

Influência da micropropagação de *Hippeastrum goianum* (Ravenna) Meerow na
biossíntese de licorina e atividade anticolinesterásica

Influence of micropropagation of *Hippeastrum goianum* (Ravenna) Meerow on lycorine
biosynthesis and anticholinesterase activity

COSTA, G. G. P.¹; SILVA, C. A. G.¹; GOMES, J. V. D.¹; TORRES, A. G.¹.; SIMEONI, L. A.¹;
FAGG, C. W.²; SILVEIRA, D.¹; GOMES-COPELAND, K. K. P.^{1*}

¹ Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy
Ribeiro, Asa Norte, Brasília, Distrito Federal, CEP 70910-900, Brasil; ² Faculdade de
Ceilândia, Universidade de Brasília, Ceilândia, Distrito Federal, CEP 72220-275, Brasil;

*Autor para correspondência: kiciagomes@gmail.com

RESUMO: A família Amaryllidaceae é reconhecida pela presença de alcaloides isoquinolínicos, a exemplo da licorina, a qual além de antiproliferativa e citotóxica apresenta atividades anticolinesterásica, antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana. *Hippeastrum goianum* (Ravenna) Meerow é uma espécie endêmica do Cerrado, e devido ao potencial farmacológico e risco de extinção vem sendo estudada. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a viabilidade de obtenção de licorina a partir de plântulas cultivadas *in vitro*, e analisar a sua atividade anticolinesterásica. Foram analisados os extratos etanólicos de folhas, oriundos de plântulas *in vitro* em diferentes condições: o primeiro extrato foi obtido a partir da germinação *in vitro* de sementes em meio Murashige e Skoog e, o segundo extrato, a partir da micropropagação de bulbilhos cultivados em meio suplementado com ANA 0,5 mg.L⁻¹ e BAP 10 mg.L⁻¹. No extrato oriundo da micropropagação constatou-se a presença de licorina (9,16 ± 0,48 µg do alcaloide por grama de folha fresca), enquanto que no extrato obtido da germinação *in vitro* não foi observada a presença desse bioativo. A

análise do potencial de inibição da acetilcolinesterase, revelou no extrato dos bulbilhos micropropagados uma IC_{50} $114,8 \pm 0,95 \mu\text{g.mL}^{-1}$, superior às plântulas germinadas *in vitro* com IC_{50} $386,00 \pm 0,97 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Portanto, os resultados evidenciaram que é possível a biossíntese de licorina a partir da micropropagação de bulbilhos da espécie em estudo, bem como melhora da ação anticolinesterásica. Esse é o primeiro relato de obtenção da licorina a partir da micropropagação de bulbilhos de *H. goianum*.

Palavras-chave: *Hippeastrum goianum*; licorina; micropropagação; acetilcolinesterase; HPLC.

ABSTRACT: The Amaryllidaceae family is recognized by the presence of isoquinolinic alkaloids, as for example the lycorine, which in addition to antiproliferative and cytotoxic has anticholinesterase, antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities. Due the pharmacological potential and risk of extinction has been studied the specie *Hippeastrum goianum* (Ravenna) Meerow wich which is endemic from the Midwest Brazilian region. So, the aim of this study was to evaluate the viability of obtaining lycorine from seedlings cultivated *in vitro*, and to analyze the anticholinesterase activity from the leaves ethanolic extracts of this cultures. Were analyzed the leaves ethanolic extracts from the *in vitro* seedlings under different conditions: the first extract was obtained by *in vitro* germination of seeds in Murashige and Skoog medium, and the second from micropropagated bulblets inoculated medium supplemented with ANA $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ and BAP 10 mg.L^{-1} . In the micropropagation extract the presence of lycorine was observed ($9,16 \pm 0,48 \mu\text{g}$ of the alkaloid per gram of the fresh leaf), whereas in the extract from the seeds germination was not observed the presence of this bioactive. The analysis of the acetylcholinesterase inhibition potential showed in the extract relative to bulblets micropropagation the IC_{50} $114,8 \pm 0,95 \mu\text{g.mL}^{-1}$. This activity was higher than extract from the seedlings germinated with IC_{50}

386,00 ± 0,97 µg.mL⁻¹. Therefore, the results showed that it is possible to produce lycorine from the micropropagation of bulblets of this specie in study, also demonstrated the improve of the anticholinesterasic action in the extract abundant in this alkaloid. This is the first report of obtaining the lycorine from the micropropagation of bulblets of *H. goianum*.

Key words: *Hippeastrum goianum*; lycorine; micropropagation; acetylcholinesterase, HPLC.

INTRODUÇÃO

A família Amaryllidaceae apresenta cerca de 80 gêneros, cuja distribuição é majoritariamente tropical e subtropical (Candido et al., 2013; The plant list, 2018a). Esta família é amplamente utilizada para fins ornamentais, no entanto, possui reconhecido potencial medicinal, devido à produção de alcaloides isoquinolínicos, característicos dessa família, além de outros metabólitos secundários (Andrade et al., 2012). As atividades biológicas são devido à presença, principalmente, de alcaloides, a exemplo da galantamina e licorina. Devido a esse valor farmacológico, diversas espécies de Amaryllidaceae vêm sendo amplamente estudadas (Andrade et al., 2011).

A licorina (Figura 1) apresenta diversas ações farmacológicas relevantes como antiproliferativa (Silva et al., 2008; Havelek et al., 2017), citotóxica, antimalárica, anticolinesterásica (Bastida et al., 2006; Liu et al., 2015) e antimicrobiana (Bendaif et al., 2018). Outros estudos, mostram também atividade contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) (Szlávik et al., 2004), coronavírus associado à síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) (Li et al., 2005), poliovírus, vírus de coxsackie, herpes vírus tipo 1 (HSV-1) (Ieven et al., 1983).

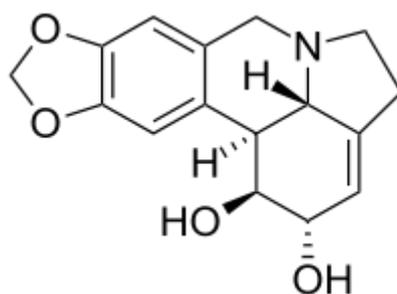


Figura 1. Licorina

O gênero *Hippeastrum* pertence a essa família, e está representado por cerca de 94 espécies distribuídas na América do Sul e Central, (Okubo, 1993; The plant list, 2018b). Destaca-se por apresentar flores de caráter ornamental e pela sua composição química. Nesse gênero tem-se identificado alcaloides, em especial do tipo tazetina e licorina (Bastida et al., 1996), dentre as espécies que apresentam esses metabólitos destacam-se: *Hippeastrum vittatum* e *Hippeastrum morelianum* (Silva et al., 2008; Jin, 2013). A espécie *Hippeastrum goianum* (Ravenna) Meerow, de ocorrência no Centro-Oeste brasileiro, encontra-se em situação de risco de extinção, devido ao forte crescimento urbano na região onde se desenvolve (CNCFlora, 2012), como também à coleta indiscriminada. Portanto, diante do imenso potencial farmacológico observado nas Amaryllidaceae, a técnica da cultura de tecidos de plantas torna-se uma alternativa fundamental para o estudo de bioprospecção, associado à conservação e não-degradação da espécie. Permitindo ainda potencializar a obtenção de compostos ativos, além de minimizar variações que comumente surgem em plantas cultivadas em campo. De acordo com Diop et al. (2007), para obtenção de 1 kg de galantamina, um alcaloide encontrado em espécies como *Leucojum aestivum* e *Narcissus confusus*, faz-se necessária a extração de cerca de 1 ton de bulbos. Isso pode gerar a diminuição ou até extinção de diversas dessas espécies, usando a metodologia de extração convencional.

Espécies de Amaryllidaceae possuem boa capacidade de propagação vegetativa devido à presença de bulbos (Leyton, 2004). Mii et al. (1974) obtiveram brotações de partes

aéreas e raízes cultivadas em meio de Murashige e Skoog (1962) suplementado com ácido naftaleno acético (ANA) e 6-furfurilaminopurina (KIN). Em extratos oriundos do cultivo *in vitro* da espécie *Leucojum aestivum*, constataram galantamina, crinina, licorina, norbeladina, dentre outros (Berkov et al., 2005). Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a viabilidade de obtenção de licorina em extratos de plântulas *in vitro* de *Hippeastrum goianum*, bem como analisar o potencial de inibição da acetilcolinesterase em seus extratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

As sementes de *Hippeastrum goianum* foram coletadas em Brasília - Distrito Federal, Brasil. A espécie foi identificada pelo taxonomista Christopher William Fagg (Universidade de Brasília), e a exsicata depositada no herbário da Universidade de Brasília (Fagg 2474). Até o momento de germinação, as sementes foram armazenadas em temperatura ambiente, envoltas em papel pardo.

Germinação *in vitro* de sementes de *Hippeastrum goianum*

A desinfestação das sementes de *H. goianum* foi realizada conforme Tahchy et al. (2010) com adaptações. Inicialmente foram imersas em etanol (70% EtOH) por um minuto, seguida de solução comercial de hipoclorito de sódio (2-2,5% NaOCl) durante oito minutos e, posteriormente, lavadas três vezes utilizando água destilada estéril. Sequencialmente, as sementes foram inoculadas em meio de cultura MS 0,4% (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 3% de sacarose, 0,7% ágar, sendo então mantidas em sala de cultivo a temperatura de 25 °C ± 2 °C em fotoperíodo de 16 horas, com intensidade de iluminação

de 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, obtida por lâmpada fluorescente branca. Após três meses de cultivo *in vitro* as folhas foram coletas e submetidas à extração.

Micropropagação dos bulbilhos

Os bulbilhos resultantes da etapa de germinação *in vitro* foram submetidos à micropropagação. Inoculados em meio de cultura Murashige e Skoog (1962) com 3% de sacarose, ágar 0,7%, suplementado com ácido naftaleno acético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP) (0,5 mg.L^{-1} e 10 mg.L^{-1} , respectivamente). Posteriormente o pH do meio foi ajustado para 5,8. Os bulbilhos recém inoculados foram mantidos no escuro durante sete dias a 25 °C \pm 2 °C. Em seguida, transferidos para sala de crescimento a temperatura de 25 °C \pm 2 °C em fotoperíodo de 16 horas, com intensidade de iluminação de 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, obtida por lâmpada fluorescente branca. Após três meses, sem subcultivo, as folhas foram excisadas, e então submetidas à extração.

Extração do material vegetal

As folhas obtidas da germinação *in vitro* e micropropagação foram secas em estufa de secagem com circulação e renovação de ar SL-102 Solab®, a 37 °C por 24 horas, apresentando 53,44 e 94,80% de umidade, respectivamente. O material vegetal seco foi rasurado e macerado em hexano por 24 horas, para a remoção de compostos apolares. A segunda extração foi realizada com etanol por igual período. Após filtração, os filtrados foram concentrados e secos utilizando rotaevaporador Heidolph Basis Hei-VAP Value® a 40 °C para a obtenção dos respectivos extratos. Os extratos etanólicos obtidos foram denominados HGF1 (*Hippeastrum goianum* folha 1: extrato etanólico produzido após a etapa de germinação) e HGF2 (*Hippeastrum goianum* folha 2: extrato etanólico obtido das folhas, após a etapa de micropropagação dos bulbilhos). Estes foram mantidos a temperatura de - 20 °C até o momento das análises.

Análise por HPLC-DAD dos extratos de *H. goianum*

A análise química foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Hitach LaChrom Elite® HLPC System, acoplado a um Detector de Arranjo de Diodos, utilizando a coluna RP-18C LiChroCART 150-4,6 Purospher® STAR RP-18e -5 µmPurospher STAR. A fase móvel foi constituída de uma mistura gradiente de água:metanol:acetonitrila (80:10:10+0,1% ácido trifluoracético) com fluxo de 1 mL.min⁻¹. A detecção foi em 290 nm. HGF1 e HGF2 foram solubilizados em metanol na concentração de 6 mg.mL⁻¹. A identificação da licorina foi realizada utilizando adição do padrão de licorina (Sigma-Aldrich) nas amostras. As concentrações finais de padrão adicionado foram 0,075 e 0,125 mg.mL⁻¹. Para a quantificação, uma curva de calibração externa foi adotada utilizando nove pontos, empregando-se como padrão licorina (Sigma-Aldrich). As concentrações da curva de calibração variaram entre 400 – 0,78 µg.mL⁻¹.

Ensaio espectrofotométrico da acetilcolinesterase

O ensaio de inibição da acetilcolinesterase foi realizado com base na metodologia de Ellman (1961) e modificado por López (2002). 50 µL de enzima a 0,25 U.mL⁻¹ em tampão fosfato (K₂HPO₄ 8mM, NaH₂PO₄ 2,3 mM e NaCl 0,15 M, pH 7,5), 50 µL do tampão PBS e 50 µL de extrato vegetal com concentração variando entre 1500 - 23,44 mg.mL⁻¹ (solubilizados em metanol 15%) foram adicionados à microplaca de 96 poços. Incubou-se por 30 minutos a 37 °C. Adicionou-se 100 µL de substrato solubilizado em água destilada (iodeto de acetiltiocolina 0,24 mM, Na₂HPO₄ 0,04M e DTNB 0,2 mM). A mistura foi incubada novamente por 10 minutos a 37 °C. A leitura da absorbância foi medida no comprimento de onda de 405 nm em EnSpire Multimode Plate Reader®. A atividade inibitória foi calculada em porcentagem. A absorbância apresentada pela atividade dos extratos é correlacionada ao controle positivo (máximo de atividade da enzima sem a presença de

inibidor). Os resultados de inibição da enzima foram analisados utilizando o *software* Graph Pad Prism® 7.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cultivo *in vitro*

De acordo com os resultados obtidos por observação, não houve contaminação das sementes durante o período estudado. A manutenção dos bulbilhos no escuro durante a primeira semana de micropropagação foi necessária para a minimização da oxidação no local da excisão, que podem causar o comprometimento do desenvolvimento das plântulas, tal como relatado por Longo et al. (2012) no cultivo *in vitro* de *Allium sativum*.

Após três meses, foi verificada completa germinação das sementes de *H. goianum* disponibilizadas, havendo bom desenvolvimento de raízes, bulbos e folhas. Na etapa de micropropagação houve desenvolvimento adequado dos bulbilhos e folhas (Figura 2), sendo obtidas até três folhas por plântula, algumas delas ultrapassando 13 cm de comprimento e não havendo contaminação em nenhuma das etapas de cultivo. Zhang et al. (2013) obtiveram um alto coeficiente de propagação das sementes de *Hippeastrum vittatum* quando cultivadas *in vitro*. Porém, tais autores salientam a fragilidade de plântulas e lento desenvolvimento de bulbilhos nessa condição de cultivo, opondo-se ao observado ao longo desse estudo. Fatores como temperatura, umidade, condições de luminosidade e meio de cultivo selecionado contribuem para o progresso do cultivo *in vitro* e *ex vitro*, portanto esse conhecimento é de extrema importância para o progresso dos cultivos *in vitro* de plântulas (Zhang et al., 2013).

A germinação de sementes em condições *in vitro* é mais rápida e controlada do que na germinação *in situ*. Por essa razão, a germinação de sementes na cultura de tecidos compreende uma importante ferramenta para a preservação de diversas espécies (Pierik,

1997; DRAGASSAKI *et al.*, 2003), a exemplo de *H. goianum* que, atualmente, encontra-se em risco de extinção, além de proporcionar uma maior variabilidade genética entre os indivíduos. O conhecimento das capacidades de germinação e emergência das sementes é um dos pré-requisitos mais importantes para manter as populações existentes e restaurar as espécies ameaçadas (Balestri & Cinelli, 2004).

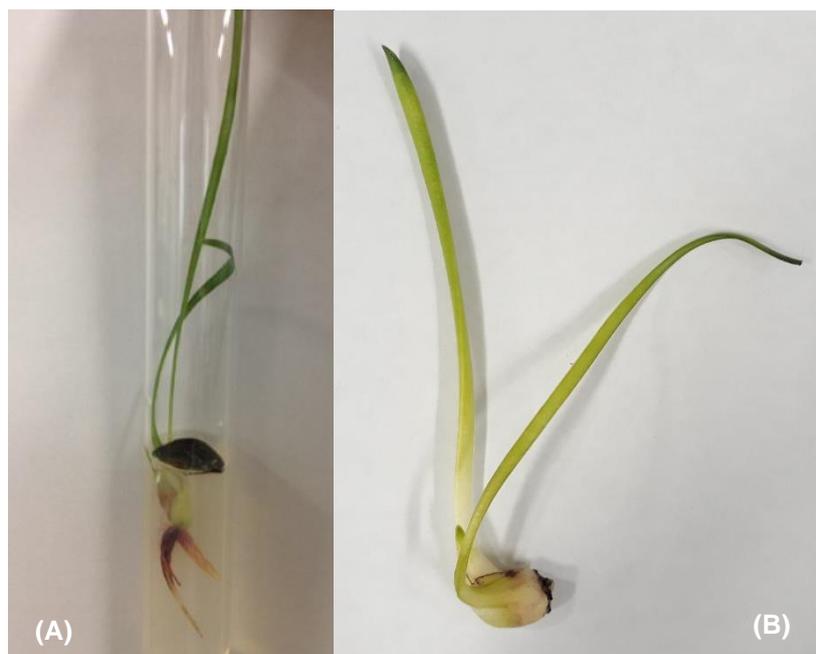


Figura 2 - Plântulas *in vitro* de *Hippeastrum goianum* após 90 dias de inoculação. (A) Semente germinada *in vitro*. (B) Bulbilho após micropropagação.

Análise por HPLC-DAD dos extratos de *H. goianum*

Os extratos etanólicos de ambos os cultivos foram avaliados por HPLC, quanto à presença de licorina. Na amostra HGF1 não foi possível identificar a presença desse alcaloide, haja visto que o cromatograma obtido não mostrou sinais característicos para tal alcaloide. No entanto, constatou-se a presença de licorina em HGF2. Foi observado sinal no tempo de retenção 11,78 minutos (Figura 3), com máximo de absorção em 240 e 290 nm. A confirmação da presença deste alcaloide foi realizada com base no aumento da

intensidade do sinal cromatográfico associado ao aumento da concentração de licorina quando adicionadas quantidades crescentes de padrão, cujas concentrações finais foram 0,075 e 0,125 mg.mL⁻¹. Ao empregar uma curva de calibração externa com equação da reta $Y = 20106x + 10852$, e o coeficiente de correlação $R^2 = 0.9999$ foi possível quantificar a licorina presente no HGF2 ($9,16 \pm 0,48 \mu\text{g}$ de licorina por grama de folha fresca), obtendo rendimento de 5,98% no extrato etanólico seco.

A micropropagação dos bulbilhos no meio de cultura MS suplementado com reguladores de crescimento ANA 0,5 mg.L⁻¹ e BAP 10 mg.L⁻¹ favoreceu a produção de licorina como um dos compostos em maior abundância no extrato etanólico de *H. goianum* (HGF2), tal como alcançado por Zayed et al. (2011), que identificaram esse alcaloide a partir de bulbilhos micropropagados de *Hippeastrum vittatum*. Houve aumento de alcaloides indólicos no cultivo *in vitro* de *Catharanthus roseus* (Papon et al., 2005). Diop et al. (2006) identificaram galantamina a partir do cultivo *in vitro* de *Leucojum aestivum* em diferentes combinações de reguladores de crescimento. Nas espécies *Narcissus pseudonarcissus* e *Leucojum aestivum* foram verificadas a presença de licorina em extratos oriundos do cultivo *in vitro* de folhas e bulbos em meio MS sob diferentes concentrações de sacarose e suplementado com reguladores de crescimento (Tahchy et al., 2011).

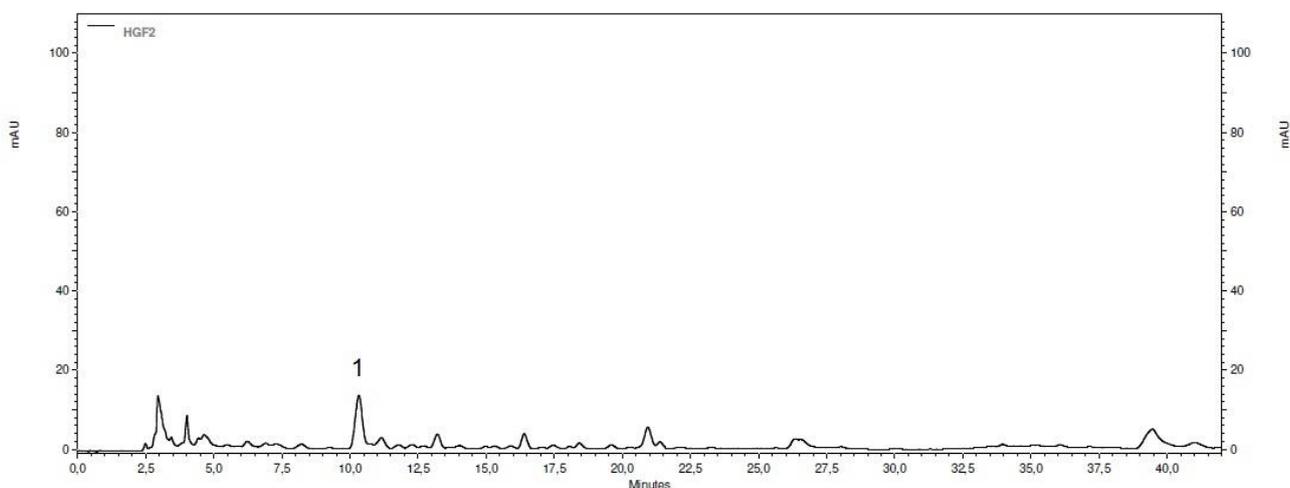


Figura 3. Perfil cromatográfico do extrato etanólico de folhas após micropropagação dos bulbilhos (HGF2). Licorina (1) identificada com $t_r = 11,78$ min.

Os reguladores de crescimento são compostos que promovem a divisão celular, influenciam na diferenciação das células, além de estimularem a biossíntese de metabólitos secundários no organismo vegetal. A biossíntese de alcaloides no cultivo *in vitro* vegetal é diretamente influenciada pela composição e concentração adequada de reguladores de crescimento (Verpoorte et al., 1991).

As citocininas e auxinas podem, neste estudo, ter interagido de maneira sinérgica não somente para o desenvolvimento dos bulbilhos, mas também na biossíntese da licorina. Portanto, essa metodologia mostrou-se eficaz para melhorar a produtividade de um sistema *in vitro* no caso de alcaloides. Contudo, a identificação desse alcaloide nas folhas de *H. goianum* confere maior relevância ao presente trabalho, pois relata pela primeira vez a produção de licorina a partir de folhas de bulbilhos micropropagados.

Atividade anticolinesterásica

Os extratos etanólicos HGF1 e HGF2 foram avaliados quanto a sua atividade anticolinesterásica. O extrato HGF1 mostrou um valor de IC_{50} de $386,00 \pm 0,97 \mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto HGF2 apresentou um valor de IC_{50} $114,80 \pm 0,95 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A atividade anticolinesterásica variou de acordo com o método de cultivo testado, e esse aumento da atividade inibitória de HGF2 revelado pela maior biossíntese de licorina e demais metabólitos secundários sintetizados não identificados nos extratos etanólicos. Estudos com extratos obtidos a partir do cultivo *in vitro* de *Narcissus pseudonarcissus* corroboram, quando relatam que com o aumento do teor de galantamina, a inibição da atividade anticolinestrásica também foi elevada (Tahchy et al., 2011). Cortes et al. (2015), ao avaliarem frações de extratos resultantes de *Hippeastrum barbatum* e *Hippeastrum*

puniceum, obtiveram IC₅₀ de 28,13 ± 1,68 µg.mL⁻¹ e 25,73 ± 1,75 µg.mL⁻¹, respectivamente, e correlacionaram esse resultado à presença de licorina, a qual foi identificada e quantificada em todos esses extratos, estando em maior abundância em *Hippeastrum puniceum*, justificando a melhor atividade desse extrato.

Portanto, o método de micropropagação viabiliza a biossíntese de licorina e outros alcaloides, contribuindo dessa forma, para avaliação de bioprospecção de espécies com interesse farmacológico sem que haja a degradação de seus espécimes.

CONCLUSÃO

Esse é o primeiro relato envolvendo a produção de licorina e atividade enzimática a partir da micropropagação *in vitro* da espécie *Hippeastrum goianum*. Os resultados permitiram concluir que a etapa de micropropagação *in vitro* foi viável e importante para a biossíntese de licorina, haja visto que não houve produção de licorina na etapa de germinação *in vitro* das sementes de *H. goianum*. O potencial de inibição da acetilcolinesterase no HGF2 (114,80 ± 0,95 µg. mL⁻¹) foi superior em relação a HGF1 (386,00 ± 0,97 µg.mL⁻¹). Portanto, esse trabalho contribui para estudos de micropropagação de plântulas de *H. goianum* como meio de obtenção de licorina.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, J. P.; BERKOV, S.; VILADOMAT, F.; CODINA, C.; ZUANAZZI, J. A. S.; BASTIDA, J. Alkaloids from *Hippeastrum papilio*. **Molecules**, v. 16, p. 7097-7104, 2011.
- ANDRADE, J. P.; PIGNI, N. B.; TORRAS-CLAVERIA, L.; GUO, Y.; BERKOV, S.; REYES-CHILPA, R.; AMRANI, A.; ZUANAZZI, J. A. S.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.;

- BASTIDA, J. Alkaloids from the *Hippeastrum* genus: chemistry and biological activity. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 40, n. 2, p. 83 - 98, 2012.
- BALESTRI, E.; CINELLI, F. Germination and early - seedling establishment capacity of *Pancratium maritimum* L. (Amaryllidaceae) on coastal dunes in the North-Western Mediterranean. **Journal of Coastal Research**, v. 20, p. 761 - 770, 2004.
- BASTIDA, J.; CODINA, C.; PORRAS, C. L.; PAIZ, L. Alkaloids from *Hippeastrum solandriiflorum*. **Planta Médica**, v. 62, p, 74 - 75, 1996.
- BASTIDA, J.; LAVILLA, R.; VILADOMAT, F.. Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. In: Cordell, G.A. (Ed.), **The Alkaloids**, v. 63. Amsterdam: Elsevier Inc., 2006. p. 87–179.
- BENDAIF, H.; MELHAOUI, A.; RAMDANIM M.; ELMSELLEM, H.; DOUEZ, C.; OUADI, Y. E. Antibacterial activity and virtual screening by molecular docking of lycorine from *Pancratium foetidum* Pom (Moroccan endemic Amaryllidaceae). **Microbial Pathogenesis**, v. 115, 138 - 145, 2018.
- BERKOV, S.; PAVLOV, A.; ILIEVA, I.; BURRUS, M.; POPOV, S.; STANILOVA, M. CGC-MS of Alkaloids in *Leucojum aestivum* Plants and their in vitro Cultures. **Phytochemical Analysis**. v. 16, p. 98 - 103, 2005.
- CANDIDO, R. S.; DA SILVA FOURNY, A. C.; GONÇALVES-ESTEVEZ, V.; LOPES, R. C. *Hippeastrum* species in areas of resting in the state of Rio de Janeiro, Brazil: pollen characters. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, p. 661 - 668, 2013.
- CNCFlora, Centro Nacional de Conservação da Flora. *Hippeastrum goianum* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2. [http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Hippeastrum goianum](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Hippeastrum%20goianum). Acessado em: 11 mai. 2018.
- 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 Science Journal**. v. 122, p. 42-50, 2015.

DIOP, M. F.; HEHN, A.; PTAK, A.; CHRÉTIEN, F.; DOERPER, S; GONTIER, E.; BOURGAUD, F.; HENRY, M.; CHAPLEUR, Y.; LAURAIN-MATTAR, D. Hairy root and tissue cultures of *Leucojum aestivum* L.: relationships to galanthamine content, **Phytochemistry**, v. 6, n. 1, p. 137 - 141, 2007.

DIOP, M.; PTAK, A.; CHRÉTIEN, F.; HENRY, M.; CHAPLEUR, Y.; LAURAIN-MATTAR, D. Galanthamine content of bulbs and *in vitro* cultures of *Leucojum aestivum*. **Natural Product Communications**, v. 1, p. 475 - 479, 2006.

DRAGASSAKI, M.; ECONOMOU, A. S.; VLAHOS, J. C. Bulblet formation and *in vitro* survival extra vitrum in *Pancratium maritimum* L. **Acta Horticulturae**, v. 616, p. 347 - 352, 2003.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES-JUNIOR, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88 - 95, 1961.

HAVELEK, R.; MUTHNA, D.; TOMSIK, P.; KRALOVEC, K.; SEIFRTOVA, M.; CAHLIKOVA, L.; HOSTALKOVA, A.; SAFRATOVA, M.; PERWEIN, M.; CERMAKOVA, E.; REZACOVA, M. Anticancer potential of Amaryllidaceae alkaloids evaluated by screening with a panel of human cells, real-time cellular analysis and Ehrlich tumor-bearing mice. **Chemical-Biological Interactions**, v. 275, p. 121 - 132, 2017.

IEVEN, M.; VAN DEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Plant antiviral agents. IV. Influence of lycorine on growth pattern of three animal viruses. **Planta Médica**, v. 49, n. 2, p. 109 - 114, 1983.

JIN, Z. Amaryllidaceae and sceletium alkaloids. **Natural Product Reports**, v. 30, p. 849 - 868, 2013.

- LEYTON, C. P. **Estudios en micropropagacion de *Rhodophiala phycelloides (Herb.)***
Hunz. 2004. Tesis de Maestría, (Área de concentración en Agronomía) -
Departamento de Ciencias Vegetales, Pontificia Universidad Catolica de Chile, Chile.
- LI, S. Y.; CHEN, C.; ZHANG, H. Q.; GUO, H. Y.; WANG, H.; WANG, L.; ZHANG, X.; HUA,
S. N.; YU, J.; XIAO, P. G.; LI, R. S; TAN, X. Identification of natural compounds with
antiviral activities against SARS-associated coronavirus. **Antiviral Research**, v. 67, n.
1, p. 18 - 23, 2005.
- LIU, Z. M.; HUANG, X. Y.; CUI, M. R.; ZHANG, X. D.; CHEN, Z.; YANG, B. S.; ZHAO, X. K.
Amaryllidaceae alkaloids from the bulbs of *Lycoris radiata* with cytotoxic and anti-
inflammatory activities. **Fitoterapia**, v. 101, p. 188 - 193, 2015.
- LONGO, A. E. O.E.; SIQUEIRA, W. J.; PASSOS, I. R. S.; SCOTT, M. D. S.; FILHO, J. A. A.
Micropropagação e bulbificação *in vitro* de alho (*Allium sativum* L.). **Plant Cell Culture
Micropropagation**, v. 8, n. 1 - 2, p. 18 - 26, 2012.
- LÓPEZ, S.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Acetylcholinesterase inhibitory
activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. **Life Science
Journal**, v. 71, p. 2521 - 2529, 2002.
- MII, M.; MORI, T.; IWASE, N. Organ formation from the excised bulb scales of *Hippeastrum
hybridum in vitro*. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 49,
n. 3, p. 241 - 244, 1974.
- MURASHIGE, T, SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco
tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497, 1962.
- OKUBO, H. *Hippeastrum (Amaryllis)* In: DE HERTOIGH, A.; LE NARD, M. **The physiology
of flower bulbs**. The Netherlands: Elsevier, 1993. p.321 - 334.

- PAPON, N.; BREMER, J.; VANSIRI, A. Cytokinin and ethylene control indole alkaloid production at the level of the MEP/terpenoid pathway in *Catharanthus roseus* suspension cells. **Planta medica**, v. 71, n. 6, p. 572 – 574, 2005.
- PIERIK, R. L. M. **In vitro Culture of Higher Plants**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997. 348 p.
- SALIBA, S.; PTAK, A.; LAURAIN-MATTAR, D. 4'-O-Methylnorbelleadine feeding enhances galanthamine and lycorine production by *Leucojum aestivum* L. shoot cultures. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, p. 640 – 645, 2015.
- SILVA, A. F.; ANDRADE, J. P.; MACHADO, K. R. B.; ROCHA, A. B.; APEL, M. A.; SOBRAL, M. E. G.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J. A. S. Screening for cytotoxic activity of extracts and isolated alkaloids from bulbs of *Hippeastrum vittatum*. **Phytomedicine**, v. 15, n. 17, p. 882 - 885, 2008.
- SZLÁVIK, L.; GYURIS, Á.; MINÁROVITS, J.; FORGO, P.; MOLNÁR, J.; HOHMANN, J. Alkaloids from *Leucojum vernum* and antirretroviral activity of Amaryllidaceae alkaloids. **Planta Médica**, v. 70, n.9, p. 871 - 873, 2004.
- TAHCHY, A. E.; BORDAGE, S.; PTAK, A.; DUPIRE, F.; BARRE, E.; GUILLOU, C.; HENRY, M.; CHAPLEUR, Y.; LAURAIN-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**, v. 106, p. 381 - 390, 2011.
- TAHCHY, A. E.; BOISBRUN, M.; PTAK, A.; DUPIRE, F.; CHRÉTIEN, F.; HENRY, M.; CHAPLEUR, Y.; LAURAIN-MATTAR, D. New method for the study of Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis using biotransformation of deuterium-labeled precursor in tissue cultures. **Acta Biochimica Polonica**, v. 57, n. 1, p. 75 – 82, 2010.

THE PLANT LIST. 2013. Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Amaryllidaceae/>. Acessado em: 11 mai. 2018.

THE PLANT LIST. 2013. Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-278178>. Acessado em: 11 mai. 2018.

VERPOORTE, R.; VAN DER HEIJDEN, R.; MORENO, P. R. H. Biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*. **The alkaloids: Chemistry and Phamacology**, v. 49, p. 221 – 229, 1997.

ZAYED, R.; EL-SHAMY, H.; BERKOV, S.; BASTIDA, J.; CODINA, C. In vitro micropropagation and alkaloids of *Hippeastrum vittatum*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 47, n. 6, p. 695 – 701, 2001.

ZHANG, W.; SONG, L.; SILVA, J. A. T.; SUN, H. Effects of temperature, plant growth regulators and substrates and changes in carbohydrate content during bulblet formation by twin scale propagation in *Hippeastrum vittatum* 'Red lion'. **Scientia Horticulturae**, v. 160, p. 230 – 237, 2013.