



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

**CALOGÊNESE *in vitro* COMO ALTERNATIVA NA PRODUÇÃO DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E COMPARAÇÃO METABÓLICA ENTRE
CALOS E PLANTAS DE *Artemisia annua***

CARLA MIDORI IYAMA

Araras

2023



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**CALOGÊNESE *in vitro* COMO ALTERNATIVA NA PRODUÇÃO DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E COMPARAÇÃO METABÓLICA ENTRE
CALOS E PLANTAS DE *Artemisia annua***

CARLA MIDORI IYAMA

ORIENTADOR: PROF. DR. JEAN CARLOS CARDOSO
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ADILSON SARTORATTO

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Produção
Vegetal e Bioprocessos Associados
como requisito parcial à obtenção do
título de MESTRE EM PRODUÇÃO
VEGETAL E BIOPROCESSOS
ASSOCIADOS

Araras
2023

Iiyama, Carla Midori

Calogênese in vitro como alternativa na produção de metabólitos secundários e comparação metabólica entre calos e plantas de *Artemisia annua* / Carla Midori Iiyama -- 2023.
58f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras
Orientador (a): Jean Carlos Cardoso
Banca Examinadora: Jean Carlos Cardoso, Pedro Melillo de Magalhães, Mariana Altenhofen da Silva
Bibliografia

1. Biotecnologia. 2. Calogênese. 3. Plantas medicinais. I. Iiyama, Carla Midori. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8
7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Carla Midori Iiyama, realizada em 30/05/2023.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Jean Carlos Cardoso (UFSCar)

Prof. Dr. Pedro Melillo de Magalhães (UFSB)

Profa. Dra. Mariana Altenhofen da Silva (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Jean Carlos Cardoso por toda orientação desde a graduação, pelas caronas durante a pandemia, pelos aprendizados dentro do laboratório, por acreditar no potencial dos nossos trabalhos, pelo incentivo nas fases mais pesadas do mestrado, pela amizade e pelas oportunidades que o senhor me proporcionou.

Ao meu coorientador Dr. Adilson Sartoratto pelo auxílio com a realização das análises e acompanhamento das atividades, pelas contribuições feitas no exame de qualificação e por todo apoio nesses dois anos.

Ao Dr. Pedro Melillo de Magalhães, Dr. Ilio Montanari Jr e ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) pelo fornecimento das sementes de *Artemisia annua* para a realização do presente trabalho.

À Dra. Ligianne Din Shirahigue Viani e Profa. Dra. Mariângela Cristofani-Yaly pelas contribuições feitas no exame de qualificação.

À Profa. Dra. Mariana Altenhofen da Silva e Dr. Pedro Melillo de Magalhães pelas contribuições feitas na defesa da dissertação.

Aos meus pais Paulo Eji Iiyama e Silvia Ayumi Uenishi Iiyama e à minha irmã Paula Kazumi Iiyama que estão sempre me ajudando a resolver problemas, tomar decisões e aproveitar os finais de semana. 色々ありがとう!

Ao Wagner José Vilella dos Reis por me levar pra faculdade durante a pandemia, me ajudar com o transporte de amostras, por todo apoio, incentivo e companheirismo.

À técnica do Laboratório de Fisiologia Vegetal e Cultura de Tecidos (LFVCT) Ana Lúcia Cerri Arruda por todo apoio, carinho, paciência, conselhos e amizade sempre deixando o ambiente do laboratório leve e agradável.

Aos meus amigos Joe Abdul Vilcherrez-Atoche, Mariana Pelais Leite, Willian Naves Duarte, Rafaela de Oliveira Silva, Guilherme Feleto Rodrigues, Laura Vieira Malachias, Stéfany Cândido da Silva Ayres, Alessia Zincone Volponi por compartilhar momentos dentro do laboratório durante a realização do projeto, pela ajuda com coleta de amostras, pela amizade, conversas, conselhos e risadas.

À Natalia Cristina Soares, Claudia Elizabeth Bogado González e Lourdes Belén Cuba Maidana pela amizade, conversas, desabafos, ajudas nesses dois anos do mestrado.

À Profa. Dra. Monalisa Sampaio Carneiro e à Isabella Valadão pelo uso do liofilizador do Laboratório de Biotecnologia de Plantas.

Ao Prof. Dr. Fernando César Sala, Prof. Dr. Claudinei Fonseca Souza e à Priscila Helena da Silva Macedo pelo uso da estufa para secagem de amostras.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1. Plantas medicinais e sua importância.....	4
3.2. <i>Artemisia annua</i>	4
3.3. Artemisinina	5
3.4. <i>Artemisia annua</i> e outros metabólitos de interesse	6
3.5. Produção de <i>Artemisia annua</i> e seus metabólitos	6
3.6. Cultivo <i>in vitro</i>	7
3.7. Produção <i>in vitro</i> de metabólitos secundários	8
4. MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1. Material vegetativo.....	10
4.2. Semeadura <i>in vitro</i>	10
4.3. Benzilaminopurina (BAP) e Ácido Naftaleno Acético (ANA) na indução e proliferação de calos <i>in vitro</i> de <i>Artemisia annua</i>	11
4.4. Luz e fitorreguladores na proliferação dos calos <i>in vitro</i> de <i>A. annua</i>	13
4.5. Obtenção de calos <i>in vitro</i> de <i>Artemisia annua</i> cultivados em diferentes comprimentos de onda do espectro visível de luz	13
4.6. Obtenção de plântulas <i>in vitro</i>	14
4.7. Obtenção de plantas cultivadas em casa de vegetação	15
4.8. Análise dos metabólitos secundários por SPME/GC-MS.....	17
4.9. Comparação do perfil de metabólitos secundários de diferentes tecidos de <i>Artemisia annua</i>	18
4.10. Análise estatística	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1. Semeadura <i>in vitro</i>	20
5.2. Efeitos da Benzilaminopurina (BAP) e Ácido Naftaleno Acético (ANA) na indução e proliferação de calos <i>in vitro</i> de <i>Artemisia annua</i>	20
5.3. A luz na proliferação dos calos <i>in vitro</i> de <i>Artemisia annua</i>	23
5.4. Diferentes faixas de comprimento de onda do espectro visível de luz na indução e proliferação dos calos <i>in vitro</i> de <i>Artemisia annua</i>	24

5.5. Comparação do perfil de metabólitos secundários de diferentes tecidos de <i>Artemisia annua</i>	27
5.5.1. Diferentes faixas de comprimento de onda do espectro visível de luz na produção de metabólitos de calos <i>in vitro</i> de <i>Artemisia annua</i>	27
5.5.2. Efeitos dos tipos de tecidos na produção de metabólitos em <i>Artemisia annua</i>	30
5.5.3. Calos <i>in vitro</i> como alternativa na produção de metabólitos secundários	35
5.5.4. Calos <i>in vitro</i> de <i>A. annua</i> como fonte de metabólitos não reportados na espécie e no gênero	36
5.6. Variabilidade entre as amostras dos diferentes tecidos de <i>Artemisia annua</i>	38
6. CONCLUSÕES	40
7. LITERATURA CITADA	41

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Concentração dos fitorreguladores Benzilaminopurina (BAP) e Ácido Naftaleno Acético (ANA) na indução e proliferação de calos <i>in vitro</i> de <i>A. annua</i>	12
Tabela 2 - Efeito dos fitorreguladores Benzilaminopurina (BAP) e Ácido Naftaleno Acético (ANA) no diâmetro (cm) dos calos <i>in vitro</i> induzidos no escuro a partir de ápices caulinares de <i>A. annua</i> após 70 dias de cultivo	21
Tabela 3 - Efeito dos fitorreguladores Benzilaminopurina (BAP) e Ácido Naftaleno Acético (ANA) na massa fresca (g) dos calos <i>in vitro</i> induzidos a partir de ápices caulinares de <i>A. annua</i> após 70 dias de cultivo	22
Tabela 4 - Efeito dos fitorreguladores Benzilaminopurina (BAP) e Ácido Naftaleno Acético (ANA) e da presença e ausência de iluminação no diâmetro (cm), massa fresca (g) dos calos <i>in vitro</i> de <i>A. annua</i> na fase de proliferação	23
Tabela 5 - Perfis de metabólitos secundários obtidos por SPME GC-MS com metabólitos observados em calos <i>in vitro</i> e cultivados em diferentes comprimentos de onda fornecidos por LEDs.....	29
Tabela 6 – Relatos na literatura sobre uso de diferentes iluminações para o cultivo de <i>Artemisia annua</i>	30
Tabela 7 – Perfil de metabólitos secundários obtidos por SPME GC-MS de plantas cultivadas em casa de vegetação, plântulas <i>in vitro</i> e calos <i>in vitro</i> de <i>A. annua</i>	33
Tabela 8 - Moléculas identificadas por SPME GC-MS somente nos calos <i>in vitro</i> reportadas na literatura	37

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Sementes de <i>A. annua</i> fornecidas pelo CPQBA-Unicamp.....	10
Figura 2 - Diferentes comprimentos de onda do espectro visível de luz utilizados para o cultivo <i>in vitro</i> de calos de <i>A. annua</i>	14
Figura 3 - Explante inicial de <i>A. annua</i> para a obtenção de plântulas <i>in vitro</i>	15
Figura 4 - Plântulas de <i>A. annua</i> germinadas em substrato.	16
Figura 5 - Plantas de <i>A. annua</i> cultivadas em casa de vegetação. A. Plântulas transplantadas para vasos. B. Plantas antes do desbaste. C. Plantas após o desbaste.....	16
Figura 6 - Análise dos calos <i>in vitro</i> por SPME-GC-MS. A. Calos <i>in vitro</i> dos diferentes tratamentos armazenados em tubos Falcon. B. Amostra em solução salina saturada de NaCl. C. Amostra em banho maria e injeção da fibra SPME ..	17
Figura 7 - Esquema ilustrativo do experimento	18
Figura 8 - Plântulas de <i>A. annua</i> obtidas por semeadura <i>in vitro</i> em meio MS $\frac{1}{2}$ com 15,0 g L ⁻¹ de sacarose.	20
Figura 9 - Efeito dos fitorreguladores Benzilaminopurina (BAP) e Ácido Naftaleno Acético (ANA) no desenvolvimento dos calos <i>in vitro</i> induzidos no escuro a partir de ápices caulinares de <i>A. annua</i> após 70 dias de cultivo.	22
Figura 10 - Efeito de fitorreguladores e iluminação no desenvolvimento dos calos <i>in vitro</i> de <i>A. annua</i> após 28 dias de proliferação	24
Figura 11 - Curvas de crescimento (massa fresca e diâmetro) dos calos <i>in vitro</i> de <i>A. annua</i> cultivados sob diferentes comprimentos de onda fornecidos por LEDs em meio de cultura MS + 1,0 L ⁻¹ BAP + 1,0 mg L ⁻¹ ANA.....	25
Figura 12 - Efeito de diferentes comprimentos de onda do espectro visível na proliferação dos calos <i>in vitro</i> de <i>A. annua</i> cultivados em meio de cultura MS + 1,0 L ⁻¹ BAP + 1,0 mg L ⁻¹ ANA. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	26
Figura 13 - Diagrama de Venn da quantidade de metabólitos reportados em calos <i>in vitro</i> de <i>A. annua</i> cultivados em diferentes comprimentos de ondas: azul, vermelha, azul e vermelha, branca e escuro.....	28
Figura 14 - Diferentes fontes de material de <i>A. annua</i> utilizados para identificação e comparação do perfil de metabólitos secundários por meio de SPME GC-MS. A. Plantas cultivadas em casa de vegetação com 90 dias de idade. B. Plântulas <i>in vitro</i> com 28 dias de cultivo. C. Calos <i>in vitro</i> cultivados em diferentes comprimentos de onda do espectro visível de luz com 28 dias de cultivo.	31
Figura 15 - Diagrama de Venn da quantidade de metabólitos registrados para três tecidos de <i>A. annua</i> : calos <i>in vitro</i> , plântulas <i>in vitro</i> e plantas cultivadas em condições de casa de vegetação.	32
Figura 16 - Diagrama de Venn da quantidade de metabólitos registrados para as repetições dos diferentes tecidos de <i>A. annua</i> . A. Relação entre as amostras	

de plantas cultivadas em casa de vegetação. **B.** Relação entre as amostras de plântulas micropropagadas. **C.** Relação entre as amostras de calos *in vitro*.39

CALOGÊNESE *in vitro* COMO ALTERNATIVA NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E COMPARAÇÃO METABÓLICA ENTRE CALOS E PLANTAS DE *Artemisia annua*

Autor: CARLA MIDORI IYAMA

Orientador: Prof. Dr. JEAN CARLOS CARDOSO

Co-orientador: Prof. Dr. ADILSON SARTORATTO

RESUMO

Dentre as aplicações de técnicas de cultivo *in vitro* de plantas medicinais estão o uso de mudas clonais a partir de genótipos superiores, a produção de metabólitos em ambiente controlado e a transformação genética visando a produção de tecidos e metabólitos específicos. A produção de metabólitos secundários *in vitro* tem como vantagens o ambiente controlado, isento de pragas e patógenos, além de permitir a produção de perfil de metabólitos diferentes daqueles produzidos em plantas cultivadas. O presente trabalho teve como objetivos estabelecer um protocolo de indução e proliferação de calos *in vitro* de *Artemisia annua* e comparar o perfil de metabólitos secundários de calos, com plântulas *in vitro* e plantas cultivadas em casa de vegetação. Além disso, foram avaliados os efeitos de comprimentos de onda do espectro visível de luz (escuro, branca, azul, vermelha, azul e vermelha) na produção de metabólitos secundários. A presença de fitorreguladores Benzilaminopurina (BAP) e Ácido Naftaleno Acético (ANA) a 1,0 mg L⁻¹ cada, promoveu a indução e proliferação dos calos, com aumento de diâmetro e massa fresca. As análises de SPME GC-MS demonstraram diferenças no perfil dos metabólitos produzidos nos diferentes sistemas de cultivo de *A. annua* e comprimentos de onda utilizados no cultivo dos calos. As fontes de luz branca (fria e fluorescente) e a luz vermelha (LEDs) resultaram em maior diversidade de metabólitos produzidos nos calos, sendo que seis metabólitos foram identificados exclusivamente nos calos cultivados sob luz vermelha, demonstrando especificidade de resposta dos calos. Ao total, 27 metabólitos foram identificados exclusivamente nos calos de *A. annua* e quatro delas foram relatadas pela primeira vez na espécie: acetato de mentila, acetato de geranila, 4-metoxi benzaldeído e alfa-santaleno. Os resultados demonstram o potencial do cultivo *in vitro* de calos de *A. annua* na produção de metabólitos diferentes daqueles obtidos em tecidos diferenciados, como as plântulas *in vitro* e plantas.

Palavras-chave: *Artemisia annua*, planta medicinal, calogênese, micropropagação, metabólitos secundários

In vitro* CALLOGENESIS AS AN ALTERNATIVE IN THE PRODUCTION OF SECONDARY METABOLITES AND METABOLIC COMPARISON BETWEEN CALLUS AND PLANTS OF *Artemisia annua

Author: CARLA MIDORI IIYAMA

Adviser: Prof. Dr. JEAN CARLOS CARDOSO

Co-adviser: Prof. Dr. ADILSON SARTORATTO

ABSTRACT

Among the applications of *in vitro* culture technique of medicinal plants are the use of clonal plantlets from previously selected superior genotypes, the production of metabolites in controlled environment and genetic transformation aiming at the production of specific tissues and metabolites. The *in vitro* production of secondary metabolites has the advantage of a controlled environment, free of pests and pathogens, in addition to allowing the production of metabolic profile different from those produced in cultivated plants. The present work aimed to establish a protocol for *in vitro* calli induction and proliferation of the medicinal plant *Artemisia annua* and to compare the metabolic profile of calli with *in vitro* plantlets and plants grown in a greenhouse. In addition, the effects of wavelengths of the visible light spectrum (dark, white, blue, red, blue and red) on the production of secondary metabolites were evaluated. The presence of phyto regulators Benzylaminopurine (BAP) and Naphthalene Acetic Acid (NAA) at 1.0 mg L⁻¹ each, promoted the induction and proliferation of calli, with an increase in diameter and fresh weight. SPME GC-MS analyzes showed differences in the metabolic profile produced in different cultivation systems of *A. annua* and wavelengths used in calli cultivation. White light (cold and fluorescent) and red light (LEDs) resulted in a greater diversity of metabolites produced in calli, with six metabolites found exclusively in calli cultivated under red light, demonstrating specificity of calli response. 27 metabolites were identified exclusively in the calli of *A. annua* and four of them were reported for the first time in the species: menthyl acetate, geranyl acetate, 4-methoxy benzaldehyde and alpha-santalene. The results demonstrate the potential of *in vitro* culture of *A. annua* calli in the production of metabolites different from those obtained in different tissues, such as *in vitro* plantlets and plants grown in greenhouse.

Key-words: *Artemisia annua*, medicinal plant, callogenesis, micropropagation, secondary metabolites

1. INTRODUÇÃO

Metabólitos secundários de plantas são um grupo diverso de compostos orgânicos relacionados com a adaptação, interação e mecanismo de defesa das plantas a diferentes condições ambientais, como respostas a estresses bióticos e abióticos, a exemplo da sinalização química e estabelecimento de relações complexas com animais e outros organismos (CARDOSO; DE OLIVEIRA; CARDOSO, 2019; MURTHY; LEE; PAEK, 2014).

As plantas medicinais são a principal fonte de uma grande diversidade de metabólitos secundários e compostos ativos (NAIK; AL-KHAYRI, 2016) com propriedades terapêuticas e que são utilizados para o desenvolvimento de medicamentos, incluindo aplicações na saúde humana (NIGAM *et al.*, 2019; XIONG *et al.*, 2019). Como exemplo, não somente para a medicina tradicional ou alternativa, aproximadamente 25% dos medicamentos prescritos são extratos ou compostos ativos de plantas (GUPTA; VAGHELA, 2019).

Artemisia annua, nativa da China, é uma planta medicinal de grande importância por possuir, em suas folhas e flores, a artemisinina que é muito utilizada no tratamento da malária (COWMAN *et al.*, 2016; MORAES; CERDEIRA; LOURENÇO, 2021). Embora a artemisinina seja o principal composto na *A. annua*, é uma espécie muito rica em outros metabólitos secundários de interesse farmacêutico como a cânfora, eucaliptol, germacreno (ABAD *et al.*, 2012; BORA; SHARMA, 2011).

Além da micropropagação de plantas elite, técnicas utilizando o cultivo *in vitro* de tecidos vegetais podem ser empregados para a produção de metabólitos secundários e biomassa de plantas medicinais (KESHVARI *et al.*, 2018; KHAN; AL-QURAINY; NADEEM, 2012).

O ambiente controlado e livre de microrganismos é a principal vantagem do cultivo *in vitro*, permitindo a produção escalonada de metabólitos secundários em relação ao cultivo convencional, podendo ser replicada em diferentes regiões do mundo, além de não necessitar do uso de herbicidas e pesticidas no cultivo (CARDOSO; GERALD; TEIXEIRA DA SILVA, 2018). A produção *in vitro* de metabólitos secundários pode ser realizada utilizando tecidos diferenciados como brotações, raízes, embriões somáticos ou tecidos desdiferenciados como os calos. A desdiferenciação consiste no processo no qual uma célula adulta, já diferenciada,

regredir para um estágio indiferenciado sendo capaz de originar novos tipos de células e no caso dos calos, novos tipos de tecidos (GONÇALVES; ROMANO, 2018).

O cultivo *in vitro* de calos para a produção de metabólitos secundários têm se mostrado como uma alternativa aos métodos convencionais, já que os calos são tecidos que se mantêm em constante divisão celular, sendo a indução e multiplicação de calos mais fácil de ser controlada quando comparado aos tecidos diferenciados utilizados na micropropagação convencional.

Porém, a principal desvantagem da produção *in vitro* de metabólitos secundários está relacionada com os altos custos dessa técnica, fazendo com que seja mais utilizada como alternativa para produção de metabólitos que são difíceis de serem sintetizados ou extraídos. Consequentemente, o cultivo *in vitro* visando a produção de metabólitos secundários é mais aplicada para estudar os diferentes fatores que afetam o desenvolvimento dos calos e a produção de seus metabólitos (CARDOSO; OLIVEIRA; CARDOSO, 2019).

Entretanto, resultados com a planta medicinal *Phyllanthus amarus* demonstraram que os calos *in vitro* são capazes de produzir perfil de moléculas diferentes das que são encontradas em plantas cultivadas convencionalmente e ainda, moléculas não reportadas na espécie, aumentando o interesse da calogênese *in vitro* como alternativa para produção *in vitro* de metabólitos secundários (OLIVEIRA; SARTORATTO; CARDOSO, 2020). Assim, a descoberta de moléculas de interesse nos calos *in vitro* diferentes das encontradas na planta poderia superar os altos custos relacionados com a técnica, viabilizando a produção de metabólitos de interesse medicinal.

Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de protocolos de indução e proliferação de calos a partir de cultivo *in vitro* para investigar se calos de outras espécies de plantas medicinais, nesse caso *A. annua*, também apresentam potencial na produção de metabólitos de interesse além da artemisinina. Ademais, avaliar o potencial dos tecidos desdiferenciados, calos, em produzir moléculas diferentes das que são obtidas em plântulas *in vitro* e por cultivos convencionais ou que ainda não foram reportadas na espécie.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Estabelecer um protocolo de cultivo *in vitro* de calos de *Artemisia annua* e comparar o perfil de metabólitos secundários de calos *in vitro* com os produzidos em plantas cultivadas convencionalmente.

Objetivos específicos

- Determinar a combinação e concentrações de citocinina Benzilaminopurina (BAP) e auxina Ácido Naftaleno Acético (ANA) que resulte na maior massa e diâmetro de indução e proliferação de calos *in vitro* de *A. annua*.
- Determinar se fatores como luz e comprimento de onda do espectro visível de luz são fatores significativos para a indução, proliferação de calos e produção de metabólitos secundários.
- Identificar e comparar o perfil dos metabólitos secundários produzidos em calos *in vitro*, plântulas *in vitro* e plantas cultivadas em casa de vegetação, baseado nas informações da técnica microextração em fase sólida (SPME – solidphase microextraction) utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).
- Investigar se os calos *in vitro* de *A. annua* podem ser fonte de metabólitos secundários de interesse e ainda não reportados na espécie.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Plantas medicinais e sua importância

O uso de plantas para fins medicinais é registrado desde 2.600 A.C., em que era aplicado de forma empírica sem conhecimento sobre seus compostos ativos e propriedades farmacológicas. Somente no século 19, os princípios ativos das plantas medicinais como morfina, cafeína, nicotina, codeína, colchicina, cocaína foram estudados e isolados de suas fontes. Desde então, os princípios ativos têm sido sintetizados quimicamente em laboratórios para aumentar a produção (ATANASOV *et al.*, 2015).

A medicina moderna está atrelada a indústria de medicamentos farmacêuticos, já que muitos são estruturados em princípios ativos de plantas como é o caso da cocaína para anestesia e morfina como analgésico (KAYSER, 2018). Entretanto, segundo dados da Organização Mundial da Saúde apenas 50% da população mundial tem acesso adequado aos sistemas de saúde e de tratamento, sendo que a outra metade da população mundial é completamente desassistida pelos sistemas públicos de saúde (WHO, 2017).

Tendo em vista que esses medicamentos sintéticos não estão disponíveis ou possuem acesso limitado, muitos países subdesenvolvidos utilizam da medicina tradicional baseada no uso direto de plantas medicinais para a cura de doenças e outras enfermidades (SALMERÓN-MANZANO; MANZANO-AGUGLIARO, 2020). Isso se deve ao seu baixo custo, já que essas plantas possuem moléculas orgânicas sintetizadas naturalmente, e redução de efeitos colaterais em relação aos medicamentos convencionais (CARDOSO; OLIVEIRA; CARDOSO, 2019; GUPTA; VAGHELA, 2019).

3.2. *Artemisia annua*

Artemisia é um dos maiores gêneros pertencentes à família Asteraceae, contendo mais de 500 espécies distribuídas nas zonas temperadas da Ásia, América do Norte e Europa (ABAD *et al.*, 2012; BORA; SHARMA, 2011). O gênero compreende plantas medicinais e aromáticas com ampla atividade fitoquímica, devido à presença de muitos compostos ativos e metabólitos secundários, possibilitando o tratamento de diversas doenças como malária, hepatite, câncer, inflamações e infecções causadas por fungos, bactérias e vírus (WILLCOX, 2009; ZAYOVA *et al.*, 2020).

Apesar de ser uma planta medicinal nativa da China e ocorrer originalmente na Ásia e Europa, *Artemisia annua* é distribuída em todos os continentes. Na África, ela é cultivada, já que a infusão de chá é usada para o tratamento de malária (NIGAM *et al.*, 2019), além de apresentar atividade anti-inflamatória (MAGALHÃES *et al.*, 2012) e anti-HIV (vírus da imunodeficiência humana) (LUBBE *et al.*, 2012).

A. annua é tradicionalmente utilizada para tratamento de febres e calafrios, recomendada como droga contra a malária pela Organização Mundial da Saúde, sendo a única fonte natural de artemisinina, mundialmente utilizada devido suas propriedades antimaláricas (WHO, 2020).

A malária é uma doença infecciosa severa causada por protozoários parasitas do gênero *Plasmodium* e transmitida aos humanos pela picada de mosquitos infectados do gênero *Anopheles* e apesar de sua mortalidade ter reduzido nos últimos 20 anos, ainda se apresenta como uma ameaça à saúde global, principalmente na África subsariana (HUSSEIN *et al.*, 2020; WHO, 2020).

Atingindo principalmente áreas mais pobres das regiões tropicais e subtropicais do mundo, como é o caso da África e de alguns países da Ásia e América, a malária afetou 229 milhões de pessoas, causando 409 mil mortes em 2019 no mundo todo. Esses valores são mais baixos comparados com as 607 mil mortes em 2010 e isso ocorreu principalmente devido ao programa de controle da malária em escala global, com foco no diagnóstico precoce, prevenção e tratamento da doença (WHO, 2020).

3.3. Artemisinina

Artemisinina é uma lactona sesquiterpênica com um grupamento endoperóxido, produzida naturalmente nos tricomas glandulares das folhas e flores de *A. annua* (DUKE *et al.*, 1994). Em 1970, cientistas chineses liderados por Tu Youyou isolaram o princípio ativo da *A. annua*, artemisinina, provando ser muito útil no tratamento da malária. Em 2015, Tu Youyou recebeu o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina devido a descoberta dessa substância que possibilitou novos meios terapêuticos e a produção de medicamentos para salvar vidas contra a malária (GUO, 2016; HSU, 2006).

Artemisinina e seus derivados como artesunato e artemeter são amplamente utilizados em terapia de combinação baseada em artemisinina (ACT) para o tratamento de malária (LI *et al.*, 2010; TALAPKO *et al.*, 2019). A ACT assegura uma probabilidade de cura de aproximadamente 95% contra o *Plasmodium falciparum* e é

utilizada devido à alta resistência do parasita a cloroquina, sulfadoxina-pirimetamina e amodiaquina (WHO, 2018). O uso de ACT é recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como principal método de tratamento para a malária multirresistente a medicamentos derivados de quinina, cloroquina e mefloquina (WHO, 2017), reduzindo a disseminação da resistência aos medicamentos.

Além da sua conhecida atividade antimalárica, um artigo de revisão demonstrou que a artemisinina e seus derivados possuem outras propriedades de interesse além da malária, como atividade antiviral, antifúngica, anti-inflamatória, antialérgica, anti-helmíntica, anti-esquistossomal, anti-protozoários e ação contra células cancerígenas (HO *et al.*, 2014). Ademais, extratos de *A. annua* com alto teor de artemisinina estão sendo estudados em um ensaio clínico contra COVID-19 (NIE *et al.*, 2021).

3.4. *Artemisia annua* e outros metabólitos de interesse

Embora a artemisinina seja o principal composto na *A. annua*, essa é uma espécie muito rica em metabólitos secundários de interesse farmacêutico, possuindo atividades anti-inflamatória, antibacteriana, antitumoral, antiviral e anti-helmíntica (BHAKUNI *et al.*, 2001; MAGALHÃES *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2015; MESA *et al.*, 2015; MA *et al.*, 2019), com aplicações em diferentes áreas que vão da cicatrização de úlceras gástricas ao tratamento de tumores (FAPESP, 2005; LANG *et al.*, 2019; KOLESAR; SEEBERGER, 2022).

A planta possui alto teor de polifenóis, flavonoides, cumarinas, fitoesteróis, polissacarídeos (MESA *et al.*, 2015) e seu óleo essencial é rico em monoterpenos e sesquiterpenos, sendo muito utilizado na composição de produtos cosméticos e produtos sanitários (BILIA *et al.*, 2014; MAGALHÃES *et al.*, 1999). *A. annua* possui em seu óleo essencial compostos como cânfora (2-bornanona), eucaliptol (1,8-cineol), germacreno D, linalol, α -pineno, cetona de *Artemisia*, canfeno, borneol, beta cariofileno, pineno (ABAD *et al.*, 2012; BORA; SHARMA, 2011). Portanto, apresentam diversos princípios ativos e metabólitos secundários com diferentes mecanismos de ação fazendo com que tenham um amplo espectro de bioatividade (ABAD *et al.*, 2012).

3.5. Produção de *Artemisia annua* e seus metabólitos

A artemisinina é difícil de ser sintetizada, por possuir estrutura química complexa, fazendo que o isolamento e purificação da *A. annua* seja a principal fonte

de artemisinina (MESA *et al.*, 2015). Para a produção industrial de produtos farmacêuticos contendo artemisinina e seus derivados é necessária uma produção em larga escala de plantas contendo altos teores de artemisinina.

No entanto, a propagação de *A. annua* normalmente é feita através de sementes, a partir de plantas com altos teores de artemisinina (1 – 2% em massa seca), utilizando cultivares como a ‘Artemis’ e ‘Anamed A3’, por vezes chamadas de híbridas (FERREIRA *et al.*, 2005; HAILU; ABERA; MARIAM, 2013; REALE *et al.*, 2011). Os “híbridos” não são verdadeiros híbridos pois seus parentais não são comprovadamente homocigotos para a produção de artemisinina.

Apesar dos sucessivos aumentos na concentração de artemisinina associados as subseqüentes gerações de melhoramento, plantas provenientes de sementes ainda apresentam alta variabilidade genética associada as concentrações desse metabólito de interesse, resultando em concentrações reais menores que 1% de artemisinina na massa seca (WETZSTEIN *et al.*, 2018). Além da influência de fatores genéticos, os fatores ambientais também podem afetar a produção de biomassa e artemisinina (TARIQ; ALI; ABBASI, 2014).

3.6. Cultivo *in vitro*

A micropropagação é uma técnica de cultivo *in vitro* de plantas, que possibilita uma rápida multiplicação clonal de plantas livres de doenças, geneticamente uniformes e em ambiente altamente controlado, tanto climaticamente como do ponto de vista nutricional e, de controle do desenvolvimento de plantas *in vitro* por meio dos fitorreguladores (CARDOSO; GERALD; TEIXEIRA DA SILVA, 2018). Devido ao ambiente controlado da sala de crescimento e ambiente asséptico do meio de cultura, a micropropagação viabiliza a produção uniforme em larga escala de plantas com qualidade genética e sanitária superiores as convencionais, além de ser independente de clima e estação do ano.

Experimentos anteriores de produção de plantas micropropagadas de *A. annua* a partir de sementes, ápices caulinares e segmentos nodais tem sido reportada com uso de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo diferentes concentrações dos fitorreguladores 6-Benziladenina (BAP), Thidiazuron (TDZ), Ácido Giberélico (GA3), Ácido Naftaleno Acético (ANA) e Ácido Indolbutírico (AIB) (HAILU; ABERA; MARIAM, 2013; JAMALEDDINE *et al.*, 2011; LUALON *et al.*, 2008; ZAYOVA *et al.*, 2018).

A micropropagação de *A. annua* tem sido amplamente estudada com resultados promissores da aplicação da técnica na produção de plantas de origem clonal. Wetzstein *et al.* (2018) reportaram que o uso de técnicas clonais baseadas na cultura de tecidos e estaquia como métodos de clonagem, seguido do cultivo de plantas com altas concentrações de artemisinina resultaram no incremento de uma média 25 kg ha⁻¹ para 70 kg ha⁻¹ desse metabólito, demonstrando que plantas de origem clonal tem um significativo potencial de substituição das sementes.

3.7. Produção *in vitro* de metabólitos secundários

Além da produção clonal de mudas, o cultivo *in vitro* pode ser utilizado para a produção de metabólitos secundários. O cultivo *in vitro* de calos, baseado numa massa de células em constantes e rápidas divisões celulares e de forma não organizada e não diferenciada, tem se mostrado como uma alternativa para a produção de biomassa *in vitro* visando a produção e estímulo da produção de metabólitos secundários (CARDOSO; OLIVEIRA; CARDOSO, 2019).

Nesse contexto, a produção de calos *in vitro* de plantas traz algumas vantagens em relação a micropropagação convencional, como: tecidos mais fáceis de serem controlados quanto a sua indução e crescimento, comparados a um sistema de regeneração de uma planta completa; a capacidade desse tipo de tecido em se manter em constante divisão celular, permitindo que cada célula se torne uma fonte do metabólito secundário, podendo resultar num sistema mais simples de duas fases, onde parte do tecido é mantido em crescimento *in vitro* e a outra parte utilizada para a extração do metabólito (CARDOSO; OLIVEIRA; CARDOSO, 2019).

O ambiente do cultivo *in vitro* ainda possibilita maior controle sobre a produção de metabólitos secundários (concentração e tempo de produção) sendo possível consorciar um período ou estágio de produção de massa vegetal com outro de elicitação dos metabólitos secundários, sob condições com redução considerável dos efeitos associados as variações geográficas, ambientais e sazonais (CARDOSO; OLIVEIRA; CARDOSO, 2019; MORAES; CERDEIRA; LOURENÇO, 2021; NAIK; AL-KHAYRI, 2016).

Entretanto, a produção *in vitro* de metabólitos apresenta algumas limitações envolvendo os altos custos para manutenção do ambiente controlado e baixo rendimento de biomassa em relação a produção convencional de metabólitos utilizando plantas cultivadas no campo (CARDOSO; OLIVEIRA; CARDOSO, 2019).

Portanto, a cultura de tecidos desdiferenciados *in vitro* é uma importante ferramenta para estudar fatores que afetam a produção de diferentes metabólitos e a possibilidade dos calos em produzir compostos diferente dos tecidos diferenciados obtidos de plantas *in vitro* ou cultivadas em casa de vegetação.

Estudos recentes com a proliferação de tecidos de calos de *Phyllanthus amarus* resultaram em perfil de metabólitos secundários de metabólitos secundários diferente dos tecidos obtidos de plantas derivadas de micropropagação e cultivadas em vasos. A partir dos calos *in vitro*, foi relatada a ocorrência de moléculas ainda não reportadas na espécie, a exemplo da betulona (OLIVEIRA; SARTORATTO; CARDOSO, 2020).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetativo

Sementes de *Artemisia annua* da variedade CPQBA 3, com alta concentração de artemisinina (proveniente de mais de dez gerações com média de 1% de artemisinina nas folhas secas em cultivo em campo), foram fornecidas pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA – Unicamp) (Figura 1).



Figura 1 - Sementes de *A. annua* fornecidas pelo CPQBA-Unicamp

Essas sementes foram utilizadas para a germinação *in vitro* e obtenção de plântulas, sendo que todos os materiais vegetais utilizados para as comparações de perfil de metabólitos (calos *in vitro*, plântulas *in vitro* e plantas em casa de vegetação) tiveram como mesma origem genética.

4.2. Semeadura *in vitro*

Para a germinação *in vitro* de *A. annua* foi utilizado o meio de cultura Murashige; Skoog (1962) contendo metade da concentração dos macronutrientes ($MS\frac{1}{2}$), com $15,0\text{ g L}^{-1}$ de sacarose, $0,1\text{ g L}^{-1}$ de inositol e pH ajustado para 5,8 seguido da adição de $6,5\text{ g L}^{-1}$ de ágar. Aproximadamente 35 mL desse meio de cultura foram adicionados em frascos de vidro de 250 mL de capacidade e vedados com tampas de polipropileno. Os mesmos foram autoclavados em autoclave vertical de 150 L a temperatura de $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressão de 1 kgf cm^{-2} , por 25 min.

A assepsia foi realizada inicialmente em 100 sementes de *A. annua* ($4,98 \pm 0,30$ mg), sendo que essas foram previamente acondicionadas em papel filtro dobrando-se as extremidades e, com auxílio de uma pinça, imersos em álcool 70% durante um minuto. Em seguida, foi feita a imersão por 15 min em solução de hipoclorito de sódio contendo 0,3% de cloro ativo, acrescido de cinco gotas por litro de detergente neutro. Por fim, foram realizadas três lavagens consecutivas com água deionizada previamente autoclavada.

As sementes foram então inoculadas no meio de cultura e mantidas para germinar em condições de sala de crescimento com temperatura de 26 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 h fornecida por luz branca fria fluorescente ($40-50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), visando a germinação e desenvolvimento inicial das plântulas.

Nessa fase inicial, foram avaliadas a porcentagem de germinação das sementes e de plântulas completamente desenvolvidas com a presença de raízes, caule e folhas. Somente as plântulas completamente desenvolvidas foram utilizadas para os experimentos de indução e proliferação de calos, obtenção das plântulas *in vitro* e das plantas de *A. annua* posteriormente cultivadas em casa de vegetação.

4.3. Benzilaminopurina (BAP) e Ácido Naftaleno Acético (ANA) na indução e proliferação de calos *in vitro* de *Artemisia annua*

O objetivo deste experimento foi obter uma combinação de Benzilaminopurina (BAP) e Ácido Naftaleno Acético (ANA) com melhor resposta para as fases de indução e de proliferação de calos *in vitro*, baseados no aumento da taxa de explantes com formação de calos e produção de biomassa de calos de *A. annua*.

Como explantes foi utilizada a região apical das plântulas previamente germinadas (item 4.2). Esses foram obtidos pelo corte logo acima do par de folha cotiledonar, com comprimento $1,57 \pm 0,30$ cm e foram realizados com 30 dias de cultivo após a semeadura.

O meio de cultura básico utilizado para a indução dos calos *in vitro* foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 30 g L^{-1} de sacarose, $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de inositol com pH ajustado para 5,8 antes da adição de $6,4 \text{ g L}^{-1}$ de ágar. Aproximadamente 12 mL desse meio de cultura foram adicionados em tubos de ensaio de 12 cm x 3 cm, vedados com papel alumínio e autoclavados a 120 °C e pressão de 1 kgf cm^{-2} , por 25 min.

A escolha dos tipos e concentrações de fitorreguladores, bem como condições de cultivo, foram baseadas em diferentes trabalhos publicados com a espécie *A.*

annua (ALEJOS-GONZALEZ *et al.*, 2013; BROWN, 1994; DANGASH *et al.*, 2015; GHASSEMI; NAYERI; HOSSEINI, 2015; MOHAMMAD *et al.*, 2014; TAHIR *et al.*, 2015; ZAYOVA *et al.*, 2020). Dessa forma, as concentrações de BAP utilizadas foram 0, 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 mg L⁻¹ combinadas com concentrações de ANA a 0, 0,5 e 1,0 mg L⁻¹, sendo os fitorreguladores adicionados ao meio de cultura previamente ao ajuste de pH e autoclavagem. Nesse experimento, foi utilizado delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 5 x 3 (concentrações de BAP x concentrações de ANA), com dez repetições, tubos de ensaio contendo os explantes, por tratamento (Tabela 1)

Tabela 1 - Concentração dos fitorreguladores Benzilaminopurina (BAP) e Ácido Naftaleno Acético (ANA) na indução e proliferação de calos *in vitro* de *A. annua*

Concentração (mg L ⁻¹)	
BAP	ANA
0	0
	0,5
	1,0
0,25	0
	0,5
	1,0
0,5	0
	0,5
	1,0
0,75	0
	0,5
	1,0
1,0	0
	0,5
	1,0

Os explantes foram mantidos no escuro por um período de 70 dias em condições de sala de crescimento com temperatura de 26 ± 1 °C.

Após o período de 70 dias de cultivo, foram realizadas avaliações do diâmetro e da massa fresca dos calos obtidos. Os diâmetros dos calos foram mensurados a partir da média de duas medições perpendiculares de diâmetros de cada calo obtido.

A massa fresca dos calos foi mensurada com auxílio de balança analítica de precisão Mettler ML201 (Mettler, Suíça), subtraindo-se a massa dos ápices caulinares utilizados para a indução.

4.4. Luz e fitorreguladores na proliferação dos calos *in vitro* de *A. annua*

O objetivo deste experimento foi determinar o efeito da presença ou ausência de luz (escuro) na proliferação dos calos *in vitro* de *A. annua*. Foram testados em ambas as condições os tratamentos com maior diâmetro e massa de calos obtidos no experimento anterior, portanto, combinando BAP e ANA, a 0,5 mg L⁻¹ e a 1,0 mg L⁻¹ cada.

Os calos obtidos ao final dos 70 dias de cultivo foram transferidos para frascos com 250 mL de capacidade, contendo 35 mL de meio de cultura correspondente ao tratamento do qual se originaram.

Parte dos calos obtidos foram submetidos a condições de sala de crescimento a 26±1 °C em condições de escuro e outra metade na presença de luz, fornecida por luz branca fria fluorescente em fotoperíodo de 16 h e densidade de fluxo de fótons fotossintéticos de 45-50 μmol m⁻² s⁻¹.

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2 x 2 (concentrações de BAP e ANA x iluminação), com dez repetições (calo obtido da fase de indução).

4.5. Obtenção de calos *in vitro* de *Artemisia annua* cultivados em diferentes comprimentos de onda do espectro visível de luz

Os objetivos deste experimento foram avaliar a viabilidade do uso de LEDs, em substituição a luz fria fluorescente, e determinar os comprimentos de onda associados a produção de massa e de metabólitos secundários nos calos *in vitro* de *A. annua*.

Para a indução de calos *in vitro*, foram utilizados como explante ápices caulinares com 1,29 ± 0,34 cm de comprimento, provenientes de plântulas germinadas com 30 dias de idade, realizado conforme descrito no item 4.2

O meio de cultura utilizado foi escolhido baseado nos melhores resultados obtidos no item 4.3, MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de inositol, acrescido de 1,0 mg L⁻¹ de BAP e 1,0 mg L⁻¹ de ANA, com pH ajustado para 5,8 antes da adição de 6,4 g L⁻¹ de ágar. 12 mL de meio de cultura foram adicionados em tubos de ensaio de 12 cm x 3 cm, vedados com tampa de

polipropileno e autoclavados a 120 °C e pressão de 1 kgf cm⁻², mantidos por 25 minutos. No momento da inoculação dos explantes, as tampas de polipropileno foram substituídas por plástico filme transparente.

Além das condições de escuro (E) (0,58 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$), foram utilizadas as faixas de comprimento de onda do espectro visível de luz branca (B) (64,09 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$) fornecida por lâmpada fluorescentes e diferentes comprimentos de onda fornecidos por diodos emissores de luz (LEDs), sendo essas: azul (A) (55,58 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$), vermelha (V) (106,22 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$), azul e vermelha (AV) (71,48 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$), todas em fotoperíodo fixo de 16 h (Figura 2).

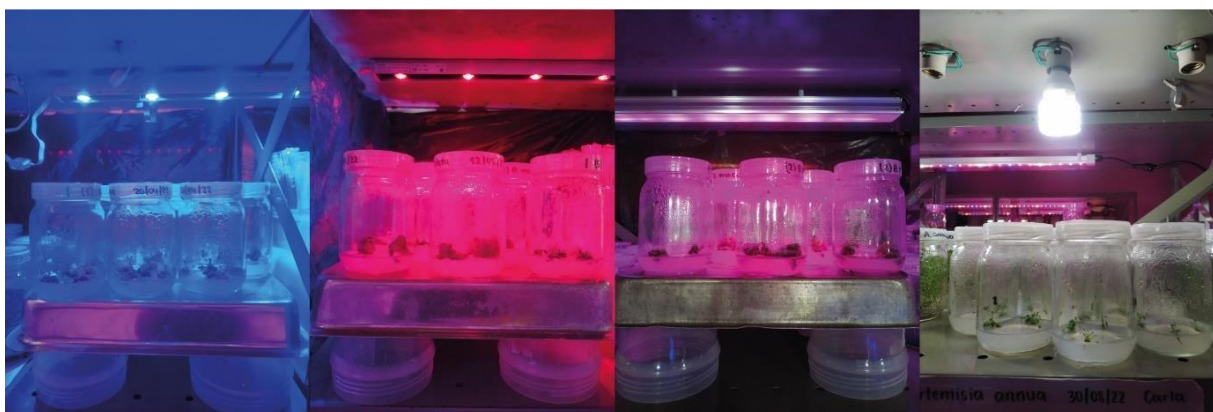


Figura 2 - Diferentes comprimentos de onda do espectro visível de luz utilizados para o cultivo *in vitro* de calos de *A. annua*

A massa fresca e diâmetro dos calos foi mensurada a cada sete dias por um período de 56 dias para a elaboração da curva de crescimento dos calos na fase de indução e após 28 dias na fase de proliferação.

4.6. Obtenção de plântulas *in vitro*

Dois frascos de plântulas germinadas *in vitro* foram utilizados para a micropropagação de *A. annua*, utilizando ápices caulinares como explante. Foi utilizado o protocolo desenvolvido por Wetzstein *et al.* (2018) no qual foi obtido maior proliferação de brotações em meio de cultura MS acrescido de 0,20 mg L⁻¹ de BAP e 0,05 mg L⁻¹ de ANA (Figura 3).



Figura 3 - Explante inicial de *A. annua* para a obtenção de plântulas *in vitro*

O cultivo foi feito por 28 dias e as brotações foram mantidas em condições de sala de crescimento com temperatura de 26 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 h fornecida por luz branca fria fluorescente e densidade de fluxo de fótons fotossintéticos de 45-50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mesmas condições de cultivo dos calos.

4.7. Obtenção de plantas cultivadas em casa de vegetação

Sementes de *A. annua* provenientes do mesmo lote e genótipo utilizados para o cultivo *in vitro* foram semeadas em substrato comercial, acondicionadas em bandejas de plástico e cultivadas em casa de vegetação com condições de temperatura entre 20-30°C e umidade relativa do ar acima de 60%, controlada por sistema de resfriamento tipo Pad-Fan com sombreamento obtido por tela com quebra de luz de 50%, tipo Aluminet® (Figura 4).



Figura 4 - Plântulas de *A. annua* germinadas em substrato.

Após 40 dias de germinação, as mudas foram transplantadas para vasos de plástico preto com capacidade de 1,0 L contendo substrato comercial baseado em casca de pinus moída e adubadas com fertilizante com tecnologia de liberação lenta, tipo Basacote®, fórmula 16-8-12 + macros e micros (Figura 5A).



Figura 5 - Plantas de *A. annua* cultivadas em casa de vegetação. **A.** Plântulas transplantadas para vasos. **B.** Plantas antes do desbaste. **C.** Plantas após o desbaste.

Após dez dias do transplante, foi feita o desbaste de mudas mantendo-se de duas a três mudas por vaso que foram cultivadas em casa de vegetação por mais 30 dias, totalizando um período de 90 dias desde a semeadura (Figura 5B, Figura 5C).

Ao final dos 90 dias de cultivo, as partes aéreas das plantas foram coletadas e utilizadas para as análises de metabólitos secundários.

4.8. Análise dos metabólitos secundários por SPME/GC-MS

A técnica de micro-extração em fase sólida (SPME – solid phase microextraction) acoplada a cromatografia gasosa com espectrometria de massas (GC-MS) foi realizada em parceria com o Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA-Unicamp) para análise dos compostos voláteis de calos, plântulas *in vitro* e plantas cultivadas em casa de vegetação de *A. annua*.

Para análises dos calos, das plântulas *in vitro* e das plantas cultivadas em casa de vegetação, aproximadamente 2 g de massa fresca foram coletadas e armazenadas em tubos Falcon de 50 mL (Figura 6A).

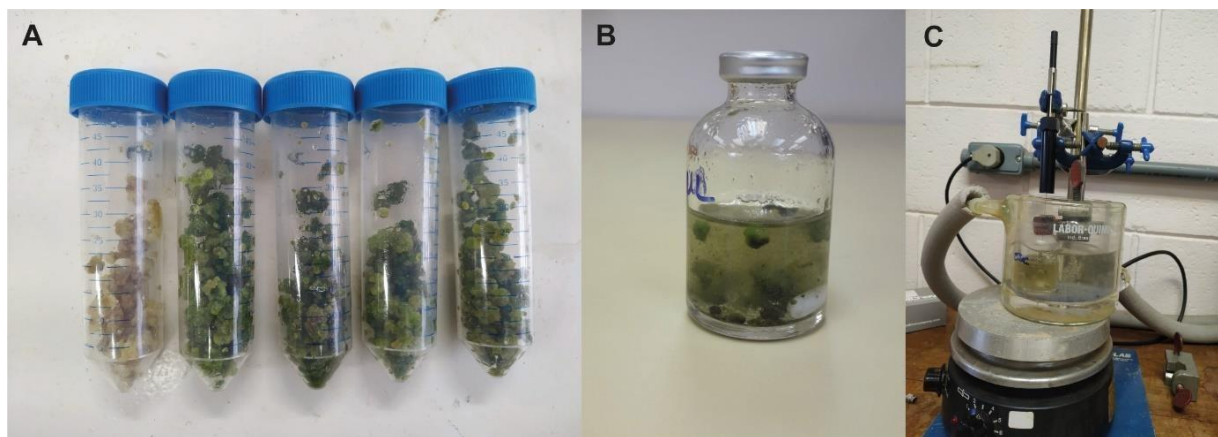


Figura 6 - Análise dos calos *in vitro* por SPME-GC-MS. **A.** Calos *in vitro* dos diferentes tratamentos armazenados em tubos Falcon. **B.** Amostra em solução salina saturada de NaCl. **C.** Amostra em banho maria e injeção da fibra SPME

Para a extração por SPME, 2 g de amostra foram transferidos para frasco de vidro de 40 mL, adicionados 15 mL de uma solução saturada de NaCl (360 g L^{-1}), lacrado com septo de silicone (Figura 6B) e colocado em um banho-maria a 60°C .

Em seguida, o meio foi mantido sob agitação constante por 30 minutos para liberação dos voláteis. Após este período, a fibra de SPME foi exposta aos voláteis

para sorção dos mesmos, permanecendo por mais 30 minutos (Figura 6C). Finalmente, a fibra foi retirada do frasco e introduzida no injetor do cromatógrafo a gás para liberação dos voláteis e análise por GC-MS.

As análises para calos, plântulas *in vitro* e plantas cultivadas em casa de vegetação foram realizadas em triplicata. No caso dos calos, foram coletadas três amostras de cada tratamento (E, B, A, V, AV). Cada uma das amostras consistiu no conjunto de calos tomados aleatoriamente (pelo menos 4 calos distintos) para atingir os 2 g de massa fresca. Cada amostra de plântula *in vitro* também consistiu em um conjunto tomado aleatoriamente das partes aéreas das plântulas contidas em diferentes frascos para atingir os 2 g de massa fresca. No caso das plantas cultivadas em casa de vegetação, cada conjunto contido em um vaso foi considerado como uma amostra, sendo retirado apenas as partes aéreas.

4.9. Comparação do perfil de metabólitos secundários de diferentes tecidos de *Artemisia annua*

Após a obtenção dos diferentes tecidos de *A. annua* e análise dos metabólitos, o objetivo foi comparar o perfil dos metabólitos secundários produzidos em plantas cultivadas em casa de vegetação, plântulas *in vitro* e calos *in vitro* todas provenientes da mesma fonte, conforme descrito no item 4.2 (Figura 7).

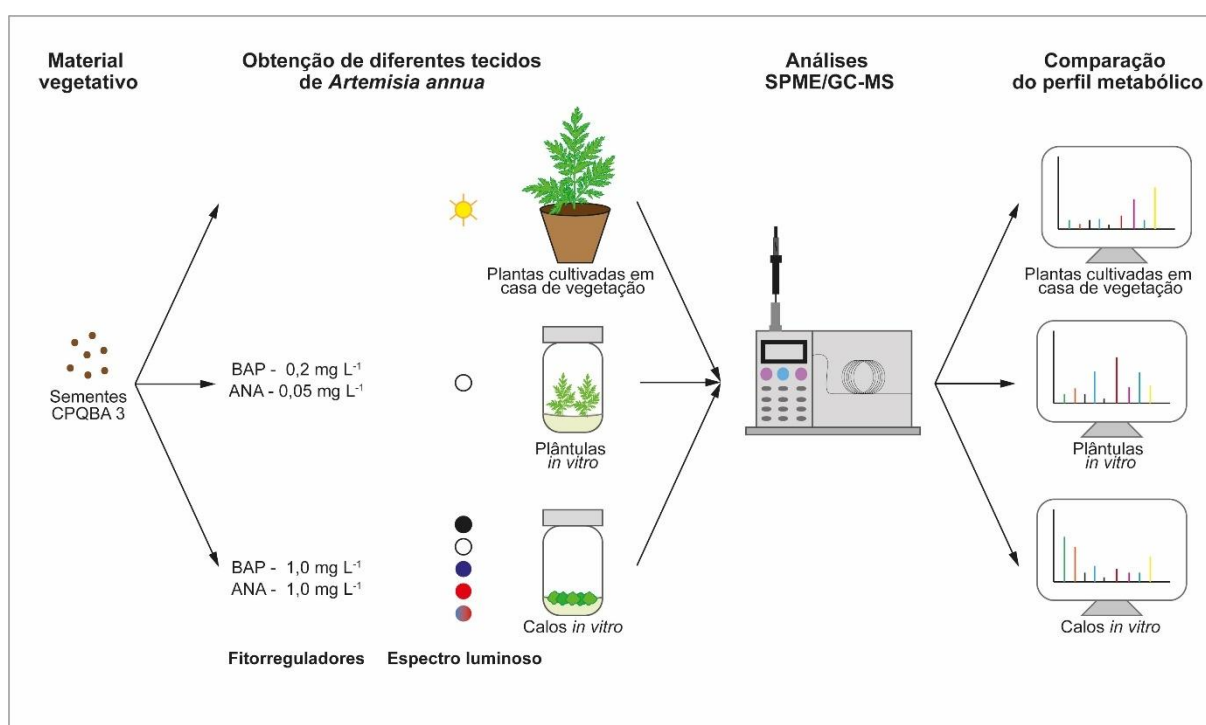


Figura 7 - Esquema ilustrativo do experimento

Primeiramente, foi feita a comparação entre as iluminações utilizadas para o cultivo de calos *in vitro* (escuro, luz branca, azul, vermelha e azul+vermelha). Com o intuito de representar as diferenças e semelhanças entre os conjuntos de metabólitos secundários identificados nas iluminações, foram construídos diagramas de Venn, com auxílio do software InteractiVenn (HEBERLE *et al.*, 2015). Em seguida, foi feita uma tabela apresentando os valores médios de porcentagem relativa das três amostras analisadas por SPME GC-MS em cada uma das iluminações.

Para os dados relacionados aos metabólitos secundários dos tecidos de *A. annua* (calos *in vitro*, plântulas *in vitro* e plantas cultivadas em casa de vegetação) também foram construídos diagramas de Venn. Nesse caso, os metabólitos dos calos foram considerados independente da iluminação utilizada. Para a porcentagem relativa dos calos, foi utilizada a média dos valores das três amostras e de todas as iluminações.

Também foram construídos diagramas de Venn para avaliar a variabilidade entre as três amostras utilizadas nas análises por SPME GC-MS de cada um dos tecidos: calos *in vitro*, plântulas *in vitro* e plantas cultivadas em casa de vegetação. Nesse caso, cada conjunto representou o conjunto de metabólitos secundários identificados em cada amostra analisada.

Por fim, foi feita uma busca na literatura para investigar se os calos *in vitro*, pelas suas características particulares como células não diferenciadas e em crescimento desorganizado, poderiam resultar na produção de moléculas ainda não reportadas em tecidos diferenciados de *A. annua*.

4.10. Análise estatística

Os dados obtidos dos experimentos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA). Primeiramente, foram realizados o teste de Shapiro-Wilk a 5% para avaliar a normalidade dos resíduos e o teste de Bartlett a 5% para homogeneidade das variâncias. Os dados que não respeitavam as pressuposições da Análise de Variância (ANOVA) foram transformados utilizando a equação $\arcsen\sqrt{x/100}$, para dados em porcentagem, e $\sqrt{x/0,1}$ para os dados de massa fresca e diâmetro. Com os dados apresentando normalidade de resíduos e homoscedasticidade, foi feito o teste de comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância, utilizando o software RStudio v. 4.2.1 (RSTUDIO TEAM, 2022).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Semeadura *in vitro*

O protocolo para a desinfecção superficial das sementes de *A. annua* foi eficiente para a semeadura *in vitro*, sem a observação de contaminações microbianas, com porcentagem de germinação de $65,57 \pm 6,70\%$ e sucesso obtenção de plântulas após um período de 20-30 dias.

Essas plântulas germinadas foram utilizadas para a indução de calos e obtenção de plântulas *in vitro* (Figura 8).



Figura 8 - Plântulas de *A. annua* obtidas por semeadura *in vitro* em meio MS $\frac{1}{2}$ com 15,0 g L $^{-1}$ de sacarose.

5.2. Efeitos da Benzilaminopurina (BAP) e Ácido Naftaleno Acético (ANA) na indução e proliferação de calos *in vitro* de *Artemisia annua*

O uso de fitorreguladores BAP e ANA, independentemente da concentração, demonstraram ser essenciais para a indução de calos *in vitro* de *A. annua*, aumentando o diâmetro dos calos em até 400%, obtido com o tratamento combinando de 0,5 mg L $^{-1}$ de BAP e ANA, comparado ao controle sem fitorreguladores (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito dos fitorreguladores Benzilaminopurina (BAP) e Ácido Naftaleno Acético (ANA) no diâmetro (cm) dos calos *in vitro* induzidos no escuro a partir de ápices caulinares de *A. annua* após 70 dias de cultivo

Concentração (mg L ⁻¹)		Diâmetro (cm)
BAP	ANA	
0	0	0,38 Bb
	0,5	1,09 Ba
	1,0	1,14 Ba
0,25	0	1,26 Ab
	0,5	1,51 Aa
	1,0	1,64 Aa
0,5	0	1,21 Ab
	0,5	1,89 Aa
	1,0	1,73 Aa
0,75	0	0,93 Ab
	0,5	1,79 Aa
	1,0	1,56 Aa
1,0	0	0,94 Ab
	0,5	1,45 Aa
	1,0	1,77 Aa
P valor BAP		< 0,00001*
P valor ANA		< 0,00001*
P valor interação		0,40335 ^{ns}
Coeficiente de variação (%)		34,14 %

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula para concentração de BAP e minúscula para concentração de ANA, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ^{ns} não significativo.

Apesar de não haver diferença significativa no diâmetro dos calos quando cultivados em combinação de BAP e ANA, independente da concentração, apenas quatro tratamentos foram avaliados quanto a massa fresca.

Essa escolha se deu baseada no maior diâmetro de calos observados (0,5 mg L⁻¹ de ANA e BAP, combinados) e na avaliação dos efeitos individuais dos fitorreguladores, ou seja, uso isolado de ANA (0,5 mg L⁻¹) ou BAP (0,5 mg L⁻¹) na mesma concentração. Além disso, o tratamento contendo o dobro da concentração de BAP e ANA (1,0 mg L⁻¹ de BAP e ANA) foi escolhido devido ao aspecto visual dos calos. Eles apresentaram coloração mais clara e células mais friáveis, menos compactas em relação aos calos cultivados com 0,75 mg L⁻¹ de BAP e 0,5 mg L⁻¹ de ANA (Figura 9).

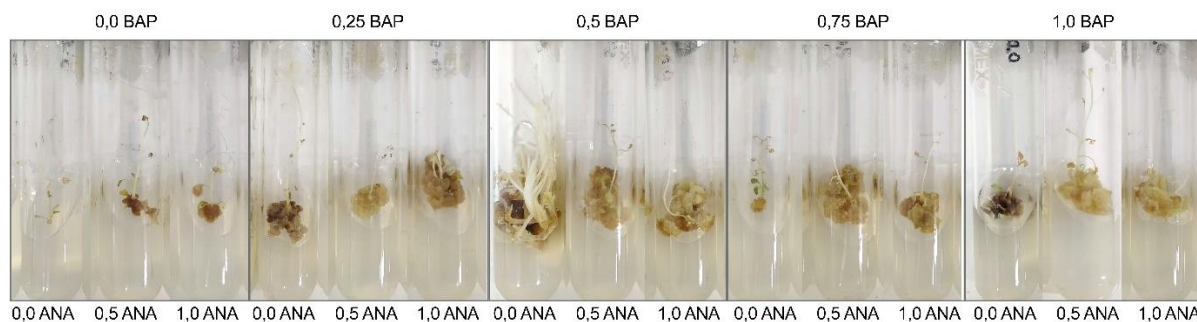


Figura 9 - Efeito dos fitorreguladores Benzilaminopurina (BAP) e Ácido Naftaleno Acético (ANA) no desenvolvimento dos calos *in vitro* induzidos no escuro a partir de ápices caulinares de *A. annua* após 70 dias de cultivo.

Para massa fresca, foi possível observar a importância do uso combinado de BAP e ANA. A combinação de BAP e ANA a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ resultou em aumento de 374% da massa fresca em relação ao uso isolado de ANA e 146% em relação ao uso isolado de BAP. Ainda, o aumento da concentração de ambos os fitorreguladores para $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ resultou em aumento de 39,92% na massa fresca dos calos em relação a concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (

Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito dos fitorreguladores Benzilaminopurina (BAP) e Ácido Naftaleno Acético (ANA) na massa fresca (g) dos calos *in vitro* induzidos a partir de ápices caulinares de *A. annua* após 70 dias de cultivo

Concentração (mg L^{-1})		Massa fresca dos calos (g)
BAP	ANA	
0	0,5	0,4545 b
0,5	0	0,8877 b
0,5	0,5	2,1834 a
1,0	1,0	3,0551 a
P valor		7.402e-07*
Coeficiente de variação (%)		32,63

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Protocolos para cultura de calos, organogênese e cultura de células tem sido reportados para *A. annua* utilizando diversas concentrações e combinações de diferentes fitorreguladores como ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), Benzilaminopurina (BAP), Thidiazuron (TDZ), Cinetina, Ácido naftaleno acético (ANA),

Ácido indolbutírico (AIB) e Ácido indolacético (AIA) (ALEJOS-GONZALEZ *et al.*, 2013; DANGASH *et al.*, 2015; GHASSEMI; NAYERI; HOSSEINI, 2015; TAHIR *et al.*, 2015; ZAYOVA *et al.*, 2020), sendo o 2,4-D, BAP e ANA os mais utilizados.

A combinação de 0,5 mg L⁻¹ de BAP e ANA utilizada no experimento também foi reportada em *A. annua* (KENG *et al.*, 2010) e a concentração de 1,0 mg L⁻¹ de BAP e ANA para a indução de calos *in vitro* também foi reportada para *A. annua*, em que foi utilizado o fungo *Aspergillus* sp. como elicitor para aumentar a concentração de artemisinina em culturas de calos (YULIANI *et al.*, 2018).

5.3. A luz na proliferação dos calos *in vitro* de *Artemisia annua*

Para o diâmetro dos calos obtidos na fase de proliferação, não houve diferença significativa entre a presença e ausência de luz, nem entre as concentrações de fitorreguladores utilizadas. Para a massa fresca dos calos proliferados, a ausência de luz resultou em maiores valores de massa fresca, independente da concentração dos fitorreguladores (Tabela 4)

Tabela 4 - Efeito dos fitorreguladores Benzilaminopurina (BAP) e Ácido Naftaleno Acético (ANA) e da presença e ausência de iluminação no diâmetro (cm), massa fresca (g) dos calos *in vitro* de *A. annua* na fase de proliferação

Concentração (mg L ⁻¹)		Iluminação	Proliferação	
BAP	ANA		Diâmetro (cm)	Massa fresca (g)
0,5	0,5	Escuro	1,34	0,8512 a
		Branca		0,6355 b
1,0	1,0	Escuro	1,35	0,7836 a
		Branca		0,7262 b
P valor BAP e ANA			0,76062 ^{ns}	0,81660 ^{ns}
P valor Iluminação			0,79338 ^{ns}	0,01943 [*]
P valor interação			0,12017 ^{ns}	0,17746 ^{ns}
Coeficiente de variação (%)			15,46	30,38

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ^{ns} não significativo.

Além disso, a iluminação também influenciou na coloração dos calos formados. Os calos obtidos com BAP ou ANA aplicados isoladamente no meio de cultura apresentaram coloração marrom independente da iluminação. Já a combinação BAP e ANA no mesmo meio de cultura resultou em calos de coloração verde na presença de

luz, especialmente na maior concentração (1,0 mg L⁻¹ de cada). Em condições de escuro, as colorações dos calos variaram de marrom na menor concentração (0,5 mg L⁻¹ de cada) a creme na maior concentração (1,0 mg L⁻¹ de cada) (Figura 10).

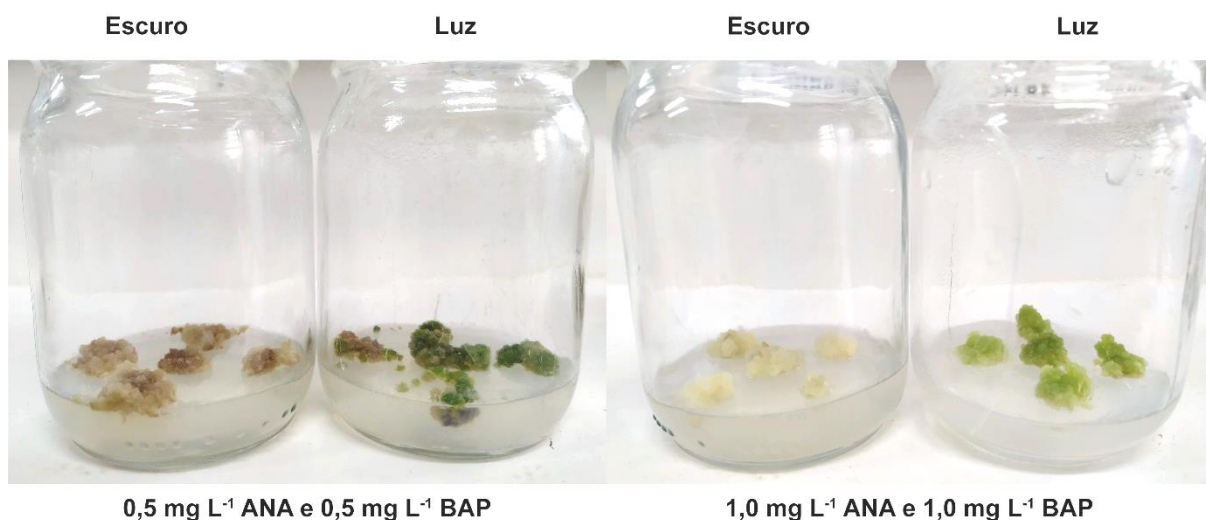


Figura 10 - Efeito de fitorreguladores e iluminação no desenvolvimento dos calos *in vitro* de *A. annua* após 28 dias de proliferação

Outro fato interessante observado nesse estudo foi que os calos provenientes do tratamento contendo 0,5 mg L⁻¹ de BAP e ANA resultaram em grande quantidade de calos com células mais densas com coloração marrom que não proliferaram nas fases seguintes, tornando-se ainda mais escuros e sem resposta de crescimento quando transferidos para novo meio de cultura. Diferentemente, o tratamento contendo 1,0 mg L⁻¹ de cada um dos fitorreguladores resultou em calos com manutenção da boa proliferação quando subcultivados no meio de cultura subsequente.

5.4. Diferentes faixas de comprimento de onda do espectro visível de luz na indução e proliferação dos calos *in vitro* de *Artemisia annua*

O efeito dos diferentes comprimentos de onda na produção e biomassa dos calos foi avaliado desde a fase de indução dos calos. A massa fresca e diâmetro dos calos atingiu valores máximos, sem incrementos posteriores e até diminuição da massa, entre 42 e 49 dias de cultivo, exceto para luz azul e vermelha, na qual o aumento de massa fresca dos calos ocorreu até os 56 dias de cultivo.

Aos 28 dias, período em que os calos foram utilizados para a fase de proliferação, a LED vermelha resultou nos maiores valores de massa (0,2293 g) e diâmetro (0,99 cm) e o escuro nos menores valores (0,0972 g e 0,60 cm) (Figura 11).

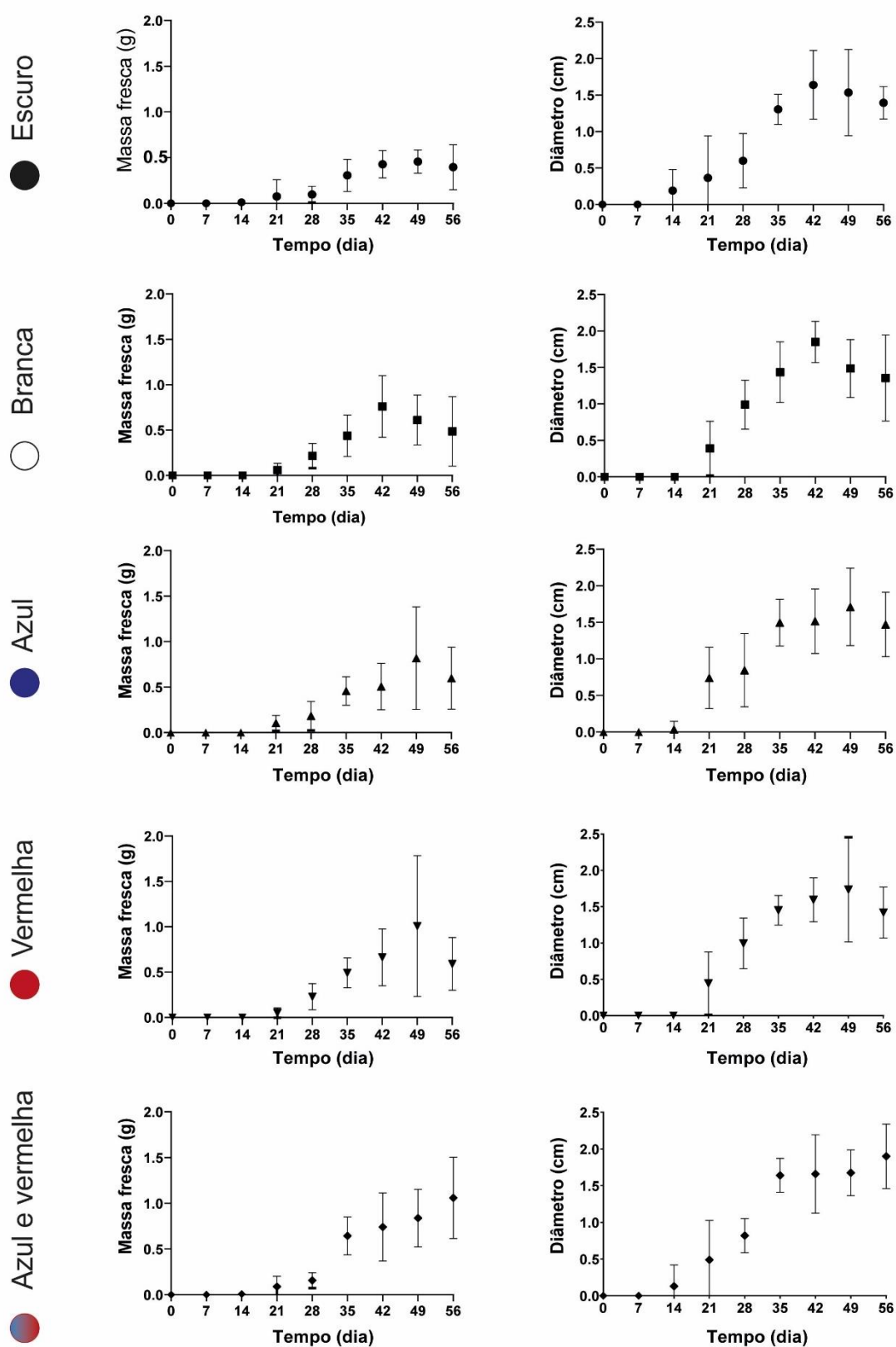


Figura 11 - Curvas de crescimento (massa fresca e diâmetro) dos calos *in vitro* de *A. annua* cultivados sob diferentes comprimentos de onda fornecidos por LEDs em meio de cultura MS + 1,0 L⁻¹ BAP + 1,0 mg L⁻¹ ANA.

Para o diâmetro e massa fresca dos calos na fase de proliferação, não houve diferença significativa entre os calos cultivados em presença de luz, seja lâmpada fria ou LEDs.

Em relação a massa fresca, a única iluminação que diferiu do escuro foi a LED vermelha, com a maior produção de biomassa nos calos de *A. annua*, resultando em aumento significativo da massa fresca dos calos (0,5924 g) em relação ao escuro (0,3265 g). Em relação ao diâmetro, o uso de LED vermelha (1,51 cm) e azul+vermelha (1,43 cm) resultaram em aumento significativo em relação ao escuro (1,11 cm) (Figura 12).

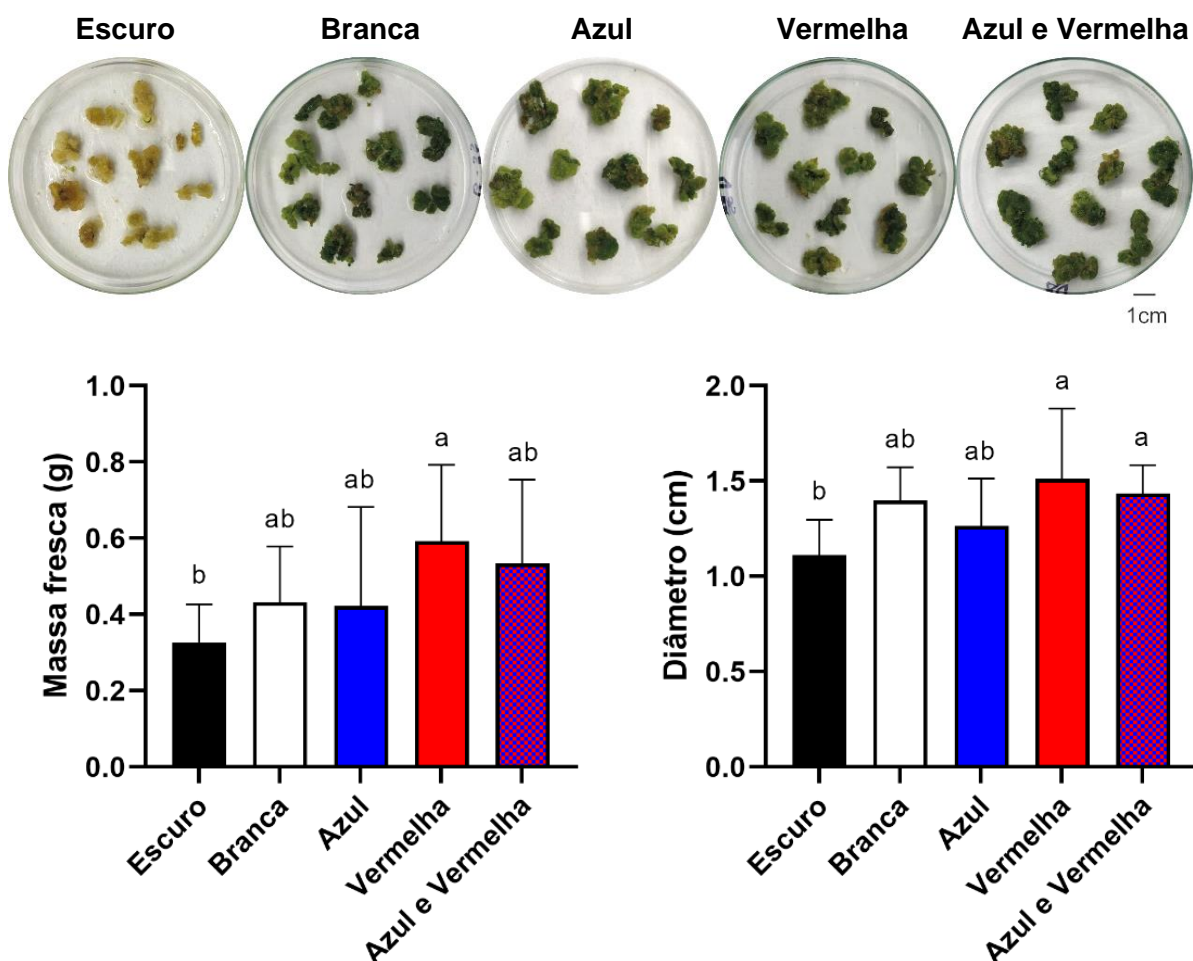


Figura 12 - Efeito de diferentes comprimentos de onda do espectro visível na proliferação dos calos *in vitro* de *A. annua* cultivados em meio de cultura MS + 1,0 L⁻¹ BAP + 1,0 mg L⁻¹ ANA. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nesse experimento, não houve diferença estatística entre a massa fresca dos calos proliferados no escuro e em luz branca. Por outro lado, no experimento anterior (item 5.3), quando foi avaliado a presença e ausência de luz na proliferação dos calos, a massa dos calos cultivados no escuro foi maior do que em luz branca.

Um dos motivos dessa divergência é o fato de que anteriormente os calos foram induzidos no escuro e parte deles proliferados em luz branca, o que pode ter causado morte das células nessa adaptação para a presença de luz, resultando em diminuição da massa fresca. Entretanto, no experimento atual, os calos foram induzidos nos diferentes comprimentos de onda em que foram proliferados, então possivelmente estavam mais condicionados durante a fase de proliferação.

5.5. Comparação do perfil de metabólitos secundários de diferentes tecidos de *Artemisia annua*

5.5.1. Diferentes faixas de comprimento de onda do espectro visível de luz na produção de metabólitos de calos *in vitro* de *Artemisia annua*

Sobre os efeitos dos diferentes comprimentos de onda utilizados para o cultivo dos calos, esses também tiveram influência no perfil de metabólitos secundários de metabólitos produzidos pelos calos de *A. annua*.

Os calos que produziram o maior número de moléculas foram aqueles cultivados na luz branca e na luz vermelha, totalizando 29 moléculas diferentes cada. Não foi observado nenhum metabólito exclusivo de calos cultivados na luz azul e vermelha ou no escuro (Figura 13).

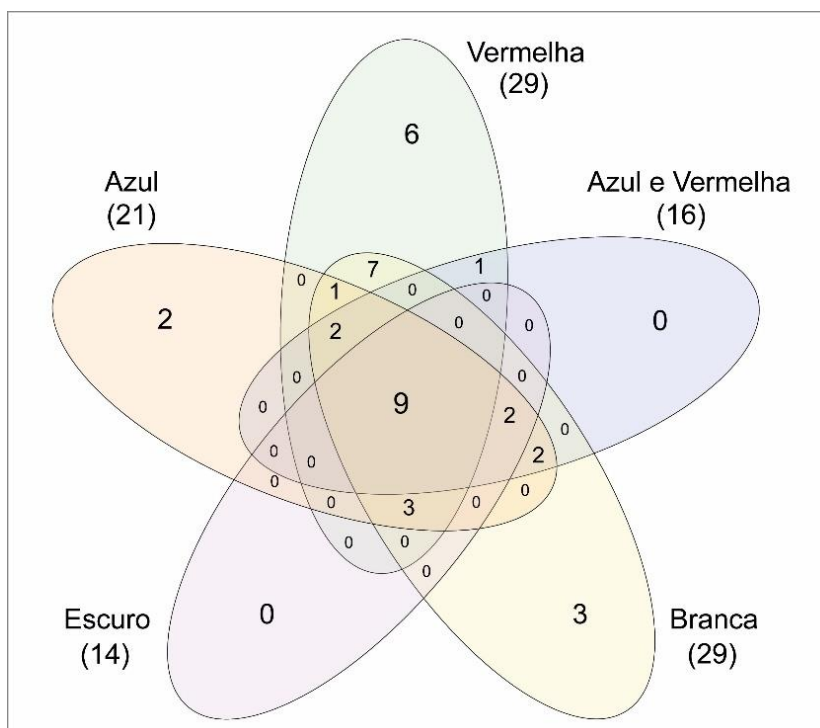


Figura 13 - Diagrama de Venn da quantidade de metabólitos reportados em calos *in vitro* de *A. annua* cultivados em diferentes comprimentos de ondas: azul, vermelha, azul e vermelha, branca e escuro.

O beta-pineno (média 20,66%), trans-cariofileno (média 14,43%), alfa-santaleno (média 13,83%), 4-metoxi benzaldeído (média 12,15%), acetato de mentila (média 9,44%), 1-hexanol (média 6,53%), hexanal (média 4,62%) foram os metabólitos identificados nos calos cultivados em todos os comprimentos de onda. O delta-3-careno (média 11,24%) e alfa-santaleno (média 13,83%) só não foi identificado em luz azul+vermelha

Enquanto o geraniol (15,41%) e o acetato de geranila (9,07%) somente não foram reportados em luz vermelha, o delta-cadineno (2,49%) e o para-cimeno (1,93%) foram identificados somente em calos cultivados nesse comprimento de onda.

Outro metabólito identificado exclusivamente em uma das iluminações foi o mentol (3,75%) e alfa-terpineol (1,90%) em luz branca. O eucaliptol (média 10,01%), allo aromadendreno (média 8,06%), beta-bisaboleno (média 2,46%), alfa-humuleno (média 2,42%) e 4-terpineol (média 2,12%) foram identificados em calos cultivados sob luz fria branca e LEDs vermelhas (Tabela 5).

Tabela 5 - Perfis de metabólitos secundários obtidos por SPME GC-MS com metabólitos observados em calos *in vitro* e cultivados em diferentes comprimentos de onda fornecidos por LEDs

t _R (min)	IR	Identificação	% Relativa				
			E	B	A	V	AV
3,12	800	hexanal	7,96	2,54	2,79	1,59	8,21
3,91	847	2-hexenal		4,81	3,84	1,13	8,77
3,95	850	3-hexenol		2,83	2,10	2,53	9,00
4,15	862	1-hexanol	3,50	3,16	1,60	2,90	21,49
8,26	1024	para-cimeno				1,93	
8,49	1031	eucaliptol		10,79		9,23	
12,73	1144	cânfora	40,52	60,44	5,63	46,15	
13,89	1173	mentol		3,75			
13,99	980	beta-pineno	23,15	22,00	18,29	31,18	8,70
14,08	1178	4-terpineol		1,95		2,28	
14,63	1191	alfa-terpineol		1,90			
17,26	1254	4-metoxi benzaldeído	10,03	7,84	30,13	4,27	8,46
17,33	1256	geraniol	13,96	7,03	26,57		14,07
18,98	1295	acetato de mentila	17,49	7,07	5,14	3,17	14,32
19,26	1011	delta-3-careno	9,60	13,18	6,95	15,24	
21,72	1454	alfa-humuleno		2,50		2,33	
22,01	1461	allo aromadendreno		4,57		3,54	
22,75	1385	acetato de geranila	9,12	7,46	11,32		8,38
24,05	1509	beta-bisaboleno		2,30		2,61	
24,13	1419	trans-cariofileno	19,25	15,48	16,82	11,31	9,29
24,17	1420	alfa-santaleno	19,96	9,88	12,92	6,06	20,34
24,55	1524	delta-cadineno				2,49	
56,51	-----	éster de ácido carboxílico	12,54	15,16	30,75	47,03	19,57

t_R: tempo de retenção. IR: índice de retenção.

Os diferentes comprimentos de onda utilizados nesse estudo também resultaram em diferentes perfis metabólicos nos calos de *A. annua*. Os estudos sobre o efeito da luz sobre os metabólitos produzidos em *A. annua* são direcionados para o aumento da concentração de artemisinina, principal componente de *A. annua* (Tabela 6).

Tabela 6 – Relatos na literatura sobre uso de diferentes iluminações para o cultivo de *Artemisia annua*

Material	Luz	Resultados	Referência
Casa de vegetação	Azul, vermelha, verde e branca	Sem diferenças	(ZHANG <i>et al.</i> , 2023)
Casa de vegetação	Branca, azul	↑artemisinina	(SANKHUAN <i>et al.</i> , 2022)
Plântulas <i>in vitro</i>	Azul e UV	↑artemisinina	(LOPES <i>et al.</i> , 2020; PANDEY; RAI 2014; RAI <i>et al.</i> , 2011)
Plântulas	Azul e vermelha	↑artemisinina	(ZHANG <i>et al.</i> , 2018)
Calos <i>in vitro</i>	Luz e escuro	↑artemisinina em luz	(MOHAMMAD <i>et al.</i> , 2014)

Utilizando o cultivo em casa de vegetação não foram observadas diferenças no perfil de metabólitos secundários de plantas cultivadas com luz azul, vermelha, verde e branca (ZHANG *et al.*, 2023). No entanto, a luz branca e a luz azul aumentaram as concentrações de artemisinina em plantas cultivadas em casa de vegetação (SANKHUAN *et al.*, 2022).

Além disso, a luz azul e UV influenciaram positivamente a biossíntese de artemisinina em plântulas *in vitro* (LOPES *et al.*, 2020; PANDEY; RAI 2014; RAI *et al.*, 2011). Em plântulas de *A. annua*, a LED azul e vermelha permitiu o incremento da concentração de artemisinina (ZHANG *et al.*, 2018) e em calos, houve maior produção de artemisinina quando cultivados na luz em relação ao escuro (MOHAMMAD *et al.*, 2014).

Em nosso trabalho, foi possível concluir que além das observações já realizadas com a artemisinina, o perfil de metabólitos secundários de *A. annua* também é alterado e responde especificamente aos diferentes comprimentos de onda fornecidos por LEDs.

5.5.2. Efeitos dos tipos de tecidos na produção de metabólitos em *Artemisia annua*

Os dados obtidos por meio da SPME-GC-MS resultaram no registro de 91 metabólitos em *Artemisia annua*. Foi observada a presença de moléculas de ocorrência geral, observada tanto na parte aérea das plantas cultivadas *in vitro* e em

casa de vegetação, bem como nos calos *in vitro* e grupos de moléculas específicas de cada parte analisada (Figura 14).

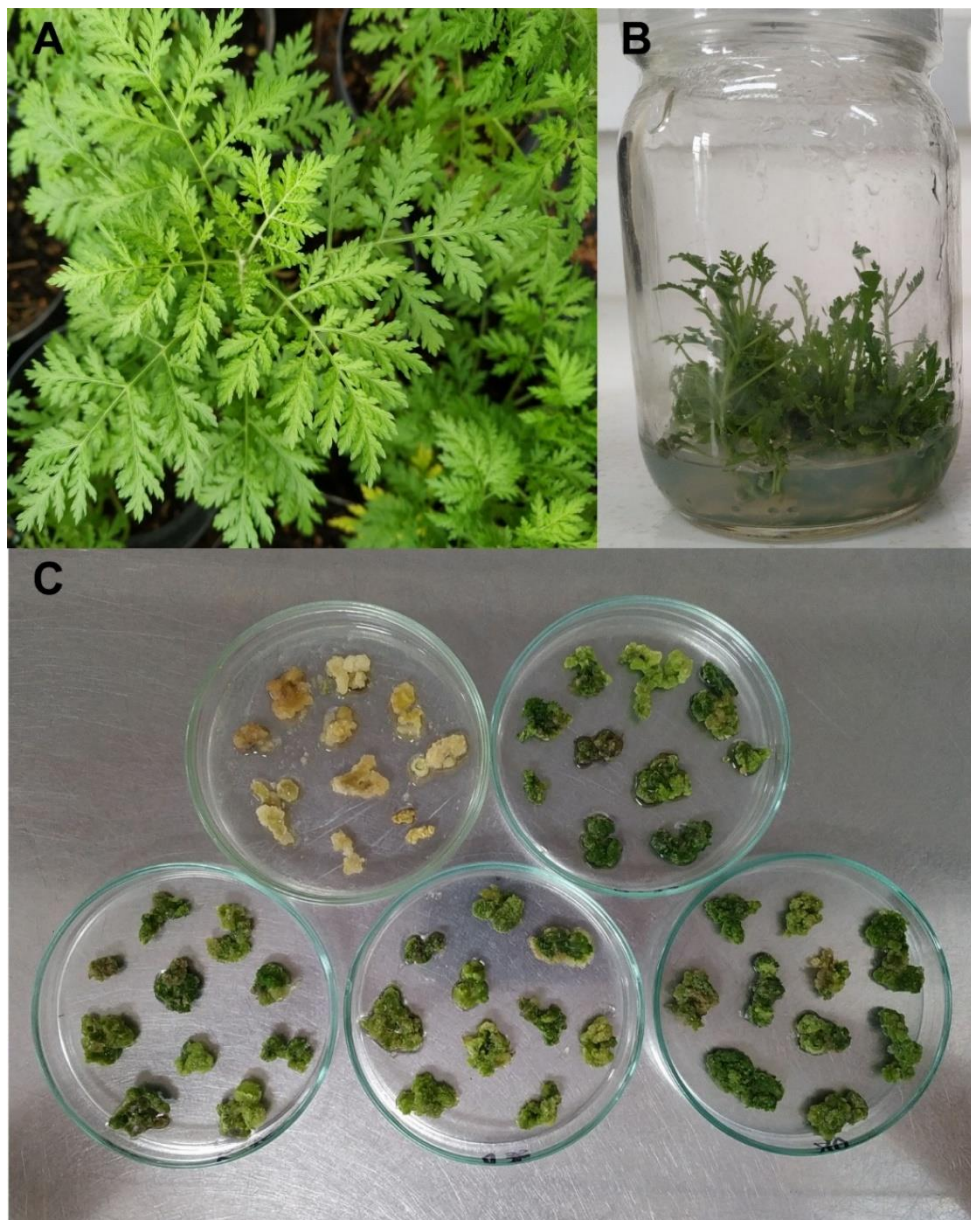


Figura 14 - Diferentes fontes de material de *A. annua* utilizados para identificação e comparação do perfil de metabólitos secundários por meio de SPME GC-MS. **A.** Plantas cultivadas em casa de vegetação com 90 dias de idade. **B.** Plântulas *in vitro* com 28 dias de cultivo. **C.** Calos *in vitro* cultivados em diferentes comprimentos de onda do espectro visível de luz com 28 dias de cultivo.

Do total, foram observadas 58 moléculas em plantas cultivadas em casa de vegetação (63,7%), 38 moléculas nos calos *in vitro* (41,8%) e 12 em plântulas *in vitro* (13,2%). Desse total, 45 metabólitos foram identificados somente na parte aérea de

plantas cultivadas em casa de vegetação (50,4%), 27 dos metabólitos somente em calos (29,7%) e cinco somente nas plântulas *in vitro* (5,5%) (Figura 15).

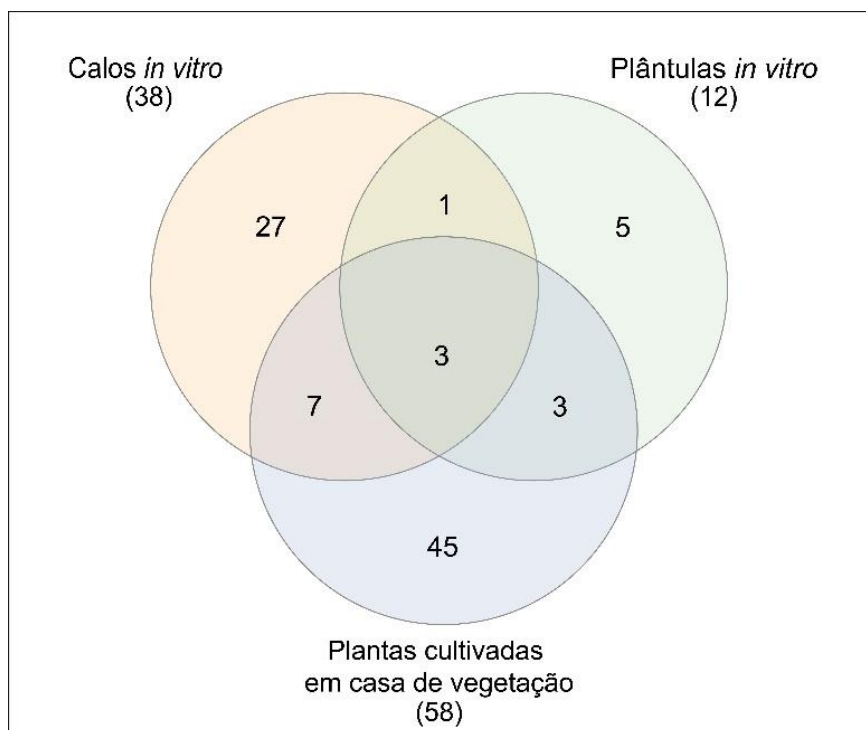


Figura 15 - Diagrama de Venn da quantidade de metabólitos registrados para três tecidos de *A. annua*: calos *in vitro*, plântulas *in vitro* e plantas cultivadas em condições de casa de vegetação.

Um dos principais metabólitos identificados em comum em todas as partes analisadas foi a cânfora, sendo a principal molécula encontrada nos calos provenientes do cultivo em luz branca (60,4%) e no escuro (40,5%) e a segunda principal (22%) nas plantas cultivadas em casa de vegetação, depois da cumarina (22,6%). Interessantemente, nas plântulas *in vitro* a cânfora representou menos de 10% da composição total. A cânfora somente não foi observada no tratamento com luz azul e vermelha combinadas. Mesmo assim foi o principal componente identificado nos calos (média 38,19%).

A cânfora é um monoterpeno já conhecido e reportado nos óleos essenciais de *A. annua*, possuindo propriedades antimicrobiana, antibacteriana, antiviral, anticancerígena, inseticida e repelente, sendo muito utilizado para formulações de perfumes e cosméticos (ABAD *et al.*, 2012; MALABADI *et al.*, 2021). Além da cânfora, o 3-hexenol e o éster de ácido carboxílico foram identificados em todos os tecidos de *A. annua* (Tabela 7).

Tabela 7 – Perfil de metabólitos secundários obtidos por SPME GC-MS de plantas cultivadas em casa de vegetação, plântulas *in vitro* e calos *in vitro* de *A. annua*

t_R (min)	IR	Identificação	% Relativa		
			Calos <i>in vitro</i>	Plântulas <i>n vitro</i>	Plantas cultivadas em casa de vegetação
3,12	800	hexanal	4,62	1,08	
3,91	847	2-hexenal	4,64		0,45
3,95	850	3-hexenol	4,11	0,77	0,35
4,15	862	1-hexanol	6,53		
6,80	977	1-octen-3-ol			0,44
13,99	980	beta-pineno	20,66		
19,26	1011	delta-3-careno	11,24		
8,26	1024	para-cimeno	1,93		
8,49	1031	eucaliptol			2,82
9,74	1066	hidrato de cis-sabineno			0,32
10,91	1099	linalol			0,40
11,94	1125	crisantenona			0,65
12,73	1144	cânfora	38,19	9,01	22,01
13,46	1162	pinocarvona			0,30
13,60	1166	borneol			1,14
13,89	1173	mentol	3,75		
14,08	1178	4-terpineol			0,57
14,63	1191	alfa-terpineol	1,90		0,91
15,82	1220	trans-carveol			0,56
16,30	1231	cis-carveol			0,32
16,83	1244	carvona			0,37
17,26	1254	4-metoxi benzaldeído	12,15		
17,33	1256	geraniol	15,41		
18,80	1290	timol			0,49
18,98	1295	acetato de mentila	9,44		
21,64	1358	eugenol			1,67
22,75	1385	acetato de geranila	9,07		
22,84	1387	2-metil butirato de benzila			0,53
24,13	1419	trans-cariofileno	14,43		0,44
24,17	1420	alfa-santaleno	13,83		
24,88	1437	cumarina			22,56
21,72	1454	alfa-humuleno	2,42		
25,71	1458	trans-beta-farneseno		37,94	2,54
22,01	1461	allo aromadendreno	4,06		
26,42	1475	beta-chamigreno			2,38
26,63	1481	germacreno D		4,52	2,00
26,73	1483	10s, 11s-himachala-3(12),4-dieno			0,62
26,83	1486	beta-selineno			0,65
24,05	1509	beta-bisaboleno	2,46		
24,55	1524	delta-cadineno	2,49		
31,11	1596	dietil ftalato		2,05	
32,51	1634	alfa-acorenol			1,08
33,28	1655	selin-11-en-4-alfa-ol			0,62
33,42	1659	7-epi-alfa-eudesmol		5,37	
33,90	1672	xantoxilina		17,33	
34,38	1685	alfa-bisabolol			4,11
36,47	1743	N-acetil-L-tirosinamida			0,60
56,51		éster de ácido carboxílico	25,01	8,67	3,52

tR: tempo de retenção. IR: índice de retenção.

Os resultados demonstram que o perfil de metabólitos secundários dos tecidos de *A. annua* analisados são diferentes entre si e que podem ser explorados em relação ao número, tipo e porcentagem relativa dos metabólitos produzidos nas diferentes condições de cultivo.

O trans-beta-farneseno foi o principal metabólito identificado nas plântulas *in vitro* (37,94%), porém foi identificado em porcentagem relativa menor nas plantas cultivadas em casa de vegetação (2,54%) e não reportado de ocorrência nos calos.

O trans-beta-farneseno é um sesquiterpeno que possui atividade antioxidante, atividade anticarcinogênica, antibacteriana, antifúngica e neuroprotetora (RUSSO; MARCU, 2017). Tem sido reportado em *Artemisia* (ABAD *et al.*, 2012; BILIA *et al.*, 2014; NIGAM *et al.*, 2019), porém em porcentagens relativas bem menores (até 8,2%) (BILIA *et al.*, 2014), similar ao reportado nas plantas cultivadas em casa de vegetação do atual experimento (2,5%). Isso mostra que as plântulas *in vitro* podem ser uma alternativa para obtenção desse metabólito.

Por outro lado, o trans-cariofileno não foi identificado nas plântulas *in vitro*, mas sim em plantas cultivadas em casa de vegetação (0,44%) e sendo o metabólito com maior porcentagem relativa nos calos *in vitro* (média de 14,4%), demonstrando toda a diversidade de respostas em diferentes tecidos cultivados.

Nesse sentido, os resultados demonstram que os diferentes tecidos de *A. annua* podem ser explorados em relação às moléculas produzidas e suas aplicações, pois apesar de estarem presentes nos tecidos vegetais *ex vitro*, foram reportadas em quantidades relativas diferentes dos tecidos *in vitro*.

Os diferentes tecidos de *A. annua* também apresentaram potencial na produção de moléculas exclusivas, ou seja, que só foram identificadas em um dos sistemas de cultivo. O 1-octen-3-ol, hidrato de cis sabineno, linalol, crisantenona, pinocarvona, borneol, 4-terpineol, alfa-terpineol, cis e trans-carveol, carvona, timol, eugenol, 2-metil butirato de benzila, cumarina, beta-chamigreno, beta-selineno, selin-11-em-4-alfa-o, alfa-bisabolol, N-acetil-L-tirosinamida, 10s, 11s-himachala-3(12),4-dieno e alfa-acorenol foram identificadas somente em plantas cultivadas em casa de vegetação, sendo que os três últimos não haviam sido reportados em *A. annua*.

Já a xantoxilina, o dietil ftalato e 7-epi-alfa-eudesmol foram identificadas somente em plântulas *in vitro* a partir dos resultados de SPME GC-MS do nosso estudo. A xantoxilina apresenta atividade contra bactérias encontradas no trato urinário e efeito antinociceptivo (CAMPOS-BUZZI *et al.*, 2006; FILHO *et al.*, 1995) e

apesar de já ter sido reportada em *A. annua* (BROWN, 1992; SEGNEANU *et al.*, 2021), a xantoxilina foi identificada somente nas plântulas *in vitro*.

Algumas moléculas que são comumente reportadas nos óleos essenciais de *A. annua*, não foram reportados de forma ampla (ABAD *et al.*, 2012; BORA; SHARMA, 2011). O eucaliptol, por exemplo, não foi identificado nas plântulas *in vitro*, bem como cumarina e eugenol somente foram identificados nas plantas de casa de vegetação.

5.5.3. Calos *in vitro* como alternativa na produção de metabólitos secundários

Foi possível observar que calos *in vitro* de *A. annua* tiveram a produção de metabólitos que não foram identificados nas plantas cultivadas em casa de vegetação nem nas plântulas *in vitro*. Isso demonstra um perfil de metabólitos secundários e rotas metabólicas específicas dos calos e diferente de tecidos diferenciados.

Do total de moléculas identificadas, 29,7% foram exclusivas dos calos *in vitro*. As moléculas identificadas foram: beta-pineno, geraniol, alfa-santaleno, 4-metoxi benzaldeído, delta-3-careno, acetato de mentila, acetato de geranila, allo aromadendreno, mentol, delta-cadineno, beta-bisaboleno, alfa-humuleno e paracimeno.

Apesar de haver relatos de moléculas de interesse que só são produzidas em tecidos vegetais especializados como no caso das *hairy roots* ou em glândulas (GONÇALVES; ROMANO, 2018), nosso trabalho demonstrou que tecidos desdiferenciados, como os calos, são capazes de biossintetizar moléculas específicas diferentes das encontradas em tecidos diferenciados, como as plantas inteiras.

A presença de moléculas em calos que não são identificadas nas plantas também foi observada em calos *in vitro* de *Phyllanthus amarus* (OLIVEIRA; SARTORATTO; CARDOSO, 2020), em cultura de suspensão de células de *Nicotiana tabacum* (NCUBE *et al.*, 2014), *Rosa damascena*, ambas analisadas por GC-MS.

Em cultivos específicos como de suspensão de células em meio líquido utilizando biorreatores, a diferença no perfil de metabólitos produzidos tem sido associada a outros fatores que não a origem da célula, como os estresses da agitação e aeração geradas nos biorreatores (PAVLOV *et al.*, 2005).

Mais recentemente, o nível de diferenciação dos tecidos junto a fatores ambientais do cultivo tem sido apontado como a principal origem dessas diferenças no perfil de metabólitos secundários comparando-se os calos à parte aérea de

plântulas *in vitro* e aquelas cultivadas em casa de vegetação (NCUBE *et al.*, 2017; OLIVEIRA; SARTORATTO; CARDOSO, 2020).

Dessa forma, o estudo atual com *A. annua* demonstrou que em condições similares de cultivo (cultivo *in vitro*) e utilizando o mesmo genótipo, foram notados perfis de metabólitos secundários diferentes entre calos e plântulas cultivadas *in vitro*.

De forma interessante, e por apresentarem nível de diferenciação menor que as partes aéreas das plantas, foi possível observar a presença de uma molécula específica nos calos, o para-cimeno, que é considerado um precursor do timol, esse último identificado com baixa porcentagem relativa e somente nas plantas cultivadas em casa de vegetação.

Também foi possível notar rotas bioquímicas específicas dos calos, servindo de exemplo a identificação das moléculas geraniol e mentol, que são precursoras dos metabólitos acetato de geranila e de mentila, reportadas somente nos calos de *A. annua*. Também, a molécula alfa-santaleno é o precursor do alfa-santalol, embora esse último não tenha sido observado em nenhuma das amostras analisadas.

5.5.4. Calos *in vitro* de *A. annua* como fonte de metabólitos não reportados na espécie e no gênero

Algumas dessas moléculas identificadas somente nos calos em nosso estudo já haviam sido reportadas na espécie ou no gênero *Artemisia* anteriormente, como no caso do mentol, delta-cadineno, beta-pineno, beta-bisaboleno, delta-3-careno, geraniol, alfa-humuleno e allo aromadendreno.

No entanto, os calos de *A. annua* também possibilitaram a biossíntese de metabólitos ainda não reportados na espécie *A. annua*: o acetato de mentila, o acetato de geranila, o 4-metoxi benzaldeído e o alfa-santaleno (Tabela 8).

Tabela 8 - Moléculas identificadas por SPME GC-MS somente nos calos *in vitro* reportadas na literatura

Identificação	<i>A. annua</i>	<i>Artemisia</i>	Referência
para-cimeno			(BILIA <i>et al.</i> , 2008)
mentol			(BORA; SHARMA, 2011; NIGAM <i>et al.</i> , 2019; BHAKUNI <i>et al.</i> , 2001; SEGNEANU <i>et al.</i> , 2021)
beta-pineno			(BORA; SHARMA, 2011) (NIGAM <i>et al.</i> , 2019).
delta-cadineno			(MARINAS <i>et al.</i> , 2015; MOHAMMADREZA, 2008)
beta-bisaboleno			(NIGAM <i>et al.</i> , 2019)
geraniol			(SEGNEANU <i>et al.</i> , 2021)
delta-3-careno			(MOHAMMADREZA <i>et al.</i> , 2008; NIGAM <i>et al.</i> , 2019)
alfa-humuleno			(MARINAS <i>et al.</i> , 2015)
allo aromadendreno			(BROWN, 2010; CHARLES <i>et al.</i> , 1991)
acetato de mentila	x		(MASOUDI; RUSTAIYAN; VAHEDI, 2012)
acetato de geranila	x		(NIGAM <i>et al.</i> , 2019; ABAD <i>et al.</i> , 2012)
4-metoxi benzaldeído	x	x	
alfa-santaleno	x	x	

x: não reportado na literatura

O acetato de mentila é um monoterpene encontrado nos óleos essenciais do gênero *Mentha*, possuindo propriedades antimicrobianas, sendo utilizado para formulações de produtos de limpeza e cosméticos (KRIN *et al.*, 2022). Para *Artemisia*, foi identificado como um dos principais componentes do óleo de *A. chamaemelifolia* (MASOUDI; RUSTAIYAN; VAHEDI, 2012).

O acetato de geranila é um monoterpene formado a partir do geraniol, sendo utilizado na produção de cosméticos devido ao seu aroma agradável. Além disso, foi reportada sua atividade antinociceptiva, apresentando propriedades farmacológicas relacionadas a processos inflamatórios e dor, possibilitando seu uso para métodos terapêuticos (QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2022). No gênero *Artemisia*, já foi reportado em *A. pallens*, *A. sieberi*, *A. scoparia* (NIGAM *et al.*, 2019), *A. sieversiana*, *A. aucheri* (ABAD *et al.*, 2012).

Apesar de serem reportadas pela primeira vez em *A. annua*, o acetato de mentila e acetato de geranila já foram identificadas em outras espécies do gênero *Artemisia*. Por outro lado, o 4-metoxi benzaldeído e o alfa-santaleno, ambos presentes nos calos cultivados em todas as iluminações, foram reportados pela primeira vez no gênero *Artemisia*.

O 4-metoxi benzaldeído ou p-anisalaldeído é um dos principais componentes do óleo essencial das sementes de *Pimpinella anisum*, conhecida como erva-doce ou anis, apresentando atividades antimicrobianas (LIN *et al.*, 2021), sendo muito utilizado para formulações de farmacêuticos e cosméticos devido ao seu aroma doce (SUN *et al.*, 2019).

O alfa-santaleno, identificado somente nos calos de *A. annua*, é um sesquiterpeno precursor do alfa-santalol, que é o principal componente do óleo essencial do gênero *Santalum*. Por possuir propriedades antibacteriana, antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória e calmante tem sido utilizado na indústria farmacêutica e cosmética, que devido ao baixo rendimento do óleo essencial, e incremento na exploração das árvores com a crescente demanda, tem se obtido como alternativas para obtenção desse metabólito a produção desse composto utilizando estirpes engenheiradas de *Escherichia coli* (ZHANG *et al.*, 2022). Nesse contexto, os calos de *A. annua* poderiam ser uma alternativa para a produção de alfa-santaleno, pois esses representaram em média 20,34% da quantidade relativa produzida em calos cultivados sob LEDs azul+vermelha e 19,96% no escuro.

Os resultados obtidos com *A. annua* também confirmam os resultados obtidos com a planta medicinal *Phyllanthus amarus*, em que moléculas que ainda não haviam sido identificadas na espécie ou no gênero, foram reportadas pela primeira vez e em altas porcentagens relativas nos calos dessa espécie (OLIVEIRA; SARTORATTO; CARDOSO, 2020).

Isso demonstra a plasticidade dos calos *in vitro*, seja pelo seu estado não diferenciado que resulta na produção de moléculas encontradas em espécies correlatas ao gênero, mas não somente isso, a capacidade dos calos em produzirem um perfil molecular distinto e de moléculas ainda não reportadas no gênero.

Dessa forma, e considerando que um dos principais desafios da produção *in vitro* de metabólitos secundários são os altos custos relacionados a técnica, quando comparado com a produção convencional de plantas no campo (CARDOSO; OLIVEIRA; CARDOSO, 2019), a calogênese em *A. annua*, bem como outras espécies de plantas medicinais, pode viabilizar produção *in vitro* visando a descoberta e biossíntese de moléculas diferentes das que são encontradas nos tecidos das plantas cultivadas convencionalmente, bem como na produção de moléculas raras.

5.6. Variabilidade entre as amostras dos diferentes tecidos de *Artemisia annua*

Analisando os resultados dentro de cada sistema de cultivo de *A. annua*, através da montagem de Diagramas de Venn, foi possível notar uma variabilidade dentro das amostras em relação às quantidades e tipos de metabólitos que foram identificados.

46,6% dos metabólitos das plantas cultivadas em casa de vegetação foram identificados nas três repetições (Figura 16A) e 58,8% dos metabólitos das plântulas *in vitro* foram identificados nas três repetições (Figura 16B). Para os calos, houve maior variação das repetições, apenas 11,8% dos dados foram convergentes entre as três amostras (Figura 16C).

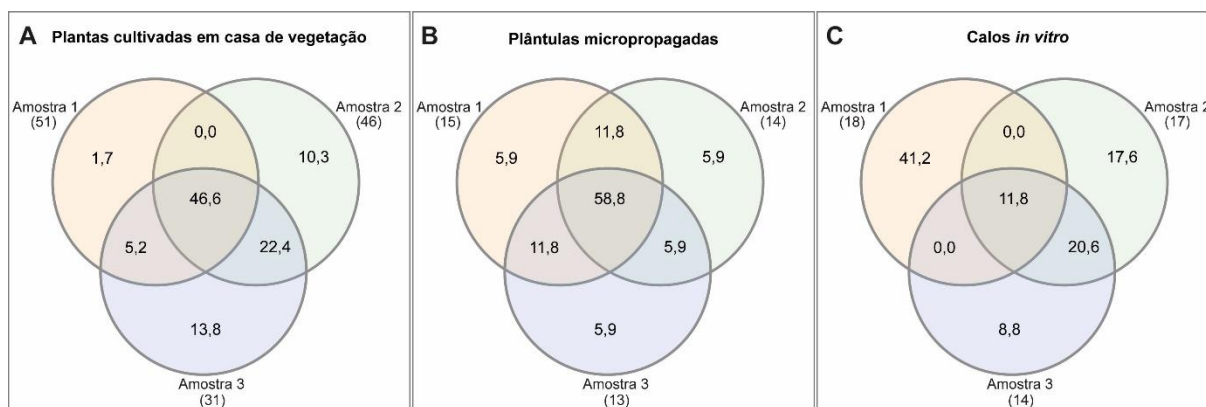


Figura 16 - Diagrama de Venn da quantidade de metabólitos registrados para as repetições dos diferentes tecidos de *A. annua*. **A.** Relação entre as amostras de plantas cultivadas em casa de vegetação. **B.** Relação entre as amostras de plântulas micropropagadas. **C.** Relação entre as amostras de calos *in vitro*.

Esses dados demonstram como as plântulas *in vitro* são mais uniformes que as plantas cultivadas em casa de vegetação e que os calos, por crescerem de forma desdiferenciada e desorganizada podem apresentar maior variação no seu perfil de metabólitos secundários. Dos metabólitos presentes nos calos cultivados no escuro, apenas 14,3% foram convergentes entre as amostras, na luz branca, apenas 6,9%; na luz azul e vermelha, 5,9%; na luz azul, 5,0% e na luz vermelha apenas 3,7% dos dados.

6. CONCLUSÕES

Foi possível estabelecer um protocolo de indução e proliferação para o cultivo *in vitro* de calos de *A. annua* visando a produção de metabólitos secundários, determinando as melhores concentrações dos fitorreguladores BAP e ANA (1,0 mg L⁻¹ de BAP e 1,0 mg L⁻¹ de ANA).

Os calos são capazes de produzir perfil de moléculas diferentes quando submetidos a diferentes espectros luminosos, sendo que a luz vermelha e a luz branca resultaram em maior diversidade de metabólitos produzidos.

Os diferentes tecidos de *A. annua* tem efeito no perfil de metabólitos secundários, sendo que nos calos foram identificadas moléculas diferentes das encontradas nas plântulas *in vitro* e nas plantas cultivadas em casa de vegetação. Além disso, quatro moléculas foram reportadas pela primeira vez em *A. annua*: acetato de geranila, acetato de mentila, alfa-santaleno e 4-metoxibenzaldeído, sendo as duas últimas reportadas pela primeira vez no gênero *Artemisia*.

Esses resultados demonstram que a calogênese *in vitro* de *A. annua* pode ser uma alternativa eficiente na produção de metabólitos secundários de interesse, além da artemisinina e ainda, diferente dos metabólitos encontrados nos tecidos diferenciados das plântulas *in vitro* e de plantas cultivadas em casa de vegetação.

7. LITERATURA CITADA

- ABAD, M. J. *et al.* The *Artemisia* L. genus: A review of bioactive essential oils. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 2542–2566, 2012.
- ALEJOS-GONZALEZ, F. *et al.* Efficient somatic embryogenesis and organogenesis of self-pollination *Artemisia annua* progeny and artemisinin formation in regenerated plants. **American Journal of Plant Sciences**, v. 04, n. 11, p. 2206–2217, 2013.
- ATANASOV, A. G. *et al.* Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.
- BHAKUNI, R. S. *et al.* Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. **Current Science**, v. 80, n.1, p. 35–48, 2001.
- BILIA, A.R. *et al.* Essential oil of *Artemisia annua* L.: an extraordinary component with numerous antimicrobial properties. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, p.1–7, 2014.
- BORA, K. S.; SHARMA, A. The genus *Artemisia*: A comprehensive review. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 1, p. 101–109, 2011.
- BROWN, G. D. Two new compounds from *Artemisia annua*. **Journal of Natural Products**, v. 5, n. 12, p. 1756-1760, 1992
- BROWN, G. D. Secondary metabolism in tissue culture of *Artemisia annua*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 7, p. 975–977, 1994.
- BROWN, G. D. The biosynthesis of artemisinin (Qinghaosu) and the phytochemistry of *Artemisia annua* L. (Qinghao). **Molecules**, v.15, n. 11, p. 7603-7698, 2010.
- CAMPOS-BUZZI, F. Antinociceptive effects of synthetic chalcones obtained from xanthoxylone. **Archiv der Pharmazie - Chemistry in Life Sciences**, v. 339, p. 361-365, 2006.
- CARDOSO, J. C.; OLIVEIRA, M. E. B. S.; CARDOSO, F. DE C. I. Advances and challenges on the *in vitro* production of secondary metabolites from medicinal plants. **Horticultura Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 124–132, 2019.
- CARDOSO, J. C.; SHENG GERALD, L. T.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A. Micropropagation in the Twenty-First century. **Methods in Molecular Biology**, v. 1815, p. 17–46, 2018.
- CHARLES, D. J.; CEBERT, E.; SIMON, J. E. Characterization of the essential oil of *Artemisia annua* L. **Journal of Essential Oil Research**, v. 3, n. 1, p. 33-39, 1991.

- COWMAN, A. F. *et al.* Malaria: Biology and Disease. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 610–624, 2016.
- DANGASH, A. *et al.* *In vitro* selection and hormonal regulation in cell culture of *Artemisia annua* L. plant. **JSM Cell Dev Biol & Developmental Biology**, v. 3, p. 1–7, 2015.
- DUKE, M. V. *et al.* Localization of artemisinin and artemisitene in foliar tissues of glanded and glandless biotypes of *Artemisia annua* L. **International Journal of Plant Sciences**, v. 155, p. 365–373, 1994.
- FAPESP. Revista Pesquisa Fapesp: **A terapia da artemísia**. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/a-terapia-da-Artemisia/>. Acesso em 30 mai. 2022.
- FERREIRA, J. F. S. *et al.* Cultivation and genetics of *Artemisia annua* L. for increased production of the antimalarial artemisinin. **Plant Genetic Resources**, v. 3, n. 2, p. 206–229, 2005.
- FILHO, V. *et al.* Antispasmodic activity of xanthoxyline derivatives: Structure–activity relationships. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 84, n. 4, p. 473-475, 1995.
- GHASSEMI, B.; NAYERI, F. D.; HOSSEINI, R. The impact of carbon source, explants and growth regulators on callogenesis and organogenesis of *Artemisia annua*. **Notulae Scientia Biologicae**, v. 7, n. 4, p. 475–485, 2015.
- GONÇALVES, S.; ROMANO, A. Production of plant secondary metabolites by using biotechnological tools. In: VIJAYAKUMAR, R. **Secondary Metabolites - Sources and Applications**. Intech, 2018. p. 81-99.
- GUO, Z. Artemisinin anti-malarial drugs in China. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 6, n. 2, p. 115–124, 2016.
- GUPTA, M.; VAGHELA, J. Recent advances in pharmacological and phytochemistry studies on *Phyllanthus amarus*. **Pharmaceutical and Biosciences Journal**, v. 7, n. 1, p. 01, 2019.
- HAILU, T.; ABERA, B.; MARIAM, E. G. *In vitro* mass propagation of *Artemisia* (*Artemisia annua* L.) cv: Anamed. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 165–176, 2013.
- HEBERLE, H. *et al.* *InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams*. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 169, p. 1-7, 2015.
- HO, W. *et al.* Artemisinins: Pharmacological actions beyond anti-malarial. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 142, n. 1, p. 126-139, 2014

- HSU, E. The history of qing hao in the Chinese materia medica. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 6, p. 505–508, 2006.
- HUSSEIN, M. I. H. *et al.* Malaria and COVID-19: unmasking their ties. **Malaria Journal**, v. 19, n. 457, p. 1-10, 2020.
- JAMALEDDINE Z. *et al.* *In vitro* growth response of *Artemisia annua* seeds to different concentrations of plant growth regulators. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 77, p. 17841-17844, 2011.
- JANZANTTI N. S. *et al.* Influence of the cultivation system in the aroma of the volatile compounds and total antioxidant activity of passion fruit. **LWT - Food Sci. Technol.**, v. 48, n. 2, p. 511-518, 2012.
- KAMATOU, G. P. P. *et al.* Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties. **Phytochemistry**, v. 96, p. 15-25, 2013.
- KAYSER, O. Ethnobotany and medicinal plant biotechnology: from tradition to modern aspects of drug development. **Planta Medica**, v.84, p.834-838, 2018.
- KENG, C. *et al.* Production of artemisinin from cell suspension culture of *Artemisia annua* L. **Asia-Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.**, v. 18, n. 1, p. 137-139, 2010.
- KESHVARI, T. *et al.* Callus induction and somatic embryogenesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni as a medicinal plant. **Cellular and Molecular Biology**, v. 64, n. 2, p. 46, 2018.
- KHAN, S.; AL-QURAINY, F.; NADEEM, M. Biotechnological approaches for conservation and improvement of rare and endangered plants of Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 1, p. 1-11, 2012.
- KIM, W. *et al.* Anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial effects of artemisinin extracts from *Artemisia annua* L. **Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 19, n. 1, p. 21-27, 2015.
- KOLESAR, J. M.; SEEBERGER, P. H. Editorial: Anticancer potential of *Artemisia annua*. **Frontiers in Oncology**. v.12, 2022.
- KRIN, A. *et al.* Menthyl acetate. A new link in the chain of acetates studied with rotational spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 1252, p. 1-9, 2022.
- LANG, S. J. *et al.* Antitumor activity of an *Artemisia annua* herbal preparation and identification of active ingredients. **Phytomedicine**, v. 62, 2019.
- LI, S. *et al.* Pharmaceutical crops: an overview. **Pharmaceutical Crops**, v. 1, n. 1, p. 1–17, 2010.

- LIN, Y. *et al.* The p-anisaldehyde/ β -cyclodextrin inclusion complexes as fumigation agent for control of postharvest decay and quality of strawberry. **Food Control**, v. 130, p. 1-8, 2021
- LOPES, E. M. *et al.* *Artemisia annua* L. and photoresponse: from artemisinin accumulation, volatile profile and anatomical modifications to gene expression. **Plant Cell Reports**, v. 39, p. 101-107, 2020.
- LUALON, W. *et al.* Artemisinin production by shoot regeneration of *Artemisia annua* L. using thidiazuron. **Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 63, n. 1–2, p. 96–100, 2008.
- LUBBE, A. *et al.* Ethnopharmacology in overdrive: The remarkable anti-HIV activity of *Artemisia annua*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p.854-859, 2012
- MA, Y. N. *et al.* Monitoring antifungal agents of *Artemisia annua* against *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani*, associated with *Panax notoginseng* root-rot disease. **Molecules**, v. 24, n. 213, p. 1-14, 2019.
- MAGALHÃES, P. M. DE *et al.* New hybrid lines of the antimalarial species *Artemisia annua* L. **Acta Horticulturae**, v. 502, p. 377–381, 1999.
- MAGALHÃES, P. M. DE *et al.* Anti-inflammatory effect and modulation of cytochrome P450 activities by *Artemisia annua* tea infusions in human intestinal Caco-2 cells. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p.864-871, 2012
- MALABADI, R. B. *et al.* Camphor tree, *Cinnamomum camphora* (L.); Ethnobotany and pharmacological updates. **Biomedicine**, v. 41, n. 2, p. 181-184, 2021
- MARINAS, I. C. *et al.* Chemical composition and antipathogenic activity of *Artemisia annua* essential oil from Romania. **Chemistry and Biodiversity**, v. 12, n. 10, p. 1554-1564, 2015.
- MASOUDI, S.; RUSTAIYAN, A.; VAHEDI, M. Volatile oil constituents of different parts of *Artemisia chamaemelifolia* and the composition and antibacterial activity of the aerial parts of *A. turcomanica* from Iran. **Natural Product Communications**, v. 7, n. 11, p. 1519-1522, 2012.
- MESA, L. E. *et al.* *Artemisia annua* L., potential source of molecules with pharmacological activity in human diseases. **American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics**, v. 3, n. 5, p.436-450, 2015.
- MOHAMMAD, A. *et al.* Impact of plant growth regulators (PGRs) on callogenesis and artemisinin content in *Artemisia annua* L. plants. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 26–33, 2014.

- MOHAMMADREZA V. Essential oil composition of *Artemisia annua* L. of different growth stages growing in Iran. **Z. Naturforsch., C, J. Biosci.**, v. 63, n. 11, p. 785-788, 2008.
- MORAES, R. M.; CERDEIRA, A. L.; LOURENÇO, M. V. Using micropropagation to develop medicinal plants into crops. **Molecules**, v. 26, n. 6, 2021.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473 – 497, 1962.
- MURTHY, H. N.; LEE, E. J.; PAEK, K. Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: Strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p. 1–16, 2014.
- MURUGESAN, S. *et al.* Identification of insecticidal properties in common weed - *Lantana camara* Linn by Gas Chromatography and Mass Spectrum (GC-MS-MS). **Advances in Applied Science Research**, v. 3, n. 5, p. 2754-2759, 2012
- NAIK, P. M.; AL-KHAYRI, J. M. Abiotic and biotic elicitors–role in secondary metabolites production through *in vitro* culture of medicinal plants. In: **Abiotic and biotic stress in plants - recent advances and future perspectives**. InTech, 2016.
- NCUBE, E. N. *et al.* Analyses of chlorogenic acids and related cinnamic acid derivatives from *Nicotiana tabacum* tissues with the aid of UPLC-QTOF-MS/MS based on the in-source collision-induced dissociation method. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2014.
- NCUBE, E. N. *et al.* Metabolite profiling of the undifferentiated cultured cells and differentiated leaf tissues of *Centella asiatica*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 129, n. 3, p. 431-443, 2017.
- NIE, C. *et al.* *In vitro* efficacy of *Artemisia* extracts against SARS-CoV-2. **Virology Journal**, v.18, n.182, p.1-7, 2021.
- NIGAM, M. *et al.* Bioactive compounds and health benefits of *Artemisia* species. **Natural Product Communications**, v. 14, n. 7, 2019.
- OLIVEIRA, M. E. B. S. DE; SARTORATTO, A.; CARDOSO, J. C. *In vitro* calli production resulted in different profiles of plant-derived medicinal compounds in *Phyllanthus amarus*. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 1–15, 2020.
- PANDEY, N.; PANDEY-RAI, S. Short term UV-B radiation-mediated transcriptional responses and altered secondary metabolism of *in vitro* propagated plantlets of

Artemisia annua L., **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 116, p. 371-385, 2014.

PAVLOV, A. *et al.* Volatile and polar compounds in *Rosa damascena* Mill 1803 cell suspension. **Journal of Biotechnology**, v. 118, n. 1, p. 89-97, 2005.

RAI, R. P. *et al.* UV-B and UV-C pre-treatments induce physiological changes and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L.-an antimalarial plant, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 105, p. 216-225, 2011.

QUINTANS-JÚNIOR, L. *et al.* Antinociceptive activity and redox profile of the monoterpenes (+)-camphene, p -cymene, and geranyl acetate in experimental models. **ISRN Toxicology**, v. 2013, p.1-11, 2013.

REALE, S. *et al.* Volatile fingerprints of artemisinin-rich *Artemisia annua* cultivars by headspace solid-phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.25, n.17, p. 2511-2516, 2011.

RSTUDIO TEAM. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA. Disponível em: <http://www.rstudio.com/>. 2022.

RUSSO, E. B.; MARCU, J. Cannabis pharmacology: The usual suspects and a few promising leads. In: KENDALL, D.; ALEXANDER, S. P. H. **Advances in Pharmacology**, Academic Press, 2017, p. 67-134.

SALMERÓN-MANZANO, E.; MANZANO-AGUGLIARO, F. Worldwide Research on low cost technologies through bibliometric analysis. **Inventions**, v. 5, n. 9, p.1–22, 2020.

SANKHUAN, D. *et al.* Variation in terpenoids in leaves of *Artemisia annua* grown under different LED spectra resulting in diverse antimalarial activities against *Plasmodium falciparum*. **BMC Plant Biology**, v. 22, n. 1, p. 1-13, 2022

SEGNEANU, A. E. *et al.* *Artemisia annua* growing wild in Romania: a metabolite profile approach to target a drug delivery system based on magnetite nanoparticles. **Plants**, v. 10, n. 11, p. 1-23, 2021.

SUN, W. Anise (*Pimpinella anisum* L.), a dominant spice and traditional medicinal herb for both food and medicinal purposes. **Cogent Biology**, v. 5, n. 1, p. 1-26, 2019.

TAHIR, S. *et al.* Effect of varying concentrations of auxin (2,4-d) on *in vitro* callus initiation using leaf of *Artemisia annua* (L). **Science World Journal**, v. 10, n. 1, p. 17–19, 2015.

TALAPKO, J. *et al.* Malaria: The past and the present. **Microorganisms**, v. 7, n. 6, 2019.

- TARIQ, U.; ALI, M.; ABASI, B. H. Morphogenic and biochemical variations under different spectral lights in callus cultures of *Artemisia absinthium* L. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 130, p. 264-271, 2014.
- WANG, X. *et al.* Genetic and bioprocess engineering for the selective and high-level production of geranyl acetate in *Escherichia coli*. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 10, n. 9, p. 2881-2889, 2022.
- WETZSTEIN, H. Y. *et al.* Selection and clonal propagation of high artemisinin genotypes of *Artemisia annua*. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1–11, 2018.
- WHO - World Health Organization. **Tracking universal health coverage: 2017 global monitoring report**, Tokyo, 2017.
- WHO - World Health Organization. **World malaria report 2018**, Geneva, 2018.
- WHO - World Health Organization. **World malaria report 2020**, Geneva, 2020.
- WILLCOX, M. *Artemisia* species: From traditional medicines to modern antimalarials - And back again. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 15, n. 2, p. 101–109, 2009.
- XIONG, X. *et al.* Efficacy and safety of Chinese herbal medicine for patients with postmenopausal hypertension: A systematic review and meta-analysis. **Pharmacological Research**, v. 141, p. 481–500, 2019.
- YULIANI, F. *et al.* The study of artemisinin content in callus *Artemisia annua* L. cultures elicited with endophytic fungi *Aspergillus* sp. **Molekul**, v. 13, n. 2, p. 155-161, 2018.
- ZAYOVA, E. G. *et al.* Efficient protocol for mass micropropagation of *Artemisia annua* L. **GSC Biological and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 059–068, 2018.
- ZAYOVA, E. *et al.* Tissue culture applications of *Artemisia annua* L. callus for indirect organogenesis and production phytochemical. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 97–106, 2020.
- ZHANG D. *et al.* Red and blue light promote the accumulation of artemisinin in *Artemisia annua* L. **Molecules**, v. 23, n. 6, p. 1-17, 2018.
- ZHANG, J. *et al.* Sesquiterpene synthase engineering and targeted engineering of α -santalene overproduction in *Escherichia coli*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 17, p. 5377-5385, 2022.
- ZHANG, N. *et al.* Towards greenhouse cultivation of *Artemisia annua*: The application of LEDs in regulating plant growth and secondary metabolism. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 1-12, 2023.