

Claudia Isabel Paola Hinojosa Chang

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

**Cultivo *in vitro* de *Artemisia annua* L.
para a produção de artemisinina**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Claudia Isabel Paola Hinojosa
Chang
e aprovada pela Comissão Julgadora.

5/3/96

Simone L. K. Shepherd

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
como pré-requisito para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Orientadora: Simone L. K. Shepherd

Campinas

1996

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

9613398

BC
MADA:
NICAMP
62 C
Ex.
BC/28403
667/96
☐ D ☒ X
R\$ 11,00
03/09/96

00091649-6

Campinas, 05 de março de 1996

Banca Examinadora

Titulares

Profª. Dra. Simone L. K. Shepherd (Orientadora)

Profª. Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder

Prof. Dr. Ladaslav Sodek

Simone L. K. Shepherd
Vera Lucia Garcia Rehder
Sodek

Suplente

Prof. Dr. Pedro Roberto Furlani

APROVADA

Aos meus queridos pais, Ramón e Lidia

Quando eu ando por aí e olho para as belezas grandes e pequenas da terra, minha alma fica agradecida. Consigo dançar e sorrir junto a sinfonia e mistérios dela. Penso então nos meus primeiros passos e descubro uma humilde mas sábia silhueta. Uma silhueta cuja alma foi sempre moradia de muitos jardins, céus, montanhas, rios e flores.

AGRADECIMENTOS

- À Prof^ª. Dra. Simone L. K. Shepherd pela orientação e amizade durante a realização desta pesquisa.
- À CAPES pela bolsa recebida, a qual me permitiu completar o programa de mestrado e realizar esta tese.
- À Sub-Comissão de Pós-Graduação do Curso de Biologia Vegetal e a Comissão de Pós-Graduação do Instituto de Biologia pelo auxílio recebido durante o curso de mestrado.
- À Direção do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - CPQBA e em especial ao Sr. Pedro M. Magalhães, pelo apoio e pela valiosa oportunidade de desenvolver a parte experimental do meu trabalho no laboratório de cultura de tecidos.
- Aos amigos do CPQBA, Dra. Vera Lúcia Redher, Marta Ricoy Leite, Ana Paula Pelegrine, Kátia Calago e Benício Pereira pelo constante incentivo que me foi dado durante o desenvolvimento da tese.
- E a todos aqueles, que de alguma forma colaboraram com este trabalho.

ÍNDICE

	Págs.
Lista de tabelas	i
Lista de figuras	iii
Abreviaturas	v
Resumo	vi
1. Introdução	01
2. Objetivos	03
3. Revisão Bibliografica	04
3.1 Aspecto históricos da malária e seu controle	04
3.1.2 O Ciclo da doença	04
3.1.3 A procura de medicamentos antimaláricos naturais	09
3.1.4 A procura de novas armas para combater a malária	12
3.2 Produção <i>in vitro</i> de metabólitos secundários	13
3.2.1 Otimização de meios de cultura	18
3.2.2 Efeito dos nutrientes na produção de metabólitos	19
3.2.3 Efeito dos fitoreguladores de crescimento na síntese de metabólitos	20
3.3 Descrição do material vegetal	22
3.3.1 Cultura de <i>A. annua in vitro</i>	23
3.3.2 Artemisinina e outros compostos do gênero <i>Artemisia</i>	25
3.3.3 Biossíntese dos terpenos	28
3.3.4 Caminho biossintético da artemisinina	32
4. Materiais e Métodos	34
4.1 Origem do material vegetal	34
4.2 Obtenção de plântulas assépticas a partir de sementes	34
4.3 Fonte de explantes	35
4.3.1 Brotos axênicos	35
4.4.2 Plântulas	35
4.4 Meios de cultura	35
4.4.1 Cultura de brotos	35

4.4.2	Cultivo <i>in vitro</i> e produção de artemisinina	36
4.4.3	Cultivo <i>in vitro</i> em meio White acrescido do retardante de crescimento (CCC)	36
4.5	Condições de cultivo	36
4.6	Características avaliadas	36
4.7	Extração e determinação de artemisinina	37
4.7.1	Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	37
4.8	Análise estatística	37
5.	Resultados e Discussões	41
5.1	Cultura de brotos	41
5.2	Cultivo <i>in vitro</i> e produção de artemisinina	46
5.3	Cultivo <i>in vitro</i> em meio White acrescido do retardante de crescimento (CCC)	65
5.	Conclusões	85
7.	Literatura citada	86
8.	Apêndice	94

Lista de Tabelas

Págs.

1.	Algumas espécies de plantas utilizadas popularmente no tratamento da malária	10
2.	Espécies vegetais citadas popularmente na Amazônia como antimaláricas	10
3.	Alguns exemplos de metabólitos secundários provenientes de cultura de tecidos	16
4.	Influência de alguns fitoreguladores de crescimento na biossíntese de vários metabólitos secundários em diferentes tipos de cultura	21
5.	Classificação dos terpenóides	31
6.	Composição modificada dos meios White, Murashige & Skoog e Gamborg <i>et al.</i> (B ₅)	38
7.	Efeito da concentração dos macronutrientes do meio MS e da concentração de GA ₃ avaliada através da altura (cm) dos brotos de <i>A. annua</i> . Avaliação após 14 dias de cultivo	43
8.	Efeito da concentração dos macronutrientes do meio MS e da concentração de GA ₃ em relação a massa fresca dos brotos de <i>A. annua</i> . Avaliação após 14 dias de cultivo	44
9.	Efeito da concentração dos macronutrientes do meio MS e da concentração de GA ₃ em relação a massa fresca dos brotos de <i>A. annua</i> . Avaliação após 14 dias de cultivo	45
10.	Efeito dos meios Murashige & Skoog (MS), Gamborg (B ₅), White (W) e dos fitoreguladores no número de brotos por plântula de <i>A. annua</i> . Avaliação após 28 dias de cultivo	51
11.	Efeito dos meios de cultura suplementados com GA ₃ no teor de artemisinina (em %) na parte aérea. Avaliação após 28 dias de cultivo	56
12.	Efeito dos meios de cultura suplementados com GA ₃ no teor de ácido artemisinínico na parte aérea. Avaliação após 28 dias de cultivo	57
13.	Efeito dos meios de cultura suplementados com GA ₃ no teor de ácido artemisinínico nas raízes destacadas de <i>A. annua</i> . Avaliação após 28 dias de cultivo	58

14. Efeito dos meios de cultura suplementados com GA ₃ no teor de artemisinina na parte aérea. Avaliação após 14 dias de cultivo	66
15. Efeito dos meios de cultura suplementados com GA ₃ no teor de ácido artemisinínico na parte aérea. Avaliação após 14 dias	67
16. Efeito dos meios de cultura suplementados com GA ₃ no teor de ácido artemisinínico nas raízes destacadas. Avaliação após 14 dias	68
17. Teores de artemisinina expressos em porcentagens em relação a massa seca da parte aérea. Plântulas de <i>A. annua</i> cultivadas em meio com redução do nível de fosfato e na presença de CCC. Avaliação após 28 dias de cultivo	74
18. Teores de ácido artemisinínico expressos em porcentagens em relação a massa seca da parte aérea. Plântulas de <i>A. annua</i> cultivadas em meio com redução do nível de fosfato e na presença de CCC. Avaliação após 28 dias de cultivo	75
19. Teores de ácido artemisinínico expressos em porcentagens em relação a massa das raízes destacadas das plântulas de <i>A. annua</i> , cultivadas em meio com redução do nível de fosfato e na presença de CCC. Avaliação após 28 dias de cultivo	76
20. Influência da concentração de nitrato no meio White em presença de CCC nos teores de artemisinina (%) da parte aérea. Avaliação após 28 dias de cultivo	82
21. Influência da concentração de nitrato no meio White em presença de CCC nos teores de ácido artemisinínico (%) da parte aérea. Avaliação após 28 dias de cultivo	83
22. Influência da concentração de nitrato no meio White em presença de CCC nos teores de ácido artemisinínico nas raízes destacadas. Avaliação após 28 dias de cultivo	84

Lista de figuras	Págs.
1. O ciclo biológico da malária	06
2. Estruturas químicas de alguns compostos produzidos somente por cultura de tecidos	17
3. Estruturas químicas de substâncias isoladas de <i>Artemisia annua</i>	27
4. Biossíntese dos terpenos	30
5. Biossínteses dos sesquiterpenos e artemisinina em particular	33
6a. Material vegetal <i>in vivo</i> (no campo), selecionado e cultivado no CPQBA/UNICAMP	42
6b. Aspecto do cultivo <i>in vitro</i> por 14 dias dos brotos de <i>A. annua</i> em meio Murashige & Skoog	42
7. Plântula de <i>A. annua</i> cultivada no CPQBA/UNICAMP a partir de sementes da Suíça	49
8. Efeito dos meios Murashige & Skoog (MS), Gamborg (B ₅), White (W) e dos fitoreguladores no crescimento em altura (cm) das plântulas de <i>A. annua</i> . Avaliação após 28 dias de cultivo	50
9. Efeito dos meios Murashige & Skoog (MS), Gamborg (B ₅), White (W) e dos fitoreguladores na massa fresca e massa seca da parte aérea. Avaliação após 28 dias de cultivo	52
10. Efeito dos meios Murashige & Skoog (MS), Gamborg (B ₅), White (W) e dos fitoreguladores na massa fresca e massa seca das raízes destacadas de <i>A. annua</i> . Avaliação após 28 dias de cultivo	53
11. Cromatograma (CCD) de extratos brutos de plântulas e raízes de <i>A. annua</i>	55
12. Efeito dos meios Murashige & Skoog (MS), Gamborg (B ₅), White (W) e dos fitoreguladores no crescimento em altura (cm) das plântulas de <i>A. annua</i> . Avaliação após 14 dias de cultivo	60
13. Efeito dos meios de cultura e dos fitoreguladores no número de brotos por plântula de <i>A. annua</i> . Avaliação após 14 dias de cultivo	61

14. Efeito dos meios Murashige & Skoog (MS), Gamborg (B₅), White (W) e dos fitoreguladores na massa fresca e massa seca da parte aérea. Avaliação após 14 dias de cultivo 62
15. Efeito dos meios Murashige & Skoog, Gamborg, White e dos fitoreguladores na massa fresca e massa seca das raízes destacadas de *A. annua*. Avaliação após 14 dias de cultivo 63
16. Efeito dos níveis de fosfato do meio de composição de White em presença de CCC no crescimento das plântulas de *A. annua*. Avaliação após 28 dias de cultivo 71
17. Efeito dos níveis de fosfato do meio de composição de White em presença de CCC na massa fresca e massa seca da parte aérea de *A. annua*. Avaliação após 28 dias de cultivo 72
18. Efeito dos níveis de fosfato do meio de composição de White em presença de CCC na massa fresca e massa seca das raízes destacadas de *A. annua*. Avaliação após 28 dias 73
19. Efeito dos níveis de nitrato do meio W em presença de CCC no crescimento das plântulas de *A. annua*. Avaliação após 28 dias de cultivo 77
20. Efeito dos níveis de nitrato no meio de composição de White em presença de CCC na massa fresca e massa seca da parte aérea. Avaliação após 28 dias de cultivo 78
21. Efeito dos níveis de nitrato no meio de composição de White em presença de CCC na massa fresca e massa seca das raízes destacadas de *A. annua*. Avaliação após 28 dias de cultivo 81

ABREVIATURAS

CCC	- Cloroeto de 2-clorotiltrimetilamônio
AIA	- Ácido 3-idolilacético
ANA	- Ácido naftalenoacético
AIB	- Ácido indolilbutírico
2,4-D	- Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
BA	- 6-Benzilaminopurina
GA ₃	- Ácido giberélico
CCD	- Cromatografia em camada delgada
MS	- Murashige & Skoog (1962)
B ₅	- Gamborg <i>et al.</i> (1968)
W	- White (1943)
CPQBA	- Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - UNICAMP

Resumo

A malária, um dos maiores problemas de saúde pública dos países tropicais, vem sendo combatida através de medicamentos sintéticos como a cloroquina e derivados, os quais apresentam sérios efeitos colaterais e cuja eficácia é afetada principalmente pela resistência do agente causador da malária a estes medicamentos. Um extrato vegetal de *Artemisia annua*, contendo artemisinina vem sendo utilizado à milhares de anos na China e tem-se mostrado eficaz no combate às febres, entre elas a malária.

A influência da concentração dos nutrientes dos meios padrão Murashige & Skoog (1962), Gamborg *et al* (1968) e White (1943), adicionados de fitoreguladores (GA_3 e AIA), na produção de artemisinina e do seu precursor, o ácido artemisinínico foi observada através dos estudos de cultivo *in vitro* de *Artemisia annua* L. Os cultivos *in vitro* das plântulas foram realizados em períodos de 14 e 28 dias.

Os experimentos mostraram que dentre os meios padrões utilizados, o meio White (com nutrientes em menor concentração) promoveu um maior efeito tanto no crescimento das plântulas, como na produção de artemisinina. Para otimizar a produção *in vitro* de artemisinina e do ácido artemisinínico, ao meio de White foi adicionado o retardante de crescimento (CCC) e foram reduzidos os níveis de fosfato e nitrato das concentrações originais do meio, constatando-se que não afetaram significativamente o teor de artemisinina. Já a diminuição pela metade da concentração original de nitrato do meio White aumentou significativamente a produção de ácido artemisinínico na parte aérea. A adição do retardante CCC (com o ótimo da concentração de 150 mg/l) no meio padrão de White aumentou significativamente a produção do ácido artemisinínico, notadamente na parte aérea.

Assim, o estudo da composição nutricional do cultivo *in vitro* permite uma otimização da produção de artemisinina e do respectivo precursor, visando a obtenção de um medicamento antimalárico, oferecendo pois, uma importante perspectiva para a indústria farmacêutica, já que a síntese química de artemisinina até hoje, tem-se mostrado técnica e economicamente inviável.

SUMMARY

Malaria, one of the major public health problems in tropical countries, has been counteracted by synthetic drugs such as chloroquine and their derivatives, presenting serious side effects. In addition their efficacy is affected mainly by the resistance of the malaria causing agent to these drugs. A plant extract from *Artemisia annua*, containing artemisinin, has been used for millenium in China, showing great efficacy against fevers including malaria.

The influence of the nutrient concentrations in the standard basal media of Murashige & Skoog (1962), Gamborg *et al.* (1968) and White (1943), supplemented with growth regulators GA₃ and IAA on the production of artemisinin and its precursor artemisinic acid, was observed using an *in vitro* culture of *Artemisia annua* L.

The experiments showed that of the different media tested, White's medium (with lower nutrient concentrations) better enhanced the growth of seedlings and artemisinin production. In order to optimize the *in vitro* production of artemisinin and artemisinic acid, White's medium was supplemented with a growth retardant (CCC) and the phosphate and nitrate levels reduced, it being shown that this did not affect the artemisinin content significantly.

A fifty percent reduction in the initial nitrate content of White's medium significantly increased the artemisinic acid production in the aerial part. The addition of CCC (optimal concentration of 150 mg/l) to White's basal medium significantly increased artemisinic acid production, especially in the aerial part.

Thus the study of the nutritional composition of an *in vitro* culture allowed optimization of the production of artemisinin and its precursor, with the objective of obtaining an antimalarial drug, offering a valuable perspective for the pharmaceutical industry, since nowadays the chemical synthesis of artemisinin is technically and economically inviable.

I. INTRODUÇÃO

A malária é um dos maiores problemas de saúde pública que afetam os países tropicais. De acordo com as estimativas da Organização Mundial de Saúde, ocorrem ao nível mundial, de 210 a 220 milhões de casos de malária aguda e crônica por ano, dos quais aproximadamente 85% são causados pelo parasita *Plasmodium falciparum* (LUO and SHEN, 1987 apud WOERDENBAG *et al.* 1990). No Brasil, a malária ocorre principalmente nos estados de Rondônia, Pará, Mato Grosso e Amazônia, afetando por volta de 500 mil pessoas por ano (PEÑA, 1991; BOULOS, 1995).

Desde os primórdios da humanidade numerosas estratégias e tecnologias medicinais têm sido utilizadas para combater a malária., sendo que, desde essas épocas, os extratos de plantas vêm sendo utilizado como a base principal dos medicamentos para tratar as pessoas afetadas por esta doença. Entre estes extratos, destacam-se o de *Cinchona* (quinina) que foi utilizado em grande escala no Ocidente e o extrato de artemisinina ("qinghaosu") amplamente empregado no Oriente (JOHNSON, 1993).

Medicamentos obtidos através de síntese química como a cloroquina e seus derivados, os quais passaram a serem utilizados a nível mundial na década dos 40, apresentam, porém, uma sensível desvantagem por terem efeitos colaterais e principalmente a crescente resistência adquirida pelo agente causador da malária a estes medicamentos (OLIWENSTEIN, 1993; COWLEY *et al.* 1992).

Mais recentemente na década dos 80, diversos órgãos de saúde e a indústria farmacêutica de numerosos países, na busca de novos medicamentos antimaláricos tem concentrado seus esforços de pesquisa em dois caminhos principais: o desenvolvimento de uma vacina eficaz que fortaleça o sistema imunológico das pessoas, a síntese química de novos compostos, entre eles da artemisinina, que é um medicamento reconhecidamente eficaz contra o *P. falciparum* e que não apresenta os efeitos colaterais pelos derivados da cloroquina (OLIVEIRA e STRAUSS, 1993).

Entretanto, a complexidade estrutural da molécula de artemisinina, um sesquiterpeno lactônico, tem inviabilizado até hoje, econômica e tecnicamente a síntese química deste metabólito (ENDRESS, 1994)

Por outro lado, a *Artemisia annua*, planta que produz artemisinina, apresenta uma complexa variação na produção deste metabólito. Esta variação é influenciada por numerosos

fatores, como a procedência da planta, as condições do clima, características do solo e seus aspectos nutricionais (DELABYS, 1992).

Para superar os problemas da complexa variação na produção de metabólitos de interesse farmacêutico e industrial, os pesquisadores tem encontrado na biotecnologia uma valiosa ferramenta para desenvolver suas pesquisas.

Assim, dentro desta estratégia de pesquisa a cultura de tecidos incluindo a micropropagação, cultura de células, raízes transformadas e mais recentemente cultivo de células transgênicas vêm sendo intensamente utilizadas nos laboratórios privados e públicos, que investigam e produzem remédios a partir de plantas medicinais (CONSTABEL, 1990).

A cultura de tecidos aplicável a produção de metabólitos secundários, oferece perspectivas para a produção em escala industrial de algumas substâncias naturais de difícil obtenção por extração ou por síntese química, ou ainda, a possível redução a longo prazo dos custos de produção de algumas substâncias medicinais (ROBERT *et al.* 1991). Para tal, a produção de metabólitos pode também ser realizada através de cultura de células em suspensão, onde pode-se provocar algum tipo de estresse, seja nutricional, hormonal ou de fatores como pH, luz, temperatura e outros.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo estudar a influência da composição nutricional dos meios Murashige & Skoog, Gamborg e White suplementados como fitoreguladores no cultivo *in vitro* de *Artemisia annua*, procurando também identificar aqueles que pudessem influenciar significativamente na produção de artemisinina e o ácido artemisinínico. Além disso, estudou-se os efeitos da redução de fosfato e nitrato do meio White e da adição do retardante de crescimento-cloreto de 2-clorotiltrimetilamônio (CCC) na produção de artemisinina e do seu precursor.

3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 ASPECTOS HISTÓRICOS DA MALÁRIA E SEU CONTROLE

Acredita-se que a malária vem afetando a espécie humana há milhares de anos infectando inicialmente o *Homo erectus* nas selvas do sudeste asiático e espalhando-se posteriormente pela África e Europa. Já no século 16 A.C., existem os primeiros registros dessa doença em certos papirus egípcios e admite-se por alguns cientistas, que as expedições de Colombo e outros navegantes trouxeram posteriormente a doença para a América.

Somente em 1880 o médico francês Charles Laveran descobriu um estranho microorganismo no sangue de pacientes infectados com a malária. Posteriormente, outros pesquisadores como o médico inglês Ronald Ross descobriram o ciclo completo da doença estabelecendo assim, a relação mosquito-parasita e a doença (KLAYMAN, 1989; COWLEY *et al.* 1992).

No Brasil, a malária continua sendo entre as doenças parasitárias uma das mais perniciosas e difundidas causando um elevado número de mortes. A nível mundial a malária atinge de 200 a 400 milhões de pessoas, matando a cada ano 2 a 3 milhões de pessoas, sendo na maioria crianças que quando infectadas perdem os anticorpos maternos ficando assim, desprotegidas. Além disso, a doença incapacita outros milhares de pessoas que vivem nas áreas endêmicas (NUSSENZWEIG and NUSSENZWEIG, 1985).

O *Plasmodium* parasita causador da malária possui um complexo ciclo evolutivo. A fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* é o único mosquito que lhe serve como hospedeiro, no qual se instala nas glândulas salivares deste inseto.

A transmissão da malária humana, conhecida também por "impaludismo", "febre palustre", "sezão" ou "maleita", se dá através da picada do mosquito do gênero *Anopheles*. No Brasil a malária é causada por três espécies de protozoários do gênero *Plasmodium* com diferentes ciclos de reprodução (BRANDÃO *et al.* 1991; REIS, 1992).

- *Plasmodium vivax* - responsável pela febre terçã benigna, com ciclo de 48 h;
- *Plasmodium falciparum* - responsável pela febre terçã maligna. É a forma mais grave da doença, pois causa a morte e apresenta um ciclo irregular de 36 a 48 h;
- *P. malariae* - responsável pela febre quartã benigna, com ciclo de 72 h;
- *P. ovale* - existe somente na África e na Ásia tropical, com ciclo de 48 h, causa também a febre terçã benigna.

3.1.2 O CICLO DA DOENÇA

O ciclo biológico esquematizado na FIGURA 1 ocorre em dois hospedeiros:

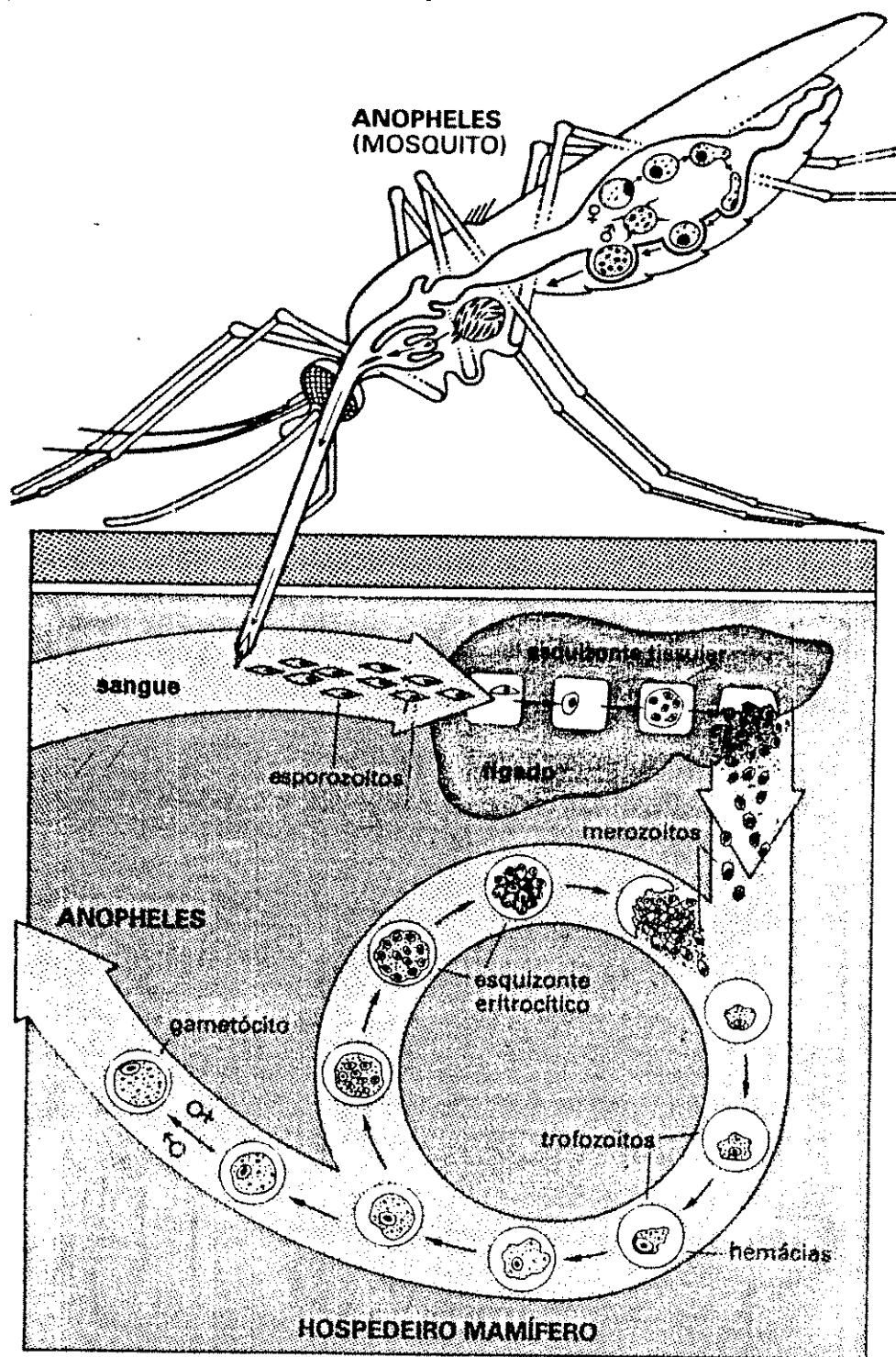
- Hospedeiro intermediário - é o homem e neste ciclo ocorre a reprodução assexuada do protozoário.
- Hospedeiro definitivo - é o mosquito e neste ciclo ocorre a reprodução sexuada.

Junto com a picada do mosquito, são injetados na corrente sanguínea da espécie atacada minúsculos esporozoítos. O animal atacado pode ser ou não ser susceptível, pois, cada tipo de *Plasmodium* necessita de um hospedeiro de espécie diferente. Assim, o parasita da malária do homem, das aves, dos roedores e dos macacos não são iguais entre si. (BRANDÃO *et al.* 1991).

Como mostra a FIGURA 1, os esporozoítos encontram as células do fígado, nas quais se instalam sem provocar sintomas da doença e se transformam em formas denominadas de exoeritrocíticas. No fígado, cada uma destas formas de exoeritrocíticas produz milhares de merozoítos (parasitas) que, após alguns dias, invadem a corrente sanguínea (NETO, 1993).

A partir daí, os parasitas invadem as hemáceas e convertem-se em trofozoítos. Estes por sua vez crescem dentro das hemáceas e convertem-se em esquizontes que, rompendo suas células hospedeiras, dão origem a novos merozoítos que vão parasitar outras hemáceas. Alguns merozoítos se transformam em gametócitos (masculinos e femininos), formas que são transferidas pelo mosquito ao picar o indivíduo, infectando-o, iniciando assim um novo ciclo biológico (NUSSENZWEIG and NUSSENZWEIG, 1985).

FIGURA 1: O ciclo biológico da malária



Fonte: NUSSENZWEIG and NUSSENZWEIG, 1985.

Em relação as medidas adotadas pela humanidade no controle e combate da malária, sabe-se que no Oriente os chineses e os vietnamitas tem utilizado milenarmente o "qinghaosu", um extrato produzido das folhas de *Artemisia annua* para combater a malária e outras febres (JOHNSON, 1993).

No Ocidente, um dos primeiros remédios naturais para o tratamento da malária surgiu das matas da América do sul. No século 17, os jesuítas começaram a usar na Europa e na África, um preparado que aprenderam com os índios sul-americanos extraído da casca de *Cinchona*. Este extrato continha quinina natural que passou a ser o único medicamento disponível na época para combater a doença, sendo que o reconhecimento pelos médicos de seu efeito curativo, permitiu a rápida utilização deste remédio tanto na África como na Europa (KLAYMAN, 1985; RAMALHO, 1988; KLAYMAN, 1989).

Assim, durante muitos séculos, o combate da malária baseou-se unicamente na utilização de remédios naturais extraídos de plantas, sendo que a indústria farmacêutica começou intensamente a pesquisar no começo deste século um medicamento eficaz, que fosse produzido por síntese química. A descoberta foi conseguida na década de 40, fortemente acelerada pelas necessidades de proteção aos soldados na 2ª guerra mundial. Para tanto, em 1943, o exército americano introduziu pela primeira vez a cloroquina, droga produzida via sintética (COWLEY *et al.* 1992).

As principais medidas de controle da malária após a 2ª guerra mundial foram divididas em duas grandes áreas de combate. Em primeiro lugar, o tratamento quimioterápico dos pacientes com medicamentos específicos tais como cloroquina, quinino e em segundo, a aplicação intensiva intradomiciliar e ambiental de inseticidas residuais principalmente DDT para combater o mosquito (KLAYMAN, 1989; BRANDÃO *et al.* 1991; PEREIRA, 1993).

Contudo, apesar de todas essas medidas sanitárias, um dos principais problemas enfrentado no controle e no tratamento da doença é a crescente resistência do parasita aos medicamentos antimaláricos usuais e aos inseticidas (NETO, 1993).

Mais recentemente, em muitas pesquisas na área da quimioterapia experimental tem-se utilizado medicamentos derivados da síntese química e surpreendentemente tem-se observado também a retomada das pesquisas de produtos naturais com ênfase na abordagem etnofarmacológica (BRANDÃO, *et al.* 1991)

Por outro lado, em 1979 a estrutura química do composto denominado artemisinina foi determinada por cientistas chineses, após o composto ter sido isolado em 1971 das folhas de *Artemisia annua* (KLAYMAN, 1985). Este composto tem a grande virtude de ser pouco tóxico quando comparado com outros medicamentos químicos e tem sido usado com sucesso no Brasil.

Nos estados de Rondônia, Pará e no Mato Grosso vêm sendo usados nestes últimos anos dois tipos de medicamentos derivados da artemisinina, o artemeter e o artesunato (PEÑA, 1991).

Entretanto, devido a artemisinina ser insolúvel em água, tem-se estudado várias formas de administração aos pacientes através de comprimido, óleo, suspensão em óleo e suspensão aquosa para conseguir um maior efeito do composto. No tratamento da malária, a administração de artemisinina aos pacientes foi efetuada via injeção intramuscular e a rapidez da ação de cada formulação do composto contra o *P. vivax*, mostrou que a ordem de eficácia foi: comprimido > óleo > suspensão em óleo > suspensão aquosa (KLAYMAN, 1985).

Na utilização de artemeter e artesunato, conseguiu-se recuperar pacientes em 40 horas, diferindo sensivelmente dos remédios químicos tradicionais cloroquina, sulfas e quinino, os quais costumam surtir efeito em 98 horas. Além da demora em combater a doença, os remédios sintéticos convencionais enfrentam um outro problema - a resistência imunológica do *Plasmodium* a esses medicamentos. Assim, visando superar o problema da resistência, o combate quimioterápico da doença é combinado com transfusões de sangue, o que causa um risco aos pacientes de contrair outras doenças infecciosas (PEÑA, 1991).

Por outro lado, as drogas chinesas extraídas de *A. annua* apresentam uma importante vantagem adicional em relação aos medicamentos químicos, já que também são eficazes nos casos de reincidência da doença. Em pesquisas realizadas na China o artemeter e o artesunato provaram que apenas 5% dos pacientes tomaram a contrair a doença, enquanto que no Brasil, utilizando tratamento a base de quinina, cerca de 50% dos casos voltam a apresentar a doença (PEÑA, 1991).

Na busca de medicamentos contra a malária no Brasil, estão sendo desenvolvidas importantes experiências no Instituto de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, empregando duas drogas, a mefloquina e o artesunato. Estas duas drogas, tanto associadas como na forma isolada, tem apresentado 100% de eficiência no tratamento de pacientes de malária no município de Itaibuna em Belém-PA. Esta cidade, que abriga um centro de garimpeiros é um dos municípios com maior incidência da doença na região Amazônica, região esta onde ocorre 99% dos 600 mil casos de malária registrados anualmente no país (GONDIN, 1994).

Pesquisas semelhantes estão sendo realizadas também em outros países da Ásia e da África, que como se sabe, são lugares onde a doença também apresenta alta incidência. Porém, nestes países não se encontrou a mesma eficácia com o uso isolado das drogas (GONDIN, 1994).

3.1.3 A PROCURA DE MEDICAMENTOS ANTIMALÁRICOS NATURAIS

Numerosas pesquisas vêm sendo realizadas nos órgãos de Saúde de diferentes países, para estudar outras plantas além da *A. annua* visando determinar os seus componentes ativos e avaliar sua eficácia terapêutica como antimaláricos.

Os trabalhos de BRANDÃO *et al.* (1985), vêm estudando a quimioterapia experimental antimalárica com extratos obtidos de várias plantas coletadas na região sudeste do Brasil. Como também, vem sendo realizado um vasto levantamento botânico bibliográfico de espécies vegetais brasileiras, que são usadas pelas populações locais contra a malária.

BRANDÃO *et al.* (1985), pesquisaram um total de 148 diferentes espécies de plantas brasileiras pertencentes a 33 famílias. A maioria delas foi testada na forma de extrato bruto, aplicado experimentalmente em camundongos inoculados com as formas eritrocitárias do *Plasmodium berghei*. Na dose de 100 mg/Kg, todos os extratos se mostraram inativos, inclusive o da cerveja-de índio (*Ampelozizyphus amazonicus* Ducke, Rhamnaceae), vegetal muito utilizado pelas populações da Amazônia como poderoso antimalárico.

Entretanto, considerando-se que em geral os princípios ativos das plantas ocorrem em concentrações extremamente baixas nos extratos brutos, segundo BRANDÃO *et al.* (1985) é interessante a utilização de doses mais elevadas nos testes antiparasitários em geral. Porém, para que isso ocorra é importante a determinação prévia da dose letal dos produtos, antes mesmo da utilização dos extratos nos testes antimaláricos ou antiparasitários.

Através do levantamento bibliográfico realizado pelo Centro de Desenvolvimento e Planejamento Regional-CEDEPLAR da Universidade Federal de Minas Gerais, junto à população do Pará e da Rondônia, foi feita uma avaliação químico-farmacológica de numerosas plantas que as populações dessas regiões atribuem propriedades antimaláricas. Neste levantamento, um total de 42 espécies, distribuídas em 23 famílias botânicas, foram indicadas como úteis para o tratamento dessa doença (BRANDÃO *et al.* 1991).

TABELA 1: Algumas espécies de plantas utilizadas popularmente no tratamento da malária

Família	Espécie	Nome popular
Apocinaceae	<i>Aspidospermum nitidum</i> Benth	Carapanatiba
	<i>Geissospermum sericeum</i> Benth	Quina
Bixaceae	<i>Bixa orellana</i> L.	Urucum
	<i>Acanthospermum australe</i> (Lof.) Kuntze	Carrapicho
Composita	<i>Artemisia</i> sp	Losna/ <i>Artemisia</i>
Cucurbitaceae	<i>Momordica charantia</i> L.	Melão de São Caetano
Gentianaceae	<i>Tachia guianensis</i> Aubl.	Caferana
Lecytidaceae	<i>Bertholletia excelsa</i>	Castanheira
Leguminosa	<i>Senna alata</i> (L.) Roxb.	Mata-pasto
Subfamília	<i>Senna occidentalis</i> (L.) H.	Fedegoso
Caesalpinioidae		
Nictaginaceae	<i>Boerhavia hirsuta</i> Willt	Pega-pinto
Rubiaceae	<i>Coutarea hexandra</i> (Jacq.) Schum	Quina-quina
Solanaceae	<i>Solanum</i> sp	Jurubeba

Fonte: BRANDÃO *et al.* 1991.

As amostras das plantas relacionadas na TABELA 2, foram coletadas visando a preparação de extratos brutos aquosos, os quais também foram testados como antimaláricos em camundongos, infectados com *P. berghei*. Porém, dos 9 extratos testados, somente 2 tiveram atividade antimalárica confirmada. Segundo, BRANDÃO *et al.* (1991), estes resultados destaca a importância de uma abordagem etnofarmacológica na pesquisa de novos antimaláricos a partir de produtos naturais.

TABELA 2: Espécies vegetais citadas popularmente na Amazônia como antimaláricas.

Espécie	Parte usada (origem)	Atividade antimalárica em laboratório
<i>Acanthospermum australe</i>	folhas, toda (nativa)	Ativa
<i>Aspidospermum nitidum</i>	casca (nativa)	Inativa
<i>Bertholletia excelsa</i>	casca (nativa)	Inativa
<i>Boerhavia hirsuta</i>	toda (nativa)	Inativa
<i>Coutarea hexandra</i>	casca (nativa)	Inativa
<i>Geissospermum sericeum</i>	casca (nativa)	Inativa
<i>Momordica charantia</i>	toda (nativa/cultivada)	Inativa
<i>Senna occidentalis</i>	raiz (nativa/cultivada)	Inativa
<i>Tachia guianensis</i>	casca (nativa)	Ativa

Fonte: BRANDÃO *et al.* 1991

Entretanto, a procura de novos fármacos, também vem sendo pesquisada pela equipe do professor Jairo Kenupp Bastos, da Faculdade de Ciências farmacêuticas-USP, no qual vem trabalhando com extrato de folhas de *Zanthoxylum naranjillo* (Mamica de porca). Esta planta é originária do Sul do país, sendo que os pesquisadores já conseguiram com a aplicação desse extrato, eliminar 98% dos plasmódios em ensaios de laboratório (OLIVEIRA e STRAUSS, 1993).

3.1.4 A PROCURA DE NOVAS ARMAS PARA COMBATER A MALÁRIA

Os cientistas tanto no Brasil como no exterior, vêm direcionando suas linhas de pesquisas na procura de novas armas contra a malária (OLIVEIRA e STRAUSS, 1993). Esses cientistas vêm trabalhando em 3 direções:

- Procuram desenvolver uma vacina eficaz contra a malária;
- Formular medicamentos químicos e naturais eficazes;
- Encontrar inseticidas biológicos, inofensivos ao meio ambiente, porém que sejam eficientes no combate ao *Anopheles*.

Em relação à estratégia de combater ao mosquito *Anopheles*, os pesquisadores do CENARGEM-EMBRAPA e da empresa Geratec de Cruz Alta, no Rio Grande do Sul, estão trabalhando na produção de um bioinseticida, cujo princípio é uma toxina produzida por uma bactéria (*Bacillus sphaericus*), a qual mata as larvas dos mosquitos *Culex*. O CENARGEM pesquisará essa mesma fórmula do bioinseticida no mosquito *Anopheles*.

Entretanto, a obtenção de uma vacina contra a malária tem sido um ideal almejado há bastante tempo, tanto por pesquisadores brasileiros em Nova York, Paris e outros Centros como por todos aqueles que se defrontam com endemias de proporções e efeitos tão devastadores (NUSSENZWEIG and NUSSENZWEIG, 1985; OLIVEIRA e STRAUSS, 1993; BOULOS, 1995).

Entre os diferentes grupos de cientistas que trabalham nesta linha de pesquisa, o médico colombiano Manuel Patarroyo foi quem obteve os melhores resultados. A vacina por ele obtida tem apresentado bons resultados em testes realizados na Colômbia e Venezuela. Porém esses resultados não foram tão bons quando a vacina foi empregada em regiões de mais alta endemicidade (BOULOS, 1995).

Segundo a Organização mundial da Saúde, há pelo menos outras 5 vacinas promissoras, prontas para testes em seres humanos e outras 20 em diferentes fases de estudo em laboratório (ANÔNIMO, 1994).

3.2 PRODUÇÃO *in vitro* DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os metabólitos secundários tem sido definidos no passado como compostos que não possuem função conhecida em relação a manutenção dos processos fisiológicos nas plantas e em outros organismos. Estes compostos são amplamente produzidos pelos microorganismos, pelas plantas superiores e tem despertado grande interesse do ponto de vista de sua função biológica, como também pelo seu potencial de aplicação como medicamentos (ROBERT *et al.* 1991)

Os metabólitos secundários, como são chamadas algumas das substâncias produzidas em pequenas quantidades e em condições especiais pelas plantas, constituem a maioria dos princípios ativos dos medicamentos (SHEPHERD, 1995).

Mais recentemente, ao estudar as diversas estratégias de sobrevivência das plantas, descobriu-se que os metabólitos secundários desempenham importantes funções protetoras contra predadores, facilitando a competição pelo habitat com outras plantas (CHEN *et al.* 1990) e atraindo polinizadores. Inclusive, acredita-se que talvez exerçam uma função de proteção contra os diferentes tipos de estresse sofrido durante o ciclo de vida das plantas (LOYO-VARGAS, 1985 apud ROBERT *et al.* 1991).

Por outro lado, certas evidências mostram que os metabólitos secundários encontram-se na planta sob uma forte regulação metabólica (REYES *et al.* 1985 apud ROBERT *et al.* 1991) e que sua síntese também é regulada por diversos fatores, tais como: luz (HAGIOMORI *et al.* 1982b, OHLSSON *et al.* 1983; SPRING *et al.* 1986), fitoreguladores de crescimentos (HAGIMORI *et al.* 1982a; OHLSSON, 1990), retardantes de crescimento e hormônios (KUDAKASSERIL *et al.* 1987; WOERDENBAG *et al.* 1993,) e temperatura (DICOSMO and TOWERS, 1984; ENDRESS, 1994). Isto sugere que de algum modo, os metabólitos secundários exercem uma função importante para superar qualquer tipo de estresse para que a espécie possa sobreviver (ROBERT *et al.* 1991). Outros pesquisadores sugerem ainda, que os metabólitos secundários poderiam ser o produto final de um processo biossintético aberrante e/ou produtos de excreção metabólica. Tais produtos se mantiveram ao longo da evolução devido a um gene especial para a sobrevivência da espécie (BELL, 1981, apud ROBERT *et al.* 1991).

Até o início deste século, quase todos os medicamentos usados pelo homem eram provenientes das plantas. Posteriormente, na década de 30 e 40 a síntese orgânica substituiu as plantas como fonte de matéria prima para extração dos princípios ativos, dando origem aos chamados medicamentos químicos. Entretanto, ainda se observa que existem muitas dificuldades no processo de síntese de princípios ativos de uso farmacêutico, como por exemplo, das piretrinas

(inseticidas naturais), o qual tem despertado novamente um grande interesse nas plantas como fonte de produtos naturais (ROBERT *et al.* 1991).

Mesmo com os medicamentos químicos, a fitoquímica continuou produzindo compostos importantes, tais como: glicosídeos (digitoxina e digoxina), extraídos de *Digitalis purpurea*, os quais são usados como cardiotônicos; saponina esteroideal (diosdenina), extraído da *Dioscorea compositae*, que serve de base para a produção de hormônios, hormônios estes que são usados no controle de natalidade ou ainda para sintetizar corticóides. Alcalóides derivados de plantas como vincoleucoblastina e vincristina compostos extraídos de *Cataharanthus roseus*, apresentam ainda grande interesse científico devido a sua atividade antitumoral como a leucemia infantil (STAFFORD, 1991; SHEPHERD, 1995).

Por outro lado, a utilização das plantas como "farmácias vivas" também apresenta sérios problemas que derivam do cultivo e da colheita. O fato da principal obtenção destas plantas continua a ser extrativista e sem controle, gera uma justificada preocupação em relação à extinção das espécies. Entre os diversos exemplos, podemos citar:

- Quinina - produto que se extrai da casca de *Chinchona officinalis* e *C. ledgeriana* (STAFFORD, 1991). Para sua obtenção são necessários 21 anos para que a planta alcance a idade adequada. Assim, há uma urgente necessidade de um programa de reflorestamento para não ocorrer a extinção da espécie (ROBERT *et al.* 1991)
- Taxol - é um diterpeno citotóxico inicialmente isolado do caule de *Taxus brevifolia* Nutt. (STAFFORD, 1992). Esta substância é um potente inibidor da replicação celular, bloqueando as células na fase G2/M no ciclo celular (HOROWITZ *et al.* 1986, apud WICKREMESINHE and ARTECA, 1993) e é altamente efetivo no tratamento de câncer ovariano e câncer mamário (STAFFORD, 1992; SHEPHERD, 1995). Assim, a utilização da técnica de cultura de tecidos e o uso do ^{14}C para o estudo da biossíntese do taxol, pode acelerar sensivelmente o período de reprodução da planta. Esta planta precisa no mínimo 12 anos para adquirir condições necessárias para ser transplantada no campo (BORMAN, 1991; STROBEL *et al.* 1993; WICKREMESINHE and ARTECA, 1993;).

Portanto, a biotecnologia constitui atualmente uma valiosa alternativa para a produção de compostos de uso farmacêutico, agrícola ou ainda industrial. Esta alternativa, pode amenizar os problemas de produção comercial por métodos convencionais (síntese química ou a extração de compostos), que podem resultar difíceis ou economicamente pouco viáveis. Pode ainda, possibilitar o aumento da produção dos princípios ativos nas plantas, através da manipulação das células ou ainda provocar de algum modo um tipo de estresse seja este nutricional, hormonal ou ainda por fatores como temperatura, pH, luz e outros que influenciam na formação destes princípios ativos.

De acordo com a definição de Grime (1981), estresse em plantas é um fenômeno fisiológico que pode limitar a taxa de produção de matéria seca na planta ou partes da vegetação. Entre os tipos de estresse podemos citar aqueles causados por: deficiência de água, luz, nutrição mineral e temperatura subótima. Esta deficiência pode ser uma característica própria do ambiente, ou pode ainda ser induzida ou intensificada pela vegetação (DICOSMO and TOWERS, 1984).

Assim, este conceito poderia ser aplicado para a cultura de células de plantas, onde existem muitos tipos de estresse, os quais podem reduzir a matéria seca das culturas e até alterar o metabolismo das células cultivadas em relação à produção de metabólitos. Este último tipo de estresse, normalmente resulta no "desligamento" da produção do metabólito secundário e sua produção pode ser novamente ativada através da manifestação dos níveis de nutrientes, fitoreguladores vegetais, intensidade e qualidade da luz, temperatura, pH ou ainda pela própria técnica de cultura de tecidos.

O interesse pela biossíntese de metabólitos secundários por cultura de tecidos de plantas tem progredido no mundo inteiro nestes últimos anos, devido basicamente à duas razões. A primeira é que a técnica de cultura de tecidos pode ser aplicada em muitas espécies de plantas e a segunda razão se deve ao potencial de alguns sistemas de cultura para a produção de medicamentos importantes. Estes sistemas podem agilizar alternativas comerciais na produção de algumas drogas (STAFFORD, 1991).

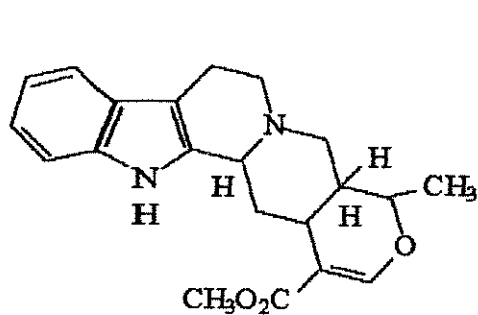
A TABELA 3 mostra alguns metabólitos secundários produzidos através da cultura de tecidos, sendo que novos compostos não detectados em plantas intactas, são produzidos apenas em cultura de células (FIGURA 2).

TABELA 3: Alguns exemplos de metabólitos secundários provenientes de cultura de tecidos.

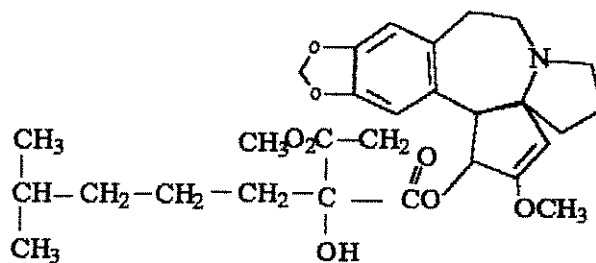
Classe Química	Produto	Espécies
Alcalóides	Atropina	<i>Atropa belladonna</i>
	Cafeína	<i>Camellia sinensis</i>
	Codeína	<i>Papaver somniferum</i>
	Harrigtoina	<i>Cephalotaxus harringtonia</i>
	Papaverina	<i>Papaver somniferum</i>
Esteróides	Colesterol	<i>Dioscorea deltoidea</i>
	Diosgenina	<i>Dioscorea deltoidea</i>
	Stigmasterol	<i>Brassica napus</i>
	Sitosterol	<i>Artemisia absinthium</i>
	Panaxadiol	<i>Panax ginseng</i>

Fonte: STAFFORD, 1991.

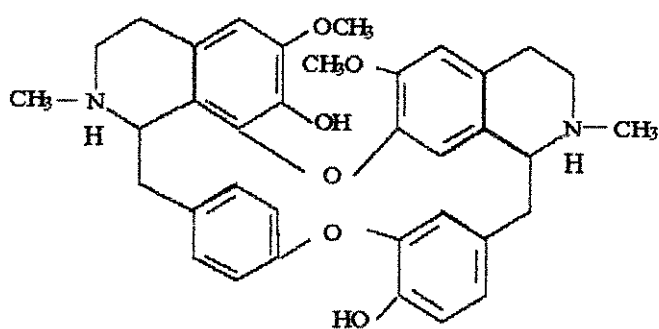
FÍGURA 2: Estruturas químicas de alguns compostos produzidos somente por cultura de tecidos



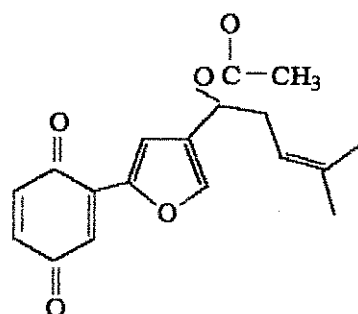
19, Epi-ajmalicina
em *C. roseus*



Homodeoxyharringtonina
em *Cephalotaxus harringtonia*



Aromolina em *Stephania cepharantha*



Echinofuran em *Echium lycopsis*

fonte: DICOSMO and TOWERS, 1984

3.2.1 OTIMIZAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

Uma das principais dificuldades do cultivo *in vitro* de células vegetais para a produção de metabólito em escala industrial é o ritmo de crescimento lento das células, exigindo um longo tempo de cultivo para a produção da biomassa (ROBERT *et al.* 1991).

Por outro lado, nos sistemas microbianos, o crescimento e a síntese de produtos secundários são processos mutuamente excluentes, sendo que algo similar parece acontecer ao sistema de cultivo de células vegetais, em que a acumulação dos metabólitos ocorre durante a fase estacionária. Este fenômeno foi observado em cultivos de *Gallium molugo* para a produção de antraquinona (WILSON *et al.* 1978).

Enquanto que, em outros cultivos, tais como em solanáceas para a produção de alcalóides tropanos um certo grau de desdiferenciação das células torna-se um pré-requisito importante (LINDSEY *et al.* 1983 b). Um outro exemplo ocorre com o cultivo de *Artemisia annua* L. onde também é exigido uma diferenciação completa como pré-requisito para a produção de artemisinina e/ou precursores deste metabólito (FULZELE *et al.* 1991).

Contudo, sabe-se que certas condições nutricionais ou físicas que restringem o crescimento, podem influenciar a síntese dos metabólitos secundários (LINDSEY *et al.* 1983 a e b; FOWLER, 1983). Por isso, há a necessidade de definir a relação entre a velocidade de produção da biomassa com a acumulação dos metabólitos. Alguns pesquisadores sugerem o cultivo em duas fases. A fase I - teria como objetivo a manutenção do material vegetal (crescimento rápido), enquanto que a fase II visaria a produção de produtos metabólitos, empregando diferentes tipos de meios de cultivos (ROBERT *et al.* 1991).

STAFFORD *et al.* (1985), consideram que essa separação entre o crescimento e o acúmulo de metabólitos, se deve as condições experimentais empregadas com as células, que encontram-se num mesmo estado fisiológico. Estes pesquisadores analisaram a produção de alcalóides em relação ao crescimento do cultivo de *C. roseus* provenientes de diferentes fases de crescimento. Quando cultivadas em condições idênticas, observaram que em todas as etapas do cultivo, a acumulação de serpentina era proporcional a acumulação de biomassa (ROBERT *et al.* 1991).

Portanto, pode-se inferir que os fatores físicos e químicos que são constituintes ou estão presentes no meio de cultivo, afetam de alguma forma a velocidade de crescimento e consequentemente a produção de metabólitos secundários. Assim, a seguir será abordado brevemente alguns desses fatores químicos.

3.2.2 EFEITO DOS NUTRIENTES NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Em geral, pelas raízes de plantas a absorção de nutrientes do solo é um fenômeno de grande complexidade que depende de numerosos fatores como a concentração e a forma química dos nutrientes, da difusão destes nutrientes e das taxas de absorção de água e nutrientes pelas raízes. Da mesma forma que as folhas absorvem carbono a partir de baixa concentração de CO_2 na atmosfera, as raízes devem absorver minerais essenciais também de baixa concentração no solo (SALISBURY and ROSS, 1992). O solo constitui um meio altamente complexo e heterogêneo, onde a planta deve se adaptar rapidamente para crescer e se desenvolver. As técnicas de cultura de tecidos visam simular as condições de cultivo no solo, sob condições controladas de concentração de nutrientes, temperatura e luz (ASHER and EDWARDS, 1983).

Sabe-se que a concentração de nutrientes no meio de cultivo tem influência direta sobre a velocidade de crescimento do material vegetal cultivado *in vitro*. Em geral concentrações elevadas de macronutrientes como nitrato, potássio, amônia e fosfato permitem e estimulam um crescimento acelerado, enquanto que a ausência destes limita ou até detém o crescimento, estimulando ao mesmo tempo o acúmulo de metabólitos (MANTELL and SMITH, 1983, ROBERT *et al.* 1991).

Por outro lado, a qualidade dos nutrientes presentes no meio de cultivo exerce também influência na produção de metabólitos específicos, por exemplo, em cultura de calos de *Portulaca grandiflora* o crescimento das células foi sustentado adequadamente pela composição do meio MS. Porém, a composição do meio White estimulou mais o acúmulo de betacianina nesta espécie (ENDRESS, 1994). Enquanto que, em cultivos de *C. roseus*, onde diversos meios de culturas podem sustentar adequadamente o crescimento das células, somente na composição do meio de MS, ocorreu um maior acúmulo de serpentina (alcalóide) nas células em suspensão (ZENK *et al.* 1977 apud ENDRESS, 1994).

Os meios padrões de cultivo de tecidos apresentam como fonte de nitrogênio em sua composição nutricional, as formas de nitrato e amônia. Entretanto, algumas culturas de células de plantas não podem tolerar excessivos níveis de amônia, presentes no meio de cultura, principalmente o meio padrão MS (DICOSMO and TOWERS, 1984).

Podemos citar entre os diversos efeitos na produção de metabólitos secundários, a influência da relação amônia : nitrato, a redução e/ou alteração dessa relação, ou ainda o uso de nitrato como única fonte de nitrogênio na síntese de fitoquímicos:

- produção alterada de ubiquinona em cultura em suspensão de *N. tabacum* quando a relação $\text{NH}_4 : \text{NO}_3$ foi alterada de 3:1 para 1:3 (IKEDA *et al.* 1976 apud DICOSMO and TOWERS, 1984).
- o aumento de quase 4 vezes do conteúdo de cafeína em cultura de *Camellia sinensis* em resposta à amônia (ZIELKE and FILNER, 1971 apud DICOSMO and TOWERS, 1984).
- células de rosa cresceram em meio com uma única fonte de nitrogênio (nitrato). Os níveis de amidas e a massa fresca foram aumentados (BRADFORD, 1982).

Quando aumenta-se a concentração de fosfato, prolonga-se a fase longa e exponencial do crescimento das células (MANTELL and SMITH, 1983). Em culturas de *C. roseus* estabelecidas por MacCARTHY *et al.* (1980), observaram que os aumentos dos níveis de fosfato e sacarose no meio, prolongaram a fase lag e exponencial do crescimento das células e aumentaram quase o dobro o rendimento da massa seca. Em presença de baixos níveis de fosfato ou ainda na ausência de fosfato no meio de cultura de calos de *Peganum harmala*, estimularam a formação de metabólitos, porém limitaram o crescimento e a morfologia dos calos (NETTLESHIP and SLAYTOR, 1974).

Segundo MANTELL and SMITH (1983), a biossíntese de nicotina em cultura de tabaco está associada com o esgotamento de fosfato no meio, bem como também ao esgotamento de outros nutrientes como nitrato e sacarose. Os resultados mostraram que a redução dos níveis iniciais de fosfato inorgânico em 50% e 10% dos níveis padrões (150 mg/l) induziram um aumento precoce da biossíntese de nicotina nas células.

3.2.3 EFEITO DOS FITOREGULADORES DE CRESCIMENTO NA SÍNTESE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os fitoreguladores de crescimento geralmente induzem a formação de metabólitos *in vitro* e *in vivo*. A concentração e a qualidade das auxinas presentes no início e durante o desenvolvimento do cultivo apresentaram um efeito marcante e variado sobre o metabolismo primário e secundário (ENDRESS, 1994; ROBERT *et al.* 1991). Tem-se verificado em diversos experimentos que elevados níveis de metabólitos em cultivo de células de plantas coincidem com a diferenciação ou organogênese (FULZELE *et al.* 1991).

Por essa razão, muitos estudos sobre metabólitos secundários têm sido realizados em cultivos de células de plantas, focando os efeitos da concentração e o tipo dos fitoreguladores de

crescimento. Os efeitos da indução ou inibição por fitoreguladores não são uniformes, pode ser vista na TABELA 4.

TABELA 4: Influência de alguns fitoreguladores de crescimento na biossíntese de metabólitos secundários em diferentes tipos de cultura.

Material vegetal	Metabólito Secundário	Aumento	Inibição
<i>Digitalis lanata</i>	Digitoxina	GA ₃	-
<i>Digitalis purpurea</i>	Digitoxina	ANA, AIA, 2,4-D, BA	-
<i>Daucus carota</i>	Flavonóides	-	GA ₃
<i>Datura tatula</i>	Alcalóides	-	KIN
<i>Cinchona pubescens</i>	Alcalóides	-	2,4-D+KIN, AIA
<i>Papaver bracteatum</i>	Tebaina	AIA	2,4-D, ANA
<i>Papaver somniferum</i>	Codeína	2,4-D	
<i>Nicotiana tabacum</i>	Nicotina	AIA, KIN	-
<i>Portulaca grandiflora</i>	Betacianina	GA ₃ , KIN	2,4-D, ANA
<i>Catharanthus roseus</i>	Alcalóides	AIA	-

Fonte: MANTELL and SMITH, 1983; DICOSMO and TOWERS, 1984; ENDRESS, 1994.

3.3 DESCRIÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Artemisia annua L. (Asteraceae) da tribo Anthemidae é nativa da Ásia, mais provavelmente da China. Ocorre naturalmente como parte da vegetação nativa na região norte da China numa altitude entre 1.000 a 1.500 m sobre o nível do mar. Cresce também em forma nativa em diversos países como a antiga Jugoslávia, Hungria (onde é cultivada para obtenção de óleo aromático), na Bulgária, Roménia, Turquia, Argentina, Itália, França e Espanha (FERREIRA, 1994).

Espécie herbácea, que varia entre 0,80 a 1,50 m de altura, ramos sulcados; folhas simples alternas, com pontuações glandulosas e pêlos esparsos em ambas as faces. Pecíolo em torno de 2,0 cm de comprimento, limbo com cerca de 5,0 a 9,0 cm de comprimento e 3,0 a 5,0 cm de largura; flores ordenadas em inflorescências axilares e terminais. As inflorescências são constituídas em racemo composto de capítulos, cada capítulo pedicelado com cerca de 2,5 mm de comprimento, constituídos de 8 a 10 flores femininas radiais e 13 a 23 flores hermafroditas no disco.

O fruto tipo aquênio, acastanhado, com cerca de 1,0 mm de comprimento, floresce e frutifica nos meses mais quentes do ano (FIGUEIRA, 1995).

Nas plantas da família Asteraceae são comumente encontrados os tricomas glandulares contendo terpenos e óleos voláteis, tendo despertado grande interesse para os estudos quimiotaxonômicos (LIERSCH *et al.* 1986; SPRING *et al.* 1986; FERREIRA, 1994).

No gênero *Artemisia*, os tricomas glandulares são os sítios de acumulação de diversos produtos metabólitos secundários (DUKE and PAUL, 1983), sendo que, em muitas espécies de *Artemisia* biosintetizam monoterpenos, sesquiterpenos lactônicos, flavonóides e cumarinas (KELSEY and SHAFIZADEH, 1980).

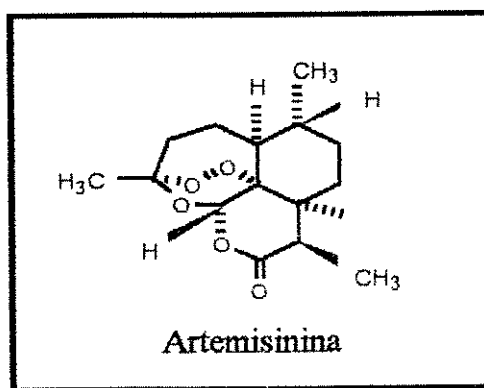
A. absinthium é uma espécie que mesmo não possuindo tricomas glandulares nas folhas cotiledonares, defende-se dos predadores através de uma estratégia baseada no número de aquênios produzidos por capítulos e a presença de compostos fenólicos (pêlos tectores) nos primórdios foliares (LIMA, 1983). Enquanto que, em *A. nova* e outras espécies de *Artemisia*, o sesquiterpeno lactônico e alguns monoterpenos se concentram nos tricomas glandulares na superfície das folhas, uma característica altamente evoluída (Prof. Antônio Salatino, comunicação pessoal). Consequentemente, os animais herbívoros ao consumirem as folhas rompem essa estrutura e, então, os metabólitos secundários ficam expostos provocando nestes animais efeitos fisiológicos geralmente tóxicos. Ou ainda, se as glândulas

permanecerem intactas quando as folhas morem e ao cair na superfície do solo podem promover um ambiente fitotóxico para a germinação das plântulas (KELSEY and SHAFIZADEHL, 1980).

CHEN and LEATHER (1990), relataram que artemisinina pode ser um fitotóxico não somente para plantas terrestre, mas também possui um efeito inibitório significante contra plantas aquáticas como *Lemna minor* e *L. oscura*. Além disso, o ácido artemisinínico e artenuina-B estimularam a formação de raízes em plantas de feijão.

3.3.1 CULTURA DE *A. annua* IN VITRO

Artemisinina, um sesquiterpeno lactônico, isolado da planta medicinal *Artemisia annua* L., é um potente composto antimalárico (ACTON and KLAYMAN, 1985; DELABYS *et al.* 1992).



Devido a seu potencial como medicamento, tem despertado grande interesse nos últimos anos o cultivo *in vitro* de células de plantas para a produção deste composto antimalárico.

Diversos pesquisadores (KOTHARI and CHANDRA, 1986; NAIR *et al.* 1986; SUMITA *et al.* 1988; BENJAMIN *et al.* 1990; ELHAG *et al.* 1991; LÊ and COLLET, 1991; WHIPKEY *et al.* 1992; PANIEGO and GIULIETTI, 1994) vêm tentando estabelecer protocolos para a cultura de células e a micropropagação de *A. annua* ou outras espécies de *Artemisia*, sendo que através da técnica *in vitro* bem dominada, pode-se selecionar clones, linhagens de células e aplicar as pesquisas bioquímicas e biotecnológicas.

A concentração media de artemisinina em plantas originária da Europa varia de 0.03 para 0.22% (massa seca de folhas) porém, clones de origem chinesa pode alcançar até 1.1%.

Trabalhos de genética clássica de cruzamentos tem sido realizados com plantas de *A. annua*, utilizando-se clones provenientes da China com pólen proveniente de plantas originárias da Itália, Iugoslávia e Espanha. Os híbridos assim obtidos e cultivados na Suíça produziram por volta de 0.64%, 0.73% e 0.95% de artemisinina, respectivamente conforme a origem do pólen (DELABYS et al. 1993).

Por outro lado, trabalhos têm sido realizados tanto com *A. annua* como *Tanacetum parthenium* (Asteraceae), ambas plantas medicinais, apresentam uma rica e variada gama de terpenóides. BROWN (1992), estabeleceu o cultivo *in vitro* de ambas espécies capazes de acumular princípios ativos, os sesquiterpenos. Embora a cultura dessas duas espécies tenha sido obtida sob uma variação hormonal e de regimes de fotoperíodo, os resultados iniciais de presença de artemisinina não foram satisfatórios. Entretanto, o mesmo autor observou a produção de isofraxidina (cumarina) para *T. parthenium*, enquanto que para *A. annua*, houve a produção de derivados de ácidos graxos e a presença de escopoletina.

Embora a síntese deste composto sesquiterpeno lactônico seja possível, ele ocorre em baixíssimo rendimento, o que torna a metodologia química impraticável. Somente sua extração a partir de plântulas de *A. annua* cultivadas, parece ser economicamente possível (DELABAYS, 1992).

Devido à variação do teor de artemisinina em plantas de diferentes procedências e como a síntese química deste composto ainda não é economicamente viável, procura-se agora direcionar as perspectivas para a seleção de linhagens de *A. annua* que apresentem um teor mais elevado de artemisinina (BRANDÃO et al. 1985; LIERSCH et al. 1986; SINGH et al. 1988; FULZELE et al. 1991; PRAS et al. 1991; ELHAG et al. 1992).

Consequentemente, mesmo que vários grupos de pesquisadores tenham diversificado suas linhas de pesquisas, todas estas levam a um objetivo comum, que é a procura pelo aumento do teor do metabólito de interesse através de aplicações de fitoreguladores de crescimento; de nutrientes no meio de cultura ou ainda pela utilização da técnica do cultivo de células em suspensão (WHIPKEY et al. 1992; WOERDENBAG et al. 1993; GIULIETTI, 1994).

A artemisinina é um composto derivado do ácido mevalônico via caminho do isopreno. Fitoreguladores de crescimento que exercem seu efeito ao nível do metabolismo da giberelina podem influenciar na produção de artemisinina na planta (ALKILA et al. 1987).

Contudo, a compreensão do modo de ação dos fitoreguladores de crescimento é limitada. Alguns pesquisadores sugerem que os retardantes de crescimento tais como fosfon D (WHIPKEY et al. 1992) e o cloreto de 2-clotiltrimetilamônio (LIERSCH et al. 1986;

RADEMACHER, 1991) interagem na biossíntese do ácido giberélico, aumentando a formação de terpenos, como por exemplo regulando no aumento do conteúdo de óleo essencial em *Mentha piperita* (EL-KELTAWI and CROTEAU, 1986).

Em outra abordagem, LIERSCH *et al.* (1986), propuseram-se verificar se o número de tricomas glandulares poderia ser um marcador morfológico correlacionado com as mudanças no rendimento de artemisinina. Outra abordagem seria se certos retardantes de crescimento como CCC e daminozide, afetariam o metabolismo secundário.

O CCC mostrou ser capaz de aumentar o teor de artemisinina para 30% ou até mais em relação as plantas não tratadas com este retardante de crescimento.

Sabe-se que vários fatores podem influenciar a produção e o teor de princípios ativos na planta, como por exemplo as condições climáticas, estágio de desenvolvimento da planta e a procedência desta planta. O efeito da temperatura no acúmulo de artemisinina foram estudados por SHUKLA *et al.* 1992. Quanto ao estágio de desenvolvimento da planta e a procedência, os pesquisadores tem constatado variações no teor de artemisinina, chegando a encontrar uma variação de 0.1 a 0.9% (SINGH *et al.* 1988; LIERSCH *et al.* 1986). Pequenos traços deste metabólito (0.08%) foram encontrados em espécies como *A. apiacea* de procedência da China, porém em *A. spee* (Kilimanjaro) e *A. capillares* (China e Japão) não foi detectada a presença deste metabólito.

Seguindo ainda nesta linha de pesquisa, a aplicação por pulverização com triacontanol (tria) nas concentrações de 1,0 a 1,5 mg/l produziram um efeito positivo e estatisticamente significativo no teor de artemisinina, bem como na altura da planta e no rendimento foliar. Portanto, o efeito do Tria na produção de artemisinina parece ser mediada através de seu efeito no crescimento da planta. Enquanto que, com a pulverização de CCC (1000 e 1500 mg/l) obsevou-se também um aumento no teor de artemisinina, porém constatou-se um decréscimo na altura da planta e um aumento no rendimento foliar em concentrações elevadas de CCC. SHUKLA *et al.* (1992), observaram também que o CCC aumentou o nível de ABA e reduziu o GA₃.

3.3.2 ARTEMISININA E OUTROS COMPOSTOS DO GÊNERO *Artemisia*

O gênero *Artemisia*, compreende mais de 100 espécies (BRUCE-CHWATT, 1982 apud WOERDENBAG *et al.* 1990). Algumas espécies são caracterizadas pela ocorrência de eudesmanolide e guaianolide altamente oxigenadas (lactonas sesquiterpênicas), enquanto

que outras contém principalmente cumarinas ou sesamina tipo liganas (HUNECK *et al.* 1986).

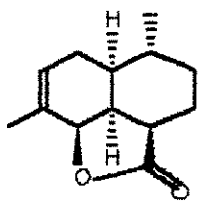
Outras lactonas sesquiterpênicas da *A. annua*, relacionadas com artemisinina (ZAMAN and SHARMA, 1991), são a artenuína-B, artenuína-C, artemisiteno e o sesquiterpeno, ácido artemisinínico (FIGURA 3). Terpenos citotóxicos e flavonóides, os quais foram testados *in vitro* em células tumorais de humanos, são encontrados na *A. annua*, como estigmasterol, fiedelina (triterpeno), artemetina, quarcetagetina (ZHENG, 1994).

Por outro lado, o grande número de espécies do gênero *Artemisia*, tem sido o objetivo de numerosos estudos químicos. Das partes aéreas de *A. feddei* (crescidas na China), onde isolou-se β -sitosterol, escopoletina, herniarina a partir da qual foi sintetizado um acelerador de crescimento das raízes de alface (TAM, JIA and ZHAO, 1992). Em espécies Iranianas como *A. turcomanica* Gand, foram encontrados óleo essencial, sendo que em *A. deserte* Krash isolou-se ergosterol, flavonóides como hispidulina, jaceosidina e eupalitina e monoterpenos como cânfora, borneol e piperitona (MARCO *et al.* 1993).

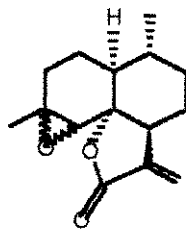
O óleo essencial de *A. annua* tem pouco valor em perfumaria e farmácia e apresenta atividade antifúngica. Em cultivos de *A. annua* no Vietnã, tiveram o máximo de conteúdo de óleo logo antes do florescimento e a composição deste óleo foi de 55% monoterpenos e 45% de sesquiterpenos (WOERDENBAG *et al.* 1994).

O conteúdo de artemisinina varia de acordo com o diferente estágio de desenvolvimento da planta, e a procedência da mesma (WOERDENBAG *et al.* 1990). Com a perda das folhas em função do estágio avançado de crescimento, a parte inferior da planta apresenta um conteúdo inferior de artemisinina (LIRSCH *et al.* 1986; SINGH *et al.* 1988).

FÍGURA 3 : Estruturas químicas de substâncias isoladas de *Artemisia annua*.

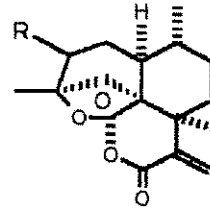


Artenuína A



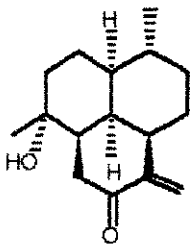
Art.-B epóxido

Art.-C epóxido

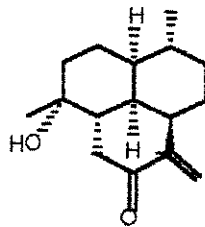


R = OH

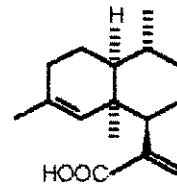
R = H deoxyartemisinina



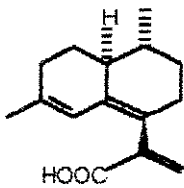
Artenuína E



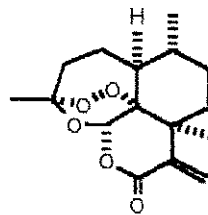
Artenuína F



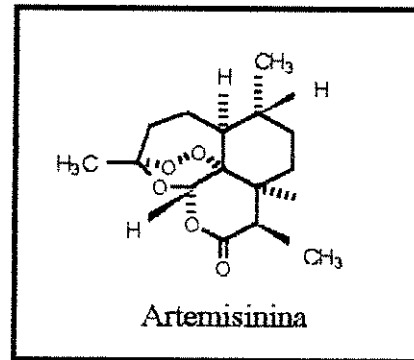
Ácido artemisinínico



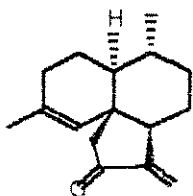
Ácido 6,7-
deidroartemisinínico



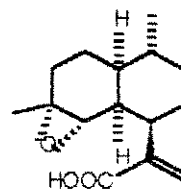
Artemisiteno



Artemisinina



(+)- Deoxiisoartemisinina



Ácido 4,5-epoxi-
artemisinínico

Fonte: ZAMAN and SHARMA (1991).

3.3.3 BIOSSÍNTESES DOS TERPENOS

O termo terpenóide compreende uma enorme variedade de substâncias vegetais, o que indica que estas substâncias são associadas por apresentarem uma origem biossintética comum. Assim, todos os terpenóides estão baseados na molécula de isopreno ($\text{CH}_2 = \text{C}(\text{CH}_3) - \text{CH} = \text{CH}_2$) e são constituídos por 2 ou mais unidades de 5 carbonos (HARBONE, 1973).

Quanto a classificação, os terpenóides podem ser classificados de acordo com o número de carbonos (TABELA 5).

Entre os terpenóides, alguns isoprenóides são considerados como metabólitos primários, tais como os esteróides, carotenóides, reguladores de crescimento e quinonas. Outros ainda, são considerados como metabólitos secundários incluindo nestes os monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos que realizam uma importante função interativa entre a planta e seu meio ambiente (CHAPPELL, 1995).

A biossíntese dos terpenos começa com acetil CoA, a qual combina-se com uma segunda unidade de acetil CoA dando origem a aceto acetil CoA. Uma terceira molécula de acetil CoA é adicionada produzindo por hidrogenação o ácido mevalônico (MVA), por meio de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ com liberação da CoA.

O ácido mevalônico, que foi descoberto como um fator de crescimento para microorganismo, é um importante intermediário. O isopreno ativo, isopentenil pirofosfato (IPP) é derivado deste ácido através de descarboxilação, desidratação e fosforilação com ATP (HESS *et al.* 1975; WOERDENBAG *et al.* 1990).

O IPP existe em equilíbrio com seu isômero dimetil alil pirofosfato (DMPP). Este último composto é o precursor sem o qual a biossíntese dos terpenóides não podem iniciar-se. Isto, se deve a que somente o dimetil alil pirofosfato pode se unir para formar a cadeia aberta de monoterpeno, geranyl pirofosfato, sendo liberado assim, o pirofosfato (FIGURA 4). Outras cadeias abertas e monoterpenos cíclicos podem ser formados a partir deste composto.

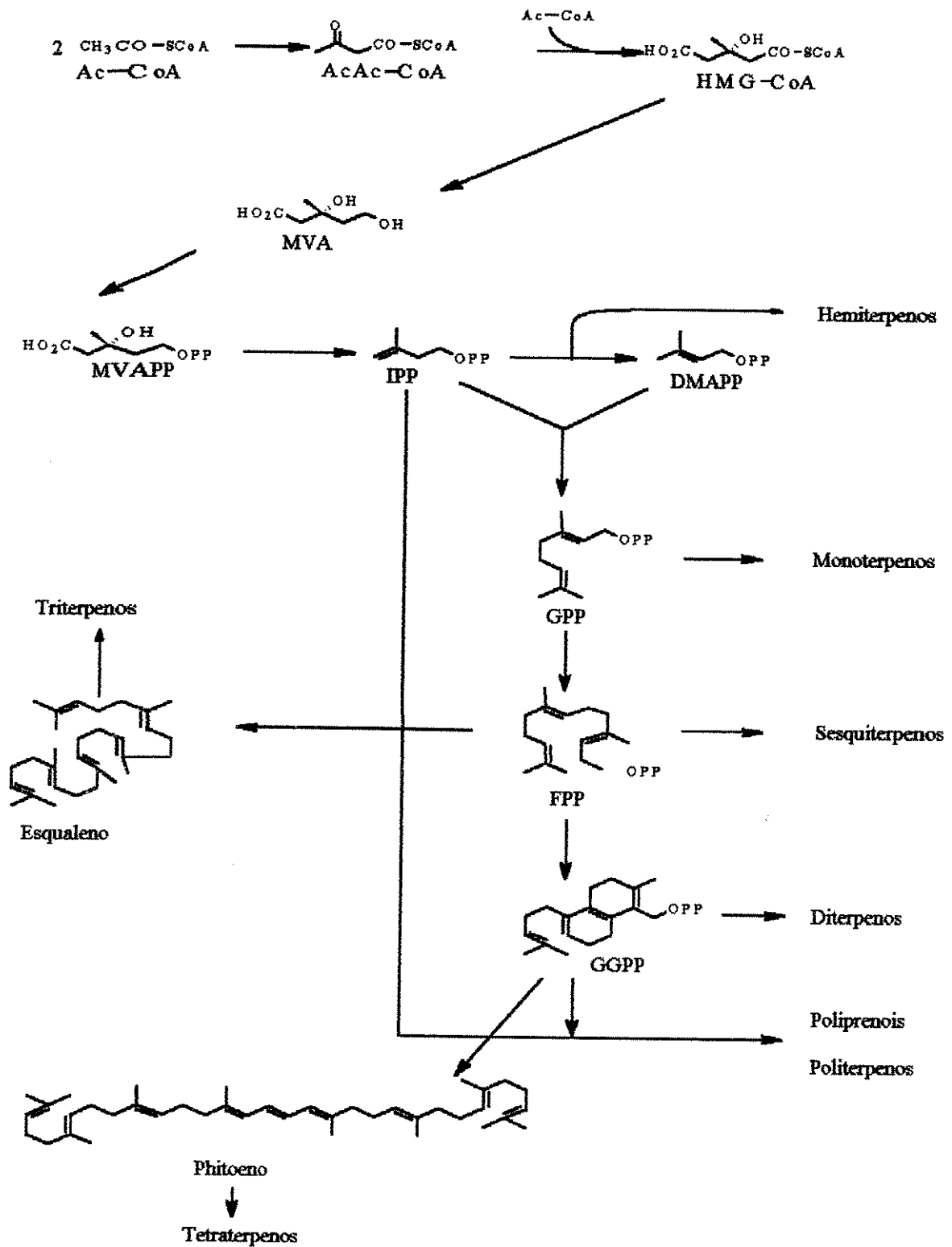
Assim, durante a biossíntese de terpenóides são necessários o fornecimento de acetil CoA, ATP e NADPH. Estes provavelmente provêm do metabolismo de açúcares através da glicose e da via da pentose.

Os sesquiterpenos são constituídos por 3 unidades de isopreno e podem ser classificados como no caso dos monoterpenos de acordo com seu esqueleto de carbono básico. Os mais comuns são os acíclicos, monocíclicos ou bicíclicos, porém dentro de cada

grupo há muitos compostos diferentes, sendo que uma estimativa recentemente calcula em 1000 sesquiterpenos correspondentes a 100 esqueletos de carbono típicos.

Por outro lado, as lactonas sesquiterpênicas possuem uma ampla distribuição nas Asteraceae. Estas lactonas sesquiterpênicas apresentam eventualmente sabores amargos e pungentes e as vezes até propriedades alergênicas. Em geral, lactonas sesquiterpênicas são particularmente capazes de promover a defesa contra os insetos herbívoros e são conhecidos por exibir atividade biológica como atividade citotóxica, antitumorais e antibióticas, atuam como fitotoxinas ou como toxinas para animais e contra insetos (SLONE and KELSEY, 1985 apud DUKE and PAUL, 1993). Todavia, podem provocar alergias ou dermatites em pessoas, sendo que estas últimas propriedades são menos conhecidas (ZHENG, 1994).

FÍGURA 4 : Biossíntese dos terpenos



Fonte: CROTEAU (1987)

TABELA 5: Classificação dos terpenóides

Nº de unidades de isoprenos e Nº de carbonos	Classificação	Tipos e ocorrências
1 (C ₅)	isopreno	detectados em folhas de <i>Hamamelis japonica</i> , óleo essencia em <i>Mentha</i> e Eucalipto
2 (C ₁₀)	monoterpenóides	monoterpenos em óleo essencial, limoneno em <i>Citrus sp</i> , α pinene em <i>Pinus sp</i>
3 (C ₁₅)	sesquiterpenóides	sesquiterpeno em óleo esencial, sesquiterpeno lactona (comum em Asteraceae), ácido abscísico
4 (C ₂₀)	diterpenóides	ácidos diterpenos em resina de planta giberelinas (ácido giberélico)
6 (C ₃₀)	triterpenóides	Esterol (sitosterol, stigmasterol) triterpenos (β -aminina - plântulas de feijão, resina e latex) saponinas (yamogenina) glicosídeos cardíacos (<i>D. lanata</i> e <i>D. purpurea</i> , plantas da família Apocináceas e Moráceas)
8 (C ₄₀)	tetraterpenóides	carotenóides (licopeno - tomate, flavoxantina - pétala de flor, violaxantina - <i>Viola spp</i> , β -caroteno)
n (C _n)	polisopreno	borracha (<i>Hevea brasiliensis</i>)

Fonte: GOODWIN and MECER, 1972; DOMINGUES, 1973; HARBONE, 1973)

3.3.4 CAMINHO BIOSSINTÉTICO DA ARTEMISININA

A biossíntese dos sesquiterpenos (FIGURA 5) tem como precursor o farnesil difosfato (FPP), o qual é sintetizado pelo ácido mevalônico difosfato via isopentenil difosfato (IPP) e geranyl difosfato - GPP (ALKILA *et al.* 1987; WOERDENBAG *et al.* 1990).

Por outro lado, o farnesil difosfato pode ser ciclizado dando origem ao cardinano (FIGURA 5). Este por sua vez, sofre uma oxidação havendo assim, a formação do ácido artemisinínico, sendo este composto um intermediário para o caminho biossintético da artemisinina (ROTH and ACTON, 1989).

O ácido artemisinínico isolado de folhas de *A. annua* pode ser convertido para artenuína-B através das reações de epoxidação, deoxigenação e lactonização (EL-FERALY *et al.* 1986; SANGWAN *et al.* 1993). Por sua vez, a partir deste precursor, artenuína-B, artemisinina pode ser formada (ALKILA *et al.* 1987). Porém, ACTON and KLAYMAN (1985), observaram a presença do artemisiteno que é uma nova lactona sesquiterpênica, a qual também participa no caminho biossintético da artemisinina. Além disso, em pesquisas com extratos de *A. annua*, ACTON and KLAYMAN observaram que a taxa de artemisiteno e artemisinina foi 1:10 no começo do crescimento, mudando mais tarde para 1:1, quando as flores se desenvolveram.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ORIGEM DO MATERIAL VEGETAL

Material vegetal : Sementes de *Artemisia annua* L. provenientes de plantas cultivadas e selecionadas no campo do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas CPQBA/UNICAMP. As plantas foram selecionadas em relação ao fenótipo (planta em roseta), em função de sua maior produção de biomassa e de artemisinina.

Também foram utilizadas sementes de *A. annua* L. provenientes do campo da Estação Federal de Pesquisas Agronômicas de Changins, Contthey (Suíça). Estas sementes são provenientes de plantas híbridas, onde houve o cruzamento de clone de origem chines com pólen de plantas provenientes da antiga Iugoslávia. As plantas originadas desse cruzamento, sob condições climáticas da Suíça, crescem mais de 2 m de altura no campo e apresentam um rendimento de folhas secas de aproximadamente 4 toneladas/ha com um teor de artemisinina por volta de 0.8% (Dr. Delabays, comunicação pessoal).

4.2 OBTENÇÃO DE PLÂNTULAS ASSÉPTICAS A PARTIR DE SEMENTES

Plântulas assépticas foram obtidas a partir de sementes esterilizadas seguindo o tratamento abaixo, sob condições de capela de fluxo laminar:

- a) Esterilização superficial das sementes em solução de 1% de fungicida Benomyl (Benlate) por 10 minutos;
- b) Imersão por 20 segundos em álcool 70%;
- c) esterilização com hipoclorito de sódio (pa) 1% por 12 minutos e
- d) Lavagem por 4 vezes com água destilada e autoclavada.

Após esse procedimento de esterilização as sementes foram inoculadas em frascos contendo meio nutritivo de Murashige & Skoog (MS). Os frascos ficaram dispostos nas prateleiras na sala de cultivo, sob fotoperíodo de 16 horas de luz a $25 \pm 1^\circ \text{C}$.

4.3 FONTE DE EXPLANTE

4.3.1 BROTOS AXÊNICOS

Sementes de plantas de *A. annua* do CPQBA/UNICAMP foram germinadas *in vitro* em meio de composição de MS. Os brotos axênicos foram coletados de plantas jovens, cultivadas por 3 meses.

4.3.2 PLÂNTULAS

Sementes provenientes da Suíça foram germinadas *in vitro* em meio nutritivo de composição de MS. Após 2 passagens neste mesmo meio nutritivo plântulas com 3 meses de idade foram utilizadas como explantes.

4.4 MEIOS DE CULTURA

4.4.1 CULTURA DE BROTOS

Brotos axênicos foram cultivados em tubos de fundo chato (8,4 cm de altura e 2,1 cm de diâmetro) contendo 6 ml de meio líquido sob ponte de papel filtro. As concentrações da interação dos macronutrientes do meio MS com as concentrações do ácido giberélico (GA_3) foram 100, 50, 25, e 0%; 20, 10, 5 e 0, respectivamente. Todos os demais componentes do meio utilizado foram mantido nas mesmas concentrações do meio MS original, com exceção da sacarose cuja concentração foi diminuída para 5g/l. O pH do meio de cultivo foi ajustado antes da autoclavagem para 5.8. O GA_3 foi esterilizado ao ser adicionado no meio de cultura com auxílio de membrana Milipore (0.22 μm).

4.4.2 CULTIVO *in vitro* E PRODUÇÃO DE ARTEMISININA

Visando otimizar tanto o cultivo *in vitro* de *A. annua* como a produção de artemisinina a metodologia empregada desta fase teve o objetivo de se verificar a interação das melhores combinações dos fitoreguladores de crescimento com a composição nutricional de três meios de cultura (TABELA 6).

Em todos os experimentos as plântulas foram cultivadas em frascos (14,3 cm de altura e 5,7 cm de diâmetro) contendo 50 ml de meio líquido. Os tratamentos adotados consistiram na interação da composição nutritiva dos meios de cultura (MS, Gamborg - B₅ e White - W) com GA₃ (0 e 10mg/l) e GA₃ combinado com AIA (10mg/l e 0,1mg/l), respectivamente.

4.4.2.1 CULTIVO *in vitro* EM MEIO WHITE ACRESCIDO DO RETARDANTE DE CRESCIMENTO (CCC)

Níveis menores de fosfato e nitrato da concentração original de White, em presença de CCC foram testados para o cultivo *in vitro* de *A. annua*, visando obter uma melhor produção de artemisinina. As plantas jovens foram cultivadas por 28 dias.

4.5 CONDIÇÃO DE CULTIVO

As condições de cultivos de todos os experimentos foram um fotoperíodo de 16 horas de luz à 25 ± 1° C.

4.6 CARACTERÍSTICAS AVALIADAS

Mediu-se tanto a altura dos brotos de *A. annua* após 14 dias como das plântulas aos 14 e 28 dias de cultivo. Características avaliadas foram: número de broto por plântula, massa fresca e massa seca, tanto da parte aérea como da raiz.

4.7 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE ARTEMISININA

As amostras do material vegetal (parte aérea e as raízes) foram secas em estufa à $30^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{ C}$ por 48 horas. Após a secagem, realizou-se a extração por maceração com tolueno (2ml/100mg de massa seca) por 2 minutos (FIGUEIRA, 1995). Obteve-se assim o extrato bruto.

4.7.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

O extrato bruto foi recolhido em frasco com pipeta Pasteur. A seguir, fizeram-se as aplicações com seringa em cromatoplaça de silicagel 60 F254 (Merck).

Em todas as corridas os padrões de artemisinina e ácido artemisinínico sempre foram incluídos. O sistema de solventes consistiu de 98,5% diclorometano : 1,5% metanol (v/v). As cromatoplaças após a corrida, foram secas e mergulhadas na mistura reveladora (50 ml de ácido acético glacial, 1,0 ml de ácido sulfúrico concentrado e 0,5 ml de anisaldeído) por 10 segundos, seguido de aquecimento (FIGUEIRA, 1995).

Após a revelação à quente observa-se que o padrão de artemisinina apresenta coloração amarelo no início passando a rosa-lilás após o esfriamento, enquanto que o padrão de ácido artemisinínico apresenta uma coloração cinza-azulado. A determinação de artemisinina e do ácido artemisinínico foi realizada através da comparação visual entre as manchas dos padrões e as manchas das amostras na cromatoplaça.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos tiveram 3 repetições para cada tratamento. Os dados foram submetidos a uma análise de variância, quando F foi significativo as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (CENTENO, 1982; BAUER, 1960). O delineamento experimental foi casualizado. Para tanto, usou-se o sistema de análise estatístico para microcomputador - SANEST para a análise dos dados (ZONTA & MACHADO, 1992).

TABELA 6: Composição modificada dos meios de Murashige & Skoog (MS), Gamborg *et al.* (B₅) e White (W).

TABELA 6.1: Composição dos macronutrientes e micronutrientes

Sais	Meio MS (mg/l) ^a	Meio B ₅ (mg/l) ^b	Meio W (mg/l) ^c
Macronutrientes			
Ca(NO ₃). 4H ₂ O	-	-	300
NH ₄ NO ₃	1650	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134	-
KNO ₃	1900	2500	80
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440	150	-
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370	250	720
KH ₂ PO ₄	170	-	-
KCl	-	-	65
Na ₂ SO ₄	-	-	200
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	-	150	19
Micronutrientes			
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22.3	-	6.65
MnSO ₄ . H ₂ O	-	10	-
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.6	2.0	2.67
H ₃ BO ₃	6.2	3.0	1.5
KI	0.83	0.75	0.75
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.25	0.25	-
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.025	0.025	0.01
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.025	0.025	-
H ₂ MoO ₄	-	-	0.001
FeEDTA *			
Na ₂ EDTA. 2H ₂ O	37.3	37.3	37.3
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27.8	27.8	27.8

Fonte: ^a MURASHIGE & SKOOG (1962); ^b GAMBORG *et al.* (1968) apud CALDAS *et al.* 1990; ^c WHITE (1943), com modificações de YEOMAN *et al.* (1977) e SINGH *et al.* (1981) apud MROGINSKI and ROCA (1991).

* concentração padronizada para os experimentos.

Tabela 6.2: Composição orgânica

Orgânicos	Meio MS (mg/l) ^a	Meio B ₅ (mg/l) ^b	Meio White (mg/l) ^c
Glicina	2.0	-	3.0
Ác. nicotínico	0.5	1.0	0.5
Piridoxina . HCl	0.5	1.0	0.1
Tiamina . HCl	0.1	10	0.1
Mio-inositol	100	100	100
Sacarose	20.000	30.000	20.000
pH *	5.8	5.8	5.8

Fonte: ^a MURASHIGE & SKOOG (1962); ^b GAMBORG *et al.* (1968) apud CALDAS *et al.* 1990; ^c WHITE(1943), com modificações de YEOMAN *et al.* (1977) e SINGH *et al.* (1981) apud MROGINSKI and ROCA (1991).

* pH padronizado para os experimentos.

TABELA 6.3 : Concentração de íons nos meios MS, B₅ e W

Íons	Meio MS (mg/l)	Meio B ₅ (mg/l)	Meio W (mg/l)
N-NO ₃	551.67	346.15	46.63
N-NH ₄	288.60	18.25	-
N total	840.27	364.40	46.63
P	38.72	29.80	3.77
K	781.76	964.46	65.03
Ca	119.71	40.81	50.81
Mg	36.02	24.34	71.04
Cl	209.56	71.48	30.51
Fe	5.59	5.59	5.59
S	55.36	70.22	144.71
B	1.10	0.53	0.26
Mn	5.49	3.25	1.64
Zn	1.94	0.45	0.58
Cu	0.0063	0.060	0.0025
Mo	0.099	0.19	0.00005
I	0.63	0.57	0.57
Co	0.006	0.06	-

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CULTURA DE BROTO

Neste experimento utilizou-se sementes de *A. annua* para a obtenção de brotos (FIGURA 6b), sendo estas sementes provenientes de plantas (em roseta) cultivadas e selecionadas no CPQBA/UNICAMP (FIGURA 6a). Este material vegetal foi selecionado de acordo com seu fenótipo e por apresentar maior biomassa e elevados teores de artemisinina.

Os dados (TABELA 7) mostraram que o crescimento dos brotos é um fenômeno influenciado pela concentração dos macronutrientes do meio Murashige & Skoog (MS) e pela concentração do GA₃. A combinação da diluição de 50% da concentração original dos macronutrientes acrescidos de GA₃ (10 mg/l) apresentou um ótimo estímulo ao crescimento dos brotos de *A. annua*. O mesmo resultado positivo foi obtido com a combinação da diluição de 25% dos macronutrientes com 5 mg/l de GA₃.

A diminuição da concentração dos macronutrientes do meio MS não afetou drasticamente o crescimento dos brotos *in vitro*. Mesmo sem a presença dos macronutrientes os brotos apresentaram valores de crescimento relativamente altos, provavelmente devido a utilização das reservas nutricionais da própria plântula. Estes valores foram marcantes quando houve a adição de GA₃ (10 mg/l) para um cultivo de 14 dias.

No crescimento avaliado tanto pela massa fresca (TABELA 8) como a incorporação de matéria orgânica avaliada pela massa seca (TABELA 9), o melhor resultado foi a combinação de 50% dos macronutrientes com 10 mg/l de GA₃. Houve concordância de resultados em relação a altura dos brotos (TABELA 7).

Estes resultados confirmam os dados obtidos por WOERDENBAG *et al.* (1993), nos quais o cultivo mais eficiente de *A. annua in vitro* se deu com os macronutrientes do meio MS reduzidos à metade. Resultado semelhante foi obtido também por SHEPHERD (1992).

Concomitantemente à avaliação do crescimento dos brotos, foi determinada a presença de artemisinina nestes brotos. A presença de artemisinina não foi detectada, devido provavelmente a um destes fatores atuando isoladamente ou em conjunto:

1) procedência do material vegetal; 2) estado fisiológico dos brotos; 3) ausência de raízes.

De acordo com FULZELE *et al.* (1991), a síntese de artemisinina requer a completa diferenciação até com as raízes das plântulas em cultura de brotos de *A. annua*.

FÍGURA 6 : **a)** Material vegetal *in vivo* (no campo), selecionado e cultivado no CPQBA/UNICAMP. **b)** Aspecto do cultivo *in vitro* por 14 dias dos brotos de *A. annua* em meio Murashige & Skoog.



TABELA 7: Efeito da concentração dos macronutrientes do meio MS e da concentração de GA₃ avaliada através da altura (cm) dos brotos de *A. annua*. Avaliação após 14 dias de cultivo.

Concentração dos macronutrientes do meio MS	Concentração de GA ₃ (mg/l)				DMS
	0	5	10	20	
100%	0.22	0.62	0.34	0.61	NS
50%	0.41 b	0.96 a	1.10 a	0.65 ab	0.54
25%	0.67 ab	0.85 a	0.52 ab	0.38 b	0.39
0%	0.64	0.60	0.77	0.52	NS

Médias seguidas por letras distintas diferam entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

NS - valor de F não significativo

TABELA 8: Efeito da concentração dos macronutrientes do meio MS e da concentração de GA₃ em relação a massa fresca dos brotos de *A. annua*. Avaliação após 14 dias de cultivo.

Concentração dos macronutrientes do meio MS	Concentração de GA ₃ (mg/l)				DMS
	0	5	10	20	
100%	0.16 b	0.30 a	0.24 ab	0.23 ab	0.10
50%	0.23	0.23	0.37	0.21	NS
25%	0.26	0.35	0.24	0.15	NS
0%	0.22	0.19	0.27	0.35	NS

Médias seguidas por letras distintas diferam entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

NS - valor de F não significativo

TABELA 9: Efeito da concentração dos macronutrientes do meio MS e da concentração de GA₃ em relação a massa seca dos brotos de *A. annua*. Avaliação após 14 dias de cultivo.

Concentração dos macronutrientes do meio MS	Concentração de GA ₃ (mg/l)			
	0	5	10	20
100%	0.030	0.042	0.043	0.042
50%	0.037	0.035	0.053	0.032
25%	0.043	0.042	0.033	0.025
0%	0.036	0.028	0.040	0.047

NAIR e colaboradores (1986) também não observaram a presença de artemisinina e/ou do ácido artemisinínico em brotos não enraizados nem nos calos de *A. annua*. Este fato corrobora a idéia da necessidade de diferenciação das raízes para a produção de artemisinina em *A. annua*.

5.2 CULTIVO *in vitro* E PRODUÇÃO DE ARTEMISININA

De acordo com os resultados obtidos no experimento anterior, a diluição de 50% dos macronutrientes acrescidos de GA₃ (10 mg/l), apresentou resultados satisfatórios quanto ao crescimento, tanto na massa fresca como na massa seca dos brotos, quando cultivados por 14 dias. Visando estudar e comparar o cultivo *in vitro* de *A. annua* por 14 e 28 dias como também a produção de artemisinina e do ácido artemisinínico, os experimentos a seguir foram realizados com plântulas provenientes de sementes de origem suíça (FIGURA 7). Já que este material vegetal apresenta um alto teor de artemisinina (Dr. Delabays, comunicação pessoal).

No cultivo *in vitro* das plântulas de *A. annua* por 28 dias, observou-se que a composição nutricional dos meios de cultura ($\frac{1}{2}$ MS, B₅ e White) acrescidos de fitoreguladores (GA₃ e AIA) influenciaram o crescimento das plântulas (FIGURA 8). Embora a composição nutricional do meio White (TABELA 6), tenha menores teores relativos de sais minerais incluindo a ausência de amônia, pela FIGURA 8 pode-se visualizar o estímulo produzido por este meio no crescimento das plântulas, estímulo este significativo. Este crescimento foi menor na presença de GA₃, porém a adição de AIA, reverteu o efeito inibitório do GA₃. Enquanto que, o meio B₅ acrescido de GA₃ não afetou drasticamente na diminuição da altura das plântulas, sendo que este efeito inibitório do GA₃ foi revertido também pela adição de AIA. Quando foi utilizado o meio $\frac{1}{2}$ MS a adição de GA₃ causou a diminuição da altura das plântulas, efeito este acentuado com a adição conjunta de AIA.

Observou-se que, tanto o estímulo da composição nutricional dos meios de cultura como a concentração dos fitoreguladores de crescimento estimularam as brotações nas plântulas de *A. annua* (TABELA 10). Os melhores efeitos encontrados foram para o meio B₅ principalmente, sendo que o número de brotações por plântula aumentou quando o meio de cultura foi suplementado com GA₃ (10 mg/l). A combinação de GA₃ e AIA aumentou o número de brotações por plântula no meio $\frac{1}{2}$ MS, enquanto que para os outros dois meios de cultura houve diminuição do número de brotos.

Para a micropropagação de *A. annua*, os resultados mostraram que os meios que promovem as brotações ($\frac{1}{2}$ MS e B₅) apresentam concentrações de nitrogênio, potássio, fósforo e cloro mais elevadas (TABELA 6.3). Assim, parece haver uma interação entre a variação na composição nutricional dos meios com o GA₃ na promoção destas brotações.

Por outro lado, os estudos sobre absorção de nutrientes em meio líquido indicam que a absorção destes pelas raízes é altamente específica e seletiva. Assim, a absorção pode provocar não só a rápida redução dos nutrientes, mas alterações tanto no pH, como nos potenciais químico e eletropotencial do meio durante o cultivo (ASHER and EDWARDS, 1983).

A absorção seletiva dos íons pode também afetar o próprio fenômeno de absorção através das membranas das raízes, já que estas membranas permitem o transporte dos solutos para dentro das células. Acredita-se que determinadas proteínas que participam do processo de transporte podem ser ativadas ou inativadas por certos íons ou moléculas químicas (SALISBURY and ROSS, 1992).

Nos trabalhos de literatura de micropropagação e/ou organogênese de *A. annua* mostraram que a composição nutricional do meio MS é a mais utilizada. Nestes trabalhos para o estímulo das brotações, o meio MS foi suplementado com os seguintes fitoreguladores: BA + AIB (LÊ and COLLET, 1991), somente BA (SUMITA *et al.* 1988, WHIPKEY *et al.* 1992, PANIEGO and GIULIETTI, 1994), BA + ANA + AIA (BENJAMIN *et al.* 1990), BA + ANA (PANIEGO and GIULIETTI, 1994).

Os resultados quanto a massa fresca e massa seca da parte aérea são mostrados na FIGURA 9. Por esta figura pode-se observar que os meios $\frac{1}{2}$ MS e B₅ estimularam uma maior incorporação de matéria orgânica pelas plântulas (massa seca), não tanto pelo aumento da altura destas (FIGURA 8), mas sim pelo estímulo de proliferação de brotos (TABELA 10). Quanto a massa fresca, os meios de cultura com concentrações de macronutrientes mais elevadas ($\frac{1}{2}$ MS e B₅) tiveram um melhor efeito quando comparado ao meio White (concentração mais fraca de macronutrientes e ausência de amônia). Porém, quanto a massa seca os resultados não mostraram grandes diferenças entre os tratamentos.

Entre o grupo dos fitoreguladores, as giberelinas são conhecidas por estimular o crescimento por alongamento das partes aéreas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990). A fase de alongamento nas plantas é caracterizada por um rápido aumento de volume, incorporação de água acompanhada de vacuolização e síntese da parede celular (TAIZ, 1991).

Neste experimento, quando o GA_3 foi acrescentado nos meios ($\frac{1}{2}$ MS e B_5), houve maior formação de brotações, com uma pequena redução na altura das plântulas (FÍGURA 8), sem apresentar um efeito marcante na massa seca destas, devido talvez ao tipo de crescimento promovido pelo GA_3 .

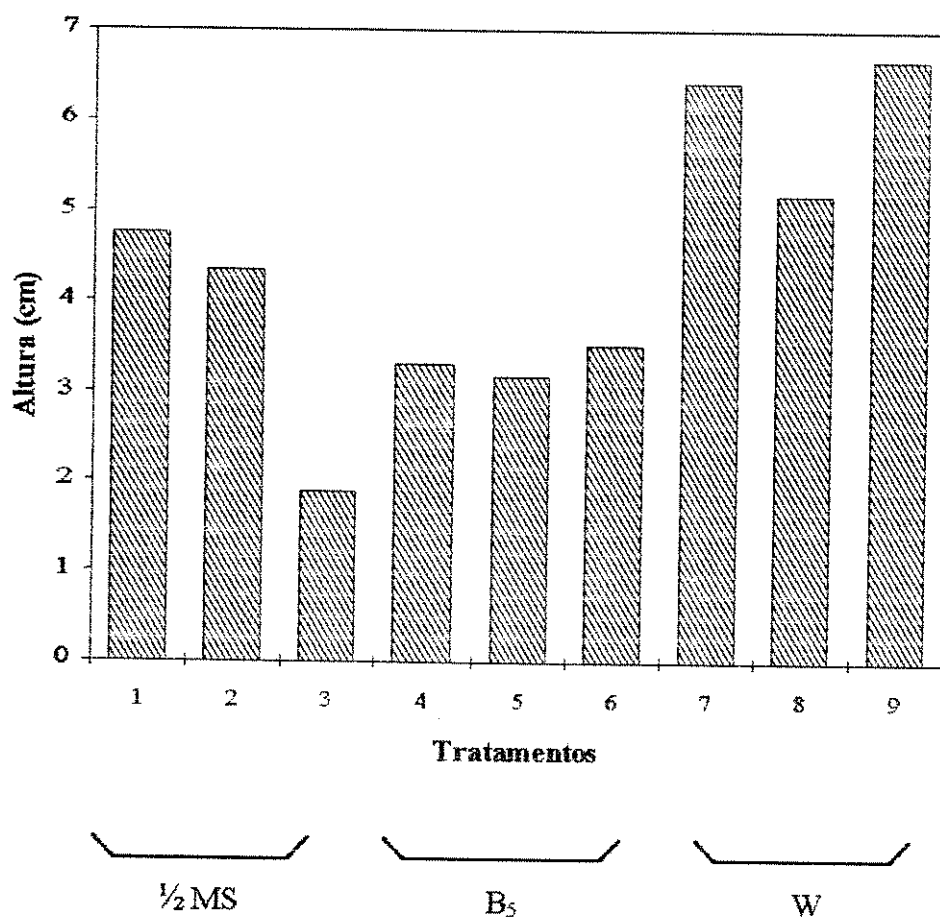
Quanto a massa fresca das raízes destacadas, esta foi influenciada pela composição nutricional dos meios de cultura e pela concentração do GA_3 . Na FÍGURA 10, pode-se visualizar que o meio W acrescido de GA_3 , tanto a massa fresca como a massa seca diminuem e quando acrescido da combinação de $GA_3 + AIA$, acentua-se essa diminuição. Enquanto que, no meio $\frac{1}{2}$ MS, este mesmo efeito causado pelo GA_3 ocorre para a massa fresca e a massa seca das raízes destacadas. Mas, a adição de AIA promoveu um leve aumento da massa fresca e da massa seca das raízes, já que o AIA provavelmente reverteu o efeito inibitório de GA_3 pela sua propriedade em promover o crescimento das raízes. Quando o meio B_5 , (estabelecida para o cultivo em suspensão de células de raízes de soja), foi acrescido tanto de GA_3 como com a combinação de $GA_3 + AIA$, não afetou a massa fresca das raízes. Entretanto o meio B_5 acrescido de GA_3 estimulou o acúmulo de matéria orgânica nas raízes, provocando um aumento na massa seca destas.

A avaliação dos resultados da massa seca mostrou que a composição nutricional dos meios $\frac{1}{2}$ MS, B_5 e White também apresentaram o mesmo efeito observado para a massa fresca das raízes.

FÍGURA 7: Planta de *A. annua* cultivada no CPQBA/UNICAMP a partir de sementes da Suíça.



FÍGURA 8: Efeito dos meios Murashige & Skoog (MS), Gamborg (B₅), White (W) e dos fitoreguladores no crescimento em altura (cm) das plântulas de *A. annua*. Avaliação após 28 dias de cultivo.



Tratamentos: 1- $\frac{1}{2}$ MS

2- $\frac{1}{2}$ MS + GA₃

3- $\frac{1}{2}$ MS + GA₃ + AIA

4- B₅

5- B₅ + GA₃

6- B₅ + GA₃ + AIA

7- W

8- W + GA₃

9- W + GA₃ + AIA

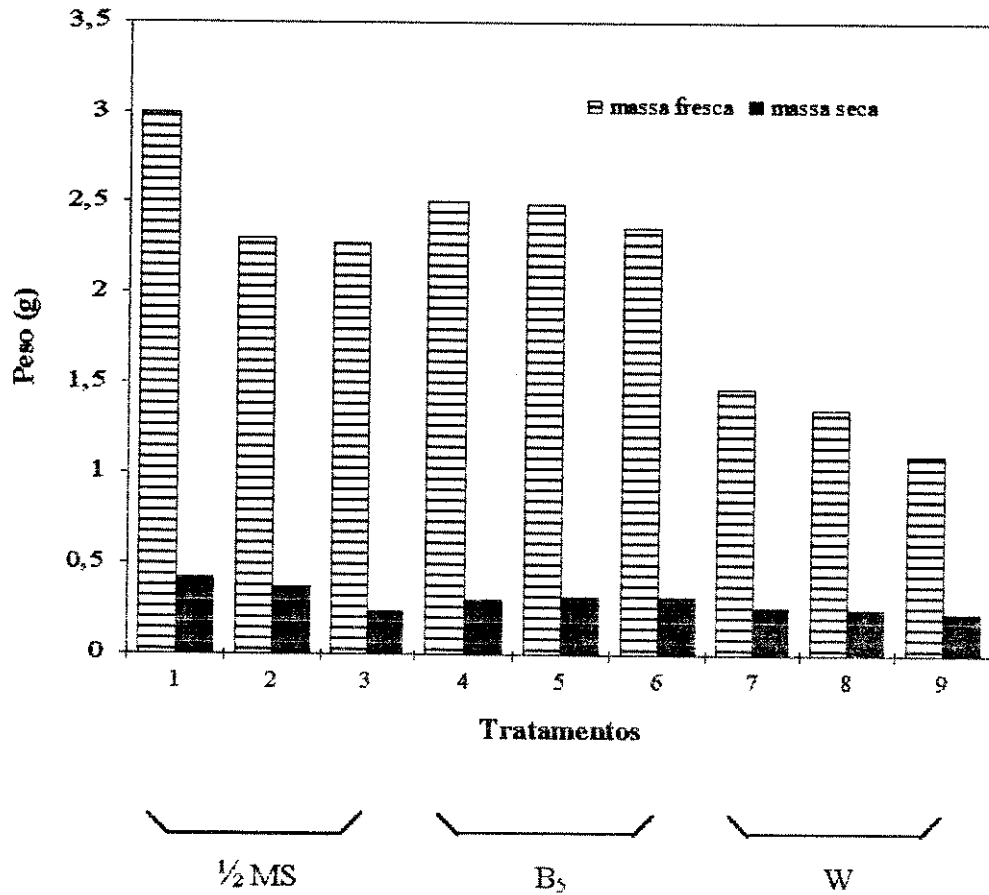
TABELA 10: Efeito dos meios Murashige & Skoog (MS), Gamborg (B₅), White (W) e dos fitoreguladores no número de brotos por plântula de *A. annua*. Avaliação após 28 dias de cultivo.

Meios de cultura	0 mg/l GA ₃	10 mg/l GA ₃	10 mg/l GA ₃ + 0.1 mg/l AIA	DMS
½ MS	2.24 b	3.26 a	3.49 a	0.70
B ₅	2.91	3.37	3.24	NS
White	0.84 b	2.10 a	1.18 b	0.78

Médias seguidas por letras distintas diferam entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

NS - valor de F não significativo

FÍGURA 9: Efeitos dos meios Murashige & Skoog (MS), Gamborg (B₅), White (W) e dos fitoreguladores na massa fresca e massa seca da parte aérea de *A. annua*. Avaliação após 28 dias de cultivo.



Tratamentos: 1- $\frac{1}{2}$ MS

2- $\frac{1}{2}$ MS + GA₃

3- $\frac{1}{2}$ MS + GA₃ + AIA

4- B₅

5- B₅ + GA₃

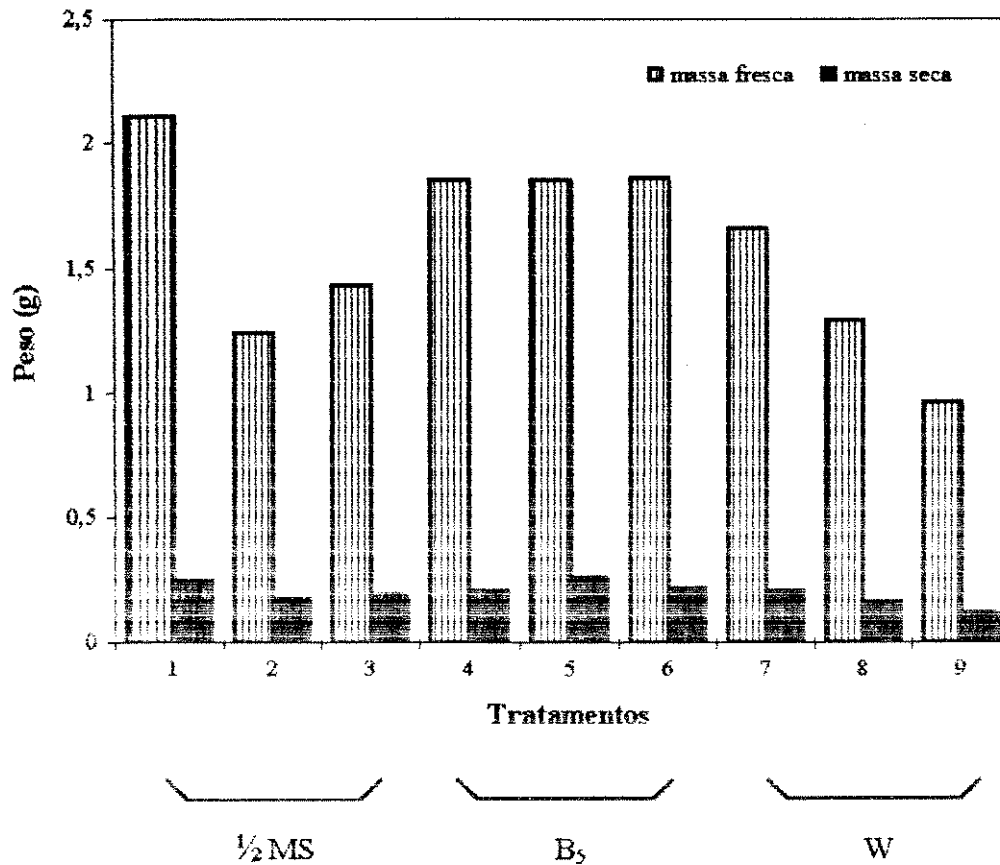
6- B₅ + GA₃ + AIA

7- W

8- W + GA₃

9- W + GA₃ + AIA

FÍGURA 10: Efeito dos meios Murashige & Skoog (MS), Gamborg (B₅), White (W) e dos fitoreguladores na massa fresca e massa seca das raízes destacadas de *A. annua*. Avaliação após 28 dias de cultivo.



Tratamentos: 1- $\frac{1}{2}$ MS

2- $\frac{1}{2}$ MS + GA₃

3- $\frac{1}{2}$ MS + GA₃ + AIA

4- B₅

5- B₅ + GA₃

6- B₅ + GA₃ + AIA

7- W

8- W + GA₃

9- W + GA₃ + AIA

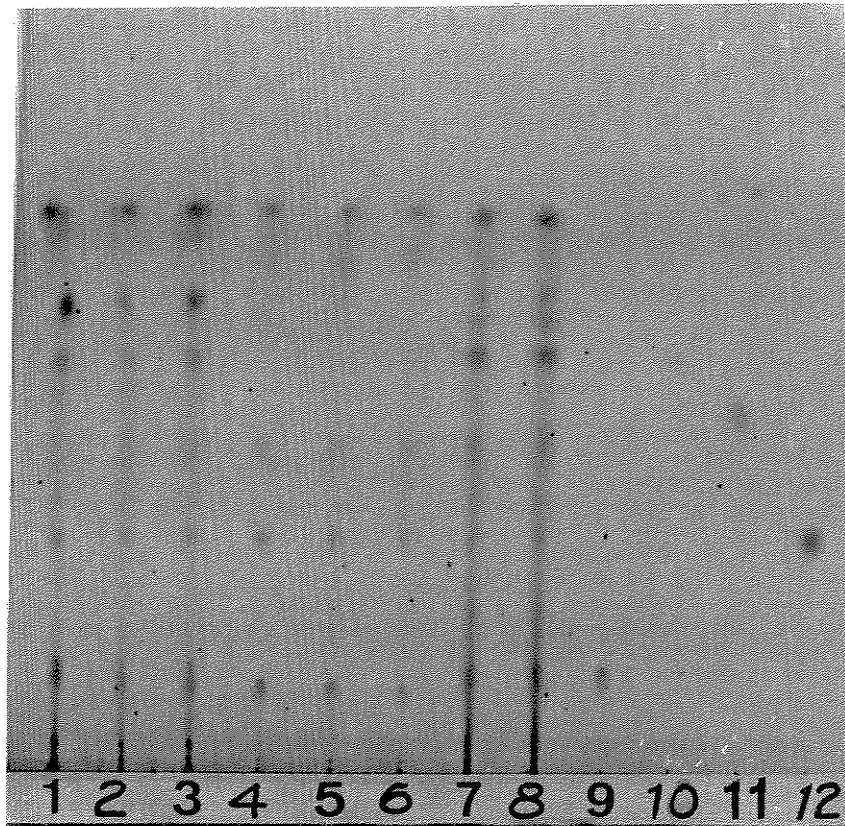
Os teores de artemisinina e do ácido artemisinínico no cultivo de *A. annua*, foram determinados através de cromatografia em camada delgada-CCD (FIGURA 11). Esta técnica é perfeitamente válida para este tipo de estudo, ou ainda para o monitoramento das análises rotineiras onde sejam manipuladas muitas amostras.

Nos experimentos com $\frac{1}{2}$ MS, B₅ e W, observou-se além dos efeitos destes no crescimento, na produção de massa seca, o efeito no teor de artemisinina e ácido artemisinínico na parte aérea (TABELA 11 e 12), como também do ácido artemisinínico nas raízes destacadas de *A. annua* (TABELA 13). Observa-se na TABELA 11 que a composição nutricional dos meios de cultura influenciaram significativamente a produção de artemisinina na parte aérea. A presença de GA₃ reduziu a produção deste metabólito e no caso do meio B₅, não foi detectada a presença de artemisinina. Por outro lado, apesar da produção de massa seca (FIGURA 9) foi menor no meio White, este meio mostrou ser o mais propício para a produção de artemisinina e promoveu ao mesmo tempo um bom crescimento (em altura) das plântulas (FIGURA 8).

Entretanto, o teor de ácido artemisinínico da parte aérea também foi afetado significativamente pela concentração dos fitoreguladores. Por outro lado, a presença do GA₃ reduziu a produção de ácido artemisinínico em todos os meios de cultura, sendo esta redução mais marcante nos meios B₅ e White (TABELA 12). Porém, observou-se que a adição de AIA reverteu o efeito de GA₃, aumentando relativamente a produção de ácido artemisinínico.

Quanto a produção de ácido artemisinínico nas raízes das plântulas (TABELA 13), a presença de GA₃ diminuiu os teores deste ácido, efeito semelhante ocorrido na parte aérea (TABELA 12). Apesar desta auxina (AIA) promover a rizogênese em brotos de *A. annua*, não influenciou muito a produção de ácido artemisinínico nas raízes.

FÍGURA 11 : Cromatograma (CCD) de extratos brutos da parte aérea, raízes destacadas e plantas de *A. annua*.



- Legenda :**
- 1 a 3 extratos da parte aérea
 - 4 a 6 extratos das raízes das plântulas
 - 7 e 8 extratos de plantas cultivadas no campo
 - 9 padrão do ácido artemisinínico
 - 10 padrão da artemisinina
 - 11 padrão da artenuína-B
 - 12 padrão do sitosterol

TABELA 11: Efeito dos meios de cultura suplementados com GA₃ no teor de artemisinina (em %) na parte aérea. Avaliação após 28 dias de cultivo.

Meios de cultura	0 mg/l GA ₃	10 mg/l GA ₃	10 mg/l GA ₃ + 0.1 mg/l AIA
½ MS	0.03	0.03	0.02
B ₅	0.04	*	*
W	0.08	0.05	0.07

* não detectado por CCD.

TABELA 12: Efeito dos meios de cultura suplementados com GA₃ no teor de ácido artemisinínico (em %) na parte aérea. Avaliação após 28 dias de cultivo.

Meios de cultura	0 mg/l GA ₃	10 mg/l GA ₃	10 mg/l GA ₃ + 0.1 mg/l AIA
$\frac{1}{2}$ MS	0.09	0.08	0.09
B ₅	0.17	0.04	0.11
W	0.11	0.04	0.09

TABELA 13: Efeito dos meios de cultura suplementados com GA₃ no teor de ácido artemisinínico (em %) nas raízes destacadas de *A. annua*. Avaliação após 28 dias de cultivo.

Meios de cultura	0 mg/l GA ₃	10 mg/l GA ₃	10 mg/l GA ₃ + 0.1 mg/l AIA
½ MS	0.06	0.04	0.04
B ₅	0.07	0.03	0.05
W	0.04	0.05	0.04

Análise de variância - valor de F não significativo

Embora o meio White tenha estimulado uma maior produção de artemisinina, esta produção poderia ser aumentada com a otimização deste meio. Sabe-se que condições nutricionais e físicas podem restringir o crescimento das plântulas, mas ao mesmo tempo podem aumentar a produção de metabólitos (ROBERT *et al.* 1991). Por outro lado, apesar do padrão de cultivo de *A. annua* ser 28 dias, WOERDENBAG *et al.* (1993) observaram que a produção *in vitro* de artemisinina, ocorreu com 14 dias de cultivo. Assim, o tempo de cultivo é um aspecto importante, o qual pode em alguns casos, influenciar a formação de metabólitos secundários. Cultivou-se as plântulas de *A. annua* por 14 dias nos mesmos tratamentos citados anteriormente.

Observa-se que com 14 dias de cultivo, a composição nutricional dos meios e a presença dos fitoreguladores, influenciaram no crescimento das plântulas (FIGURA 12). Na presença de GA₃, a altura diminuiu nos meios White e ½ MS, sendo que, o AIA reforça o efeito inibitório de GA₃. Entretanto no caso do meio B₅, o GA₃ estimulou o crescimento das plântulas (altura) e seu efeito foi inibido pela presença de AIA.

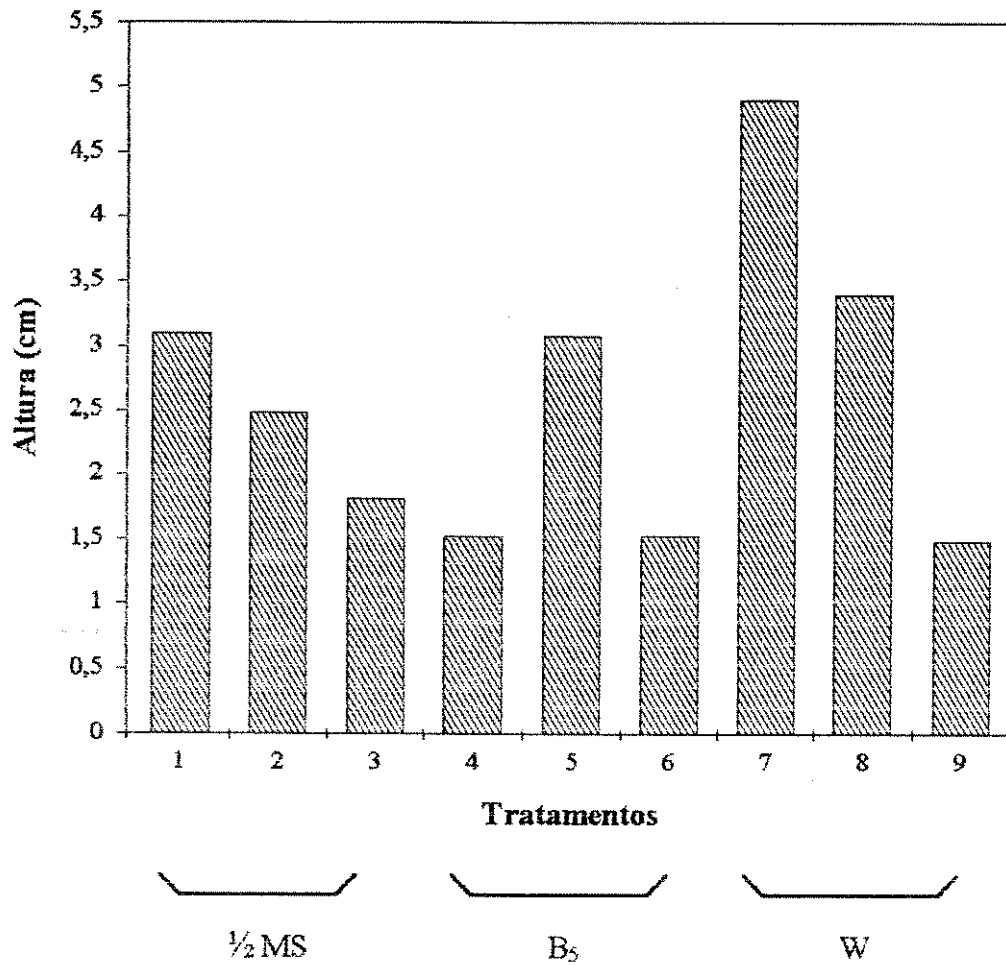
A composição do meio B₅ estimulou significativamente a formação de brotos nas plântulas. Na presença de GA₃ as brotações foram mais estimuladas, sendo este estímulo afetado pela adição de AIA em todos os meios de cultura (FIGURA 13).

Entretanto, na FIGURA 14 pode-se visualizar que a composição nutricional dos meios de ½ MS, B₅ e White não influenciaram muito nos resultados da massa fresca e massa seca. Nas composições dos meios ½ MS e W acrescidos de GA₃, a massa fresca diminuiu e esse efeito inibitório do GA₃, foi acentuado pela presença de AIA no meio ½ MS. Quando o meio B₅ foi suplementado com GA₃, a massa fresca aumentou e na presença de AIA tanto na massa fresca como a massa seca foram reduzidas.

Nesta figura, observa-se ainda que o meio B₅ acrescido de GA₃ apresenta um valor relativamente alto de massa seca, pois o GA₃ estimulou a promoção de brotações nas plântulas (FIGURA 13) como ocorre também para 28 dias de cultivo (TABELA 10).

Em relação aos resultados da massa fresca e massa seca das raízes destacadas de *A. annua*, a influência tanto da composição nutricional dos meios como a adição dos fitoreguladores nos meios para a massa fresca não foram significativos. Entretanto, na FIGURA 15 observa-se que na presença do GA₃ a massa fresca e massa seca diminuíram para os meios White e ½ MS. Já no caso do meio White, a adição de AIA neste meio de cultura, estimulou novamente o crescimento das raízes (massa fresca) inibido anteriormente pelo GA₃. Porém, esse crescimento talvez foi produzido principalmente por um alongamento das raízes com a incorporação de água e vacuolização dos tecidos, o qual pode explicar a queda na massa seca neste tratamento.

FÍGURA 12: Efeito dos meios de Murashige & Skoog (MS), Gamborg (B₅), White (W) e dos fitoreguladores no crescimento em altura (cm) das plântulas de *A. annua*. Avaliação após 14 dias de cultivo.



Tratamentos: 1- $\frac{1}{2}$ MS

2- $\frac{1}{2}$ MS + GA₃

3- $\frac{1}{2}$ MS + GA₃ + AIA

4- B₅

5- B₅ + GA₃

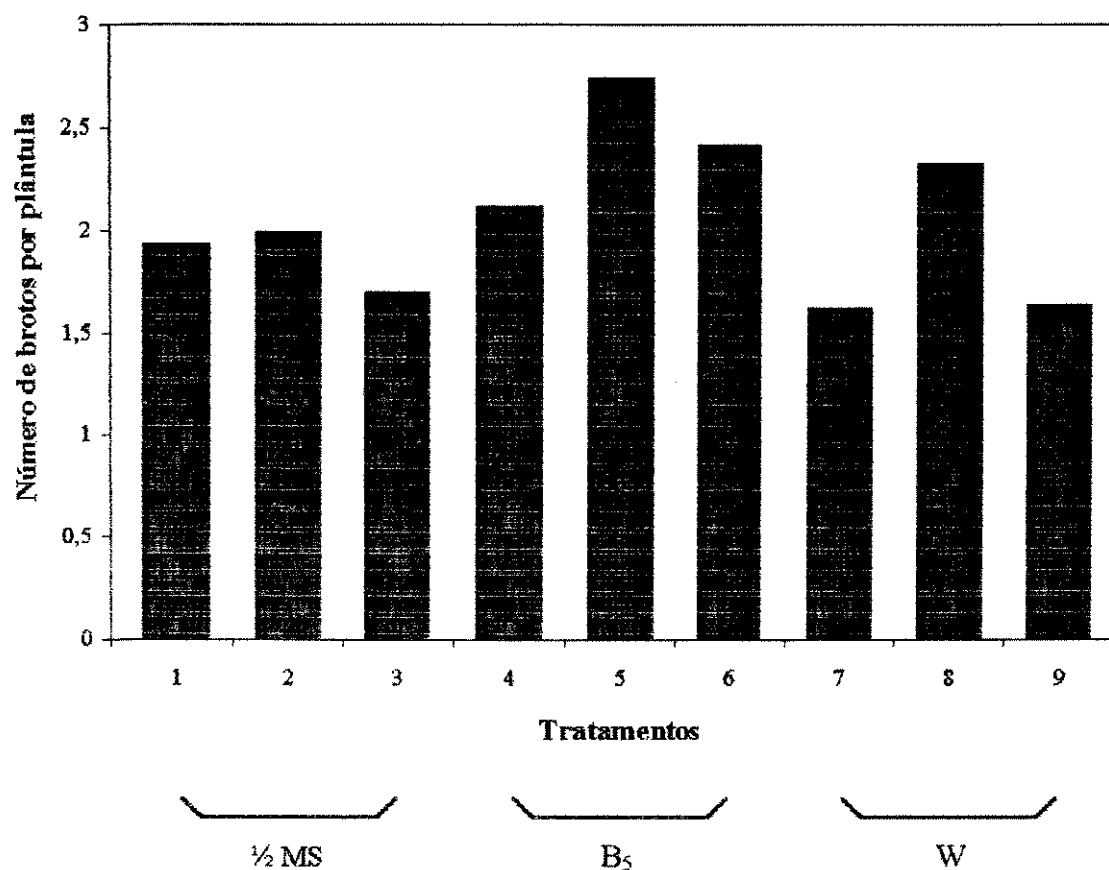
6- B₅ + GA₃ + AIA

7- W

8- W + GA₃

9- W + GA₃ + AIA

FIGURA 13: Efeito dos meios de cultura e dos fitoreguladores no número de brotos por plântula de *A. annua*. Avaliação após 14 dias de cultivo.



Tratamentos: 1- $\frac{1}{2}$ MS

2 - $\frac{1}{2}$ MS + GA₃

3 - $\frac{1}{2}$ MS + GA₃ + AIA

4 - B₅

5 - B₅ + GA₃

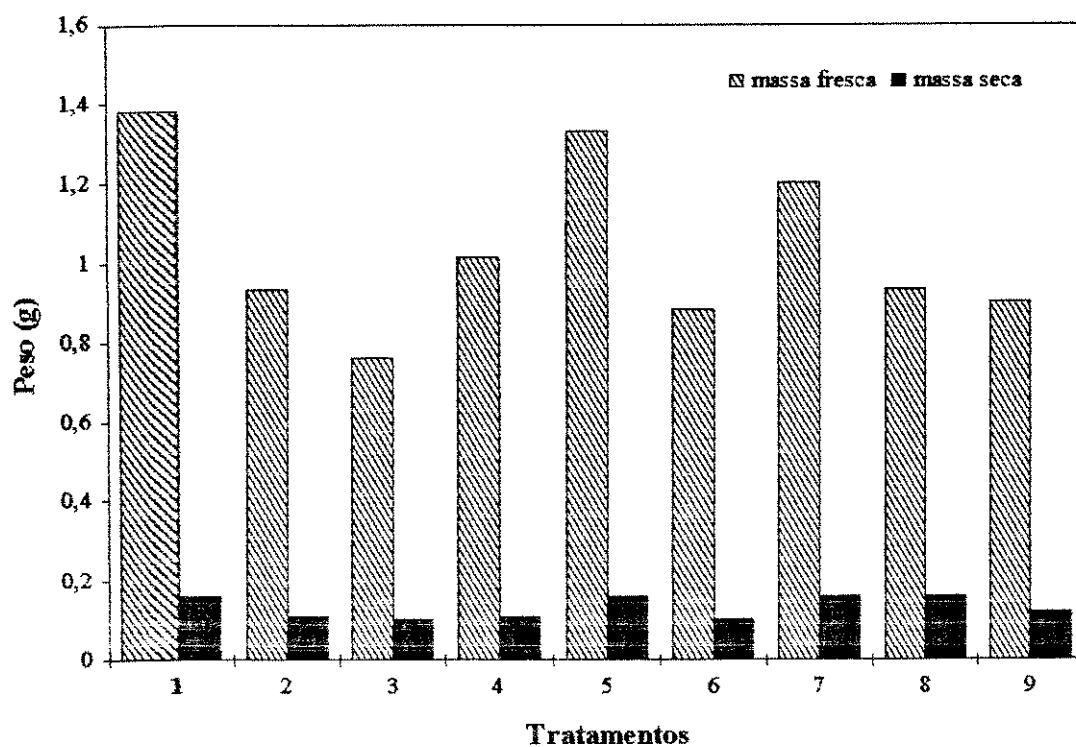
6 - B₅ + GA₃ + AIA

7 - W

8 - W + GA₃

9 - W + GA₃ + AIA

FÍGURA 14: Efeito dos meios Murashige & Skoog (MS), Gambor (B₅), White (W) e dos fitoreguladores na massa fresca e massa seca da parte aérea. Avaliação após 14 dias de cultivo.



$\frac{1}{2}$ MS

B₅

W

Tratamentos: 1- $\frac{1}{2}$ MS

2 - $\frac{1}{2}$ MS + GA₃

3 - $\frac{1}{2}$ MS + GA₃ + AIA

4 - B₅

5 - B₅ + GA₃

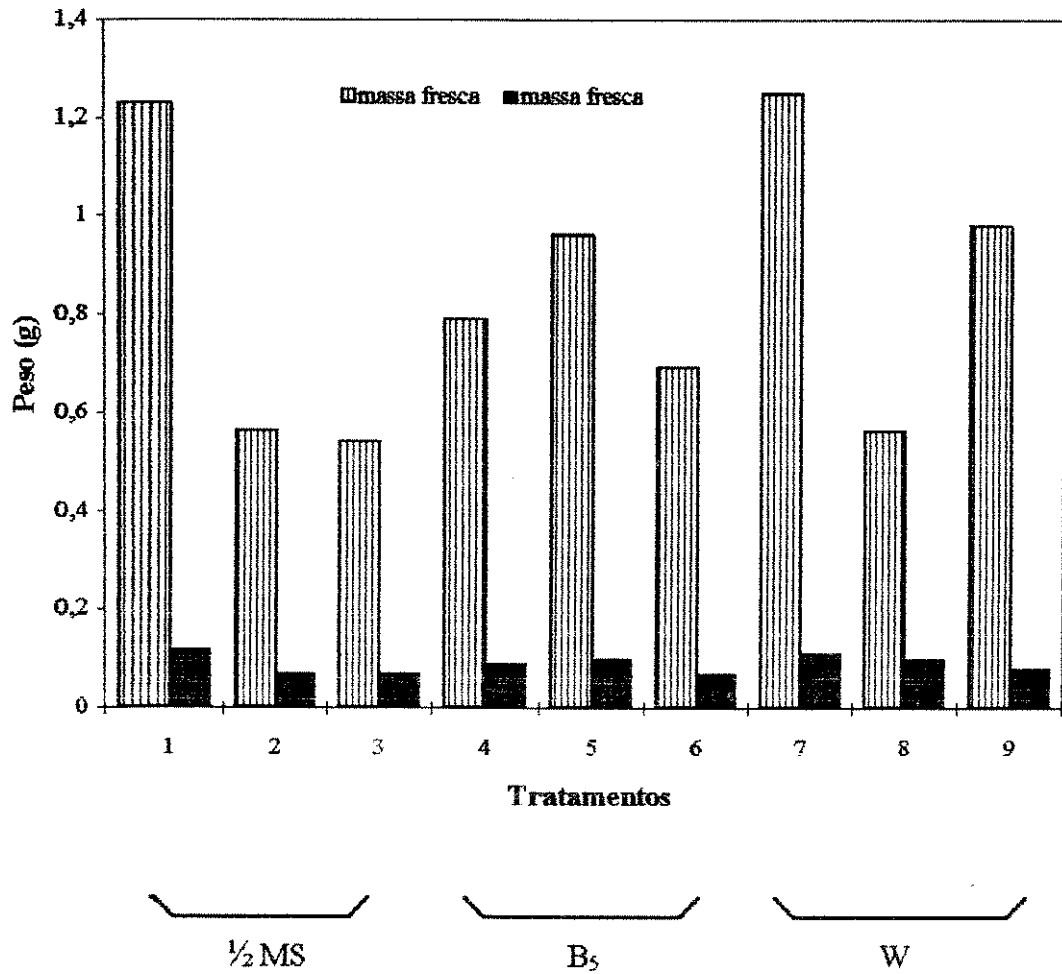
6 - B₅ + GA₃ + AIA

7 - W

8 - W + GA₃

9 - W + GA₃ + AIA

FIGURA 15: Efeito dos meios de cultura e dos fitoreguladores na massa fresca e massa seca das raízes destacadas de *A. annua*. Avaliação após 14 dias de cultivo.



Tratamentos: 1- $\frac{1}{2}$ MS

2 - $\frac{1}{2}$ MS + GA₃

3 - $\frac{1}{2}$ MS + GA₃ + AIA

4 - B₅

5 - B₅ + GA₃

6 - B₅ + GA₃ + AIA

7 - W

8 - W + GA₃

9 - W + GA₃ + AIA

Enquanto que, em relação ao meio B₅, o GA₃ estimulou a incorporação de matéria orgânica estimada através da massa seca, sendo que um efeito semelhante foi obtido também para a parte aérea (FÍGURA 14).

Nas plântulas de *A. annua* cultivadas por 14 dias, o teor de artemisinina foi afetado significativamente tanto pela composição nutricional, como pela concentração dos fitoreguladores (TABELA 14). Entre os meios testados, o meio W mostrou um efeito maior no teor de artemisinina produzido pela parte aérea, alcançando um valor de 0.09%. A composição deste meio estimulou também um maior crescimento em altura das plântulas (FÍGURA 12). Observa-se também na TABELA 14 que a adição de GA₃ nestes meios de cultura com exceção do meio B₅, causou uma diminuição da produção de artemisinina. No caso do meio B₅, a adição de GA₃ provocou um aumento do teor de artemisinina, sendo que esta mesma combinação estimulou também um maior número de brotações (FÍGURA 13) e um incremento da massa fresca e seca da parte aérea (FÍGURA 14).

Além disso, a adição de AIA nestes meios, com exceção de 1/2 MS, provocou uma maior redução do teor deste metabólito, chegando inclusive até não ser detectado no meio White.

Na constatação da presença do ácido artemisinínico em plântulas cultivadas por 14 dias, observa-se que o teor do ácido foi afetado pela composição nutricional dos meios e pela concentração dos fitoreguladores em cada meio (TABELA 15). Entretanto, entre os meios sem a adição de fitoreguladores, o meio de White estimulou mais a produção deste ácido (0.38%). A adição de GA₃ e AIA reduziu este teor, como ocorreu também na produção de artemisinina (TABELA 14). Os experimentos mostraram também que a produção deste ácido sofre uma importante redução com o tempo de cultivo, como mostram as TABELAS 11 e 15. Esta redução no teor encontrado, talvez seja um indicador do processo bioquímico da transformação dos precursores (ácido artemisinínico e artenuína-B) em artemisinina. A complexidade destes processos de transformação dificultam uma explicação mais clara do fenômeno da redução, influenciada também pelo tempo de cultivo *in vitro*.

Por outro lado, a adição dos fitoreguladores nos meios de cultura, influenciaram significativamente a produção de ácido artemisinínico nas raízes destacadas. Observa-se na TABELA 16 que no meio W, os teores de ácido foram relativamente baixos nas raízes destacadas, apesar da composição deste meio estimular uma maior produção de ácido artemisinínico na parte aérea (TABELA 15). O meio B₅ acrescido de GA₃ + AIA, estimulou um sensível aumento na produção de ácido.

Nos extratos obtidos das raízes destacadas de *A. annua*, cultivadas por 14 dias, entretanto, não foi detectada a presença de artemisinina. De acordo com NAIR *et al.* (1986), nas raízes e nas plantas enraizadas provenientes de explantes de folhas, encontraram artemisinina, sendo que baixos níveis deste metabólito, foram observados por estes pesquisadores na cultura líquida e no meio de cultura em suspensões de células de calos. Porém, ELHAG *et al.* (1992) não observaram a produção de artemisinina, ou dos seus precursores, o ácido artemisinínico e artemunina-B em calos e brotos não enraizados. Resultado semelhante foi também observado por FULZELE *et al.* (1991), que quando utilizaram *A. annua* de origem européia, não detectaram a síntese de artemisinina em calos, células, brotos e na cultura de raízes. Além disso, estes pesquisadores não verificaram a presença de artemisinina ou artemunina-B no meio de cultura.

Contudo, a síntese de artemisinina parece ser ativada quando ocorre a iniciação do enraizamento na cultura de brotos (FULZELE *et al.* 1991). Estudos preliminares realizados por SUMITA *et al.* (1988), revelaram a presença de artemisinina em raízes, brotos não enraizados e em calos, sendo que a cultura de brotos foi estabelecida em meio de MS + 2mg/l BA e o material vegetal foi de origem americana.

Já a cultura de brotos estabelecida por WOERDENBAG *et al.* (1993), produziu 0.16% de artemisinina, sendo que o meio utilizado foi o meio MS (com reduções de sais), suplementado com 0,2 mg/l BA e 0,05 mg/l ANA e com 0.5% de sacarose. Nestas culturas a adição de GA₃ (10 mg/l) elevou a produção de artemisinina.

5.2.1 CULTIVO *in vitro* EM MEIO WHITE ACRESCIDO DO RETARDANTE DE CRESCIMENTO (CCC)

O cultivo *in vitro* por 28 dias no meio White, mostrou um resultado positivo na produção de artemisinina (TABELA 11), quando comparado com os meios ½ MS e B₅. Assim, foram iniciados outros experimentos, desta vez apenas com o meio de composição de White, reduzindo especificamente a concentração de fosfato e nitrato. A redução dos macronutrientes foi combinada com a adição de CCC na proporção de 100 e 150 mg/l. A adição deste retardante foi feita, visando observar se a adição do retardante e /ou combinado com a redução da concentração de fosfato e nitrato, resultaria numa maior produção de artemisinina *in vitro* pelas plântulas.

TABELA 14 : Efeito dos meios de cultura suplementados com GA₃ no teor de artemisinina (em %) na parte aérea. Avaliação após 14 dias.

Meios de cultura	0 mg/l GA ₃	10 mg/l GA ₃	10 mg/l GA ₃ + 0.1 mg/l AIA	DMS
½ MS	0.02	0.01	0.01	NS
B ₅	0.02 ab	0.07 a	0.01 b	0.05
W	0.09	0.04	*	NS

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

* não detectado por CCD.

NS - valor de F não significativo

TABELA 15 : Efeito dos meios de cultura suplementados com GA₃ no teor de ácido artemisinínico (em %) na parte aérea. Avaliação após 14 dias.

Meios de cultura	0 mg/l GA ₃	10 mg/l GA ₃	10 mg/l GA ₃ + 0.1 mg/l AIA
½ MS	0.25	0.25	0.23
B ₅	0.27	0.30	0.20
W	0.38	0.28	0.19

Análise de variância - valor de F não significativo

TABELA 16: Efeito dos meios de cultura suplementados com GA₃ no teor de ácido artemisinínico (em %) nas raízes destacadas. Avaliação após 14 dias.

Meios de cultura	0 mg/l GA ₃	10 mg/l GA ₃	10 mg/l GA ₃ + 0.1 mg/l AIA
½ MS	0.15	0.25	0.24
B ₅	0.16	0.22	0.29
W	0.13	0.19	0.17

A redução em $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ de fosfato do meio White, não mostrou um efeito marcante no crescimento das plântulas de *A. annua* (FÍGURA 16). Entretanto, bastou o acréscimo de CCC nas concentrações de 100 e 150 mg/l para provocar uma diminuição significativa do crescimento das plântulas, sendo que esta diminuição foi da ordem de 50% para os tratamentos 5 e 6. Esse efeito do CCC observado no cultivo de *A. annua*, evidencia o fato que os retardantes de crescimento exercem uma ação bloqueadora do efeito das giberelinas, provavelmente por redução tanto da divisão celular como do alongamento dos tecidos (CONSIDINE, 1983). Sabe-se que a ação de alguns retardantes como AMO 1618 e CCC, é limitada a somente um passo no caminho biossintético de giberelinas (LANG, 1970 apud DOUGLAS and PALEG, 1974; CONSIDINE, 1983; RADEMACHER, 1991). Porém, em trabalhos com plântulas de tabaco observou-se a capacidade do GA_3 para reverter o efeito retardante no crescimento, induzido pelo AMO 1618, CCC e Phosfon D (DOUGLAS and PALEG, 1974).

Neste mesmo experimento não houve surgimento de brotos nas plântulas. De acordo com SHUKLA *et al.* (1992), elevadas concentrações de CCC (1500 e 2000 mg/l) afetam significativamente o aumento em altura das plântulas e concentrações mais baixas (500 mg/l) afetaram o rendimento de matéria fresca de plantas de *A. annua*.

Quanto a massa fresca e a massa seca da parte aérea, tanto a concentração de CCC como a redução do nível de fosfato no meio W não mostraram influenciar significativamente nessas variáveis (FÍGURA 17). Entretanto, observa-se que na presença de CCC (100 mg/l), houve uma maior incorporação de matéria orgânica, estimada pela massa seca.

Em cultura de brotos de *A. annua*, FERREIRA (1994) não encontrou diferenças significativas em concentrações de CCC (0.6, 6.3 e 63.3 μ M) na massa fresca dos brotos quando cultivados em MS, acrescido de hidrolizado de caseína.

A redução da concentração de fosfato do meio W influenciou também a massa fresca e a massa seca das raízes destacadas (FÍGURA 18). No entanto, a adição de CCC aumentou a massa fresca (nos tratamentos 2,6 e 8), apesar de causar redução no crescimento das plântulas (FÍGURA 16). No caso da massa seca, este aumentou com a presença de 100mg/l de CCC, sendo que, este efeito foi semelhante ao observado na massa seca da parte aérea (FÍGURA 17).

Quanto à produção de artemisina, a redução do nível de fosfato no meio W não influenciou muito esta produção. Porém, a produção de artemisinina foi reduzida pela adição de CCC (100 mg/l) no meio com $\frac{1}{2}$ PO_4 (TABELA 17). Enquanto que, no caso da produção de ácido artemisinínico, a adição de CCC (100 mg/l) no meio com $\frac{1}{4}$ de PO_4 , aumentou o teor deste ácido.

No entanto, a adição de CCC (150 mg/l) teve um efeito positivo nos teores de ácido artemisinínico nos meios 1/1 PO₄ e com redução de metade de PO₄ (TABELA 18).

Por outro lado, na raízes destacadas de *A. annua* a produção de ácido diminuiu drasticamente nos meios 1/1 PO₄ e com redução do nível de 1/4 PO₄ acrescidos de 100 mg/l de CCC. Enquanto que, a concentração de 150 mg/l de CCC, provocou um aumento significativo na produção de ácido (TABELA 19), nas raízes esta mesma concentração causou uma redução de crescimento (FÍGURA 18).

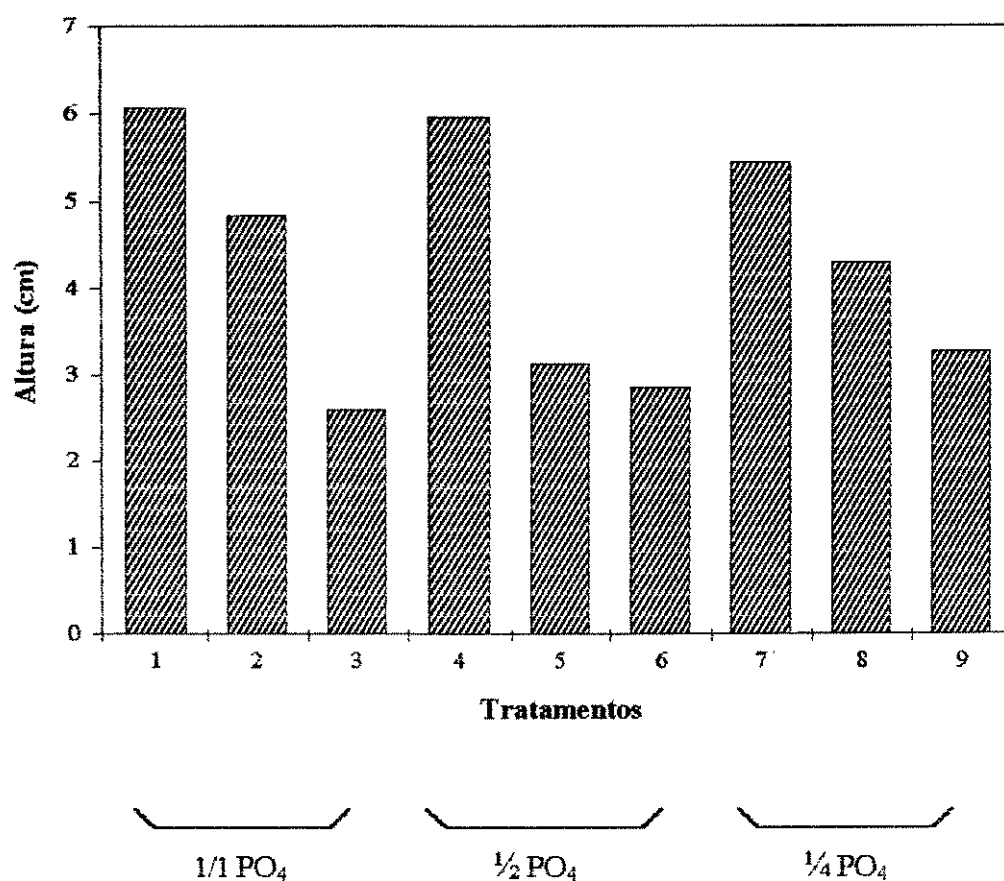
Quanto ao efeito do nitrato, a redução da concentração de 1/2 e 1/4 NO₃ do original em presença de concentrações elevadas de CCC (100 e 150mg/l) causaram uma diminuição no crescimento em altura das plântulas de *A. annua* (FÍGURA 19). O efeito inibidor causado pelo CCC na altura das plântulas de *A. annua*, foi também observado no experimento com redução na concentração de fosfato (FÍGURA 16).

Em trabalho com nutrição mineral em casa de vegetação com *A. annua*, FIGUEIRA (1995) observou uma relação direta entre os níveis crescentes de nitrogênio e o desenvolvimento vegetativo. SHEPHERD (1992), observou que independente da composição de fitoreguladores (ANA, 2,4-D e BA) empregada, um meio mais pobre de nitrogênio contendo 0.5 mM (NH₄)₂SO₄ + 12.4 mM KNO₃ apresentou um melhor resultado na morfogênese *in vitro* de *A. annua*, tanto para a regeneração como para a formação de calos.

Na FÍGURA 20 estão representados os resultados obtidos quanto a massa fresca e massa seca da parte aérea. Observa-se que a redução de nitrato do meio W provocou uma redução na massa fresca, sendo que este mesmo efeito foi observado para a massa seca.. Entretanto, a adição de CCC (100 mg/l) no meio reduzido a um quarto de NO₃ do meio original, estimulou uma maior incorporação de matéria orgânica como também ocorreu com o meio reduzido à metade de NO₃. Resultado semelhante foi obtido por ALMEIDA (1994), a qual verificou que apesar da adição de CCC diminuir a altura das plântulas *in vitro* de *Sinningea alagophylla*, este retardante aumentou tanto a massa fresca e a massa seca da parte aérea, como da raiz.

Para *A. annua*, de acordo com FIGUEIRA (1995), a massa seca das plantas aumentou em proporção direta aos níveis de nitrogênio (0, 70, 140, 210 e 280 mg/l), presentes na solução nutritiva de Sarruge. Além disso, GONÇALVES (1984) observou o aumento de matéria fresca e seca em calos de cana de açúcar, quando houve um aumento na concentração de nitrogênio inorgânico (40 e 60mM) no meio de cultura.

FÍGURA 16: Efeito dos níveis de fosfato do meio de composição de White em presença de CCC no crescimento das plântulas de *A. annua*. Avaliação após 28 dias de cultivo.



Tratamentos: 1 - White com $1/1 \text{ PO}_4$

6 - White com $1/2 \text{ PO}_4$ + 150mg/l CCC

2 - White com $1/1 \text{ PO}_4$ + 100mg/l CCC

7 - White com $1/4 \text{ PO}_4$

3 - White com $1/1 \text{ PO}_4$ + 150mg/l CCC

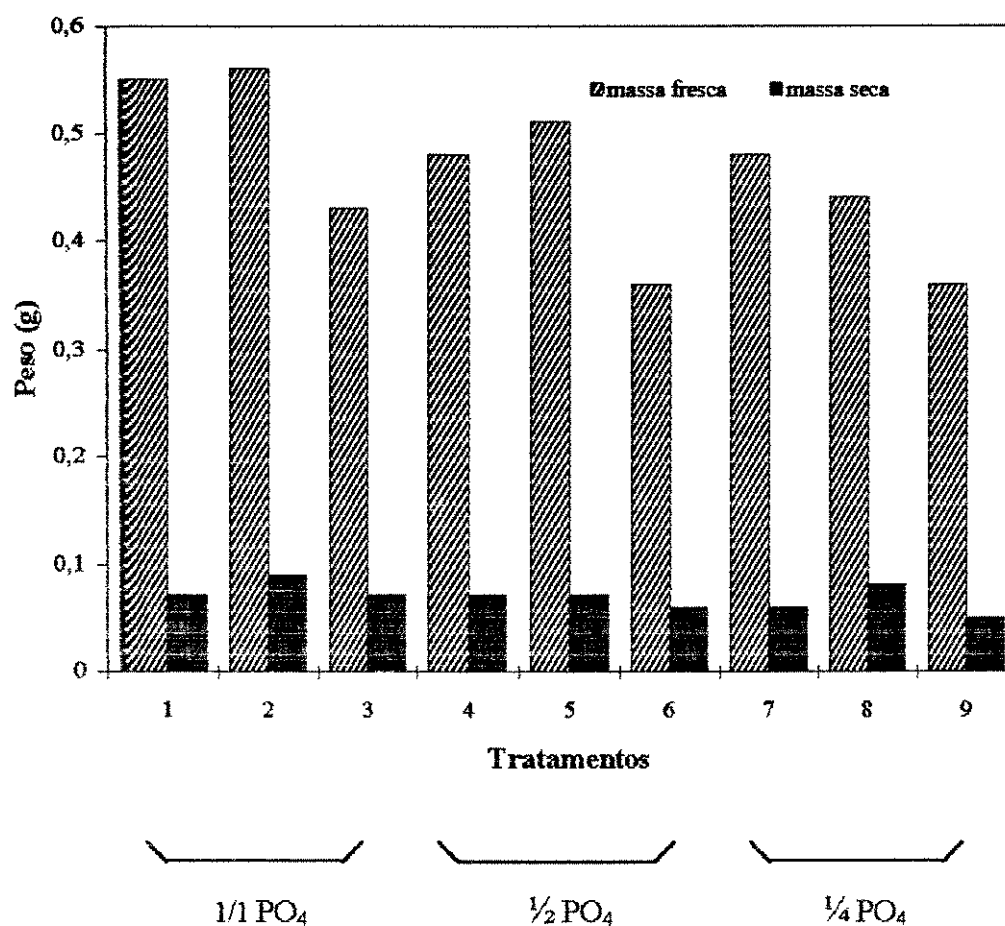
8 - White com $1/4 \text{ PO}_4$ + 100mg/l CCC

4 - White com $1/2 \text{ PO}_4$

9 - White com $1/4 \text{ PO}_4$ + 150mg/l CCC

5 - White com $1/2 \text{ PO}_4$ + 100mg/l CCC

FÍGURA 17: Efeito dos níveis de fosfato do meio de composição de White em presença de CCC na massa fresca e massa seca da parte aérea. Avaliação após 28 dias de cultivo.



Tratamentos: 1 - White com 1/1 PO₄

2 - White com 1/1 PO₄ + 100mg/l CCC

3 - White com 1/1 PO₄ + 150mg/l CCC

4 - White com 1/2 PO₄

5 - White com 1/2 PO₄ + 100mg/l CCC

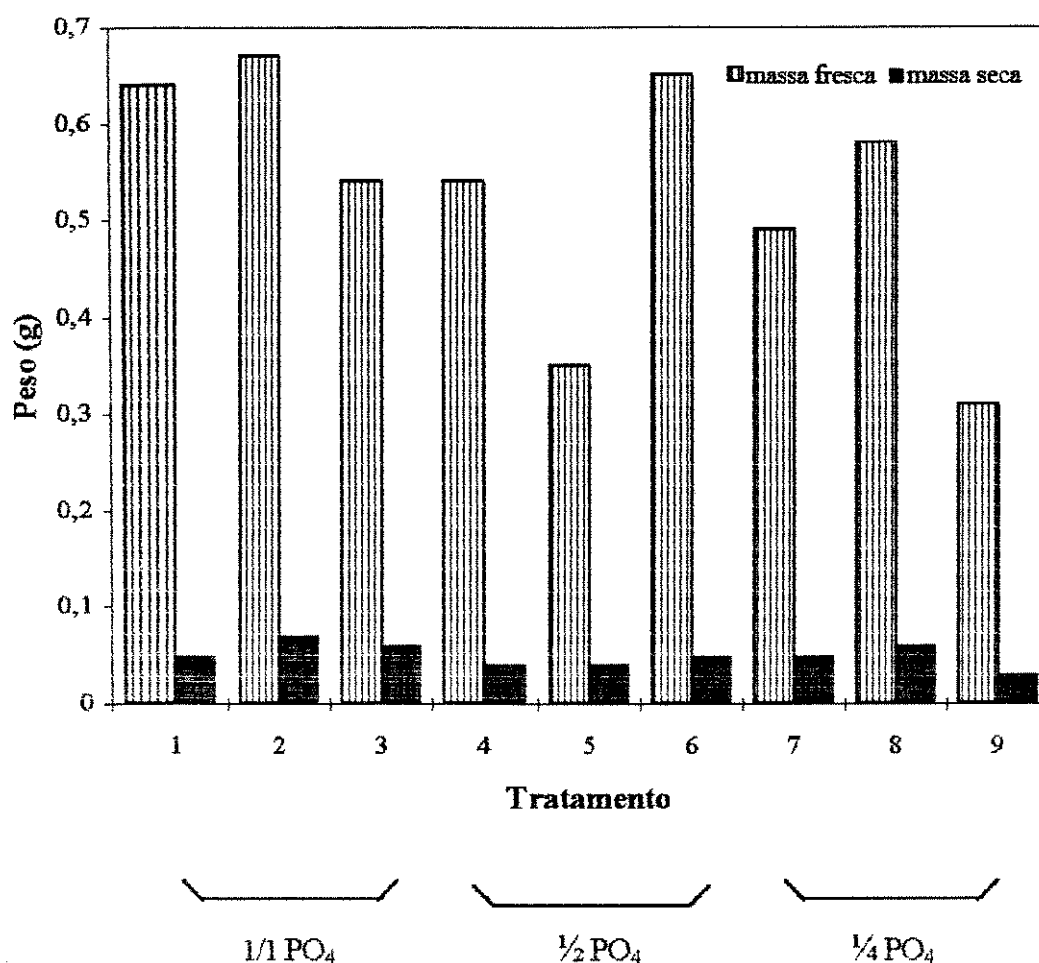
6 - White com 1/2 PO₄ + 150mg/l CCC

7 - White com 1/4 PO₄

8 - White com 1/4 PO₄ + 100mg/l CCC

9 - White com 1/4 PO₄ + 150mg/l CCC

FÍGURA 18: Efeito dos níveis de fosfato do meio de composição de White e das concentrações de CCC na massa fresca e massa seca das raízes destacadas. Avaliação após 28 dias de cultivo.



Tratamentos: 1 - White com 1/1 PO₄

6- White com 1/2 PO₄ + 150mg/l CCC

2 - White com 1/1 PO₄ + 100mg/l CCC

7 - White com 1/4 PO₄

3 - White com 1/1 PO₄ + 150mg/l CCC

8 - White com 1/4 PO₄ + 100mg/l CCC

4 - White com 1/2 PO₄

9 - White com 1/4 PO₄ + 150mg/l CCC

5 - White com 1/2 PO₄ + 100mg/l CCC

TABELA 17: Teores de artemisinina expressos em porcentagens em relação a massa seca da parte aérea. Plântulas de *A. annua*, cultivadas em meio com redução do nível de fosfato e na presença de CCC. Avaliação após 28 dias de cultivo.

Meios de cultura	Concentração de CCC (mg/l)		
	0	100	150
1/1 PO ₄	0.08	0.06	0.07
1/2 PO ₄	0.09	0.03	0.08
1/4 PO ₄	0.07	0.08	0.06

Análise de variância - valor de F não significativo

TABELA 18: Teores de ácido artemisinínico expressos em porcentagens em relação a massa seca da parte aérea. Plântulas de *A. annua*, cultivadas em meio com redução do nível de fosfato e na presença de CCC. Avaliação após 28 dias de cultivo.

Meios de cultura	Concentração de CCC (mg/l)			DMS
	0	100	150	
1/1 PO ₄	0.05 b	0.07 ab	0.26 a	0.21
1/2 PO ₄	*	*	0.25	-
1/4 PO ₄	*	0.23	0.17	NS

Médias seguidas por letra distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

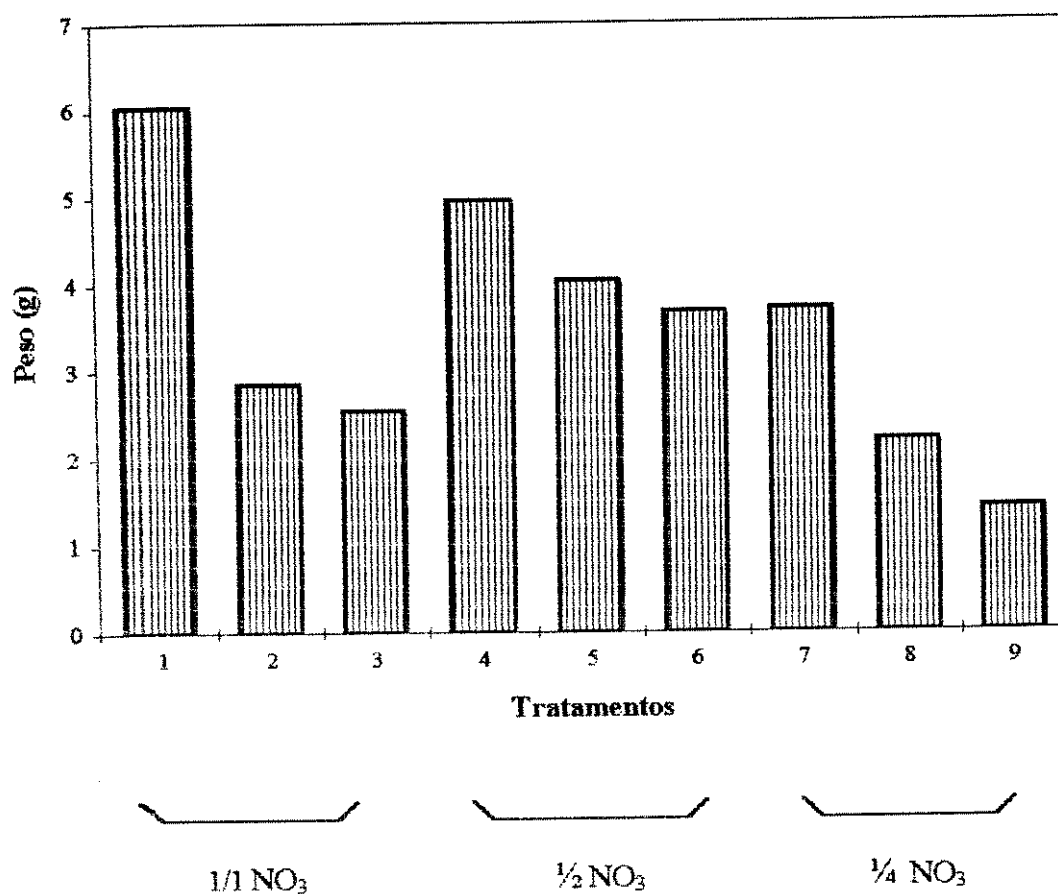
* não detectado por CCD.

NS - valor de F não significativo

TABELA 19: Teores de ácido artemisinínico expressos em porcentagens em relação a massa seca das raízes destacadas das plântulas de *A. annua*, cultivadas em meio com redução do nível de fosfato e na presença de CCC. Avaliação após 28 dias de cultivo.

Meios de cultura	Concentração de CCC (mg/l)		
	0	100	150
W completo	0.09	0.05	0.10
$\frac{1}{2} \text{PO}_4$	0.09	0.09	0.11
$\frac{1}{4} \text{PO}_4$	0.07	0.05	0.15

FIGURA 19: Efeito dos níveis de nitrato do meio W em presença de CCC no crescimento das plântulas de *A. annua*. Avaliação após 28 dias de cultivo.



Tratamentos: 1 - White com 1/1 NO₃

6 - White com 1/2 NO₃ + 150mg/l CCC

2 - White com 1/1 NO₃ + 100mg/l CCC

7 - White com 1/4 NO₃

3 - White com 1/1 NO₃ + 150mg/l CCC

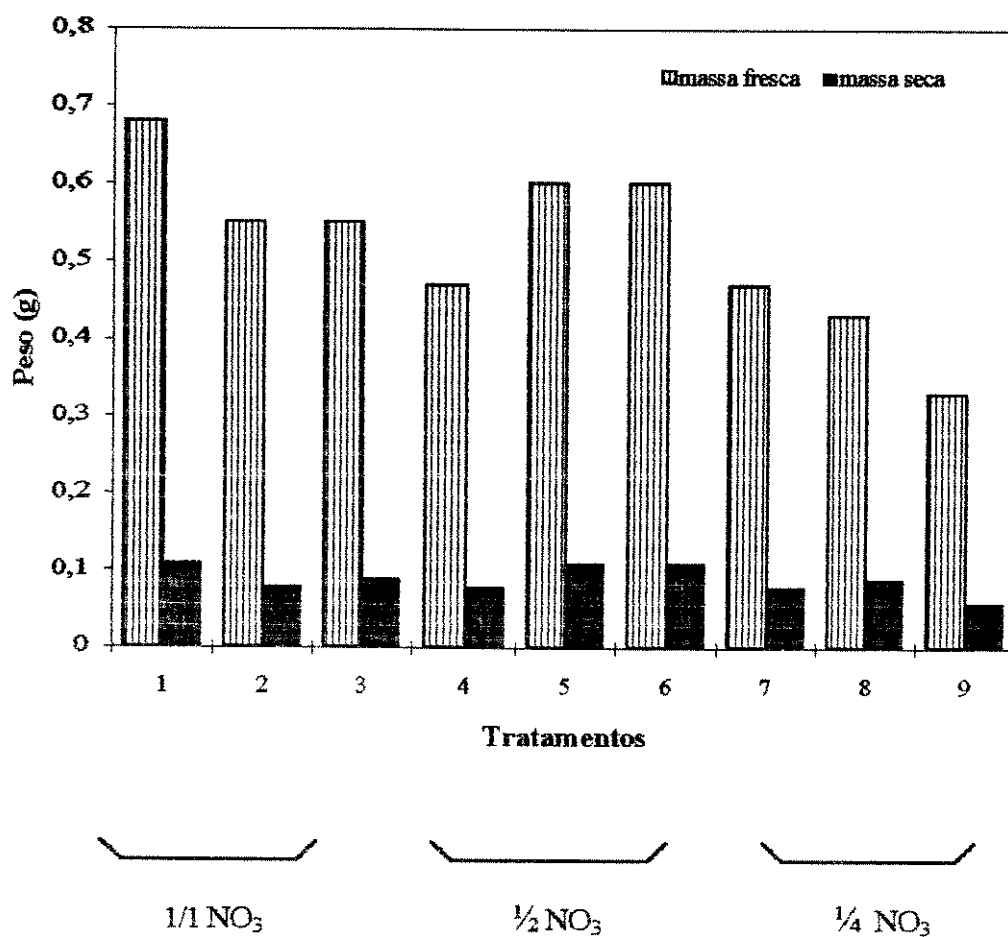
8 - White com 1/4 NO₃ + 100mg/l CCC

4 - White com 1/2 NO₃

9 - White com 1/4 NO₃ + 150mg/l CCC

5 - White com 1/2 NO₃ + 100mg/l CCC

FIGURA 20: Efeito dos níveis de nitrato do meio W em presença de CCC na massa fresca e massa seca da parte aérea. Avaliação após 28 dias de cultivo.



Tratamentos: 1 - White com 1/1 NO₃

2 - White com 1/1 NO₃ + 100mg/l CCC

3 - White com 1/1 NO₃ + 150mg/l CCC

4 - White com 1/2 NO₃

5 - White com 1/2 NO₃ + 100mg/l CCC

6 - White com 1/2 NO₃ + 150mg/l CCC

7 - White com 1/4 NO₃

8 - White com 1/4 NO₃ + 100mg/l CCC

9 - White com 1/4 NO₃ + 150mg/l CCC

A redução da concentração para um quarto de NO_3 da concentração original afetou positivamente a massa fresca das raízes destacadas, além de ter influenciado na maior incorporação de matéria orgânica, representada pela massa seca (FIGURA 21). Em presença de CCC (150 mg/l) no meio 1/1 NO_3 , houve um aumento positivo tanto na massa fresca como na massa seca das raízes destacadas (FIGURA 21). A análise estatística dos resultados mostrou que tanto a composição nutricional dos meios como a adição de CCC nos meios não afetaram significativamente a massa fresca e massa seca das raízes destacadas. PARK *et al.* 1989, observaram que a diferenciação de raízes em cultura de brotos de *A. annua* iniciou-se fortemente após o esgotamento de glicose e nitrato no meio de cultura.

Os retardantes de crescimento são conhecidos por atuarem negativamente no crescimento vegetativo. Porém observou-se que o CCC influenciou no crescimento das raízes (FIGURA 21). Contudo, FERREIRA (1994) observou a diferenciação de raízes na cultura de brotos de *A. annua*, através do número de raízes, tendo observado o aumento deste número em presença de CCC (6.3 μM) e daminozide (62.4 μM). WELANDER (1978), observou que a concentração de 5.0 mM de nitrogênio foi ótima para a formação de raízes em pecíolos de *Pelargonium*, assim como a concentração de 20 g/l de sacarose no meio de cultura. A massa seca aumentou com a elevação da concentração de nitrogênio (10-15 mM).

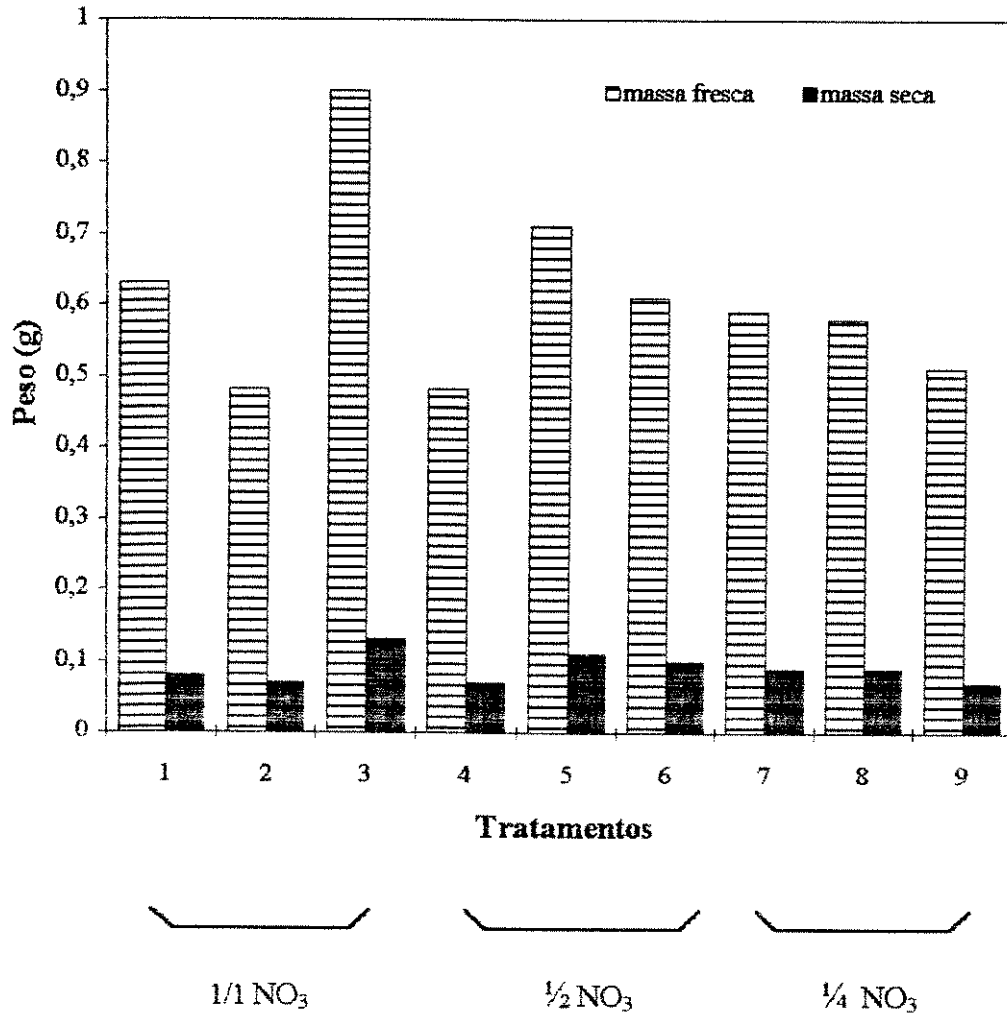
Quanto à influência da concentração de nitrato no meio White e da concentração de CCC no teor de artemisinina nas plântulas de *A. annua*, a TABELA 20 apresenta os resultados obtidos através da detecção deste metabólito por CCD. Nesta tabela pode-se observar que a redução de nitrato não influenciou muito a produção de artemisinina. Entretanto, a presença de CCC (100 mg/l) causou uma diminuição relativa nesta produção, sendo que com a concentração de 150 mg/l no meio com redução de $\frac{1}{4}$ NO_3 , a produção deste metabólito aumentou levemente.

Em relação a produção de ácido artemisinínico na parte aérea, observa-se na TABELA 21, que a redução de $\frac{1}{2}$ NO_3 afetou positivamente essa produção. Já a presença de CCC (150 mg/l) no meio 1/1 NO_3 , este retardante causou um aumento na produção de ácido artemisinínico.

Nas raízes destacadas de *A. annua*, tanto a composição dos meios como a concentração de CCC não influenciaram significativamente no teor de ácido artemisinínico (TABELA 22). Porém ambos meios, o meio 1/1 NO_3 acrescido de 100 mg/l CCC como o meio com redução de $\frac{1}{4}$ NO_3 suplementado com 150 mg/l CCC apresentaram teores mais elevados. Nestas duas combinações de composição de meios de cultura, a concentração de CCC reduziu o crescimento das raízes destacadas (FIGURA 21).

De acordo com VELIKY (1971) o nitrogênio é necessariamente o principal componente do meio de cultura e tanto a qualidade como a quantidade da fonte de nitrogênio influenciam drasticamente no crescimento da cultura, podendo ainda influenciar na bioquímica da célula como também na formação de metabólicos (apud VELIKY and ROSE, 1973; MARTIN *et al.* 1977).

FÍGURA 21: Efeito dos níveis de nitrato no meio W em presença de CCC na massa fresca e massa seca das raízes destacadas. Avaliação após 28 dias.



Tratamentos: 1 - White com 1/1 NO₃

6 - White com 1/2 NO₃ + 150mg/l CCC

2 - White com 1/1 NO₃ + 100mg/l CCC

7 - White com 1/4 NO₃

3 - White com 1/1 NO₃ + 150mg/l CCC

8 - White com 1/4 NO₃ + 100mg/l CCC

4 - White com 1/2 NO₃

9 - White com 1/4 NO₃ + 150mg/l CCC

5 - White com 1/2 NO₃ + 100mg/l CCC

TABELA 20: Influência da concentração de nitrato no meio W em presença de CCC nos teores de artemisinina (%) da parte aérea. Avaliação após 28 dias de cultivo.

Meios de cultura	Concentração de CCC (mg/l)		
	0	100	150
1/1 NO ₃	0.05	0.05	0.04
1/2 NO ₃	0.05	0.04	0.04
1/4 NO ₃	0.04	0.03	0.05

Análise de variância - valor de F não significativo

TABELA 21: Influência da concentração de nitrato no meio W em presença de CCC nos teores de ácido artemísínico (%) na parte aérea. Avaliação após 28 dias de cultivo.

Meios de cultura	Concentração de CCC (mg/l)			DMS
	0	100	150	
1/1 NO ₃	0.07 b	0.07 b	0.19 a	0.07
1/2 NO ₃	0.16 a	0.03 b	0.08 b	0.06
1/4 NO ₃	0.04	0.06	0.05	NS

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

NS - valor de F não significativo

TABELA 22: Influência da concentração de nitrato no meio W em presença de CCC nos teores de ácido artemisinínico(%) nas raízes destacadas. Avaliação após 28 dias de cultivo.

Meios de cultura	Concentração de CCC (mg/l)		
	0	100	150
1/1 NO ₃	0.07	0.10	0.07
½ NO ₃	0.06	0.04	0.03
¼ NO ₃	0.04	0.05	0.09

Análise de variância - valor de F não significativo

6. CONCLUSÕES

- Entre os meios utilizados, o meio de White com menores concentrações de nutrientes e sem amônia, apresentou os melhores resultados para a produção de artemisinina em plântulas de *A. annua*, após 28 dias.
- A produção de ácido artemisinínico mostrou ser maior no período de cultivo por 14 dias, enquanto que a produção de artemisinina foi maior com 28 dias de cultivo, em todos os meios utilizados sem a adição dos fitoreguladores.
- Quanto ao cultivo *in vitro* observou-se que no meio B₅, acrescido de GA₃ (10 mg/l), houve a quebra de dominância apical com estímulo acentuado de brotação de gemas laterais em plântulas intactas de *A. annua*. Estas gemas brotadas corresponderiam a brotos que podem ser utilizados para a micropropagação em larga escala desta planta.
- O GA₃ quando adicionado aos meios de cultura, teve um efeito inibitório na produção de artemisinina e do ácido artemisinínico.
- Os meios 1/2 MS e B₅ acrescidos de GA₃ promoveram uma melhor produção de ácido artemisinínico no período de cultivo por 14 dias.
- A adição do retardante de crescimento (CCC) no meio White além de provocar uma redução no crescimento das plântulas, promoveu um aumento da produção de ácido artemisinínico no cultivo por 28 dias.
- A transformação do precursor, o ácido artemisinínico, em artemisinina apresenta grande complexidade bioquímicas que ainda não está devidamente esclarecida, abrindo portanto, um horizonte para novas pesquisas nessa área.

7. LITERATURA CITADA

- ACTON, A. and KLAYMAN, D. Y. (1985) - Artemisitene, a new sesquiterpene lactone endoperoxide from *Artemisia annua*. *Planta Med* 51: 441-442.
- AKILA, A. A.; THAKUR, R. S. and POPLI, S. P. (1987) - Biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua*. *Phytochemistry* 26(7):1927-1930.
- ALMEIDA, V. P. (1994) - Tuberização em *Sinningea allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae), uma espécie do cerrado. UNICAMP, Tese de doutorado, 168 p.
- ANÔNIMO (1994) - Inventor defende vacina contra malária. *Caderno-Ciência da Folha de São Paulo*, 15 de fevereiro, 10 p.
- ASHER, C. J. and EDWARDS, D. G. (1983) - Modern solution culture techniques. In: *Inorganic Plant Nutrition* (Läuchli, A. and Bielecki, R. L. eds.) *Encyclopedia of plant physiology*. New Series vol. 15 A, Springer-Verlag, p. 94-119.
- BAUER, E. L. (1960) - A statistical manual for chemists. Academic Press, New York and London.
- BENJAMIN, B. D.; SIPAHIMALANI, A. T. and HEBLE, M. R. (1990) - Tissues cultures of *Artemisia pallens*: Organogenesis, terpenoid production. *Plant Cell, Tiss. Organ Cult* 21(2):159-164.
- BORMAN, S. (1991) - Scientists mobilize to increase supply of anti cancer drug taxol. *Chem Eng* 69(35):11-15.
- BOULOS, M. - Proteção parcial reduz dano da malária. *Caderno 2-Especial do O Estado de São Paulo*, 02 de julho de 1995, 4 p.
- BRADFORD, J. A. and FLETCHER, J.S. (1982) - Influence of protein synthesis on NO₃ reduction, NH₄ accumulation and amide synthesis in suspension cultures of Paul's Scarlet Rose. *Plant Physiol* 69(1):63-66.
- BRANDÃO, M. G. L.; BOTELHO, M. G. A. e KRETLI, A. U. (1985) - Quimioterapia experimental antimalárica com produtos naturais: I. Uma abordagem mais racional. *Ciênc Cult* 37(7):1152-1163. Julho.
- BRANDÃO, M. G. L.; CARVALHO, L. H. e KRETLI, A. U. (1991) - Antimaláricos de uso popular na Amazônia. *Ciência Hoje* 13(78):9-11.
- BROWN, G. D. (1992) - Production of anti-migraine and anti-malarial drugs in tissue culture of *Artemisia annua* e *Tanacetum parthenium*. 1° World Congress on Medicinal and Aromatic plants for human welfare. 19-25 july. Maastricht, Netherlands.

- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P. e FERREIRA, M. L. (1991) - Meios nutritivos. In: Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de planta (Torres, A. C. e Caldas, L. S. eds), ABCTP/EMBRAPA, p. 37-70.
- CENTENO, A. J.(1981) - Curso de estatística aplicada à biologia. Ed. da Universidade Federal de Goiás p. 97-129.
- CHAPPELL, J. (1995) - The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiol.* 107:1-6.
- CHEN, P. K. and LEATHER, G. R. (1990) - Plant growth regulatory activities of artemisinin and its related compounds. *J Chem Ecol*, 16(6): 1867-1876.
- CONSIDINE, J. A. (1983) - Concepts and practice of use of plant growth regulating chemicals in viticulture. In: Plant growth regulating chemicals (Nickell, L. G. ed.), vol. I. CRC Press, p. 89-183 .
- CONSTABEL, F. (1990) - Medicinal Plant biotechnology. *Planta Med* 56(5):4212-425.
- COWLEY, G.; MOREAU, R.; BARTHOTEL, J.; MARGOLIS, M. and HAGER, M. (1992) - A killer return. *News Week* 30 nov. p. 38-43.
- CROTEAU, R. (1987) - Terpenoid natural products : A biosynthetic overview. In: Models in plant physiology and biochemistry (Newman, D. W. and Wilson, K. G. eds.), vol.11, CRC Press, pp. 59-63.
- DELABAYS, N. (1992) - The selection of *Artemisia annua* and the genetics of its artemisinin (qinghaosu) content. The genetics of secondary metabolites and the breeding of medicinal and aromatic plants. Proceedings of the 2 nd Mediplant conference Centre Des fougères, Rac, Conthey, Switzerland. 14-15 May, pp. 41-50.
- DELABAYS, N.; BENAKIS, A. and COLLET, G. (1993) - Selection and breeding for high artemisinin (Qinghaosu) yielding strains of *Artemisia annua*. *Acta Horti* 330:203-207.
- DICOSMO, F. and TOWERS, G. H. N. (1984) - Stress and secondary metabolism in cultures plant cells. In: A. Recent advances in phytochemistry - Phytochemical adaptation to stress (Timmermann, B. N.; Steelink, C. and Loewwus, F. eds), vol 18, Plenum Press, New York p. 97-175.
- DOMINGUEZ, X. A. (1973) - Métodos de investigación fitoquímica. Editorial limusa, S.A, p. 45-66.
- DOUGLAS, T. J. and PALEG, L. G. (1974) - Plant growth retardant a inhibitors of sterol biosynthesis in tobacco seedlings. *Plant Physiol.* 54:238-245.
- DUKE, S. O. and PAUL, R. N. (1993) - Development and fine structure of glandular trichomes of *Artemisia annua* L. *Inst. J. Plant Sci.* 154(1):107-118.

- EL-FERALY, F. S.; AL-MESHAL, I. A.; AL-YAHYA, M. A. and HIFNAWY, M. S. (1986) - On the possible role of Qinghao acid in the biosynthesis of artemisinin. *Phytochemistry* 25(12):2777-2778.
- EL-KELTAWI, N. E. and CROTEAU, R. (1986) - Influence of phosfon D and cycocel on growth and essential oil content of sage and peppermint. *Phytochemistry* 25(7):1603-1606.
- ELHAG, H. M.; EL-DOMIATY, M. M.; EL-FERALY, F. S.; MOSSA, F. S. and EL-OLEMI (1992) - Selection and micropropagation of high artemisinin producing clones of *Artemisia annua* L. *Phytother. Res.* 6:20-24.
- ENDRESS, R. (1994) - Plant cells as producers of secondary compounds In: *Plant Cell Biochnology* (Endress, R. ed), Spring-Velag, p. 121-255.
- FERREIRA, J. F. S. (1994) - Production and detection of artemisinin in *A. annua* L. Tese de Doutorado, Purdue University, 125 p.
- FIGUEIRA, G. M. (1995) - Nutrição mineral, produção e concentração de artemisinina em *Artemisia annua* L. ESALQ/USP, Piracicaba, Tese de mestrado, 74p.
- FOWLER, M. W. (1983) - Commercial application and economic aspects of mass plant cell culture. In: *Plant Biotechnology* (Mantell, S. H. and Smith, H. eds), Cambridge University Press, p. 3-37.
- FULZELE, D. P.; SIPAHIMALANI, A. T. and HEBLE, M. R. (1991) - Tissue culture of *Artemisia annua* L. : Organogenesis and artemisinin production. *Phytother. Res.* 5:149-153.
- GIULIETTI, A. M. (1994) - Artemisinin production by transformed shoot cultures of *Artemisia annua* L. In: VIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Firenze, June 12-17, Abstracts, p. 253.
- GONÇALVES, C. H. R. P. (1984) - Efeito da nutrição nitrogenada no crescimento e diferenciação de calos de cana de açúcar (*SACCHARUM* SPP, VAR IAC 48-65). ESALQ/USP, Piracicaba, Tese de mestrado.
- GONDIN, A. (1994) - Brasileiro consegue cura contra malária. Caderno-Ciência da Folha de São Paulo, 5 de março, 12 p.
- GOODWIN, T. W. and MECER, E. I. (1972) - Introduction to Plant Biochemistry, Pergamon Press Ltd, p. 256-283
- GRATTAPAGLIA, D. e MACHADO, M. A. (1990) - Micropropagação. In: *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas* (Torres, A. C. e Caldas, L. S. eds.), ABCT/Embrapa-CNPq, p. 99-169.
- HAGIMORI, M.; MATSUMOTO, T. and OBI, Y. (1992a) - Studies on the production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue culture. III. Effects of nutrients on digitoxin formation by shoot-

- forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. *Plant Cell Physiol.* 23(7):1205-1211.
- HAGIMORI, M.; TAKASHI, M. Y. and OBI, R. Y. (1992b) - Studies on the production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue culture. II. Effect of light and plant growth substances on digitoxin formation by undifferentiated cell and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. *Plant Physiol.* 69:653-656.
- HARBONE, J. B. (1973) - *Phytochemical methods*, Chapman and Hall Ltd, p. 89-131
- HESS, D. (1975) - *Plant physiology- Molecular, Biochemical and Physiological*, Springer-Verlag, p. 99-116.
- HUNECK, S.; ZDERO, C. and BOHLMANN, F. (1986) - Seco guaianolides and other constituents from *Artemisia* species. *Phytochemistry* 25(4):883-889.
- JOHNSON, M. (1993) - Malaria it's back. *Time* 141(22):30-36.
- KELSEY, R. G. and SHAFIZADEH, F. (1980) - Glandular trichomes and sesquiterpene lactones of *Artemisia nova* (Asteraceae). *Biochem Syst Ecol* 8(4): 371-377.
- KLAYMAN, D. L. (1985) - Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science* 228: 1049-1055.
- KLAYMAN, D. L. (1989) - Weeding out malaria. *Nat. Hist.*, p. 18-26.
- KOTHARI, S. L. and CHANDRA, N. (1986) - Adventitious shoot production from stem internode and callus culture of *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit. *J. Plant Physiol.* 124: 409-412.
- KUDAKASSERIL, G. J.; LAM, L. and STABA, E. J. (1987) - Effect of sterol inhibitors on the incorporation of ^{14}C -isopentenyl pyrophosphate into artemisinin by a cell-free system from *Artemisia annua* tissue culture and plants. *Plant Med* 53(3):280-284.
- LÊ, C. L. and COLLET, G. F. (1991) - The *in vitro* culture of *Artemisia annua* L. *Schweiz. Landw. Fo. Rech. Agron. en Suisse* 31(3):111-116.
- LIERSCH, R.; SOICKE, H.; STEHR, C. and TULLNER, H. U. (1986) - Formation of artemisinin in *Artemisia annua* during one vegetation period. *Planta Med* 52:387-390.
- LIMA, M. I. S. (1983) - *Sistemática micromolecular de Artemisia L.* Tese de Mestrado-USP.
- LINDSEY, K. and YEOMAN, M. M. (1983 a) - Novel experimental systems for studying the production of secondary metabolites by plant tissue cultures. In: *Plants Biotechnology* (Mantell, S. H. and Smith, H. eds), Cambridge University Press, p. 39-66.
- LINDSEY, K. and YEOMAN, M. M. (1983 b) - The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. *J. Exp. Bot.* 43:1055-1065.

- MacCARTHY, J. J.; RATCLIFFE, D. and STREET, H. E. (1980) - The effect of nutrient medium composition on the growth cycle of *Catharanthus roseus* G. Don cell grown in batch culture. *J. Exp. Bot.* 31:1315-1325.
- MANTELL, S. H. and SMITH, H. (1983) - Cultural factors that influence secondary metabolite accumulations in plant cell and tissue culture. In: *Plant biotechnology* (Mantell, S. H. and Smith, H. eds., Cambridge University Press, p. 75-108.
- MARCO, J. A.; SANZ-CERVERA, J. F.; MANGLANO, F. S.; RUSTAIYANT, A. and KARDARF, M. (1993) - Sesquiterpene lactones from iranian *Artemisia* species. *Phytochemistry* 43(6):1561-1564.
- MARTIN, S. M.; ROSE, D. and HUI, V. (1977) - Growth of plant cell suspension cultures with ammonium as the sole source of nitrogen. *Can. J. Bot.* 55:2838-2843.
- MROGINSKI, L. A.; ROCA, W. M. (1991) - Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. In: *Cultivos de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos e Aplicaciones* (Roca, W. M.; Mroginski, L. A eds), Centro Internacional de Agricultura Tropical- CIAT, p. 19-40.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. (1962) - A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15:473-497.
- NAIR, M. S. R.; ACTON, N.; KLAYMAN, D. L.; KENDRICK, K.; BASILE, D. V. and MANTE, S. (1986) - Production of artemisinin in tissue culture of *Artemisia annua* L. *J. Nat. Prod.* 49:502-507.
- NETO, R. B. (1993) - Brasil descobre erro no combate à malária. *Caderno-Ciência da Folha de São Paulo*, março 12 p.
- NETTLESHIP, L. and SLAYTOR, M. (1974) - Adaptation of *Peganum harmala* callus to alkaloid production. *J. Exp. Bot.* 25(69):1114-1123.
- NUSSENZWEIG, V. and NUSSENZWEIG, R. (1985) - A vacina é possível: Malária. *Ciência Hoje* 3(16):26-35.
- OHLSSON, A. B. (1990) - Effects of abscisic acid on cardenolide accumulation and growth in *Digitalis lanata* tissue cultures. *J. Plant Physiol.* 136(4):510-512.
- OHLSSON, A. B.; BJÖRK, L. and GATENBECK, S. (1983) - Effect of light on cardenolide production by *Digitalis lanata* tissue cultures. *Phytochemistry* 22(11):2447-2450.
- OLIVEIRA, M. e STRAUSS, J. V. (1993) - Para varrer a malária do mapa. *Globo Ciência* Nº 22, p. 49-52, maio.
- OLIWENSTEIN, L. (1993) - New victories in an old war. *The world of science* 14(6):16-17.
- PANIEGO, N. B. and GIULIETTI, A. M. (1994) - *Artemisia annua* L.: Dedifferentiated and differentiated cultures. *Plant Cell, Tiss. Organ Cult.* 36:163-168.

- PARK, J. M.; HU, W. S. and STABA, E. J. (1989) - Cultivation of *Artemisia annua* L. Plantlets in a bioreactor containing a single carbon and a single nitrogen source. *Biotechnol Bioeng* 34:1209-1213.
- PEÑA, F. (1991) - Agente amarelo: Droga com receita milenar chinesa é a nova arma para combater a malária no País. *Revista Isto é Senhor*, Nº 1148, 25 de setembro, p. 36.
- PEREIRA, R. (1993) - Registrados cinco casos de malária no Rio. *Caderno-Geral do O Estado de São Paulo*, 11 de março, p. 19.
- PRAS, J. M.; VIESSER, J. F. BATTERMAN, S.; WOERDENBAG, H. J. and MALIGRÉ, T. M. (1991) - Laboratory selection of *Artemisia annua* L. for high artemisin yielding types. *Phytochem. Anal.* 2:80-83.
- RADEMACHER, W. (1991) - Inhibitors of gibberellin biosynthesis: applications in agriculture and horticulture. In: *Gibberellin* (Takahashi, W.; Phinney, B. O. and MacMillan, J. eds.), Spring-Verlag, p. 296-310.
- RAMALHO, G. (1988) - A malária não tem graça. *Revista Senhor* Nº 360, 15 de fevereiro, p. 58.
- REIS, J. (1992) - Malária pode ter origem em parasita de aves. *Caderno-Ciência da Folha de São Paulo*, 12 de julho, p. 13.
- ROBERT, M. L.; REYES, J. e LOYOLA, V. M. (1991) - Biosíntesis y bioconversión de metabolitos secundarios por células cultivadas in vitro. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. eds. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT, Colombia, p. 211-238.
- ROTH, R. and ACTON, N. (1989) - A simple conversion of artemisinic acid into artemisinin. *J. Nat. Prod.* 52(5):1183-1185.
- SALISBURY, F. B. and ROSS, C. W. (1992) - Absorption of mineral salts. In: *Plant physiology* (Salisbury, F. B. and Ross, C. W. eds.) 4th ed., Wadsworth Publishing Company, Belmont, p. 136-160.
- SANGWAN, R. S.; AGARWAL, K.; LUTHRA, R.; THAKUR, R. S. and SINGH-SAGWAN, N. (1993) - Biotransformation of arteannuic acid into arteannuin-B and artemisinin in *A. annua*. *Phytochemistry* 43(5): 1301-1302.
- SHEPHERD, S. L. K. (1992) - Nutrição mineral ao nível celular: Alterações quanto à fonte de nitrogênio em *Artemisia annua* L. In: *IX Congresso da Sociedade botânica de São Paulo*. Ilha Solteira, 6-12 de setembro, Resumo, p. 226.
- SHEPHERD, S. L. K. (1995) - O jardim secreto das plantas. *Ciência Hoje* 19(109):59-62.

- SHUKLA, A.; FAROOQI, A. H. A.; SHUKL, Y. N. and SHARMA, S. (1992) - Effect of triacontanol and chlormequat on growth plant hormones and artemisinin yield in *Artemisia annua* L. *Plant Growth Regul* 11:165-171.
- SINGH, A.; VISHWAKARMA, A. and HUSAIN, A. (1988) - Evalutation of *Artemisia annua* L. strains for higher artemisinin production. *Planta Med* 54:475-476.
- SPRING, O.; BIENERT and KLEMT, V. (1987) - Sesquiterpene lactone in glandulartrichomes of sunflower leaves. *J. Plant Physiol.* 130(4/5):433-439.
- SPRING, O.; PRIESTER, T. and HAGER, A. (1986) - Ligth-induced accumulation of sesquiterpene lactones in sunflower seedlings. *J. Plant Physiol.* 123(1):79-89.
- STAFFORD, A. (1991) - Natural products and metabolites from plants and plant tissue cultures. In: *Plant Cell and tissue Culture* (Stafford, A. and Warren, G eds), John Wiley & Sons, New York, p. 124-162.
- STAFFORD, A. (1992) - New pharmaceuticals from plant cell cuture. *Agro-food Industry Hi-tech* 9-13.
- STROBEL, G. A.; STIELE, A.; HESS, W. M. (1993) - Taxol formation yen-taxus. *Plant Sci* 92(1):1-12.
- SUMITA, J. H. A.; HA TIMIR, B. J. and MAHATO, S. B. (1988) - Tissue culture of *Artemisia annua* L. : A potential source of an antimalarial drug. *Curr Sci.* 57(6):344-346.
- TAIZ, L. and ZEIGER, E. (1991) - *Plant Physiology*. The Benjamin Cummings Publishing Company.
- TAM, R.X.; JIA, Z. J. and ZHAO, Y. (1992) - Sesquiterpene lactones and other constituents from *Artemisia feddei*. *Planta Med.* 50: 459-460.
- VELIKY, I. A. and ROSE, D. (1973) - Nitrato and ammonium as nitrogen nutrients for plant cell culturtes. *Can. J. Bot.* 51:1837-1844.
- WELANDER, T. (1978) - Influence of nitrogen and sucrose in the medium and of irradiance of the stock plants on root formation in *Pelargonium* pestioles grown *in vitro*. *Pthysiol. Plant* 43:136-141.
- WHIPKEY, A.; SIMON, J. E.; CHARLES, D. J. and JANICK, J. (1992) - *In vitro* production of artemisinin from *Artemisia annua* L. *Journal of Herbs, Spices Medicinal Plants* 1(1/2):15-25.
- WICKREMESINHE, E. R. M. & ARTECA, R. N. (1993) - Taxus callus ctures. Initiation, growth optimization, charaterization and taxol production. *Plant Cell, Tiss. Organ Cult.* 35:181-193.
- WILSON, G. and MARROM, P. (1978) - Growth and entharquinose biosynthesis by *Gallium molhuo* L. cells in bath and chemostat culture. *J. Exp. Bot.* 29:837-851.

- WOERDENBAG, H. J.; LUGT, C. B. and PRAS, N. (1990) - *Artemisia annua* L.: a source of novel antimalarial drugs. *Pharm Weekbl* 12(5):169-181.
- WOERDENBAG, H. J.; LUERS, F. J.; UDEN, W. V.; PRAS, N.; MALIGRÉ, T. M. and AFTERMAN, A. W. (1993) - Production of the new antimalarial drug artemisinin in shoot culture of *Artemisinin annua* L. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 32:247-257.
- WOERDENBAG, H. J.; PRAS, N.; CHAN, N. G.; BANG, B. T.; BOS, R.; UDEN, W. V.; VAN, P.; BOI, N. V.; BATTERMAN, S. and LUGT, C. B. (1994) - Artemisinin, related sesquiterpenes, and essential oil in *Artemisia annua* during a vegetation period in Vietnam. *Plant Med.* 60:272-275.
- ZAMAN, S. S. and SHARMA, R. P. (1991) - Some aspects of the chemistry and biological activity of artemisinin and related antimalarials. *Heterocycles* 32(8):1593-1638.
- ZHENG, G.Q. (1994) - Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *Artemisia annua*. *Planta Med.* 60:54-57.
- ZONTA, E. P. e MACHADO, A. A. (1992) - SANEST- sistema de análise estatístico para microcomputadores.

8. APÊNDICE

Análises de variância

1. Altura - dados da tabela 7

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	3	0.2231	5.2291 **
fitoreguladores	3	0.1901	4.4566 *
Meios X fitor.	9	0.1234	2.8927 *
Residuo	32	0.0426	
Total	47		

Variações	G.L.	Q.M.	Valor F
Meio (100%)	3	0.1191	2.5122 ^{NS}
Residuo	8	0.0474	
Total	11		

Variações	G.L.	Q.M.	Valor F
Meio (50%)	3	0.2873	6.5059 *
Residuo	8	0.0441	
Total	11		

Variações	G.L.	Q.M.	Valor F
Meio (25%)	3	0.1215	5.3720 *
Residuo	8	0.0226	
Total	11		

Variações	G.L.	Q.M.	Valor F
Meio (0%)	3	0.0325	0.5756 ^{NS}
Residuo	8	0.0564	
Total	11		

2. Massa fresca - dados da tabela 8

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	3	0.0019	0.3717 ^{NS}
fitoreguladores	3	0.0105	1.9711 ^{NS}
Meios X fitor.	9	0.0168	3.1515 *
Residuo	32	0.0053	
Total	47		

Variações	G.L.	Q.M.	Valor F
Meio (100%)	3	0.0108	6.46 *
Residuo	8	0.0016	
Total	11		

Varições	G.L.	Q.M.	Valor F
Meio (50%)	3	0.0171	1.6669 ^{NS}
Residuo	8	0.0102	
Total	11		

Varições	G.L.	Q.M.	Valor F
Meio (25%)	3	0.0195	3.0688 ^{NS}
Residuo	8	0.0063	
Total	11		

Varições	G.L.	Q.M.	Valor F
Meio (0%)	3	0.0195	3.0688 ^{NS}
Residuo	8	0.0063	
Total	11		

3. Massa seca - dados da tabela 9

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	3	0.00008	0.9681 ^{NS}
fitoreguladores	3	0.00013	1.4984 ^{NS}
Meios X fitor.	9	0.00020	2.2395 *
Residuo	32	0.00009	
Total	47		

Varições	G.L.	Q.M.	Valor F
Meio (100%)	3	0.00011	1.6370 ^{NS}
Residuo	8	0.00007	
Total	11		

Varições	G.L.	Q.M.	Valor F
Meio (50%)	3	0.00027	2.1254 ^{NS}
Residuo	8	0.0013	
Total	11		

Varições	G.L.	Q.M.	Valor F
Meio (25%)	3	0.00015	1.5905 ^{NS}
Residuo	8	0.00009	
Total	11		

Varições	G.L.	Q.M.	Valor F
Meio (0%)	3	0.00019	3.1241 ^{NS}
Residuo	8	0.00006	
Total	11		

4. Altura - dados da figura 8

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	20.5056	10.5377 **
fitoreguladores	2	1.5640	0.8037 ^{NS}
Meios X fitor.	4	3.8232	1.9647 ^{NS}
Residuo	18	1.9459	
Total	26		

Teste de Tukey

Meios	Médias dos meios
½ MS	3.66 b
B ₅	3.33 b
W	6.09 a

5. Promoção de brotos - dados da tabela 10

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	35.4360	62.2422 **
fitoreguladores	2	7.8904	13.8594 **
Meios X fitor.	4	1.5684	2.7550 *
Residuo	99	0.5693	
Total	107		

Varições	G.L.	Q.M.	Valor F
Meio (1/2 MS)	2	5.2886	10.5885 *
Residuo	33	0.4994	
Total	35		

Varições	G.L.	Q.M.	Valor F
Meio (B ₅)	2	0.6835	1.15930 ^{NS}
Residuo	33	0.5896	
Total	35		

Varições	G.L.	Q.M.	Valor F
Meio (W)	2	5.0553	8.1681
Residuo	33	0.6189	
Total	35		

6. Massa fresca da parte aérea - dados da figura 9

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	4.1486	37.8512 **
fitoreguladores	2	0.3913	3.5705 *
Meios X fitor.	4	0.1215	1.1091 ^{NS}
Residuo	18	0.1096	
Total	26		

Teste de Tukey

Meios	Médias dos meios	Fitoreg.	Médias dos fitoreg.
½ MS	2.52 a	0 mg/l	2.32 a
B5	2.45 a	10 mg/l GA ₃	2.05 ab
w	1.31 b	GA ₃ + AIA	1.91 b

7. Massa seca da parte aérea - dados da figura 9

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	0.0206	2.9436 ^{NS}
fitoreguladores	2	0.0110	1.5765 ^{NS}
Meios X fitor.	4	0.0081	1.1540 ^{NS}
Resíduo	18	0.0070	
Total	26		

8. Massa fresca das raízes - dados da figura 10

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	0.6701	6.2229 **
fitoreguladores	2	0.5702	5.2950 *
Meios X fitor.	4	0.2076	1.9277 ^{NS}
Resíduo	18	0.1076	
Total	26		

9. Massa seca das raízes - dados da figura 10

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	0.0110	7.1535 **
fitoreguladores	2	0.0049	3.2110 ^{NS}
Meios X fitor.	4	0.0041	2.7002 ^{NS}
Resíduo	18	0.0015	
Total	26		

Teste de Tukey

Meios	Médias dos meios
½ MS	0.20 ab
B ₅	0.23 a
W	0.16 b

10. Teor de artemisinina - dados da tabela 11

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	1	0.0068	16.1354 **
fitoreguladores	2	0.0002	0.6825 ^{NS}
Meios X fitor.	2	0.0005	1.2479 ^{NS}
Resíduo	12	0.0004	
Total	17		

Teste de Tukey

Meios	Médias dos meios
$\frac{1}{2}$ MS	0.02 b
W	0.06 a

11. Teor de ácido artemisinínico - dados da tabela 12

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	0.0023	1.1277 ^{NS}
fitoreguladores	2	0.0112	5.3671 *
Meios X fitor.	4	0.0028	1.3638 ^{NS}
Resíduo	18	0.0020	
Total	26		

12. Teor de ácido artemisinínico das raízes - dados da tabela 13

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	0.00003	0.0536 ^{NS}
fitoreguladores	2	0.00080	1.1480 ^{NS}
Meios X fitor.	4	0.00032	0.1688 ^{NS}
Resíduo	18	0.00069	
Total	26		

13. Altura - dados da figura 12

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	3.4492	2.0430 ^{NS}
fitoreguladores	2	6.4887	3.8433 *
Meios X fitor.	4	2.9367	1.7394 ^{NS}
Resíduo	18	1.6883	
Total	26		

Fitoreg.	Médias dos fitoreg.
0 mg/l	3.16 a
10 mg/l GA ₃	2.98 a
GA ₃ + AIA	1.61 a

14. Promoção de brotos - dados da figura 13

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	3.6931	6.0783 **
fitoreguladores	2	2.4094	3.9655 *
Meios X fitor.	4	0.4859	0.7998 ^{NS}
Resíduo	99	0.6076	
Total	107		

Teste de Tukey

Fitoreg.	Médias dos fitor.	Meios	Médias dos meios
0 mg/l	1.88 b	½ MS	1.87 b
10 mg/l GA ₃	2.34 a	B ₅	2.42 a
GA3+AIA	1.91 ab	W	1.85 b

15. Massa fresca da parte aérea - dados da figura 14

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	0.0150	0.3589 ^{NS}
fitoreguladores	2	0.3396	8.1217 **
Meios X fitor.	4	0.1178	2.8175 ^{NS}
Resíduo	18	0.0418	
Total	26		

Teste de Tukey

Fitoreg.	Médias dos fitoreg.
0 mg/l	1.19 a
10 mg/l GA ₃	1.16 a
GA3+AIA	0.84 b

16. Massa seca da parte aérea - dados da figura 14

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	0.0014	2.1739 ^{NS}
fitoreguladores	2	0.0035	5.2228 *
Meios X fitor.	4	0.0014	2.0679 ^{NS}
Resíduo	18	0.0006	
Total	26		

Teste de Tukey

Fitoreg.	Médias dos fitoreg.
0 mg/l	0.14 a
10 mg/l GA ₃	0.14 a
GA3+AIA	0.10 b

17. Massa fresca das raízes - dados da figura 15

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	0.2126	2.2513 ^{NS}
fitoreguladores	2	0.2993	3.1692 ^{NS}
Meios X fitor.	4	0.1470	1.5569 ^{NS}
Resíduo	18	0.0944	
Total	26		

18. Massa seca das raízes - dados da figura 15

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	0.0003	0.5417 ^{NS}
fitoreguladores	2	0.0023	3.7917 *
Meios X fitor.	4	0.0008	1.3631 ^{NS}
Residuo	18	0.0006	
Total	26		

Teste de Tukey

Fitoreg.	Médias do fitor.
0 mg/l	0.10 a
10 mg/l GA ₃	0.08 ab
GA ₃ +AIA	0.07 b

19. Teor de artemisinina - dados da tabela 14

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	1	0.0013	4.0843 *
fitoreguladores	2	0.0017	5.2068 *
Meios X fitor.	2	0.0016	4.8717 *
Residuo	12	0.0003	
Total	17		

Varições	G.L.	Q.M.	Valor F
Meio (1/2 MS)	2	0.00004	0.2630 ^{NS}
Residuo	6	0.00016	
Total	8		

Varições	G.L.	Q.M.	Valor F
Meio (B ₅)	2	0.0033	6.6430 *
Residuo	6	0.0005	
Total	8		

Varições	G.L.	Q.M.	Valor F
Meio (W)	1	0.0034	3.7139 ^{NS}
Residuo	4	0.0009	
Total	5		

20. Teor de ácido artemisinínico - dados da tabela 15

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	0.0038	0.3415 ^{NS}
fitoreguladores	2	0.0223	1.9626 ^{NS}
Meios X fitor.	4	0.0068	0.6018 ^{NS}
Residuo	18	0.0114	
Total	26		

21. Teor de ácido artemisinínico das raízes - dados da tabela 16

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	0.0086	2.1791 ^{NS}
fitoreguladores	2	0.0196	4.9356 *
Meios X fitor.	4	0.0023	0.5844 ^{NS}
Resíduo	18	0.0039	
Total	26		

Teste de Tukey

Fitoreg.	Médias do fitoreg.
0 mg/l	0.14 b
10 mg/l GA ₃	0.22 ab
GA ₃ +AIA	0.23 a

22. Altura - dados da figura 16

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	0.6368	0.7731 ^{NS}
fitoreguladores	2	19.4757	23.6436 **
Meios X fitor.	4	1.1652	1.4146 ^{NS}
Resíduo	18	0.8237	
Total	26		

Teste de Tukey

Fitoreg.	Médias do fitoreg.
0 mg/l CCC	5.82 a
100 mg/l CCC	4.07 b
150 mg/l CCC	2.89 c

23. Massa fresca da parte aérea - dados da figura 17

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	0.0171	2.0429 ^{NS}
fitoreguladores	2	0.0116	1.3850 ^{NS}
Meios X fitor.	4	0.0166	1.9839 ^{NS}
Resíduo	18	0.0083	
Total	26		

24. Massa seca da parte aérea - dados da figura 17

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	0.00024	1.5227 ^{NS}
fitoreguladores	2	0.00082	5.0682 *
Meios X fitor.	4	0.00005	0.3295 ^{NS}
Resíduo	18	0.00016	
Total	26		

Teste de Tukey

Retardante de cresc.	Médias do retard.
0 mg/l	0.06 ab
100 mg/l CCC	0.08 a
150 mg/l CCC	0.06 b

25. Massa fresca das raízes - dados da figura 18

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	0.0581	1.5175 ^{NS}
fitoreguladores	2	0.0078	0.2056 ^{NS}
Meios X fitor.	4	0.0636	1.6609 ^{NS}
Residuo	18	0.0383	
Total	26		

26. Massa seca das raízes - dados da figura 18

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	0.0008	2.9259 ^{NS}
fitoreguladores	2	0.0004	1.3704 ^{NS}
Meios X fitor.	4	0.0004	1.5185 ^{NS}
Residuo	18	0.0003	
Total	26		

27. Teor de artemisinina - dados da tabela 17

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	0.0001	0.2572 ^{NS}
fitoreguladores	2	0.0011	2.1169 ^{NS}
Meios X fitor.	4	0.0010	1.9847 ^{NS}
Residuo	18	0.0005	
Total	26		

28. Teor de ácido artemisinínico - dados da tabela 18

Variações	G.L.	Q.M.	Valor F
Meio (1/1 PO ₄)	2	0.0426	5.8287 *
Residuo	6	0.0073	
Total	8		

Variações	G.L.	Q.M.	Valor F
Meio (¼ PO ₄)	1	0.0051	0.5495 ^{NS}
Residuo	4	0.0093	
Total	5		

29. Teor de ácido artemisinínico das raízes - dados da tabela 19

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	0.0006	0.9783 ^{NS}
fitoreguladores	2	0.0075	11.4493 **
Meios X fitor.	4	0.0014	2.1860 ^{NS}
Residuo	18	0.0006	
Total	26		

Retardante de cresc.	Médias do retard.
0 mg/l CCC	0.08 b
100 mg/l CCC	0.06 b
150 mg/l CCC	0.12 a

30. Altura - dados da figura 19

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	7.7937	8.2856 **
fitoreguladores	2	13.8980	14.7752 **
Meios X fitor.	4	1.3397	1.4243 ^{NS}
Residuo	18	0.9406	
Total	26		

Meios	Médias dos meios	Retardant. de cresc.	Médias do retard.
1/1 NO ₃	3.80 a	0 mg/l CCC	4.90 a
½ NO ₃	4.22 a	100 mg/l CCC	3.02 b
¼ NO ₃	2.44 b	150 mg/l CCC	2.54 b

31. Massa fresca da parte aérea - dados da figura 20

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	0.0840	9.6853 *
fitoreguladores	2	0.0053	0.6161 ^{NS}
Meios X fitor.	4	0.0225	2.6003 ^{NS}
Residuo	18	0.0086	
Total	26		

Teste de Tukey

Meios	Médias dos meios
1/1 NO ₃	0.59 a
½ NO ₃	0.56 a
¼ NO ₃	0.41 b

32. Massa seca da parte aérea - dados da figura 20

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	0.0010	2.2822 ^{NS}
fitoreguladores	2	0.0001	0.2258 ^{NS}
Meios X fitor.	4	0.0008	1.9556 ^{NS}
Residuo	18	0.0004	
Total	26		

33. Massa fresca das raízes - dados da figura 21

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	0.0296	0.5736 ^{NS}
fitoreguladores	2	0.0291	0.5650 ^{NS}
Meios X fitor.	4	0.0773	1.4984 ^{NS}
Residuo	18	0.0516	
Total	26		

34. Massa seca das raízes - dados da figura 21

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	0.0003	0.2945 ^{NS}
fitoreguladores	2	0.0091	0.7994 ^{NS}
Meios X fitor.	4	0.0018	1.5906 ^{NS}
Residuo	18	0.0011	
Total	26		

35. Teor de artemisinina - dados da tabela 20

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	0.00003	0.1274 ^{NS}
fitoreguladores	2	0.00008	0.3715 ^{NS}
Meios X fitor.	4	0.00022	0.9295 ^{NS}
Residuo	18	0.000237	
Total	26		

36. Teor de ácido artemisinínico - dados da tabela 21

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	0.0079	11.7432 **
fitoreguladores	2	0.0062	9.2217 **
Meios X fitor.	4	0.0110	16.2414 **
Residuo	18	0.0006	
Total	26		

Variações	G.L.	Q.M.	Valor F
Meio (1/1 NO ₃)	2	0.0145	14.4317 **
Residuo	6	0.0010	
Total	8		

Variações	G.L.	Q.M.	Valor F
Meio ($\frac{1}{2}$ NO ₃)	2	0.0134	18.9743 **
Resíduo	6	0.0007	
Total	8		

Variações	G.L.	Q.M.	Valor F
Meio ($\frac{1}{4}$ NO ₃)	2	0.0003	1.1900 ^{NS}
Resíduo	6	0.0003	
Total	8		

37. Teor de ácido artemisinínico das raízes - dados da tabela 22

Causas da variação	G.L.	Q.M.	Valor F
Meios	2	0.0029	2.4895 ^{NS}
fitoreguladores	2	0.0003	0.3122 ^{NS}
Meios X fitor.	4	0.0019	1.6484 ^{NS}
Resíduo	18	0.0011	
Total	26		