

Ana Paula Pellegrino

**“AVALIAÇÃO ATRAVÉS DE TÉCNICAS DE  
CULTURA DE TECIDOS DA PRODUÇÃO DE  
ANTIMALÁRICOS EM GENÓTIPOS SELECIONADOS**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) Ana Paula Pellegrino  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

24/3/2000

*Simone Lili Kirszenzhaft Shepherd*  
**DE *Artemisia annua* L.”**

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Doutor em Biologia Vegetal.

**ORIENTADOR: Profa. Dra. Simone Liliane Kirszenzhaft Shepherd**

2000

0008385

CHAMADA :  
UNICAMP  
P364a  
Ex.  
180 BC/ 41448  
C. 278/00  
:  D   
08. R\$ 11,00  
A 11-07-00  
CPD

CM-00142426-0

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

**Pellegrino, Ana Paula**

**P634a** Avaliação através de técnicas de cultura de tecidos da  
produção de antimaláricos em genótipos selecionados de  
*Artemisia annua* L./Ana Paula Pellegrino. - - Campinas, SP:  
[s.n.], 2000  
128f: ilus.

Orientadora: Simone Liliane Kirszenzaft Shepherd  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas,  
Instituto de Biologia.

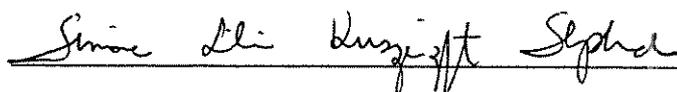
1. *Artemisia annua*. 2. Plantas medicinais. 3. Malaria-tratamento.  
I. Shepherd, Simone Liliane Kirszenzaft. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 24 de março de 2000

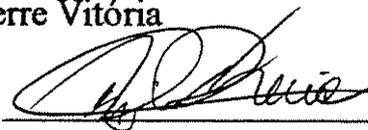
Banca Examinadora:

Titulares:

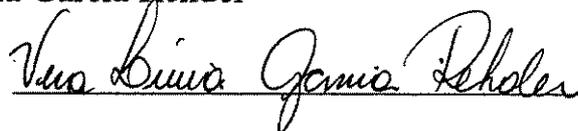
Profa. Dra. Simone Liliane Kirszenzaft Shepherd (orientador)

  
\_\_\_\_\_

Profa. Dra. Angela Pierre Vitória

  
\_\_\_\_\_

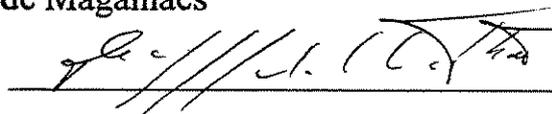
Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder

  
\_\_\_\_\_

Profa. Dra. Mary Ann Foglio

  
\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Pedro Mellilo de Magalhães

  
\_\_\_\_\_

Suplentes:

Profa. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Jorge Vega

\_\_\_\_\_

*Aos meus pais, pela constante amizade,  
incentivo e apoio,*

*e ao Cícero, companheiro  
de todos os momentos.*

*Com amor.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela força e iluminação que me possibilitaram concluir este trabalho.

À Profa. Dra. Simone L. K. Shepherd pela orientação e amizade incondicional ao longo de todos estes anos.

Aos Prof. Dr. Vera Rehder, Mary Ann Foglio e Pedro Mellilo de Magalhães pela inestimável ajuda na pré-banca, sem a qual a finalização deste trabalho não teria sido possível.

Aos amigos e colegas do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP pelo carinho e companheirismo, em especial à Kátia Viviane Gonçalves pela presença e amizade constantes, e aos professores pelo conhecimento transmitido durante esses anos de estudo.

Aos funcionários do Departamento e das Secretarias de Pós-Graduação pela disponibilidade e ajuda, em especial à Josênia pelas dicas e pelo apoio, e à Dulce Regina G. Joaquim pelos valiosos ensinamentos no laboratório.

À CAPES pela bolsa concedida.

*“A vida é como andar de bicicleta:  
a gente só cai quando pára  
de pedalar”*

## ÍNDICE

Abreviaturas .....	i
Resumo .....	iii
Summary .....	v
1. Introdução Geral .....	1
1.1. A Malária .....	1
1.2. A planta <i>Artemisia annua</i> L. ....	7
1.3. A artemisinina .....	10
1.4. Objetivo Geral .....	13
Capítulo I – Influência das condições de cultivo sobre o crescimento e a produção de ácido artemisinínico em raízes transformadas do híbrido “Ch x Viet 55” de <i>A. annua</i> L.....	15
1. Introdução .....	15
2. Objetivos .....	19
3. Materiais e Métodos .....	21
4. Resultados e Discussão .....	33
5. Conclusões .....	49

Capítulo II – Avaliação do crescimento e da produção de artemisinina em híbridos “Ch x Viet 55” e “39 x 1V” de <i>A. annua</i> L. micropropagados e obtidos por sementes.....	51
1. Introdução .....	51
2. Objetivos .....	55
3. Materiais e Métodos .....	57
4. Resultados e Discussão .....	63
5. Conclusões ..	75
Capítulo III– Avaliação comparativa dos níveis de artemisinina, clorofilas e carotenóides em genótipos híbridos e em uma população não melhorada da planta medicinal <i>A. annua</i> L. ....	77
1. Introdução .....	77
2. Objetivos .....	81
3. Materiais e Métodos .....	83
4. Resultados e Discussão .....	89
5. Conclusões .....	97
Conclusões Gerais .....	99
Literatura Citada .....	101

## ABREVIATURAS

½ MS: meio de Murashige & Skoog com a concentração de sais diluída à metade.

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

AIA: ácido indol-acético.

AIB: ácido indol-butírico.

ANA: ácido naftalenoacético.

BA: 6-benziladenina.

CCD/DT: cromatografia em camada delgada com detecção fotodensitométrica.

CCD: cromatografia em camada delgada.

cpm: contagens por minuto.

CPQBA: Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas.

dCTP: deoxicitidina trifosfato.

DNA: ácido desoxiribonucléico.

EDTA: etileno diamina tetra acético.

FPP: farnesil pirofosfato.

IPP: isopentenil pirofosfato.

kb: kilobase (número de bases em milhares).

KIN: cinetina (6-furfuriladenina).

MCA: metanol:clorofórmio:água.

MEDIPLANT: Centre de Recherches sur les Plantes Médicinales et Aromatiques.

MS: meio de sais minerais de Murashige & Skoog (1962).

P.A.: para análise.

pRi: plasmídeo do *Agrobacterium rhizogenes*.

RNA: ácido ribonucléico.

RNase: ribonuclease.

SDS: sódio dodecil sulfato.

SSC: sódio sarcosil citrato.

T-DNA: região do plasmídeo que é transferida para a planta, após a integração no genoma vegetal (DNA transferido).

Tris – HCl: tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto.

Tris: tris (hidroximetil) aminometano.

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas.

## RESUMO

A malária é uma das mais graves moléstias das regiões tropicais, com 300 a 500 milhões de casos clínicos e mais de 1 milhão de mortes anuais. O parasita causador da doença é o *Plasmodium*, transmitido pela picada do mosquito *Anopheles* e que adquiriu resistência aos medicamentos tradicionais. Atualmente um dos principais tratamentos para os casos mais graves da malária resistente causada pelo *P. falciparum* utiliza derivados semi-sintéticos da artemisinina, produto natural isolado da *Artemisia annua* L., espécie nativa da China e aclimatada em vários países, inclusive no Brasil. O principal objetivo deste trabalho foi avaliar, com a utilização de técnicas de cultura de tecidos, genótipos híbridos de *A. annua* altamente produtivos em artemisinina e com florescimento tardio, obtidos pelo programa de melhoramento da MEDIPLANT e do CPQBA/UNICAMP. Raízes transformadas via *Agrobacterium rhizogenes* do híbrido Ch x Viet 55 foram avaliadas quanto ao potencial de crescimento e produção de ácido artemisinínico, e quanto a ação de reguladores de crescimento sobre as culturas “in vitro”. O pico de crescimento de biomassa das culturas “in vitro” foi determinado como sendo aos 28 dias de cultivo, e a desdiferenciação foi maior quando da adição de auxinas no meio de cultura, confirmando resultados descritos na literatura para tecidos não transformados. Embora as raízes transformadas tenham apresentado ácido artemisinínico em quantidades maiores (0,48 g / kg massa seca) que as raízes normais (0,16 g / kg massa seca), as quantidades produzidas ainda não foram suficientes para um cultivo com finalidades comerciais. Também foi estabelecido um protocolo de micropropagação e aclimação para os híbridos Ch x Viet 55 e 39 x 1V com a obtenção de 50-60 plântulas fenotipicamente fiéis às plantas matrizes em cada sub-cultura, sendo obtido máximo enraizamento (100%) com 2 mg/L de AIB aos 12 dias

após a transferência das plântulas. As curvas de crescimento e produção de massa, as análises de açúcares e de artemisinina não apresentaram diferenças significativas entre as plantas matrizes e micropropagadas, e validaram o processo de micropropagação para a manutenção dos híbridos e de seus parentais. Na última etapa, os híbridos Ch x Viet 55 e 39 x 1V foram cultivados “in vitro”, aclimatados e comparados com uma população não melhorada de *A. annua*. Os híbridos apresentaram superioridade de crescimento e elevados teores de artemisinina, proteínas, açúcares, clorofilas e carotenóides. A população melhorada apresentou rendimento em artemisinina de 37,72 mg de artemisinina por planta (folhas secas), contra 11,61 mg da população não melhorada. Os teores de clorofilas e de carotenóides acompanharam os níveis de artemisinina apresentados pelas duas populações, evidenciando a existência de uma correlação positiva entre esses compostos de origem biossintética comum e possibilitando um acompanhamento indireto dos teores de artemisinina através das análises de clorofilas e carotenóides.

## SUMMARY

Malaria is one of the most serious diseases in the tropical regions, with 300-500 million clinical cases and more than 1 million deaths a year. The pathogenic agent, *Plasmodium*, which is transmitted by the bite of the *Anopheles* mosquito is resistant against the traditional medicines. One of the main treatment for resistant malaria caused by *P. falciparum* uses semi-synthetic artemisinin derivatives, a natural product from *Artemisia annua* L., native from China and adapted in various places, including Brazil. The main objective of this work was to evaluate *A. annua* hybrid genotypes rich in artemisinin and with late blooming, obtained by breeding program of MEDIPLANT and CPQBA/UNICAMP, with tissue culture techniques. We obtained transformed roots in Ch x Viet 55 hybrid by *Agrobacterium rhizogenes* and they were evaluated in relation to their potential growth, artemisinic acid production and effects of growth regulators of cultures "in vitro". The biomass growth peak was on the 28<sup>th</sup> day of cultivation, and the greater dedifferentiation with the addition of auxin in the culture medium, in accordance with results obtained previously in non-transformed tissues. The transformed root cultures showed greater yields of artemisinic acid (0,48 g / kg dry weight) than normal roots (0,16 g / kg dry weight), but the yields were not sufficient for commercial cultivation. We also obtained a micropropagation and climate adaptation protocol for Ch x Viet 55 and 39 x 1V hybrids, that resulted in a 50-60 plants phenotypically identical to the original plants in each subculture, and we obtained maximal rooting (100%) in 2 mg/L IBA, 12 days after seedlings were transferred. The curves of growth and mass production, and the analysis of sugar and artemisinin did not show differences between micropropagated and original plants, and they validated micropropagation process to maintenance of hybrid and parental plants. In the final experiment, we cultivated and climate adapted Ch x Viet 55 and 39 x 1V hybrids, and we compared them with a non selected *A. annua* population. The hybrids showed a growth superiority in association with high levels of

artemisinin, protein, sugar, chlorophyll and carotenoids. The hybrids resulted in 37,72 mg artemisinin in each plant (dry leaves), against 11,61 mg in non selected population. Chlorophyll and carotenoid levels were in accordance with artemisinin levels showed by hybrids and non selected population, making clear the existence of a positive correlation between these compounds: chlorophylls and carotenoids. These compounds have the same biosynthetically origin and these results make possible a indirect measurement of artemisinin yields by chlorophyll and carotenoid analysis.

# 1. INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1. A MALÁRIA

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde, a malária é atualmente a mais importante doença parasitária tropical, e mata mais que todas as outras doenças registradas, com exceção da tuberculose (WHO, 1998). Conhecida desde a antiguidade, já existiam descrições da malária em antigos manuscritos egípcios datados do século XVI a.C.. Associada à sintomas como febres e tremores, a doença veio novamente a ser descrita na Grécia clássica por discípulos de Hipócrates, os primeiros a perceber a associação entre a malária e a ocorrência de febres a intervalos regulares. Na mesma época, em torno do século V a.C. esses mesmos estudiosos observaram a ligação das febres com os pântanos. No século XVII os italianos acreditavam que a contaminação pela malária ocorria devido ao "ar ruim" (*mal aria*) que se respirava próximo à locais pantanosos, originando o termo *malaria* tal como o conhecemos e que foi incluso na literatura médica inglesa durante a primeira metade do século XIX. Até hoje a denominação da doença em francês (*paludisme*) e em espanhol (*paludismo*) derivam do latim *palus*, que significa pântano (Klayman, 1989; The Atlantic Monthly, 1997).

A malária manifesta-se normalmente em regiões quentes e úmidas com temperaturas acima de 20°C e umidade relativa do ar maior que 55%, e encontra-se em crescimento em várias áreas. Ocorrem anualmente 300 a 500 milhões de casos clínicos de malária resultando em mais de 1 milhão de mortes, sendo a grande maioria entre crianças com menos de 5 anos de idade (WHO, 1998). Quase 90% dos casos ocorre na África, mas grandes áreas da Ásia, América Central e América do Sul contribuem significativamente para o aumento dessas estatísticas, sendo que somente no Brasil 400 mil casos foram notificados para o ano de 1997 (SUCEN, 1999). A Organização Mundial da Saúde estima ainda que cerca de 40% da

população mundial sofre riscos de ser contaminada pelo parasita, e que a malária ainda é um sério problema em mais de 90 países, habitados por cerca de 2400 milhões de pessoas (WHO, 1998).

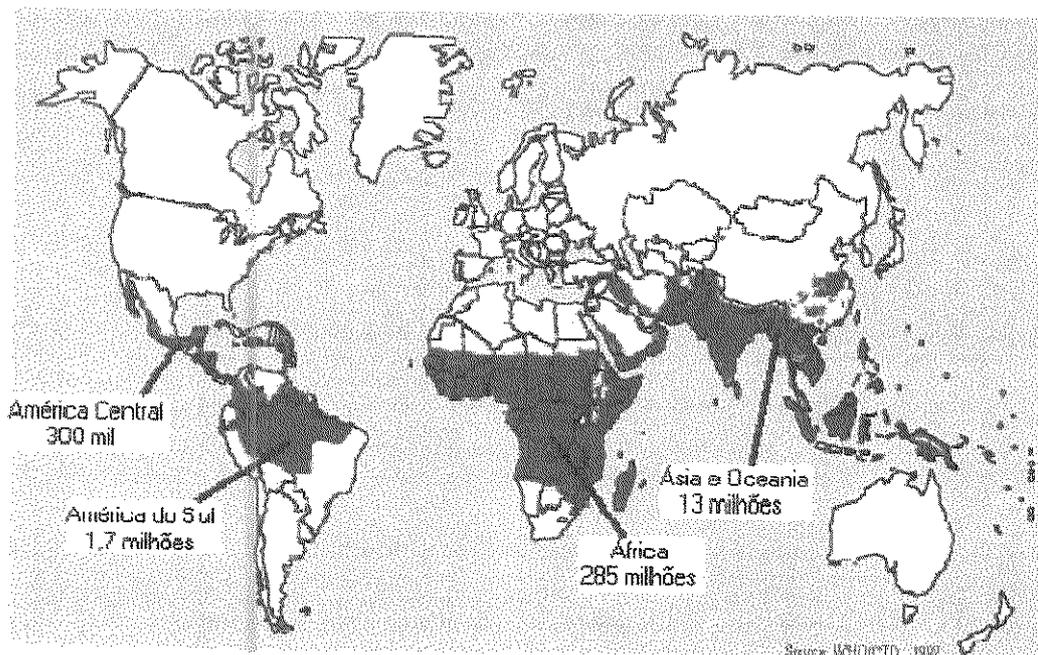


Figura 1. Áreas de transmissão da malária e estimativa do número de pessoas infectadas anualmente no mundo (adaptado de Marchese, 1999; WEHI, 1999 e WHO, 1998).

Os agentes causadores da malária em seres humanos são quatro espécies de protozoários do gênero *Plasmodium*: *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. falciparum*. Desses, o *P. falciparum* causa a forma aguda mais severa e letal da doença, a malária cerebral. A malária é transmitida pelas fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles* (Klayman, 1989). Estes são preferencialmente rurais, habitando florestas e matas e suas proximidades, principalmente perto de lagoas e águas limpas, mas também vivem dentro e ao redor das residências próximas a áreas de grande vegetação. Têm hábitos crepusculares e noturnos, não sendo comum se alimentarem durante o dia. Proliferam-se em águas limpas e no Brasil distribuem-se por todo o país, com

exceção das áreas de seca no Nordeste e do extremo sul. No Estado de São Paulo são encontrados na região da Serra do Mar e na região Oeste do Estado, onde transmitem a doença de forma natural. No entanto, a malária notificada no Estado de São Paulo, em sua grande maioria, provém de outras regiões do país (284 casos dos 323 notificados no ano de 1997) (SUCEN, 1999).

A forma infecciosa do parasita que é introduzida no hospedeiro pela picada do mosquito corresponde aos esporozoítos, que após circular brevemente pela corrente sanguínea chegam até as células do fígado, onde se instalam sem provocar sintomas e se transformam em formas chamadas exoeritrocíticas. Cada uma produz milhares de parasitas (merozoítos) que, após alguns dias caem na corrente sanguínea e invadem as hemácias, onde se multiplicam. Alguns merozoítos se transformam em gametócitos (masculinos e femininos), formas que poderão ser apanhadas por um mosquito ao picar o indivíduo infectado, iniciando um novo ciclo (Figura 2). Os sintomas tais como calafrios e febre, aparecem no hospedeiro quando as hemácias são destruídas e os merozoítos libertados (Nussenzweig & Nussenzweig, 1985; SUCEN, 1999; WEHL, 1999).

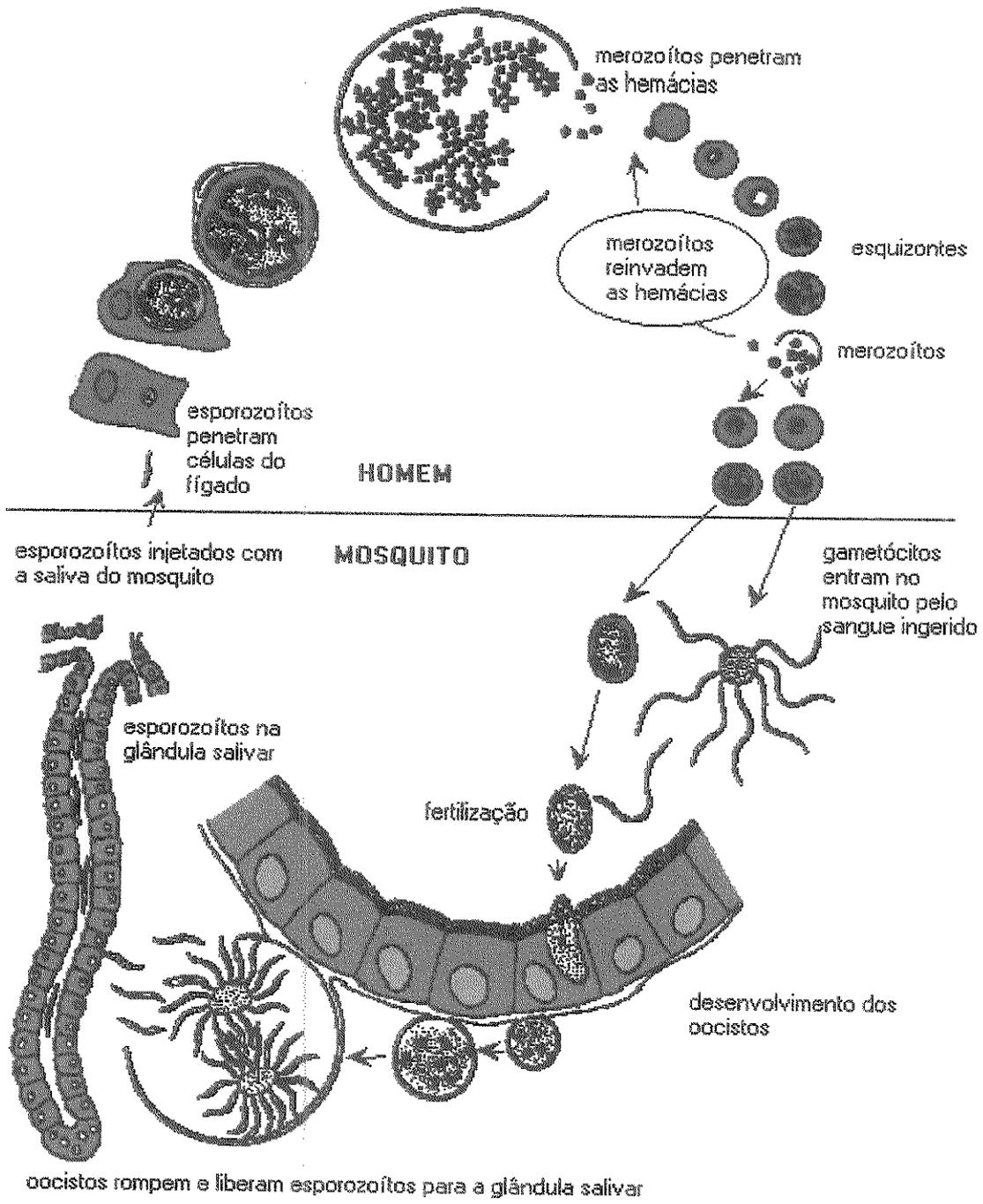
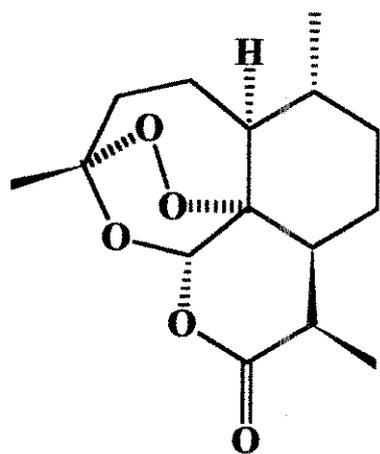


Figura 2. Ciclo do *Plasmodium* (adaptado de WEHI, 1999).

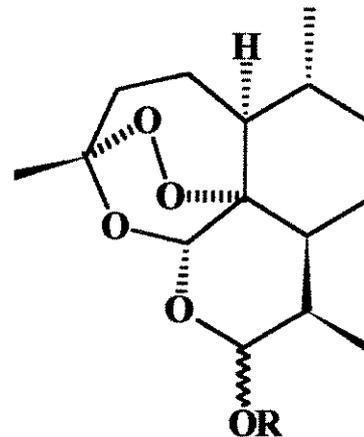
Ao contrário de muitas moléstias que produzem resistência a reinfecções ao longo da vida a malária somente causa imunidade após muitas infecções recorrentes ao longo dos anos. Além disso, a imunidade adquirida desse modo é apenas parcialmente efetiva e resulta em infecções brandas e às vezes assintomáticas, apesar da presença dos parasitas. Esse tipo de imunidade também não dura por muito tempo, ao menos que seja reforçada por reinfecções freqüentes. No entanto, observa-se que em áreas endêmicas as pessoas que sobreviveram a uma infecção pelo *P. falciparum* durante a infância desenvolvem um certo grau de imunidade à doença (Klayman, 1989; Nussenzweig & Long, 1994; WHO, 1998).

As tentativas de controle e tratamento da malária não são recentes. Em 1834 os químicos franceses Pierre Pelletier e Joseph Caventou isolaram um alcalóide da árvore cinchona, a quinina, que se tornou o principal tratamento disponível durante muitos anos (Klayman, 1985; 1989). Até hoje os indivíduos infectados vêm sendo tratados com drogas derivadas de quinina, principalmente a cloroquina, embora o *P. falciparum* tenha se tornado geneticamente resistente ao tratamento. Na última década as pesquisas relativas ao desenvolvimento de vacinas evoluíram consideravelmente, existindo atualmente mais de dez substâncias em estudo, algumas já na fase de testes clínicos. No entanto, estima-se que uma vacina efetiva no controle da doença, somente esteja disponível nos próximos 7 a 15 anos (WHO, 1998; Marchese, 1999). Até que se consiga obter vacinas a preços acessíveis e promover vacinações em massa, a melhor alternativa para o tratamento de casos graves de malária resistente causada por *P. falciparum* é a utilização de derivados semi-sintéticos da artemisinina, produto natural da planta *A. annua* L. que vêm se mostrando bastante eficaz no tratamento dos indivíduos infectados pelo parasita (Klayman, 1985; WHO, 1998; Marchese, 1999). A artemisinina caracteriza-se por apresentar baixa solubilidade, tanto em óleo quanto em água, o que dificulta a sua administração. Por isso vêm sendo desenvolvidos derivados semi-sintéticos da artemisinina, com melhores características de

solubilidade, como por exemplo arteéter e arteméter (ambos solúveis em óleo), e artesunato de sódio, solúvel em água (figura 3).



**Artemisinina**



**Artemeter**  $R=CH_3$

**Arteéter**  $R=CH_2CH_3$

**Artesunato de sódio**  $R=COCH_2CH_2COONa$

**Figura 3.** Artemisinina e derivados arteméter, arteéter e artesunato de sódio.

## 1.2. A PLANTA *A. annua* L.

*A. annua* L. faz parte da mais tradicional medicina chinesa, sendo conhecida como *qinghaosu* (erva verde) e vem sendo utilizada há séculos para tratamento de vários tipos de moléstias, incluindo febres de diferentes origens. É uma planta aromática anual que ocorre naturalmente como parte da vegetação de estepe do norte das províncias de Chahar e Suiyuan (40° N, 109° L) na China, entre 1000 e 1500 metros acima do nível do mar, porém atualmente também aparece de maneira selvagem em outros países. A espécie foi introduzida no Brasil em 1987 pelo CPQBA/UNICAMP, que desde então vem realizando experimentos e observando o comportamento da espécie com o objetivo de otimizar o cultivo em nossas condições (Figueira, 1995).

Dicotiledônea anual, pertence à família *Asteraceae*, tribo *Anthemidae*. É cultivada na Europa pelas suas qualidades aromáticas e na China como planta medicinal (Klayman, 1989; Woerdenbag *et al.*, 1994). O óleo essencial da *A. annua* vem também sendo usado na produção de vermute como aromático (Anônimo, 1992), e na indústria de fragrâncias (Charles *et al.*, 1991).

A planta apresenta caráter arbustivo com altura variando entre 0,8 e 2,0 metros (Ferreira & Janick, 1996). Propaga-se vegetativamente e por sementes, reproduzindo-se naturalmente por fecundação cruzada (Magalhães, 1996). É sensível ao comprimento do dia, havendo na literatura variações quanto ao fotoperíodo crítico para indução da floração, desde 11 horas (Magalhães, 1996) até 12 a 14 horas (Geldre *et al.*, 1997). A planta floresce cerca de duas semanas após a indução (Ferreira, 1994).

As folhas de *A. annua* são cobertas de tricomas glandulares (Duke *et al.*, 1987; Duke & Paul, 1993), cada um deles composto de dez células diferenciadas em cinco pares de células, cada par aparentemente com funções diferentes conforme deduz-se a partir

das diferenças ultraestruturais (Duke & Paul, 1993), e sabe-se que um biotipo de *A. annua* desprovido de tais glândulas não apresenta artemisinina. Daí se conclui que a artemisinina é seqüestrada nos tricomas glandulares da *A. annua*, visto que flores e folhas, estruturas ricas em artemisinina apresentam abundantes tricomas glandulares (Duke *et al.*, 1994; Ferreira *et al.*, 1995). O conteúdo de artemisinina é 4 a 11 vezes mais alto nas inflorescências que nas folhas, durante o florescimento (Ferreira & Janick, 1996), no entanto existem discordâncias a respeito de em que fase os maiores níveis de artemisinina ocorrem. Alguns autores apontam que o conteúdo de artemisinina é maior imediatamente antes do florescimento (Acton & Klayman, 1985; Woerdenbag *et al.*, 1991, 1993, Foglio, 1996; Magalhães, 1996), enquanto outros indicam como sendo durante o pleno florescimento (Pras *et al.*, 1991; Ferreira, 1994, Ferreira & Janick, 1996).

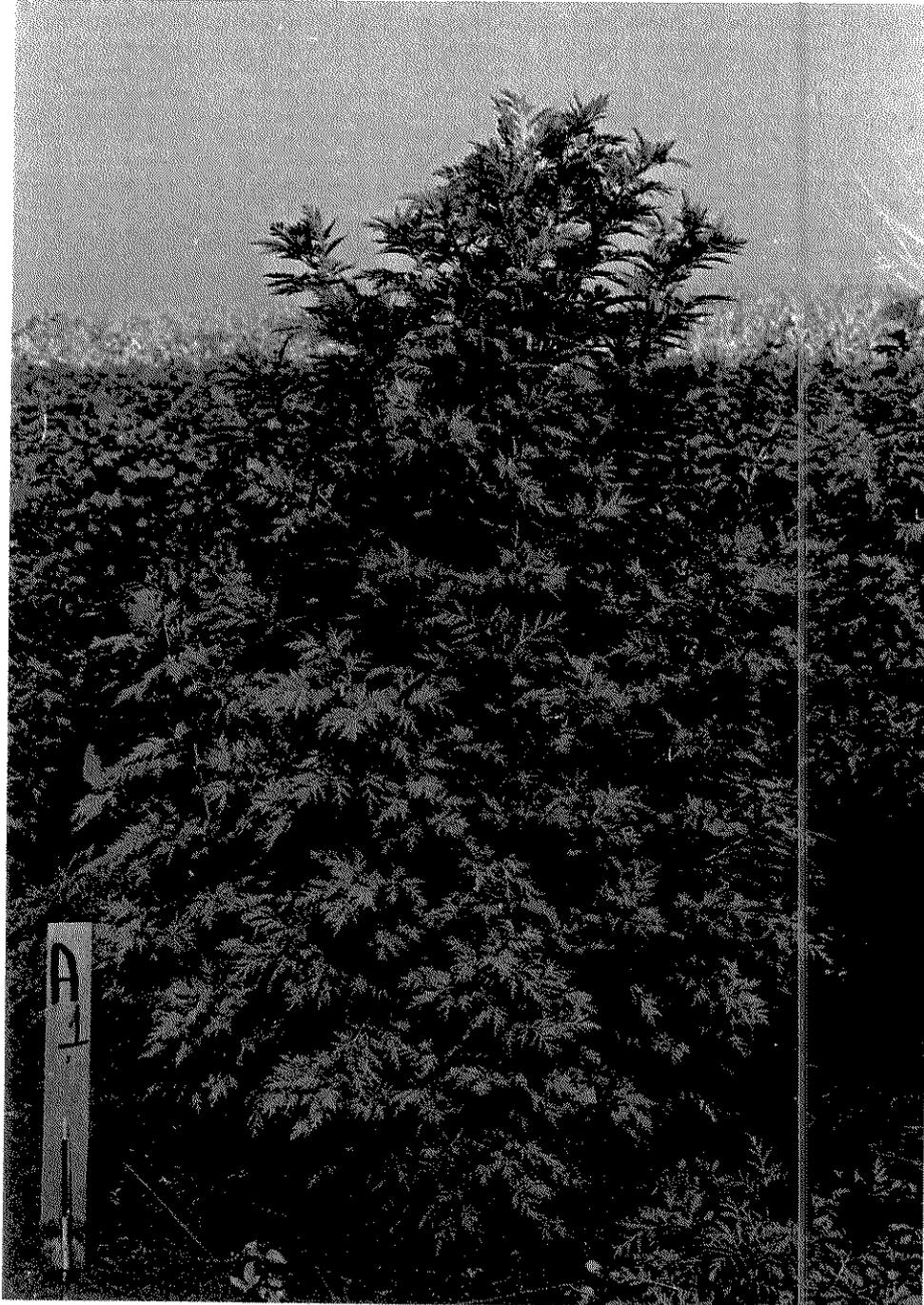


Figura 4. Planta de *A. annua* L. cultivada no Brasil (híbrido "Ch x Viet.55"), em estágio de corte.

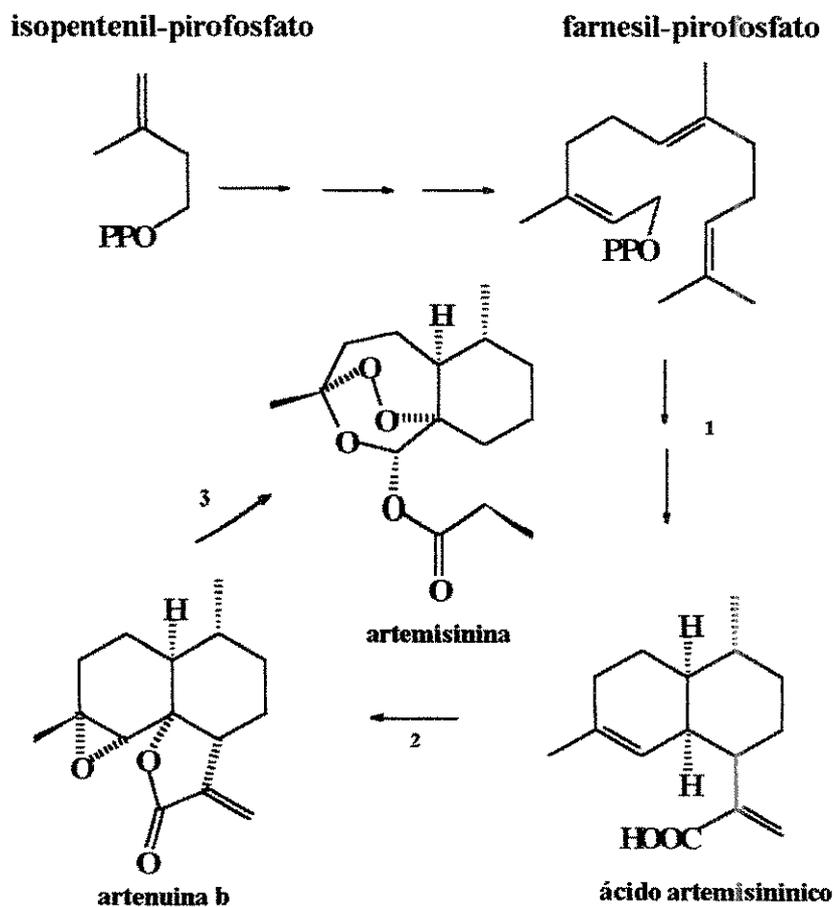
### 1.3. A ARTEMISININA

No final da década de 60, motivados pelo aparecimento das formas de *P. falciparum* resistentes a cloroquina, um grupo de cientistas chineses iniciou pesquisas visando comprovar cientificamente a atividade antimalárica da *A. annua* L. e isolar o composto químico responsável pela ação medicinal da planta. Em 1972 foi isolada uma lactona sesquiterpênica com ação efetiva no controle da malária, sendo denominada *qinghaosu* (erva verde) ou artemisinina (Klayman, 1985; 1989; Ferreira, 1994; Woerdenbag *et al.*, 1994; Magalhães, 1996). A atividade terapêutica da artemisinina baseia-se na redução do peróxido orgânico pelo ferro armazenado pelo parasita a partir da hemoglobina do hospedeiro, formando intermediários altamente reativos responsáveis pela morte do *Plasmodium* (Posner *et al.*, 1995).

A síntese orgânica total da artemisinina já foi estabelecida (Schmid & Hofheinz, 1983; Xu *et al.*, 1986; Avery *et al.*, 1987; Ravindranath *et al.*, 1990; Avery *et al.*, 1992), porém devido ao grande número de etapas e ao baixo rendimento, esta via de obtenção de artemisinina é inviável técnica e economicamente, o que faz com que a planta *A. annua* L. continue sendo uma alternativa válida para a obtenção de artemisinina nos dias de hoje.

A via biossintética da artemisinina ainda não foi completamente estabelecida, embora alguns passos da sua biotransformação já tenham sido elucidados. O farnesil-pirofosfato (FPP) forma-se a partir da condensação do isopentenil-pirofosfato (IPP) com o geranyl-pirofosfato (GPP) (Mann, 1987; McGarvey & Croteau, 1995; Dey & Harborne, 1997). De acordo com Akhila *et al.* (1987), o FPP é um dos precursores iniciais da via biossintética da artemisinina, sendo a artenuína B seu precursor imediato. Estudos posteriores sugeriram que o ácido artemisinínico é sintetizado a partir da ciclização do IPP, não sendo, no entanto, precursor direto da artemisinina (Akhila *et al.*, 1990). Outros autores sugerem o ácido artemisinínico como sendo um possível precursor biogenético da artenuína B (ElFeraly *et al.*, 1986; Jung *et al.*, 1990; Nair

& Basile, 1993; Brown, 1994), sendo a artenuína B o precursor da artemisinina. Na figura 5 a seguir estão mostradas as principais vias descritas na literatura para a biossíntese da artemisinina.



**Figura 5.** Vias de biossíntese propostas para artemisinina. 1. (Akhila *et al.*, 1990); 2. (El-Ferly *et al.*, 1986; Jung *et al.*, 1990; Nair & Basile, 1993; Brown, 1994); 3. (Akhila *et al.*, 1987; Sangwan *et al.*, 1993; Nair & Basile, 1993; Brown, 1994)

#### 1.4. OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar, quanto à produção de compostos anti-maláricos, híbridos de *A. annua* altamente produtivos obtidos pelo programa de melhoramento desenvolvido pela MEDIPLANT e posteriormente pelo CPQBA/UNICAMP. Para isso, foram escolhidos os híbridos Ch x Viet 55 e 39 x 1V, sendo utilizadas algumas técnicas de cultura de tecidos adequadas à manutenção desses genótipos melhorados, que foram adaptadas aos híbridos estudados. Em um primeiro momento, foi utilizada a transformação via *Agrobacterium rhizogenes* para avaliação de culturas de raízes transformadas com relação ao potencial de crescimento e produção de ácido artemisinínico, além da avaliação da ação de reguladores de crescimento sobre as culturas. Posteriormente, foi estabelecido um protocolo para micropropagação e aclimação dos híbridos no ambiente local, sendo avaliada a ocorrência de variações somaclonais e a manutenção dos níveis de artemisinina nas plantas micropropagadas. Finalmente, os híbridos foram comparados com uma população não melhorada com relação aos padrões de crescimento e biomassa, e analisados quanto à existência de interações entre compostos anti-maláricos, clorofilas e carotenóides, compostos de origem biossintética comum.

**CAPÍTULO I - INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO "IN VITRO" SOBRE  
O CRESCIMENTO E A PRODUÇÃO DE ÁCIDO ARTEMISINÍNICO EM RAÍZES  
TRANSFORMADAS DO HÍBRIDO Ch x Viet 55 DE *A. annua* L.**

**1. INTRODUÇÃO**

O gênero *Agrobacterium* de bactérias de solo possui a capacidade de induzir hipertrofias em plantas, especialmente em dicotiledôneas. Compreende várias espécies, sendo o *A. rhizogenes* de grande importância para processos relacionados à biotecnologia vegetal. É o agente causador da "síndrome de raízes em cabeleira", que se caracteriza pelo crescimento lento e anormal de grande quantidade de raízes (Gordon, 1981).

Apesar de se conhecer tanto as bactérias quanto os sintomas decorrentes de sua infecção desde o início do século, a chave da indução desses sintomas foi encontrada somente há cerca de 20 anos (Zaenen *et al.*, 1974; Van Larebeke *et al.*, 1975; Van Sluys, 1999) com a descoberta de grandes elementos extracromossômicos (os plasmídeos) abrigando genes diretamente envolvidos na indução da doença. Com a descoberta da base genética do processo tornou-se claro que a manifestação dos sintomas estaria relacionada à transferência dos genes da bactéria para a planta, causando assim uma transformação no genoma da planta hospedeira. A partir de então o *Agrobacterium* passou a ser associado à possibilidade de utilização como vetor para transferência de genes entre plantas, dando início ao grande volume de pesquisas executadas na área durante os últimos anos.

Com a infecção pelo *Agrobacterium*, ocorre a transferência de um fragmento específico de DNA (denominado T-DNA) da bactéria para a planta e a expressão desse T-DNA após a integração no genoma vegetal. Algum tempo após a infecção, as hipertrofias começam a

se desenvolver devido às divisões celulares estimuladas pela produção de auxinas e citocininas, comandada pelo T-DNA. Estes hormônios, embora sendo moléculas orgânicas relativamente simples são poderosos agentes de crescimento que controlam vários aspectos relativos à proliferação, alongamento e diferenciação celulares. Como consequência de um balanço hormonal desregulado induzido pelo T-DNA, a multiplicação celular torna-se descontrolada e inicia-se o desenvolvimento do tumor.

Os tumores do tipo "raízes em cabeleira", causados pela infecção por *A.rhizogenes*, são formados unicamente por células transformadas, constituindo assim clones celulares (Chilton *et al.*, 1982; David *et al.*, 1984; Bercetche *et al.*, 1987). Proliferam-se geralmente de modo organizado (embora descontrolado), resultando em uma abundante produção de raízes no local da inoculação. As raízes em cabeleira apresentam um fenótipo bem definido em relação às raízes normais de uma mesma espécie sendo que, quando cultivadas *in vitro*, em geral crescem mais rapidamente que as culturas normais, apresentando alta incidência de ramificações e ausência de geotropismo (David *et al.*, 1984). Na maioria dos casos esse fenótipo característico em cultivo *in vitro* pode ser considerado como um bom marcador genético para a transformação. A natureza clonal das raízes em cabeleira, aliada ao fato de que estas apresentam um fenótipo bastante específico e facilmente distinguível das células normais torna relativamente fácil o isolamento das raízes transformadas.

O cultivo de raízes transformadas obtidas a partir da inoculação pelo *A.rhizogenes* apresenta-se viável para a obtenção de vários compostos secundários de plantas. Como as culturas de raízes transformadas apresentam elevada produtividade devida às altas velocidades de crescimento, em conjunto com uma boa estabilidade genética e bioquímica, observamos nos últimos anos um aumento nas pesquisas de protocolos viáveis para a produção de metabólitos secundários com aplicações químicas e farmacêuticas. Muitos desses compostos

possuem valor de mercado elevado, justificando sua exploração mesmo para culturas com capacidade de síntese pequena (Hamill *et al.*, 1987).

Os compostos sintetizados em cultura pelas raízes transformadas normalmente se limitam aos produzidos pelas raízes das plantas normais em uma mesma espécie (Hamill *et al.*, 1986; Kamada *et al.*, 1986) e eventuais diferenças provavelmente se devem à ausência dos efeitos de transporte nas plantas inteiras. Segundo Endress (1994), a produção dos compostos secundários em culturas de raízes transformadas ocorre exclusivamente como efeito da rizogênese relacionada à morfologia alterada dessas raízes.

Embora as culturas de raízes normais (não transformadas) também possam ser utilizadas para a produção de compostos secundários para muitas espécies, tanto a produção como a manutenção das culturas de raízes normais apresenta-se difícil, acrescido ao fato do qual a suplementação de auxina necessária para otimizar o crescimento das raízes normais pode causar a modificação na produção dos metabólitos secundários (Hashimoto *et al.*, 1986; Norton & Towers, 1986). Uma das grandes vantagens do cultivo de raízes transformadas são os altos níveis de produtividade em relação aos metabólitos secundários. Como a transformação normalmente não afeta as quantidades relativas de compostos secundários sintetizados e as concentrações geralmente se encontram nos mesmos níveis que nas raízes não transformadas (Endress, 1994), as diferenças básicas referem-se à taxa de crescimento das culturas e aos níveis de produção constantes. O cultivo de raízes transformadas é vantajoso, pois origina culturas de crescimento mais rápido que de raízes normais, sem necessidade de adição de reguladores de crescimento e sem decréscimo na produção de compostos. Além disso, o número de cromossomos das raízes transformadas permanece idêntico ao da planta matriz da qual origina-se a cultura, mantendo-se durante várias gerações e garantindo a preservação da integridade estrutural do sistema das raízes. Por isso os níveis de crescimento e de síntese de compostos secundários permanecem igualmente estáveis durante longos períodos (Hamill *et al.*, 1987).

Pelos motivos expostos as culturas de raízes transformadas vêm sendo desenvolvidas visando a produção de compostos do metabolismo secundário de plantas, em especial produtos de interesse farmacêutico. A produção de raízes transformadas via *A. rhizogenes* é viável no caso de *A. annua* e, como em raízes normais, as raízes transformadas produzem ácido artemisinínico e não produzem artemisinina, segundo dados anteriores obtidos por Pellegrino (1995), que obteve ácido artemisinínico em raízes transformadas de *A. annua* a partir do *A. rhizogenes* cepa 8196 em populações de plantas oriundas das primeiras introduções da espécie no CPQBA/UNICAMP. Além de ser um precursor biossintético amplamente utilizado na semi-síntese da artemisinina, o ácido artemisinínico pode ser produzido como fonte de substrato quiral para produção de novos compostos com atividades farmacológicas a partir das raízes transformadas de *A. annua*, por isso o interesse no estabelecimento de cultivos a partir de materiais geneticamente melhorados. Sabe-se que o estabelecimento de estratégias eficientes para a transformação de plantas via *Agrobacterium* depende de uma interação bem sucedida entre o patógeno e a planta (Machado et al., 1997; Banerjee et al., 1997; Vergauwe et al., 1998). Como a cepa 8196 do *A. rhizogenes* mostrou-se a mais adequada para transformação de *A. annua* em experimentos anteriores, optou-se por essa cepa para o estabelecimento de raízes transformadas dos híbridos melhorados pelo CPQBA/UNICAMP.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- a) determinar o protocolo para estabelecimento de culturas de raízes transformadas de *A. annua* a partir de sementes dos híbridos Ch x Viet 55 obtidos no programa de melhoramento desenvolvido pelo CPQBA/UNICAMP.
- b) determinar as taxas de crescimento das raízes obtidas, através de medidas de massa fresca e massa seca, além da dosagem de açúcares no meio de cultura.
- c) dosar o ácido artemisinínico produzido na fase de pico de crescimento das culturas de raízes transformadas e comparar com a produção obtida por raízes normais, investigando as possibilidades de produção de ácido a níveis significativos pelo híbrido “Ch x Viet 55” através da metodologia utilizada.
- d) verificar a ação de reguladores de crescimento sobre o crescimento e a morfologia das raízes transformadas em cultura.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL VEGETAL, BACTERIOLÓGICO E REAGENTES UTILIZADOS

As plantas de *A. annua* utilizadas como fonte de explantes para este trabalho foram germinadas e cultivadas *in vitro* a partir de híbridos desenvolvidos no CPQBA/UNICAMP. Para todos os experimentos foram utilizadas sementes do híbrido Ch x Viet 55, rico em artemisinina e de florescimento tardio (Magalhães, 1996). As sementes foram armazenadas em condições constantes de temperatura (10°C) e umidade (70%).

As culturas de bactérias da cepa selvagem de *A. rhizogenes* 8196 foram mantidas em meio LB (Sambrook *et al.*, 1989), a 5°C (em geladeira), e repicadas a cada 30 dias. Após a repicagem as bactérias foram mantidas no escuro, à  $25 \pm 2$  °C por 48 horas, período necessário para o crescimento das colônias. Os estoques foram mantidos em geladeira. Por ocasião da inoculação das plantas de *A. annua* com o *A. rhizogenes*, uma nova repicagem foi feita, sendo estas as colônias utilizadas para inoculação nas plantas.

Todos os reagentes utilizados para as análises químicas são de grau P.A. (para análise). O ácido artemisinínico utilizado como padrão nas análises foi cedido pela Divisão de Fitoquímica do CPQBA, na concentração de 0,2 µg/µL (ponto de fusão obtido = 129,5 – 130°C). Os extratos foram aplicados por microseringas Hewlett-Packard 9301-0246 com capacidade de 10 µL. Utilizou-se também uma cuba cromatográfica de vidro para eluição e uma estufa para aquecimento das cromatoplasmas para permitir a visualização dos resultados. As semi-quantificações do ácido artemisinínico foram feitas em fotodensitômetro PHARMACIA BIOTECH / IMAGE MASTER 1D.

Para as análises moleculares os reagentes utilizados foram todos provenientes da Sigma ou Merck. O desoxirribonucleotídeo radioativo ( $\alpha$ - $^{32}$ P)dCTP foi fornecido pela Amersham. O "Kit Multiprimer" para marcação radioativa da sonda foi adquirido da Gibco. A resina Sephadex G-50 fina foi produzida pela Sigma (S-5897). As endonucleases de restrição foram adquiridas da Pharmacia. As membranas de nylon utilizadas para o "Dot Blot" foram as "Gene Screen Plus" Hybridization Transfer Membrane produzidas pela DuPont. O filme de raio-X e as soluções para revelação e fixação do filme da membrana foram fornecidas pela Kodak.

Todas as soluções-estoque utilizadas nas análises moleculares foram preparadas de acordo com SAMBROOK *et al.* (1989), sendo as seguintes:  $\beta$ -mercaptoetanol (14,4 M), KOAc (5 M), Brometo de etídeo (10 mg/mL), NaOH (10 N), NaCl (5 M), NaOAc (3 M), Tris HCl pH 7,5 (1 M), Tris pH 8,0 (1 M), EDTA pH 8,0 (0,5 M), SDS (20X), SSC (20X).

### 3.2. METODOLOGIA DE TRANSFORMAÇÃO

Para germinação *in vitro* as sementes de *A. annua* L. foram esterilizadas por imersão em uma solução a 1% de fungicida (marca comercial Benlate, grupo químico benzimidazol), por 10 minutos, seguida por imersão em álcool 70% (20 segundos) e em seguida NaOCl 1% (hipoclorito de sódio P.A. 5-6%) por 12 minutos. A seguir as sementes foram lavadas três vezes com água destilada estéril. Para inoculação e cultivo das sementes de *A. annua* foi utilizado o meio básico de sais minerais de Murashige & Skoog (1962), sem adição de reguladores de crescimento. Os frascos, após a inoculação, foram mantidos à temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , sob luz branca incandescente (intensidade 3000 lux) em fotoperíodo de 16 horas.

As plântulas obtidas foram sub-cultivadas por 4 meses até alcançarem cerca de 3 cm de altura (figura 1), sendo nessa fase inoculadas com o *A. rhizogenes* cepa 8196. As inoculações foram feitas na extremidade basal das estacas, com 2 ou 3 pares de folhas, com o ápice e as raízes das plântulas removidos. As inoculações foram feitas individualmente, totalizando 30 estacas, e o material inoculado foi mantido à temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sob luz branca incandescente (intensidade 3000 lux) em fotoperíodo de 16 horas.

Após cerca de 30 dias de inoculação das estacas com a bactéria *A. rhizogenes* cepa 8196 começou-se a visualizar raízes no ponto de inoculação (figura 2). Quando as raízes crescidas atingiram cerca de 1 cm de comprimento foi feito o isolamento das mesmas em meio básico de sais minerais de Murashige & Skoog (1962) com a concentração de macronutrientes

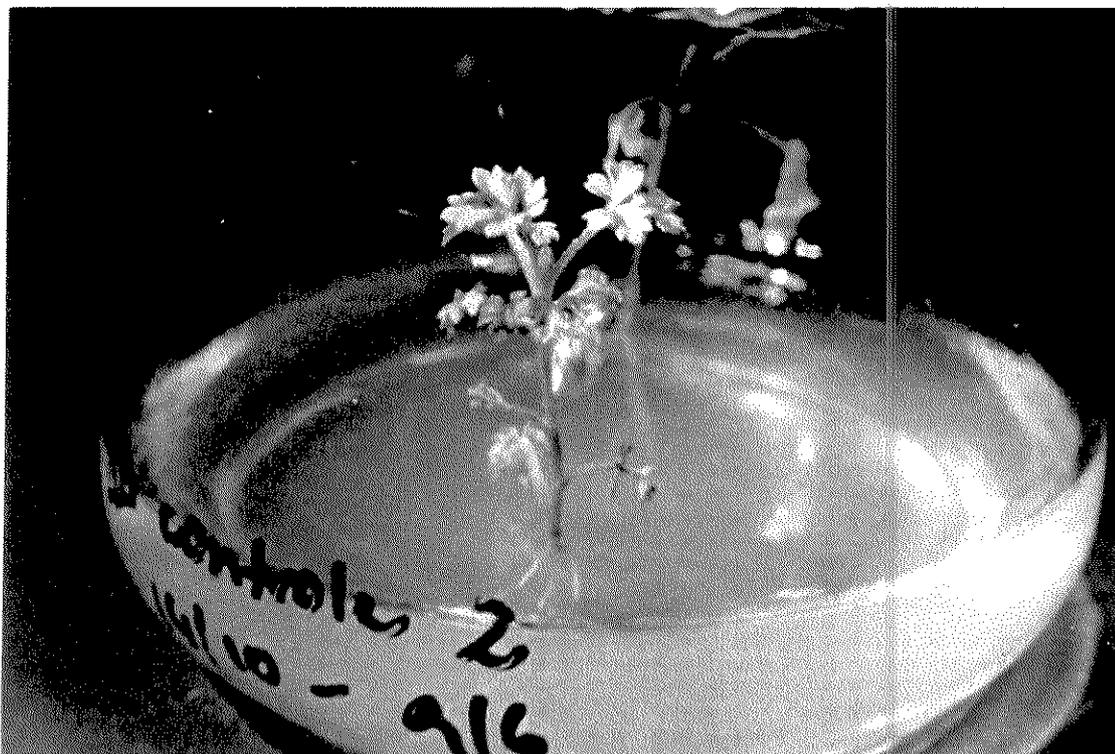


Figura 1. Plântulas de *A. annua* prontas para serem inoculadas com o *A. rhizogenes* cepa 8196.



Figura 2. Raízes transformadas de *A. annua*, obtidas cerca de 30 dias após a inoculação pelo *A. rhizogenes*.

reduzida à metade ( $\frac{1}{2}$  MS), acrescido de antibiótico (cefotaxime, marca comercial Claforan) na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  de meio de cultura, segundo dados obtidos anteriormente (Pellegrino, 1995). As raízes isoladas foram mantidas no escuro à temperatura constante de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , sendo repicadas 2 vezes a intervalos de 45 dias, para meio de cultura contendo antibiótico. Após três passagens no mesmo meio de cultura, as raízes já se encontravam livres de qualquer contaminação pela bactéria, sendo iniciado o cultivo em meio líquido sem antibiótico. As raízes foram transferidas para meio de sais minerais de White (1943) líquido, com sacarose na concentração de 30 g/L. O meio foi distribuído em erlenmeyers de 250 mL, na proporção de 100

mL de meio para cada erlenmayer. Os recipientes foram mantidos sob agitação constante em agitador orbital (New Brunswick) a 110 rpm, à temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  sob luz branca incandescente (intensidade 3000 lux), em fotoperíodo de 16 horas. As repicagens das raízes foram feitas em intervalos de 30 dias, segundo metodologia descrita anteriormente por Pellegrino (1995).

### 3.3. CONFIRMAÇÃO DO CARÁTER TRANSGÊNICO DAS RAÍZES OBTIDAS

#### 3.3.1. EXTRAÇÃO DE DNA VEGETAL

A extração de DNA, tanto das raízes transformadas como do material vegetal (planta) não transformado utilizado para controle foi feita segundo metodologia descrita por Dellaporta *et al.* (1983). Esta metodologia consistiu em uma minipreparação de DNA vegetal simples e rápida, apropriada para quantidades de material entre 0,50 e 2,00 g, sendo 1,00 g considerada a quantidade ideal.

O material vegetal foi pesado e macerado em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó muito fino e homogêneo. Transferiram-se então as amostras maceradas para tubos de 50 mL adicionando-se 7 mL do tampão de extração (50 mM Tris, pH 8 + 10 mM EDTA, pH 8 + 100 mM NaCl + 1% SDS + 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol) em cada tubo e misturando-se vagarosamente até o macerado voltar à temperatura ambiente. A seguir o material foi incubado a  $65^\circ\text{C}$  durante 30 minutos, em banho-maria. Após esse período foram adicionados para cada amostra 2,5 mL de KOAc 5M, agitando-se delicadamente. Após a agitação o material foi mantido em gelo durante 30 minutos.

A seguir os tubos foram centrifugados a 5000 rpm, a  $4^\circ\text{C}$  durante 30 min, (Superspeed RC-5B Sorvall, rotor SS34) para a separação de fases. Após a centrifugação a fase

aquosa foi filtrada lentamente e coletada em tubo COREX de 50 mL contendo 5 mL de isopropanol. Cada tubo foi então lentamente invertido várias vezes para provocar uma precipitação do DNA. O precipitado foi recuperado após uma nova centrifugação a 5000 rpm, a 4°C durante 30 min, (Superspeed RC-5B Sorvall, rotor HS-4).

O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 80%. Os tubos COREX foram colocados sobre a bancada em papel de filtro na posição invertida até a secagem do etanol. O DNA precipitado foi ressuscitado em 500 µL de tampão TE (10 mM Tris, pH 8 + 1 mM EDTA, pH 8), misturando-se delicadamente até uma perfeita homogeneização. A remoção de resíduos contaminantes de RNA foi feita por adição de RNase às amostras na concentração final de 50 µg/mL, seguida de incubação em banho-maria a 37°C durante 1 hora. O material foi então transferido para tubos eppendorf e mantido em freezer a -18°C.

### 3.3.2. ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO DE DNA OBTIDA

Para estimar a concentração de DNA obtida após a extração foi feita uma eletroforese em minigel de agarose, comparando-se os extratos obtidos com padrões de DNA de bacteriófago λ. O DNA foi separado em gel de agarose 0,7% em tampão TBE (1 M Tris, pH 8 + 1 M Ácido Bórico + 20 mM EDTA, pH 8) 0,5X, durante 1 hora sob corrente de 34 V. O gel foi corado com 5 µL de Brometo de etídeo 5 mg/L diluído em 20 mL de água destilada durante 20 min, sendo posteriormente lavado em água destilada por 15 min em agitação constante. A visualização do DNA e a estimativa da concentração obtida foi possível após a exposição do gel à luz ultra-violeta.

### 3.3.3. MARCAÇÃO RADIOATIVA DA SONDA

A sonda utilizada nesta marcação foi o fragmento número 6, de 7,2 kb, purificado da digestão do plasmídeo p6 (subclone do pRi8196) pela endonuclease de restrição *Bam*HI (figura 4). Foram utilizados 100 ng de sonda e a desnaturação do DNA foi feita a 100°C durante 2 min. A incorporação do desoxirribonucleotídeo radioativo ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dCTP foi realizada utilizando-se o "Kit Multiprimer" para marcação radioativa (marca comercial Gibco), em reação a 37°C durante 1 hora. Para eliminação dos nucleotídeos não incorporados durante a reação utilizou-se coluna de resina Sephadex G-50 fina, equilibrada com o tampão TE/SDS (10 mM Tris, pH 8 + 1 mM EDTA, pH 8 + 0,5% SDS) por onde foi passada a sonda. A atividade utilizada de sonda por membrana foi de  $4 \times 10^5$  cpm/mL de solução de hibridização.

### 3.3.4. ANÁLISE DO DNA POR "DOT BLOT"

#### 3.3.4.1. PREPARAÇÃO DA MEMBRANA

Foram preparados 500 ng de DNA não digerido de cada amostra a ser analisada. As amostras de DNA foram desnaturadas por aquecimento, tendo sido submetidas à temperatura de 95°C durante 5 min e logo a seguir resfriadas sobre gelo durante 2 min. As amostras foram aplicadas sobre membrana de nylon ("Gene Screen Plus" hybridization transfer membrane, marca comercial DuPont) em alíquotas de 2,5  $\mu$ L tomando-se o cuidado de permitir que as amostras secassem totalmente entre as aplicações. Além das amostras de DNA das raízes, foi aplicado como controle negativo uma amostra de DNA de plântula de artemísia cultivada *in vitro*. Como controle positivo foram aplicados 2 ng do fragmento número 6, de 7,2 kb, purificado da digestão do plasmídeo p6 (subclone do pRi8196) pela endonuclease de restrição *Bam*HI. O fragmento do plasmídeo p6 utilizado nesta fase foi cedido pela Dra. Marie-Anne Van Sluys, do Departamento de Biologia, IB, Universidade de São Paulo.

Após a secagem total das amostras as membranas foram umedecidas e mantidas durante 5 min na solução desnaturante (1,5 M NaCl + 0,5 M NaOH), sendo logo a seguir transferidas para a solução de neutralização (1,5 M NaCl + 0,5 M Tris HCl pH 7,5), onde foram mantidas também durante 5 min. Após esse período as membranas foram retiradas da solução e colocadas para secar sobre papel de filtro, onde foram deixadas até que estivessem completamente secas (pelo menos 1 hora).

#### 3.3.4.2. HIBRIDIZAÇÃO DA MEMBRANA

A membrana foi previamente umedecida com SSC 2X sob agitação durante 2 min. Foi feita então uma pré-hibridização incubando-se a membrana em solução de hibridização (SSC 5X + 0,5% SDS + 1% Leite em pó desnatado (Molico), volume em mL igual a 20% da área da membrana em cm<sup>2</sup>) a 65°C durante 24 h sob agitação. Após esse período um volume de sonda (fragmento número 6, de 7,2 kb, purificado da digestão do plasmídeo p6, subclone do pRi8196) pela endonuclease de restrição *Bam*HI (figura 4), marcado com o desoxirribonucleotídeo radioativo ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dCTP) foi desnaturado adicionando-se 1/3 do volume da sonda de NaOH 10 N durante 5 min, sendo logo a seguir neutralizado por adição de 1 volume de (sonda + NaOH) de Tris 1 M pH 8,0 durante 5 min. O volume obtido foi adicionado à solução de hibridização. O processo de hibridização prosseguiu após a adição da sonda mantendo-se a membrana em incubação por mais 48 horas a 65°C sob agitação.

#### 3.3.4.3. LAVAGEM DA MEMBRANA E EXPOSIÇÃO

Após a retirada da membrana da solução de hibridização procedeu-se às lavagens para eliminação da sonda não hibridizada. Primeiramente foram realizadas duas lavagens em SSC 2X à temperatura ambiente durante 5 min sob leve agitação. Após as duas

lavagens, quando verificados níveis ainda elevados de radiação, foram realizadas mais duas lavagens em solução de SSC 2X + 1% SDS à 65°C durante 30 min.

A membrana lavada foi exposta a um filme de raio-X em chassi com intensificador, mantido em freezer a -70°C por tempo variável de acordo com o sinal obtido. A revelação do filme foi feita por imersão durante 3 min em revelador, seguida de imersão por 2 min em água e por 5 min em fixador, sendo então lavado em água corrente por 30 a 40 min e colocado para secar.

### 3.3.5. ANÁLISES QUÍMICAS DAS RAÍZES TRANSFORMADAS

As análises de ácido artemisinínico das raízes transformadas foram conduzidas no CPQBA/UNICAMP e baseadas no método utilizado para análise de artemisinina (Pras *et al.*, 1991; Delabays, 1997). Após a separação do material vegetal a ser analisado este foi transferido para uma estufa com circulação de ar para secagem em temperatura de  $34 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 48 horas. Para cada amostra, 100 mg de material finamente moído foi extraído em 5 mL de tolueno, em ultra-dispersor POLYTRON/PT2000 (equipamento misturador e triturador de alta eficiência para pequenos volumes) por 30 segundos a 20.000 g. Posteriormente, o extrato foi centrifugado durante 6 minutos a 3200 g, obtendo-se os extratos brutos a serem analisados.

Com uma microseringa, 10  $\mu\text{L}$  de cada extrato foram aplicados sobre uma placa de sílica-gel 60 F<sub>254</sub> (MERCK art. 1.05554). Cada placa recebeu 4 diferentes concentrações de ácido artemisinínico (1,5; 2,0; 2,5 e 3,0  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) ao centro, mais 4 aplicações laterais, em duplicata, das amostras. As placas do ensaio foram eluídas em cuba de vidro previamente saturada com uma mistura de clorofórmio : metanol (98 : 2 v/v). Para a revelação, uma solução contendo 50 mL de ácido acético glacial, 0,5 mL de anisaldeído e 1,0 mL

de ácido sulfúrico concentrado foi borrifada sobre as placas. Posteriormente, cada placa foi colocada em estufa a 110°C durante 5 minutos, para permitir a visualização dos resultados, e as cromatoplas foram escaneadas e avaliadas comparativamente por fotodensitometria.

### **3.3.6. DOSAGENS DE AÇÚCARES NO MEIO DE CULTURA**

A dosagem dos açúcares presentes no meio de cultura foi feita segundo metodologia descrita por Yemm & Willis (1954), com 3 repetições por amostra. Foi utilizada antrona (Sigma Chemical Co.) a 2%, dissolvida em ácido sulfúrico 95%. Em tubos de ensaio foram colocadas alíquotas de 1 mL do meio de cultura, adicionados 2 mL do reagente de antrona, sendo os tubos então agitados, vedados e aquecidos em banho-maria a 100°C por 5 minutos, e a seguir resfriados.

As leituras de absorvância foram feitas em espectrofotômetro FENTO modelo 435 a 620 nm, e os cálculos feitos a partir de uma reta padrão obtida com a utilização de concentrações de 10 a 70 µg de sacarose por mL de água destilada.

### **3.3.7. CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS RAÍZES TRANSFORMADAS**

#### **3.3.7.1. DETERMINAÇÃO DAS TAXAS DE CRESCIMENTO DAS RAÍZES TRANSFORMADAS**

Para a determinação das taxas de crescimento das raízes transformadas, as mesmas foram cultivadas durante 5 semanas, em agitador orbital New Brunswick a 110 rpm, com medidas semanais de massa fresca e massa seca, além das dosagens de açúcares no meio de cultura de acordo com a metodologia acima descrita.

O experimento consistiu em 15 amostras de três clones de raízes transformadas, com 3 repetições por amostra, sendo que a cada semana eram feitas as medidas referentes a 3 amostras. A secagem do material era feita em estufa de circulação forçada, utilizando-se temperatura entre 40 e 45°C durante um período de 24 horas, com o objetivo de preservar o material vegetal para as análises químicas.

### **3.3.7.2. ESTABELECIMENTO DE FASES EXPONENCIAIS PARA ESTUDO COM REGULADORES DE CRESCIMENTO**

Após a determinação das taxas de crescimento, foram selecionadas as fases exponenciais das respectivas curvas. Durante essas fases, foram testadas várias concentrações de reguladores de crescimento (auxinas - AIA e citocininas - KIN), as interações possíveis entre eles e seus efeitos sobre o crescimento e a morfologia das raízes transformadas.

Os tratamentos testados foram os seguintes:

Tratamento 1 - 0 mg/L KIN + 0 mg/L AIA

Tratamento 2 - 0 mg/L KIN + 0,5 mg/L AIA

Tratamento 3 - 0 mg/L KIN + 1 mg/L AIA

Tratamento 4 - 0 mg/L KIN + 2 mg/L AIA

Tratamento 5 - 0,5 mg/L KIN + 0 mg/L AIA

Tratamento 6 - 0,5 mg/L KIN + 0,5 mg/L AIA

Tratamento 7 - 0,5 mg/L KIN + 1 mg/L AIA

Tratamento 8 - 0,5 mg/L KIN + 2 mg/L AIA

Foram conduzidos cultivos durante 28 dias, sendo que o cultivo das raízes transformadas foi acompanhado com um cultivo controle de raízes normais. Aos 28 dias de cultivo as amostras foram coletadas e analisadas quanto à morfologia e ao crescimento.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. TRANSFORMAÇÃO

As características fenotípicas apresentadas pelas raízes obtidas após a inoculação dos híbridos Ch x Viet 55 com o *A. rhizogenes* cepa 8196 evidenciaram a ocorrência da transformação. O padrão de crescimento das raízes em cabeleira, característico de raízes transformadas, é considerado como marcador positivo da transformação (David *et al.*, 1984; David & Tempé, 1988; Van Shuys, 1999) e está mostrado na Figura 3. Conforme experimentos anteriores relatados por Pellegrino (1995), a cepa 8196 do *A. rhizogenes* é a mais eficaz na transformação de outros genótipos de *A. annua*, sendo por isso escolhida para estes experimentos com o híbrido Ch x Viet 55.

A caracterização molecular do material teve como objetivo evidenciar definitivamente a passagem do material genético da bactéria para a planta, tendo sido selecionados três clones de raízes obtidos nos testes de transformação. Partindo-se de raízes em cultivo, apresentando massas entre 0,620 e 2,600 g, e de 1,000 g de amostra de planta não transformada (controle negativo da transformação), foi feita a extração de acordo com a metodologia descrita por Dellaporta *et al.* (1983). As concentrações de DNA estimadas por comparação com os padrões de concentração foram de 100 ng/ $\mu$ L para as três amostras de raízes transformadas e de 70 ng/ $\mu$ L para a amostra de planta não transformada, sendo que o DNA obtido por essa metodologia apresentou-se bastante puro e íntegro.

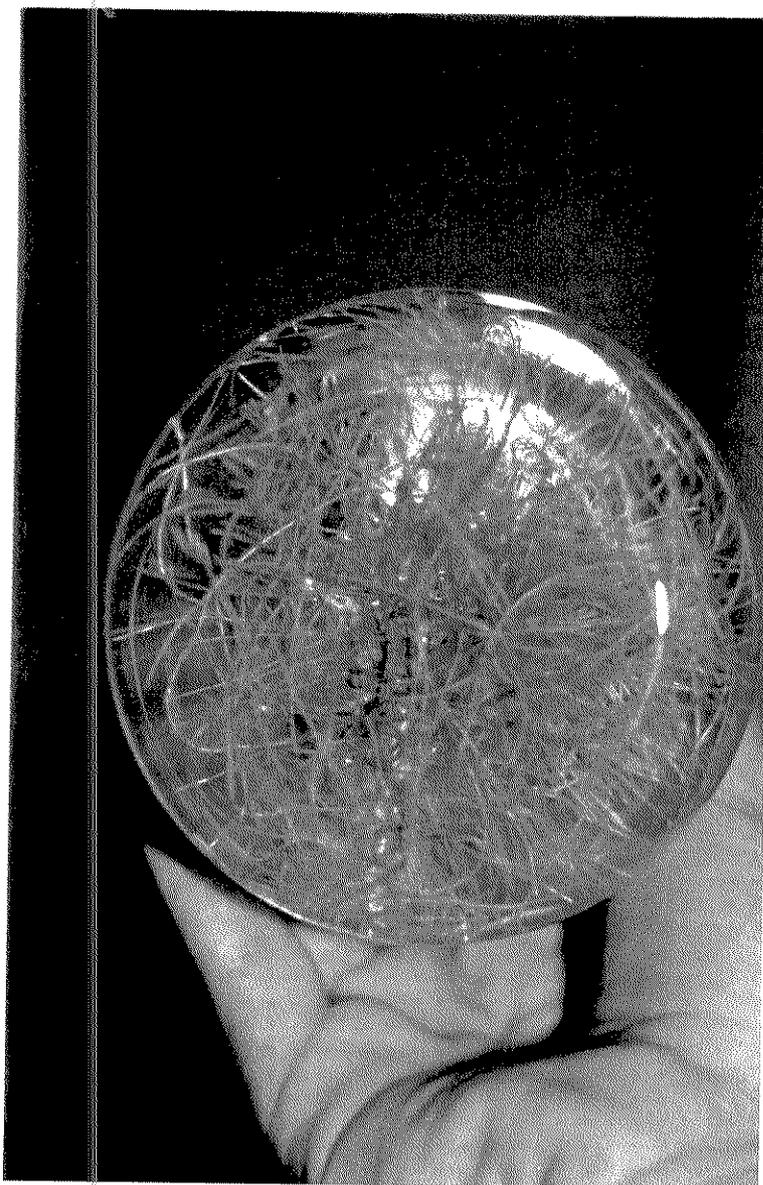


Figura 3. Raízes transformadas de *A. annua* (híbrido Ch x Viet 55), obtidas pela inoculação de estacas com o *A. rhizogenes*, após 28 dias de cultivo em meio líquido.

Após a extração, foi escolhido o processo de "Dot Blot" para a caracterização molecular. Este processo de hibridização compreendeu basicamente a aplicação de séries de amostras de DNA em quantidades iguais, próximas umas das outras e em manchas de diâmetro uniforme sobre uma membrana de nylon ou nitrocelulose. O DNA foi desnaturado e submetido à

incubação em uma solução contendo as sequências correspondentes com marcações radioativas específicas ( $^{32}\text{P}$ ), ao qual denominamos sonda, que foi hibridizado com o material a ser testado e depois exposto a um filme de raio-X (Kafatos *et al.*, 1979). A extensão da hibridização para cada mancha de DNA foi avaliada semi-quantitativamente após a impressão do filme, por comparação visual da intensidade e do diâmetro aparente das manchas com um padrão. Como o "Dot Blot" origina manchas grandes e de tamanho variável, não foi possível obter-se medidas quantitativas precisas, conseguindo-se entretanto determinar a expressão do gene desejado, por comparação relativa (Thomas, 1983; Sambrook *et al.*, 1989). A técnica do "Dot Blot" é especialmente conveniente quando apenas estimativas semi-quantitativas são necessárias, fornecendo um método rápido e eficiente de "screening". Outra vantagem é que o método necessita de quantidades relativamente pequenas de tecido e implica em pouca manipulação de cada amostra, não sendo necessário, por exemplo, digerir o DNA por enzimas de restrição (Kafatos *et al.*, 1979; White & Bancroft, 1982; Thomas, 1983).

A membrana para o "Dot Blot" foi preparada aplicando-se amostras de 500 ng de DNA genômico das raízes transformadas e da planta não transformada. Como controle positivo foram aplicados 2 ng do fragmento número 6, de 7,2 kb, purificado da digestão do plasmídeo p6 (subclone do pRi8196) pela endonuclease de restrição *Bam*HI. Esse mesmo fragmento foi posteriormente utilizado como sonda radioativa durante a hibridização da membrana. Na figura 4 está mostrado o padrão da digestão *Bam*HI na região do T-DNA do plasmídeo e identificado o fragmento 6 utilizado como controle positivo e como sonda marcada com o ( $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ )dCTP.

O fragmento 6 utilizado como sonda foi obtido do pRi8196, o mesmo utilizado para a transformação da *A. annua* L. neste experimento. Como a transformação caracteriza-se pela passagem e integração do T-DNA da bactéria para o genoma da planta, após a hibridização esperava-se um sinal positivo nas amostras de DNA das raízes, que seria resultante da ligação dos

nucleotídeos marcados da sonda aos fragmentos do T-DNA existentes nas raízes transformadas. Por outro lado, os controles negativos não deveriam se hibridizar com a sonda, não apresentando assim nenhum sinal impresso no filme de raio-X. Conforme o esperado, as amostras de raízes apresentaram o sinal positivo que caracteriza a transformação, e o controle negativo (DNA de planta não transformada) não apresentou sinal impresso no filme de raio-X (figura 5).

região T-DNA pRi8196

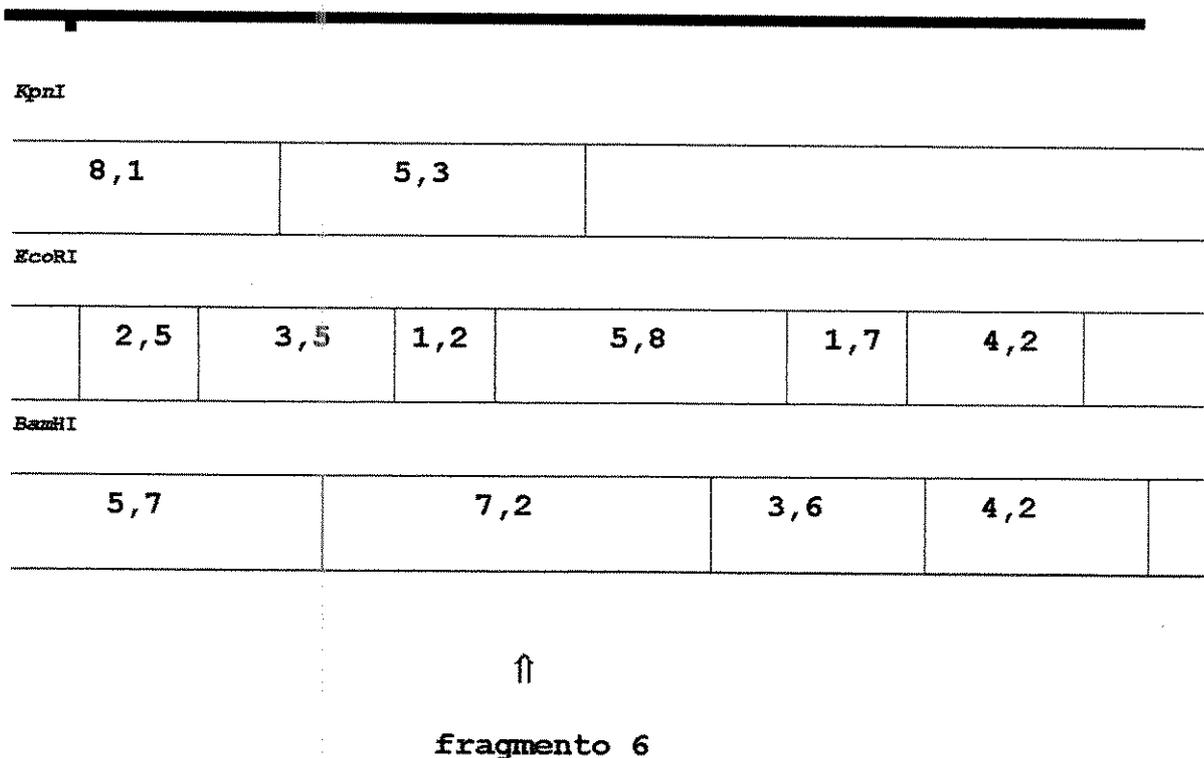
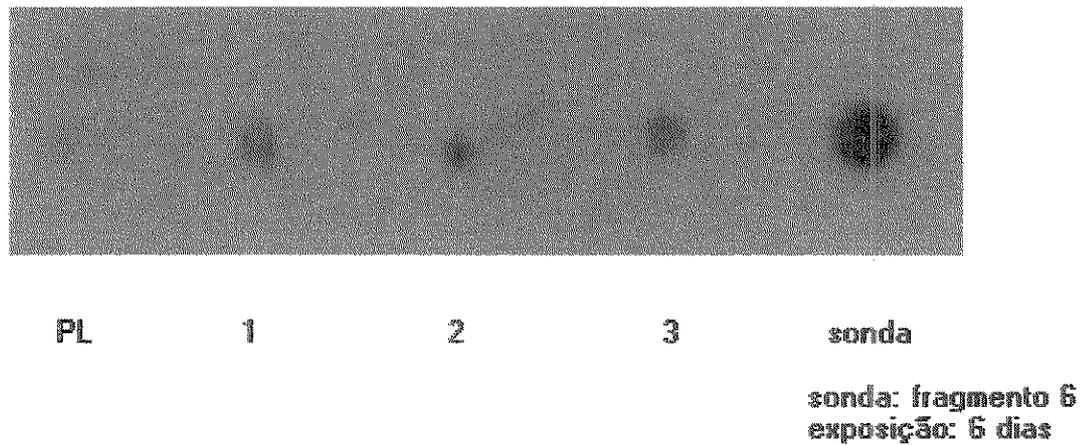


Figura 4. Padrão de digestão do pRi8196 na região do T-DNA para as endonucleases de restrição: *KpnI*, *EcoRI* e *BamHI* mostrando a região do fragmento 6, de 7,2 kb, na digestão *BamHI*, utilizado como sonda neste trabalho). (Extraído de Tempé & Casse-Delbart, 1989).



**Figura 5.** Autoradiografia da membrana do "Dot Blot" após exposição de 6 dias. As amostras 1, 2 e 3 referem-se às raízes transformadas. A amostra PL corresponde à planta não transformada (controle negativo). A sonda (controle positivo) corresponde ao fragmento 6 da digestão *Bam*HI do plasmídeo p6.

## 4.2. CULTIVO PARA DETERMINAÇÃO DAS TAXAS DE CRESCIMENTO

Durante as 5 semanas de cultivo das raízes transformadas foram retiradas alíquotas semanalmente, sendo as mesmas pesadas antes e após a secagem. Ao final do experimento, as amostras foram reunidas e analisadas quanto ao teor de ácido artemisinínico. As médias das medidas de massa fresca e massa seca ao longo do tempo estão apresentadas nas figuras 6 e 7 mostradas a seguir, tornando evidente que a fase exponencial das curvas encontra-se entre 21 e 28 dias de cultivo, sendo determinado o dia 28 a partir do início do cultivo como sendo o pico do crescimento. Tais dados de massa concordam com as avaliações visuais do material e com as análises de açúcares no meio de cultura, onde podemos perceber uma diminuição nos teores com o passar do tempo, sendo essa diminuição menos acentuada após o pico de crescimento (tabela 1). Como os açúcares do meio de cultura são a fonte de energia para o crescimento das raízes em cultivo, considerando-se o dia 28 como pico do crescimento podemos justificar a diminuição no consumo de açúcares através da diminuição na taxa de crescimento. A determinação de açúcares em meio líquido é utilizado rotineiramente no cultivo de plantas "in vitro", não havendo, no entanto, relatos na literatura referentes a *A. annua*.

Tabela 1. Dosagens de açúcares no meio de cultura das raízes transformadas ao longo de 5 semanas. Cada ponto é a média das medidas de 3 repetições. Médias seguidas por letras distintas na vertical, diferiram entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

dias de cultivo	Sacarose (g/L) no meio de cultura	sacarose (g/L) consumida pela cultura no período
0	29,80 a	0,00
7	27,23 a	2,57
14	25,47 a	1,76
21	22,36 b	3,11
28	18,11 bc	4,25
35	16,38 c	1,73

Os diferentes clones de raízes transformadas apresentaram o mesmo padrão de curva, com o pico de crescimento no 28º dia de cultivo. Os dados obtidos confirmam um procedimento amplamente utilizado em cultura de plantas “in vitro”, onde se utiliza como padrão a repicagem do material aos 28 dias de cultivo. No caso de cultivo de raízes transformadas, não existem dados a respeito descritos na literatura, sendo que os resultados obtidos neste trabalho são inéditos e possibilitam o embasamento científico da técnica utilizada, no caso das raízes transformadas de *A. annua*. Os dados relativos às taxas de massa fresca e massa seca estão mostrados nas figuras 6 e 7 a seguir:

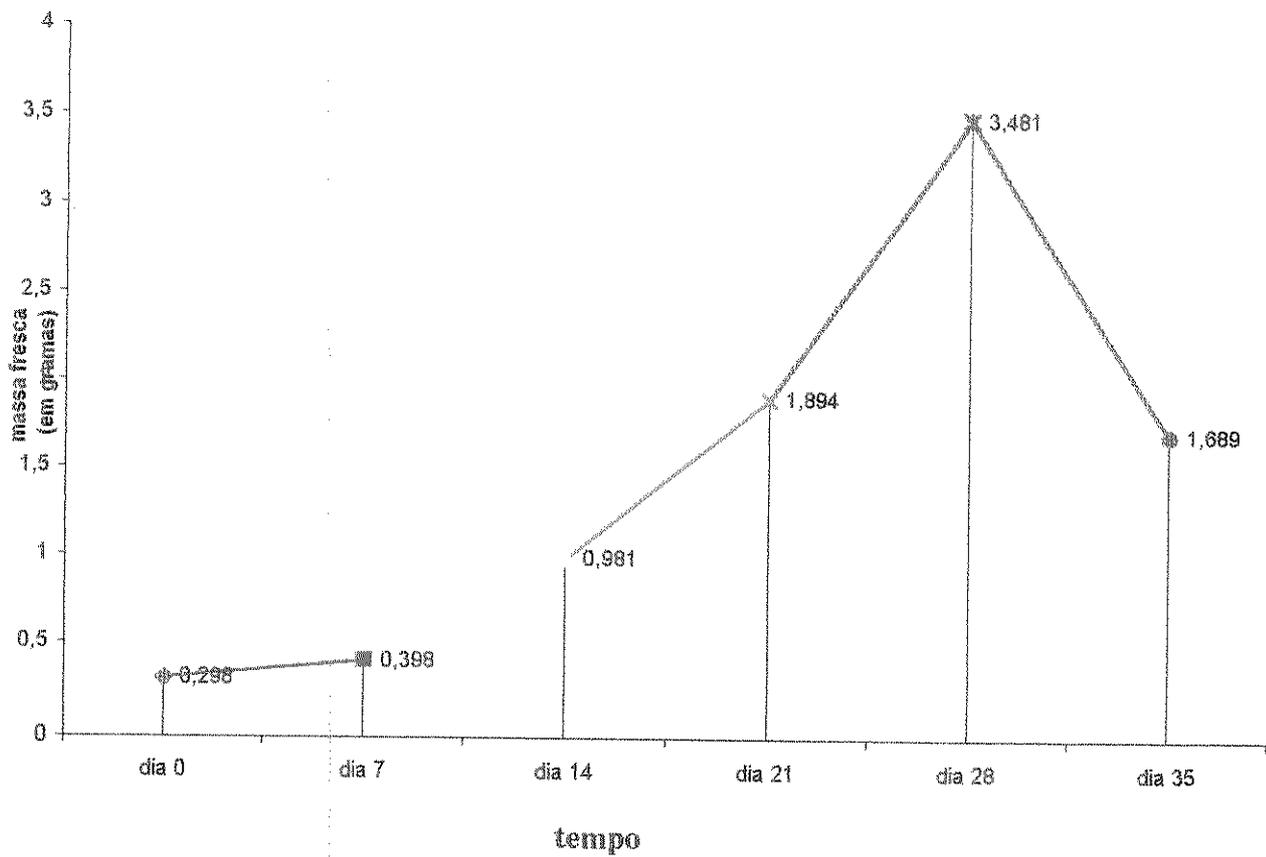


Figura 6. Taxas de crescimento com medidas semanais de massa fresca ao longo de 5 semanas. Cada ponto é a média das medidas de 3 repetições.

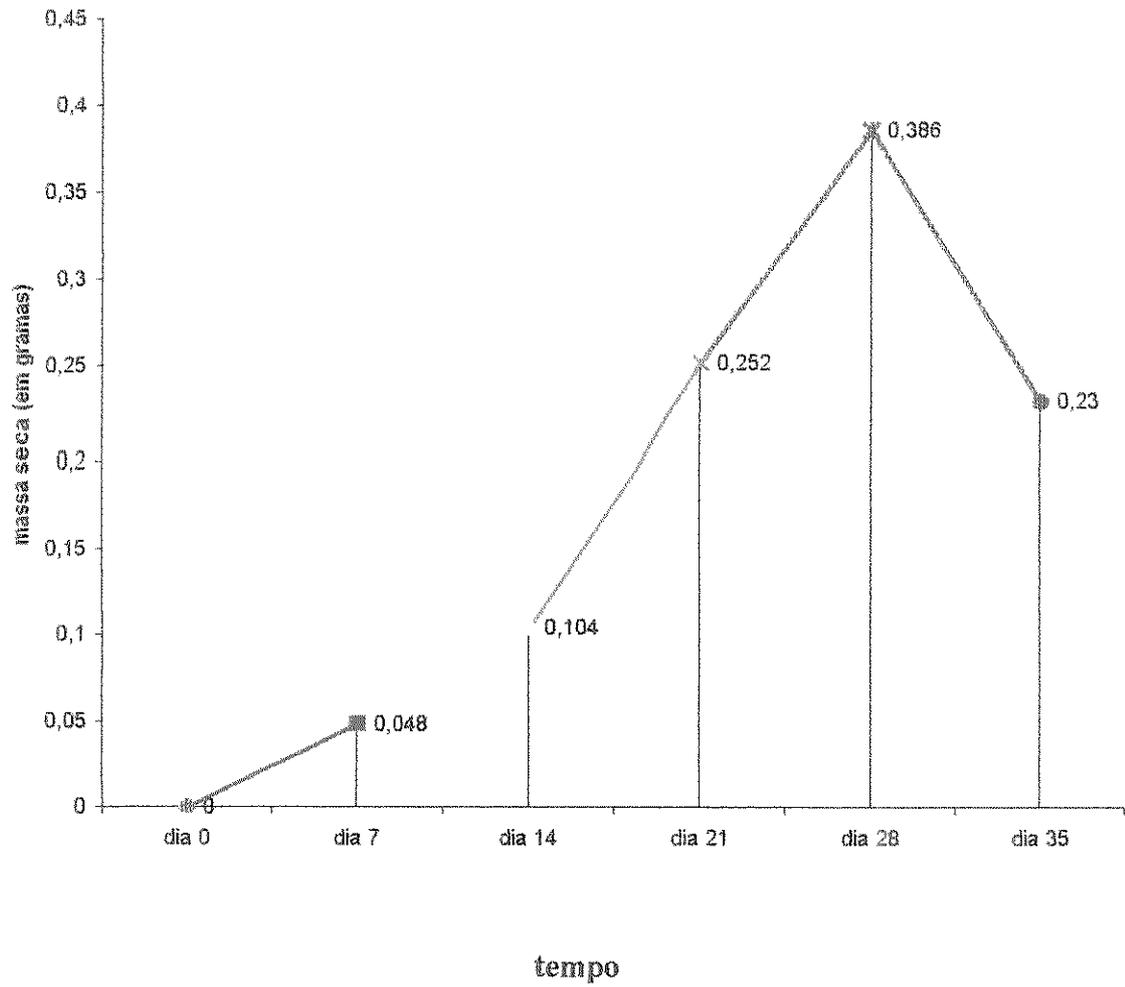


Figura 7. Taxas de crescimento com medidas semanais de massa seca ao longo de 5 semanas.

Cada ponto é a média das medidas de 3 repetições.

### 4.3. ANÁLISES QUÍMICAS

As determinações dos teores de ácido artemisinínico foram conduzidas após a determinação das taxas de crescimento das raízes transformadas. Neste trabalho optamos por realizar as análises químicas por CCD com detecção fotodensitométrica (CCD/DT), método bastante utilizado e com vários relatos na literatura para análises tanto de artemisinina quanto de ácido artemisinínico (Bryson & Croom, 1991; Delabays *et al.*, 1997; Sartoratto *et al.*, 1997; Figueira & Sartoratto, 1997; Magalhães *et al.*, 1997; Marchese *et al.*, 1998).

Conforme citado anteriormente na literatura, raízes normais de *A. annua* não possuem a capacidade de acumular artemisinina (Pras *et al.*, 1991; Pellegrino, 1995), sendo este composto encontrado nas partes aéreas da planta, principalmente nas folhas. Em experimentos anteriores, Pellegrino (1995) obteve raízes transformadas de *A. annua* a partir de sementes provenientes das primeiras introduções da espécie pelo CPQBA, não obtendo produção de artemisinina nesses cultivos. O principal composto encontrado nas raízes transformadas cultivadas nessas condições foi o ácido artemisinínico, composto de interesse em função das suas aplicações para semi-síntese de artemisinina.

Para o presente trabalho, foram realizadas análises por CCD em 15 extratos de amostras de raízes normais e em 15 amostras de 3 clones independentes de raízes transformadas, no período de pico de crescimento das culturas. Em todos os extratos foi detectada a presença de ácido artemisinínico, em concentrações variando entre 0,010 e 0,025% da massa seca da amostra para as raízes normais, e 0,020 a 0,071% da massa seca da amostra para as raízes transformadas. Resultados semelhantes foram relatados anteriormente (Pellegrino, 1995; Banerjee *et al.*, 1997; Weathers *et al.*, 1997), e concordam com dados da literatura que citam que os compostos sintetizados em cultura pelas raízes transformadas normalmente são os mesmos produzidos pelas raízes das plantas normais de uma mesma espécie (Hamill *et al.*, 1986; Kamada *et al.*, 1986; Van

Sluys, 1999). É característica das raízes transformadas em cultura apresentar velocidades de crescimento muito maiores que raízes normais da mesma espécie, chegando a triplicar a velocidade de crescimento com relação às raízes normais. Comparando-se os níveis obtidos, obtivemos a média de 0,48 g de ácido artemisinínico por kg de massa seca nas raízes transformadas, e 0,16 g de ácido artemisinínico por kg de massa seca nas raízes normais. Considerando-se que as raízes transformadas em cultura crescem mais rápido que as raízes normais, e associando-se a produção do ácido artemisinínico em quantidades mais altas que as produzidas normalmente pelas raízes à ausência de graxas características das folhas e talos da planta, as raízes transformadas são vantajosas com relação às raízes normais para extração de ácido artemisinínico em *A. annua*. No entanto, os resultados obtidos por este trabalho mostram que as quantidades produzidas ainda são baixas para extração a nível comercial do composto através desse tipo de cultivo, uma vez que são necessários cerca de 10 kg de material fresco para a obtenção de 1 kg de material seco, o que corresponde a cerca de 0,50 g do ácido artemisinínico, quantidade muito pequena para justificar um cultivo comercial do material.

Tabela 2. Concentrações de ácido artemisinínico detectadas em raízes normais(\*) e transformadas.

AMOSTRA RAIZ TRANSFORMADA	(%PESO SECO) ÁCIDO ARTEMISININICO	AMOSTRA RAIZ NORMAL	(%PESO SECO) ÁCIDO ARTEMISININICO
RT-01	0,036	RN-01	0,013
RT-02	0,070	RN-02	0,010
RT-03	0,044	RN-03	0,022
RT-04	0,020	RN-04	0,020
RT-05	0,060	RN-05	0,016
RT-06	0,038	RN-06	0,012
RT-07	0,036	RN-07	0,021
RT-08	0,051	RN-08	0,016
RT-09	0,043	RN-09	0,010
RT-10	0,043	RN-10	0,011
RT-11	0,057	RN-11	0,018
RT-12	0,061	RN-12	0,010
RT-13	0,055	RN-13	0,021
RT-14	0,071	RN-14	0,025
RT-15	0,045	RN-15	0,020
MÉDIA RAÍZES TRANSFORMADAS	0,048	MÉDIA RAÍZES NORMAIS	0,016
DESVIO-PADRÃO	0,012	DESVIO-PADRÃO	0,013

(\*) As raízes normais são provenientes de plantas cultivadas *in vitro*, com 3 meses de idade, germinadas a partir do mesmo lote de sementes utilizado na obtenção de estacas para os experimentos de transformação.

#### 4.4. CULTIVO PARA ESTUDO DAS INTERAÇÕES HORMONAIIS

Após a seleção das fases exponenciais das curvas de crescimento, foram testadas várias concentrações e combinações de auxina (AIA) e citocinina (KIN), visando verificar seus efeitos sobre o crescimento e a morfologia das raízes transformadas. O acompanhamento do crescimento foi feito por medidas de massa e pela avaliação visual do material. Para todos os experimentos foram mantidos cultivos paralelos de raízes normais, como controle para comparação de crescimento e morfologia, sendo essas raízes provenientes de plantas cultivadas *in vitro*, com 3 meses de idade, germinadas a partir do mesmo lote de sementes utilizado na obtenção de estacas para os experimentos de transformação. Os resultados obtidos estão descritos na tabela 3 e na figura 8 a seguir.

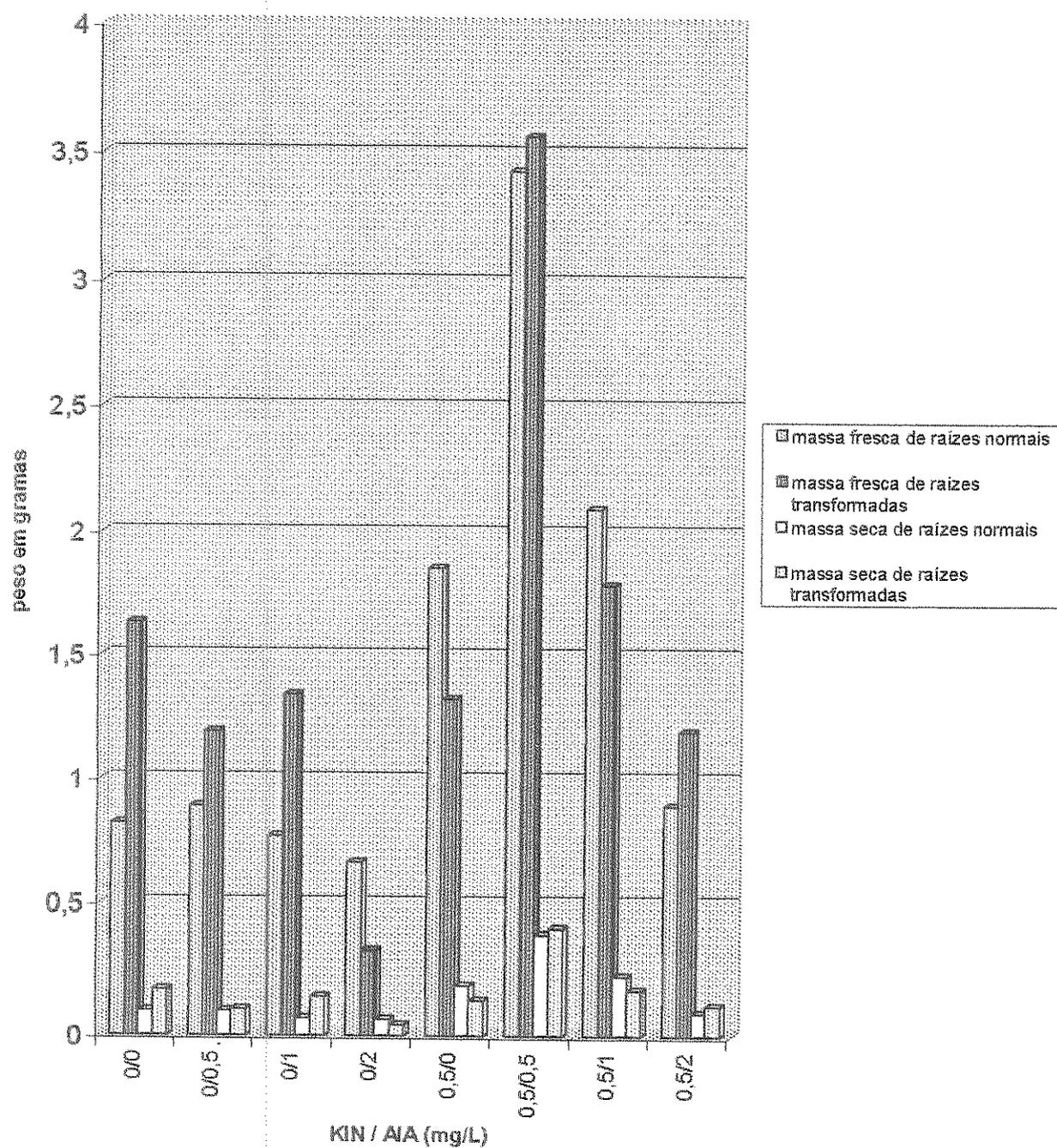


Figura 8. Comparação entre massa fresca e massa seca obtidas para as raízes normais e transformadas após 28 dias de cultivo em diferentes combinações de KIN e AIA. As massas são a média das medidas de 6 repetições.

**Tabela 3.** Morfologia e crescimento de culturas de raízes de *A. annua* após 28 dias de cultivo, na luz, em meio White líquido adicionado dos reguladores de crescimento abaixo descritos. As massas são a média das medidas de 6 repetições. Médias seguidas por letras distintas na vertical diferiram entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

KIN/AIA (mg/L)	RAÍZES	FORMAÇÃO DE	MASSA FRESCA (g)	MASSA SECA (g)
0,0/0,0	Normais	raízes	0,820 cd	0,098 cd
(Tratamento 1)	Transformadas	raízes	1,630 bc	0,182 b
0,0/0,5	Normais	raízes	0,890 cd	0,099 cd
(Tratamento 2)	Transformadas	c + 10r	1,190 c	0,106 cd
0,0/1,0	Normais	raízes	0,770 cd	0,068 d
(Tratamento 3)	Transformadas	c + 5r	1,340 bc	0,156 bc
0,0/2,0	Normais	calos	0,660 d	0,065 d
(Tratamento 4)	Transformadas	calos	0,330 d	0,041 d
0,5/0,0	Normais	raízes	1,850 b	0,201 b
(Tratamento 5)	Transformadas	c + 5r	1,320 bc	0,142 c
0,5/0,5	Normais	raízes	3,420 a	0,386 a
(Tratamento 6)	Transformadas	calos	3,560 a	0,408 a
0,5/1,0	Normais	c + 10r	2,090 b	0,236 b
(Tratamento 7)	Transformadas	calos	1,780 b	0,184 b
0,5/2,0	Normais	calos	0,890 cd	0,092 cd
(Tratamento 8)	Transformadas	calos	1,190 c	0,121 c

• a estrutura formada é expressa como: raízes = mais de 20 ramificações laterais; c + 10r = calos com mais de 10 ramificações laterais; c + 5r = calos com menos de 10 ramificações laterais; calos = sem ramificações laterais.

A morfologia das raízes normais e transformadas sofreu alterações para estruturas semelhantes a calos, com ou sem brotações laterais de raízes, quando da adição de reguladores de crescimento. Calos com e sem raízes foram obtidos com a adição de AIA, isoladamente ou em combinação com KIN. As alterações morfológicas foram tanto mais evidentes quanto maior a concentração de auxinas no meio, sendo que em todos os casos houve formação de calos quando da adição de AIA na concentração de 2,0 mg/L, indicando o efeito positivo das auxinas na formação de calos, mesmo para tecidos transformados. Esse efeito é conhecido em tecidos não transformados, inclusive para *A. annua* (Nair *et al.*, 1986; Whipkey *et al.*, 1992; Paniego & Giulietti, 1994), porém não há relatos para raízes transformadas, e os resultados obtidos neste trabalho são inéditos em se tratando de raízes transformadas de *A. annua*.

No Tratamento 1 (sem adição de reguladores de crescimento) não verificamos alterações morfológicas, sendo o crescimento das raízes transformadas significativamente mais rápido que o das raízes normais cultivadas nas mesmas condições, confirmando dados existentes na literatura para outras espécies (Saito *et al.*, 1992; Endress, 1994). O crescimento das culturas de raízes normais foi significativamente aumentado nos tratamentos contendo AIA em combinação com 0,5 mg/L de KIN, sendo que tanto para as raízes normais quanto para as raízes transformadas foi verificada a maior taxa de crescimento quando da adição dos reguladores na proporção de 0,5/0,5, indicando uma ação positiva da combinação entre os dois reguladores de crescimento. A menor taxa de crescimento foi verificada na proporção de 0/2, podendo neste caso ser explicada pelas alterações morfológicas que deram origem aos calos observados para este tratamento.

## 5. CONCLUSÕES

O protocolo estabelecido em trabalhos anteriores para transformação de *A. annua* mostrou-se válido para o híbrido Ch x Viet 55. A cepa de *A. rhizogenes* 8196 foi efetiva na transformação desse híbrido, indicando uma interação bem sucedida entre o patógeno e a planta, e a possibilidade de utilização desta cepa de *Agrobacterium* na transformação desses híbridos.

As taxas de crescimento determinadas nestes experimentos confirmaram um procedimento amplamente utilizado em cultura de tecidos, a repicagem do material aos 28 dias de cultivo, associada ao pico de crescimento da cultura. No caso das raízes transformadas de *A. annua*, pudemos obter o embasamento científico para este procedimento, até então não relatado para esta espécie vegetal.

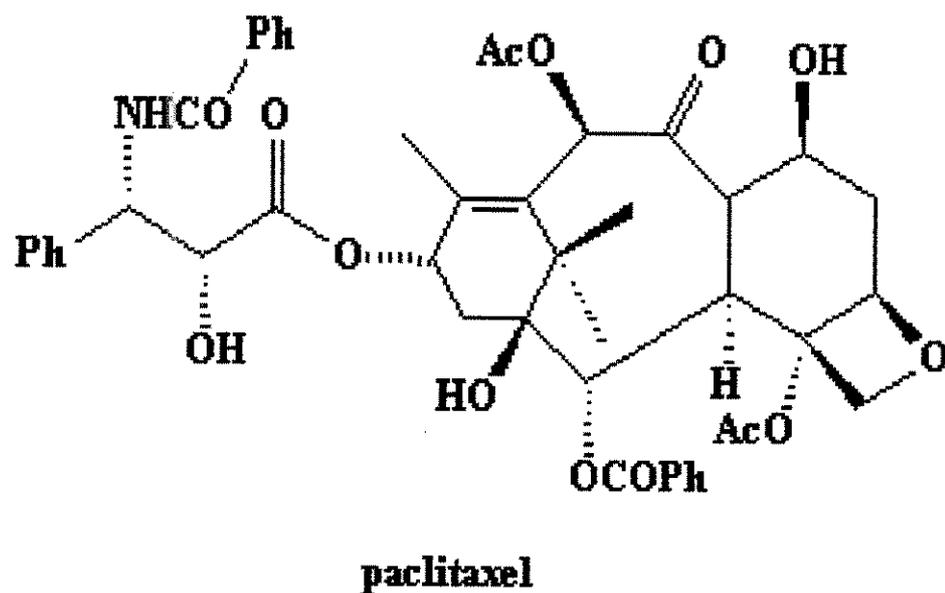
Quanto à produção de ácido artemisinínico, esta foi maior nas culturas de raízes transformadas quando comparadas às raízes normais, com as raízes transformadas produzindo em média 0,48 g de ácido artemisinínico por kg de massa seca, enquanto as raízes normais produziram em média 0,16 g de ácido artemisinínico por kg de massa seca. Embora a produção das raízes transformadas tenha sido consideravelmente maior, ainda não consideramos a quantidade obtida como adequada a um cultivo em larga escala com finalidades comerciais.

As alterações morfológicas observadas nas culturas foram tanto mais marcantes quanto maior a concentração de auxinas no meio, desdiferenciando as culturas em calos e confirmando resultados já obtidos com tecidos não transformados. O crescimento das raízes transformadas foi maior que o das raízes normais no tratamento sem adição de reguladores de crescimento, e a menor taxa de crescimento foi verificada na proporção de 0,0 KIN / 2,0 AIA, favorável a produção de calos.

**CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E DA PRODUÇÃO DE  
ARTEMISININA EM HÍBRIDOS “Ch X Viet. 55” E “39 X 1V” DE *A. annua* L.  
MICROPROPAGADOS E OBTIDOS POR SEMENTES**

**1. INTRODUÇÃO**

As plantas vêm sendo consideradas como parte integrante da medicina tradicional em todas as civilizações desde tempos remotos e apesar das drogas sintéticas serem produtos fundamentais para o tratamento de doenças, sabe-se que atualmente 25% das prescrições contém ao menos uma substância derivada de plantas (Robbers *et al.*, 1996). Durante os últimos anos, o interesse pelo uso das técnicas de cultura de tecidos de espécies medicinais e aromáticas vem aumentando consideravelmente (Sahoo *et al.*, 1997), inclusive a micropropagação para propagação clonal rápida em larga escala. A cultura de tecidos vegetais aparece também como ferramenta para obtenção de compostos medicinais derivados de plantas e manutenção de genótipos produtivos. Várias substâncias isoladas de plantas são atualmente produzidas desse modo e utilizadas na terapia do câncer, e Yukamine *et al.* (1996) produziram paclitaxel (taxol® é marca registrada da Bristol-Meyers-Squibb) a partir de culturas de tecidos de *Taxus brevifolia* em quantidades seis vezes maior que a partir de plantas intactas. Estima-se que no ano 2000 as vendas do paclitaxel (figura 1) atinjam US\$ 1 bilhão por ano (Robbers *et al.*, 1996). As técnicas de cultura de tecidos são especialmente importantes no caso de espécies com risco de extinção, arbóreas de ciclo longo (caso do gênero *Taxus*) e espécies com dificuldades de propagação.



**Figura 1.** Paclitaxel, substância antitumoral derivada de plantas “in vitro”.

Os primeiros experimentos relacionados à cultura de ápices caulinares em plantas datam do início do século, porém o rápido progresso nas técnicas de micropropagação deve-se aos estudos de Murashige e Skoog (1962). Todo o método de micropropagação baseia-se na indução do crescimento das gemas laterais através de um balanço hormonal favorável às citocininas. Cada uma das gemas é capaz de produzir uma pequena plântula capaz de ser individualizada e o processo pode ser novamente repetido. As taxas de micropropagação variam muito de espécie para espécie, porém é possível se produzir milhares

de plantas no período de um ano, iniciando-se a partir de um único ápice (Caldas *et al.*, 1990). A micropropagação é utilizada como ferramenta no melhoramento e na seleção de plantas, sendo bastante útil na manutenção de genótipos superiores de interesse comercial. Como as respostas podem variar entre as diferentes espécies de um mesmo gênero, ou ainda entre variedades de uma mesma espécie, torna-se necessário otimizar os protocolos de cultivo “*in vitro*” para o material desejado, partindo-se de protocolos já existentes para materiais similares. Há ainda o problema de variação somaclonal que deve ser considerado na proposição dos protocolos, já que as plantas micropropagadas devem constituir cópias das plantas matrizes com a máxima fidelidade possível.

No caso específico de *A. annua*, muito se tem pesquisado no sentido de selecionar plantas com altos níveis de artemisinina. O programa de melhoramento do CPQBA/UNICAMP conta atualmente com híbridos selecionados para aumento da fitomassa e dos teores de artemisinina que chegam a produzir 25 kg/ha da molécula, enquanto nas populações base o rendimento é de apenas 5 kg/ha (Magalhães *et al.*, 1997). Os genótipos superiores obtidos através desse melhoramento podem ser preservados através da cultura de tecidos, e já existem relatos na literatura de estudos anteriores com micropropagação em *A. annua* para diferentes materiais vegetais (Lê & Collet, 1991; Woerdenbag *et al.*, 1993), inclusive híbridos melhorados obtidos pela MEDIPLANT (Magalhães, comunicação pessoal), evidenciando a importância de se determinar protocolos específicos de acordo com o genótipo trabalhado (Elhag *et al.*, 1992; 1997; Ferreira & Janick, 1996; Gulati *et al.*, 1996). Além dos protocolos de micropropagação, é de fundamental importância que a aclimação das plantas obtidas “*in vitro*” seja eficiente e que as mesmas não sejam perdidas durante essa etapa do processo, através de procedimentos adequados e do monitoramento em casa de vegetação, garantindo assim o sucesso na manutenção do genótipo. A manutenção de genótipos altamente produtivos através de cultivo “*in vitro*” é um procedimento bastante utilizado, visto que os

programas de melhoramento são demorados e trabalhosos, e a manutenção em laboratório é segura e eficiente, ocupando espaços reduzidos e demandando pouca mão-de-obra.

A artemisinina está presente principalmente nas folhas de *A. annua* e é encontrada em plantas chinesas e vietnamitas em concentrações variando de 0,5 a 1,2% da massa seca da planta (Nair *et al.*, 1986; Chan *et al.*, 1995; Dung & Loi, 1991; Delabays *et al.*, 1993). Van Geldre *et al.* (1997) relataram que plantas com altos níveis de artemisinina em laboratório mantinham o mesmo padrão quando levadas a campo, correlação esta que pode ser um parâmetro eficiente para estimar a concentração de artemisinina nas plantas no campo. Além disso, uma elevada correlação entre os níveis de artemisinina observados em plantas cultivadas em campo e em casa de vegetação podem indicar que a avaliação de plantas adultas em casa de vegetação reflete as condições de campo e é um sistema eficiente para a seleção de clones altamente produtivos em artemisinina (Elhag *et al.*, 1992). Esses clones superiores podem ser cruzados entre si em condições de fotoperíodo indutor que varia entre 11 e 14 horas (Marchese, 1999), para a obtenção de ganho genético. No entanto, mesmo utilizando-se as técnicas de cultura de tecidos para armazenar e preservar clones produtivos, a avaliação do conteúdo de artemisinina em plantas *in vitro* não é confiável para a estimativa da concentração de artemisinina das plantas no campo, sendo sempre necessário que se proceda a aclimação das mesmas em casa de vegetação para que se possa proceder a seleção (Peter-Blanc, 1992).

## 2. OBJETIVOS

Pelos motivos expostos, o presente trabalho teve como objetivos:

- a) estabelecer um protocolo para micropropagação dos híbridos de *A. annua* obtidos pelo programa de melhoramento e seleção do CPQBA/UNICAMP, sendo escolhidos os híbridos Ch x Viet.55 e 39 X 1V, altamente produtivos em artemisinina.
  
- b) estabelecer as condições ideais para aclimação das plantas micropropagadas dos híbridos Ch x Viet 55 e 39 x 1V em casa de vegetação, para o ambiente local.
  
- c) verificar a ocorrência de variações através da análise dos padrões de crescimento com relação as plantas matrizes cultivadas em casa de vegetação, e quanto a manutenção dos níveis de artemisinina nas plantas obtidas por cultivo “in vitro”.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL VEGETAL, EQUIPAMENTOS E REAGENTES UTILIZADOS

As plantas de *A. annua* L. utilizadas como fonte de explantes para este trabalho foram germinadas a partir de sementes de híbridos desenvolvidos no CPQBA/UNICAMP. As sementes utilizadas são dos clones 39 x 1V e Ch x Viet 55, característicos por apresentar florescimento tardio e elevados teores de artemisinina (Magalhães *et al.*, 1997). Todos os experimentos foram feitos com 15 plantas de cada clone tomadas aleatoriamente, e as sementes foram armazenadas em condições constantes de temperatura (10°C) e umidade (70%).

Todos os reagentes utilizados para as análises químicas são de grau P.A. (para análise). A artemisinina utilizada como padrão nas análises foi purificada na Divisão de Química Orgânica Farmacêutica do CPQBA (ponto de fusão obtido = 154-155°C). Os extratos foram aplicados com microseringas Hewlett-Packard 9301-0246 com capacidade de 10 µl. Utilizou-se também uma cuba cromatográfica de vidro para eluição e uma estufa para aquecimento das cromatoplasmas para permitir a visualização dos resultados. As semi-quantificações do ácido artemisinínico foram feitas em fotodensitômetro PHARMACIA BIOTECH / IMAGE MASTER 1D.

Para o cultivo “*in vitro*” e as análises de açúcares, os reagentes e reguladores de crescimento utilizados foram todos provenientes da Sigma ou Merck. Todo o processo de esterilização e a manipulação das culturas “*in vitro*” foi executado em câmara de fluxo laminar horizontal HLFS12 marca Veco. As leituras de absorbância foram feitas em espectrofotômetro FENTO modelo 435, a 620 nm e as centrifugações foram feitas em centrífuga refrigerada Superspeed RC-5B Sorvall, rotor SS34, a 4°C.

### 3.2. GERMINAÇÃO E CULTIVO DAS PLANTAS MATRIZES

As plantas matrizes foram germinadas e conduzidas em casa de vegetação no Departamento de Fisiologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas, em vasos contendo vermiculita e mantidas sob dias longos durante os meses de maio a agosto de 1996 para crescimento. Durante o cultivo em casa de vegetação as plantas foram regadas semanalmente com 300 mL de solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950), sendo os vasos mantidos em sistema aberto onde recebiam água diariamente, e solução nutritiva uma vez por semana. Após 4 meses da germinação foram retirados folhas, entrenós e ápices inteiros das plantas, para serem utilizados como explantes no cultivo *in vitro*.

Os explantes foram esterilizados em condições assépticas por imersão durante 10 minutos em uma solução a 1% de fungicida (marca comercial Benlate, grupo químico benzimidazol). Após estes 10 minutos, os explantes foram passados por álcool 70% durante 20 segundos e imersos em uma solução a 1% de NaOCl (hipoclorito de sódio P.A. 5-6%) por 8 minutos. Em todas as soluções foram adicionados 0,1 mL de agente espalhante (Tween 20 v/v) e o recipiente foi mantido sob agitação constante durante todo o processo de esterilização. Após a esterilização foram feitas três lavagens dos explantes com água destilada estéril. Os explantes esterilizados foram colocados para secar sobre papel de filtro estéril em placas de Petri, durante 1 hora em condições assépticas. Todo o processo de esterilização descrito foi executado em câmara de fluxo laminar.

Para micropropagação e cultivo da *A. annua* L. foi utilizado o meio de sais minerais de Murashige & Skoog (1962), acrescido de sacarose na concentração de 30 g/L como fonte de carboidratos. A concentração de ágar utilizada foi de 7 g/L e o pH foi ajustado para o valor de 5,8 anteriormente à autoclavagem. Após a esterilização dos explantes e sua inoculação nos frascos de cultivo estes foram mantidos à temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , sob luz branca

incandescente (intensidade 3000 lux) em fotoperíodo de 16 horas. Após 10 dias da esterilização os explantes foram transferidos para meio MS suplementado com vários reguladores de crescimento, conforme descrito na tabela 1. O pH do meio foi ajustado a 5,8 anteriormente à autoclavagem. As culturas foram crescidas sob luz contínua fluorescente (3000 lux), a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Para todos os experimentos 20 replicatas foram mantidas e cada experimento foi repetido 3 vezes.

**Tabela 1.** Reguladores de crescimento adicionados ao Meio Básico de Sais Minerais de Murashige & Skoog (1962). Valores indicados em mg/L.

Meio	ANA	AIA	2,4-D	BA
1	0,1	-	-	0,5
2	1,0	-	-	1,0
3	1,0	-	-	0,1
4	0,5	-	-	2,0
5	-	-	-	1,5
6	-	-	-	1,0
7	-	0,1	-	1,0
8	1,0	-	0,5	-
9	0,5	1,0	1,0	-

### 3.3. ENRAIZAMENTO, ACLIMATAÇÃO E CULTIVO DAS PLANTAS EM CASA DE VEGETAÇÃO

As plântulas desenvolvidas *in vitro*, ao apresentarem cerca de 3 cm de comprimento, foram individualizadas e transferidas para enraizamento em meio MS suplementado com AIA ou AIB (2 mg/L). Uma vez enraizadas, as plântulas foram transferidas para meio de sais minerais de Murashige & Skoog (1962) com a metade da concentração de sais ( $\frac{1}{2}$  MS) por cerca de uma semana, sendo então plantadas em vermiculita autoclavada e mantidas em câmara de crescimento a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Cerca de 30 dias após a transferência para vermiculita, as plântulas foram transferidas para pequenos vasos contendo vermiculita como substrato, sendo então mantidas em casa de vegetação para aclimatação. Simultaneamente as sementes foram germinadas em vasos contendo vermiculita, para serem crescidas em casa de vegetação nas mesmas condições das plantas micropropagadas, sendo que esta população constituiu a população matriz (população de plantas não micropropagadas).

As plantas aclimatadas foram mantidas em casa de vegetação juntamente com a população de plantas não micropropagadas (população matriz), sendo que cada população consistiu de 30 plantas, sob regime de dias longos (16 horas de luz) durante 6 meses. As plantas foram regadas semanalmente com 300 mL de solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950) e os vasos foram mantidos em sistema aberto onde recebiam água diariamente, e solução nutritiva uma vez por semana. Foram feitas medidas semanais de altura ao longo desse período. Ao final desse período (180 dias) as plantas foram coletadas, sendo feitas medidas de massa fresca, massa seca, dosagens de açúcares totais e de artemisinina.

### 3.4. DOSAGENS DE AÇÚCARES TOTAIS

Os extratos iniciais para as análises de açúcares totais foram obtidos em MCA (metanol:clorofórmio:água) na proporção de 12:5:3 (v/v/v), sendo utilizados 10 mL da mistura por grama de material fresco, de acordo com metodologia descrita por Bielecki & Turner (1966), sendo esta a metodologia mais utilizada atualmente para este tipo de análise. A metodologia de extração consistiu em:

- a) trituração do material vegetal em ultra-dispersor POLYTRON/PT2000 (equipamento misturador e triturador de alta eficiência para pequenos volumes) por 15 segundos;
- b) centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos e separação da fração sobrenadante;
- c) separação e eliminação da fase clorofórmio pela adição de clorofórmio e água destilada à fração sobrenadante, com nova centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos;
- d) retirada e incubação do sobrenadante em banho-maria a 35°C por 2 horas para eliminação do resíduo de clorofórmio.

Após a extração, as dosagens de açúcares solúveis totais foram feitas a partir da fração sobrenadante obtida da extração por MCA, segundo metodologia descrita por Yemm & Willis (1954), utilizando-se reativo de antrona 0,2% em ácido sulfúrico concentrado. Para a curva-padrão foi utilizada a dextrose e as leituras de absorvância foram feitas em 620 nm. A metodologia de dosagem consistiu em:

- a) adição de 1,0 mL da amostra em 2,0 mL do reagente de antrona, agitando a seguir;
- b) aquecimento em banho-maria a 100°C por 5 minutos, para completar a reação;
- c) parada da reação em banho de gelo, nova agitação e obtenção das leituras de absorvância.

### 3.3.5. ANÁLISES DE ARTEMISININA POR CCD

As análises de artemisinina foram conduzidas no CPQBA/UNICAMP e baseadas no método descrito por Delabays *et al.* (1997). Após a separação do material vegetal a ser analisado este foi transferido para uma estufa com circulação de ar para secagem em temperatura de  $34 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 48 horas. Para cada amostra, 100 mg de material finamente moído foi extraído em 5 mL de tolueno, em ultra-dispersor POLYTRON/PT2000 (equipamento misturador e triturador de alta eficiência para pequenos volumes) por 30 segundos a 20.000 rpm. Posteriormente, o extrato foi centrifugado durante 6 minutos a 3200 g, obtendo-se os extratos brutos a serem analisados.

Com uma microseringa, 3  $\mu\text{L}$  de cada extrato foram aplicados sobre uma placa de sílica-gel 60 F<sub>254</sub> (MERCK art. 1.05554). Cada placa recebeu 4 diferentes concentrações de artemisinina (1,5; 2,0; 2,5 e 3,0  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) ao centro, mais 4 aplicações laterais, em duplicata, das amostras. As placas do ensaio foram eluídas em cuba de vidro previamente saturada com uma mistura de clorofórmio : metanol (98 : 2 v/v). Para a revelação, uma solução contendo 50 mL de ácido acético glacial, 0,5 mL de anisaldeído e 1,0 mL de ácido sulfúrico concentrado foi borrifada sobre as placas. Posteriormente, cada placa foi colocada em estufa a  $110^\circ\text{C}$  durante 5 minutos, para permitir a visualização dos resultados, e as cromatoplas foram escaneadas e avaliadas comparativamente por fotodensitometria.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO

Nove meios de cultura, demonstrados anteriormente na tabela 1 foram usados com várias combinações hormonais para os testes de iniciação de brotações múltiplas em *A. annua*. Entre os diferentes explantes testados (folhas, entrenós e ápices inteiros assépticos) apenas os ápices inteiros responderam positivamente após 10 dias da inoculação. O crescimento dos explantes iniciou-se visualmente após 7 dias de cultivo, e os explantes que não resultaram em micropropagação efetiva foram descartados após 30 dias de cultivo.

Na tabela 2 estão descritos os números de brotações por explante, sendo que esses dados representam a média de 20 determinações independentes e os experimentos foram realizados em triplicata.

Os meios 8 e 9 induziram a proliferação de calos, e em consequência observou-se menores taxas de brotações múltiplas nesses tratamentos. O meio 6 apresentou-se o mais eficiente em termos de micropropagação, resultando em 50 brotações múltiplas para cada explante inicial, sendo esse resultado superior aos descritos anteriormente na literatura (Lê & Collet, 1991; Woerdenbag *et al.*,1993). De modo geral os meios contendo 6-benziladenina em ausência de auxinas apresentaram os melhores resultados na indução de brotações múltiplas, sendo determinado o nível de 1,0 mg/L de BA como ótimo.

Tabela 2. Combinações de meios testados e resultado de brotações/explante obtidas nos experimentos para indução de brotações múltiplas em cultivo *in vitro* de *A. annua* L.

Meio	ANA	AIA	2,4-D	BA	brotações/explante
1	0,1	-	-	0,5	15± 0,75
2	1,0	-	-	1,0	20± 0,84
3	1,0	-	-	0,1	11± 0,25
4	0,5	-	-	2,0	25± 1,20
5	-	-	-	1,5	25± 0,14
6	-	-	-	1,0	50± 0,83
7	-	0,1	-	1,0	30± 1,14
8	1,0	-	0,5	-	5 ± 1,13
9	0,5	1,0	1,0	-	7 ± 0,03

#### 4.2. ENRAIZAMENTO, ACLIMATAÇÃO E CULTIVO EM CASA DE VEGETAÇÃO

Uma vez obtidas as brotações múltiplas, tais plântulas necessitavam ser enraizadas para dar prosseguimento ao processo de cultivo *in vitro* e posterior aclimação. As plântulas desenvolvidas *in vitro*, ao apresentarem cerca de 3 cm de comprimento, foram individualizadas e transferidas para enraizamento em meio MS suplementado com AIA ou AIB (2 mg/L). Enquanto o meio suplementado com AIA apresentou taxas de enraizamento de 70% após 12 dias da transferência, o meio MS suplementado com 2 mg/l de AIB apresentou máximo enraizamento (100%) em 10 a 12 dias após a transferência (figura 2). As raízes

desenvolveram-se diretamente das partes aéreas, sem a formação de calos. Uma vez enraizadas, as plântulas foram transferidas para meio de cultura ½ MS por cerca de uma semana, sendo então plantadas em vermiculita autoclavada e mantidas em câmara de crescimento a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Cerca de 30 dias após a transferência para vermiculita, as plântulas foram transferidas para pequenos vasos contendo vermiculita como substrato e mantidas em casa de vegetação para aclimação. Plântulas completas podem assim ser obtidas em menos de 4 meses, resultado inédito de aclimação no Brasil para os híbridos Ch x Viet.55 e 39 X 1V micropropagados.

#### 4.3. CURVAS DE CRESCIMENTO, MEDIDAS DE MASSA E DOSAGENS DE AÇÚCARES

As plantas aclimatadas e mantidas em casa de vegetação sob regime de dias longos durante 6 meses foram medidas semanalmente quanto a altura e ao diâmetro do caule. Os resultados obtidos estão demonstrados nas Figuras 3 e 4 a seguir:



Figura 2. Plântula de *A. annua* em meio MS suplementado com 2 mg/l de AIB 12 dias após a transferência, pronta para ser aclimatada.

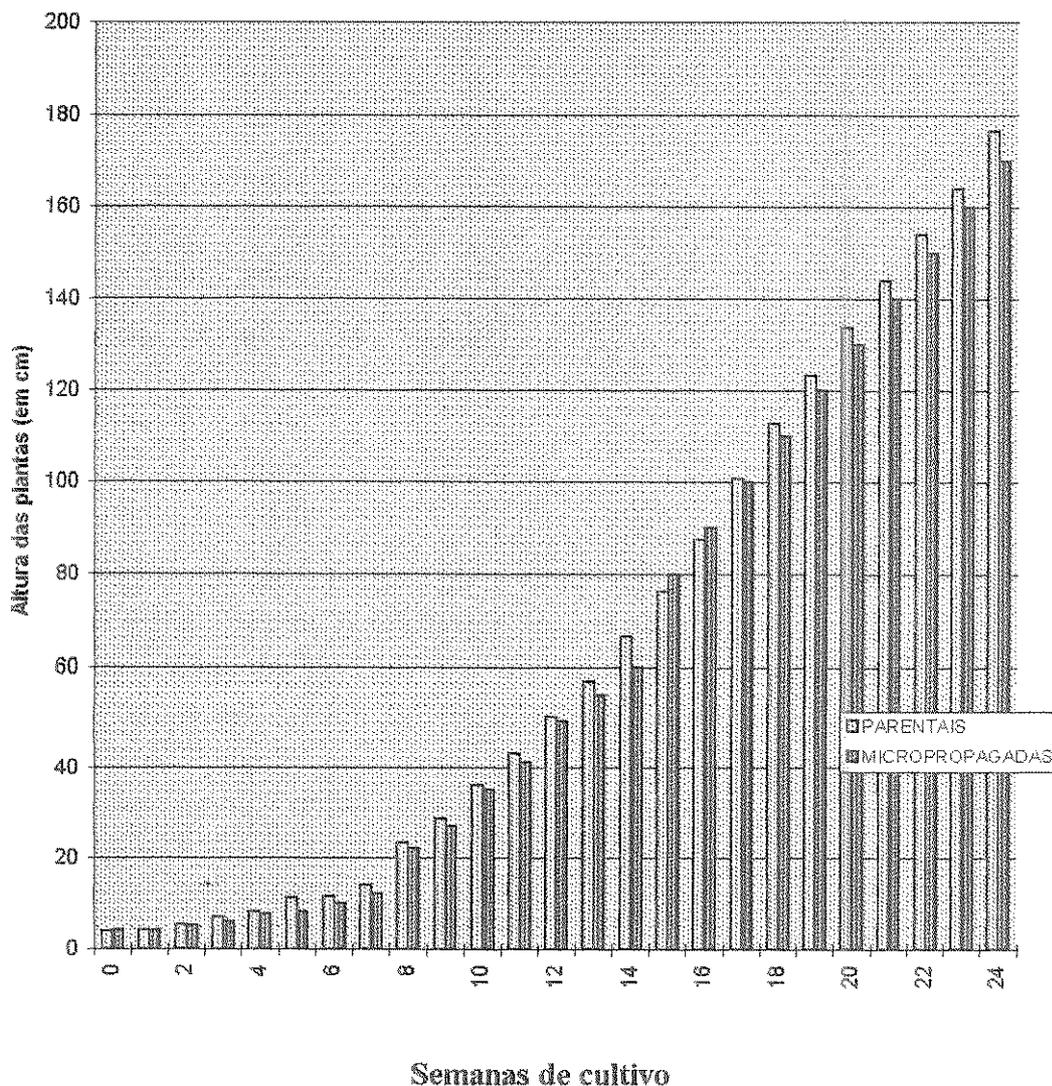


Figura 3. Curvas Comparativas de Crescimento em altura (cm) das Plantas Matrizes e Micropropagadas de *A. annua* durante 24 semanas de cultivo em casa de vegetação. Os dados representam a média de 30 plantas para cada população, distribuídas totalmente ao acaso e não diferem entre si pelo teste T de Student ao nível de 5% de probabilidade. Desvio-padrão após 24 semanas: matrizes = 0,53; micropropagadas = 0,48.

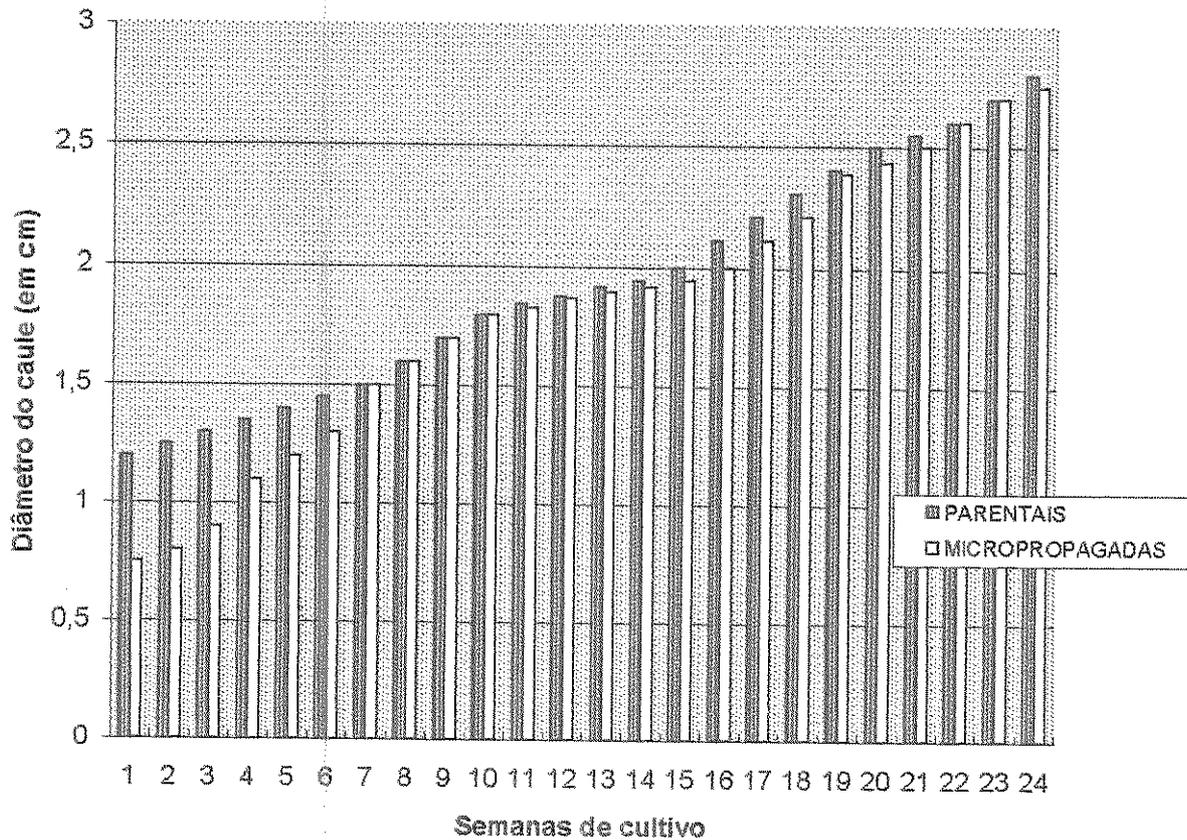


Figura 4. Curvas Comparativas de Crescimento do diâmetro do caule (cm) das Plantas Matrizes e Micropropagadas de *A. annua* durante 24 semanas de cultivo em casa de vegetação. Os dados representam a média de 30 plantas para cada população, distribuídas totalmente ao acaso e não diferem entre si pelo teste T de Student ao nível de 5% de probabilidade. Desvio-padrão após 24 semanas: matrizes = 0,15; micropropagadas = 0,12.

Conforme demonstrado nas figuras 3 e 4, as plantas matrizes e as micropropagadas não diferiram significativamente com relação à altura final e ao diâmetro do caule após as 24 semanas de cultivo, segundo o teste T de Student a nível de 5% de probabilidade. A altura das plantas pode ser considerada igual nas duas populações, não havendo diferenças no padrão de crescimento ao longo do tempo. O diâmetro do caule (Figura 4), por sua vez, nas primeiras semanas é mais estreito nas plantas micropropagadas que nas plantas normais. No entanto, o diâmetro das duas populações praticamente se igualam a partir da sétima semana de cultivo. Tais dados nos indicam que as plantas que passaram pelo processo de cultivo *in vitro* podem inicialmente ser mais estreitas que aquelas cultivadas em casa de vegetação, mas as diferenças existentes tendem a ser minimizadas com o passar do tempo.

Ao final das 24 semanas de cultivo as plantas foram coletadas para medidas de massa fresca, massa seca e dosagens de açúcares solúveis totais, sendo os resultados apresentados nas Figuras 5 e 6 a seguir:

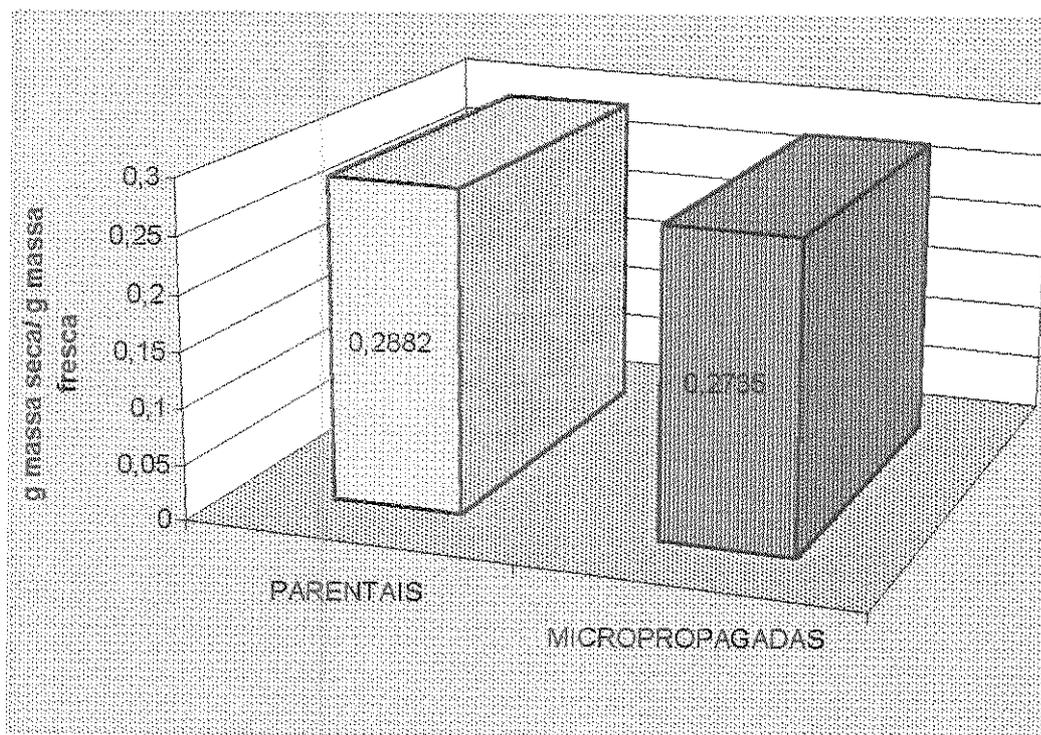


Figura 5. Resultados obtidos de comparação entre massa seca/massa fresca após 24 semanas de cultivo em casa de vegetação de plantas matrizes e plantas micropropagadas. Os dados representam a média de 30 plantas para cada população, distribuídas totalmente ao acaso e não diferem entre si pelo teste T de Student ao nível de 5% de probabilidade. Desvio-padrão: matrizes = 0,02; micropropagadas = 0,03.

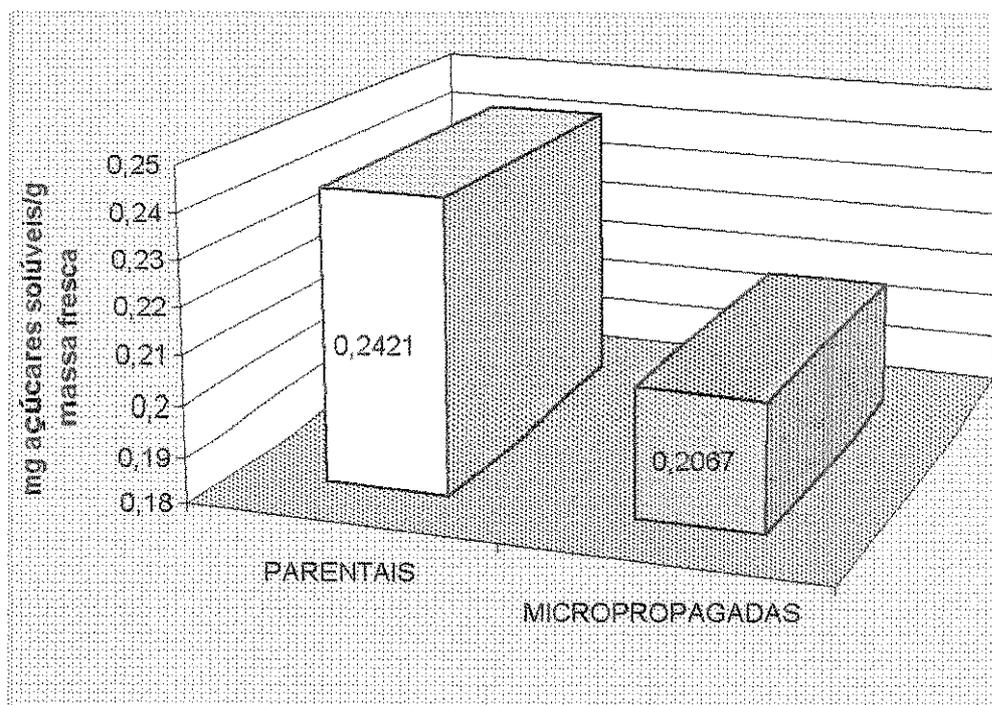


Figura 6. Resultados obtidos de comparação entre teores de açúcares solúveis/massa fresca após 24 semanas de cultivo em casa de vegetação de plantas matrizes e plantas micropropagadas. Os dados representam a média de 30 plantas para cada população, distribuídas totalmente ao acaso e não diferem entre si pelo teste T de Student ao nível de 5% de probabilidade. Desvio-padrão: matrizes = 0,04; micropropagadas = 0,02.

A relação entre massa fresca e seca foi de 0,288 g para as plantas matrizes, e de 0,273 g para as plantas micropropagadas (Figura 5). Quanto aos açúcares solúveis totais, enquanto as plantas matrizes apresentaram 0,242 mg/g de massa fresca, as plantas micropropagadas apresentaram 0,206 mg/g de massa fresca (Figura 6). Em ambos os casos os teores não diferiram significativamente entre si segundo o teste T de Student a nível de 5% de probabilidade, o que nos levou a presumir que, de modo análogo ao observado nas análises de crescimento em altura e diâmetro do caule, as plantas matrizes e as micropropagadas apresentam desempenho bastante semelhante no que diz respeito à capacidade de acúmulo de biomassa e disponibilidade de energia. Tais resultados confirmam os demonstrados no Capítulo III deste trabalho.

#### 4.4. ANÁLISES DE ARTEMISININA

As plantas matrizes e micropropagadas foram analisadas quanto aos teores de artemisina por CCD/DT, após as 24 semanas de cultivo. Os teores obtidos estão demonstrados na Figura 7 a seguir:

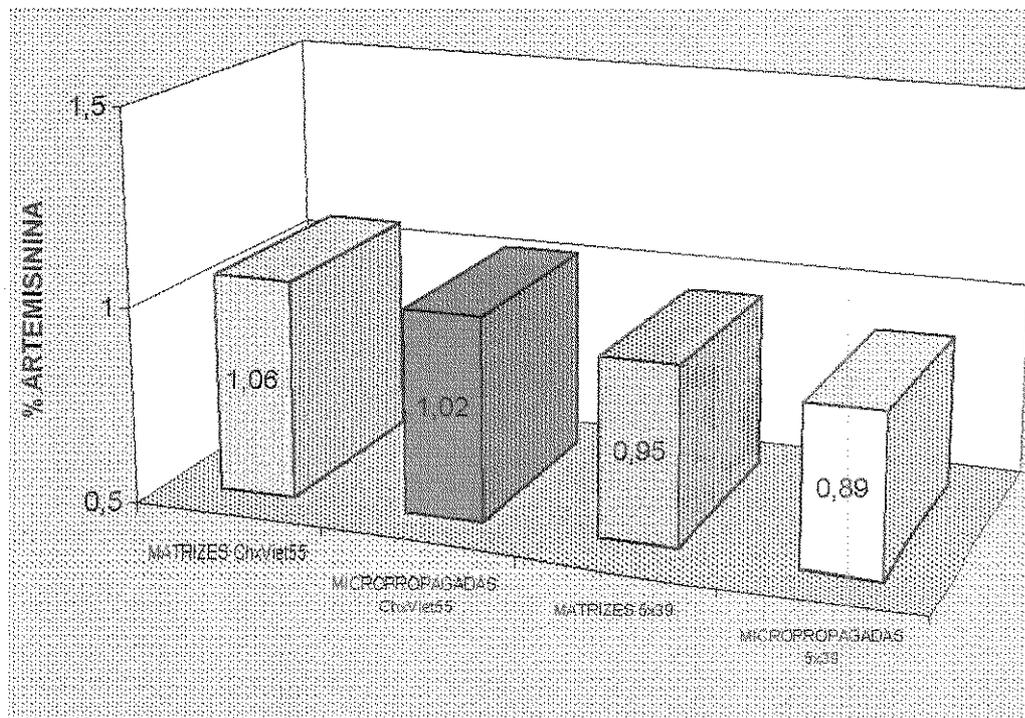


Figura 7. Comparação entre teores de artemisinina para as plantas matrizes e micropropagadas de *A. annua* clones Ch x Viet 55 e 39 x 1V, após 24 semanas de cultivo em casa de vegetação. Os dados representam a média de 15 plantas para cada população e os resultados obtidos pelos clones Ch x Viet 55 e 39 X 1V não diferem entre si pelo teste T de Student ao nível de 5% de probabilidade. Desvio-padrão: ChxViet55 matrizes = 0,15; ChxViet55 micropropagadas = 0,11; 39 x 1V matrizes = 0,12; 39 x 1V micropropagadas = 0,11.

Embora todos os experimentos tenham sido conduzidos com dois clones de *A. annua* (Ch x Viet 55 e 39 x IV), apenas com relação aos teores de artemisinina esses dois clones apresentaram alguma diferença entre si (Figura 7). Embora as plantas do clone Ch x Viet 55 tenham mostrado uma ligeira superioridade na produção, as diferenças encontradas não são significativas pelo teste T de Student ao nível de 5% de probabilidade e não invalidaram o processo de micropropagação, visto que os teores mais baixos de artemisinina encontrados (0,89%, clone 39 x IV micropropagado) ainda são bastante elevados indicando que as plantas micropropagadas mantêm os níveis elevados das populações matrizes. Os relatos da manutenção dos teores encontrados em casa de vegetação e no campo são mencionados para esta espécie (Ferreira *et al.*, 1995), portanto esses teores elevados de artemisinina serão provavelmente mantidos. Aliados aos padrões de crescimento analisados anteriormente, nos levam a considerar que o processo de micropropagação é válido na manutenção de híbridos em *A. annua*.

## 5. CONCLUSÕES

A técnica utilizada neste estudo permitiu aumentar as taxas de micropropagação em *A. annua*, principalmente pela manipulação de reguladores de crescimento. Entre as diferentes combinações utilizadas, o meio MS suplementado com BA (1 mg/L) induziu o maior número de brotações múltiplas diretamente de ápices assépticos. Para o enraizamento “in vitro” o meio MS adicionado de AIB (2 mg/L) provou ser o melhor entre as combinações utilizadas, sendo que o enraizamento na fase de vasos foi estabelecido uniformemente em níveis acima de 95%. O protocolo desenvolvido neste trabalho nos permitiu obter 50-60 plântulas em cada sub-cultura, resultado nunca antes relatado para cultivos “in vitro” de *A. annua*.

Com os resultados obtidos para as curvas de crescimento e produção de massa, junto das análises de açúcares e artemisinina, pudemos concluir que o processo de micropropagação foi vantajoso na manutenção dos híbridos Ch x Viet 55 e 39 x 1V, uma vez que as plantas micropropagadas apresentaram-se fenotipicamente fiéis às plantas matrizes. Os resultados encontrados nas plantas micropropagadas foram bastante próximos aos observados nas plantas que não passaram pelo cultivo *in vitro*, o que nos levou a concluir que o processo de micropropagação foi válido e pode ser uma importante ferramenta na manutenção de genótipos de elite desta planta medicinal, estando incluídos nesse caso os híbridos estudados, bem como seus parentais.

# CAPÍTULO III – AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS NÍVEIS DE ARTEMISININA, CLOROFILAS E CAROTENÓIDES EM GENÓTIPOS HÍBRIDOS E EM UMA POPULAÇÃO NÃO MELHORADA DA PLANTA MEDICINAL *A. annua* L.

## 1. INTRODUÇÃO

Desde 1987 a *A. annua* vem sendo cultivada no Brasil pelo CPQBA/UNICAMP, que vem realizando experimentos com o objetivo de domesticar e otimizar o cultivo da espécie em nossas condições (Figueira, 1995). Várias etapas do processo de domesticação já foram concluídas, permitindo excelentes resultados com relação ao melhoramento e obtendo novos híbridos com características agronômicas adequadas ao cultivo em climas tropicais, em associação a elevados níveis de artemisinina. O CPQBA/UNICAMP, prosseguindo os trabalhos da MEDIPLANT (Suíça), selecionou e hibridizou genótipos ricos em artemisinina e com elevada produção de biomassa, obtendo híbridos adaptados às condições climáticas brasileiras. Através de cruzamentos controlados entre genótipos selecionados provenientes de populações chinesas e vietnamitas, obteve-se ganho genético quanto ao teor de artemisinina e sobre a uniformidade da cultura, e pelo aumento de biomassa e dos teores de artemisinina foi possível aumentar a produção de artemisinina de 5 kg/ha na população base, para cerca de 25 kg/ha na população geneticamente melhorada (Magalhães *et al.*, 1997).

Além do aumento na produtividade, houve a necessidade de desenvolver novos genótipos com florescimento tardio, pois embora as condições climáticas brasileiras permitam o cultivo da *A. annua* durante todos os períodos do ano devido à nossa faixa de temperatura, na nossa latitude (22° 48') ocorrem fotoperíodos muito favoráveis à indução do florescimento (Magalhães, 1996). Como a artemisinina é uma molécula complexa e a sua produção em laboratório ainda não é comercialmente viável, a planta ainda é viável para obtenção do

composto. Assim, os híbridos desenvolvidos com alto teor de artemisinina (acima de 1% da massa de folhas secas), permitiram realizar 2 cortes por ano e tornaram o Brasil um local competitivo para a produção de artemisinina a partir da *A. annua* (Magalhães *et al.*, 1997).

A via biossintética completa para a artemisinina ainda não foi completamente elucidada, porém vários passos da sua biotransformação já foram determinados (El-Feraly *et al.*, 1986; Akhila *et al.*, 1987; Akhila *et al.*, 1990; Jung *et al.*, 1990; Sangwan *et al.*, 1993; Nair & Basile, 1993; Brown, 1994). A artemisinina deriva do ácido mevalônico e do isopentenil-pirofosfato (IPP), conforme demonstrado na Figura 1. É um terpenóide, e os compostos desta classe baseiam-se na molécula do isopreno ( $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ ), sendo constituídos por duas ou mais unidades de 5 carbonos (Lehninger, 1993). Como as clorofilas e os carotenóides também derivam do isopreno e têm a mesma origem biossintética da artemisinina, derivando do IPP, existe a possibilidade de correlações entre os níveis de clorofilas, carotenóides e os níveis de artemisinina observados nos híbridos com alto teor de artemisinina.

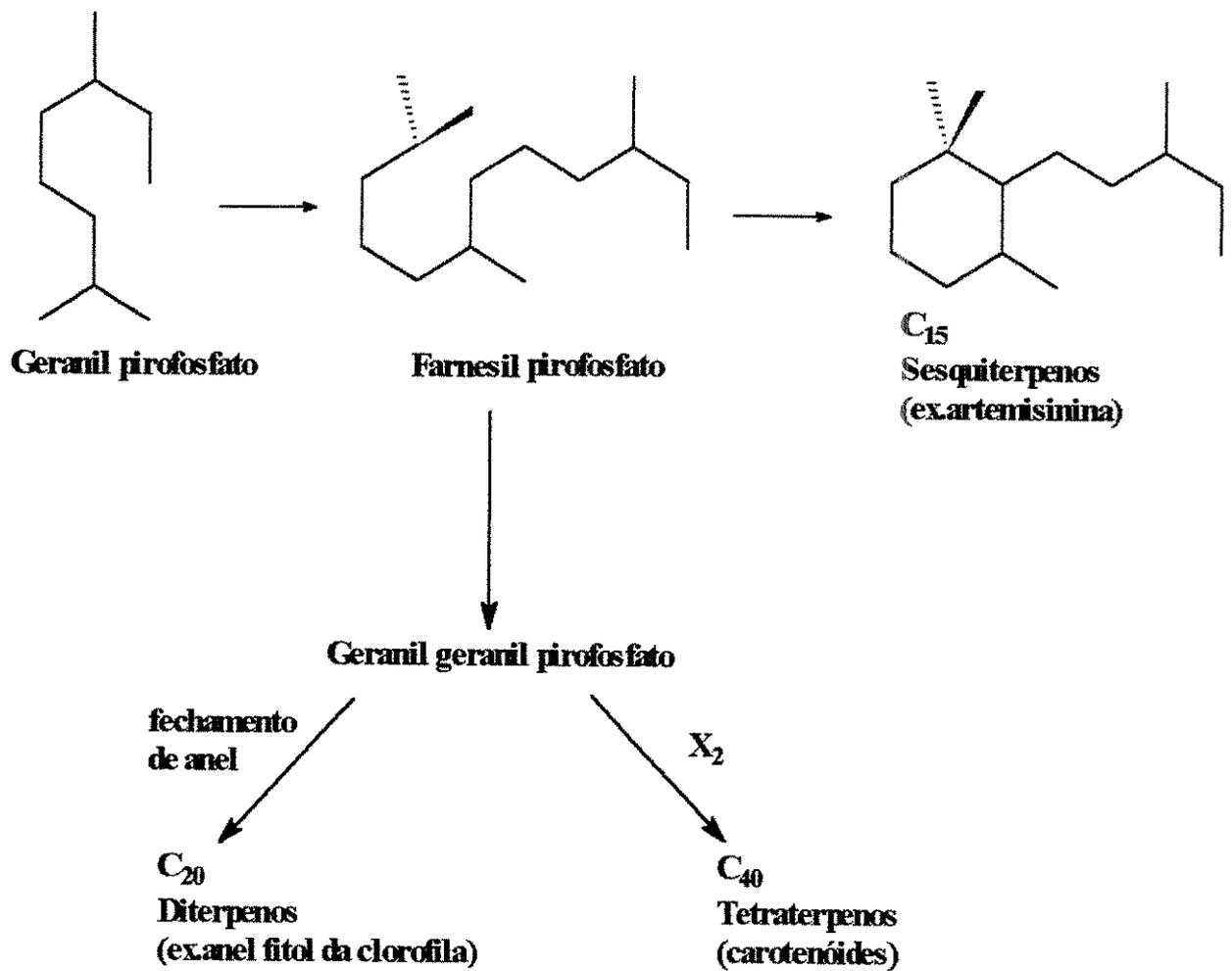


Figura 1. Rota biossintética proposta para diferentes terpenóides em plantas (adaptado de Lehninger, 1993)

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar e comparar os híbridos Ch x Viet 55 e 39 X 1V de *A. annua* obtidos pelo programa de melhoramento e seleção do CPQBA/UNICAMP, com uma população não melhorada, característica por apresentar florescimento precoce e baixos níveis de artemisinina. Os híbridos foram comparados com a população não melhorada visando:

- a) comparar padrões de crescimento, medidas de massa e de rendimento nas duas populações.
- b) comparar o desempenho relativo ao acúmulo de proteínas e aos açúcares solúveis totais nas plantas, avaliando a biomassa e a disponibilidade de energia para as duas populações.
- c) comparar os níveis de artemisinina e de clorofilas e carotenóides nas plantas, e verificar possíveis interações entre os compostos de origem biossintética comum.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL VEGETAL, EQUIPAMENTOS E REAGENTES UTILIZADOS

As plantas de *A. annua* L. utilizadas como fonte de explantes para este trabalho foram germinadas *in vitro* a partir de sementes cedidas pelo CPQBA/UNICAMP, e provêm de duas populações de plantas que diferem quanto a produção de artemisinina e a características agronômicas em relação a sua adequação ao cultivo em clima tropical. A população melhorada (denominada população "M") é composta por plantas dos clones 39 x 1V e Ch x Viet 55, sendo metade das plantas de cada clone, e se caracteriza por apresentar florescimento tardio e teores de artemisinina acima de 1% sobre a massa das folhas secas (Magalhães *et al.*, 1997). A população introdutória foi obtida nas primeiras introduções da espécie no CPQBA/UNICAMP (denominada população "T") e apresenta teores de artemisinina variando de 0,2 a 0,4% sobre a massa das folhas secas, além do florescimento precoce. As sementes de ambas as populações foram armazenadas em condições constantes de temperatura (10°C) e umidade (70%).

Todos os reagentes utilizados para as análises químicas são de grau P.A. (para análise). A artemisinina utilizada como padrão nas análises foi purificada na Divisão de Química Orgânica Farmacêutica do CPQBA (ponto de fusão obtido = 154-155°C). Os extratos foram aplicados com microseringas Hewlett-Packard 9301-0246 com capacidade de 10 µl. Utilizou-se também uma cuba cromatográfica de vidro para eluição e uma estufa para aquecimento das cromatoplasmas para permitir a visualização dos resultados. As semi-quantificações do ácido artemisinínico foram feitas em fotodensitômetro PHARMACIA BIOTECH / IMAGE MASTER 1D.

Para o cultivo “in vitro” e análises de proteínas, açúcares, clorofilas e carotenóides os reagentes e reguladores de crescimento utilizados foram todos provenientes da Sigma ou Merck. Todo o processo de esterilização e a manipulação das culturas “in vitro” foi executado em câmara de fluxo laminar horizontal HLFS12 marca Veco. As leituras de absorvância foram feitas em espectrofotômetro FENTO modelo 435, a 620 nm e as centrifugações foram feitas em centrífuga refrigerada Superspeed RC-5B Sorvall, rotor SS34, a 4°C.

### 3.2. ESTERILIZAÇÃO E CULTIVO *IN VITRO*

As sementes das populações selecionadas foram esterilizadas superficialmente em condições assépticas por imersão durante 10 minutos em uma solução a 1% de fungicida (marca comercial Benlate, grupo químico benzimidazol). Após este tempo, as sementes foram passadas por álcool 70% durante 20 segundos e imersas em uma solução a 1% de NaOCl (hipoclorito de sódio P.A. 5-6%) por 12 minutos. Em todas as soluções foram adicionados 0,1 mL de agente espalhante (Tween 20 v/v) e o recipiente foi mantido sob agitação constante durante todo o processo de esterilização. Após a esterilização foram feitas três lavagens das sementes com água destilada estéril. As sementes esterilizadas foram secas sobre papel de filtro estéril em placas de Petri, durante 1 hora em condições assépticas. Todo o processo de esterilização descrito foi executado em câmara de fluxo laminar.

Para germinação e cultivo das sementes de *A. annua* foi utilizado o meio de sais minerais de Murashige & Skoog (1962), acrescido de sacarose na concentração de 30 g/L como fonte de carboidratos. A concentração de ágar utilizada foi de 7 g/L e o pH foi ajustado para o valor de 5,8 anteriormente à autoclavagem. Após a esterilização das sementes foram feitas

as inoculações nos frascos de cultivo, os quais foram mantidos à temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , sob luz branca incandescente (intensidade 3000 lux) em fotoperíodo de 16 horas.

As plântulas desenvolvidas *in vitro*, ao apresentarem cerca de 3 cm de comprimento, foram individualizadas e transferidas para enraizamento em meio MS suplementado com 2 mg/L de AIB (2 mg/L), conforme o protocolo estabelecido anteriormente e descrito no Capítulo II deste trabalho. Uma vez enraizadas, as plântulas foram transferidas para meio de sais minerais de Murashige & Skoog (1962) com a metade da concentração de sais ( $\frac{1}{2}$  MS) por uma semana, sendo então plantadas em vermiculita autoclavada e mantidas em câmara de crescimento a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Cerca de 30 dias após a transferência para vermiculita, as plântulas foram transferidas para pequenos vasos contendo vermiculita como substrato, sendo então mantidas em casa de vegetação para aclimação.

### 3.3. CULTIVO EM CASA DE VEGETAÇÃO

Após a aclimação as plantas das duas populações, denominadas “M” (melhorada) e “T” (introdutória) foram mantidas em casa de vegetação sob regime de dias longos (16 horas de luz) durante os meses de março a agosto de 1997, sendo que cada população consistiu de 30 plantas individualizadas. Todas as plantas foram distribuídas totalmente ao acaso e mantidas em condições idênticas de ambiente. As plantas foram regadas semanalmente com 300 mL de solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950) e os vasos foram mantidos em sistema aberto onde recebiam água diariamente, e solução nutritiva uma vez por semana. Foram feitas medidas semanais de altura ao longo desse período. Ao final desse período (180 dias) as folhas foram coletadas, sendo feitas medidas de massa fresca, massa seca, dosagens de açúcares totais, de proteínas, de clorofilas e carotenóides e de artemisinina nas folhas.

### 3.4. MONITORAMENTO DO CRESCIMENTO

O monitoramento do crescimento foi feito a partir de medidas semanais das plantas das duas populações, individualmente, durante os 180 dias de cultivo em casa de vegetação. Por ocasião das análises, as plantas foram amostradas para obtenção dos dados individuais relativos a massa fresca e massa seca, além dos rendimentos de folhas, talos e raízes.

### 3.5. EXTRAÇÕES PARA DOSAGENS

Os extratos iniciais para as dosagens de açúcares totais, proteínas, clorofilas e carotenóides foram obtidos em MCA (metanol:clorofórmio:água) na proporção de 12:5:3 (v/v/v), sendo utilizados 10 mL da mistura por grama de material fresco, de acordo com metodologia descrita por Bielecki & Turner (1966), sendo esta a metodologia mais utilizada atualmente para este tipo de extração. A metodologia de extração consistiu em:

- a) trituração do material vegetal em ultra-dispersor POLYTRON/PT2000 (equipamento misturador e triturador de alta eficiência para pequenos volumes) por 15 segundos;
- b) centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos e separação da fração sobrenadante;
- c) separação e eliminação da fase clorofórmio pela adição de clorofórmio e água destilada à fração sobrenadante, com nova centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos;
- d) incubação do sobrenadante em banho-maria a 35°C por 2 horas para eliminação do resíduo de clorofórmio.

### 3.6. DOSAGENS DE AÇÚCARES TOTAIS, PROTEÍNAS, CLOROFILAS E CAROTENÓIDES

Após a extração, as dosagens de açúcares solúveis totais foram feitas a partir da fração sobrenadante obtida da extração por MCA, sendo esta a metodologia mais utilizada atualmente para esta análise e que foi descrita por Yemm & Willis (1954), utilizando-se reativo de antrona 0,2% em ácido sulfúrico concentrado. Para a curva-padrão foi utilizada a dextrose e as leituras de absorvância foram feitas em 620 nm. A metodologia de dosagem consistiu em:

- a) adição de 1,0 mL da amostra em 2,0 mL do reagente de antrona, seguida de agitação;
- b) aquecimento em banho-maria a 100°C por 5 minutos, para completar a reação;
- c) parada da reação pela colocação do tubo em banho de gelo, seguida de nova agitação e obtenção das leituras de absorvância.

A fração protéica foi determinada a partir do precipitado obtido na extração por MCA, sendo o mesmo ressuspensionado em solução de NaOH 0,1 N (10 mL/g de material fresco), homogeneizado e centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos (3 vezes). O sobrenadante contém a fração protéica. A dosagem de proteínas do extrato foi feita segundo Bradford (1976), utilizando-se reagente de Coomassie Brilliant G250 (100 mg em 50,0 mL de etanol 95%, acrescido de 100 mL de ácido ortofosfórico 85% em volume final de 1000 mL). A dosagem consistiu em adicionar 3,0 mL do reagente de Coomassie a 0,3 mL da amostra, agitando a seguir, sendo as leituras de absorvância obtidas a 595 nm. A elaboração das curvas-padrão foi feita com albumina de soro bovino (BSA) dissolvida em solução de NaOH 0,1 N.

Os teores de clorofila e carotenóides foram obtidos através de leitura dos extratos em MCA em absorvâncias de 666, 653 e 470 nm, de acordo com metodologia descrita por Lichtenthaler & Wellburn (1983), sendo esta metodologia a mais utilizada atualmente para essas análises.

### 3.7. ANÁLISES DE ARTEMISININA POR CCD

As análises de artemisinina foram conduzidas no CPQBA/UNICAMP e baseadas no método descrito por Delabays *et al.* (1997). Após a separação do material vegetal a ser analisado este foi transferido para uma estufa com circulação de ar para secagem em temperatura de  $34 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 48 horas. Para cada amostra, 100 mg de material finamente moído foi extraído em 5 mL de tolueno, em ultra-dispersor POLYTRON/PT2000 (equipamento misturador e triturador de alta eficiência para pequenos volumes) por 30 segundos a 20.000 rpm. Posteriormente, o extrato foi centrifugado durante 6 minutos a 3200 g, obtendo-se os extratos brutos a serem analisados.

Com uma microseringa, 10  $\mu\text{L}$  de cada extrato foram aplicados sobre uma placa de sílica-gel 60 F<sub>254</sub> (MERCK art. 1.05554). Cada placa recebeu 4 diferentes concentrações de artemisinina (1,5; 2,0; 2,5 e 3,0  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) ao centro, mais 4 aplicações laterais, em duplicata, das amostras. As placas do ensaio foram eluídas em cuba de vidro previamente saturada com uma mistura de clorofórmio : metanol (98 : 2 v/v). Para a revelação, uma solução contendo 50 mL de ácido acético glacial, 0,5 mL de anisaldeído e 1,0 mL de ácido sulfúrico concentrado foi borrifada sobre as placas. Posteriormente, cada placa foi colocada em estufa a  $110^\circ\text{C}$  durante 5 minutos, para permitir a visualização das manchas, e as cromatoplas foram escaneadas e avaliadas comparativamente por fotodensitometria.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. CURVAS DE CRESCIMENTO, MEDIDAS DE MASSA E RENDIMENTO, DOSAGENS DE PROTEÍNAS E AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS

A partir das medidas semanais das alturas das plantas, foram elaboradas curvas de crescimento comparativas para as duas populações estudadas, com o objetivo de avaliar os padrões de crescimento de cada população e verificar possíveis diferenças entre as mesmas. Verificou-se uma notável superioridade da população melhorada “M” com relação à população introdutória “I” quanto a velocidade de crescimento e altura final alcançadas, e pudemos observar que o crescimento da população “M” se mostrou superior a partir da quinta semana de cultivo, ressaltando que o cultivo das duas populações se iniciou com plantas de mesmo tamanho. A altura final da população “M” alcançou aproximadamente o dobro da altura final da população “I”. Como as duas populações foram mantidas em condições idênticas de cultivo e de manejo, sendo distribuídas totalmente ao acaso para este experimento, a população “M” apresentou indiscutivelmente uma melhor performance, levando-se em conta a produção do dobro de biomassa que a população “I” ao final de 24 semanas de cultivo. As curvas comparativas de crescimento representam a média das medidas individuais de 30 plantas para cada população, distribuídas totalmente ao acaso, e podem ser vistas na figura 2.

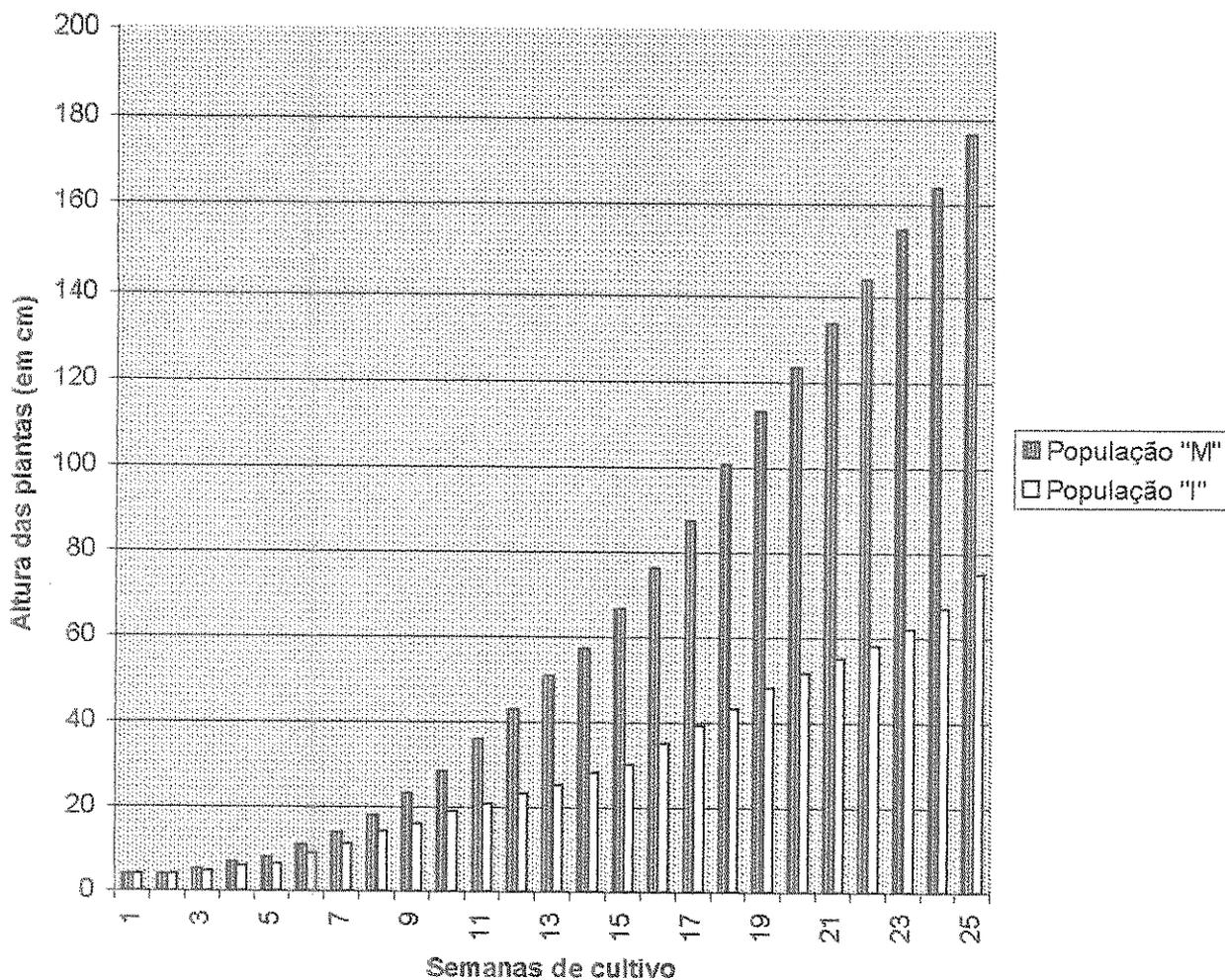


Figura 2. Curvas comparativas de crescimento em altura (cm) das populações melhorada "M" e introdutória "I" de *A. annua* durante 24 semanas de cultivo em casa de vegetação. Os dados representam a média de 30 plantas para cada população, distribuídas totalmente ao acaso e não diferem entre si pelo teste T de Student ao nível de 5% de probabilidade. Desvio-padrão após 24 semanas: "M" = 9,85; "I"= 17,21.

O melhor desempenho observado quanto ao crescimento na população “M” pode ser confirmado com os resultados obtidos pela relação massa fresca/massa seca de folhas, bem como quanto ao acúmulo de proteínas pelas duas populações ao final das 24 semanas de cultivo. A massa seca obtida por grama de massa fresca de folhas foi de 0,296 g para a população “M”, superior aos 0,219 g obtidos para a população “I”. Estes dados ainda são complementados pelos teores de proteína obtidos, de 1,240 mg proteína/g massa fresca de folhas para a população “M”, superiores aos 1,133 mg proteína/g massa fresca de folhas acumulados pela população “I”. Tais resultados indicam claramente que a população “M”, além de apresentar maior velocidade e maior potencial de crescimento que a população “I”, responde de maneira mais efetiva quanto ao acúmulo de biomassa.

As análises dos teores de açúcares totais também nos permitiram verificar diferenças relacionadas ao desempenho superior obtido pela população “M”. Enquanto a população “I” apresentou teores de açúcares totais de 0,156 mg/g massa fresca, os resultados na população “M” foram de 0,245 mg/g massa fresca. Assim sendo, a população “M” apresentou uma maior disponibilidade para manutenção de seus processos vitais e de desenvolvimento, podendo dar suporte à maior produção observada nos resultados acima descritos. Os dados relativos às análises de massa seca, proteínas e açúcares mostram o desempenho superior apresentado pela população “M” com relação a população “I” e podem ser observados na Figura 3.

Com relação aos resultados obtidos para rendimento de folhas, talos e raízes, pudemos confirmar o desempenho superior da população “M”, que apresentou rendimentos superiores em todos os casos, sendo o rendimento bastante superior no caso de folhas e talos, e pouco superior no caso das raízes. Os dados relativos ao rendimento de folhas, talos e raízes em gramas/planta podem ser observados na Figura 4 a seguir.

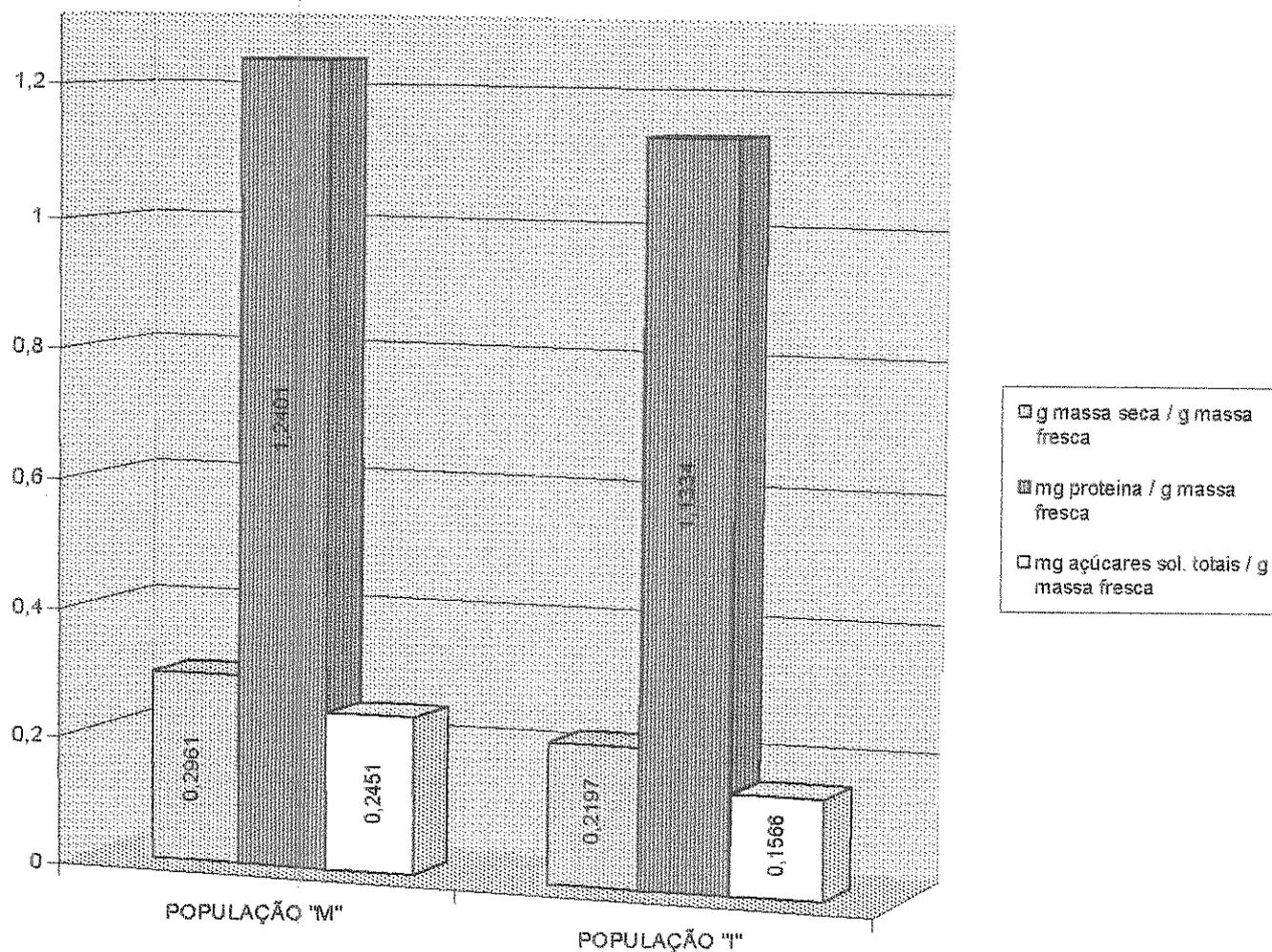


Figura 3. Resultados obtidos de comparação após 24 semanas de cultivo em casa de vegetação de plantas das populações melhorada "M" e introdutória "I". Os dados representam a média de 30 plantas para cada população, distribuídas totalmente ao acaso e diferem entre si pelo teste T de Student ao nível de 5% de probabilidade. Desvios-padrão: a) dados de massa seca: "M" = 0,09, "I" = 0,15; b) dados de proteína: "M" = 0,12, "I" = 0,56; c) dados de açúcares: "M" = 0,09, "I" = 0,12.

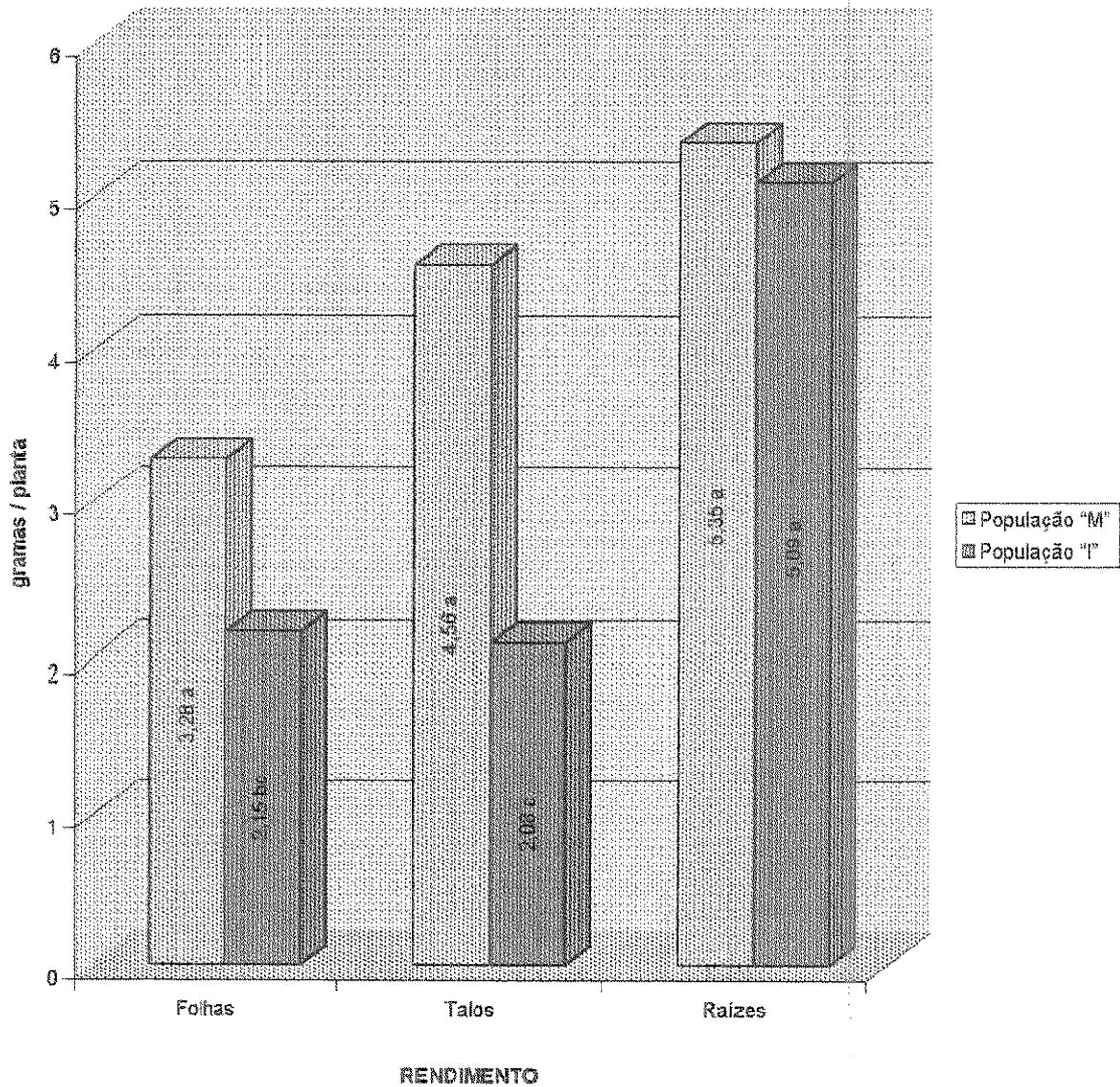


Figura 4. Rendimento de folhas, talos e raízes obtidos após 24 semanas de cultivo em casa de vegetação de plantas das populações melhorada "M" e introdutória "T". Os dados representam a média de 30 plantas para cada população, e médias seguidas por letras distintas diferiram entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Desvios-padrão: a) folhas: "M" = 0,81, "T" = 1,27; b) talos: "M" = 1,18, "T" = 1,31; c) raízes: "M" = 1,91, "T" = 2,15.

## 4.2. DOSAGENS DE ARTEMISININA, CLOROFILAS E CAROTENÓIDES

As análises de artemisinina confirmaram os resultados esperados quanto aos teores e ao rendimento do composto, sendo que a população “M” apresentou teores e rendimento de artemisinina bastante superiores aos apresentados pela população “T” (Figuras 5 e 6). Os resultados relativos à artemisinina acompanharam os resultados obtidos com relação as análises de clorofilas e carotenóides feitas comparativamente para as duas populações, onde a população “M” também apresentou teores de clorofilas e carotenóides mais altos que a população “T”. Sabemos que a artemisinina, bem como os carotenóides e o anel fitol da clorofila pertencem à classe dos isoprenóides, sendo formados por unidades estruturais de 5 carbonos denominadas de isoprenos e sintetizadas a partir da acetil-CoA (Figura 1). Os resultados obtidos com relação às clorofilas e carotenóides indicaram diferenças que aparentemente corresponderam às diferenças entre os teores de artemisinina para as duas populações, onde a população “M” apresentou teores mais elevados que a população “T” em todos os casos. A população “M”, mais produtiva em artemisinina, apresentou teores mais altos de clorofilas e carotenóides (62,649 mg/g massa fresca) quando comparada à população “T” (50,673 mg/g massa fresca), conforme demonstrado na Figura 6. Considerando-se a origem biossintética em comum desses diferentes compostos e com base nestes resultados obtidos, pudemos mostrar a existência de uma correlação positiva entre os teores de clorofilas e carotenóides e a produção de artemisinina em *A. annua*.

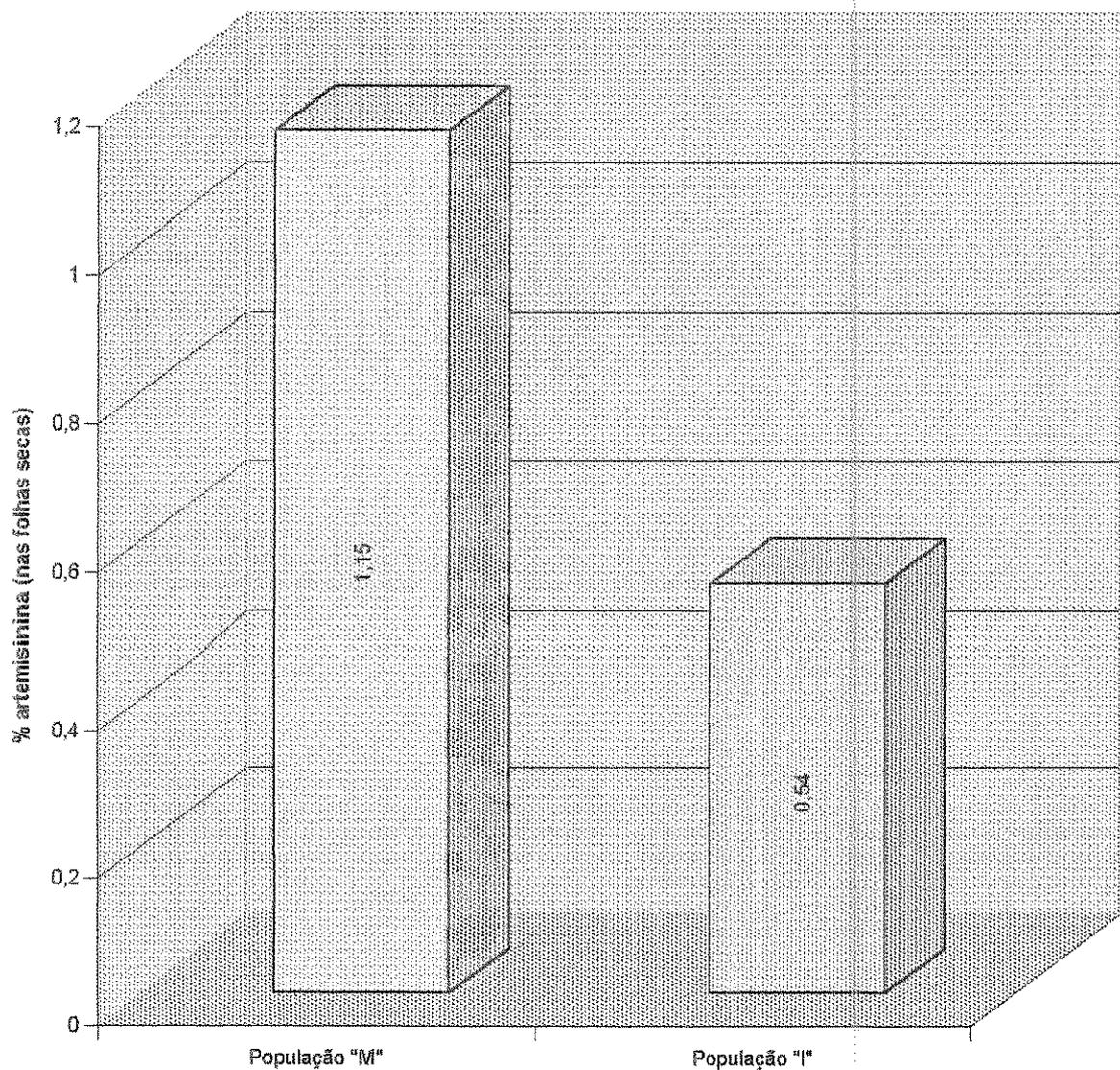


Figura 5. Resultados de comparação entre porcentagens de artemisinina nas folhas secas após 24 semanas de cultivo em casa de vegetação de plantas das populações melhorada "M" e introdutória "I". Os dados representam a média de 30 plantas para cada população, distribuídas totalmente ao acaso e diferem entre si pelo teste T de Student ao nível de 5% de probabilidade. Desvio-padrão: "M" = 0,22; "I" = 0,31.

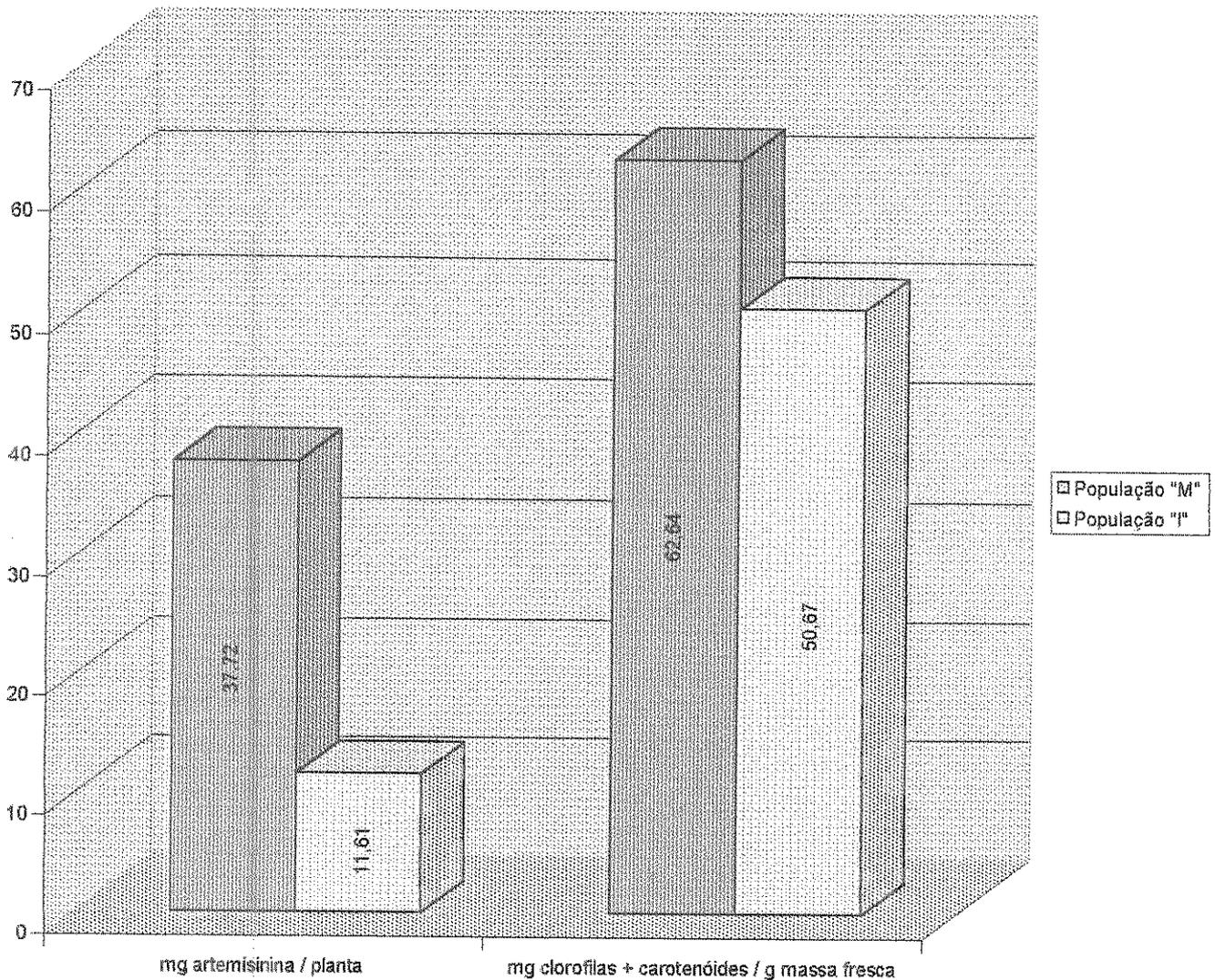


Figura 6. Resultados de comparação entre rendimento de artemisinina e clorofilas+carotenóides/massa fresca de folhas após 24 semanas de cultivo em casa de vegetação de plantas das populações melhorada "M" e introdutória "I". Os dados representam a média de 30 plantas para cada população, distribuídas totalmente ao acaso e diferem entre si pelo teste T de Student ao nível de 5% de probabilidade. Desvios-padrão: a) dados de artemisinina: "M" = 1,15, "I" = 3,52; b) dados de clorofilas + carotenóides: "M" = 15,18, "I" = 22,21.

## 5. CONCLUSÕES

As diferenças observadas entre as populações com relação aos parâmetros analisados mostraram um melhor desempenho da população melhorada “M” sobre a população introdutória “T”, visto que as duas populações apresentaram resultados diferenciados de crescimento, proteínas, açúcares e artemisinina, quando submetidas às mesmas condições de manejo. Em associação aos teores de proteínas e de açúcares observados, a maior produção da população “M” foi verificada especialmente pelas taxas de crescimento, com a população “M” resultando em mais que o dobro da altura da população “T” ao final de 24 semanas de cultivo, propiciando o alto rendimento em artemisinina da população “M” de 37,72 mg/planta, bastante superior aos 11,61 mg/planta apresentados pela população “T”.

Juntamente com os teores de artemisinina observados na população “M” de 1,15% (folhas secas), significativamente superiores aos 0,54% (folhas secas) apresentados pela população “T”, associamos os teores de clorofilas e carotenóides, também mais elevados na população melhorada “M” quando comparada à população introdutória “T”. Como artemisinina, clorofilas e carotenóides apresentam uma origem biossintética comum, evidenciamos a existência de uma correlação positiva entre esses compostos, tornando possível um acompanhamento indireto dos teores obtidos por populações melhoradas de *A. annua* através das análises de clorofilas e carotenóides.

## CONCLUSÕES GERAIS

A cultura de tecidos vegetais vem se mostrando como uma poderosa ferramenta para o estudo e o entendimento de processos metabólicos em plantas de várias espécies, além de ser comprovadamente válida como metodologia para manutenção de genótipos, sendo amplamente utilizada ao longo dos últimos anos. Tendo em vista a alta produtividade em biomassa e em artemisinina dos híbridos de *A. annua* obtidos pelo programa de melhoramento desenvolvido pela MEDIPLANT e posteriormente pelo CPQBA/UNICAMP, e a alta especificidade das técnicas de cultura de tecidos com relação às variedades estudadas, verificamos a possibilidade de adaptar técnicas de cultivo "in vitro" a alguns desses híbridos, para uma avaliação da produção de compostos anti-maláricos, além da posterior manutenção em laboratório desses genótipos melhorados.

As raízes transformadas via *A. rhizogenes* vêm sendo intensivamente estudadas nos últimos anos e são um excelente material para extração de metabólitos secundários, sendo que no caso de *A. annua* apenas o ácido artemisinínico foi encontrado nessas raízes. A cepa de *A. rhizogenes* 8196 foi efetiva na transformação do híbrido Ch x Viet 55, e o procedimento de repicagem aos 28 dias de cultivo foi confirmado como sendo o pico de crescimento das culturas, adequando o procedimento à manutenção do material. Com relação à produção de ácido artemisinínico, esta não foi verificada em quantidades adequadas a um cultivo em larga escala com finalidades comerciais, mostrando que a técnica de raízes transformadas pode ser viável para a manutenção do genótipo, não sendo válida para a produção dos compostos. Também a técnica de micropropagação dos híbridos foi efetiva na manutenção desses genótipos, uma vez que conseguimos obter 50-60 plântulas micropropagadas fenotipicamente fiéis às plantas matrizes em cada sub-cultura e desenvolver uma metodologia eficiente para a aclimação das plantas micropropagadas em nosso ambiente, possibilitando a extração de

artemisinina a partir de plantas provenientes de micropropagação, posteriormente levadas a campo. Em uma última etapa, verificamos a ocorrência de fortes interações entre a produção de artemisinina e os níveis de clorofilas e de carotenóides apresentados pelos híbridos, em comparação com uma população não melhorada. As características superiores dos híbridos mantiveram-se constantes ao longo de todas as análises, indicando uma correlação positiva entre as clorofilas e carotenóides e a artemisinina, e abrindo uma nova perspectiva para avaliações indiretas do conteúdo de artemisinina nessas plantas melhoradas.

Assim, pudemos avaliar a validade de algumas técnicas de cultura de tecidos para *A. annua*, sendo que, de modo geral, as técnicas apresentaram-se adequadas à manutenção dos genótipos superiores obtidos através de melhoramento, sendo que a extração de compostos é preferível a partir de plantas no campo.

## LITERATURA CITADA

- Acton, N. & Klayman, D.L., 1985. Artemisitene, a new sesquiterpene lactone endoperoxide from *Artemisia annua*. *Planta Med.* 5: 441-442.
- Akhila, A., Rani, K. & Thakur R.S., 1990. Biosynthesis of artemisinic acid in *Artemisia annua*. *Phytochemistry* 29: 2129-2132.
- Akhila, A., Thakur, R.S. & Popli, S.P., 1987. Biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua*. *Phytochemistry* 26: 1927-1930.
- Anônimo, 1992. Rediscovering wormwood: qinghaosu for malaria (editorial). *Lancet* 339: 649-651.
- Avery, M.A., Jennings-White, C. & Chong, W.K.M., 1987. The total synthesis of (+)-artemisinin and (+)-9-desmethylartemisinin. *Tetrahedron Lett.* 28: 4629-4632.
- Avery, M.A., Chong, W.K.M. & Jennings-White, C., 1992. Stereoselective total synthesis of (+)-artemisinin, the antimalarial constituent of *Artemisia annua* L. *J. Am. Chem. Soc.* 114: 974-979.
- Banerjee, S., Zehra, M., Gupta, M.M. & Kumar, S., 1997. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Artemisia annua*: Production of transgenic plants. *Planta Med.* 63: 467-469.
- Bercetche, J., Chriqui, D., Adam, S. & David, C., 1987. Morphogenetic and cellular reorientations induced by *A. rhizogenes* (strains 1855, 2659 and 8196) on carrot, pea and tobacco. *Plant Sci.* 52: 195-210.
- Bielecki, R.L. & Turner, N.A., 1966. Separation and estimation of aminoacids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Anal. Biochem.* 17: 278-293.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-251.

- Brown, G.D., 1994. Cadinanes from *Artemisia annua* that may be intermediates in the biosynthesis of artemisinin. *Phytochemistry* 36: 637-641.
- Bryson, C.T. & Croom Junior, E.M., 1991. Herbicide inputs for a new agronomic crop, annual wormwood (*Artemisia annua*). *Weed Technol.* 5: 117-124.
- Caldas, L.S., Haridasan, P. & Ferreira, M.E., 1990. IN: Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas (A.C. Torres & L.S. Caldas, ed.), ABCT/EMBRAPA, Brasília, p. 37-70.
- Chan, K.L., Teo, C.K.H., Jinadasa, S. & Yuen, K.H., 1995. Selection of high artemisinin yielding *Artemisia annua*. *Planta Med.* 61: 285-87.
- Charles, D.J., Cebert, E. & Simon, J.E., 1991. Characterization of the essential oil of *Artemisia annua* L. *J. Ess. Oil Res.* 3: 33-39.
- Chilton, M.D., Tepfer, D.A., Petit, A., David, C., Casse-Delbart, F. & Tempé, J., 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into genome of the host plant root cells. *Nature* 295: 432-434.
- David, C., Chilton, M.D. & Tempé, J., 1984. Conservation of T-DNA in plants regenerated from hairy-root cultures. *Bio/Technology* 2: 73-76.
- David, C. & Tempé, J., 1988. Genetic transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. Botrytis) by the Ri T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.* 7: 88-91.
- Delabays, N., Benakis, A. & Collet, G., 1993. Selection and breeding for high artemisinin (qinghaosu) yielding strains of *Artemisia annua*. *Acta Hort.* 330: 203-207.
- Delabays, N., 1997. Biologie de la reproduction chez L' *Artemisia annua* et genétique de la production en artemisinine. Université de Lausanne, France, Thèse de Doctorat.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. & Hicks, J.B., 1983. A plant DNA miniprep: version 2. *Plant Mol. Biol. Reporter* 1: 19-22.
- Dey, P.M. & Harborne, J.B., 1997. *Plant Biochemistry*. Academic Press, London, 554p.

- Duke, S.O. & Paul, R.N., 1993. Development and fine structure of the glandular trichomes of *Artemisia annua* L. *Int. J. Plant Sci.* 154: 107-118.
- Duke, S.O., Vaughn, K.C., Croom, E.M. & ElSohly, H.N., 1987. Artemisinin, a constituent of annual wormwood (*Artemisia annua*), is a selective phytotoxin. *Weed Sci.* 35: 499-505.
- Duke, M.V., Paul, R.N., ElSohly, H.N., Sturtz, G. & Duke, S.O., 1994. Localization of artemisinin and artemisitene in foliar tissues of glanded and glandless biotypes of *Artemisia annua* L. *Int. J. Plant Sci.* 155: 365-372.
- Dung, N.G. & Loi, D.T., 1991. Selection of traditional medicines for study. *J. Ethnopharmacol.* 32: 57-70.
- El-Feraly, F.S., Al-Meshal, I.A., Al-Yahya, M.A. & Hifnawy, M.S., 1986. On the possible role of qinghao acid in the biosynthesis of artemisinin. *Phytochemistry* 25: 2777-2778.
- El-Feraly, F.S., Al-Meshal, I.A. & Khalifa, S.I., 1987. Epi-deoxyarteannuin-b and 6,7-dehydroartemisinic acid from *Artemisia annua*. *J. Nat. Prod.* 52: 196-198.
- Elhag, H.M., EIDomiaty, M.M., ElFeraly, F.S., Mossa, J.S. & ElOlemy, M.M., 1992. Selection and micropropagation of high artemisinin producing clones of *Artemisia annua* L.. *Phytother. Res.* 6: 20-24.
- Elhag, H.M., Abdel-Sattar, E. & EIDomiaty, M.M., 1997. Selection and micropropagation of high artemisinin producing clones of *Artemisia annua* L. Part II. Follow up of the performance of the micropropagated clones. *Arab. Gulf J. Sci. Res.* 15: 683-693.
- Endress, R., 1994. *Plant Cell Biotechnology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 353p.
- Ferreira, J.F.S., 1994. Production and detection of artemisinin in *Artemisia annua* L. Purdue University, EUA, tese de Doutorado.
- Ferreira, J.F.S. & Janick, J., 1996. Roots as an enhancing factor for the production of artemisinin in shoot cultures of *Artemisia annua*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 44: 211-217.

- Ferreira, J.F.S., Simon, J.E. & Janick, J., 1995. Developmental studies of *Artemisia annua* L.: flowering and artemisinin production under greenhouse and field conditions. *Planta Med.* 61: 167-170.
- Figueira, G.M., 1995. Nutrição mineral, produção e concentração de artemisinina em *Artemisia annua* L. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, tese de Mestrado.
- Figueira, G.M. & Sartoratto, A., 1997. Avaliação dos teores de artemisinina em *Artemisia annua* L. após secagem e armazenamento das folhas. IN: III Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, Campinas, Brasil, resumos, pp. 69-70.
- Foglio, M.A., 1996. Estudo químico da *Artemisia annua* L. aclimatada no Brasil. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Doutorado.
- Gordon, M.P., 1981. Tumor formation in plants. IN: "The Biochemistry of Plants" vol. 6, Academic Press, Inc., pg. 531-570.
- Gulati, A., Bharel, S. & Jain, S.K., 1996. In vitro micropropagation and flowering in *Artemisia annua*. *J. Plant Biochem. Biot.* 5: 31-35.
- Hamill, J.D., Parr, A.J., Robins, R.J. & Rhodes, M.J.C., 1986. Secondary product formation by cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotiniana rustica* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.* 5: 111-114.
- Hamill, J.D., Parr, A.J., Rhodes, M.J.C., Robins, R.J. & Walton, N.J., 1987. New routes to plant secondary products. *Bio/Technology* 5: 800-804.
- Hashimoto, T., Yikimune, Y. & Yamada, Y., 1986. Tropane alkaloid production in *Hyoscyamus* root cultures. *J. Plant Physiol.* 124: 61-75.
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Sta. Circ.* 347.

- Jung, M., ElSohly, H.N. & McChesney, J.D., 1990. Artemisinic acid: a versatile chiral synthon and bioprecursor to natural products (poster). *Planta Med.* 56: 624.
- Kafatos, F.C., Jones, C.W. & Efstratiadis, A., 1979. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. *Nucleic Acids Res.* 7: 1541.
- Kamada, H., Okamura, N., Satake, M., Harada, H. & Shimomura, K., 1986. Alkaloid production by hairy-root cultures in *Atropa belladonna*. *Plant Cell Rep.* 5: 239-242.
- Klayman, D.L., 1985. *Qinghaosu* (Artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science* 228: 1049-1055.
- Klayman, D.L., 1989. Weeding out malaria. *Nat. Hist. Oct.*: 18-26.
- Lê, C.L. & Collet, G.F., 1991. The *in vitro* culture of *Artemisia annua* L. *Recherche Agronom. en Suisse* 31: 111-116.
- Lehninger, A.L., 1993. *Princípios de Bioquímica*. Sarvier Eds., 725p.
- Lichtenthaler, H.K. & Wellburn, A.R., 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Soc. Transactions* 11: 591-592.
- Machado, L.O.R., Andrade, G.M., Cid, L.P.B., Penchel, R.M. & Brasileiro, A.C.M., 1997. *Agrobacterium* strain specificity and shooty tumour formation in eucalypt (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*). *Plant Cell Rep.* 16: 299-303.
- Magalhães, P.M., 1996. Seleção, melhoramento e nutrição da *Artemisia annua* L. para cultivo em região intertropical. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Doutorado.
- Magalhães, P.M., Delabays, N. & Sartoratto, A., 1997. New hybrid lines of the antimalarial species *Artemisia annua* L. guarantee its growth in Brazil. *Ciência e Cultura*, 49: 413-415.
- Mann, J., 1987. *Secondary metabolism*. 2<sup>nd</sup>. Edition, Clarendon Press, Oxford, 374p.

- Marchese, J.A., Rehder, V.L.G. & Sartoratto, A., 1998. Dosagem de artemisinina em *Artemisia annua* L. – Comparação entre as técnicas CLAE-UV e CCD-densitometria. IN: Sétimo Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Afins, Águas de São Pedro, Brasil, p.372.
- Marchese, J.A., 1999. Produção e detecção de artemisinina em plantas de *Artemisia annua* L. submetidas a estresses abióticos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Mestrado.
- McGarvey, D.J. & Croteau, R., 1995. Terpenoid Metabolism. *The Plant Cell* 7: 1015-1026.
- Murashige, T. & Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nair, M.S.R., Acton, N., Klayman, D.L., Kendrick, K., Basile, D.V. & Mante, S., 1986. Production of artemisinin in tissue cultures of *Artemisia annua*. *J. Nat. Prod.* 49: 504-507.
- Nair, M.S.R. & Basile, D.V., 1993. Bioconversion of arteannuin-B to artemisinin. *J. Nat. Prod.* 56: 1559-1566.
- Norton, R.A. & Towers, G.H.N., 1986. Factors affecting synthesis of polyacetylenes in root cultures of *Bidens alba*. *J. Plant Physiol.* 122: 41-53.
- Nussenzweig, R.S. & Long, C.A., 1994. Malaria vaccines: multiple targets. *Science* 265: 1381-1382.
- Nussenzweig, R.S. & Nussenzweig, V., 1985. Malária: a vacina é possível. *Ciência Hoje* 3: 26-35.
- Paniego, N.B. & Giulietti, A.M., 1994. *Artemisia annua* L.: dedifferentiated and differentiated cultures. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 36: 163-168.
- Pellegrino, A.P., 1995. Transformação da Planta Medicinal *Artemisia annua* L. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Mestrado.

- Peter-Blanc, C., 1992. Developpement et biologie de la reproduction de l'*Artemisia annua* L.  
Faculte des Sciences, Universite de Lausanne, Suisse, Travail de diplôme.
- Posner, G.H, Cumming, J.N., Ploypradith, P. & Oh, C.H., 1995. Evidence for Fe(IV)=O in the  
molecular mechanism of action of the trioxane antimalarial artemisinin. J. Am. Chem.  
Soc. 117: 5885-5886.
- Pras, N., Visser, J.F., Batterman, S., Woerdenbag, H.J., Malingré, T.M. & Lugt, C.B., 1991.  
Laboratory selection of *Artemisia annua* L. for high artemisinin yielding types.  
Phytochem. Anal. 2: 80-83.
- Ravindranath, T., Anil Kumar, M., Menon, R. & Hiremath, S.V., 1990. Stereo-selective synthesis  
of artemisinin. Tetrahedron Lett. 31: 755-758.
- Robbers, J.E., Speedie, M.K. & Tyler, V.E., 1996. Pharmacognosy and  
Pharmacobiotechnology. Williams & Wilkins A Waverly Company, 212p.
- Sahoo, Y., Pattnaik, S.K. & Chand, P.K., 1997. *In vitro* clonal propagation of an aromatic  
medicinal herb *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) by axillary shoot proliferation. In  
Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 33: 293-96.
- Saito, K., Yamazaki, M. & Murakoshi, I., 1992. Transgenic medicinal plants: *Agrobacterium*-  
mediated foreign gene transfer and production of secondary metabolites. J. Nat. Prod. 55:  
149-162.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratoty manual. 2<sup>nd</sup>  
Edition, Cold Spring Harbor: CHS Press. 1626 p.
- Sangwan, R.S., Agarwal, K., Luthra, R., Thakur, R.S. & Singh-Sangwan, N., 1993.  
Biotransformation of arteannuic acid into arteannuin B and artemisinin in *Artemisia annua*.  
Phytochemistry 34: 1301-1302.

- Sartoratto, A., Rehder, V.L.G., Boaventura, S. & Oliveira, J.G., 1997. Método de quantificação de artemisinina em *Artemisia annua* L. por fotodensitometria. IN: III Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, Campinas, Brasil, resumos, pp. 206-207.
- Schmid, G. & Hofheinz, W., 1983. Total synthesis of qinghaosu. J. Am. Chem. Soc. 105: 624-625.
- SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias), 1999. Noções básicas e informações epidemiológicas sobre a malária. <http://www.sucen.sp.gov.br> (23/09/1999).
- Tempé, J. & Casse-Delbart, F., 1989. Plant gene vectors and genetic transformation: *Agrobacterium* Ri plasmids. IN: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, vol. 6: Molecular Biology of Plant Nuclear Genes, Academic Press, Inc.
- THE ATLANTIC MONTHLY, 1997. Resurgence of a deadly disease. <http://www.theatlantic.com/issues/97aug/malaria.htm> (21/09/1999).
- Thomas, P.S., 1983. Hybridization of denatured RNA transferred or dotted to nitrocellulose paper. Methods Enzymol. 100: 255-266.
- Van Geldre, E., Vergauwe, A. & Van Den Eeckhout, E., 1997. State of the art of the production of the antimalarial compound artemisinin in plants. Plant Mol. Biol. 33: 199-209.
- Van Larebeke, N., Genetello, C., Schell, J., Schilperoort, R.A., Hermans, A.K., Hernalsteens, J.P. & Van Montagu, M., 1975. Acquisition of tumour-inducing ability by non-oncogenic agrobacteria as a result of plasmid transfer. Nature 255: 742-743.
- Van Sluys, M.A., 1999. IN: Cultura de tecidos e transformação genética de plantas (A.C. Torres & L.S. Caldas, ed.), ABCT/EMBRAPA, Brasília, p. 167-197.
- Vergauwe, A., Van Geldre, E. & Inze, D., 1998. Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Artemisia annua*. Plant Cell Rep. 18: 105-110.
- Weathers, P.J., Hemmavanh, D.D., Walcerz, D.B., Cheetham, R.D. & Smith, T.C., 1997. Interactive effects of nitrate and phosphate salts, sucrose, and inoculum culture age on

- growth and sesquiterpene production in *Artemisia annua* hairy root cultures. *In Vitro Cel. Dev. Biol. Plant.* 33: 306-312.
- WEHI (Walter and Eliza Hall Institute), 1999. The Walter and Eliza Hall Institute Malaria Database – History and Biology of *Plasmodium* parasites. <http://www.wehi.edu.au/MalDB-www/intro.html> (20/09/1999).
- Whipkey, A., Simon, J.E., Charles, D.J. & Janick, J., 1992. *In vitro* production of artemisinin from *Artemisia annua* L. *J. of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 1: 15-25.
- White, P.R., 1943. *A Handbook of Plant Tissue Culture*, Jacques Cottell Press, Lancaster, Penn, 277 pg.
- White, B.A. & Bancroft, F.C., 1982. Cytoplasmic dot hybridization: simple analysis of relative mRNA levels in multiple small cell or tissue samples. *J. Biol. Chem.* 257: 8569-8572.
- WHO (World Health Organization), 1998. Malaria. Fact Sheet n° 94, 10/1998. <http://www.who.int/inffs/em/fact094.html> (20/09/1999).
- Woerdenbag, H.J., Pras, N., Bos, R., Visser, J.H., Hendriks, H. & Malingré, T.M., 1991. Analysis of artemisinin and related sesquiterpenoids from *Artemisia annua* L. by combined gas chromatography/mass spectrometry. *Phytochem. Anal.* 2: 215-219.
- Woerdenbag, H.J., Luers, J.F.J., Van Uden, W., Pras, N., Malingré, T.M. & Alfermann, A.W., 1993. Production of the new antimalarial drug artemisinin in shoot cultures of *Artemisia annua* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 247-257.
- Woerdenbag, H.J., Pras, N., Chan, N.G., Bang, B.T., Bos, R., Van Uden, W., Van Y, P., Boi, N.V., Batterman, S. & Lugt, C.B., 1994. Artemisinin, related sesquiterpenes, and essential oil in *Artemisia annua* during a vegetation period in Vietnam. *Planta Med.* 60: 272-275.
- Xu, X.X., Zhu, J., Hung, D.Z. & Zhou, W.S., 1986. Total synthesis of arteannuin and deoxyarteannuin. *Tetrahedron* 42: 819-828.

Yemm, E.W. & Willis, A.J., 1954. The estimation of carbohydrate in plant extracts by anthrone.

Biochem. J. 57: 508-514.

Yukamine, Y., Tabata, H., Higashi, Y. & Hara, Y., 1996. Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. Nature

Biotech. 14: 1130-1132.

Zaenen, I., Van Larebeke, N., Teuchy, H., Van Montagu, M. & Schell, J., 1974. Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. J.Mol. Biol. 86: 109-127.