



Micropropagação de genótipos de *Artemisia annua* L. em cultura de tecidos.

Micropropagation of *Artemisia annua* L. Genotypes in Tissue Culture.

Heloísa Talian¹, Eduarda Schmitt de Souza², Gustavo da Silva², Michelle Fernanda Fanta Rodrigues², José Abramo Marchese³

RESUMO

O uso medicinal da planta *Artemisia annua* L. é de grande importância devido à produção de metabólitos especializados, como a artemisinina, crucial no tratamento da malária não complicada. Portanto, pesquisas que visam propagar eficazmente plantas de *A. annua* desempenham um papel fundamental no combate à malária, tanto do ponto de vista social quanto econômico. Desse modo, o objetivo do trabalho consistiu no desenvolvimento de um protocolo de micropropagação *in vitro* de 15 genótipos de *A. annua*, utilizando como explantes segmentos nodais e folhas, cultivados no meio de cultura Murashige e Skoog, com a adição de 1 ml de 6-benzilaminopurina (6-BAP), visando a produção de brotos. Como resultado do experimento, observou-se que o tecido vegetal das folhas sofreu danos após 24 horas no meio de cultura, possivelmente devido ao enxágue inadequado ou exposição excessiva ao hipoclorito. Após 5 dias, todos os tubos apresentaram contaminação. Após nova tentativa com alterações no protocolo, as folhas não apresentaram danos, mas a contaminação persistiu após 5 e 7 dias. Assim, a contaminação pode ser atribuída possivelmente à ineficiência da etapa de desinfecção, falta de treino para trabalhar em condições ambientais controladas e ao comprimento não padronizado dos caules de *A. annua*.

PALAVRAS-CHAVE: Artemisinina; Malária; Cultura de tecidos;

ABSTRACT

The medicinal use of the *Artemisia annua* L. plant is of great importance due to the production of specialized metabolites, such as artemisinin, crucial in the treatment of uncomplicated malaria. Therefore, research aimed at effectively propagating *A. annua* plants plays a fundamental role in combating malaria, both from a social and economic point of view. Thus, the objective of the work was to develop an *in vitro* micropropagation protocol for 15 genotypes of *A. annua*, using nodal segments and leaves as explants, cultivated in Murashige and Skoog culture medium, with the addition of 1 ml of 6-benzylaminopurine (6-BAP), evolving towards return production. As a result of the experiment, it was proven that the plant tissue of the leaves suffered damage after 24 hours in the culture medium, possibly due to inadequate rinsing or excessive exposure to hypochlorite. After 5 days, all tubes contaminated. After another attempt with changes to the protocol, the leaves were not damaged, but the contamination persisted after 5 and 7 days. Thus, contamination can possibly be attributed to the inefficiency of the infection stage, lack of training to work in controlled environmental conditions and the non-standardized length of *A. annua* stems.

KEYWORDS: Artemisinin; Malaria; Tissue culture;

¹ Bolsista do PIBIT (Fundação Araucária). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil. E-mail: htalian@utfpr.edu.br. ID Lattes: 5226711188790683.

² Bolsista de IC-NAPI Sudoeste (Fundação Araucária). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil. E-mail: eduarda.2020@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 9093334639751648.

² Aluno de Iniciação Científica voluntário. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil. E-mail: gustavo.2021@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 5951247593837617.

² Bolsista de Pós-doutorado (Fundação Araucária). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil. E-mail: michelleffrodrigues@gmail.com. ID Lattes: 2066904180826316.

³ Docente no curso de Agronomia/DAGRO/PPGAG Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil. E-mail abramo@professores.utfpr.edu.br. ID Lattes: 5951247593837617.



INTRODUÇÃO

A malária é uma doença causada por um protozoário do gênero *Plasmodium* e está presente em quase todas as regiões tropicais do planeta, em especial na África (PUTTAPPA, *et al.*, 2017). Em 2002 a Organização Mundial de Saúde indicou a Terapia Combinada de Artemisinina (TCA), preparada com artemisinina e seus derivados semissintéticos associados a outros medicamentos, como tratamento de ponta para a malária (RODRIGUES *et al.*, 2019). Após 20 anos, a eficácia do tratamento vem sendo constantemente avaliada e ainda é atualmente recomendada como tratamento de primeira e segunda linha para malária por *P. falciparum* não complicada, bem como para malária por *P. vivax* resistente à cloroquina (Malária: Artemisinin partial resistance, 2022).

A artemisinina é extraída da *A. annua* conhecida como qinghaosu, uma erva de fins medicinais pertencente à família *Asteraceae*, originária da China (TANG, Rui *et al.*, 2015; MARCHESE, *et al.*, 2023). O potencial deste metabólito para combater febres foi documentado no ano de 340 a.C. pelos chineses, sendo que em 1970 ocorreu o primeiro isolamento de artemisinina, como resultado do "Projeto 523", que tinha o objetivo de ajudar vietnamitas que sofriam com a malária durante a guerra do Vietnã (FRANÇA *et al.*, 2008)

Devido a sua importância no combate antimalárico, a obtenção de um protocolo eficiente de propagação *in vitro* de *A. annua* é de grande interesse, já que se trata de uma excelente ferramenta de multiplicação vegetal que garante a produção de plantas livres de vírus, com concentrações elevadas de artemisinina em suas folhas, para assim se obter um cultivo comercial com plantas padronizadas e geneticamente iguais à matriz. Na cultura de tecidos, a micropropagação permite um controle preciso, assegurando que a planta de *A. annua* cultivada não seja afetada por influências ambientais externas. Isso, por sua vez, promove um desenvolvimento vegetal mais consistente quando multiplicado *in vitro*. Além disso, a técnica possibilita a preservação do genótipo da planta, o que é fundamental para a conservação das características genéticas, como destacado em estudos anteriores (MARQUES, 2002; MORAIS *et al.*, 2012), e a sua inclusão em um banco de germoplasma.

Com base no exposto acima, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer um experimento de cultivo de *Artemisia annua* L. *in vitro*, utilizando os conceitos e aplicações da cultura de tecidos, visando a propagação de explantes saudáveis.



MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido de outubro de 2022 a maio de 2023, no laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus Pato Branco, latitude 26°13'46" S, longitude 52°40'18" W. As plantas utilizadas para extração de folhas e caules foram 15 genótipos de *A. annua* do banco de germoplasma, cultivados em casa de vegetação. As etapas de condução consistiram no preparo da solução Murashige & Skoog; preparo do meio de cultura; coleta, desinfecção e acomodação dos ramos com folhas novas dos 15 genótipos de *A. annua* no meio de cultura. O preparo do meio foi a primeira etapa e consistiu na utilização de 10 ml de cada solução estoque, 1 ml de 6-benzilaminopurina (6-BAP regulador de crescimento) e 30 g de sacarose. Após isso, a solução foi completada para 1 L e levada ao pHmetro para ajuste do pH em 5,8 e adição de 9 g de agar para posterior cozimento no microondas em potência alta por aproximadamente 10 minutos, agitando a cada 1 minuto. O meio ficou pronto ao adquirir coloração transparente e foi distribuído em 15 frascos de vidro, vedados e levados para a autoclave a 120°C, por 20 minutos. Na segunda etapa, ocorreu a coleta dos ramos das plantas que foram cuidadosamente cortados e colocados em recipientes com água, para evitar que ocorresse o processo de murcha das plantas. Em seguida, realizou-se a desinfecção e colocação dos explantes no meio de cultura em câmara de fluxo laminar. Na câmara de fluxo laminar, com o uso de máscara e luvas, a desinfecção consistiu na colocação das plantas por 1 minuto em álcool 70°GL, passando em seguida por um triplice lavagem de água destilada autoclavada, e por seguinte a imersão em Hipoclorito a 1% por 10 minutos seguidos pelo enxágue. Após isto, os caules de cada planta foram cortados, bem como as folhas foram removidas. Com o auxílio do material (pinça, bisturi, placa de petri) autoclavado, cada frasco correspondeu a um genótipo, abrigando um caule e uma folha da planta (1 cm no máximo). Após cortados e inseridos os materiais vegetais nos 15 frascos, os tubos foram guardados na casa de crescimento, refrigerados e iluminados.

RESULTADOS

O tecido vegetal das folhas sofreu danos após 24 h de permanência no meio de cultura, a possível causa pode ter sido mal enxague na etapa de desinfecção ou excesso de exposição ao hipoclorito. Após 5 dias da instalação do experimento, Figura 1.a, todos os 15 tubos com material vegetal apresentaram contaminação total.

Após realizar nova tentativa, implementando ajustes no protocolo de desinfecção e adotando precauções adicionais durante a inserção dos explantes no meio de cultura, foi constatado que não ocorreu a queima das folhas, como registrado em tentativa anterior. Entretanto, ao completarem-se 5 dias após a implantação do experimento, foi observada contaminação no meio de cultura, conforme indicado na Figura 1.b. Após 7 dias, verificou-se que tanto os 15 frascos quanto os explantes estavam afetados pela contaminação.

As possíveis causas da contaminação das plantas podem estar relacionadas a deficiências no processo de desinfecção, contaminação de materiais utilizados e falta de experiência de trabalho em ambientes controlados. Outro fator que pode ter contribuído é a falta de padronização inicial no comprimento dos caules, o que pode ter afetado a



condução do experimento. É importante observar que, com base na literatura, o comprimento ideal geralmente recomendado para caules de plantas em cultivo de tecidos é de 2 cm, e não há especificações específicas para *A. annua*.

Figura 1 – Frascos com caules e folhas de *A. annua* em meio de cultura após 5 dias da instalação;



Fonte: Autoria própria.

Agradecimentos

Agradeço à Fundação Araucária pelo incentivo e fomento à pesquisa, aos meus orientadores pelos conhecimentos transmitidos e aos meus colegas de Iniciação Científica pelo auxílio na condução do experimento.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

FRANÇA, T.C.C. et al. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, p. 1271-1278, 2008.

Malaria: Artemisinin partial resistance, 2022, Acesso em: abril de 2023, Disponível em: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/artemisinin-resistance>.

MARCHESE, J.A. et al. Crop phenology and floral induction in different *Artemisia annua* L. genotypes. **Industrial Crops and Products**, v. 192, p. 116118, 2023.

MARQUES, D.A. Estabelecimento e cultura in vitro de raízes normais e transformadas com *Agrobacterium rhizogenes* para estudos de terpenos de interesse em genótipo superior de *Artemisia annua* L. 2002.



MORAIS, T. P. et al. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 110-121, 2012.

PUTTAPPA, N. et al. Artesunate-quercetin/luteolin dual drug nanofacilitated synergistic treatment for malaria: A plausible approach to overcome artemisinin combination therapy resistance. **Medical Hypotheses**, v. 109, p. 176-180, 2017.

RODRIGUES, M.F.F. et al. Techno-economic evaluation of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L. using supercritical carbon dioxide. **Industrial crops and products**, v. 132, p. 336-343, 2019.

TANG, R. et al. Artemisia allergy research in China. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015