

Aplicação exógena de artemisinina e indução floral em *Artemisia annua* L.

Marchese, J.A.^{1,2}; Broetto, F.^{2,3}; Ming, L.C.²; Rehder, V.L.G.⁴; Boaventura Júnior, S.⁴; Vendramini, P.F.⁴; Stefanini, M.B.²; Guerreiro, C.P.V.²; Leonardo, M.²

¹CEFET/PR – Curso de Agronomia – Lab. Bioquímica e Fisiologia Vegetal, 85.503-390, Pato Branco-PR (abramo@pb.cefetpr.br); ²UNESP – Faculdade de Ciências Agrônômicas – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 18.603-970, Botucatu-SP; ³UNESP – Instituto de Biociências - Depto. de Química e Bioquímica, 18.618-000, Botucatu-SP. ⁴UNICAMP – CPQBA – Div. Química Orgânica e Sintética, 13.081-970, Campinas-SP.

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de artemisinina na indução ao florescimento de *Artemisia annua*. Dois genótipos de *A. annua* (CPQBA 239x1V e 3MxPOP) foram submetidos a pulverizações com quatro diferentes concentrações de artemisinina (0, 500, 5000 e 10000 mg L⁻¹). A aplicação exógena de artemisinina não induziu o florescimento de ambos os genótipos de *A. annua* testados, em nenhuma das concentrações utilizadas.

Palavras-Chave: Crescimento e desenvolvimento, fotoperiodismo, fitormônios, plantas medicinais, artemísia.

ABSTRACT: External application of artemisinin in the induction of the flowering in *Artemisia annua* L. The objective of this work was to evaluate the effect of different artemisinin concentrations in the flowering induction of *A. annua*. Two genotypes of *A. annua* (CPQBA 239x1V and 3MxPOP) were atomized with four different artemisinin concentrations (0, 500, 5000, and 10000 mg L⁻¹). The application of artemisinin didn't induce the flowering of both genotypes tested, in none of the used concentrations.

Key words: Growth and development, photoperiodism, phytohormones, medicinal plants, sweet wormwood.

INTRODUÇÃO

Artemisia annua (Asteraceae) é uma planta herbácea aromática anual, nativa da Ásia e aclimatada no Brasil. As folhas são fonte abundante de artemisinina, uma lactona sesquiterpênica que,

conjuntamente com seus derivados semi-sintéticos (Figura 1), apresentam ação efetiva contra as cepas resistentes das espécies de *Plasmodium* causadoras da malária (Klayman, 1985; Geldre *et al.*, 1997; Marchese & Rehder, 2001).

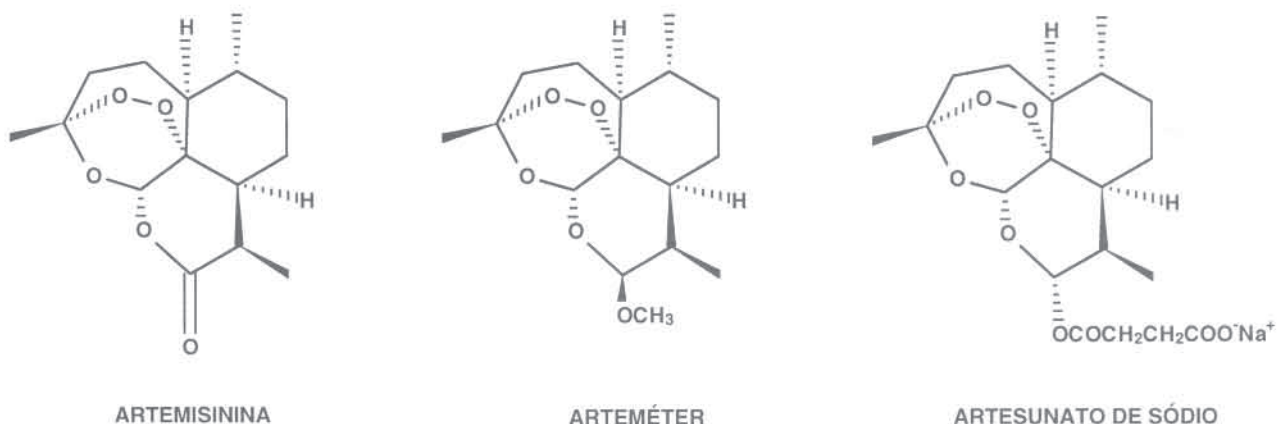


FIGURA 1. Artemisinina e alguns de seus derivados semi-sintéticos antimaláricos (Marchese *et al.*, 2001).

Recebido para publicação em 13/06/2003

Aceito para publicação em 17/12/2004

A. annua é considerada uma espécie anual de dias curtos (PDC) (Ferreira *et al.*, 1995; Geldre *et al.*, 1997; Marchese *et al.*, 2002), classificação dada àquelas plantas que florescem quando o comprimento do dia é inferior ao fotoperíodo crítico ou indutivo (Loomis & Connor, 1992). Genótipos de *A. annua* florescem entre duas (Ferreira *et al.*, 1995) e quatro semanas (Marchese *et al.*, 2002) após serem submetidos ao fotoperíodo crítico. A literatura relata diferentes fotoperíodos críticos para indução floral em *A. annua*: 11,5 horas (Ferreira *et al.*, 1995); 11 horas (Magalhães, 1996); 13,2 horas (Bagchi *et al.*, 1997b); 12 a 14 horas (Geldre *et al.*, 1997) e aproximadamente 13 horas (Marchese *et al.*, 2002).

Segundo Ferreira *et al.* (1995) e Marchese *et al.* (2002), em resposta a indução ao florescimento sob condições de dias curtos (fotoperíodo indutivo), ocorre um aumento abrupto na altura e no número de entrenós em plantas de *A. annua*. Na fase de floração, há uma interrupção no crescimento em altura e no incremento de entrenós (Figura 2), além de uma redução na produção de órgãos vegetativos, devido à conversão do meristema apical vegetativo em reprodutivo. No final do florescimento as plantas redirecionam seus assimilados para a formação de

sementes, iniciando a fase de senescência. Esse comportamento é padrão em plantas que possuem hábito de crescimento ou florescimento determinado (Loomis & Connor, 1992).

Por outro lado, na ausência da indução floral em condições de dias longos (fotoperíodo não indutivo), o crescimento em altura e a produção de entrenós são lineares e a planta vegeta indefinidamente (Figura 2). A obrigatoriedade de dias curtos para *A. annua* florescer classifica a espécie como planta de dias curtos qualitativa ou obrigatória (Marchese *et al.*, 2002).

Com relação à distribuição da artemisinina na planta, a parte aérea, principalmente folhas e inflorescências, apresenta as maiores concentrações de artemisinina, com baixas concentrações nos talos e nenhuma artemisinina na raiz e pólen. O conteúdo da molécula é de 4 a 11 vezes maior nas inflorescências que nas folhas (Ferreira & Janick, 1996). Em pré-floração, Charles *et al.* (1990) encontraram 88,9% da artemisinina total da planta nas folhas, estando os 11,1% restantes presentes nas gemas florais. Segundo Ferreira (1994), os tricomas glandulares que ocorrem nas folhas e flores são os prováveis sítios de acumulação de artemisinina em *A. annua*.

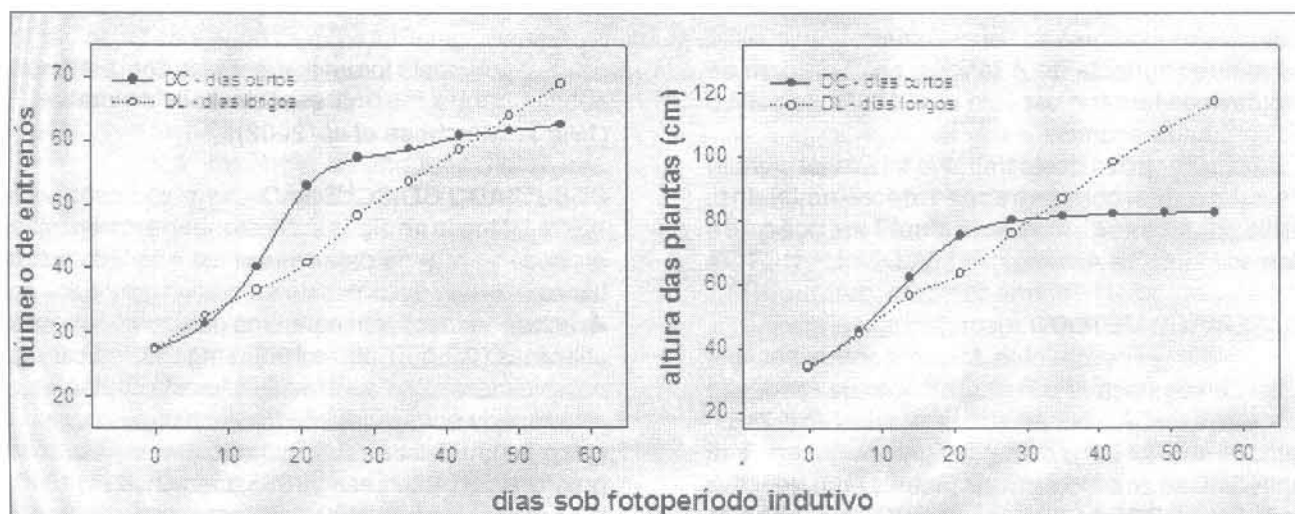


FIGURA 2. Efeito de dias curtos e dias longos no número de entrenós e na altura de plantas do genótipo chinês de *Artemisia annua*. CEFET-PR, Pato Branco-PR/2000. Adaptado de Marchese *et al.* (2002).

Há controvérsias na literatura sobre qual a fase fenológica da planta em que ocorre maior acúmulo de artemisinina. Alguns autores afirmam que o maior acúmulo da molécula ocorre na fase de pré-floração (Acton *et al.*, 1985; Liersch *et al.*, 1986; Woerdenbag *et al.*, 1991), enquanto outros reportam que o pico ocorre durante a floração (Pras *et al.*, 1991; Morales *et al.*, 1993; Ferreira, 1994; Laughlin, 1995; Ferreira & Janick, 1996).

Morales *et al.* (1993) relatam que a concentração máxima de artemisinina aparenta estar mais diretamente relacionada com o

fotoperíodo específico, do que com o estágio específico de desenvolvimento da planta. Segundo Marchese *et al.* (2002) o fato de o maior acúmulo do sesquiterpeno artemisinina ocorrer quando as plantas estão nas fases de pré-floração e floração, sugere que a molécula, de alguma maneira, possa estar envolvida com a indução do florescimento nesta espécie, apresentando possível atividade hormonal.

A literatura indica uma grande variedade de funções fisiológicas para os sesquiterpenos nas plantas, entre elas atividade reguladora de crescimento e aleloquímica (Harborne, 1993; Day &

Harborne, 1997). Abidin *et al.* (2002) relatam vários experimentos em que substâncias reguladoras de crescimento como ácido indolacético, ácido giberélico, triacontanol e cloromequat foram testadas em *A. annua*, todavia, nenhuma apresentou efeito indutor ao florescimento. Duke *et al.* (1987), Chen & Leather (1990) e Bagchi *et al.* (1997a) encontraram atividade reguladora de crescimento em diferentes espécies para a molécula de artemisinina, seus precursores e derivados semi-sintéticos.

Uma das limitações ao cultivo comercial de *A. annua* é o ciclo da espécie, que pode tornar-se longo devido à dependência de dias curtos para o florescimento. Em experimentos conduzidos no estado do Paraná (26°11' S, 52°36' W), verificou-se que a segunda quinzena de setembro é a melhor época de plantio para a espécie e que a colheita - durante o florescimento - ocorre no início de março (Marchese *et al.*, 2003). O sistema de produção agrícola local comporta até duas safras de verão (safra e safrinha) e um ciclo de 165 dias para *A. annua* é longo demais, impedindo o plantio de milho ou feijão na safrinha, que ocorre em fevereiro. A colheita na fase vegetativa não se justificaria, já que o maior acúmulo de artemisinina ocorre na floração. Em vista disto, estudos relativos à descoberta de substâncias indutoras ao florescimento, para auxiliar no manejo agrícola de *A. annua*, colaborariam na tentativa de tornar a espécie uma opção de cultivo aos produtores rurais.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de artemisinina, aplicadas exógenamente, na indução do florescimento de *A. annua*.

MATERIAL E MÉTODO

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação no Departamento de Produção Vegetal da FCA/UNESP, em Botucatu-SP (22° 51' latitude sul; 48° 26' a oeste de Greenwich, em uma altitude 786 m). Foram utilizadas sementes dos genótipos CPQBA 239x1V e 3MxPOP de *A. annua*, e a semeadura foi feita em bandejas de 72 células contendo substrato orgânico Plantmax®, em 25/04/2002. O transplantio das mudas foi feito em 09/07/2002, para vasos com capacidade de 0,5 L, contendo uma mistura de Plantmax® e terra de subsolo (1:1). Durante o experimento, as plantas permaneceram sob fotoperíodo natural de 11-12 horas, com adição de 4 horas de luz artificial, para impedir a indução natural do florescimento das mesmas, cujo fotoperíodo indutivo é de aproximadamente 13 horas. As temperaturas médias foram de 27,1 °C (máxima) e 16,7 °C (mínima). Foram testados dois genótipos de *A. annua* em dois experimentos independentes (um experimento para cada genótipo), onde as plantas foram pulverizadas com quatro diferentes

concentrações de artemisinina (0, 500, 5000 e 10000 mg L⁻¹). Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com oito repetições, sendo que uma planta foi considerada uma repetição. Os cristais de artemisinina utilizados foram purificados no Laboratório de Síntese Química do CPQBA-UNICAMP (teor de pureza = 98%; ponto de fusão = 154-155 °C e solubilidade em etanol 96% = 29,1 g L⁻¹). A artemisinina foi pré-dissolvida em etanol P.A. (dosagem min. 96%) e diluída em água destilada. Adicionou-se à calda o espalhante adesivo não iônico nonil fenoxi poli (etilenoxi) etanol, na concentração de 0,2% (v/v). Em 22/08/2002, quando as plantas se encontravam no estadio B (alongamento) da escala fenológica descrita por Delabays (1997), foram feitas as aplicações dos tratamentos com um pulverizador costal pressurizado (pressão constante de 2 bar), a uma vazão de 0,216 L min⁻¹. Foi utilizado um bico Twinjet® TJ60-11002VS e grupos de oito plantas de cada tratamento receberam um volume de calda aproximado de 0,108 L, durante 30 s. A partir de 17/07/2002 até 03/10/2002 (final do experimento), de dois em dois dias, foram avaliados a altura e o número de entrenós das plantas, bem como, o número de plantas florescidas. Os resultados encontrados foram plotados no programa SigmaPlot 8.0 e as curvas de crescimento deste experimento foram comparadas com as curvas obtidas para a mesma espécie por Ferreira *et al.* (1995) e Marchese *et al.* (2002).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Nas condições deste experimento, a aplicação exógena de artemisinina não induziu ao florescimento as plantas de ambos os genótipos de *A. annua* testados, em nenhuma das concentrações utilizadas (0, 500, 5000 e 10000 mg L⁻¹), indicando, possivelmente, que a molécula não está diretamente relacionada com a indução floral na espécie, ainda que o acúmulo da artemisinina ocorra nas fases de pré-floração (Acton *et al.*, 1985; Liersch *et al.*, 1986; Woerdenbag *et al.*, 1991) e floração (Pras *et al.*, 1991; Morales *et al.*, 1993; Ferreira, 1994; Laughlin, 1995; Ferreira & Janick, 1996).

A aplicação exógena de artemisinina não provocou um aumento abrupto na altura e no número de entrenós das plantas (Figura 3). Segundo Ferreira *et al.* (1995) e Marchese *et al.* (2002), quando ocorre a indução ao florescimento em *A. annua*, observa-se um aumento abrupto na altura e no número de entrenós nas plantas. Também, na fase de floração, há uma interrupção no crescimento em altura e no incremento de entrenós devido à conversão do meristema apical vegetativo para reprodutivo (Figura 2), o que não foi observado nas plantas tratadas, em nenhuma das doses, para ambos os genótipos testados (Figura 3).

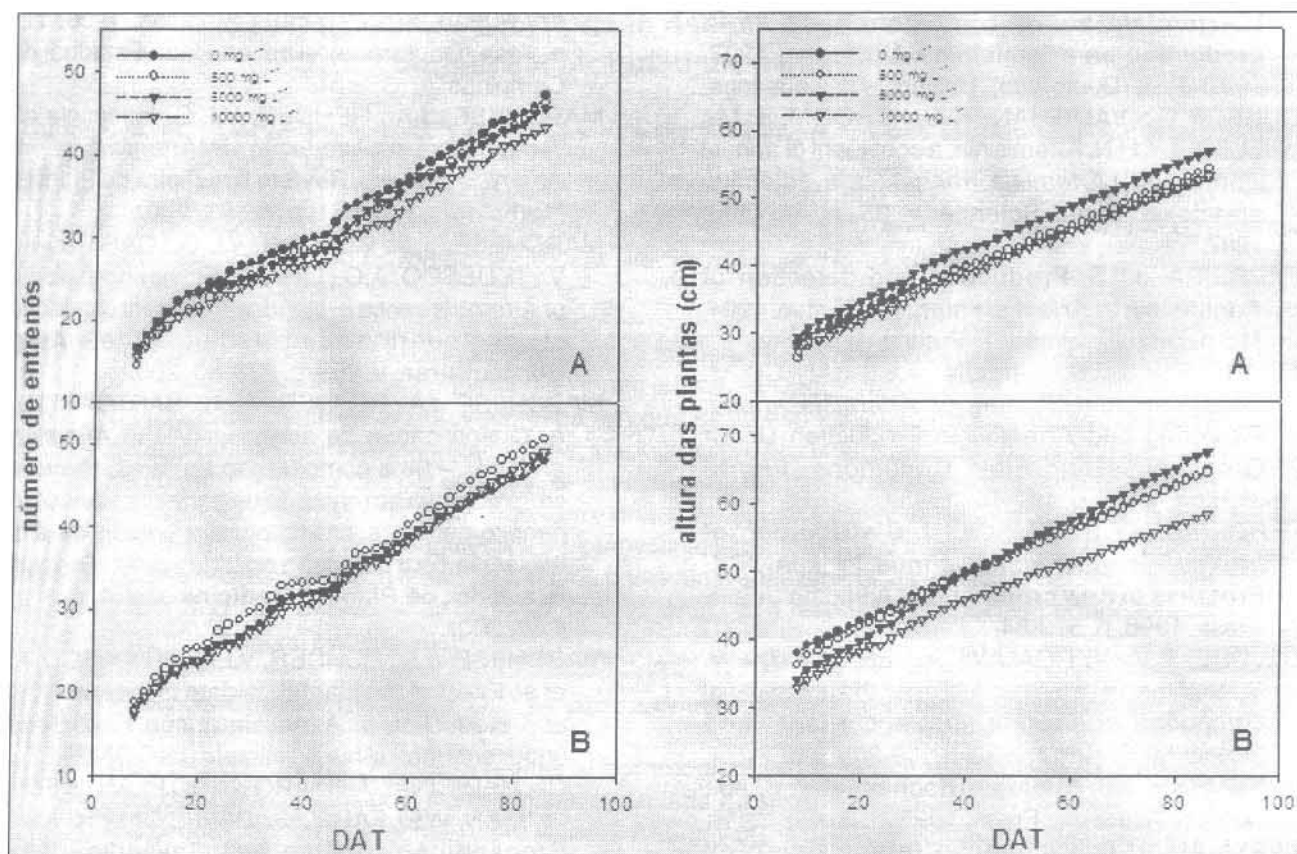


FIGURA 3. Influência de diferentes concentrações de artemisinina no número de entrenós e na altura das plantas de *Artemisia annua* L. (genótipos 3MxPOP (A) e 239x1V (B)). UNESP, Botucatu/SP, 2002.

Com a ausência da indução floral nas condições deste experimento, em função dos dias longos (fotoperíodo não indutivo) e da não efetividade das doses de artemisinina aplicadas, as curvas de crescimento para altura de plantas e número de entrenós foram lineares e as plantas ficaram vegetando até o término do experimento (Figura 3). Esses resultados corroboram com aqueles de experimentos anteriores realizados por nós (Marchese *et al.*, 2002), onde afirmamos a obrigatoriedade de dias curtos para *A. annua* florescer e classificamos a espécie como planta de dias curtos qualitativa ou obrigatória.

Pode-se inferir a partir dos resultados deste experimento que a aplicação exógena de artemisinina não induziu o florescimento de ambos os genótipos de *A. annua* testados, em nenhuma das concentrações utilizadas.

AGRADECIMENTO

Agradecemos às Divisões de Agrotecnologia e de Química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA/UNICAMP, pelo fornecimento do material vegetal e cristais de artemisinina, respectivamente.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABDIN, M.Z.; ISRAR, M.; REHMAN, R.U.; JAIN, S.K.

- Artemisinin, a novel antimalarial drug: biochemical and molecular approaches for enhanced production. **Planta Medica**, v. 69, p. 289-99, 2002.
- ACTON, N.; KLAYMAN, D.L.; ROLLMAN, I.J. Reductive eletrochemical HPLC assay for artemisinin (qinghaosu). **Planta Medica**, v. 5, p. 445-6, 1985.
- BAGCHI, G.D.; JAIN, D.C.; KUMAR, S. Arteether: a potent plant growth inhibitor from *Artemisia annua*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 6, p. 1131-3, 1997a.
- BAGCHI, G.D.; RAM, M.; SHARMA, S.; KUMAR, S. Effect of the date on growth and development of *Artemisia annua* under subtropical climatic conditions. **Planta Medica**, v. 5, p. 445-6, 1997b.
- CHARLES, D.J.; SIMON, J.E.; WOOD, K.V.; HEINSTEIN, P. Germplasm variation in artemisinin content of *Artemisia annua* using an alternative method of artemisinin analysis from crude plant extracts. **Journal of Natural Products**, v. 53, p. 157-60, 1990.
- CHEN, P.K.; LEATHER, G.R. Plant growth regulatory activities of artemisinin and its related compounds. **Journal of Chemical Ecology**, v. 16, n. 6, p. 1867-76, 1990.
- DAY, P.M.; HARBORNE, J.B. **Plant Biochemistry**. 1ed., London: Academic Press, 1997. 554 p.
- DELABAYS, N. **Biologie de la reproduction chez**

- L'*Artemisia annua* L. et genetique de la production en artemisinin.** Laussane, 1997. 169 p. Tese (Doutorado). Universite de Lausanne.
- DUKE, S.O.; VAUGHAN, K.C.; CROOM, E.M.; ELISOHL, H.N. Artemisinin, a constituent of annual wormwood (*Artemisia annua*), is a selective phytotoxin. **Weed Science**, v. 35, p. 499-505, 1987.
- FERREIRA, J.F.S. **Production and detection of Artemisinin in *Artemisia annua* L.** Purdue, 1994. 125 p. Tese (Doutorado). Purdue University.
- FERREIRA, J.F.S.; SIMON, J.E.; JANICK, J. Developmental Studies of *Artemisia annua*: Flowering and Artemisinin Production Under Greenhouse and Field Conditions. **Planta Medica**, v. 61, p. 167-70, 1995.
- FERREIRA, J.F.S.; JANICK, J. **Distribution of artemisinin in *Artemisia annua*.** In: J. JANICK. **Progress in new crops**. 1 ed., Arlington: ASHS Press, 1996, p. 579-84.
- GELDRE, E.V.; VERGAUWE, A.; EEKHOUT, E.V. State of the art of the production of the antimalarial compound artemisinin in plant. **Plant and Molecular Biology**, v. 33, p. 199-209, 1997.
- HARBORNE, J.B. **Ecology Biochemistry**. 4. ed., London: Academic Press, 1993, 318 p.
- KLAYMAN, D.L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. **Science**, v. 228, p. 1049-55, 1985.
- LAUGHLIN, J.C. The influence of distribution of antimalarial constituents in *Artemisia annua* L. on time and method of harvest. **Acta Horticulturae**, v. 390, p. 67-73, 1995.
- LIERSCH, R.; SOICKE, H.; STEHR, C.; TÜLLNER, H.U. Formation of artemisinin in *Artemisia annua* during one vegetation period. **Planta Medica**, v. 52, p. 387-90, 1986.
- LOOMIS, R.S.; CONNOR, D.J. **Crop ecology: productivity and management in agricultural systems**. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. 538 p.
- MAGALHÃES, P.M. **Seleção, melhoramento e nutrição da *Artemisia annua* L., para cultivo em região intertropical.** Campinas, 1996. 117 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
- MARCHESE, J.A.; REHDER, V.L.G. Influência da Temperatura na Produção de Artemisinin em *Artemisia annua* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, n. 1, p. 89-93, 2001.
- MARCHESE, J.A.; REHDER, V.L.G.; CASIRAGHI, V.; TEDESCO, A.C.; LIRA, R. Flowering in plants of *Artemisia annua* L. standed to diferent conditions of photoperiod and temperature. **Acta Horticulturae**, v. 569, p. 275-80, 2002.
- MARCHESE, J.A.; REHDER, V.L.G.; SARTORATTO, A. Quantificação de artemisinin em *Artemisia annua* L. – uma comparação entre as técnicas cromatografia em camada delgada com detecção densitométrica e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, n. 1, p. 81-7, 2001.
- MARCHESE, J.A.; REHDER, V.L.G.; TEDESCO, A. *et al.* Effect of the plantation date in the flowering and production of *Artemisia annua* L. cultivate under subtropical humid climate. In: CONGRESS ON MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS FOR HUMAN WELFARE, 3, 2003, Chiang Mai. **Proceedings**. Chiang Mai, Tailândia, 2003 p. 259.
- MORALES, M.R.; CHARLES, D.J.; SIMON, J.E. Seasonal accumulation of artemisinin in *Artemisia annua* L. **Acta Horticulturae**, v. 344, p. 416-20, 1993.
- PRAS, N.; VISSER, J.F.; BATTERMAN, S.; WOERDENBAG, H.J.; MALINGRÉ, T.M.. Laboratory selection of *Artemisia annua* L. for high artemisinin yielding types. **Phytochemical Analysis**, v. 2, p. 80-3, 1991.
- WOERDENBAG, J.H.; PRAS, N.; BOS, R.; VISSER, J.F.; HENDRIKS, H.; MALINGRÉ, T.M. Analysis of artemisinin and related sesquiterpenoids from *Artemisia annua* L. by combined gas chromatography/mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v. 2, p. 215-19, 1991.