



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DE SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

Gabriella Sousa dos Santos

**ESTRATÉGIAS PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE GALANTAMINA
EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA AMARYLLIDACEAE PELA TÉCNICA DA
CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS: UMA REVISÃO**

BRASÍLIA

2018

Gabriella Sousa dos Santos

**ESTRATÉGIAS PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE GALANTAMINA
EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA AMARYLLIDACEAE PELA TÉCNICA DA
CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS: UMA REVISÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como
requisito parcial para obtenção do grau de
Farmacêutico, na Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Kicia Karinne Pereira
Gomes Copeland

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni

BRASÍLIA

2018

Gabriella Sousa dos Santos

**OBTENÇÃO E ESTRATÉGIAS PARA OTIMIZAR A PRODUÇÃO DE
GALANTAMINA EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA AMARYLLIDACEAE PELA
TÉCNICA DA CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS: UMA REVISÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como
requisito parcial para obtenção do grau de
Farmacêutico, na Universidade de Brasília.

Brasília, 29 de novembro de 2018

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Kicia Karinne Pereira Gomes Copeland

Profa. Dra. Maria de Fátima Borin

MSc. Simone Batista Pires Sinoti

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Kicia por me acolher e acreditar que eu seria capaz. Agradeço pela compreensão e paciência nos momentos em que precisei.

Ao meu coorientador Luiz Simeoni pela generosidade, apoio e incentivo que não me deixaram desanimar mesmo nos momentos mais difíceis.

A vocês todo meu respeito, carinho e admiração.

À Simone pela colaboração e ensinamentos durante os meus projetos de iniciação científica. Obrigada pelo apoio e momentos de descontração!

Aos meus familiares que sempre torceram por mim e me incentivaram. Não tenho palavras para descrever o quanto sou grata.

Aos meus pais, Maria e José Alberto que me permitiram chegar até aqui.

À minha mãe por sempre cuidar de mim com tanta dedicação. Sem você nada seria possível.

Aos meus irmãos e irmãs pelas palavras de carinho e estímulo que me fizeram seguir em frente. Agradeço por compreenderem minhas impaciências e ausências. Amo todos vocês!

Em especial, agradeço imensamente ao meu irmão Gilvan que foi fundamental desde o início. Obrigada por acreditar em mim!

Aos colegas e amigos que conheci graças a UnB. Em especial à Barbara Lima, Natália Kehl e Pollyanna Petalla, que fizeram parte dessa jornada.

As minhas amigas Alessandra, Karina e Samantha, que sempre torceram por mim e me incentivaram. Vocês são incríveis!

RESUMO

Galantamina é um alcaloide encontrado na família Amaryllidaceae utilizado para minimizar os efeitos da doença de Alzheimer. A principal fonte de Gal são bulbos e partes aéreas de plantas como *Galanthus* spp, *Leucojum* sp e *Narcissus* spp. A síntese orgânica de Gal mostrou-se inviável, o que culminou na obtenção deste composto a partir de populações nativas dessas plantas, acarretando assim, na coleta indiscriminada de várias espécies. Como consequência disso o risco de ameaça de extinção de várias espécies de Amaryllidaceae tornou-se uma realidade. Nesse sentido, a cultura de tecidos de plantas surgiu como uma alternativa sustentável para a produção de Gal, uma vez que é possível obter os alcaloides de interesse a partir do cultivo *in vitro* dessas espécies. Essa técnica é baseada na totipotência das células vegetais, e tem sido apontada como valioso instrumento para estudos de metabólitos, constituindo um sistema apropriado para a produção de compostos farmacologicamente importantes. Nesta revisão, fez-se um compilado de trabalhos que abordam as ferramentas até então descobertas na cultura de tecidos vegetais capazes de otimizar a produção de galantamina. Nossos resultados apresentam estratégias de cultivo *in vitro* com a utilização de elicitores, precursores ou componentes intermediários e reguladores do crescimento de plantas/ fitohormônios

Palavras-chave: Alzheimer; Amaryllidaceae; Galantamina; Cultura de tecidos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AA	Ácido araquidônico
ABVD	Atividades Básicas da Vida Diária
AIVD	Atividades Instrumentais da Vida Diária
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ANA	Ácido naftaleno acético
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APP	Proteína Precursora Amiloide
AS	Ácido salicílico
BA	Benziladenina
BAP	Benzilaminopurina
β A	Peptídeo beta amiloide
DA	Doença de Alzheimer
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Gal	Galantamina
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
KIN	Cinetina
(MF)	Massa Fresca
MJ	Metil Jasmonato

(MS)	Massa Seca
MS	Murashige & Skoog
NFGAL	N-Formil galantamina
nAChRs	Receptores Nicotínicos da Acetilcolina
Picloram	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro picolínico
PGR	Reguladores de Crescimento de Plantas
PSEN1	Presenilina 1
PSEN2	Presenilina 2
p-tau	proteína-tau
QS	Quitosana
RHS	<i>Royal Horticultural Society</i>
sp./spp.	espécie/ espécies
TAZ	Tazetina
TCIN	Ácido trans-cinâmico

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	9
2.	OBJETIVO.....	16
3.	METODOLOGIA.....	16
4.	RESULTADOS.....	17
5.	DISCUSSÃO.....	23
6.	CONCLUSÃO.....	27
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

A demência é uma síndrome que tem como características marcantes o comprometimento de funções cognitivas como memória, aprendizado, linguagem e percepção acarretando em prejuízo tanto nas atividades básicas da vida diária (ABVD) quanto nas atividades instrumentais da vida diária (AIVD) [1].

No cenário mundial a demência representa um problema de saúde pública, em 2015 estimava-se que havia 46,8 milhões de pessoas em todo o mundo com demência [2]. Em 2017, no entanto, acredita-se que este número subiu para cerca de 50 milhões de pessoas afetadas [2]. A tendência é que esse valor quase dobre a cada 20 anos, atingindo 75 milhões em 2030 e 131,5 milhões em 2050 [2].

No ano de 2015, o custo total da demência em todo o mundo foi estimado em US \$ 818 bilhões, isso representa 1,09% do PIB mundial. Em 2018, é provável que o custo global da demência atingirá a cifra US\$ trilhões de dólares americanos [2].

A doença de Alzheimer (DA) pode ser definida como uma síndrome neurodegenerativa progressiva de fisiopatologia complexa e causa multifatorial [3]. A DA é a forma mais comum de demência correspondendo a 60-80% dos casos, sendo que em metade dessas ocorrências relata-se apenas DA e nos demais há evidências da presença de demência mista [3, 4]. Os sinais e sintomas característicos da DA são a perda de memória, dificuldade em realizar tarefas rotineiras e confusão mental [4].

Entre os aspectos fisiopatológicos mais marcantes podemos ressaltar a presença de placas β -amiloide (β A), acúmulo de proteína tau (p-tau) com formação de emaranhados neurofibrilares, bem como mutações nos genes da proteína precursora amiloide (APP) e proteína presenilina 1 (PSEN1) e presenilina 2 (PSEN2) [4] [5]. Assim como, a morte maciça de neurônios em regiões como córtex cerebral e hipocampo [6]. A perda de neurônios colinérgicos e conseqüentemente a redução da sua sinalização também é associada ao prejuízo cognitivo instalado. Sabe-se que em modelos animais essa disfunção é suficiente para mimetizar um estado de demência similar ao Alzheimer [7] [8].

O principal fator de risco para o desenvolvimento de DA é a idade, considerando que a maior parte dos diagnósticos são estabelecidos em pessoas maiores de 65 anos [4]. Dados retirados de um estudo realizado nos EUA apontam que a incidência de novos casos de

DA aumenta significativamente, sobretudo em pessoas com idade entre 75-85 anos, esses estudos mostram que dentre as pessoas diagnosticadas com DA, 82% têm 75 anos ou mais [9].

Em 2005, foram estimados 24,2 milhões de casos de pessoas no mundo com demência e acredita-se que esse número possa quadruplicar até 2050 [10]. Segundo dados do Relatório da Associação de Alzheimer de 2017 a prevalência de DA entre os americanos é de 5,3 milhões, o que significa que uma a cada 10 pessoas com idade superior a 65 anos teve diagnóstico de Alzheimer e 480.000 pessoas ainda irão desenvolver DA no mesmo ano [11].

Considerando a população com idade acima de 60 anos foi observado uma maior taxa de prevalência e incidência de demência nas regiões da América do Norte e Europa Ocidental, seguidos pela América Latina [12].

No Brasil, calcula-se que na população com idade superior a 65 anos as projeções subam de 7,6% para 7,9% entre 2010 e 2020, o que representa 55.000 novos casos a cada ano [13].

Entre as opções farmacológicas para o tratamento da DA está a galantamina (Gal), um composto que atua como inibidor reversível da acetilcolinesterase (AChE) e modulador alostérico dos receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChRs) [14-16]. Em razão do seu duplo mecanismo de ação, a Gal melhora significativamente os deficits de aprendizado, seja pela inibição da acetilcolinesterase (AChE) e consequente maior liberação do neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica, como também pelo aumento da concentração dos receptores nicotínicos [17-19].

Galantamina

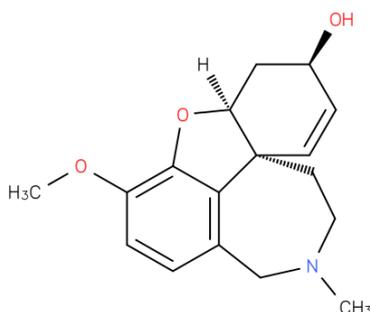


Figura. 1. Estrutura química da Galantamina. Fonte: European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI).

Estudos realizados com modelos *in vitro* e *in vivo* apontam também efeitos pleitrópicos da Gal em tecidos cerebrais submetidos a estresse por privação de glicose e oxigênio indicando dessa forma uma ação neuroprotetora [20, 21].

A galantamina é o composto mais amplamente estudado da família Amaryllidaceae, sendo caracterizada como um potente inibidor da acetilcolinesterase de ação prolongada, seletiva, reversível e competitiva [22-24]. Amaryllidaceae é uma família de plantas com flores bulbosas, monocotiledônea e da ordem Asparagales [25]. As espécies vegetais dessa família possuem propriedades antivirais, antitumorais e anticolinesterásicas [26-28]. Atualmente, a lista de plantas que contém Gal inclui cerca de 20 espécies e a procura por novas fontes ainda continua [29].

A Gal é um alcaloide isolado de bulbos e partes aéreas de plantas como *Galanthus* spp, *Leucojum* sp e *Narcissus* spp [30-32]. Foi isolada pela primeira vez na espécie *Galanthus woronowii*, da região do Cáucaso, em 1952 [33]. Na Bulgária, a Gal foi isolada de *Galanthus nivalis* [34]. Os extratos de *G. nivalis* foram amplamente aplicados na medicina popular de muitos países da Europa Oriental e do Mediterrâneo [35]. Nas décadas de 1960 e 1970, sob o nome comercial Nivalin a Gal foi usada nos países da Europa Oriental principalmente para tratar a poliomielite [36]. *Galanthus* spp é o gênero de bulbos ornamentais de origem selvagem mais comercializado no mundo. São 5,25 milhões de bulbos exportados da Turquia de *G. elwesii* e 18 milhões (15 milhões da Geórgia e 3 milhões da Turquia) de *G. woronowii*. Essa demanda é motivada pela paixão por *Galanthus* spp (Snowdrops) especialmente na Europa. Entretanto, por causa da coleta indiscriminada de *Galanthus* spp, várias espécies desse gênero estão entre as ameaçadas de extinção da Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) (<https://newredlist.iucnredlist.org/>) (tabela 1) [37].

Tabela 1. Dados taxonômicos e biogeográficos de espécies que contêm galantamina em seu habitat nativo.

FAMÍLIA	GÊNERO	ESPÉCIE	NOME POPULAR	LOCALIZAÇÃO	CLASSIFICAÇÃO NA LISTA VERMELHA DA IUCN	TENDENCIA POPULACIONAL	
AMARYLLIDACEAE	<i>Galanthus</i> spp	<i>G. nivalis</i> ***	“Snowdrop” comum; (Floco de Neve)	Extensa distribuição em toda a Europa***	Quase ameaçada	Diminuindo	
		<i>G. elwesii</i> ***	“Snowdrop”	Bulgária; Grécia; Moldávia; Roménia; Sérvia; Turquia; Ucrânia***	**	Diminuindo	
		<i>G. woronowii</i> Losinsk	“Snowdrop”	O norte do Cáucaso; Transcaucásia (Cáucaso Sul); Turquia.	-	-	
	<i>Leucojum</i> sp	<i>L. aestivum</i> ***	“Summer snowflakes” (Floco de neve de verão)	Extensa ocorrência pela Europa***	Menor preocupação	Estável	
						OBRAS BASE DOS ASPECTOS TAXONÔMICOS	
	GÊNERO/ NOME GENÉRICO	ESPÉCIE	CARACTERISTICAS	LOCALIZAÇÃO	AUTOR/ ANO		
	<i>Narcissus</i> spp (Daffodils”; <i>Narcissus</i> (Narciso)	<i>N. pseudonarcissus</i> L *	Até 30 cm; flores bicolors brancas / amarelas; corola não amplamente expandida e franzida	Espanha, sul da França, norte da Itália; naturalizada em vários outros países da Europa.	-		
		<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Carlton (*) (***)	Cultivo derivado total ou parcialmente de <i>N. pseudonarcissus</i> . Baseado no esquema RHS 1998 de classificação em 13 divisões. Pertence ao grupo de 'large-cupped' de narcisos ricos em Gal (Divisão 2). Corola ('cup') mais de um terço do comprimento do perianto, mas não tão longo.	Cultivada em larga escala nos Países Baixos e no Reino Unido.	Kreh and Matusch, 1995 Kreh <i>et al.</i> , 1995a Kreh <i>et al.</i> , 1995b Piozzi <i>et al.</i> , 1969		
		<i>Narcissus pseudonarcissus</i> subsp. <i>portensis</i> (Pugsley) (*) (***)	<i>N. portensis</i> Pugsley. Até 20 cm de altura com flores amarelas brilhantes uniformes; perianto visivelmente mais curto do que o trompete em forma de funil.	Norte de Portugal, Espanha central e noroeste	A. Fern, 1951		
		<i>N. confusus</i> Pugsley (*) (***)	Semelhante a <i>N. hispanicus</i> Flores totalmente amarelas, voltadas obliquamente para cima. Corola menos queimada na boca.	Espanha Central	Bastida <i>et al.</i> , 1987a Bastida <i>et al.</i> , 1987b		

Nota: (*) Numerosos táxons foram descritos e eles receberam várias classificações taxonômicas, muitos deles como variantes de *N. pseudonarcissus*. Devido à existência de híbridos naturais, cultivo extensivo e reprodução, e fuga e naturalização, o número de espécies reconhecidas de *Narciso* varia de 26 a cerca de 80. (**) Indeterminado, em razão de sua distribuição ser fragmentada além de ser confundida com a espécie *G. gracilis*. (***) Espécies introduzidas em outras localidades, (ex: *Narcissus*): a reprodução comercial desse gênero se concentra no Reino Unido e nos Países Baixos Obs: As espécies citadas de Narciso não constaram na lista de espécies ameaçadas até a data desta

consulta. Entretanto, há diversas outras espécies do gênero *Narcissus* sob ameaça. Fonte: IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/>>. Acesso em: 04 de outubro de 2018 [121-124]. Santos-Gally R., et. al. (2012) [125]. Hanks G. R (2002) [126,127].

A partir de 1960, a extração para produção industrial da Gal se concentrou em *Leucojum aestivum*, encontrada na Bulgária, em função dessa espécie dispor de uma maior concentração desse composto e maior biomassa [38-42]. A *Leucojum aestivum* ou floco de neve de verão, espécie Euro-Mediterrânea, é a principal fonte comercial de Gal na Bulgária [43], essa espécie já esteve ameaçada em razão do aumento da demanda por esse composto, e consequente redução das populações selvagens [44], chegando ao ponto do material recolhido decrescer para 5 toneladas, onde anteriormente eram retirados por volta de 15-10 toneladas [45-48]. Isso levou à inclusão de *L. aestivum* na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN / Red Data Book of Bulgaria, 1984 [49]. Atualmente, no entanto a espécie encontra-se em situação estável segundo esta mesma entidade devido a políticas de proteção da espécie que foram implementadas (tabela 1). Segundo dados do site da IUCN, *L. aestivum* é geralmente escassa nas regiões onde é nativa, porém é muito difundida pela Europa e foi introduzida em grande parte da América do Norte (tabela 1).

A busca por fontes mais sustentáveis de Gal levou ao gênero *Narcissus*, em razão do seu material vegetal ser encontrado em maior quantidade e por um preço mais barato, devido ao cultivo para ornamentação [50]. O gênero *Narcissus* L. contribui com cerca de 80 espécies para o total de aproximadamente 850 espécies em 60 gêneros [51]. Definir a taxonomia de Narciso é difícil devido à facilidade com que a hibridização ocorre naturalmente, acompanhada de cultivo extensivo, reprodução, seleção, fuga e naturalização [52]. No Reino Unido, o termo "Daffodil" é usado para "trumpet" ou "large cup" o nome popular para tipos de Narciso maiores, e "narcissi" para tipos menores de flores. Nesta revisão, o termo *Narcissus* (ou Narciso) é utilizado para descrever todos os tipos [53]. A hibridização resultou em Narcisos comerciais que estão em grande parte dos casos maiores e mais robustos que seus pais selvagens [54]. O cultivo de Narcisos tem se concentrado no Reino Unido e Países Baixos [55]. Devido à sua ampla disponibilidade comercial a variedade *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton é atualmente utilizada na produção comercial de Gal [42]. Nesse sentido, a variedade "Carlton", registrada desde 1927, se mostrou interessante, pois possui alto percentual de Gal (tabela 2) [56]. Nos Países Baixos, o principal produtor de bulbos de flores ornamentais do mundo,

aproximadamente 20.000 hectares são dedicados ao cultivo de bulbos anualmente, dos quais quase 1700 hectares são usados para Narciso [57].

Tabela 2. Relação entre a porcentagem de conteúdo de alcaloides totais e Galantamina

Espécies	Alcaloides (%)		Galantamina (%)	
	(MF)	(MS)	(MF)	(MS)
<i>Narcissus</i> ‘Carlton’	0,216	0,555	0,0725	0,1880
<i>Narcissus</i> ‘Gigantic Star’	0,157	0,650	0,0290	0,1201
<i>Galanthus elwesii</i>	0,113	0,290	0,0084	0,0213
<i>Galanthus nivalis</i>	0,071	0,124	0,0013	0,0031
<i>Leucojum aestivum</i>	0,033	0,236	0,0009	0,0065

Fonte: Adaptado de Hanks G. R. *Narcissus and Daffodil. The Genus Narcissus*. London, UK: 2002 [128].

O Reino Unido é o maior produtor de daffodils e de flores de *Narcissus*. O crescimento de daffodils acrescenta cerca de £ 23 M / ano à economia do Reino Unido, crescem aproximadamente cerca de metade dos bulbos de daffodil do mundo [58]. As variedades cultivadas de Narcisos foram classificadas em 13 divisões com mais de 27.000 variedades distintas [59].

Desde a aprovação da Galantamina para uso clínico pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 2001 [60] sua eficácia e segurança no tratamento da DA vem sendo comprovadas em numerosos ensaios clínicos [61]. Em 2014, foi publicado um estudo randomizado, controlado, duplo cego realizado por 2 anos com mais de 2000 pacientes com DA leve a moderada que mostrou que o tratamento com Gal reduziu significativamente a taxa de mortalidade e apresentou benefícios no prognóstico do grupo tratado com este composto, sendo relatados melhoras no desempenho cognitivo e realização de atividades diárias [61].

No ano 2000, a Gal foi lançada nos EUA e na Europa como um medicamento para tratamento da sintomatologia do Alzheimer sob o nome de Reminyl pelo laboratório Janssen Pharmaceuticals, parte da Johnson & Johnson, nome posteriormente alterado, em 2005, para Razadyne nos EUA [62] como forma de evitar confusões com o medicamento para diabetes Amaryl (glimepirida) da Sanofi-Aventis [63].

No Brasil, a Gal é comercializada na forma de sal de bromidrato de galantamina (nomenclatura genérica), Coglive (similar) e Reminyl (referência). As apresentações disponíveis são em cápsulas de 8 mg, 16 mg e 24 mg [64]. Conforme a Nota Técnica N°466/2014 publicada pelo Ministério da Saúde a Galantamina é aprovada clinicamente pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para os seguintes tratamentos: (1) sintomático da demência do tipo Alzheimer de intensidade leve a moderada (2) sintomático da demência de Alzheimer de intensidade leve a moderada com doença vascular cerebral relevante [65].

Alguns dos problemas enfrentados para a comercialização da galantamina como medicamento em larga escala foram o número restrito de fornecedores e cobrança de preços altos, já que, ela provém de fontes botânicas e os únicos fornecedores para exportação eram da Bulgária e cobravam valores por volta de US\$40,000/kg de matéria prima [62].

Tendo em vista a situação das espécies já descritas que contêm Gal a aplicação de medidas de proteção e conservação dessas espécies são urgentes e necessárias, uma vez que podem incorrer na falta de matéria prima para a fabricação do medicamento, com conseqüente prejuízo no tratamento de pessoas diagnosticadas com Alzheimer, sobretudo, levando em consideração que os dados epidemiológicos apresentados apontam uma linha crescente no diagnóstico de pessoas com DA [10, 11, 13].

Sabendo que as plantas produtoras de compostos de interesse farmacológico, por vezes, são alvo de coleta desmedida e nociva, tendo assim sua população ameaçada, torna-se necessário o emprego de outras ferramentas, tendo em vista a obtenção de bioativos de interesse de maneira sustentável [66].

Uma alternativa para promover esse tipo de produção é a técnica de cultura de tecidos de plantas que se baseia na totipotência das células vegetais. Essa técnica vem sendo apontada como valioso instrumento para o estudo de metabólitos especiais, constituindo um sistema apropriado para a produção de compostos farmacológicos importantes. A utilização de sistemas de cultivo *in vitro* é um método bastante eficiente quando o objetivo é aumentar a produção de substâncias bioativas a exemplo da Gal [67]. Na tabela 2 temos a relação entre espécies da família Amaryllidaceae e a quantidade de Gal (%).

Os protocolos de implementação dessa técnica exigem testes de adequação para cada espécie, em vista que a resposta ao meio de cultivo é variável conforme a concentração dos indutores utilizados, condições e tempo de tratamento, bem como também do explante utilizado [68].

Nesta revisão, realizaram-se compilados de trabalhos que abordam as ferramentas até então descobertas na cultura de tecidos vegetais capazes de otimizar a produção de galantamina. Em linhas gerais, tem-se resultados da biossíntese de Gal a partir dos elicitores bióticos e abióticos, reguladores de crescimento e agentes precursores ou componentes intermediários.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Apresentar um estudo de revisão de literatura sobre a obtenção e estratégias para otimizar a produção de Galantamina em espécies da família Amaryllidaceae.

2.2 Objetivo específico

Apresentar estudos que utilizem a técnica da cultura de tecidos de plantas como ferramenta que permitam otimizar a produção de galantamina em espécies da família Amaryllidaceae com enfoque no gênero *Narcissus* spp.

Expor estratégias já testadas e identificadas que apresentam bons resultados na otimização da produção de galantamina *in vitro*, compreendendo os seguintes eixos: (I) efeitos de reguladores de crescimento; (II) elicitores bióticos e/ou abióticos e (III) precursores ou componentes intermediários.

3. METODOLOGIA

3.1 Coleta de dados

A pesquisa foi realizada nas bases de dados PUBMED (National Institute of Health), BVS (Biblioteca Virtual em Saúde) e SCOPUS (Editora Elsevier) utilizando os unitermos: “Alzheimer disease” [(ou doença de Alzheiemer)] AND “Amaryllidaceae” AND “callogenesis” [(ou calogênese)] OR “calluses” OR “callus” [(ou calos)] AND ”galantamine” OR “galanthamine” [(ou galantamina)] AND “elicitors” [(ou elicitores)]

AND “*Narcissus spp*” AND “plant cell culture” OR “plant tissue culture” [(ou cultura de tecidos)] OR “secondary metabolites” [(metabólitos secundários)].

3.2 Critérios de inclusão

(1) estudos que contemplem variáveis relacionadas à obtenção de Galantamina pelo cultivo *in vitro* (2) estratégias para otimizar o processo de biossíntese de Galantamina em espécies do gênero *Narcissus spp* da família Amaryllidaceae; (3) artigos publicados entre os anos de 1997 e 2017; (4) estudos em língua inglesa e/ou portuguesa.

3.3 Critérios de exclusão

Estudos que não contemplam o tema alvo da pesquisa após análise do resumo ou do texto completo.

4. RESULTADOS

4.1 Impacto da ação de elicitores bióticos e abióticos sobre a produção de Gal

Os elicitores são sinais que desencadeiam a formação de metabólitos especiais, podendo ser classificados como bióticos e abióticos. Ambos são utilizados para estimular a formação desses metabólitos, diminuindo o tempo necessário para atingir suas altas concentrações [69].

Ação do metil jasmonato

No estudo conduzido por Colque et. al. (2004) aglomerados de brotos de *Narcissus confusus* foram tratados com concentrações diferentes de elicitores de uso comum como metil jasmonato (MJ) (12 a 112 mg/L), ácido araquidônico (AA) (1 a 10 mg /L), quitosana (QS) (50 a 500 mg/L) e ácido salicílico (AS) (14 a 138 mg / L) [70]. O efeito dos elicitores foi diferente de acordo com o tipo e a concentração de elicitor utilizada [70].

Foi observado que AS em todas as concentrações testadas, e MJ em altas doses afetaram negativamente o crescimento dos explantes *Narcissus confusus* [70]. Por sua vez, AA aplicado em concentrações intermediárias (8,21 e 16,42 μ M) apesar de não significativamente, aumentou numericamente o crescimento dos explantes em relação ao controle, enquanto as doses mais baixas e mais altas deste composto diminuiram [70]. A

QS estimulou o crescimento dos explantes em concentrações intermediárias 100 e 250 mg/L, sendo que a sua menor concentração 50 mg/L não afetou o crescimento, enquanto que em sua maior concentração 500 mg/L houve redução, mas não estatisticamente significativa. [70].

Em relação à produção de Gal foi constatado que a adição de MJ em qualquer concentração promoveu significativamente sua liberação de aglomerados de brotos para o meio de cultura em comparação com os explantes de controle. Esse efeito foi mais acentuado no tratamento com a menor concentração de MJ (25 μ M), onde a produção de GAL foi 3,8 vezes maior que o controle no 10º dia de cultura [70]. Já com relação ao AA ocorreu o inverso, a inibição da liberação de Gal para o meio em todas as concentrações [70]. Observou-se em relação aos níveis de Gal nos tecidos que todas as concentrações de MJ utilizadas promoveram a produção desse alcaloide, em especial nos aglomerados de brotos tratados com 25 μ M, onde foi acumulado 2 vezes maior em relação aos explantes controle, mostrando diferenças estatisticamente significantes [70].

A liberação de N-Formil Galantamina (FNGAL) foi estimulada principalmente pela MJ e AS, e em menor proporção pelo AA. Esse alcaloide foi acumulado no tecido em maior quantidade que os demais alcaloides, até mesmo do que Gal. A presença de MJ em todas as concentrações testadas aumentou significativamente a liberação de alcaloides, sendo esse efeito mais pronunciado na concentração de 25 μ M. Em geral, no entanto, a adição de QS, AA e AS levou a uma baixa liberação de alcaloides para o meio de cultura em relação aos controles [70]. Com relação aos alcaloides totais acumulados nos explantes, como no caso da liberação de alcaloides, é possível observar que a adição de MJ em qualquer uma das concentrações utilizadas promoveu a produção de alcaloides. Por outro lado, a presença de AS no meio de cultura inibiu essa acumulação em relação direta às concentrações utilizadas [70].

Corroboram esses achados, um estudo que analisou os efeitos de quatro elicitores (metil jasmonato, ácido salicílico, sulfato de cobre e nitrato de prata) sobre o crescimento e produção de alcaloides em culturas de brotos de *L. aestivum* [72]. O metil jasmonato (22,4 mg/L; 7 semanas de cultura) resultou numa produção significativamente melhorada de Gal em folhas e bulbos, enquanto que os outros eliciadores inibiram a produção [72].

Efeito da sacarose

A manipulação de aspectos físicos e elementos nutricionais de cultura influencia substancialmente o metabolismo especial de células e tecidos de plantas [73, 74]. Dessa maneira, sabendo que a sacarose é uma fonte de carbono comumente utilizada em células vegetais nos meios de cultivo de tecidos e órgãos. Selles et. al. (1997) investigaram os efeitos de concentrações que variam de 3% a 18% (30, 60, 90, 120, 150 e 180 g/L) de sacarose no cultivo de *Narcissus confusus* em meio de cultura líquido-agitado (110 rpm), por duas semanas utilizando duas fontes de explantes distintas: a placa basal de bulbos (prato) e sementes maduras. [75]. Constatou-se que os brotos de ambos os explantes cresceram mais quando cultivados com 9% de sacarose em meio MS (Murashige e Skoog) [76] suplementado com 1 mg/L 2,4-D, 5 mg/L BA [75], sugerindo que a fonte do explante não influencia o crescimento dos brotos. No entanto, estudos realizados com *N. pseudonarcissus* cv. Carlton a produção máxima de brotos e bulbos em meio MS contendo 1 mg/L ANA, 5-10 mg/L BA deu-se em apenas 3% de sacarose [77].

Segundo El Tahchy et al. (2011) concentrações elevadas de sacarose (6% ou 9% ou 12%) induzem organogênese, mas diminuem a formação de calos em *Narcissus* [78]. Esses resultados estão de acordo com outros estudos que constataram que altas concentrações de sacarose induziram melhor a organogênese, diminuindo a calogênese no cultivo de *Narcissus* [80, 81] e em *L. aestivum* [82, 83]. Assim como de acordo com Chow et. al. (1992), aumentar a concentração de sacarose do meio MS de 3% para 6% ou 9% levou a um aumento na porcentagem de formação de brotos em *Narcissus* para 48% e 71%, respectivamente [79].

Em *Narcissus confusus* a relação de (MS/MF) foi maior nas maiores concentrações de sacarose. Este efeito pode estar veiculado ao estresse hídrico [75]. Takayma e Miswa (1979) levantaram a hipótese de que a sacarose poderia mediar mudanças no potencial osmótico de *Lilium auratum*, explicando, assim, seu efeito no crescimento de bulbos [84].

Brotos de *Narcissus confusus* cultivados em 9% de sacarose ou menos apresentavam coloração verde-escuro, com um comprimento de 5-6 cm, enquanto os que foram cultivados em maiores concentrações de sacarose mostraram-se com coloração verde-claro com predisposição a vitrificação, sugerindo que altos níveis de sacarose foram fatores estressantes para os brotos em ambas as fontes de explantes. Estes brotos exibiram folhas verdes reduzidas e desenvolvimento deficiente. [75].

Com relação aos alcaloides do tipo galantamina (Gal e NFGAL) em aglomerados de brotos derivados de bulbos, a maior produção foi observada em 180 g/L de sacarose, onde o acúmulo total de Gal foi de 0,457 mg por cultura e o de NFGAL 0,264 mg por cultura [75]. Os autores acreditam que esse fato pode estar relacionado ao estresse hídrico [75]. No entanto, esses dados estão de acordo com os obtidos por El Tahchy et al. (2011), onde o conteúdo de Gal aumentou para 0,08% (MS) com 120 g/L de sacarose, enquanto que com 60 a 90 g/L obtinha-se 0,015 % (MS) [78]. Já em relação a produção de alcaloides nos brotos provenientes de sementes, foi observado uma produção máxima a 9% de sacarose, sendo os principais alcaloides NFGAL e TAZ, com 0,140 e 0,137 mg por cultura, respectivamente [75].

A quantidade total de alcaloides foi maior nas culturas de brotos derivados de bulbos do que de sementes, em razão da biomassa dos explantes obtido de bulbos ter sido maior. Por outro lado, a excreção de Gal e NFGAL para o meio foi maior nos brotos derivados de sementes [75].

Os efeitos da modificação do meio de cultura MS foram estudados por Georgiev et al (2009) [85]. Os resultados obtidos demonstraram que é possível aumentar a produção de Gal otimizando o meio de cultura [85]. Neste estudo, constatou-se que a otimização do nitrato, amônio, de íons fosfato e da concentração de sacarose (4,50 g/L de KNO₃, 0,89 g/L de NH₄NO₃, 1,25 g/L (NH₄)₂SO₄, 0,10 g/L KH₂PO₄ e 60 g/L de sacarose) foi capaz de aumentar a produção de Gal em cultura de brotos de *Leucojum aestivum* [85].

4.2 Uso de reguladores de crescimento de plantas e fitohormônios na suplementação do meio de cultura

A indução de calos a partir de embriões de sementes de *Narcissus confusus* Pugsley tratados com concentrações crescentes (0, 0,5, 1, 2, 4 e 8 mg /L) de picloram ou 2,4-D mostrou que calos tratados com 2,4-D se tornaram amarelos e compactos (não-embriogênicos), enquanto os que foram tratados com picloram por sua vez se tornaram-se friáveis (embriogênicos) [86]. Ao teste morfológico foi observado que calos embriogênicos dão origem a ápices caulinares e embriões somáticos, enquanto que calos não-embriogênicos a estruturas similares a raízes [86]. Embriões somáticos de calos embriogênicos *N. confusus* tratados com 0,5 ou 1 mg/L de BA ou KIN resultaram, no período de até 3 meses, em embriões somáticos, raízes adventícias e brotos. Sendo que os resultados de organogênese mais promissores foram alcançados quando os calos foram

transferidos para um meio suplementado com 1 mg/L de BA [86]. Assim, 85% dos aglomerados dos calos produziram brotos em até 6 semanas. Sendo que, os aglomerados de brotos foram capazes de produzir plântulas bulbosas em 1-2 meses após serem colocados em meio MS com 1 mg/L de 2,4-D e 5mg/L de BA [86]. Constatou-se também que nos calos embriogênicos o principal alcaloide acumulado foi Gal, bem como nos tecidos organogênicos, onde Gal foi o alcaloide principal, representando 38% dos alcaloides totais. De acordo com esse estudo, calos embriogênicos e brotos de *N. confusus* podem acumular quase a mesma quantidade de alcaloides [86]. Ainda nesse estudo, também foi observado que plântulas regeneradas de aglomerados de brotos ou embriões somáticos produzem em maior quantidade, sugerindo que existe relação entre o grau de diferenciação e a concentração de Gal [86].

Em um estudo realizado com frutos jovens de *Leucojum aestivum* foram investigados os efeitos de diferentes combinações de concentrações de auxinas (2,4-D; ANA e picloram) e citocininas (BAP e zeatina) na indução de calos [43]. Os melhores resultados foram observados em meio nutriente MS suplementado com 3 ou 4 mg/L 2,4-D e 2 mg/L BAP. No entanto, os melhores resultados em relação a organogênese foram obtidos quando os calos foram cultivados em meio MS com 1,15 mg/L ANA e 2 mg/L BAP, sendo que até 70% dos calos cultivados desenvolveram brotos após 8 semanas de cultivo. Foi estabelecido que a quantidade de Gal acumulada dependia fortemente do nível de diferenciação [43]. Assim como também, que a luz aumenta a síntese de Gal em aglomerados de brotos de *L. aestivum* cultivados em meio líquido [43]. Este resultado está de acordo com de Berkov et al. (2009), no qual aglomerados de brotos cultivados sob luz acumularam cerca de duas vezes mais Gal (uma média de 74 µg/g de (MS) do que aqueles cultivados no escuro (uma média de 39µg /g de (MS) [44].

As culturas de calos em geral apresentam quantidades muito baixas de produção de Gal (0,03-0,11 µg/g (MS) em *Narcissus* [87]. Por outro lado, sabe-se que diferenciação celular pode afetar diretamente as vias biossintéticas dos alcaloides, uma das razões é o aumento do acoplamento oxidativo produzindo precursores de Gal [87]. O interessante, portanto, é em que o tecido mais diferenciado difere do calo para que a biossíntese de alcaloide possa ser alcançada.

A influência da sacarose (30, 60, 90 e 120 g/L), carvão ativado (5 e 10 g/L) e várias concentrações de reguladores de crescimento sobre a organogênese e o acúmulo de

alcalóides foi Gal investigada em *Narcissus pseudonarcissus*, *Galanthus elwesii* e *Leucojum aestivum*, indicando que a adição de carvão ativado não parece ser benéfica em nenhuma condição, ocasionando sempre um efeito negativo, na calogênese e em especial na organogênese, sua concentração no meio nutriente diminuiu a formação de raízes e bulbos [78]. O aumento na concentração de 2,4-D fez decrescer a taxa de sobrevivência dos explantes, indicando toxicidade [78]. Os efeitos de BA e 2,4-D, isoladamente, não foram significativos, no entanto, a adição de 2,4-D e BA combinados apresentou um efeito positivo na produção de calos, raízes e bulbos [78]. Dessa forma, observou-se que as combinações de BA (4 μM) / 2,4-D (10 μM) foram ótimas para formação de calo e BA (5 μM) / 2,4-D (12 μM) para bulbos [78]. Selles et al. (1997) relataram que a transferência das culturas de *Narcissus confusus* para um meio MS sólido contendo baixas quantidades de 2,4-D (4,52 μM) e altas quantidades de BA (22,2 μM) estimulou a formação de bulbos e o crescimento global [75].

Os calos de *Narcissus* foram induzidos com êxito na presença de baixas concentrações de auxina (4,52 μM de 2,4-D). Sage et al. (2000) mostraram que um número maior de embriões somáticos de *Narcissus* foi produzido com 5 e 10 μM de 2,4-D do que com 0,5 μM [88]. Por outro lado, rendimentos razoáveis de embriões somáticos foram obtidos pela combinação de 2,4-D com BA [88].

A melhor formação de calos e bulbos em *N. pseudonarcissus* foi obtida a partir da parte aérea em meio MS suplementado com 4 μM de BA, 10 μM de 2,4-D, enriquecido com 60 g/L de sacarose e isento de carvão ativado [78]. Calos derivados de explantes de bulbos e folhas de *N. tazetta* var. *italicus* mostraram a maior taxa de crescimento e proliferação quando cultivado em meio MS suplementado com alto ANA (3 mg/L) e baixo BAP (1,5 mg/L) [89].

Em cultura de calos de *Leucojum aestivum* em meio MS suplementado com 25 μM de picloram e 0,5 μM de BA foi observado que a adição de um precursor de etileno, ácido 1-aminociclopropano carboxílico (ACC), aumentou a produção de etileno, mas reduziu a formação de calos e induziu formação de embriões somáticos [90]. Nos embriões somáticos cultivados em meio enriquecido com ACC, o conteúdo de Gal 2% (MS) foi quase seis vezes maior que o controle 0, 34% (MS) [90].

Curiosamente, já foi relatado que em meio sem reguladores de crescimento não há o crescimento de calos [86]. Isso sugere que a auxina e a citocinina são obrigatórias para o

crescimento e diferenciação celular e que a maior concentração de auxinas facilita a formação de calo [91, 92].

4.3 Precusores ou componentes médios na rota de produção de Galantamina

Para elevar o rendimento do produto final, o fornecimento de precusores ou compostos intermediários é uma estratégia vantajosa [93]. Precusores são compostos químicos que precedem outros compostos em uma via metabólica [94].

Todos os alcalóides da família Amaryllidaceae são derivados dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina, que produzem o precursor da via comum 4'-O-metilnorbeladina [96]. Os precusores dos alcaloides Amaryllidaceae são tirosina, fenilalanina, tiramina, ácido trans-cinâmico, norbeladina e 4-O-metilnorbeladina [97]. A adição de um precursor pode desencadear maiores rendimentos de alcaloides [95]. Neste caso, o acoplamento fenol oxidativo de 4'-O-metilnorbeladina pode ocorrer nas posições orto-para', para-orto' e para-para' [42] [118]. A Gal é formada pelo acoplamento oxidativo para-orto' fenol da 4'-O-metilnorbeladina [98].

Concentrações de ácido trans-cinâmico (TCIN) (250 a 1000 mg/L) foram utilizadas para analisar a produção de alcaloides em culturas de aglomerados de brotos de *N. confusus*. Na maior concentração (1000 mg/L) de TCIN foi demonstrado um aumento na produção de Gal e NFGAL, embora este nível tenha inibido o crescimento de culturas [95].

Estudos usando deutério marcado apontaram que 4'-O-metilnorbeladina, um precursor central dos alcaloides da família Amaryllidaceae, pode ser absorvido por células cultivadas e transformado em alcaloides Amaryllidaceae [98] [99].

A incorporação de 4'-O-metilnorbelidina no meio líquido de culturas de brotos de *L. aestivum* mostrou uma biossíntese altamente estimulada de Gal 0,5 mg/g de (MS). A produção máxima de alcaloides foi observada com concentração de precursor de 0,1 g/L após 15 dias de cultivo [100].

5. DISCUSSÃO

As estatísticas de demência disponíveis são alarmantes, apontando que uma pessoa desenvolve demência a cada 3 segundos [2]. A cada ano são mais de 9,9 milhões de novos casos em todo o mundo [2]. A perspectiva é que em 2030 o número de pessoas com demência no mundo chegue próximo aos 132 milhões [2]. Esse cenário ressalta a

importância de assegurar o tratamento das doenças neurodegenerativa, sobretudo da DA que é a mais prevalente de todas elas [101]. Nesse sentido, a galantamina, o primeiro alcaloide da família Amaryllidaceae aprovado para uso clínico tem um papel relevante [102].

O mecanismo de ação da Gal é por meio da inibição reversível da AChE e modulação alostérica dos receptores nAChRs [14-16]. Mas além da ação colinérgica a Gal possui atividade antioxidante, neuroprotetora e antiapoptótica [103,104]. Foi demonstrado que ao modular o sistema colinérgico a Gal reduz os níveis de peptídeo β A em cultura de células e no líquido cefalorraquidiano, indicando que a Gal pode não estar agindo puramente como um tratamento sintomático [105,106]. Além disso, estudos demonstraram que o tratamento crônico com Gal pode degradar os depósitos de placas neuríticas em camundongos (5XFAD) com predisposição ao depósito precoce de placas amiloides [107].

Esses resultados contribuem com a alegação de que a Gal não apenas é capaz de melhorar os sintomas cognitivos e comportamentais na DA, mas que pode ter propriedades modificadoras da doença e neuroprotetora, como é indicado pela formação tardia da placa $A\beta$ [107]. Apesar de a Gal ser inicialmente indicada para o tratamento de pacientes em estágios de DA leve ou moderada, ela foi capaz de melhorar a cognição de pacientes em estágio severo da doença. Tudo isso, além de promover neurogênese na região hipocampo [108].

Em razão de estatísticas apontarem um salto no número de pessoas diagnosticadas com Alzheimer [2,10,11,13] a tendência é que a demanda por Gal cresça imensamente. Isso impulsiona a procura de formas de se obter Gal por meios não convencionais, tornando o cultivo de espécies *in vitro* um aliado na produção sustentável desse composto [43].

Nos estudos de cultura de tecidos *in vitro* observou-se que a fonte do explante escolhido para a cultura influencia a liberação de Gal para o meio de cultura. Isso foi demonstrado por Sellés et al. (1997) [75] onde excreção de Gal e NFGAL para o meio de cultura foi maior nos brotos derivados de sementes do que nos brotos provenientes de bulbos de *Narcissus confusus* [75]. A quantidade de alcaloides excretada para o meio de cultura também pode ser melhorada como foi mostrado por Colque et. al. (2004) [70] em que houve aumento em proporções de até 300% na liberação de Gal e outros alcaloides em relação aos explantes controle quando foi adicionado MJ na concentração de 25 μ M. Isso pode ser considerado uma grande vantagem, uma vez que ao se manter os brotos em

condições favoráveis de cultivo, seria possível extrair os alcaloides sem a necessidade de ferir os tecidos, criando dessa forma um sistema sustentável de obtenção de Gal. Ao contrário, a adição de QS, AA e AS levou a uma baixa liberação de alcaloides para o meio de cultura em relação aos controles [70].

O metil jasmonato, o ácido jasmônico e o ácido salicílico têm sido alvo constante na produção de compostos fenólicos por culturas *in vitro* [109], sendo que o metil jasmonato e o ácido jasmônico induzem genes responsáveis pela síntese das enzimas envolvidas nas vias metabólicas secundárias [110]. Além disso, MJ foi considerado o melhor elicitador para biossíntese de Gal em plântulas de *L. chinensis* [111]. Corroboram esses achados um estudo que mostrou que os conteúdos máximos de Gal e licorina foram obtidos na elicitação com ácido jasmônico em culturas *in vitro* de *L. aestivum* [112]. O mecanismo seria devido à indução da atividade da tirosina descarboxilase. Enquanto que o metil jasmonato foi capaz de estimular o rendimento de N-desmetilgalantamina, um precursor direto da Gal, e a biossíntese de ácidos fenólicos, devido à indução da atividade da fenilalanina amônia liase [112].

Diferentemente do aumento da produção de alcaloides na presença de ácido salicílico visto por outros autores [113], o AS diminuiu não só a liberação de Gal, mas também o seu acúmulo nos tecidos, indicando que a sua biossíntese pode ser inibida por este composto [70]. Tem sido demonstrado que o AS bloqueia a síntese endógena de MJ em células vegetais, limitando a produção de alcaloides [114]. Este fato poderia explicar o efeito negativo do ácido salicílico na produção de alcaloides em *N. confusus*, uma vez que a adição de MJ aumentou a produção de Gal e alcaloides relacionados. No entanto, a diminuição dessa produção de alcalóides pode ser um efeito indireto da SA, pois o crescimento dos explantes tratados com este composto foi extremamente reduzido [70]. O mesmo efeito negativo foi observado com o carvão ativado (5 e 10 g / L) em *Narcissus pseudonarcissus*, *Galanthus elwesii* e *Leucojum aestivum*, onde a adição de carvão ativado não foi benéfica, acarretando em um efeito negativo na calogênese e em especial na organogênese [78]. Confirmando o que já foi apontado sobre a variação dos efeitos de elicitores sobre o crescimento de tecidos em cultura conforme a concentração e tipo de elicitador utilizado.

Com relação a efeitos da sacarose e das auxinas nos perfis dos alcaloides de Amaryllidaceae observou-se que estes variam dependendo da espécie. Brotos de

Narcissus confusus cresceram mais quando cultivados com 9% de sacarose em meio MS [75] enquanto em *N. pseudonarcissus* cv. Carlton a produção máxima de brotos se deu em apenas 3% de sacarose no mesmo meio [77].

Foi verificado que em meio sem reguladores de crescimento não houve crescimento de calos [86]. Foi visto também que efeitos de BA e 2,4-D, isoladamente, não foram significativos. Entretanto, a adição de 2,4-D e BA combinados apresentou um efeito positivo na produção de calos, raízes e bulbos [78]. Isso nos leva a concluir que a auxina e a citocinina são importantes para o crescimento e diferenciação celular [91,92]. No cultivo de *Narcissus confusus* em meio MS com baixas quantidades de 2,4-D (4,52 μ M) e altas quantidades de BA (22,2 μ M) foi estimulada a formação de bulbos e o crescimento global [78]. Em contrapartida a melhor formação de calos e bulbos em *N. pseudonarcissus* foi obtida a partir da parte aérea em meio MS com 4 μ M de BA, 10 μ M de 2,4-D [78]. Calos derivados de explantes de *N. tazetta* var. *italicus* mostraram a maior taxa de crescimento quando cultivado em meio MS com altas concentrações de ANA (3 mg / L) e baixas de BAP (1,5 mg / L) [89]. Por outro lado, em *N. pseudonarcissus* cv. Carlton a produção máxima de brotos e bulbos no mesmo meio foi com 1 mg/L ANA, 5-10 mg/L BA [73]. Assim, podemos concluir que o balanço auxinas e citocininas é importante em diferentes fases do desenvolvimento [91, 92]. A indução de calos foi favorecida por altas concentrações de auxina e baixa de citocinina [78] [89]. Enquanto o crescimento de brotos e plântulas a partir de maior concentração de citocinina e uma baixa de auxina [75] [78].

Com relação ao uso de precursores no estímulo da síntese de Gal vale destacar que entre os primeiros passos na biossíntese de alcalóides de Amaryllidaceae compreendem a conversão enzimática de fenilalanina em ácido cinâmico pela enzima fenilalanina amônia liase e a descarboxilação da tirosina por tirosina descarboxilase para produzir tiramina [115,116]. A degradação do ácido cinâmico produz o aldeído protocatecuico e sua junção com a tiramina leva à norbeladina, que é então seletivamente O-metilada pela enzima norbeladina 4'-O-metiltransferase (N4OMT), sendo a Gal formada pelo acoplamento oxidativo para-orto-fenol da O-metilnorbeladina [98,115,116]. Isso explica porque a incorporação de 4'-O-metilnorbelidina no meio líquido de culturas de brotos de *L. aestivum* levou a uma biossíntese altamente estimulada de Gal [100].

Como foi visto a O-metilnorbeladina é derivada de precursores de aminoácidos [96] e o acoplamento oxidativo para-orto-fenol, assim como, a N-metilação de norbelladina é

parte limitante para a conversão desse composto em Gal [98,115,116]. No entanto, além dos efeitos de precursores o estudo das enzimas envolvidas é um componente relevante no estudo da biossíntese de Gal. Em *N. pseudonarcissus* um possível gene responsável pela metilação da norbeladina para 4'-O-metilnorbeladina foi identificado [117]. A proteína resultante foi uma enzima 4-O-metiltransferase de norbeladina (NpN4OMT) da via biossintética de Galantamina [117]. Essa descoberta permite a futura elucidação de outras enzimas que atuam na via biossíntese de Gal [117]. A partir dessa informação genes que co-expressam NpN4OMT podem ser identificados e usados como genes candidatos para outras etapas da via biossintética da Gal [117]. Também já foi identificado em *N. pseudonarcissus* e *Galanthus* spp uma enzima do citocromo P450 (CYP96T) [118] que é capaz de formar os produtos a partir de 4'-O metilnorbeladina [119]. Esse conhecimento é um passo importante na busca por otimização da produção de alcaloides [96] pois a produção de alcaloides pode ser correlacionada com perfis de expressão gênica a partir da análise do transcriptoma e do perfil metabólico [120].

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que a cultura de tecidos é uma iniciativa promissora na busca por otimizar a obtenção de compostos de interesse farmacêutico como a galantamina. No entanto, principais desafios na sua utilização consistem no fato dessa técnica requerer condições únicas de cultivo para cada planta medicinal, sendo assim considerada quase uma arte, uma vez que as condições ótimas de produção de qualquer composto são ímpares e exclusivas de cada espécie. Dessa forma, a cultura de tecidos *in vitro* necessita ser trabalhada passo-a-passo, buscando-se a melhor forma de promover a otimização da produção da rota metabólica que leva ao bioativo de interesse. O que se espera no futuro é que a partir do conhecimento das particularidades das espécies da família Amaryllidaceae que contêm galantamina é criar um sistema otimizado de produção de Gal suprimindo assim a necessidade da população que faz tratamento da doença de Alzheimer com galantamina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] American Psychiatry Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV) 4rd ed. Washington, 1994.
- [2] ADI: Dementia statistics. Disponível em: <http://www.alz.co.uk/research/statistics> [(acessado em 15 de novembro 2018)].
- [3] Yilmaz, U. Radiologe (2015) 55: 386. <https://doi.org/10.1007/s00117-014-2796-2>

- [4] Alzheimer's, Association. "2015 Alzheimer's disease facts and figures." *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association* 11.3 (2015): 332.
- [5] Goldman, J.S., Hahn, S.E., Bird, T. Genetic counseling and testing for Alzheimer disease: Joint practice guidelines of the American College of Medical Genetics and the National Society of Genetic Counselors. *Genet Med* 2011; 13:597–605.
- [6] Selkoe D. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 2001;81(2):741-66.
- [7] Bartus, R.T., Emerich, D.F. Cholinergic markers in Alzheimer disease. *JAMA.* 1999;282 (23):2208-9.
- [8] Auld, D.S., Kornecook, T.J., Bastianetto S., Quirion, R. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition and treatment strategies. *Prog Neurobiol.* 2002;68(3):209-45.
- [9] Hebert, L.E., Weuve, J., Scherr, P.A., Evans, D.A. Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 Census. *Neurology* 2013; 80:1778–83
- [10] Reitz, C., Mayeux, R. Alzheimer disease: Epidemiology, Diagnostic Criteria, Risk Factors and Biomarkers. *Biochemical pharmacology.* 2014;88(4):640-651. doi:10.1016/j.bcp.2013.12.024.
- [11] Alzheimer's Association. "2017 Alzheimer's disease facts and figures." *Alzheimer's & Dementia* 13.4 (2017): 325-373.
- [12] Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet.* 2005 Dec 17;366(9503):2112–7. [PMC free article] [PubMed]
- [13] Burlá, C., Camarano, A.A., Kanso, S., Fernandes, D., Nunes, R. Panorama prospectivo das demências no Brasil: um enfoque demográfico. *Cien Saude Colet* 2013; 18(10):2949-2956
- [14] Cummings, Jeffrey L., Travis Morstorf, and Kate Zhong. "Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures." *Alzheimer's research & therapy* 6.4 (2014): 37.
- [15] Takos, A.M., Rook, F. Towards a Molecular Understanding of the Biosynthesis of Amaryllidaceae Alkaloids in Support of Their Expanding Medical Use. *International Journal of Molecular Sciences.* 2013;14(6):11713-11741. doi:10.3390/ijms140611713.
- [16] Santos, M.D., Alkondon, M., Pereira, E.F.R., Aracava, Y., Eisenberg, H.M., Maelicke, A., Albuquerque, E.X. The nicotinic allosteric potentiating ligand galanthamine facilitates synaptic transmission in the mammalian central nervous system. *Mol. Pharmacol.* 2002; 61:1222–1234. [PubMed]
- [17] Arias, E., et al., Galantamine prevents apoptosis induced by β -amyloid and thapsigargin: involvement of nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology.* 46(1) 2004, p. 103-114.

- [18] Wang, D., et al., The allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors by galantamine ameliorates the cognitive dysfunction in beta amyloid25–35 icv-injected mice: involvement of dopaminergic systems. *Neuropsychopharmacology*. 32(6) 2007, p. 1261-1271.
- [19] Woodruff-Pak, D.S., R.W. Vogel, and G.L. Wenk, Galantamine: effect on nicotinic receptor binding, acetylcholinesterase inhibition, and learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98(4) 2001, p. 2089-2094.
- [20] Egea, J., Martin-de-Saavedra, M.D., Parada, E., Romero, A., del Barrio, L., Rosa A.O., Garcia, A.G., Lopez, M.G. Galanthamine elicits neuroprotection by inhibiting iNOS, NADPH oxidase and ROS in hippocampal slices stressed with anoxia/reoxygenation. *Neuropharmacology*. 2012;62:1082–1090.[PubMed]
- [21] Lorrio, S., Sobrado, M., Aria, E., Roda, J.M., Garcia, A.G., Lopez, M.G. Galanthamine postischemia provides neuroprotection and memory recovery against transient global cerebral ischemia in gerbils. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007; 322:591–599. [PubMed]
- [22] Sweeney, J.E., Puttfarcken, P.S., Coyle, J.T. Galanthamine, an acetylcholinesterase inhibitor: a time course of the effect on performance and neuro-chemical parameters in mice. *Pharm Biochem Behav* 1989; 34:129–37.
- [23] Thomsen, T., Kewitz, H. Selective inhibition of human acetylcholinesterase by galanthamine in vitro and in vivo. *Life Sci* 1990; 46:1553–8.
- [24] Thomsen, T., Zendej, H., Fischer, J.P., Kewitz, H. In vitro effects of various cholinesterase inhibitors on acetyl and butyrylcholinesterase of healthy volunteers. *Biochem Pharm* 1991; 41:139–41.
- [25] Takos AM, Rook F. Towards a Molecular Understanding of the Biosynthesis of Amaryllidaceae Alkaloids in Support of Their Expanding Medical Use. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14(6):11713-11741. doi:10.3390/ijms140611713
- [26] Gabrielsen, B., Monath, T.P., Huggins, J.W., Pettit, G.R., Groszek, G., Hollingshead, M., et al. Antiviral (RNA) activity of selected Amaryllidaceae isoquinoline constituents and synthesis of related substances. *J Nat Prod* 1992; 55:1569–81.
- [27] Pettit, G.R., Groszek, G., Backhaus, R.A., Doubek, D.L., Barr, J., et al. Antineoplastic agents, 301. An investigation of the Amaryllidaceae genus *Hymenocallis*. *J Nat Prod* 1995; 58:756–9.
- [28] Luttmann, E., Linnemann, E., Fels, G. Galanthamine as bis-functional ligand for the acetylcholinesterase. *J Mol Model* 2002; 8:208–16.
- [29] Novikova, Y., Tulaganov, A.A. Physicochemical methods for the analysis of galanthamine. *Pharm Chem J* 2002;36(11):623–7.
- [30] Tsvetkova, D., et al. Antioxidant activity of galantamine and some of its derivatives. *Current medicinal chemistry*. 20(36) 2013, p. 4595-4608.
- [31] Neto, J.S., Bezerra, C.R.M., Fernandes, N.P., Medeiros, R.M., Nova, A.N.M.V., Pinto, D.S. A Fitoterapia como terapêutica complementar no tratamento de Alzheimer. *Rev. Ciênc. Saúde Nova Esperança* 2014 Dez; 12(2): 1-8.

- [32] Heinrich, M. and H. Lee Teoh. Galanthamine from snowdrop—the development of a modern drug against Alzheimer’s disease from local Caucasian knowledge. *Journal of ethnopharmacology*. 92(2) 2004, p. 147-162.
- [33] N. F. Proscurina and A. P. Yakovleva, *Chem. Abstr.* 147, 6959 (1953)
- [34] L. Bubeva-Ivanova, *Farmacia* 2, 23 (1957)
- [35] A. Plaitakis and R. C. Duvoisin, *Clin. Neuropharmacol.* 6, 1 (1983).
- [36] D. Paskov, “Nivalin: Pharmacology and Clinical Application”, *Medicina i fizkultura*, Sofia, 1955.
- [37] Rønsted, Nina., et al. "Snowdrops falling slowly into place: An improved phylogeny for *Galanthus* (Amaryllidaceae)." *Molecular phylogenetics and evolution* 69.1 (2013): 205-217.
- [38] N. Stoyanov and P. Savchev, *Farmacia* 14, 17 (1964).
- [39] N. Astadjov, in “Proceedings of the 2nd National Conference of Botany” (D. Yordanov, ed.), p. 61. *Bulg. Acad. Sci. Press*, Sofia, 1973.
- [40] A. Mitrev, in “Chorological Atlas of medicinal plants in Bulgaria” (I. Bondev, ed.), p. 118. *Acad. Publishers “Prof. M. Drinov”*, Sofia, 1995.
- [41] Zh. Stefanov. *Ecobiological and Phytochemical Investigations of Natural Populations and Introduced Origins of Summer Snowflake (Leucojum aestivum L.) in Bulgaria*. D.Sc. Thesis, NIHFI, Sofia, Bulgaria, 1990.
- [42] Takos AM, Rook F. Towards a molecular understanding of the biosynthesis of amaryllidaceae alkaloids in support of their expanding medical use. *Int J Mol Sci.* 2013;14(6):11713-41. Published 2013 May 31. doi:10.3390/ijms140611713
- [43] Pavlov, A. et al. "Galanthamine production by *Leucojum aestivum* in vitro systems." *Process Biochemistry* 42.4 (2007): 734-739.
- [44] Berkov, Strahil, et al. "Alkaloid synthesis and accumulation in *Leucojum aestivum* in vitro cultures." *Natural product communications* 4.3 (2009): 359-364.
- [45] N. Stoyanov and P. Savchev, *Farmacia* 14, 17 (1964).
- [46] N. Astadjov, in “Proceedings of the 2nd National Conference of Botany” (D. Yordanov, ed.), p. 61. *Bulg. Acad. Sci. Press*, Sofia, 1973.
- [47] A. Mitrev, in “Chorological Atlas of medicinal plants in Bulgaria” (I. Bondev, ed.), p. 118. *Acad. Publishers “Prof. M. Drinov”*, Sofia, 1995.
- [48] Zh. Stefanov, *Ecobiological and Phytochemical Investigations of Natural Populations and Introduced Origins of Summer Snowflake (Leucojum aestivum L.) in Bulgaria*. D.Sc. Thesis, NIHFI, Sofia, Bulgaria, 1990.
- [49] *Red Data Book of Bulgaria*, vol. 1 Plants (V. Velchev, ed.), p. 76. *Bulg. Acad. Sci. Press*, Sofia, 1984.

- [50] Kreh, M. Studies on Galanthamine Extraction from *Narcissus* and Other Amaryllidaceae. In: Hanks G.R., editor. *Narcissus and Daffodil. The Genus Narcissus*. Taylor & Francis; London, UK: 2002. pp. 256–272.
- [51] Meerow, H.W. and Snijman, D.A. (1998) Amaryllidaceae. In: K. Kubitzki (ed.), *Families and Genera of Vascular Plants*, Vol. 3, Springer-Verlag, Berlin.
- [52] Webb, D.A. (1980) *Narcissus* L. In: T.G. Tutin, V.H. Heywood, N.A. Burges, D.M. Moore, D.H. Valentine, S.M. Walters and D.A. Webb (eds.), *Flora Europaea*, Vol. 5, *Alismataceae to Orchidaceae (Monocotyledones)*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 78–84.
- [53] Hanks, G.R. The Biology of *Narcissus*. In: Hanks G.R., editor. *Narcissus and Daffodil. The Genus Narcissus*. Taylor & Francis; London, UK: 2002. pp. 1–18.
- [54] Doorenbos, J. (1954) Notes on the history of bulb breeding in the Netherlands. *Euphytica*, **3**, 1–11.
- [55] Royal Horticultural Society, The Daffodil Register e Classified List. [(acessado em 19 de março de 2013)]. Disponível online: <http://www.rhs.org.uk/plants/plant-science/plant-registration/daffodils>.
- [56] Brandham, P.E., West J.P. Correlation between nuclear DNA values and differing optimal ploidy levels in *Narcissus*, *Hyacinthus* and *Tulipa* cultivars. *Genetica*. 1993; 90:1–8.
- [57] Bloembollenkeuringsdienst (BKD) Voorlopige statistiek voorjaarsbloeiers 2012–2013. [(acessado em 6 de abril de 2013)]. Disponível: <http://www.bkd.eu/index.php/over-de-bkd/statistieken/voorjaarsbloeierende-bolgewassen>
- [58] Jones, M., Pulman, J. & Walker, T. 2011. Drugs from daffodils. *CHEMISTRY & INDUSTRY*, 18-20.
- [59] Royal Horticultural Society, The Daffodil Register and Classified List. [(accessed on 19 March 2013)]. Available online: <http://www.rhs.org.uk/plants/plant-science/plant-registration/daffodils>.
- [60] Cummings, Jeffrey L., Travis Morstorf, and Kate Zhong. "Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures." *Alzheimer's research & therapy* 6.4 (2014): 37.
- [61] Hager K, Baseman, A.S, Nye, J.S., et al. Effects of galantamine in a 2-year, randomized, placebo-controlled study in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2014; 10:391-401. doi:10.2147/NDT.S57909.
- [62] Mucke, H.A. The case of galantamine: repurposing and late blooming of a cholinergic drug. *Future Science OA*. 2015;1(4):FSO73. doi:10.4155/fso.15.73.
- [63] U.S. Food and Drug Administration. [(accessed on 9 March 2013)]. Available online:<http://www.fda.gov/Drugs/default.htm>.

- [64] Lista de Medicamentos Similares e seus respectivos medicamentos de referência, conforme RDC 58/2014 [(acessado em 10 de novembro 2018)]. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/219401/Lista%2Bsite%2B26-01-16%2BEXCEL.pdf/b5e6d58d-5315-4a73-b1ed-25e289d1e2f5>
- [65] Nota Técnica 466/2014 do Ministério da Saúde [(acessado em 10 de novembro 2018)], disponível em: <http://www.agu.gov.br/page/download/index/id/23699259>
- [66] Villareal, M.L., Arias, C., Veja, J., Feria-Velasco, A., Ramirez, O.T., Nicasio, P., Rojas, G., Quintero, R. 1997. Cell suspension culture of *Solanum chrysotrichum* - a plant producing an antifungal spirostanol saponin. *Plant Cell Tiss Org Cult* 50: 39-44.
- [67] Fumagali, Elisângela, et al. "Production of plant secondary metabolites in plant cell and tissue culture: the example of *Tabernaemontana* and *Aspidosperma* genera." *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18.4 (2008): 627-641.
- [68] Caldas, L. S., Haridasan, P., Ferreira, M. E., Meios nutritivos. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH, 1998. V. 1, p. 87-132
- [69] Eilert, U. Elicitation: Methodology and aspects of application. In: Constable F, Vasil I, editors. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. San Diego: Academic Press; 1987. pp. 153–96.
- [70] Colque, R., Viladomat, F., Bastida, J., & Codina, C. (2004). Improved production of galanthamine and related alkaloids by methyl jasmonate in *Narcissus confusus* shoot-clumps. *Planta médica*, 70(12), 1180-1188.
- [71] Ptak, A., El Tahchy, A., Dupire, F., Boisbrun, M., Henry, M., Chapleur, Y., Mos, M. & LaurainMattar, D. 2008. LCMS and GCMS for the screening of alkaloids in natural and in vitro extracts of *Leucojum aestivum*. *Journal of natural products*, 72, 142-147.
- [72] Schumann, A., Torras-Claveria, L., Berkov, S., Claus, D., Gerth, A., Bastida, J. & CODINA, C. 2013. Elicitation of galanthamine production by *Leucojum aestivum* shoots grown in temporary immersion system. *Biotechnology progress*, 29, 311-318
- [73] Mantell, S.H & Smith, H. (1983) Cultural factors that influence secondary metabolite accumulations in plant cell and tissue cultures. In: Mantell SH& Smith H (eds) *Plant Biotechnology*. (pp 75–108). Cambridge University Press, Cambridge
- [74] Payne, G.F., Bringi, V., Prince, C., & Shuler, M.L. (1991) *Plant cell and tissue culture in liquid systems*. Hanser, Munich
- [75] Sellés, M., Bergoñón, S., Viladomat, F. et al. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (1997) 49: 129. <https://doi.org/10.1023/A:1005889730437>
- [76] Murashige, T., & Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497
- [77] Sharma, Y., & Kanwar, S. B. Studies on micropropagation of tulips and daffodils. XXVI International Horticultural Congress: *Elegant Science in Floriculture* 624, 2002. 533- 540.

- [78] El Tahchy, Anna, 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)* 106.3 (2011): 381-390.
- [79] Chow, Y., Selby, C. & Harvey, B. 1992. A simple method for maintaining high multiplication of Narcissus shoot cultures in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 30, 227-230.
- [80] Staikidou, I., Watson, S., Harvey., B.M.R., Selby, C. (2005) Narcissus bulblet formation in vitro: effects of carbohydrate type and osmolarity of the culture medium. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 80:313–320
- [81] Chow, Y.N., Selby, C., Fraser, T.W., Harvey, B.M.R. (1992) Stimulation by sucrose of Narcissus bulbil formation in vitro. *J Horticult Sci* 62:289–293
- [82] Berkov, S., Georgieva, L., Kondakova, V., Atanasov, A., Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C. (2009a) Plant sources of galanthamine: phytochemical and biotechnological aspects. *Biotechnol Bio-technol Eq* 23:1310–2818
- [83] Berkov, S., Pavlov, A., Georgiev, V., Bastida, J., Burrus, M., Ilieva, M., Codina, C. (2009b) Alkaloid synthesis and accumulation in *Leucojum aestivum* in vitro cultures. *Nat Prod Commun* 4(3):359–364
- [84] Takayama S & Misawa M (1979). Differentiation in *Lilium* bulb scales grown in vitro. Effect of various cultural conditions. *Physiol. Plant.* 46: 184–190
- [85] Georgiev, V., Berkov, S., Georgiev, M., Burrus, M., Codina, C., Bastida, J., et al. Optimized nutrient medium for galanthamine production in *Leucojum aestivum* L. in vitro shoot system. *Z Naturforsch C.* 2009; 64:219–24. [PubMed]
- [86] Selles, M., Viladomat, F., Bastida, J. & Codina, C. 1999. Callus induction, somatic embryogenesis and organogenesis in *Narcissus confusus*: correlation between the state of differentiation and the content of galanthamine and related alkaloids. *Plant Cell Reports*, 18, 646-651.
- [87] Codina, C. 2002. Production of galanthamine by *Narcissus* tissues in vitro. *Narcissus and Daffodil (The Genus Narcissus)*. Taylor & Francis London.
- [88] Sage, O.D., Lynn, J., Hammatt, N. (2000) Somatic embryogenesis in *Narcissus* cvs. Golden harvest and St. Keeverne. *Plant Sci* 150:209–216
- [89] Taleb, A. M. A., Hamed, E. R., Shimaa, A. Z. & Adel, B. 2013. Enhancement of alkaloids production in tissue culture of *Narcissus tazetta* var. *italicus* I: Effect of growth regulators and fungal elicitors. *Journal of Agricultural Technology*, 9, 503-514
- [90] Ptak, A., et al. "Effects of ethylene on somatic embryogenesis and galanthamine content in *Leucojum aestivum* L. cultures." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 102.1 (2010): 61-67.
- [91] George, E. F., Hall, M. A. & De Klerk, G.-J. 2008. Plant growth regulators I: introduction; auxins, their analogues and inhibitors. *Plant propagation by tissue culture*. Springer.

- [92] George, E. F., Hall, M. A. & De Klerk, G.-J. 2008. Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. Plant propagation by tissue culture. Springer.
- [93] Ellis BE, Towers GH. Biogenesis of rosmarinic acid in *Mentha*. *Biochem J.* 1970;118:291–7.[PMC free article] [PubMed]
- [94] Gaviraj, E.N., Veerasham, C. Effect of precursors and organic compounds on alkaloid production in transformed root cultures of *Catharanthus roseus* var. nirmal. *Pharmaceut Biol.* 2006; 44:371–7.
- [95] Bergoñón, S., Codina, C., Bastida, J., Viladomat, F. & Melé, E. 1996. Galanthamine production in “shoot-clump” cultures of *Narcissus confusus* in liquid-shake medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 45, 191-199.
- [96] Takos, A. M. & Rook, F. 2013. Towards a molecular understanding of the biosynthesis of amaryllidaceae alkaloids in support of their expanding medical use. *International journal of molecular sciences*, 14, 11713-11741.
- [97] Kilgore, M. B. & Kutchan, T. M. 2016. The Amaryllidaceae alkaloids: biosynthesis and methods for enzyme discovery. *Phytochemistry Reviews*, 15, 317-337.
- [98] Tahchy, A. E., Boisbrun, M., Ptak, A., Dupire, F., Chrétien, F., Henry, M., Chapleur, Y. & Laurain-Mattar, D. 2010. New method for the study of Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis using biotransformation of deuterium-labeled precursor in tissue cultures. *Acta Biochimica Polonica*, 57, 75-82.
- [99] El Tahchy, A., Ptak, A., Boisbrun, M., Barre, E., Guillou, C., Dupire, F. O., Chrétien, F. O., Henry, M., Chapleur, Y. & Laurain-Mattar, D. 2011b. Kinetic study of the rearrangement of deuterium-labeled 4'-O-methylnorbelladine in *Leucojum aestivum* shoot cultures by mass spectrometry. Influence of precursor feeding on Amaryllidaceae alkaloid accumulation. *Journal of natural products*, 74, 2356-2361.
- [100] Saliba, S., Ptak, A. & Laurain-Mattar, D. 2015. 4'-O-Methylnorbelladine feeding enhances galanthamine and lycorine production by *Leucojum aestivum* L. shoot cultures. *Engineering in Life Sciences*, 15, 640-645.
- [101] Fratiglioni, L.; Q.I.U., C. Prevention of common neurodegenerative disorders in the elderly. *Experimental Gerontology*, v.44, p.46-50, 2009.
- [102] Heinrich, Michael, and Hooi Lee Teoh. "Galanthamine from snowdrop—the development of a modern drug against Alzheimer’s disease from local Caucasian knowledge." *Journal of ethnopharmacology* 92.2-3 (2004): 147-162
- [103] Arias, E., Alés, E., Gabilan, N. H., Cano-Abad, M. F., Villarroya, M., García, A. G., & López, M. G. (2004). Galantamine prevents apoptosis induced by β -amyloid and thapsigargin: involvement of nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, 46(1), 103-114.

- [104] Arias, E., Gallego-Sandín, S., Villarroja, M., García, A. G., & López, M. G. (2005). Unequal neuroprotection afforded by the acetylcholinesterase inhibitors galantamine, donepezil, and rivastigmine in SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of nicotinic receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 315(3), 1346-1353.
- [105] Raskind, M. A., Peskind, E. R., Truyen, L., Kershaw, P., & Damaraju, C. V. (2004). The cognitive benefits of galantamine are sustained for at least 36 months: a long-term extension trial. *Archives of neurology*, 61(2), 252-256.
- [106] Matharu, B., Gibson, G., Parsons, R., Huckerby, T. N., Moore, S. A., Cooper, L. J., ... & Austen, B. (2009). Galantamine inhibits β -amyloid aggregation and cytotoxicity. *Journal of the neurological sciences*, 280(1-2), 49-58.
- [107] Bhattacharya, S., Haertel, C., Maelicke, A., & Montag, D. (2014). Galantamine slows down plaque formation and behavioral decline in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *PloS one*, 9(2), e89454.
- [108] Kita, Y., Ago, Y., Higashino, K., Asada, K., Takano, E., Takuma, K., & Matsuda, T. (2014). Galantamine promotes adult hippocampal neurogenesis via M1 muscarinic and $\alpha 7$ nicotinic receptors in mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 17(12), 1957-1968.
- [109] Mewis, I., Smetanska, I. M., Müller, C. T. & Ulrichs, C. 2011. Specific polyphenolic compounds in cell culture of *Vitis vinifera* L. cv. Gamay Fréaux. *Applied biochemistry and biotechnology*, 164, 148-161.
- [110] Zhao, J., Davis, L. C. & Verpoorte, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 23, 283-333.
- [111] Mu, H. M., Wang, R., Li, X. D., Jiang, Y. M., Wang, C. Y., Quan, J. P., Peng, F. & Xia, B. 2009. Effect of abiotic and biotic elicitors on growth and alkaloid accumulation of *Lycoris chinensis* seedlings. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 64, 541-550.
- [112] Ivanov, I., Georgiev, V. & Pavlov, A. 2013. Elicitation of galanthamine biosynthesis by *Leucojum aestivum* liquid shoot cultures. *Journal of plant physiology*, 170, 1122-1129.
- [113] Pitta-Alvarez, S.I., Spollansky, T.C., Giulietti, A.M. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme Microb Tech* 2000; 26: 252-8
- [114] Gantet, P., Imbault, N., Thiersault, M., Doireau, P. Inhibition of alkaloid accumulation by 2,4-D in *Catharanthus roseus* cell suspension is overcome by methyl jasmonate. *Acta Bot Gall* 1997; 144: 501±8
- [115] Eichhorn, J., Takada, T., Kita, Y. & Zenk, M. H. 1998. Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloid galanthamine. *Phytochemistry*, 49, 1037-1047.

- [116] Bastida, J., Berkov, S., Torras, L., Pigni, N. B., De Andrade, J. P., Martínez, V., Codina, C. & Viladomat, F. 2011. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*, 3, 65-100.
- [117] Kilgore, M.B., Augustin, M.M., Starks, C.M. O'Neil-Johnson M, May GD, et al. (2014) Cloning and Characterization of a Norbelladine 49-O-Methyltransferase Involved in the Biosynthesis of the Alzheimer's Drug Galanthamine in *Narcissus* sp. aff. *pseudonarcissus*. *PLoS ONE* 9(7): e103223. doi:10.1371/journal.pone. 0103223
- [118] Kilgore, M. B., Augustin, M. M., May, G. D., Crow, J. A. & Kutchan, T. M. 2016a. CYP96T1 of *Narcissus* sp. aff. *pseudonarcissus* Catalyzes Formation of the Para-Para'CC Phenol Couple in the Amaryllidaceae Alkaloids. *Frontiers in plant science*, doi:10.3389/fpls.2016.00225
- [119] Kilgore, M. B., Holland, C. K., Jez, J. M. & Kutchan, T. M. 2016b. Identification of a Noroxomaritidine Reductase with Amaryllidaceae Alkaloid Biosynthesis Related Activities. *Journal of Biological Chemistry*, jbc. M116. 717827.
- [120] Goossens, A. & Rischer, H. 2007. Implementation of functional genomics for gene discovery in alkaloid producing plants. *Phytochemistry Reviews*, 6, 35-49.
- [121] Lansdown, RV 2014. *Leucojum aestivum*. IUCN Red List of Threatened Species 2014: e. T164488A45461549. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014.1.RLTS.T164488A45461549.en>. Downloaded on 04 October 2018.
- [122] Govaerts R. (ed). For a full list of reviewers see: <http://apps.kew.org/wcsp/compilersReviewers.do> (2018). WCSP: World Checklist of Selected Plant Families (version Aug 2017). In: Roskov Y., Ower G., Orrell T., Nicolson D., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., De Wever A., Nieukerken E. Van, Zarucchi J., Penev L., eds. (2018). *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life*, 24th September 2018. Digital resource at www.catalogueoflife.org/col. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-8858.
- [123] Crook, V., & Davis, A.P., 2011. *Galanthus nivalis*. IUCN Red List of Threatened Species 2011: e. T162168A5551773. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-1.RLTS.T162168A5551773.en>. Downloaded on 04 October 2018.
- [124] Davis, A. 2011. *Galanthus elwesii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011: eT164896A5935589. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011.1.RLTS.T164896A5935589.en>. Downloaded on 04 October 2018.
- [125] Santos-Gally R., Vargas P., Arroyo J. Insights into Neogene Mediterranean biogeography based on phylogenetic relationships of mountain and lowland lineages of *Narcissus* (Amaryllidaceae) *J. Biogeogr.* 2012;39:782–798.
- [126] Hanks, G.R. The Biology of *Narcissus*. In: Hanks G.R., editor. *Narcissus and Daffodil. The Genus Narcissus*. Taylor & Francis; London, UK: 2002. pp. 151–162.
- [127] Hanks, G.R. The Biology of *Narcissus*. In: Hanks G.R., editor. *Narcissus and Daffodil. The Genus Narcissus*. Taylor & Francis; London, UK: 2002. pp. 35-50.

[128] Hanks, G.R. The Biology of *Narcissus*. In: Hanks G.R., editor. *Narcissus and Daffodil. The Genus Narcissus*. Taylor & Francis; London, UK: 2002. pp. 258.