INFLUÊNCIA DO 6-BENZILAMINOPURINA (BAP) E DO ÁCIDO INDOLBUTÍRICO (AIB) NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE ARTEMÍSIA (*Artemisia annua* L.)

Thalita Isabel Assumpção[1]; Allan Macali Werner[2]; Dr. Gilmar Pezzopane Pla [3]

[1] Universidade do Sul de Santa Catarina, UNISUL – Tubarão/SC - Brasil - E-mail: thalita.assumpção@unisul.br ; talita_azul@hotmail.com
[2] Universidade do Sul de Santa Catarina, UNISUL – Tubarão/SC - Brasil E-mail: allan.werner@unisul.br
[3] Universidade do Sul de Santa Catarina, UNISUL – Tubarão/SC - Brasil E-mail: gilmar.pla@unisul.br

RESUMO: A *Artemisia annua* é uma planta que possui propriedades antimaláricas, a partir do isolamento do seu principio ativo, conhecido como artemisinina. A utilização da micropropagação, através de reguladores de crescimento, surge para atender a alta demanda de Artemísia, uma vez que o número de casos de malária aumenta consideravelmente. Desta forma este estudo trabalhou a produção de plantas in vitro de Artemísia, com maior rapidez para obtenção de um grande número de mudas de plantas sadias, em qualquer época do ano e em um pequeno espaço físico, o que vem de encontro à grande importância que esta planta medicinal assumiu nos últimos tempos.

Palavras - Chave: Artemisia*;* micropropagação; malária.

ABSTRACT:

Artemisia annua is a plant that has antimalarial properties, from the isolation of its active principle, known as artemisinin. The use of micropropagation through the regulators of growth, comes to help the high demand of Artemisia. Once the number of malaria cases has rise considerably. So, this research worked on a production of the Artemisia plants in vitro, to obtain a large number of healthy seedlings, at any time of year and in a small physical space. Which comes across the great importance that this medicinal plant has taken in recent times.

Key words: Artemisia; micropropagation; malaria.

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais no Brasil tem como facilitadores a grande diversidade vegetal e o baixo custo associado à terapêutica, o que vem despertando a atenção dos programas de assistência à saúde e profissionais (SANTOS, et al 2011). Plantas com efeitos medicinais são utilizadas desde os primórdios da humanidade. O conhecimento sobre tais efeitos é repassado de geração em geração e a Ciência comprovou o efeito de inúmeros princípios ativo presentes em tais plantas.

Uma delas é *Artemisia annua* L. (Asteraceae) conhecida popularmente como artemísia ou erva-de-são-joão. A planta possui propriedades diuréticas, sedativas, anti-inflamatórias, antiespasmódicas e vermífugas. É planta herbácea altamente aromática, nativa da Ásia e aclimatada no Brasil. As folhas são fontes abundantes de artemisinina, uma lactona sesquiterpênica que, conjuntamente aos seus derivados semi-sintéticos, apresenta ação efetiva contra as cepas resistentes das espécies de Plasmodium causadoras da malária (ENSERINK, 2005). Foi somente a partir da década de 70 com a extração de seu princípio ativo, conhecido como artemisinina, que a artemísia ganhou espaço no cenário farmacêutico.

A malária é de longe a doença parasitária de regiões tropicais que mais causa problemas sociais e econômicos no mundo. (PARISE, 2009). A estimativa mundial de ocorrência da doença é da ordem de 300 a 500 milhões de casos clínicos por ano e a mortalidade causada pela malária é superior a 1 milhão ao ano (RODRIGUES, et al 2006). Conforme Salcedo et al (1997) a demanda mundial pela artemisinina no tratamento da matéria cresceu, devido a suas vantagens em relação a outros compostos antimaláricos, uma vez que possui ação rápida, inclusive em casos de malária cerebral.

A propagação sexuada é um método natural de promover o rejuvenescimento de partes maduras de plantas. Embora esta técnica tenha como desvantagem o custo elevado, a crescente demanda da indústria farmacêutica por plantas indexadas, livres de vírus, com alta qualidade fitossanitária e fisiológica, bem como com capacidade de síntese de metabólitos secundários potencializada, por meio do melhoramento genético, justificam a sua utilização (LIMA et al., 2007).

Vários protocolos de micropropagação têm sido estudados para diversas espécies. No entanto, o sucesso deste processo depende de alguns fatores, como tipo de explante, meio de cultura, regulador de crescimento, condições de incubação, dentre outros (KOMALAVALLI & RAO, 2000).

A utilização da micropropagação, através de reguladores de crescimento, surge para atender a alta demanda de artemísia, uma vez que o número de casos de malária aumenta consideravelmente. Visando obter subsídios técnicos será analisada a influência da concentração da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e da auxina ácido indolbutírico (AIB) ambos reguladores de crescimento, na obtenção de mudas propagadas in vitro de *Artemisia annua* L.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este experimento foi realizado no Laboratório de Produção Vegetal, localizado no Centro Tecnológico – (CENTEC) da Unisul no Curso de Agronomia em Tubarão – SC/ Brasil.

Foram usados 96 tubos de ensaio (20 x 150 mm) contendo, em média, 10 mL de meio em cada tubo. As soluções estoques A e B foram reduzidas em 50%. Essa redução teve como objetivo diminuir a concentração do macronutriente nitrogênio, uma vez que em testes preliminares desenvolvidos com cultivo de artemísia in vitro, utilizando reguladores de crescimento observou-se a formação de calos que não se diferenciaram em brotos ou raízes.

O pH dos meios foi ajustado para 5,8. Os meios foram agitados e aquecidos por cerca de vinte minutos para então serem distribuídos nos tubos de ensaio com o auxilio de uma pipeta graduada. Em seguida foram vedados, etiquetados e armazenados em pacotes de plástico e autoclavados por 30 minutos a 1,1 kgf/cm² com temperatura de 25º C.

Os meios ficaram trinta minutos na câmara sob a luz ultravioleta que assegurou uma ação germicida. Em seguida, as plantas já isoladas foram colocadas no fluxo laminar (Trox, modelo FLH) onde foram repicadas com auxílio do instrumental (bisturi e pinças), este material foi continuamente flambado.

Os tubos de ensaio foram analisados individualmente, sendo que cada um correspondeu a uma repetição. Foram avaliados o número de raízes e brotações. Utilizando os seguintes padrões: brotação ou enraizamento nulo; um a quatro brotos ou raízes; cinco a nove brotos ou raízes; mais de dez brotos ou raízes. Esses padrões foram estabelecidos devido à impossibilidade de contagem exata dos brotos e raízes por seus posicionamentos nos tubos, dificultando a contagem exata dos mesmos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Inicialmente o objetivo foi multiplicar as plantas já isoladas no laboratório. Estas plantas já passaram por sucessivos ciclos de repicagem, por vários anos, sofrendo variações somaclonais. Visto que a literatura demonstra casos em que na multiplicação da Artemísia ocorre a formação de calos pela alta concentração de Nitrogênio no meio de cultura, o projeto já visou contornar esta situação reduzindo as soluções estoque A e B onde encontram-se os macro nutrientes. Porém, logo no primeiro tratamento de multiplicação 100% dos explantes apresentaram formação de calos, não diferenciando tecido e dificultando a obtenção de plantas completas. Como o objetivo não era formar tecidos sem diferenciação celular, sendo pelo fato de que não haveria tempo para regenerar outra planta para depois multiplicá-la no período proposto para o projeto, optou-se por fazer o isolamento novamente da Artemísia.

Utilizou-se sementes selecionadas de *Artemisia annua L.* e preparou-se meio de cultura MS acrescido de 30g.L^{-1} de sacarose e 2,5 g.L^{-1} de Phytagel. Em câmera de fluxo laminar com o instrumental autoclavado imergiu-se as sementes durante 25 minutos em hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo sob a luz germicida para garantir eficiência na assepsia. Inocularam-se aproximadamente cinco sementes por tubo de ensaio, tendo um total de 24 tubos. Os primeiros registros de germinação ocorreram após 15 dias.

Com estas novas plantas será possível aumentar os exemplares com a Micropropagação e após efetuar os tratamentos. Os problemas encontrados na elaboração deste projeto demonstram a dificuldade de elaborar protocolos para a micropropagação da Artemísia. Por se tratar de uma planta de alta importância medicinal é necessário que se continuem estudos para poder aperfeiçoar a multiplicação massal e entregar à indústria com material de alta qualidade genética e fotossanitária.

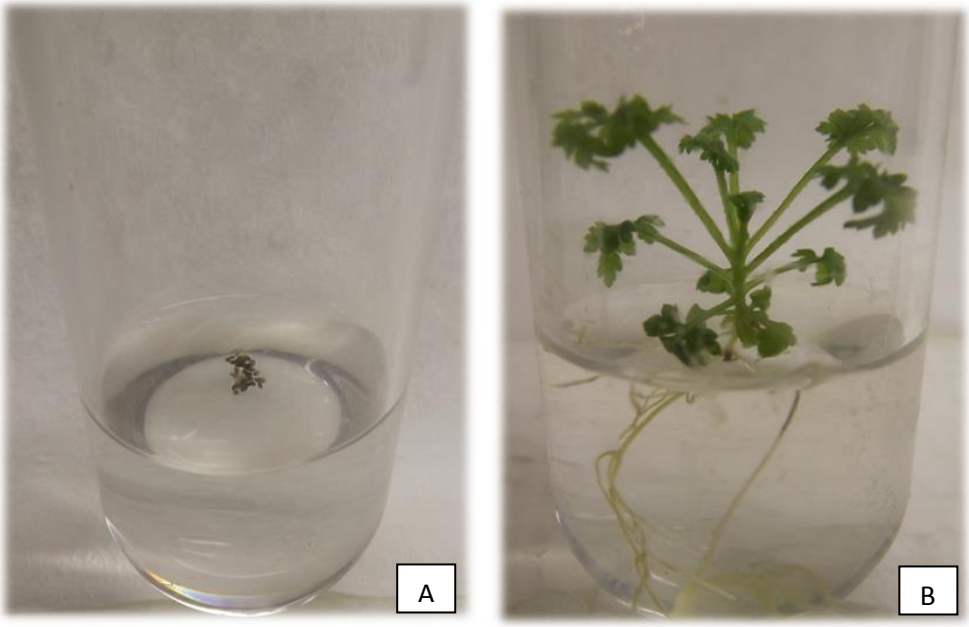

Figura 1: A: Isolamento de sementes in vitro / B: Germinação in vitro

CONCLUSÕES:

A *Artemisia annua* L. apresenta alta incidência à formação de calos em plantas com sucessivas repicagens. Por possuir princípio ativo de grande importância, faz-se necessário o desenvolvimento de protocolos de cultivo para a espécie.

REFERÊNCIAS: BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE JUNIOR, C. L. ; PLA, G. P. ; SILVA, E. P. . Efeito de diferentes concentrações do ácido indol butiríco - AIB no enraizamento de estacas de guaco. In: XI Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2007, Gramado/RS. Anais do XI Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2007.

ENSERINK, M. Source of new hope against malaria is in short supply. Science, v.307, p.33, 2005.

KOMALAVALLI, N.; RAO, M.V. In vitro micropropagation of Gymnema sylvestre - A multipurpose medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture,** v.61, n.2, p.97-105, 2000.

LIMA, C.S.M. et al. Influência de fitorreguladores no crescimento in vitro de partes aérea de Mentha viridis. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.669-71, 2007

PARISE, E.V; Malária grave em Palmas, Estado do Tocantins: relato de caso. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** vol.42 no.4 Uberaba 2009.

PLA, G. P.; FARIAS, A.N. . Micropropação do guaco (mikania glomerata): efeito do benzil amino purina - bap, nas concentrações de cumarina. In: II Jornada Unisul de Iniciação científica - JUNIC, 2007, Florianópolis. Resumos da II Jornada Unisul de Iniciação científica - JUNIC, 2007.

PLA, G. P.; SILVA, E. P.; ALBUQUERQUE JUNIOR, C. L. . Influência do pH na produção de ácido rosmarínico em plantas de melissa cultivadas in vitro. In: VIII Jornada Paulista de Plantas Medicinais, 2007, São Paulo. Anais da VIII Jornada Paulista de Plantas Medicinais, 2007

SALCEDO, J.M.V. et al. Avaliação da eficácia do artesunato associado à tetraciclina na terapêutica da malária. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, maio/jun. 1997, v. 30, n. 3. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86821997000300008&lng=es&nrm=iso>. Acesso em: 28 abr. 2012.

SANTOS, R.L.; GUIMARAES, G.P.; NOBRE, M.S.C.; PORTELA, A.S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Rev. bras. plantas med.** vol.13 no. 4. Botucatu 2011.

SILVA, E. P. ; PLA, G. P. . Influência de reguladores de crescimento na multiplicação in vitro de artemisia (*Artemisia annua*). In: IV Jornada de Iniciação Científica da Unisul - JUNIC, 2009, Palhoça/SC. IV Jornada de Iniciação Científica da Unisul - JUNIC, 2009.

Fomento: UNISUL.