

## 13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

### BIOLOGIA

#### CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E ANÁLISES DE VOLÁTEIS DE *A. ANNUA* IN VITRO CULTIVADA SOB DIFERENTES QUALIDADES DE LUZ

<sup>1</sup> Ellen Lopes (IC/UNIRIO); <sup>2</sup> Nattacha Moreira; <sup>3</sup> Humberto Bizzo (coorientador); <sup>2</sup> Eliana Tavares (coorientadora); <sup>1</sup> Andrea Macedo (orientadora)

1- Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

2- Departamento de Botânica, Centro de Ciências e da Saúde, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3- Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

Apoio financeiro: UNIRIO, FAPERJ.

Palavras-chaves: *Artemisia annua* L.; anatomia; substâncias voláteis; qualidade de luz.

#### INTRODUÇÃO

A artemisinina é uma molécula de grande interesse econômico, uma lactona sesquiterpênica produzida nos tricomas glandulares da *Artemisia annua* L. ("WHO Guidance Note on Capacity Building in Malaria Entomology and Vector Control, 2013). Atualmente, o tratamento da malária mais eficiente é a Terapia Combinada com Artemisinina, que tem se mostrado eficaz contra outras doenças como esquistossomose, hepatite B, e diferentes tipos de câncer (CHATURVEDI et al., 2010). Esta molécula é encontrada em pequena quantidade na planta (1% do peso seco). Estudos prévios demonstraram que a combinação de Luz LED (light-emitting diode; diodo emissor de luz) vermelha e azul é eficaz para promover crescimento e desenvolvimento de plantas (LIN et al., 2013). Assumindo que diferentes faixas do espectro de radiação podem influenciar aspectos estruturais e metabólicos das plantas em condições padronizadas de cultura, foi avaliado o efeito das alterações na qualidade espectral da luz na anatomia foliar e produção de substâncias voláteis.

#### OBJETIVO

Avaliar diversos parâmetro foliares, a partir de plântulas cultivadas in vitro, sob diferentes tratamentos luminosos: densidade de tricomas/área total de limbo, anatomia foliar, diâmetro de células constituintes dos parênquimas e da epiderme e, identificação comparativa de substâncias voláteis.

#### METODOLOGIA

Sementes doadas pelo Prof. Pedro Melillo/CPQBA/ UNICAMP foram assepticamente inoculadas em meio MS0 (Murashige e Skoog, 1962). Para tanto, as sementes foram lavadas com água sanitária 50%, por 3 minutos, seguida de três enxágues com água destilada por 2 minutos cada, e em seguida lavagem com álcool 70% por 3 minutos, e novos enxágues com água destilada. Após dois meses de cultivo sob luz branca, o material vegetal foi micropropagado em MS0 e cultivado em sala de crescimento com temperatura de 25°C nas seguintes condições: no escuro (ESC) - controle negativo; sob luz branca (BR) - controle positivo; luzes LED azul (AZ), vermelha (VM), verde (VD) e amarela (AM), com fotoperíodo de 16 horas. A quantidade de radiação fotossinteticamente ativa foi medida em aproximadamente 15,0 micromol/m<sup>2</sup>/s utilizando o PAR acoplado ao fluorímetro FMS2 Hansatech. Para o estudo anatômico e de descrição, foram coletadas folhas do 3º nó de diferentes indivíduos cultivados sob as condições supracitadas durante dois meses. As folhas foram fixadas em FAA 70% por 48h e, posteriormente, estocadas em etanol 70%. Para aferir a densidade de tricomas, seis folhas de cada tratamento foram coradas com safranina hidroalcoólica 50% e montadas em glicerina 50%. A densidade de tricomas foi obtida com o auxílio de microscópio ótico com câmara clara acoplada. Foram selecionadas cinco áreas (300mm<sup>2</sup>) em cada folha, totalizando 30 mensurações para cada tratamento. A área foliar foi mensurada com auxílio do programa Image J, e de uma impressora com escâner (HP). Para mensurar a espessura do mesofilo, parênquimas, epiderme e das células constituintes destes foram usadas cinco folhas de cada tratamento, essas foram emblocadas em Histoiresina (Leica®). Foram feitos cortes transversais com o auxílio de um micrótomo mecânico. Os cortes foram corados com azul de toluidina 1% e montados em lâminas com resina sintética Entellan®. Os cortes foram observados, mensurados e fotografados com auxílio do microscópio Olympus CX31, microscópio de câmara clara acoplada (Zeiss) e microscópio óptico Olympus BX-4, sucessivamente. Todos os dados foram tratados pelo software Statística (7.1), onde foram calculados as médias e os erros padrões e onde foi feito o teste de Tukey, considerando  $\alpha < 0,5$ . Com o intuito de verificar se os diferentes tratamentos de luz afetavam quantitativamente e qualitativamente as substâncias voláteis produzidas nas folhas de *A. annua* cultivada in vitro, em MS0, após 2 meses, sob diferentes qualidades de luz e escuro, os voláteis do material foliar foram extraídos por SPME (Solid Phase Micro Extration, microextração em fase sólida). As amostras (0,05g) foram pesadas em frascos de 4mL, que foram aquecidos à 60°C. As análises dos voláteis foram realizadas pelo cromatógrafo gasoso (CG) (Agilent 7890A), equipado com um detector de ionização por chama, mantido a 280°C, e uma coluna capilar DB-5 (5%-fenil-95%-metilsilicone, 30m X 0,25mm X 0,25mm). A injeção foi conduzida no modo sem divisão de fluxo (splitless). O gás carreador foi o hidrogênio a 1,5mL/min. A quantificação de substâncias foi feita utilizando-se a área normalizada (área %). Para a identificação dos voláteis as extrações foram repetidas e injetadas em um sistema de cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas (Agilent 5973N), equipado com a mesma coluna e operando nas mesmas condições

## 13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

acima. O espectrômetro foi operado no modo ionização eletrônica, a 70eV. Os componentes voláteis foram identificados por seus espectros de massas, comparados com dados da espectroscopia Wiley 6th ed. e também a partir dos seus índices de retenção linear, calculados a partir dos tempos de retenção dos componentes e de uma mistura padrão de n-alcenos. Os valores calculados foram comparados com dados da literatura (Adams, 2007).

### RESULTADOS

De acordo com as descobertas científicas o conteúdo de artemisinina nas folhas é influenciado por muitos fatores genéticos, ambientais e agrícolas ("WHO Position Statement ( June 2012 ) Effectiveness of Non-Pharmaceutical Forms of *Artemisia annua* L. against malaria," 2012). Os tricomas de *A. annua* ocorrem em toda extensão da superfície foliar, porém com intensidades distintas. A maior frequência de tricomas glandulares/limbo foi observada nas folhas tratadas com a AZ, AM e BR. Na epiderme de *A. annua*, as paredes anticlinais observadas foram sinuosas em todos os tratamentos na face adaxial, exceto as folhas sob o tratamento do ESC onde as células eram levemente sinuosas. As células da face abaxial das folhas sob o ESC eram sinuosas, assim como em folhas sob AM e VM. Para as demais (AZ e VD) as células são levemente sinuosas, exceto sob a BR cujo as células eram mais arredondadas. *A. Annua* L. apresenta dois tipos de tricomas, glandulares e não glandulares. Em todos os tratamentos os tricomas não glandulares, eram uni seriados e multicelulares constituídos de 4 à 5 células, sendo a célula basal maior. Esses também apresentam uma haste superior constituída de um célula com 2 ramificações em forma de "T", tricomas tectores. Os tricomas glandulares, apresentam pedúnculo, são bisseriados e multicelulares, apresentam 8 células no total. A cabeça do tricoma glandular é turgida e por isso é maior que as demais células. A epiderme em corte transversal foi unisseriada, com estômatos na mesma ou um pouco acima ao nível de outras células da epiderme, essas características são comuns para todos os tratamentos. O mesófilo apresentava uma pequena diferenciação entre o parênquima paliádico e o lacunoso, essa diferenciação é mais tênue em cortes de limbo de folhas no ESC e AZ. Nos tratamentos luminosos os feixes vasculares eram mais desenvolvidos que no controle positivo (BR). A mensuração do diâmetro celular das células constituintes da epiderme e do parênquima (paliádico e lacunoso) foi também verificada de acordo com cada tratamento luminoso. Foi observado que o diâmetro das células da epiderme foliar adaxial era maior sob AZ e menor sob a condição BR. O diâmetro das células da epiderme abaxial foram maiores em AZ e VD, em quanto o menor foi observado em AM e VM. No parênquima paliádico o maior diâmetro se apresenta em células das folhas cultivadas sob BR e menor cultivadas sob AM. O tratamento do ESC apresentou o maior diâmetro de células do parênquima lacunoso, enquanto em AM e VM o diâmetro das células do parênquima lacunoso foi menor. A presença de apenas uma fileira de células epidérmicas e uma fileira de parênquima paliádico corroboram com a anatomia da *A. annua* (KONOWALIK; KREITSCHITZ, 2012). Quanto à análise de substâncias voláteis, foram encontradas substâncias como:  $\beta$ -pineno, álcool artemisinínico, entre outras substâncias. VD foi o tratamento que apresentou maior diversidade de substâncias voláteis, seguido dos tratamentos de BR e AZ. Algumas substâncias foram detectadas em plantas de todos os tratamentos como o limoneno, cânfora e o canfeno. Substâncias, como o terpineno- $\alpha$ , foram encontradas em todas as condições luminosas exceto no ESC. Sob VD, foram identificadas substâncias exclusivas: ilsovaleno isovalerato e octano-4-E. Em nossas análises foram encontradas variações de quantidade relativa (%) de substâncias do óleo, como cânfora cuja maior quantidade relativa foi observada sob VD, e menor sob ESC. As substâncias voláteis encontradas corroboram com as substâncias encontradas em outras análises de óleo essencial de *A. annua* (RADULOVIC; BLAGOJEVIC, 2013).

### CONCLUSÃO

A AZ, AM e BR estimularam a diferenciação de tricomas glandulares por área de limbo; VD estimulou a produção de substâncias voláteis. Os diferentes espectros luminosos influenciam, de maneira distinta, a anatomia e a composição química de *Artemisia annua* L. como esperado.

### REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4 ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007. 800 p.
- CHATURVEDI, D. et al. Artemisinin and its derivatives: a novel class of anti-malarial and anti-cancer agents. *Chemical Society Reviews*, v. 39, p. 435–454, 2010.
- DAVID, R.; CARDE, J. P. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences Paris, Série D*, v. 258, p. 1338-1340, 1964.
- LIN, K.H., HUANG, M.Y., HUANG, W.D., HSU, M.H., YANG, Z.W., & YANG, C.M. The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. capitata). *Scientia Horticulturae*, v.150, p. 86–91, may. 2013.
- KONOWALIK, K.; KREITSCHITZ, A. Morphological and anatomical characteristics of *Artemisia absinthium* var. *absinthium* and its Polish endemic variety *A. absinthium* var. *calcigena*. *Plant Systematics and Evolution*, v. 298, n. 7, p. 1325–1336, 27 abr. 2012.
- RADULOVIC, N. S.; BLAGOJEVIC, P. D. Average mass scan of the total ion chromatograms: A new gas chromatography-mass spectrometry derived variable for fast and reliable multivariate statistical treatment of essential oil compositional data. *Journal of chromatography. A*, v. 1301, p. 190–9, 2 ago. 2013.
- WHO Guidance Note on Capacity Building in Malaria Entomology and Vector Control. n. September, p. 1–3, 2013.
- WHO Position Statement ( June 2012 ) Effectiveness of Non-Pharmaceutical Forms of *Artemisia annua* L. against malaria. n. June, p. 1–4, 2012.