A. *et al.* Global consequences of land use. **Science**, v. 309, n. 5734, p. 570-574, 2005.

FURR, M.; MAHLBERG, P. G. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 2, p. 153-159, 1981.

GAMA, P. E. *et al.* Automação de planilhas eletrônicas para o cálculo de índices de retenção na análise de óleos essenciais. Rio de Janeiro: **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, 2017.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental cell research**, v. 50, n. 1, p. 151-158, 1968.

GARCÍA, N. *et al.* Generic classification of Amaryllidaceae tribe Hippeastreae. **Taxon**, v. 68, n. 3, p. 481-498, 2019.

GARCÍA, N.; MEEROW, A. W. Corrigendum to: García & al., Generic classification of Amaryllidaceae tribe Hippeastreae [in Taxon 68: 481–498. 2019]. **TAXON**, v. 69, n. 1, p. 208-209, 2020.

GASCA, C. A. *et al.* Acetylcholinesterase inhibitory activity, anti-inflammatory, and neuroprotective potential of *Hippeastrum psittacinum* (Ker Gawl.) herb (Amaryllidaceae). **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 145, p. 111703, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111703>

GENTRY, A. H. Patterns of Neotropical Plant Species Diversity. In: HECHT, M. K.; WALLACE, B.; PRANCE, G. T. (org.). **Evolutionary Biology**. New York: Plenum Press., 1982. p. 1–84.

GEORGIEV, V. *et al.* Optimized nutrient medium for galanthamine production in *Leucojum aestivum* L. *in vitro* shoot system. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 64, n. 3-4, p. 219-224, 2009.

GEORGIEV, V.; IVANOV, I.; PAVLOV, A. Recent Progress in Amaryllidaceae Biotechnology. **Molecules**, [s. l.], v. 25, p. 4670–4682, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25204670>

GHOSAL, S.; SAINI, K.; RAZDAN, S. Crinum alkaloids: their chemistry and biology. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 24, n. 10, p. 2141–2156, 1985. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83001-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83001-0)

GIORDANI, R. *et al.* Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (amaryllidaceae). **Quim. Nova**, [s. l.], v. 31, n. 8, p. 2042–2046, 2008.

GODARA, P. *et al.* Comparative GC-MS Analysis of Bioactive Phytochemicals from Different Plant Parts and Callus of *Leptadenia reticulata* Wight and Arn. **Pharmacognosy Journal**, v. 11, n. 1, 2019.

GOMEZ, A. A. *et al.* In situ histochemical localization of alkaloids in leaves and pods of *Prosopis ruscifolia*. **Flora**, v. 256, p. 1-6, 2019.

GRAHAM, A. Diversification of Gulf/Caribbean Mangrove Communities Through Cenozoic Time. **Biotropica**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 20–27, 1995.

GREENWAY, M. B. *et al.* A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species *in vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 48, n. 4, p. 403-410, 2012.

HERRANZ, J. M.; COPETE, M. A.; FERRANDIS, P. Environmental regulation of embryo growth, dormancy breaking and germination in *Narcissus alcaracensis* (Amaryllidaceae), a threatened endemic Iberian daffodil. **The American Midland Naturalist**, v. 169, n. 1, p. 147-167, 2013a.

HERRANZ, J. M.; COPETE, E.; FERRANDIS, P. Non-deep complex morphophysiological dormancy in *Narcissus longispathus* (Amaryllidaceae): implications for evolution of dormancy levels within section Pseudonarcissi. **Seed Science Research**, v. 23, n. 2, p. 141-155, 2013b.

HERRANZ, R. *et al.* Optimization of Plant Production by Seed Treatment in Two Wild Subspecies of *Narcissus pseudonarcissus* Rich in Alkaloids. **Molecules**, [s. l.], v. 25, p. 4439–4457, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25194439>

HOFMANN, G. *et al.* The Brazilian Cerrado is becoming hotter and drier. **Glob. Chang. Biol.** 00, 1–14, 2021.

HUANG, C. W.; OKUBO, H.; UEMOTO, S. Comparison of bulblet formation from twin scales and single scales in *Hippeastrum hybridum* cultured *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 42, n. 1–2, p. 151–160, 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(90\)90156-9](https://doi.org/10.1016/0304-4238(90)90156-9)

HUANG, X.; ZHAO, Y.; HOU, Z. Purification of ethyl linoleate from foxtail millet (*Setaria italica*) bran oil via urea complexation and molecular distillation. **Foods**, v. 10, n. 8, p. 1925, 2021.

IPCC, 2018: **Summary for Policymakers. In: Global Warming of 1.5 C**. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5 C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty [Masson-Delmotte, V., P. Zhai, H.-O. P rtner, D. Roberts, J. Skea, P.R. Shukla, A. Pirani, W. Moufouma-Okia, C. P an, R. Pidcock, S.

Connors, J.B.R. Matthews, Y. Chen, X. Zhou, M.I. Gomis, E. Lonnoy, T. Maycock, M. Tignor, and T. Waterfield (eds.]. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA, pp. 3-24. <https://doi.org/10.1017/9781009157940.001>.

ITO, M. *et al.* Phylogenetic Relationships of Amaryllidaceae Based on matK Sequence Data. **Journal of Plant Research**, [s. l.], v. 112, p. 207–216, 1999.

IUCN, 2022. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2022-1. <https://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 7 Set. 2022.

JIN, Z. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. **Natural Product Rep**, [s. l.], v. 26, p. 363–381, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/b718044f>

JIN, Z.; YAO, G. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. **Natural Product Reports**, [s. l.], v. 36, p. 1462–1488, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c8np00055g>

JUAN-VICEDO, J. *et al.* *In vitro* culture and micropropagation of the Baetic-Moroccan endemic plant *Lapiedra martinezii* Lag.(Amaryllidaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 55, n. 6, p. 725-732, 2019.

KASKOOS, R. A. *et al.* Essential oil composition of the fruits of *Elettaria cardamomum*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 9, n. 1, p. 81-84, 2006.

KATOCH, D. *et al.* Simultaneous quantification of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC–DAD/ESI-MS/MS. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 71, p. 187-192, 2012.

KHOBA, K. *et al.* Isolation, Characterization, and In Silico Interaction Studies of Bioactive Compounds from *Caesalpinia bonducella* with Target Proteins Involved in Alzheimer's Disease. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 195, n. 4, p. 2216-2234, 2023.

KHONAKDARI, M. R. *et al.* Effect of photoperiod and plant growth regulators on *in vitro* mass bulblet proliferation of *Narcissus tazetta* L. (Amaryllidaceae), a potential source of galantamine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, [s. l.], v. 142, p. 187–199, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01853-y>

KISSLING, J. *et al.* Bio-guided isolation of cholinesterase inhibitors from the bulbs of *Crinum × powellii* (Amaryllidaceae). **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 19, n. 11, p. 984-987, 2005.

- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian cerrado. **Conservation biology**, v. 19, n. 3, p. 707-713, 2005.
- KOHELOVÁ, E. *et al.* Alkaloids of *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae) and their implication to Alzheimer's disease: Isolation, structural elucidation and biological activity. **Bioorganic chemistry**, v. 107, p. 104567, 2021.
- KOIRALA, M. *et al.* Biotechnological Approaches to Optimize the Production of Amaryllidaceae Alkaloids. **Biomolecules**, v. 12, n. 7, p. 893, 2022.
- KOO, H. J. *et al.* Chinese Yam Extracts Containing β -Sitosterol and Ethyl Linoleate Protect against Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice and Inhibit Muscular Expression of VCAM-1 *In Vitro*. **Journal of food science**, v. 79, n. 4, p. H719-H729, 2014.
- KULHÁNKOVÁ, A. *et al.* Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and their acetylcholinesterase-and butyrylcholinesterase-inhibitory activity. **Chemistry & biodiversity**, v. 10, n. 6, p. 1120-1127, 2013.
- KUMAR, S. *et al.* Identification of phytochemicals as potential therapeutic agents that binds to Nsp15 protein target of coronavirus (SARS-CoV-2) that are capable of inhibiting virus replication. **Phytomedicine**, v. 85, p. 153317, 2021.
- KWON, Y. *et al.* Vasodilatory effect of *phellinus linteus* extract in rat mesenteric arteries. **Molecules**, v. 25, n. 14, p. 3160, 2020.
- LÓPEZ, A. F. F.; MARTÍNEZ, O. M. M.; HERNÁNDEZ, H. F. C. Evaluation of Amaryllidaceae alkaloids as inhibitors of human acetylcholinesterase by QSAR analysis and molecular docking. **Journal of Molecular Structure**, [s. l.], v. 1225, p. 129–142, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129142>
- LUO, Z. *et al.* Cytotoxic alkaloids from the whole plants of *Zephyranthes candida*. **Journal of natural products**, v. 75, n. 12, p. 2113-2120, 2012.
- MAKINDE, E. A. *et al.* Antidiabetic, antioxidant and antimicrobial activity of the aerial part of *Tiliacora triandra*. **South african journal of botany**, v. 125, p. 337-343, 2019.
- MARRELLI, M. *et al.* Phytochemical and biological characterization of dry outer scales extract from Tropea red onion (*Allium cepa* L. var. Tropea)—A promising inhibitor of pancreatic lipase. **Phytomedicine Plus**, v. 2, n. 2, p. 100235, 2022.

MCNULTY, J. *et al.* Structure–activity studies on acetylcholinesterase inhibition in the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 20, n. 17, p. 5290–5294, 2010.

MEEROW, A. W.; SNIJAM, D. A. Amaryllidaceae. *In: The families and genera of vascular plants*. [S. l.: s. n.], 1998. v. 3, p. 83–84.

MEEROW, A. W. *et al.* Phylogeny of the American Amaryllidaceae based on nrDNA ITS sequences. **Systematic Botany**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 708–726, 2000.

MICHET, A. *et al.* Chemotypes in the volatiles of wild thyme (*Thymus pulegioides* L.). **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, n. 2, p. 101–103, 2008.

MITTERMEIER, R. A. *et al.* **Hotspots: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions**. CEMEX, SA, Agrupación Sierra Madre, SC, 1999.

MORENO, R. *et al.* Chemical profiling and cholinesterase inhibitory activity of five *Phaedranassa* Herb. (Amaryllidaceae) species from Ecuador. **Molecules**, v. 25, n. 9, p. 2092, 2020.

MU, H. *et al.* Effect of abiotic and biotic elicitors on growth and alkaloid accumulation of *Lycoris chinensis* seedlings. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 64, n. 7–8, p. 541–550, 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

NAIR, J. J.; VAN STADEN, J. Pharmacological and toxicological insights to the South African Amaryllidaceae. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 62, p. 262–275, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.042>

NAIR, J. J.; VAN STADEN, J. Cell cycle modulatory effects of Amaryllidaceae alkaloids. **Life Sciences**, [s. l.], v. 213, p. 94–101, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.08.073>

NAIR, J. J.; VAN STADEN, J. The plant family Amaryllidaceae as a source of cytotoxic homolycorine alkaloid principles. **South African Journal of Botany**, [s. l.], v. 136, p. 157–174, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.013>

NCBI - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (2023). PubChem Compound Summary for CID 72378, Lycorine. Retrieved June 30, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lycorine>.

- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>
- NG, Y. P.; OR, T. C. T.; IP, N. Y. Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 89, p. 260–270, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.07.018>
- ORTIZ, J. E. *et al.* Wild argentinian amaryllidaceae, a new renewable source of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine and other alkaloids. **Molecules**, [s. l.], v. 17, n. 11, p. 13473–13482, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules171113473>
- PAIVA, J. R. de *et al.* Development and validation of a UPLC-ESI-MS method for quantitation of the anti-Alzheimer drug galantamine and other amaryllidaceae alkaloids in plants. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, p. 265-272, 2020.
- PAN, M. J.; STADEN, J. V. The use of charcoal in *in vitro* culture—A review. **Plant growth regulation**, v. 26, p. 155-163, 1998.
- PARK, S. Y. *et al.* Ethyl linoleate from garlic attenuates lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokine production by inducing heme oxygenase-1 in RAW264. 7 cells. **International Immunopharmacology**, v. 19, n. 2, p. 253-261, 2014.
- PAVLOV, A. *et al.* Galanthamine production by *Leucojum aestivum* *in vitro* systems. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 734-739, 2007.
- PEREIRA, *et al.* Caracterização preliminar de acessos do gênero Habranthus (Amaryllidaceae). **Embrapa Agroindústria Tropical**. Fortaleza, CE, 2022. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/232332/1/DOC-193.pdf>
- PHILLIPS, G. C.; GARDA, M. Plant tissue culture media and practices: an overview. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 55, n. 3, p. 242-257, 2019.
- PRIYADHARSHINI, S.; MANOKARI, M.; SHEKHAWAT, M. S. *In vitro* conservation strategies for the critically endangered Malabar river lily (*Crinum malabaricum* Lekhak & Yadav) using somatic embryogenesis and synthetic seed production. **South African Journal of Botany**, [s. l.], v. 135, p. 172–180, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.08.030>
- PTAK, A. *et al.* Carbohydrates stimulated Amaryllidaceae alkaloids biosynthesis in *Leucojum aestivum* L. plants cultured in RITA® bioreactor. **PeerJ**, v. 8, p. e8688, 2020.
- RAVEN, P. H; AXELROD, D. I. Angiosperm Biogeography and Past Continental Movements.

Annals of the Missouri Botanical Garden, [s. l.], v. 61, n. 3, p. 539–673, 1974. Disponível em: <https://about.jstor.org/terms>

REYES-CHILPA, R. *et al.* Acetylcholinesterase-inhibiting alkaloids from *Zephyranthes concolor*. **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9520-9533, 2011.

RODRIGUES, A. M.; DE CARVALHO, T. C.; AYUB, R. A. Germinação *in vitro* de sementes de *Hippeastrum hybridum*. **Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science/Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 13, n. 1, 2020.

ROY, M. *et al.* Lycorine: A prospective natural lead for anticancer drug discovery. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 107, p. 615-624, 2018.

SELLÉS, M. *et al.* Effect of sucrose on growth and galanthamine production in shoot-clump cultures of *Narcissus confusus* in liquid-shake medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 49, n. 2, p. 129-136, 1997.

SHAH, M. *et al.* GC-MS analysis and biomedical therapy of oil from n-hexane fraction of *Scutellaria edelbergii* Rech. f.: *in vitro*, *in vivo*, and *in silico* approach. **Molecules**, v. 26, n. 24, p. 7676, 2021.

SHAHID, A. *et al.* Phytochemical Profiling of the Ethanolic Extract of *Zaleya pentandra* L. Jaffery and Its Biological Activities by In-Vitro Assays and In-Silico Molecular Docking. **Applied Sciences**, v. 13, n. 1, p. 584, 2023.

SHEHU, A. *et al.* Chemical composition from the leaf extracts of *Momordica angustisejala* with its antibacterial, antifungal and antioxidant activities. **Nigerian Journal of Chemical Research**, v. 24, n. 2, p. 56-66, 2019.

SHEHU, A. *et al.* Chemical constituents, antibacterial, antifungal and antioxidant activities from the leaf extracts of *Drynaria laurentii*. **Journal of Phytomedicine and Therapeutics**, v. 20, n. 2, p. 690-701, 2022.

SHITARA, N. *et al.* Four new Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes candida*. **Journal of natural medicines**, v. 68, p. 610-614, 2014.

SILVA, S. M., ARAÚJO, S. F., SANTOS, A. S. Detecção de alcaloides em *Crinum americanum* (Amaryllidaceae). In: **64º Congresso Nacional de Botânica**, Belo Horizonte, MG, 2013.

STAIKIDOU, I. *et al.* Narcissus bulblet formation *in vitro*: effects of carbohydrate type and osmolarity of the culture medium. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 80, n. 3, p. 313-320, 2005.

SUNDARRAJ, S. *et al.* Gamma-sitosterol from *Acacia nilotica* L. induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis through c-Myc suppression in MCF-7 and A549 cells. **J Ethnopharmacol.** 2012;141(3):803–809. doi:10.1016/j.jep.2012.03.014

SVENDSEN, A. B.; VERPOORTE, R. Chromatography of Alkaloids. Part A: Thin-Layer Chromatography, vol. 23A. 1983.

TAHCHY, A. *et al.* Effects of sucrose and plant growth regulators on acetylcholinesterase inhibitory activity of alkaloids accumulated in shoot cultures of Amaryllidaceae. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 106, n. 3, p. 381-390, 2011.

TALLINI, L. R. *et al.* *Hippeastrum reticulatum* (Amaryllidaceae): Alkaloid Profiling, Biological Activities and Molecular Docking. **Molecules**, [s. l.], v. 22, p. 2191–2204, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules22122191>

TALLINI, L. R. *et al.* Cholinesterase inhibition activity, alkaloid profiling and molecular docking of Chilean *Rhodophiala* (Amaryllidaceae). **Molecules**, v. 23, n. 7, p. 1532, 2018.

TASKER, S. Z.; COWFER, A. E.; HERGENROTHER, P. J. Preparation of structurally diverse compounds from the natural product lycorine. **Organic letters**, v. 20, n. 18, p. 5894-5898, 2018.

THERON, K. I.; JACOBS, G. Changes in carbohydrate composition of the different bulb components of *Nerine bowdenii* W. Watson (Amaryllidaceae). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 121, n. 2, p. 343-346, 1996.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology advances**, v. 26, n. 6, p. 618-631, 2008.

USAI, M. *et al.* Chemical composition of myrtle (*Myrtus communis* L.) berries essential oils as observed in a collection of genotypes. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2502, 2018.

US-CAMAS, R. *et al.* *In vitro* culture: an epigenetic challenge for plants. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, [s. l.], v. 118, p. 187–201, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0482-8>

VAIČIULYTĖ, V. *et al.* α -Terpinyl acetate: Occurrence in essential oils bearing *Thymus pulegioides*, phytotoxicity, and antimicrobial effects. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 1065, 2021.

YANG, J. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of *Chamaecyparis obtusa* leaf essential oil. **Fitoterapia**, v. 78, n. 2, p. 149-152, 2007.

WFO. **World Flora Online**. Published on the Internet; <http://www.worldfloraonline.org>. Acesso em: 07 sep. 2022.

ZARAGOZA-PUCHOL, D. *et al.* Alkaloids Analysis of *Habranthus cardenasianus* (Amaryllidaceae), Anti-Cholinesterase Activity and Biomass Production by Propagation Strategies. **Molecules**, [s. l.], v. 26, p. 192–209, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26010192>

ZHAN, G. *et al.* Amaryllidaceae alkaloids with new framework types from *Zephyranthes candida* as potent acetylcholinesterase inhibitors. **European journal of medicinal chemistry**, v. 127, p. 771-780, 2017.

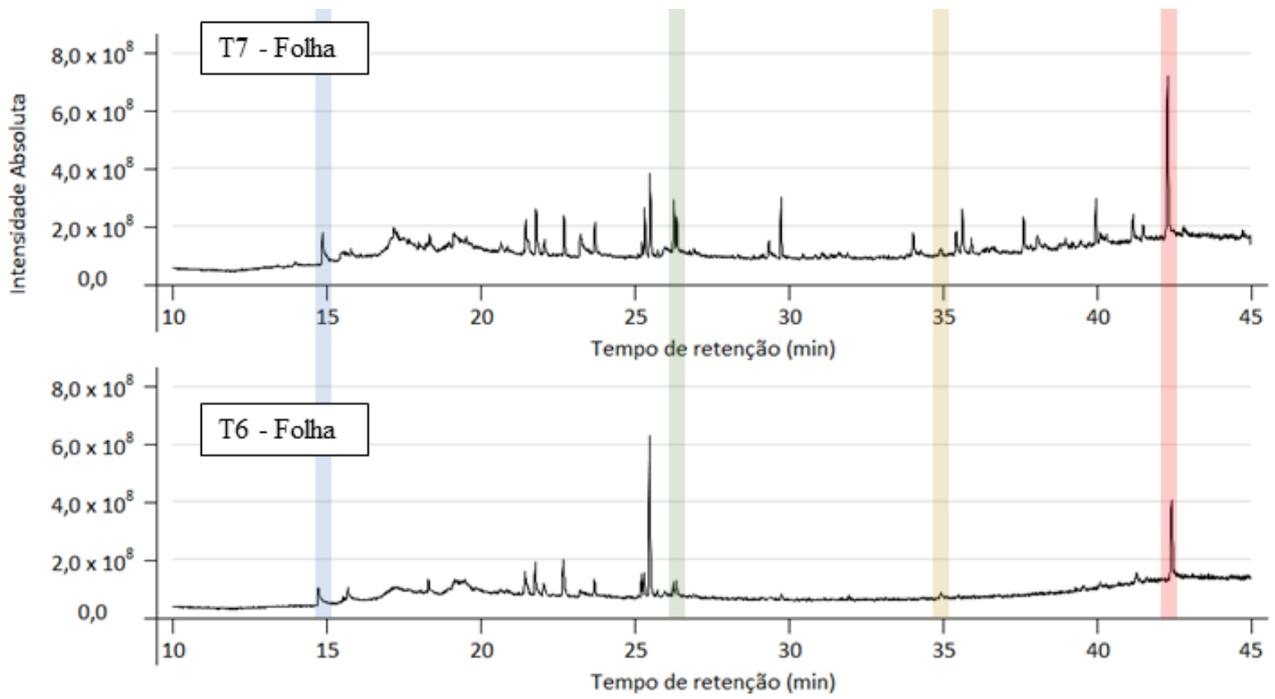
ZHAN, G. *et al.* Structurally diverse alkaloids with nine frameworks from *Zephyranthes candida* and their acetylcholinesterase inhibitory and anti-inflammatory activities. **Phytochemistry**, v. 207, p. 113564, 2023.

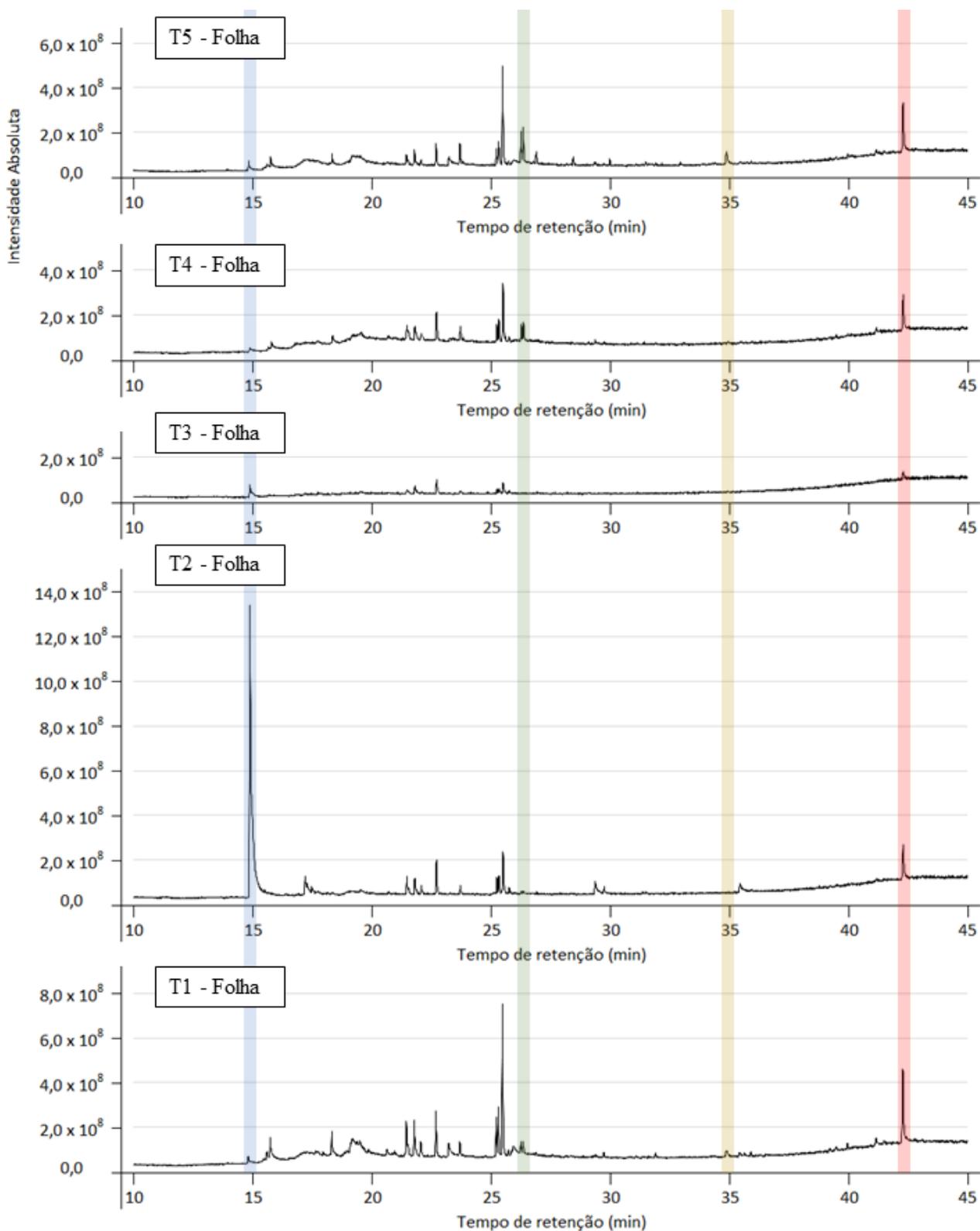
ZHOU, J. *et al.* Fungal endophytes promote the accumulation of Amaryllidaceae alkaloids in *Lycoris radiata*. **Environmental microbiology**, v. 22, n. 4, p. 1421-1434, 2020.

7. ANEXOS

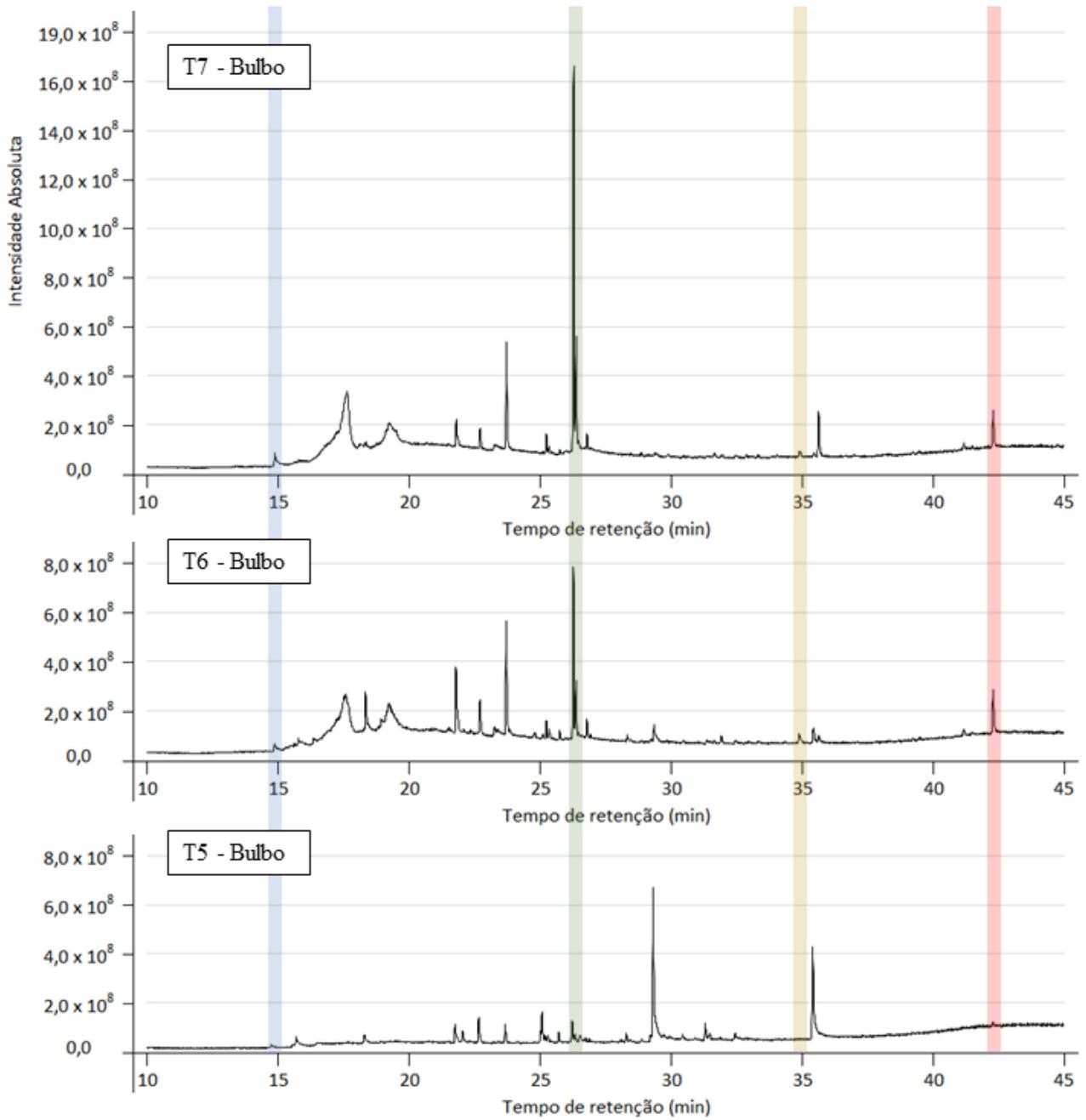
7.1. CROMATOGRAMAS

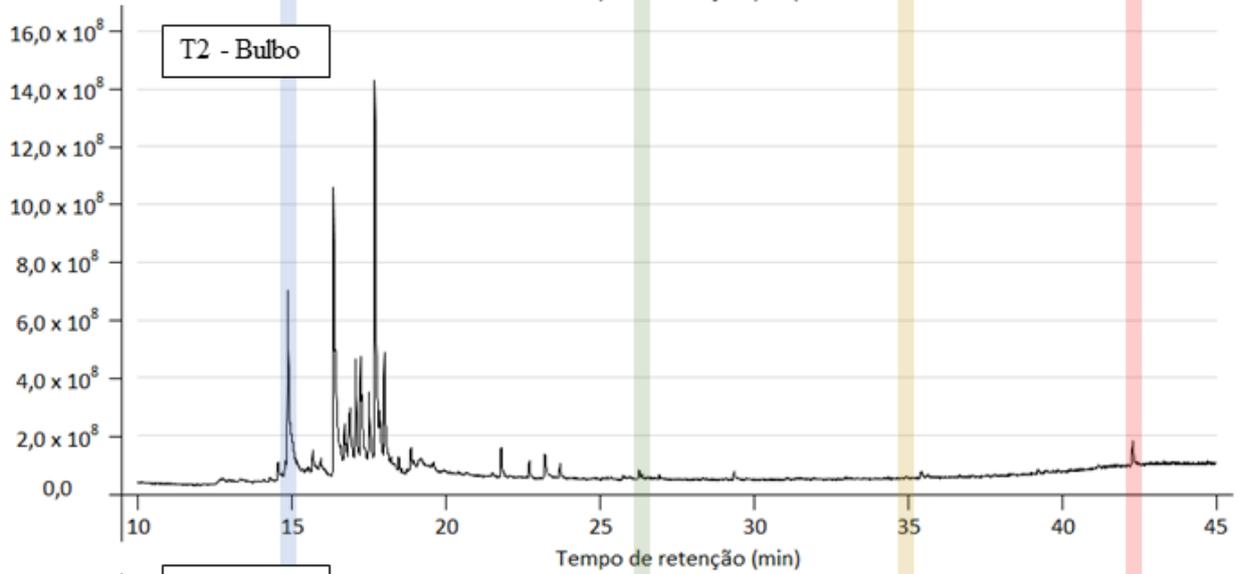
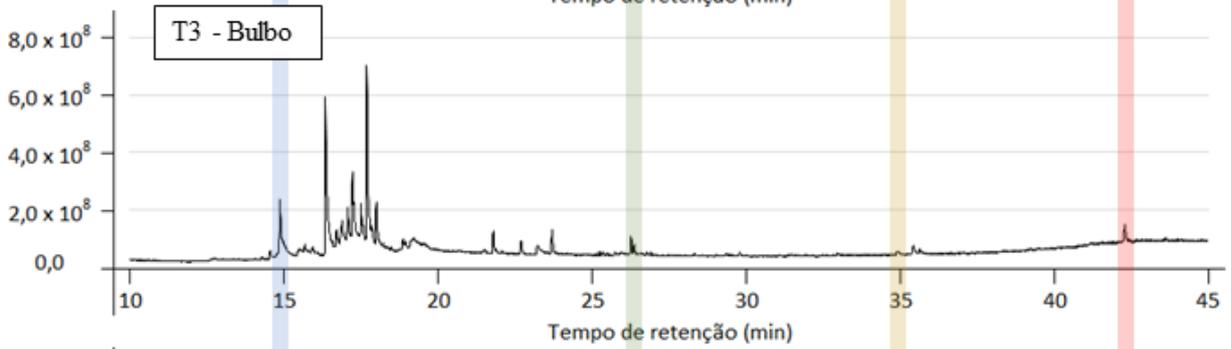
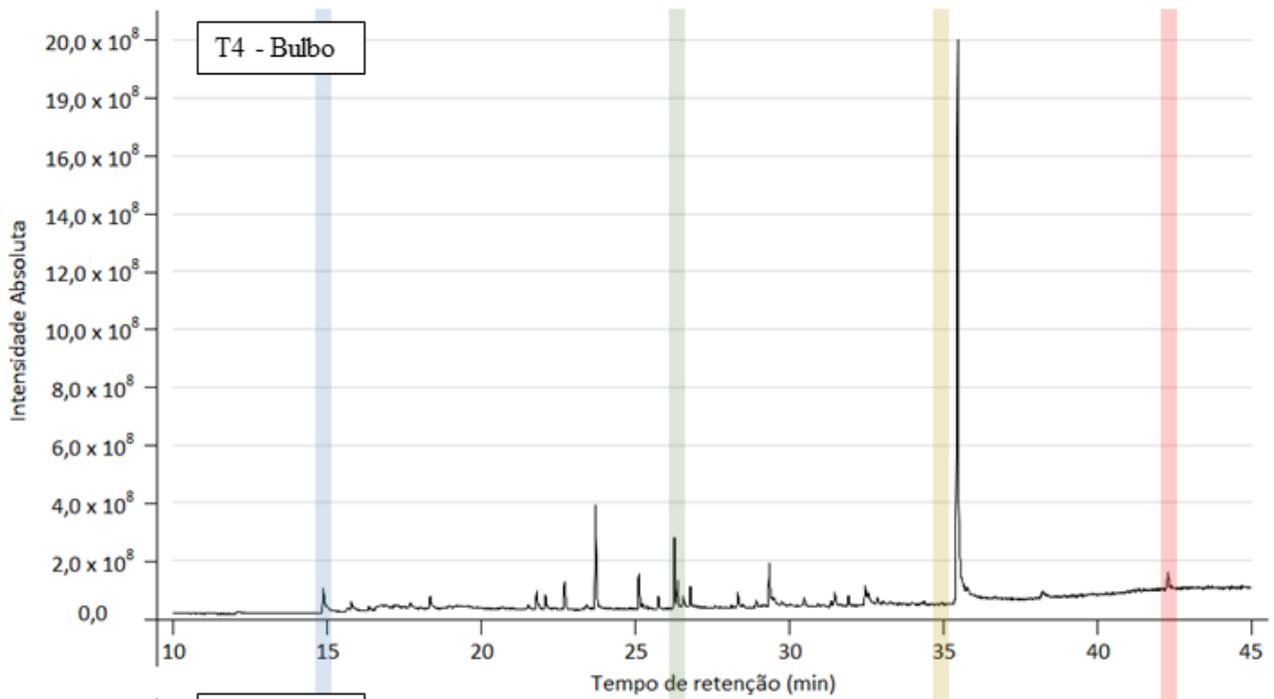
7.1.1.Folha



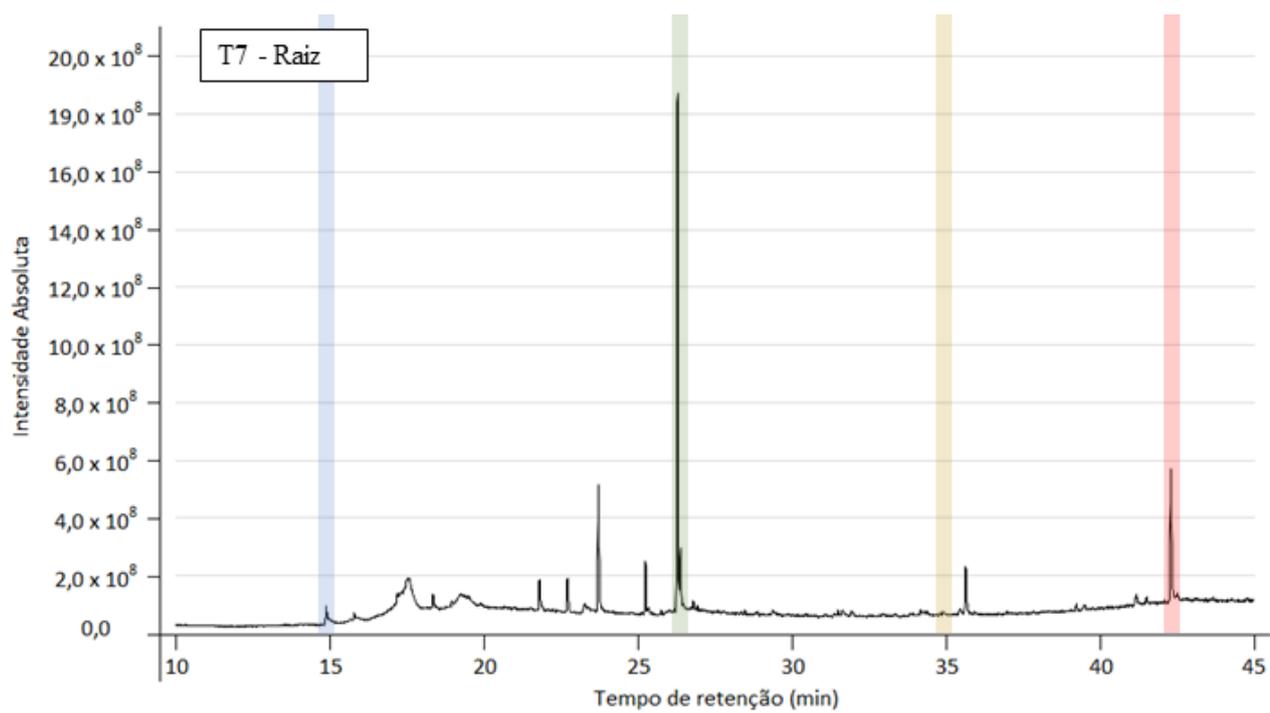


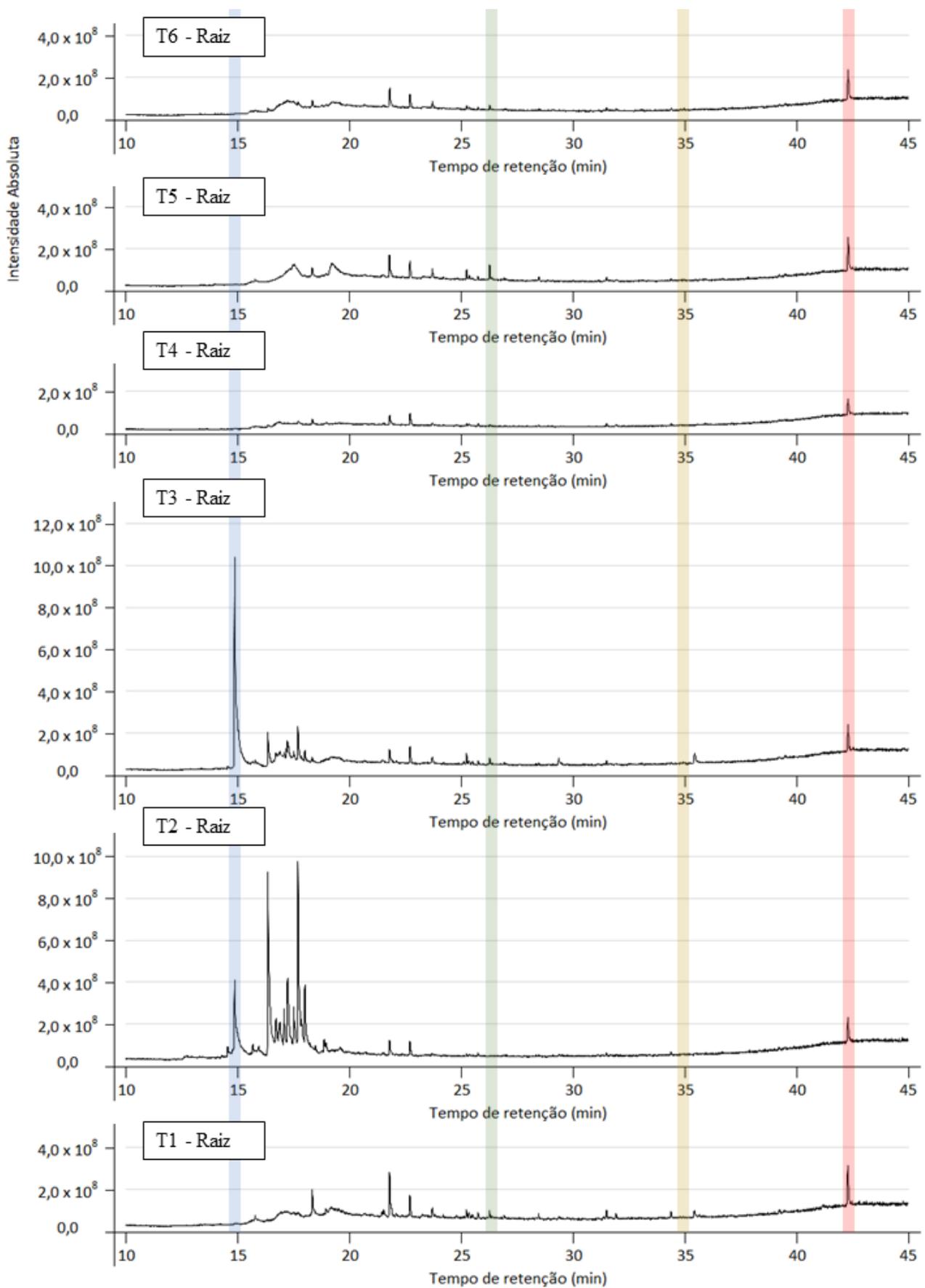
7.1.2. Bulbo





7.1.3.Raiz





7.2. MANUSCRITO

O trabalho a seguir foi desenvolvido como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Botânica, a ser submetido no periódico científico *Plants* (www.mdpi.com/journal/plants). Apresenta o formato final para publicação conforme as regras para submissão do manuscrito no periódico.

Article

Influence of Sucrose and Activated Charcoal on Phytochemistry and Vegetative Growth in *Zephyranthes irwiniana* (Ravenna) Nic. García (Amaryllidaceae).

Bertholdo Dewes Neto ^{1,*}, Kicia Karinne Pereira Gomes-Copeland ², Dâmaris Silveira ², Sueli Maria Gomes ¹, Julia Marina Muller Craesmeyer ², Christopher William Fagg ¹

¹ Department of Botany, University of Brasília, Brasília 70910-900, DF, Brazil; bertholdo.dewes@outlook.com; suelimariagomes@gmail.com; acaciafagg@gmail.com

² Laboratory of Natural Products, Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Brasília 70910-900, DF, Brazil; kiciagomes@gmail.com; damaris@unb.br

* Correspondence: bertholdo.dewes@outlook.com (B.D.N.); acaciafagg@gmail.com (C.W.F.)

Abstract: *Zephyranthes irwiniana* (Ravenna) Nic. García is an endemic, red list threatened species from the Brazilian savannah with pharmacological potential to treat the symptoms of Alzheimer's Disease – AD. This work analyzed the vegetative growth and phytochemistry of its potential compounds, in response to variations in sucrose concentration and activated carbon – AC. Seeds were germinated *in vitro* and in the greenhouse. The *in vitro* bulbs were separated in 6 treatments with different sucrose concentrations (30, 45 and 60 gL⁻¹) and/or AC (1 gL⁻¹). Biomass increases of individuals grown in the greenhouse was higher than those cultivated *in vitro*. Sucrose concentration significantly increased biomass and root number. AC had a positive influence on leaf and root size, and a negative influence on root number. GC-MS analyses indicated great variation in the abundance of α -terpenyl-acetate, ethyl linoleate, clionasterol and lycorine between treatments, with maximum concentrations 53.06%, 38.68, 14.34% and 2.57% respectively. Histolocalization tests indicated the presence of alkaloids in the leaf chlorenchyma and bulb cataphylls. Finally, the present study provided new evidence that the constitution of the culture medium directly influences the vegetative growth and phytochemistry of this species providing a good medium condition for propagating the species under threat.

Keywords: lycorine; alkaloid's histolocalization; Cerrado; acetylcholinesterase, sucrose, activated charcoal

1. Introduction

The increase demand of natural products has stimulated, in the last decades, the development of techniques for plants mass production [1,2], and *in vitro* propagation is being an important biotechnological tool [3], which also allows the production of bioactive compounds from plants under stable and controlled conditions in a short period of time [2].

The Amaryllidaceae family is known for its ornamental potential and the ability to synthesize several alkaloids, including galantamine and lycorine, potent acetylcholinesterase (AChE) inhibitors, used to alleviate the symptoms of Alzheimer's disease [4]. However, some species in this family are poorly represented, have a low multiplication rate [5] and are vulnerable or at risk of extinction [6]. Among the species in this family, *Zephyranthes irwiniana* (Ravenna) Nic. García (Figure 1) is endemic to the Brazilian savannah (Cerrado), classified as Vulnerable in terms of threat of extinction [7] and has no studies on propagation or phytochemistry under controlled conditions.



Figure 1. *Zephyranthes irwiniana* (Ravenna) Nic. García

It was observed in recent studies with Amaryllidaceae species that propagation methods [8] and the plant habitat [9] can alter phytochemistry, varying the abundance of secondary metabolites for the same species. Many *in vitro* propagation studies evaluated the influence of culture medium composition on the seedling phytochemistry and opt to vary the type and concentration of the carbohydrate source, with sucrose being the most common [10, 11]. However, few have evaluated phytochemistry from seed propagation [8] and the influence of the interaction of sucrose with activated charcoal on vegetative growth and phytochemistry.

These studies are important to increase biomass production, improve yields and the relative abundance of target compounds [11]. Furthermore, evaluating vegetative growth and determining the localization of these compounds in plant tissues can provide a better understanding of the role and sites of synthesis and accumulation of these compounds [12]. However, data of histolocalization of alkaloids in Amaryllidaceae are scarce.

Given this set of factors, the objective of this work was to analyze, for the first time, the vegetative growth and phytochemistry of potential compounds for the treatment of AD, in response to variations in sucrose concentration and the use of activated charcoal in the culture medium, for the species *Z. irwiniana*, propagated *in vitro* by seed.

2. Results

2.1. Vegetative Growth in a Greenhouse

The beginning of germination in a greenhouse occurred 20 days after sowing. Only 11 seeds germinated out of a total of 162, representing 6.79% of the total. The average maximum and minimum temperatures recorded during the experiment were 26.66 °C and 12.91 °C, respectively. The maximum, average and minimum temperature recorded was, respectively 44.91 °C, 20.03 °C and

6.13 °C. The maximum, average and minimum relative humidity recorded were, respectively, 99%, 67% and 17%.

Due to the low germination rate, only 7 individuals were evaluated. Both leaf number and average length were 1.95 and 9.38cm, respectively, and for the root, 4.86 and 14.73 cm. The average fresh and dry biomass was 6.54 g and 1.05 g, respectively.

2.2. Vegetative Growth *In vitro* and Influence of Sucrose and Activated Charcoal

The first seeds germinated after the 5th day of sowing, and in total, 154 seeds germinated, representing 96.86% of germinability.

Table 1-3 show the results on the sucrose and activated charcoal influences on the vegetative growth *in vitro* of *Z. irwiniana*.

After 5 months of *in vitro* cultivation, it was observed that the increase of sucrose concentration increased the dry biomass per individual without significant interaction of activated charcoal, (sucrose-biomass: 30 gL⁻¹, 0.05 g; 45 gL⁻¹, 0.06 g; 60 gL⁻¹, 0.10 g). Furthermore, it increased in fresh biomass per individual (sucrose-biomass: 30 gL⁻¹, 0.44 g; 45 gL⁻¹, 0.66 g; 60 gL⁻¹, 0.83 g) and the number of roots (sucrose-roots number: 30 gL⁻¹, 5.33; 45 gL⁻¹, 7.97; 60 gL⁻¹, 10.89) (table 1). For fresh biomass and number of roots, there was a significant interaction of activated charcoal only at a concentration of 60 gL⁻¹ of sucrose (table 3).

Table 1. Results of vegetative growth data collected of *Zephyranthes irwiniana*. Different letters indicate significant differences by Tukey's test ($p < 0.05$).

	(gL ⁻¹)	Treatment	Leaf n°	Root n°	Leaf le. (cm)	Root le. (cm)	Fresh biom. (g)	Dry biom. (g)
sucrose	30.0	T1-T2	3.78 a	5.33 a	20.25 a	16.83 a	0.44 a	0.05 a
	45.0	T3-T4	3.86 a	7.97 b	20.33 a	18.19 a	0.66 b	0.06 a
	60.0	T5-T6	4.02 a	10.89 c	19.53 a	17.64 a	0.83 c	0.10 b
AC	0.0	T1, T3, T5	3.63 a	8.89 a	18.31 a	14.95 a	0.61 a	0.06 a
	1.0	T2, T4, T6	4.15 b	7.24 b	21.76 b	20.16 b	0.68 a	0.07 a

Leaf n°: leaf number. Root n°: root number. Leaf le.: leaf length. Root le.: root length. Fresh biom.: fresh biomass. Dry biom.: dry biomass. AC: activated charcoal. All values are average.

Table 2. Results of sucrose breakdown within each AC level in vegetative growth data collected of *Zephyranthes irwiniana*. Different letters indicate significant differences by Tukey's test ($p < 0.05$).

AC (gL ⁻¹)	Sucrose (gL ⁻¹)	Treatment	Leaf n°	Root n°	Leaf le. (cm)	Root le. (cm)	Fresh biom. (g)	Dry biom. (g)
0.0	30.0	T1	3.67 a	6.11 a	18.89 a	13.71 a	0.47 a	0.04 a
	45.0	T3	3.61 a	8.33 b	18.91 a	16.55 b	0.64 ab	0.06 a
	60.0	T5	3.66 a	12.22 c	17.13 b	14.59 ab	0.71 b	0.09 b
1.0	30.0	T2	3.89 a	4.56 a	21.60 a	19.96 a	0.40 a	0.05 a
	45.0	T4	4.11 a	7.61 b	21.74 a	19.83 a	0.67 b	0.06 a
	60.0	T6	4.44 a	9.56 b	21.93 a	20.69 a	0.96 c	0.11 b

Leaf n^o: leaf number. Root n^o: root number. Leaf le.: leaf length. Root le.: root length. Fresh biom.: fresh biomass. Dry biom.: dry biomass. AC: activated charcoal. All values are average.

Table 3. Results of AC breakdown within each sucrose level in vegetative growth data collected of *Zephyranthes irwiniana*. Different letters indicate significant differences by Tukey's test ($p < 0.05$).

AC (gL ⁻¹)	Sucrose (gL ⁻¹)	Treatment	Leaf n ^o	Root n ^o	Leaf le. (cm)	Root le. (cm)	Fresh biom. (g)	Dry biom. (g)
0.0	30.0	T1	3.67 a	6.11 a	18.90 a	13.71 a	0.47 a	0.04 a
1.0		T2	3.89 a	4.56 a	21.60 b	19.96 b	0.40 a	0.05 a
0.0	45.0	T3	3.61 a	8.33 a	18.91 a	16.55 a	0.64 a	0.06 a
1.0		T4	4.11 b	7.61 a	21.75 b	19.83 b	0.67 a	0.06 a
0.0	60.0	T5	3.61 a	12.22 a	17.13 a	14.59 a	0.71 a	0.09 a
1.0		T6	4.44 b	9.56 b	21.93 b	20.69 b	0.96 b	0.11 a

Leaf n^o: leaf number. Root n^o: root number. Leaf le.: leaf length. Root le.: root length. Fresh biom.: fresh biomass. Dry biom.: dry biomass. AC: activated charcoal. All values are average.

Activated charcoal (AC) increased the length of the largest leaf (with AC: 21.76 cm; without AC: 18.31 cm) and the largest root (with AC: 20.16 cm; without AC: 14.95 cm) (table 1) at all levels of sucrose concentration, without significant interaction of sucrose within AC levels. AC also positively influenced the number of leaves, with a significant interaction for the sucrose concentration of 45.0 gL⁻¹ (T3: 3.61; T4: 4.11) and 60.0 gL⁻¹ (T5: 3.61; T6: 4.44) (table 3), however, there was no significant interaction of sucrose within AC levels. The number of roots was negatively influenced by AC (with AC: 7.24 cm; without AC: 8.89 cm) (table 1), interacting significantly with sucrose only at a concentration of 60 gL⁻¹ (T5: 12.22; T6: 9.56) (table 3). There was no influence of AC on the average fresh and dry biomass per individual (Table 1-3).

2.3. Ethanol Extract

The treatment T7 presented the lowest percentage yields of compounds extracted by ethanol for the bulb (1.85%), leaf (13.36%) and root (6.94%) (Figure 2). The best yields obtained for ethanolic leaf extract were from treatments without AC and the treatment T3 (46.71%) was significantly higher than all treatments. Except for treatments T3 and T7, the other treatments didn't differ statistically. The production of bulb extract showed similar results for all treatments, except for T6 (4.42%) and T7 (1.85%), which had values well below the average. The results for the bulbs, when compared with those obtained for the leaves, showed a significantly lower yield, however, the production of ethanolic extract for the root was similar to the bulb and the leaf.

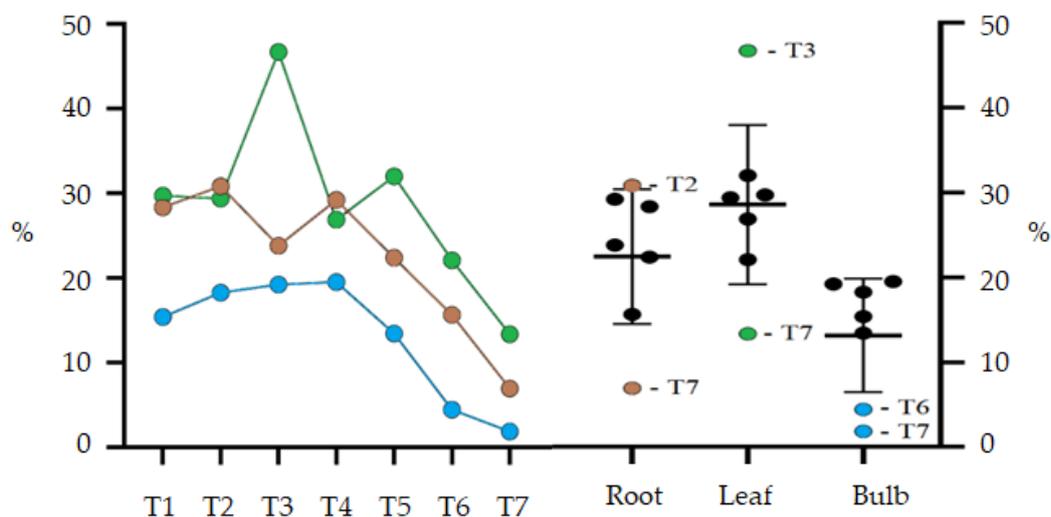


Figure 2. Percentage yield of ethanolic extract (EE) from root, leaf and bulb of *Zephyranthes irwiniana* cultivated *in vitro* and greenhouse by treatment. Blue line: Bulb. Green line: Leaf. Brown line: Root. The bars are the confidence interval (95%).

Treatments with a lower concentration of sucrose per liter showed a better percentage extraction yield, observing a downward trend in treatments with more than 45 gL⁻¹ of sucrose. The best results obtained were from treatments T3 and T2, respectively for leaf and root. For the root, there was a significant interaction between activated charcoal and a concentration of 30 gL⁻¹ of sucrose, and for the leaf, activated charcoal interacted with sucrose, negatively influencing the T4 extraction yield. The sucrose concentration did not significantly influence the bulb extraction yield, only when it interacted with AC in the T6 treatment.

2.4. Phytochemical Profile GC-MS

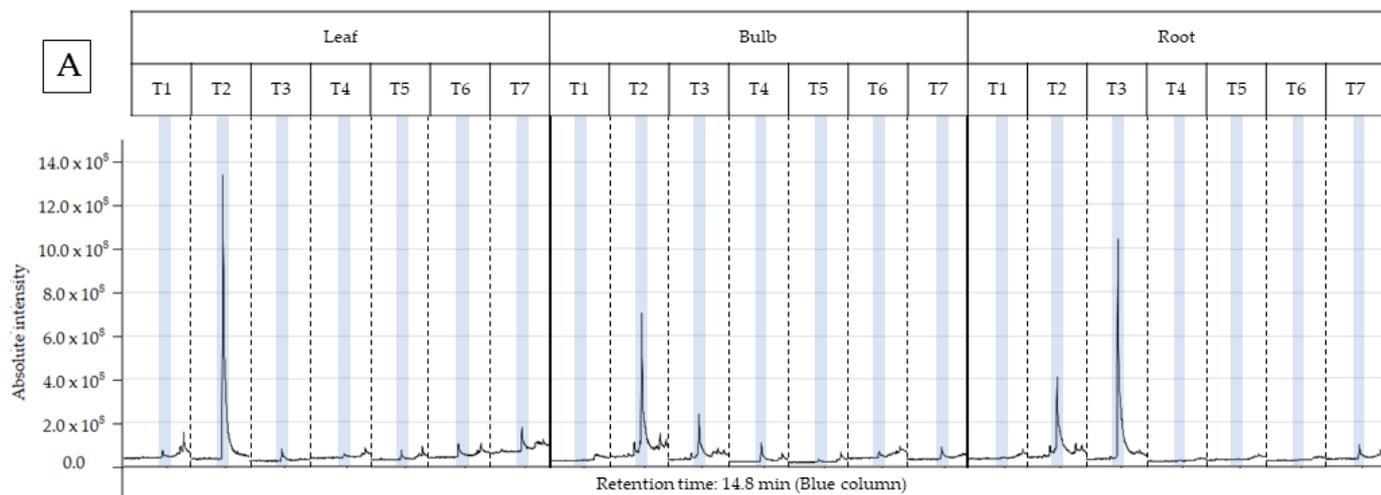
The characterization of the chemical profile of all extracts revealed 15 potential compounds (Table 4). For analysis, the compounds α -terpinyl-acetate, ethyl linoleate, clionasterol and lycorine were selected, as they were detected in at least 80% of the extracts, except for lycorine, because it is a potential alkaloid for the AD treatment. Most importantly, they have characteristics of medicinal interest according to the scientific literature. The retention time and variation in absolute intensity of each treatment are described in the chromatogram in Figures 3 and 4. All chromatogram is described in supplementary materials.

Table 4. Compounds of *Zephyranthes irwiniana* identified by gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS).

Treat.	%TIC	RT (min)	RI (exp)	RI (Lit)	Compound	Mass Fragmentation (Relative Intensity)
T3 (root)	40.8	14.9	1351	1350 ± 3	α -terpenyl acetate	121 (100), 93 (62), 43 (47), 136 (39), 67 (28), 68 (22), 107 (20), 91 (17), 79 (16), 77 (15)
T1 (leaf)	2.9	15.7	1390	1396 ± 2	Decanoic acid, ethyl ester	88 (100), 101 (51), 70 (29), 73 (39), 157 (25), 41 (25), 61 (24), 155 (22), 60 (21), 43 (20)
T2 (leaf)	1.7	17.3	1499	1499 ± 8	Naphthalene, 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1,8a-dimethyl-7-(1-	55 (100), 107 (97), 189 (96), 81 (88), 79 (82), 105 (73), 108 (57), 121 (55), 133 (54), 161 (41)

					methylethenyl)-, [1S-(1 α ,7 α ,8 α)]-		
T1 (bulb)	3.5	18.3	1590	1595 \pm 2	Dodecanoic acid, ethyl ester	88 (100), 101 (38), 73 (26), 70 (23), 41 (21), 43 (20), 55 (18), 69 (14), 57 (13), 160 (12)	
T1 (leaf)	4.7	21.4	1832	1837 \pm 5	Neophytadiene	68 (100), 69 (70), 82 (63), 95 (56), 57 (53), 67 (49), 71 (44), 81 (40), 55 (38), 41 (36)	
T6 (bulb)	3.7	22.7	1922	1926 \pm 2	Hexadecanoic acid, methyl ester	74 (100), 87 (47), 43 (15), 75 (14), 143 (11), 227 (9), 83 (6), 59 (5), 129 (5), 171 (5)	
T2 (bulb)	1.4	23.2	1956	1968 \pm 7	n-Hexadecanoic acid	60 (100), 43 (92), 41 (81), 55 (65), 129 (64), 69 (61), 83 (47), 213 (33), 185 (28), 256 (27)	
T6 (bulb)	12.3	23.7	1990	1993 \pm 3	Hexadecanoic acid, ethyl ester	88 (100), 70 (27), 43 (23), 41 (19), 55 (18), 57 (16), 69 (15), 89 (15), 157 (15), 241 (11)	
T7 (root)	4.0	25.2	2090	2092 \pm 4	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	81 (100), 67 (70), 68 (47), 41 (41), 82 (33), 96 (31), 69 (28), 79 (27), 64 (24), 109 (21)	
T1 (leaf)	6.4	25.3	2095	2098 \pm 3	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	79 (100), 67 (83), 95 (56), 108 (48), 80 (48), 93 (47), 55 (43), 69 (28), 77 (28), 107 (26)	
T7 (root)	38.4	26.3	2156	2162 \pm 6	Ethyl linoleate	67 (100), 81 (94), 95 (57), 82 (48), 55 (48), 79 (43), 41 (42), 68 (42), 69 (35), 109 (32)	
T5 (leaf)	7.0	26.4	2163	2171 \pm 13	9,12,15-Octadecatrienoic acid, ethyl ester, (Z,Z,Z)-	79 (100), 95 (82), 81 (62), 108 (40), 41 (40), 44 (32), 55 (29), 93 (25), 149 (17), 119 (16)	
T5 (bulb)	28.6	29.3	2353	2374 \pm 25	Octadecanamide	59 (100), 72 (79), 41 (31), 55 (30), 69 (24), 43 (22), 83 (15), 67 (14), 81 (13), 126 (12)	
T5 (leaf)	2.6	34.9	2734	2747 - N/A	Lycorine	226 (100), 250 (62), 227 (52), 287 (23), 268 (19), 286 (16), 228 (10), 240 (6), 269 (6), 270 (5)	
T7 (leaf)	11.6	42.3	3310	3321 \pm 31	Clionasterol	43 (100), 107 (88), 145 (82), 414 (77), 55 (77), 81 (75), 161 (72), 95 (72), 213 (68), 93 (66)	

Identification was based on comparison of the compounds mass spectral data (MS) and retention indices (RI) with those of NIST Mass Spectral Library (2014). The proportion of each compound is expressed as a percentage (%) of the total compounds measured by total ion current (TIC). The TIC% corresponds to the selected treatment (previous column) that obtained the best peak resolution. Treat.: treatment. RT: retention time. RI (exp): retention index calculated. RI (Lit): published retention index (NIST, 2014).



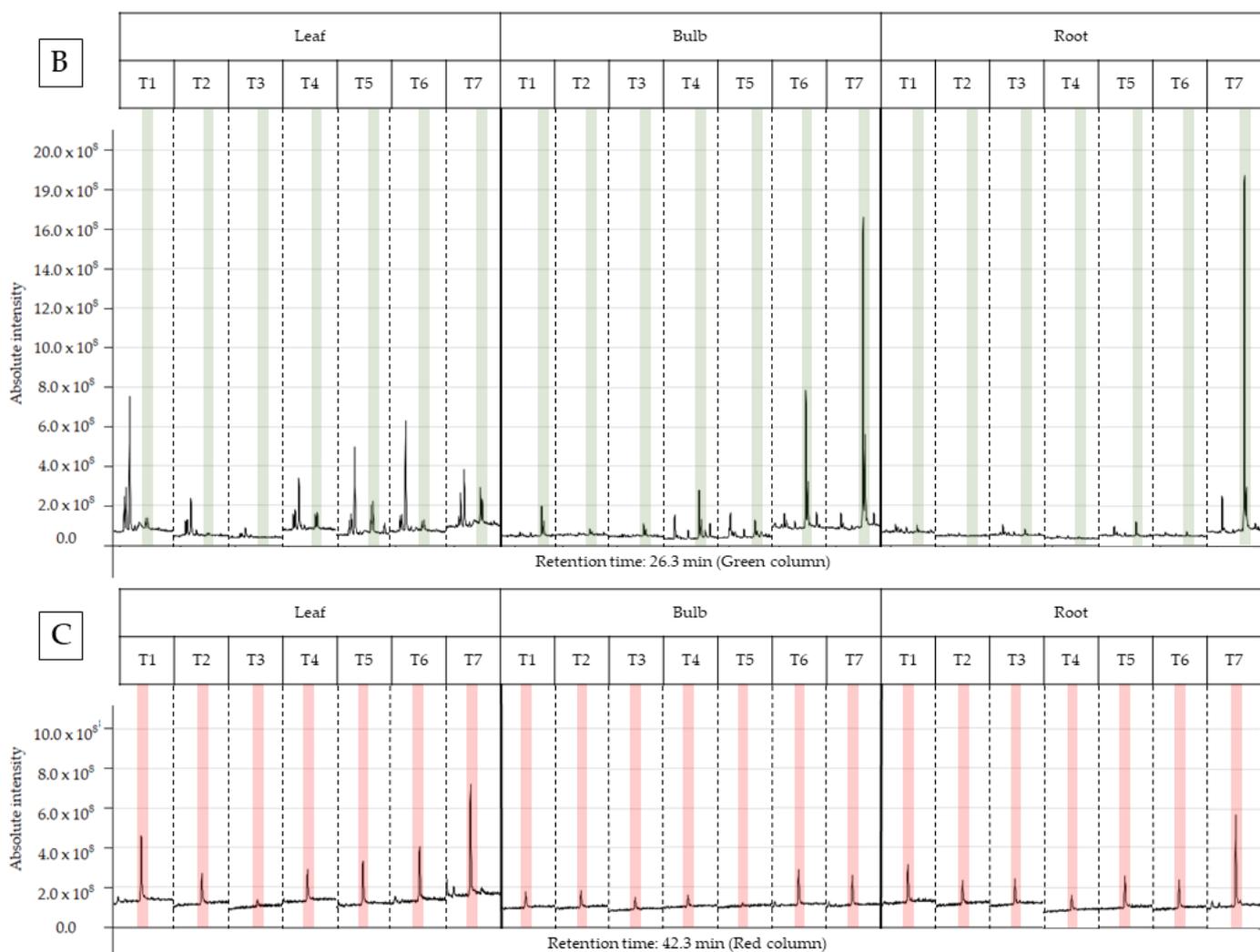


Figure 3. Peak of the compound in the chromatogram of each ethanol extract from treatments T1-T7 for leaf, bulb and root of *Zephyranthes irwiniana*. A - α -terpinyl-acetate (blue column). B - ethyl linoleate (green column). C - clionasterol (red column).

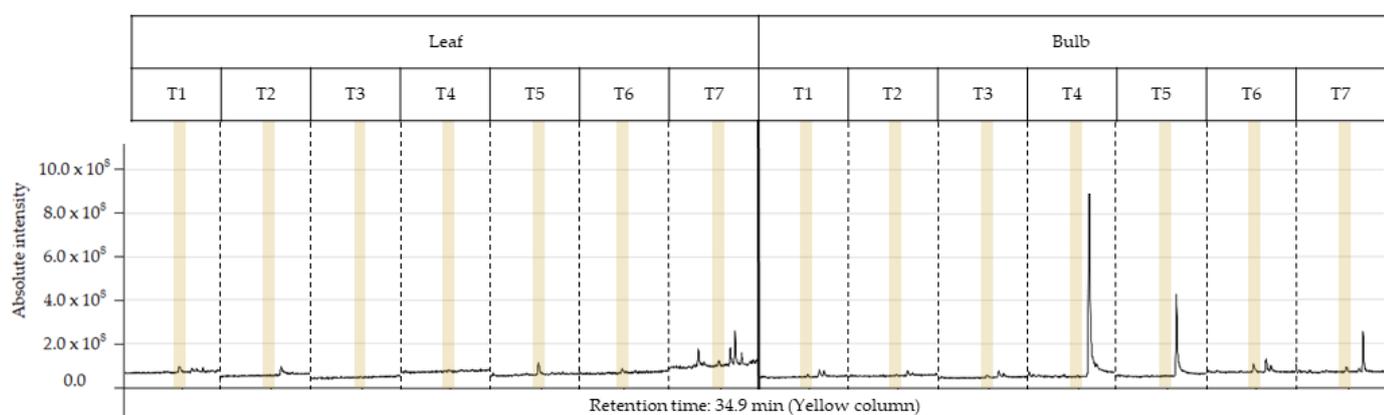


Figure 4. Peak of the lycorine (yellow column) in the chromatogram of each ethanol extract from treatments T1-T7 for leaf and bulb of *Zephyranthes irwiniana*.

2.4.1. Alpha-Terpinyl Acetate

The T2 ethanolic extract (30 gL⁻¹ sucrose and 1.0 g AC) presented the highest percentage of area in the α -terpinyl-acetate chromatogram, being 10.70% and

53.06%, respectively for bulb and leaf, however, the root extract showed no difference between treatments. The results of this study demonstrate that the abundance of α -terpinyl acetate varied due to the treatment with sucrose and AC, with a positive interaction between both in the T2 treatment for leaf and bulb, and negative in T3 for the root, as the extract without AC presented a value higher than the extract with AC (T4). It was observed that the abundance of α -terpinyl acetate decreased from the leaf to the bulb and from the bulb to the root in T2, and the opposite occurred with T3, where there was an increase in abundance in this direction. The T7 treatment (substrate in a greenhouse) didn't present an advantage in production when compared to the *in vitro* treatment, hence *in vitro* cultivation is a promising option to increase the production of this compound.

2.4.2. Ethyl Linoleate

The EE from the treatment T7 (substrate in a greenhouse) presented the highest percentage of area for the bulb and root, respectively, 38.68% and 38.41%, compared to the other treatments (T1-T6), and these did not show a significant difference between them. The compound was not identified in the leaf and root extract of T2 (sucrose 30 gL⁻¹ and 1.0 g of AC) and in the leaf extract of T3 (sucrose 45 gL⁻¹ without AC). The leaf extracts presented an abundance that varied between 1.59% and 6.98%, well below the maximum abundances found for the bulb and root. This suggests that the leaf is not promising for extracting this compound compared to the bulb and root. For the other extracts, there was no significant difference when analyzed and compared within the same part of the plant.

2.4.3. Clionasterol

Root extracts presented the two highest relative abundances of 14.34% and 13.94%, respectively for T6 and T4, being significantly higher than the other extracts. Treatments T2 and T5 presented the lowest abundances, and both were within the confidence interval. The other treatments were statistically equal. For the bulb, treatments T2-T5 presented relative abundance between 1.00% and 2.00% and significantly higher values were obtained in treatments T1 (5.60%) and T6 (4.58%). In general, the T6 treatment presented the best results, as for the bulb and root it was statistically superior to the others and for the leaf, it presented the second highest abundance. The T7 treatment presented the highest abundance of ethanol extracts in the leaves, at 11.62%, and the lowest abundance in the roots (0.73%). Interestingly, treatment T1 also showed good results in general terms, similar to T6, however the composition of the culture media differs in the concentration of sucrose and the use of AC. T6 was higher only in the root extract and T1 in the leaf and bulb extract.

2.4.4. Lycorine

The alkaloid lycorine was identified in the bulb of treatments T1, T3, T6 and T7, presenting respectively a relative abundance of 0.74%, 0.32%, 1.09% and 0.59%, and in the leaf of treatments T1, T5, T6 and T7, respectively, 0.87%, 2.57%, 0.86%, 0.54%. No alkaloids were detected in root extracts. Treatments T1, T6 and T7 presented values close to relative abundance for the bulb and leaf, however for the leaf, T5, when compared to T6, presented a much higher value, indicating that AC interacted negatively with the concentration of 60 gL⁻¹ of sucrose. The same occurred at a concentration of 30 gL⁻¹ of sucrose, as lycorine was not detected in T2 in any part of the plant. Furthermore, the treatment that presented the highest relative abundance was the T5 leaf extract. For the bulb, AC interacted positively with the concentration of 60 gL⁻¹ of sucrose, as lycorine was

detected in T6 but not in T5. The opposite happened at concentrations of 30 and 45 gL⁻¹. The best sucrose concentration was 60 gL⁻¹ for the bulb and leaf, presenting respectively 1.09% (T6) and 2.57% (T5) of relative abundance.

2.5. *Histolocalization of Alkaloids in leaves and bulbils*

The histochemical tests are shown in Figure 5 and intensity of reaction in Table 5. The histochemical test on individuals from T1 treatment (*in vitro*) with Dragendorff and Wagner reagents were positive for leaf and bulb, where the formation of a brownish red color was observed in both, indicating the presence of alkaloids, and dark brown-colored granules starch grains. In the leaves, alkaloids were detected only in the palisade and spongy chlorenchyma cells, present in several cells in the leaf margins, just below the adaxial epidermis. Alkaloids were detected in the chlorenchyma cells that accompany the adaxial and abaxial epidermis. No alkaloids were detected in the spongy parenchyma, vascular bundles, or other structures present in the leaf.

In the bulb, a strong reaction for alkaloids was observed in the region adjacent to the epidermis that faces the outside of each cataphyll, decreasing as the cataphyll reaches more extreme positions of the bulb, that is, further away from the bulbous center. This region is composed of starchy reserve parenchyma, and it was observed that the concentration of starch grains is organized in a similar way to the alkaloids in the cataphyll, that is, regions of the cataphyll with the highest concentration of alkaloids are the same ones that present the highest concentrations of starch grains.

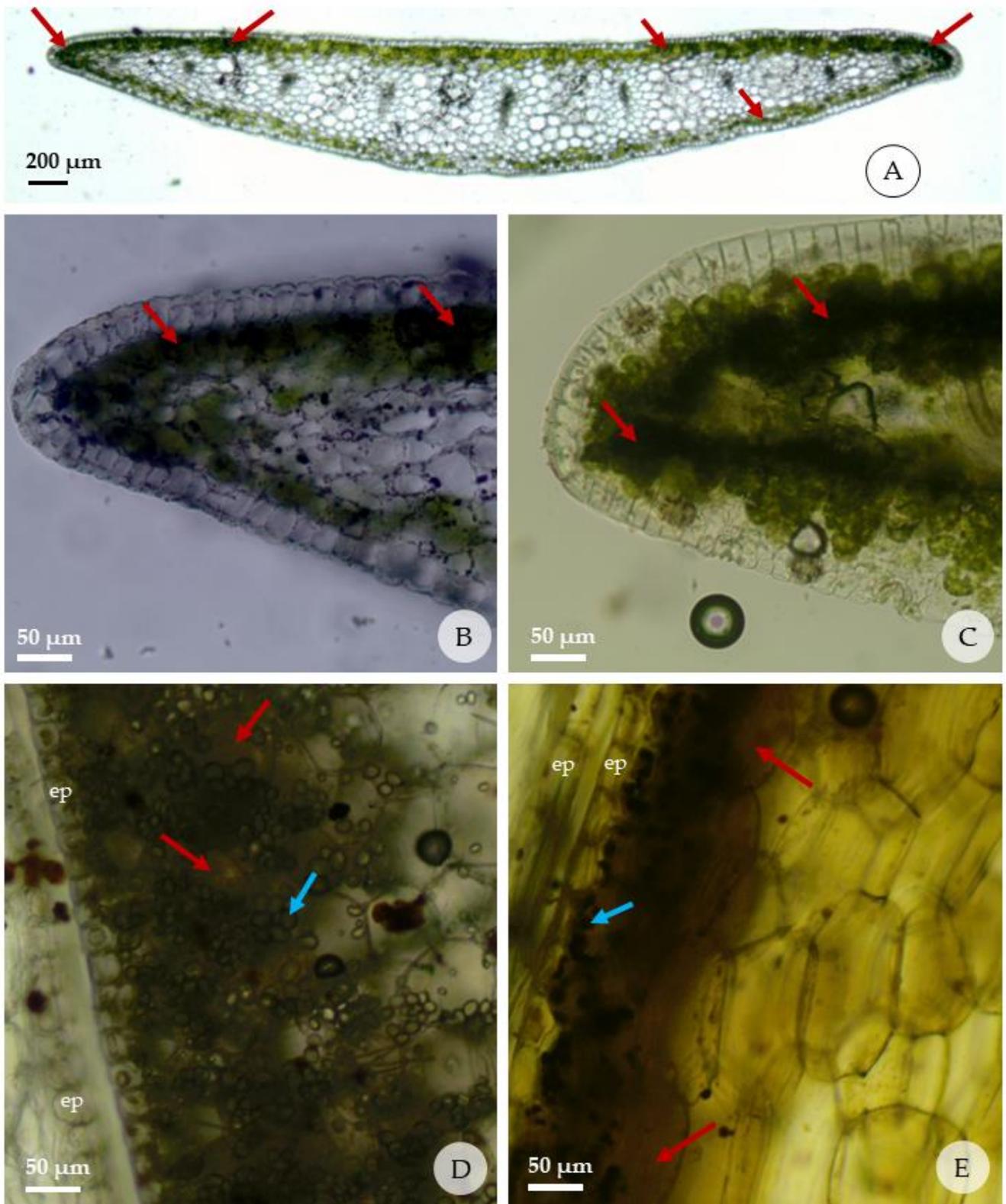


Figure 5. Reactions of fresh leaves and bulbs of *Zephyranthes irwiniana* (cross section) submitted to the histochemical test; red arrows indicate presence of alkaloids; blue arrows indicate the starch grains. A-C. detail of presence of alkaloid in the leaf margins, just below the adaxial and abaxial epidermis; D-E. detail of presence of alkaloid in the bulbs in the region adjacent to the epidermis that faces the outside of each cataphyll; A, B and D. Dragendorff test; C and E. Test with Wagner's reagent. (ep: epidermis)

Table 5. Intensity of the reaction of the fresh leaves and bulbs of *Zephyranthes irwiniana* (cross section) submitted to the histochemical test.

Compound	Test	Leaves	Bulbs
Alkaloid	Dragendorff	+	+
	Wagner	++	++

Note: (+) present; number of signs indicate the intensity of the reaction.

3. Discussion

The present study showed that the concentration of sucrose and the use of AC in the culture medium significantly influence the vegetative growth and, mainly, the phytochemistry of *Z. irwiniana*. Individuals propagated in a greenhouse had a low germination rate (6.79%), much lower than that obtained in *in vitro* cultivation (96.86%). The results obtained in *in vitro* propagation were very promising, being an efficient strategy for propagating the species *Z. irwiniana*, and the low germination rate recorded in the greenhouse propagation agrees with Herranz et al. (2020), who state that the Amaryllidaceae family has a small natural multiplication rate [13]. The germination success obtained in *in vitro* propagation, was higher than that observed for other Amaryllidaceae species. [14-16].

The increase in biomass of individuals grown in a greenhouse was higher than that *in vitro*, with emphasis on the bulb, which represented, on average, 78.8% of the total biomass (root, leaf and bulb). The total fresh and dry biomass, obtained by the sum of individuals grown in a greenhouse, was much higher when compared to those obtained in all *in vitro* cultivation treatments, regardless of the sucrose concentration and the use of AC in the culture medium. These results are even more significant when we compare the number of individuals used to obtain the total biomass per treatment, which was 7 individuals in greenhouse cultivation and an average of 21 individuals for each treatment cultivated *in vitro*. Therefore, the present study suggests that cultivation in a greenhouse is more advantageous in terms of increasing biomass than *in vitro*, especially if the target is the bulb.

The best biomass productivity observed *in vitro* was obtained using a concentration of 60 gL⁻¹ of sucrose, which also positively influenced the number of roots (table 1). Furthermore, this concentration did not negatively influence the other variables. Juan-Vicedo et al. (2019) observed an increase in biomass production of the species *Lapiedra martinezii* Lag. (Amaryllidaceae) related to the highest concentration of sucrose, and the greatest increase in biomass production found was also for a concentration of 60 gL⁻¹ of sucrose without activated carbon [10]. Other studies also observed that a higher concentration of sucrose in the culture medium improved bulb development in Amaryllidaceae cultivars and species [17-19]. However, these studies only evaluated biomass production related to variation in sucrose concentration, but not the interaction with AC. The interaction of sucrose at a concentration of 60 gL⁻¹ with AC was positive to produce dry biomass and negative for the number of roots. It is interesting to highlight that, because the extraction of secondary metabolites is carried out from dry biomass, and the use of AC can be a better alternative in the propagation of Amaryllidaceae species to produce secondary metabolites.

Other studies observed that the best concentration of sucrose in the culture medium for increasing biomass was 90 gL⁻¹ [20,21]. This concentration was not tested in this study, and it would be interesting to test the interaction of AC with the sucrose concentration of 90 gL⁻¹ in subsequent studies.

Different from sucrose, AC did not influence the increase in fresh and dry biomass, however, it had a significant and positive influence on the number of leaves and the length of leaves and roots without the significant interaction of sucrose concentrations. Few previous studies have evaluated the influence of AC on the *in vitro* vegetative growth of Amaryllidaceae, and the results obtained in the present study show that the use of AC can positively influence vegetative growth and phytochemistry, therefore, it is important to evaluate its effect on other species. Tahchy et al. (2011) observed that the addition of AC to *in vitro* tissue cultures of three species of Amaryllidaceae was not beneficial at any concentration used (0.0, 5.0 and 10.0 gL⁻¹), always having a negative effect on survival, callus and organogenesis. Furthermore, they observed that the concentration of AC in the nutrient medium decreases the rate of bulb and root formation [22]. Juan-Vicedo et al. (2019) did not observe differences in morphometric characteristics between seedlings of the species *Lapiedra martinezii* cultivated *in vitro* with AC and wild specimens, finding stability of the materials produced *in vitro* [10]. In contrast of these studies, the present study observed that the use of AC resulted in the production of leaves and roots with greater length and, in the case of the number of leaves, stimulated production. Thus, the use of AC must depend on the proposed objectives, as it was positive for the length of leaves and roots, but negative for the number of roots. Anatomical studies may provide new information about the influence of sucrose and AC on the morphology of the species *Z. irwiniana* micro propagated *in vitro*.

The plants propagated in a greenhouse had the greatest biomass increase when compared to seedlings propagated *in vitro* but had the lowest EE yields. This suggests that biomass productivity did not result in a greater productivity of metabolites, yet treatments with a lower concentration of sucrose per liter showed a better percentage extraction yield, observing a downward trend in cultures with more than 45 gL⁻¹ of sucrose. When the objective is the production of secondary metabolites, improving the extraction yield is very important to improve the efficiency of the entire process, and high yields result in a lower cost of producing plant biomass, as fewer individuals are used to obtain the same quantity of extract. In this aspect, *in vitro* cultivation proved to be the best alternative for the production of crude EE, with emphasis on the leaf, which presented the best extraction yields in crops that did not use AC. These results are possibly related to AC's high capacity for adsorption of plant growth regulators and other organic compounds [23], as it is made up of a very fine network of pores and an extraordinarily large surface area [24].

Previous studies have investigated the phytochemical profile of plant species [25-27] or the variation of this profile and the relative abundance of the target compound for the same species, varying the method of propagation and extraction, the composition of the culture medium or plant part used [8,20,21,27]. In contrast of these, the present study used AC to evaluate whether the interaction with sucrose at different concentrations would result in variation in relative abundances for the same target compound. The variations observed in the chemical profile of the chromatograms of the crude EE (Figure 3-4) in the present study revealed the influence of sucrose and AC on the biosynthesis of metabolites (figure 3-4), showing that they affected the relative abundance of the compounds α -terpenyl-acetate, ethyl linoleate, clionasterol and lycorine, in the leaf, bulb and root.

The α -terpenyl-acetate is a monoterpene ester and a secondary metabolite [28]. This compound is studied for anticholinesterase activity and antioxidant activity, in addition, molecular anchoring, physicochemical and ADMET (absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity) properties were also determined to predict whether it is orally active and has properties central nervous system (CNS) medications [29]. Recently, studies on the inhibition of the SARS-CoV-2 virus were conducted [30].

Regarding the anticholinesterase potential of α -terpenyl acetate, Chowdhury and Kumar, (2020) concluded in their study that this compound binds to multiple drug targets implicated in AD and has also demonstrated to be anticholinesterase, antioxidant, anti-amyloidogenic and neuroprotective potential and could be used as a clue to develop a new, safe and effective therapy for AD [29].

Vaičiulytė et al. (2021) found a maximum relative abundance of 64.22% for the aerial parts of the species *Thymus pulegioides* L. [28] and in the study by Michet et al. (2008) a variation between 64.8-88.0% was reported, also for the aerial parts, with α -terpenyl-acetate being the dominant compound of the essential oil for this wild species [31]. Alam et al. (2019) found a relative abundance of between 41.42-55.36% for three varieties of *E. cardamomum* fruits [32]. For the species *Z. irwiniana*, a maximum relative abundance of 53.06% was recorded in the leaf extract of individuals cultivated at a concentration of 30 gL⁻¹ of sucrose and 1.0 gL⁻¹ of AC. This result suggests that the interaction of AC at this concentration of sucrose is very advantageous to produce α -terpenyl-acetate, as it was much higher than the relative abundance obtained in other extracts, with the potential to replicate in *in vitro* cultures of different species that aim to the production of this compound.

Ethyl linoleate (synonym: linoleic acid ethyl ester) is an unsaturated fat obtained by the esterification of linoleic acid and ethanol, catalyzed by sulfuric acid [33]. This compound has many physiological functions, such as increasing immunity, reducing cholesterol and lipid levels in the blood, and is the raw material for a highly effective medicine in the prevention and treatment of chronic diseases, such as cerebral thrombosis and atherosclerosis [34]. Kissling et al. (2005), using EE from *Crinum x powellii* bulbs, identified ethyl linoleate as responsible for the inhibition of acetylcholinesterase [35]. Furthermore, ethyl linoleate has antibactericidal and anti-inflammatory properties [36].

Previous studies found an abundance of 15.86% in EE of *Phellinus linteus* (fungus) [37] and 19.67% for hexane extracts of crude oils of *Scutellaria edelbergii* Rench. f. [38]. Aly et al. (2022) found much lower values (0.83%) for hexane extracts from *Psidium guajava* L. leaves [39]. These results are lower than those obtained in the present study, which were 38.68% and 38.41%, respectively for the bulb and root, in the crude EE of individuals propagated in a greenhouse. Different to α -terpenyl-acetate, ethyl linoleate was more abundant in individuals propagated in a greenhouse. Furthermore, the influence of sucrose concentration and the use of AC on changing the abundance of this compound was not verified in this study, as they presented statistically equal values for the bulb and root, except for leaf extracts, but these did not prove to be viable for the isolation and commercialization of the compound, as they presented low abundance, varying between 1.59% and 6.98% in treatments.

Clionasterol (synonym: γ -sitosterol) is a triterpene, member of the phytosterol class. This compound has multiple bioactivities, such as anti-inflammatory, diabetes control [40], antitumor agent [41], antioxidant [39], bactericidal and fungicide [42]. Furthermore, recent studies report that clionasterol is an important agent in the enzymatic inhibition of acetylcholinesterase [39; 43] and butyrylcholinesterase [44], presenting the best results in molecular coupling, when compared to other compounds, indicating that it is a potential medicine for the treatment of AD.

Z. irwiniana showed promising results for clionasterol production, with a relative abundance of 14.34% in the root extract of individuals cultivated *in vitro*, with 30 gL⁻¹ of sucrose with AC. Aly et al. (2022) found a relative abundance of 3.90% in the hexanic extract of the essential oil of the species *Psidium guajava* L. [39], being lower than the maximum value recorded for *Z. irwiniana*. Other studies showed different concentrations of clionasterol in plant extracts from different species, from 5.42% to the ethanolic extract of seed of *Caesalpinia bonduc*

(L.) Roxb. [44], 12.54% for methanolic extract of the root of *Leptadenia reticulata* (Retz.) Wight & Arn. [45], 19.45% for the methanolic extract of the leaves of *Momordica angustisepala* Harms and 15.32% for the methanolic extract of the leaves of *Drynaria laurentii* (Christ) Hieron. [46].

Better results were obtained by Marrelli et al. (2022) for n-hexane fractionated EE of *Allium cepa* L. var. Tropea, obtaining a relative abundance of 29.4% [47]. For *Z. irwiniana* even though root extracts have shown better results, for commercial production, the best option is to use leaves collected from individuals grown in a greenhouse, as they presented a relative abundance of 11.62%, close to the maximum obtained, with the advantage of using the individual in a sustainable way, collecting only the aerial parts.

Lycorine is a natural alkaloid with immense therapeutic potential [48], isolated from bulbs and leaves of plants from the Amaryllidaceae family [49]. The results of previous studies show that among the groups of alkaloids extracted from this family, representatives of the galantamine and lycorine groups presented a significantly higher AChE inhibitory potential than the others [50-53]. Furthermore, other properties such as antitumor, bactericidal, antiparasitic [48], and anticancer [54] activities have been described. Previous studies have also produced a series of derived structures to explore the relationship between their structure and biological activity [49,52]. These facts strongly motivate the screening of Amaryllidaceae alkaloids, comprising different structural types for their AChE inhibitory activity and other biological activities.

Some studies classify lycorine as one of the main alkaloids in terms of relative abundance in the leaves of Amaryllidaceae species [8,25,55,56], and in the bulbs. Among these, Andrade et al. (2012b) found 2.35% for *Narcissus broussonetii* Lag. [57] and in a later study, they found 9.26% for *Hippeastrum aulicum* (Ker Gawl.) Herb. and 41.89% for *Hippeastrum calyptratum* (Ker Gawl.) Herb. [58], all in ethyl acetate fractions from bulbs. The best relative abundance of lycorine obtained in the present study for *Z. irwiniana* was in the leaves of individuals propagated in a culture medium with a concentration of 60 gL⁻¹ of sucrose, without the use of CA (2,57%). Paiva et al. (2020) found the alkaloids galantamine and pseudolycorine in extracts obtained from *Z. irwiniana* bulbs, at concentrations of 41.7 ± 0.9 and 372.6 ± 28.2 µg g⁻¹ [59]. In agreement with Tasker et al. (2018), lycorine was not detected in the root [49].

Previous studies have identified lycorine and other alkaloids in the bulbs and aerial parts of *Zephyranthes concolor* (Lindl.) Benth & Hook. f. [60], *Zephyranthes grandiflora* Lindl. [61], *Zephyranthes robusta* (Herb.) Baker [62], *Zephyranthes candida* (Lindl.) Herb. [63-66], and *Zephyranthes citrina* Baker [67], however, these studies aimed, in common, the identification and structural elucidation of the alkaloids of these species and not the relative abundance in the bulbs and leaves.

Ortiz et al. (2012) found different abundances for lycorine in the basic chloroform fraction of bulbs of *Zephyranthes jamesonii* (Baker) Nic. García & S.C. Arroyo when comparing the collection location [9]. Centeno-Betanzos et al. (2022) found a similar result on ethyl acetate fractions of *Zephyranthes alba* bulbs Flagg, G. Lom. Sm. & García-Mend. and *Zephyranthes fosteri* Traub, where the relative abundance of lycorine also varied depending on the collection site, respectively, from 4.28 - 8.45% and 46.36 - 88.82% [68].

These results and those obtained in the present study (leaf: T1 0,87%; T5 2,57%; T6 0,86%; T7 0,54%. bulb: T1 0,74%; T3 0,32%; T6 1,09%; T7 0,59%) indicate that lycorine production is variable and depends on the substrate or culture medium and *in vitro* propagation is a viable alternative to produce lycorine, because individuals propagated in greenhouse presented the lowest relative abundances in relation to the other treatments.

The histochemical location of the alkaloids, in the leaves and bulb of *Z. irwiniana*, previously unknown, was presented in this study. Determining the localization of secondary compounds in plant tissues can provide a better understanding of the role and sites of synthesis and accumulation of these compounds [12], however, data on the histolocalization of alkaloids in Amaryllidaceae are scarce and is a gap in knowledge about secondary metabolites of this family.

In agreement with the results obtained in crude EE, histochemical tests with Dragendorff and Wagner reagent identified alkaloids in the chlorenchyma cells of the leaf margins and in the bulbs. Similar results were obtained for some species of the Fabaceae family, proposing that green tissues, particularly the palisade mesophyll of the leaves, are the main source of alkaloids [12]. Silva et al. (2013) observed that almost all mesophyll cells in the leaves of *Crinum americanum* L. presented alkaloid content [69], different from the species *Z. irwiniana*, where only the chlorenchymatic cells presented alkaloids.

Studies are necessary to elucidate the mechanisms of interaction between sucrose and AC in plant growth and phytochemistry, as it is not clear how these interactions work, especially in relation to phytochemistry, as these results did not present a pattern.

In summary, the present study provided new evidence that the constitution of the culture medium directly influences plant growth and phytochemistry. Its great contribution is that variations in sucrose concentration and the use of AC can be tested for other species of commercial interest, since the results obtained for *Z. irwiniana* are promising, especially regarding the increase in biomass production and abundance of secondary metabolites, depending on the adjustment of the culture medium. Individuals propagated in a greenhouse showed a greater increase in biomass, mainly in the bulb, and a greater relative abundance of ethyl linoleate. Individuals propagated *in vitro* showed a greater relative abundance of α -terpenyl acetate (53.06% - leaf extract: 30 gL⁻¹ of sucrose, with AC) and clionasterol (14.34% - root extract: 60 gL⁻¹ of sucrose, with AC). Still for individuals propagated *in vitro*, the best biomass productivity observed was obtained using a concentration of 60 gL⁻¹ of sucrose with AC, without negatively influencing other variables. Thus, the use of AC must depend on the proposed objectives, as it was positive for the length of leaves and roots, but negative for the number of roots.

Finally, the results demonstrate that adjustments in the culture medium are effective in obtaining the best results in plant growth and phytochemistry, according to the established objective. However, this is a complex process and requires further research to define the relationships between the biosynthesis of bioactive compounds and the optimization of the culture medium [70].

4. Materials and Methods

4.1. *Zephyranthes irwiniana* Plant Material

Zephyranthes irwiniana plants (bulbs) were obtained from the Amaryllidaceae Germplasm Collection at Embrapa Genetic Resources and Biotechnology – CENARGEN (voucher Fagg CW 2556). Bulbs were cultivated and seeds collected and stored in brown paper bags for 3 months at room temperature until sowing. Non-viable seeds were eliminated, identified by their small size and reduced reserve tissue.

4.2. Germination and Cultivation in a Greenhouse

Germination of *Z. irwiniana* seeds was carried out in June 2021, using 162 tubes measuring 280 cm³ (190 mm x 63 mm) with Bioplant Plus® commercial

substrate pH 6.2, containing one seed per tube. After sowing, the tubes were placed in the greenhouse of the Reference Center for Nature Conservation and Recovery of Degraded Areas, located at the University of Brasília, Campus Darcy Ribeiro (Lat: 15°46'16.56"S and Long: 47° 52'3.78"O), covered with 50% Sombrite®, under natural temperature and light conditions. The beginning of germination was observed through the emission of the first leaf. Watering was carried out once a day using an automatic system, programmed to irrigate every day for 40 minutes at 7:00 am in the morning. Air temperature and humidity were recorded daily with a data logger, with a measurement frequency of every minute, for the monthly calculation of the average, maximum and minimum of both. The seedlings resulting from germination were cultivated for a period of 270 days until collection in March 2022.

4.3. *In vitro Germination*

To prepare the culture media, MS culture medium [71] (Sigma-Aldrich M5519, USA) was used, supplemented with 3% sucrose (Macron Fine Chemicals TM) and 0.15% Phytigel®. The pH of the culture medium was adjusted to 5.8. Then, it was distributed in the amount of 20 mL in 25 x 150 mm test tubes. Subsequently, the test tubes containing the culture medium were sterilized in an autoclave at a temperature of 121°C, under pressure of 1.5 atm, for a period of 20 minutes. 154 seeds were disinfected with an ethanol solution (70%) for 1 minute, followed by immersion in a commercial solution of sodium hypochlorite (2–2.5%) for 8 minutes and, subsequently, washed three times with distilled water and sterile. After this, the seeds were inoculated and kept in a growth room with a lighting intensity of 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, for a photoperiod of 12 hours, for 120 days. The beginning of germination was observed from root emergence.

4.4. *Micropropagation of Bulbils*

To prepare the culture media for the 6 treatments, MS culture medium [71] (Sigma-Aldrich M5519, USA) was used, supplemented with 0.15% Phytigel®. Furthermore, the culture media from treatments T1-2, T3-4 and T5-6 were supplemented with the respective sucrose concentrations of 30 gL^{-1} , 45 gL^{-1} and 60 gL^{-1} (Macron Fine Chemicals TM, USA), and the T2, T4 and T6 treatment media were also supplemented with 1.0 gL^{-1} of activated charcoal. The pH of the culture medium was adjusted to 5.8. Then, it was distributed in the amount of 20 mL in 25 x 150 mm test tubes. Subsequently, the test tubes containing the culture medium were sterilized in an autoclave at a temperature of 121°C, under pressure of 1.5 atm, for a period of 20 minutes.

After 120 days of *in vitro* germination of *Z. irwiniana* seeds, the test tubes were randomly separated into 6 groups, each with 25 seedlings corresponding to the same treatment. Each seedling had its root and leaves separated from the bulbil and the bulbil was inserted into a new test tube containing the corresponding treatment (T1-T6). Finally, the test tubes were closed and placed in the growth room with a lighting intensity of 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, for a photoperiod of 12 hours.

The bulbils were cultivated for a period of 150 days, and at the end of this period (March 2022), all seedlings and plants cultivated, *in vitro* and in a greenhouse, were collected and washed with running water.

4.5. *Seedling growth Analysis*

The length of the main root and leaf, the number of roots and leaves, and the total fresh and dry biomass of each seedling were evaluated. Measurements (precision 10.0mm) were taken by placing the root and leaf so that they were

stretched as much as possible, without breaking. The number of roots and leaves was determined by simple counting. In relation to the individuals that had bulbils in addition to the main bulb, these were measured individually (length and quantity of root and leaf), however, to obtain the fresh and dry biomass, they were weighed together, as they originated from the same seed. To obtain fresh and dry biomass, each seedling was weighed using an analytical balance.

4.6. *Zephyranthes irwiniana* Extract

Leaves, bulbs and roots of *Z. irwiniana* were dried in an oven with air circulation at 40 °C for 120 h. The plant material was homogenized and macerated in hexane P.A for 72 h. After the third maceration with hexane, a second extraction was carried out with ethanol for 72 h, and after the third maceration with ethanol, the extracted solution was filtered and concentrated at 40 °C using a rotary evaporator under vacuum (Hei-VAP Advantage, ML, G1, 115v— Heidolph, Schwabach, Germany). Ethanol extract (EE) was stored in a freezer at -20 °C for further analyzed by GC-MS. Due to the small amount of material obtained from the extraction with ethanol (crude extract), it was not possible to subsequently carry out the acid-base extraction to obtain the hexane, ethyl acetate and ethyl acetate:methanol fractions.

4.7. GC-MS Analysis

A total of 8 mg of EE was dissolved in 1 mL of MeOH and injected directly into the GC-MS apparatus (Clarus 680 GC, Perkin Elmer) coupled to a quadrupole mass spectrometer (Clarus SQ8 MS, Perkin Elmer, Singapore). Perkin Elmer Elite-5MS capillary column (length 30 m x inner diameter 0.25 mm x film thickness 0.25 µm) was used. The temperature gradient was performed as follows: 12 min at 100 °C, 100–180 °C at 15 °C/min, 180 at 300 °C at 5 °C/min, and 10 min at 300 °C. The injector and detector temperatures were 280 and 250 °C, respectively, and the carrier gas flow rate (He) was 1 mL/min. The injection volume was 1 µL. Alkaloids were identified by comparing their mass spectra and retention index (RI). Mass spectra were analyzed using AMDIS 2.64 software (NIST) (Gaithersburg, USA), and RI was recorded with a calibration mixture of hydrocarbon standards (C9–C36). The proportion of each alkaloid present in extracts and fractions analyzed by GC-MS was expressed as a percentage of the alkaloid peak area as a function of the total ion current (TIC).

4.8. Compounds Identification

The identification was accomplished by comparing the Kovats retention index and the mass spectrometric data (molecular ion peaks and fragmentation patterns), to those recorded in the MS library software (NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectral library, 2014 version 2.2.).

4.9. *Histolocalization of Alkaloids in the Leaf and Bulb of Zephyranthes irwiniana*

Histochemical tests with Dragendorff [72] and Wagner [73] reagents were carried out on fresh sections of leaves and bulbs, cut by hand, from 4 individuals from the T1 treatment (30 gL⁻¹ sucrose without activated charcoal). The Dragendorff Reagent stock solution was prepared with 25.0 mL of 12.5% Bismuth Nitrate in 25% Acetic Acid, 10.0 mL of 40% Potassium Iodide. For use, 5.0 mL of the solution was removed and supplemented with 10.0 mL of Acetic Acid, making up to 100.0 mL with distilled water. After preparing the reagent for use, the anatomical sections were in contact with the reagent for a period of 5 to 10 min, and then quickly washed with 5% Sodium Nitrite and then washed in distilled water. The preparation of Wagner's reagent was carried out using 2.0g of Potassium Iodide and 1.27 g of Iodine, dissolved in 100.0 mL of distilled

water. The anatomical sections were in contact with the reagent for a period of 5 to 10 min and then washed with distilled water. The presence of alkaloid was identified by the reddish-brown color for both reagents. For the control, fresh sections of the leaves and bulbs, cut by hand, from the same 4 individuals from the T1 treatment were prepared without contact with the Dragendorff and Wagner reagent.

4.10. Statistical and Data Analysis

The seedling growth data were tested by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test (Sisvar Software, version 5.6), and $p < 0,05$ were considered significant. For single samples, the t test (Graph Pad Prism Software, version 9.0) was used and $p < 0,05$ were considered significant.

Author Contributions: Conceptualization, B.D.N., K.K.P.G-C. and D.S.; Data curation, B.D.N.; Formal analysis, B.D.N., K.K.P.G-C. and C.W.F.; Funding acquisition, D.S.; Investigation, B.D.N.; Methodology, B.D.N., K.K.P.G-C., S.M.G., J.M.M.C. and C.W.F.; Project administration, D.S.; Supervision, K.K.P.G-C., D.S. and C.W.F.; Writing—original draft, B.D.N.; Writing— review and editing, B.D.N., K.K.P.G-C., S.M.G. and C.W.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES) Finance Code 001, the Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF), CNPq, and FINEP.

Data Availability Statement: The original contributions presented in the study are included in the article, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Acknowledgments: The authors are grateful to the University of Brasilia for providing the facilities for this work.

Conflicts of Interest: The funders had no role in the design of the study; in the collection, analysis, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Huang, C. W.; Okubo, H.; Uemoto, S. Comparison of bulblet formation from twin scales and single scales in *Hippeastrum hybridum* cultured in vitro. *Scientia Horticulturae* **1990**, *42*, 151–160. [[CrossRef](#)]
2. Khonakdari, M. R.; Rezadoost, H.; Heydari, R.; Mirjalili M. H. Effect of photoperiod and plant growth regulators on in vitro mass bulblet proliferation of *Narcissus tazetta* L. (Amaryllidaceae), a potential source of galantamine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **2020**, *142*, 187–199. [[CrossRef](#)]
3. Us-Camas, R.; Rivera-Solis G.; Duarte-Aké F.; De-la-Peña C. In vitro culture: an epigenetic challenge for plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **2014**, *118*, 187–201. [[CrossRef](#)]
4. Ng, Y. P.; Or, T. C. T.; Ip, N. Y. Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International* **2015**, *89*, 260–270. [[CrossRef](#)]
5. Zaragoza-Puchol, D.; Ortiz J. E.; Orden, A. A.; Sanchez, M.; Palermo, J.; Tapia, A.; Bastida, J.; Feresin, G. E. Alkaloids Analysis of *Habranthus cardenasianus* (Amaryllidaceae), Anti-Cholinesterase Activity and Biomass Production by Propagation Strategies. *Molecules* **2021**, *26*, 192–209. [[CrossRef](#)]
6. IUCN, 2022. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-1. Available online: <https://www.iucnredlist.org>. (accessed on 7 September 2022)
7. BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Gabinete do Ministro. Portaria MMA nº 148, de 7 de junho de 2022. Available online: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-mma-n-148-de-7-de-junho-de-2022-406272733> (accessed on 7 September 2022)
8. Costa, G.G.P.; Silva, C.A.G.; Gomes, J.V.D.; Torres, A.G.; Santos, I.R.I.; Almeida, F.T.C.; Fagg, C.W.; Simeoni, L.A.; Silveira, D.; Gomes-Copeland, K.K.P. Influence of in vitro micropropagation on lycorine biosynthesis and anticholinesterase activity in *Hippeastrum goianum*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2019**, *29*, 262–265. [[CrossRef](#)]
9. Ortiz, J. E.; Berkov S.; Pigni N. B.; Theoduloz C.; Roitman G.; Tapia, A.; Bastida, J.; Feresin G. E. Wild argentinian amaryllidaceae, a new renewable source of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine and other alkaloids. *Molecules* **2012**, *17*, 13473–13482. [[CrossRef](#)]

10. Juan-Vicedo, J.; Pavlov A.; Ríos, S.; Casas, J. L. In vitro culture and micropropagation of the Baetic-Moroccan endemic plant *Lapiedra martinezii* Lag.(Amaryllidaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **2019**, *55*, 725-732. [\[CrossRef\]](#)
11. Koirala, M.; Karimzadegan V.; Liyanage N. S.; Mérindol, N.; Desgagné-Penix I. Biotechnological Approaches to Optimize the Production of Amaryllidaceae Alkaloids. *Biomolecules* **2022**, *12*, 893 [\[CrossRef\]](#)
12. Gomez, A. A.; Mercado M. I.; Belizán M. M. E.; Ponessa G.; Vattuone, M. A., Sampietro, D. A. In situ histochemical localization of alkaloids in leaves and pods of *Prosopis ruscifolia*. *Flora* **2019**, *256*, 1-6. [\[CrossRef\]](#)
13. Herranz, R.; Copete, M. A.; Herranz, J. M.; Copete, E.; Ferrandis, P. Optimization of Plant Production by Seed Treatment in Two Wild Subspecies of *Narcissus pseudonarcissus* Rich in Alkaloids. *Molecules* **2020**, *25*, 4439–4457. [\[CrossRef\]](#)
14. Rodrigues, A. M.; Carvalho, T. C.; Ayub, R. A. Germinação in vitro de sementes de *Hippeastrum hybridum*. *Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science* **2020**, *13*, 1-6.
15. Herranz, J. M.; Copete, M. A.; Ferrandis, P. Environmental regulation of embryo growth, dormancy breaking and germination in *Narcissus alcaracensis* (Amaryllidaceae), a threatened endemic Iberian daffodil. *The American Midland Naturalist* **2013a**, *169*, 147-167. [\[CrossRef\]](#)
16. Herranz, J. M.; Copete, E.; Ferrandis, P. Non-deep complex morphophysiological dormancy in *Narcissus longispathus* (Amaryllidaceae): implications for evolution of dormancy levels within section *Pseudonarcissi*. *Seed Science Research* **2013b**, *23*, 141-155. [\[CrossRef\]](#)
17. Staikidou, I.; Watson, S.; Harvey, B. M. R.; Selby, C. Narcissus bulblet formation in vitro: effects of carbohydrate type and osmolarity of the culture medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **2005**, *80*, 313-320. [\[CrossRef\]](#)
18. Berkov, S.; Georgieva, L.; Kondakova, V.; Atanassov, A.; Viladomat, F.; Bastida, J.; Codina, C. Plant sources of galanthamine: phytochemical and biotechnological aspects. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **2009a**, *23*, 1170-1176. [\[CrossRef\]](#)
19. Berkov, S.; Pavlov, A.; Georgiev, V.; Bastida, J.; Burrus, M.; Ilieva, M.; Codina, C. Alkaloid synthesis and accumulation in *Leucojum aestivum* in vitro cultures. *Natural Product Communications*, **2009b**, *4*, 359-364. [\[CrossRef\]](#)
20. Sellés, M.; Bergoñón, S.; Viladomat, F.; Bastida, J.; Codina, C. Effect of sucrose on growth and galanthamine production in shoot-clump cultures of *Narcissus confusus* in liquid-shake medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **1997**, *49*, 129-136. [\[CrossRef\]](#)
21. Ptak, A.; Morańska, E.; Skrzypek, E.; Warchol, M.; Spina, R.; Laurian-Mattar, D.; Simlat, M. Carbohydrates stimulated Amaryllidaceae alkaloids biosynthesis in *Leucojum aestivum* L. plants cultured in RITA® bioreactor. *PeerJ* **2020**, *8*, e8688. [\[CrossRef\]](#)
22. Tahchy, A.; Bordage, S.; Ptak, A.; Dupire, F.; Barre, E.; Guillou, C.; Henry, M.; Chapleur, Y.; Laurian-Mattar, D. Effects of sucrose and plant growth regulators on acetylcholinesterase inhibitory activity of alkaloids accumulated in shoot cultures of Amaryllidaceae. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **2011**, *106*, 381-390. [\[CrossRef\]](#)
23. Pan, M. J.; Staden, J. V. The use of charcoal in in vitro culture—A review. *Plant growth regulation* **1998**, *26*, 155-163. [\[CrossRef\]](#)
24. Baker, F. S.; Miller, C. E.; Repik, A. J.; Tolles, D. Activated Carbon. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* **2000**. [\[CrossRef\]](#)
25. Tallini, L. R.; Bastida, J.; Cortes, N.; Osorio, E. H.; Theoduloz, C.; Schmeda-Hirschmann, G. Cholinesterase inhibition activity, alkaloid profiling and molecular docking of Chilean *Rhodophiala* (Amaryllidaceae). *Molecules* **2018**, *23*, 1532. [\[CrossRef\]](#)
26. Moreno, R.; Tallini, L. R.; Salazar, C.; Osorio, E. H.; Montero, E.; Bastida, J.; Oleas, N. H.; León, K. A. Chemical profiling and cholinesterase inhibitory activity of five *Phaedranassa* Herb. (Amaryllidaceae) species from Ecuador. *Molecules* **2020**, *25*, 2092. [\[CrossRef\]](#)
27. Ferdausi, A.; Chang, X.; Hall, A.; Jones, M. Galanthamine production in tissue culture and metabolomic study on Amaryllidaceae alkaloids in *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton. *Industrial crops and products* **2020**, *144*, 112058. [\[CrossRef\]](#)
28. Vaičiulyte, V.; Ložienė, K.; Švedienė, J.; Raudonienė, V.; Paškevičius, A. α -Terpinyl acetate: Occurrence in essential oils bearing *Thymus pulegioides*, phytotoxicity, and antimicrobial effects. *Molecules* **2021**, *26*, 1065. [\[CrossRef\]](#)
29. Chowdhury, S.; Kumar, S. Alpha-terpinyl acetate: A natural monoterpenoid from *Elettaria cardamomum* as multi-target directed ligand in Alzheimer's disease. *Journal of Functional Foods* **2020**, *68*, 103892. [\[CrossRef\]](#)
30. Kumar, S.; Kashyap, P.; Chowdhury, S.; Kumar, S.; Panwar, A.; Kumar, A. Identification of phytochemicals as potential therapeutic agents that binds to Nsp15 protein target of coronavirus (SARS-CoV-2) that are capable of inhibiting virus replication. *Phytomedicine* **2021**, *85*, 153317. [\[CrossRef\]](#)
31. Michet, A.; Chalchat, J.; Figuéredo, G.; Thébaud, G.; Billy, F.; Pétel, G. Chemotypes in the volatiles of wild thyme (*Thymus pulegioides* L.). *Journal of Essential Oil Research* **2008**, *20*, 101-103. [\[CrossRef\]](#)
32. Alam, A.; Majumdar, R. S.; Alam, P. Development of HPTLC method for determination of α -terpinyl acetate, and evaluation of antioxidant properties of essential oils in *Elettaria cardamomum*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **2019**, *18*, 2139-2145. [\[CrossRef\]](#)
33. Huang, X.; Zhao, Y.; Hou, Z. Purification of ethyl linoleate from foxtail millet (*Setaria italica*) bran oil via urea complexation and molecular distillation. *Foods* **2021**, *10*, 1925. [\[CrossRef\]](#)

34. Koo, H. J.; Park, H. J.; Byeon, H. E.; Kwak, J. H.; Um, S. H.; Kwon, S. T.; Rhee, D. K.; Pyo, S. Chinese Yam Extracts Containing β -Sitosterol and Ethyl Linoleate Protect against Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice and Inhibit Muscular Expression of VCAM-1 In Vitro. *Journal of food science* **2014**, *79*, H719-H729. [[CrossRef](#)]
35. Kissling, J.; Ioset, J.; Marston, A.; Hostettmann, K. Bio-guided isolation of cholinesterase inhibitors from the bulbs of *Crinum × powellii* (Amaryllidaceae). *Phytotherapy Research* **2005**, *19*, 984-987. [[CrossRef](#)]
36. Park, S. Y.; Seetharaman, R.; Ko, M. J.; Kim, D. Y.; Kim, T. H.; Yoon, M. K.; Kwak, J. H.; Lee, S. J.; Bae, Y. S.; Choi, Y. W. Ethyl linoleate from garlic attenuates lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokine production by inducing heme oxygenase-1 in RAW264. 7 cells. *International Immunopharmacology* **2014**, *19*, 253-261. [[CrossRef](#)]
37. Kwon, Y.; Haam, C. E.; Byeon, S.; Choi, S. J.; Shin, D.; Choi, S.; Lee, Y. Vasodilatory effect of *phellinus linteus* extract in rat mesenteric arteries. *Molecules* **2020**, *25*, 3160. [[CrossRef](#)]
38. Shah, M.; Murad, W.; Rehman, N. U.; Mubin, S.; Al-Sababi, J. N.; Ahmad, M.; Zahoor, M.; Ullah, O.; Waqas, M.; Ullah, S.; Kamal, Z.; Almeer, R.; Bungau, S. G.; Al-Harrasi, A. GC-MS analysis and biomedical therapy of oil from n-hexane fraction of *Scutellaria edelbergii* Rech. f.: in vitro, in vivo, and in silico approach. *Molecules* **2021**, *26*, 7676. [[CrossRef](#)]
39. Aly, S. H.; Eldahshan, O. A.; Al-Rashood, S. T.; Binjubair, F. A.; Hassab, M. A.; Eldehna, W. M.; Dall'Acqua, S.; Zengin, G. Chemical Constituents, Antioxidant, and Enzyme Inhibitory Activities Supported by In-Silico Study of n-Hexane Extract and Essential Oil of Guava Leaves. *Molecules* **2022**, *27*, 8979. [[CrossRef](#)]
40. Sundarraj, S.; Thangam, R.; Sreevani, V.; Kaveri, K.; Gunasekaran, P.; Achiraman, S.; Kannan, S. Gamma-sitosterol from *Acacia nilotica* L. induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis through c-Myc suppression in MCF-7 and A549 cells. *J Ethnopharmacol* **2012**, *141*, 803-809. [[CrossRef](#)]
41. Balamurugan, R.; Stalin, A.; Ignacimuthus, S. Molecular docking of γ -sitosterol with some targets related to diabetes. *European journal of medicinal chemistry* **2012**, *47*, 38-43. [[CrossRef](#)]
42. Cerqueira, F.; Watanadilok, R.; Sonchaeng, P.; Kijjoa, A.; Pinto, M.; Ufford, H. Q.; Kroes, B.; Beukelman, C.; Nascimento, M. S. J. Clonasterol: A potent inhibitor of complement component C1. *Planta medica* **2003**, *69*, 174-176. [[CrossRef](#)]
43. Shahid, A.; Khan, K. R.; Rao, H.; Aati, H. Y.; Sherif, A. E.; Khan, D. A.; Basit, A.; Umair, M.; Mueed, A.; Esatbeyoglu, T.; Korma, S. A. Phytochemical Profiling of the Ethanolic Extract of *Zaleya pentandra* L. Jaffery and Its Biological Activities by In-Vitro Assays and In-Silico Molecular Docking. *Applied Sciences* **2023**, *13*, 584. [[CrossRef](#)]
44. Khoba, K.; Kumar, S.; Chatterjee, S.; Purty, R. S. Isolation, Characterization, and In Silico Interaction Studies of Bioactive Compounds from *Caesalpinia bonducella* with Target Proteins Involved in Alzheimer's Disease. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2023**, *195*, 2216-2234. [[CrossRef](#)]
45. Godara, P.; Dulara, B. K.; Barwer, N.; Chaudhary, N. S. Comparative GC-MS Analysis of Bioactive Phytochemicals from Different Plant Parts and Callus of *Leptadenia reticulata* Wight and Arn. *Pharmacognosy Journal* **2019**, *11*, 129-140. [[CrossRef](#)]
46. Shehu, A.; Issa, S. B.; Lawal, A. Z.; Egharevba, G. O.; Bale, M. I.; Ojo, J. B.; Salami, L. B.; Taiwo, L. O.; Yusuf, S. A.; Adeyemo, J.; Bello, O.; Hamid, A. A. Chemical constituents, antibacterial, antifungal and antioxidant activities from the leaf extracts of *Drynaria laurentii*. *Journal of Phytomedicine and Therapeutics* **2022**, *20*, 690-701. [[CrossRef](#)]
47. Marrelli, M.; Russo, C.; Statti, G.; Argentieri, M. P.; Meleleo, D.; Mallamaci, R.; Avato, P.; Conforti, F. Phytochemical and biological characterization of dry outer scales extract from Tropea red onion (*Allium cepa* L. var. Tropea)—A promising inhibitor of pancreatic lipase. *Phytomedicine Plus* **2022**, *2*, 100235. [[CrossRef](#)]
48. Roy, M.; Liang, L.; Xiao, X.; Feng, P.; Ye, M.; Liu, J. Lycorine: A prospective natural lead for anticancer drug discovery. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2018**, *107*, 615-624. [[CrossRef](#)]
49. Tasker, S. Z.; Cowfer, A. E.; Hergenrother, P. J. Preparation of structurally diverse compounds from the natural product lycorine. *Organic letters* **2018**, *20*, 5894-5898. [[CrossRef](#)]
50. Bores, G. M.; Huger, F. P.; Petko, W.; Mutlib, A. E.; Camacho, F.; Rush, D. K.; Selk, D. E.; Wolf, V.; Kosley, R. W.; Davis, L.; Vargas, H. M. Pharmacological evaluation of novel Alzheimer's disease therapeutics: acetylcholinesterase inhibitors related to galanthamine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1996**, *277*, 728-738.
51. Elgorashi, E. E.; Malan, S. F.; Stafford, G. I.; Staden, J. Quantitative structure-activity relationship studies on acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. *South African Journal of Botany* **2006**, *72*, 224-231. [[CrossRef](#)]
52. McNulty, J.; Nair, J. J.; Little, J. R. L.; Brennan, J. D.; Bastida, J. Structure-activity studies on acetylcholinesterase inhibition in the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2010**, *20*, 5290-5294. [[CrossRef](#)]
53. Cortes, N.; Posada-Duque, R. A.; Alvarez, R.; Alzate, F.; Berkov, S.; Cardona-Gómez, G. P.; Osorio, E. Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five Amaryllidaceae species: A comparative study. *Life Sciences* **2015**, *122*, 42-50. [[CrossRef](#)]
54. Evidente, A.; Kornienko, A. Anticancer evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives. *Phytochemistry Reviews* **2009**, *8*, 449-459. [[CrossRef](#)]
55. BESSA, C. D. P. B.; Andrade, J. P.; Oliveira, R. S.; Domingos, E.; Santos, H.; Romão, W.; Bastida, J.; Borges, W. S. Identification of alkaloids from *Hippeastrum aulicum* (Ker Gawl.) Herb. (Amaryllidaceae) using CGC-MS and ambient ionization mass spectrometry (PS-MS and LS-MS). *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2017**, *28*, 819-830. [[CrossRef](#)]

56. Berkov, S.; Georgieva, L.; Sidjimova, B.; Nikolova, M.; Stanilova, M.; Bastida, J. In vitro propagation and biosynthesis of Sceletium-type alkaloids in *Narcissus pallidulus* and *Narcissus* cv. Hawera. *South African Journal of Botany* **2021**, *136*, 190–194. [[CrossRef](#)]
57. Andrade, J. P.; Pigni, N. B.; Torras-Claveria, L.; Berkov, S.; Codina, C.; Viladomat, F.; Bastida, J. Bioactive alkaloid extracts from *Narcissus broussonetii*: Mass spectral studies. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2012**, *70*, 13–25. [[CrossRef](#)]
58. Andrade, J. P.; Guo, Y.; Font-Bardia, M.; Calvet, T.; Dutilh, J.; Viladomat, F.; Codina, C.; Nair, J. J.; Zuanazzi, J. A. S.; Bastida, J. Crinine-type alkaloids from *Hippeastrum aulicum* and *H. calyptratum*. *Phytochemistry* **2014**, *103*, 188–195. [[CrossRef](#)]
59. Paiva, J. R.; Souza, A. S. Q.; Pereira, R. C. A.; Ribeiro, P. R. V.; Zocolo, G. J.; Brito, E. S.; Pessoa, O. D. L.; Canuto, K. M. Development and validation of a UPLC-ESI-MS method for quantitation of the anti-Alzheimer drug galantamine and other amaryllidaceae alkaloids in plants. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2020**, *31*, 265–272. [[CrossRef](#)]
60. Reyes-Chilpa, R.; Berkov, S.; Hernández-Ortega, S.; Jankowski, C. K.; Arseneau, S.; Clotet-Codina, I.; Esté, J. A.; Codina, C.; Viladomat, F.; Bastida, J. Acetylcholinesterase-inhibiting alkaloids from *Zephyranthes concolor*. *Molecules* **2011**, *16*, 9520–9533. [[CrossRef](#)]
61. Katoch, D.; Kumar, S.; Kumar, N.; Singh, B. Simultaneous quantification of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC–DAD/ESI-MS/MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2012**, *71*, 187–192. [[CrossRef](#)]
62. Kulhánková, A.; Cahlíková, L.; Novák, Z.; Macáková, K.; Kuneš, J.; Opletal, L. Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and their acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity. *Chemistry & biodiversity* **2013**, *10*, 1120–1127. [[CrossRef](#)]
63. Zhan, G.; Gao, B.; Zhou, J.; Liu, T.; Zheng, G.; Jin, Z.; Yao, G. Structurally diverse alkaloids with nine frameworks from *Zephyranthes candida* and their acetylcholinesterase inhibitory and anti-inflammatory activities. *Phytochemistry* **2023**, *207*, 113564. [[CrossRef](#)]
64. Zhan, G.; Liu, J.; Zhou, J.; Sun, B.; Aisa, H. A.; Yao, G. Amaryllidaceae alkaloids with new framework types from *Zephyranthes candida* as potent acetylcholinesterase inhibitors. *European journal of medicinal chemistry* **2017**, *127*, 771–780. [[CrossRef](#)]
65. Shitara, N.; Hirasawa, Y.; Hasumi, S.; Sasaki, T.; Matsumoto, M.; Wong, C. P.; Kaneda, T.; Asakawa, Y.; Morita, H. Four new Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes candida*. *Journal of natural medicines* **2014**, *68*, 610–614. [[CrossRef](#)]
66. Luo, Z.; Wang, F.; Zhang, J.; Li, X.; Zhang, M.; Hao, X.; Xue, Y.; Li, Y.; Horgen, F. D.; Yao, G.; Zhang, Y. Cytotoxic alkaloids from the whole plants of *Zephyranthes candida*. *Journal of natural products* **2012**, *75*, 2113–2120. [[CrossRef](#)]
67. Kohelová, E.; Maříková, J.; Korábečný, J.; Hulcová, D.; Kučera, T.; Jun, D.; Chlebek, J.; Jenčo, J.; Šafratová, M.; Hrabínová, M.; Ritomská, A.; Malaník, M.; Peřinová, R.; Breiterová, K.; Kuneš, J.; Nováková, L.; Opletal, L.; Cahlíková, L. Alkaloids of *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae) and their implication to Alzheimer's disease: Isolation, structural elucidation and biological activity. *Bioorganic chemistry* **2021**, *107*, 104567. [[CrossRef](#)]
68. Centeno-Betanzos, L. Y.; López-Caamal, A.; Rendon, N. C.; Santiago, M. L.; Osorio, E.; Bastida, J.; Cano-Santana, Z.; Reyes-Chilpa, R.; Tovar-Sánchez, E. Microsatellites, morphological, and alkaloids characterization of *Zephyranthes fosteri* and *Z. alba* (Amaryllidaceae): Allopatric populations. *Biochemical Systematics and Ecology* **2022**, *101*, 104398. [[CrossRef](#)]
69. Silva, S. M.; Araújo, S. F.; Santos, A. S. Detecção de alcaloides em *Crinum americanum* (Amaryllidaceae). In: 64^o Congresso Nacional de Botânica, Belo Horizonte, Brazil, 19 September 2013.
70. Pavlov, A.; Berkov, S.; Courot, E.; Gocheva, T.; Tuneva, D.; Pandova, B.; Georgiev, M.; Georgiev, V.; Yanev, S.; Burrus, M.; Ilieva, M. Galanthamine production by *Leucojum aestivum* in vitro systems. *Process Biochemistry* **2007**, *42*, 734–739. [[CrossRef](#)]
71. Murashige, T.; Skoog, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **1962**, *15*, 473–497. [[CrossRef](#)]
72. Svendsen, A. B.; Verpoorte, R. *Chromatography of Alkaloids. Part A: Thin-Layer Chromatography*, 1st ed, Elsevier Scientific Publishing Company: Amsterdam, The Netherlands, 1983, 23A.
73. Furr, M.; Mahlberg, P. G. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products* **1981**, *44*, 153–159. [[CrossRef](#)]