

Influência da temperatura na produção de artemisinina em *Artemisia annua* L.

Marchese, J.A.¹; Rehder, V.L.G.²

¹Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal do CEFET-PR/AGRONOMIA, Pato Branco-PR, CEP 85503-390 (abramo@pb.cefetpr.br).

²Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA-UNICAMP, Paulínia-SP, CEP 13140-000.

RESUMO: *Artemisia annua* L. é fonte abundante de artemisinina, uma lactona sesquiterpênica que apresenta comprovada eficácia no controle das cepas do gênero *Plasmodium*, parasita causador da malária. Compostos do metabolismo secundário, como a artemisinina, apresentam alteração no seu conteúdo em plantas submetidas a variações ou estresses ambientais. O objetivo deste experimento foi verificar a influência da temperatura no rendimento de artemisinina em plantas do híbrido CPQBA 2/39x1V de *A. annua*. Plantas de 88 dias, cultivadas em câmara de crescimento, foram submetidas a duas diferentes amplitudes de temperatura, 11/20°C e 18/28°C (noite/dia), durante 16 dias. O teor de artemisinina na massa seca foliar foi determinado através da técnica cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta. Foram determinadas a massa seca de folhas (MSF) e ramos (MSR), o rendimento de artemisinina por planta e a relação massa seca de folhas/ massa seca de ramos (MSF/MSR). As médias foram comparadas pelo teste *t de Student*. O tratamento 18/28°C apresentou um teor significativamente maior de artemisinina nas folhas que o tratamento 11/20°C ($p \leq 0,003$). Para os parâmetros massa seca foliar e rendimento de artemisinina por planta, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos 18/28°C e 11/20°C. Nas plantas submetidas a amplitude 18/28°C, verificou-se redução significativa na massa seca de ramos ($p \leq 0,024$), e, por consequência, aumento significativo na relação MSF/MSR ($p \leq 0,008$), quando comparadas às plantas do tratamento 11/20°C. Uma relação MSF/MSR maior, é desejável no processamento industrial de *A. annua*, uma vez que os ramos contêm substâncias graxas que dificultam o isolamento e a purificação da artemisinina.

Palavras-chave: *Artemisia annua* L., artemisinina, malária, metabolismo secundário, temperatura.

ABSTRACT: The influence of temperature in the production of Artemisinin in *Artemisia annua* L. *Artemisia annua* is a rich source of artemisinin, a sesquiterpene lactone proven to be effective in the control of the resistant strain of the malaria agent *Plasmodium*. Secondary metabolism compounds, such as artemisinin, show changes in their contents when the plants come under the influence of environmental stress and variations. The scope of this work was to study the influence of temperature in the production of artemisinin in plants of hybrid CPQBA 2/39x1V of *A. annua*. Plants of 88 days of age were cultivated in growing chambers, under two temperature levels, 11/20°C and 18/28°C, night and day, for 16 days. The artemisinin content in dry leaf mass was determined through by high performance liquid chromatography technique using ultraviolet detection. Other determining parameters were dry leaf and stem mass, and artemisinin production by plant and the leaf stem relation. The average results were compared by t-student test. The test at 18/28°C accumulated significantly more artemisinin than the 11/20°C treatment ($p \leq 0.003$). Significant differences were not found between the 18/28°C and 11/20°C treatments relating to dry leaf matter and artemisinin production by plant parameters. In plants submitted to the 18/28°C level, there was observed a significant reduction in dry stem mass ($p < 0.024$), and consequently, a significant increase in the leaf/stem relation ($p < 0.008$), when compared with the 11/20°C treatment plants. A greater leaf/stem relation is desirable in the *A. annua* industrial processing, in that the stem contains waxes which make more difficult the artemisinin isolation and purification.

Key words: *Artemisia annua* L., artemisinin, secondary metabolism, malaria, temperature.

INTRODUÇÃO

Artemisia annua L. é planta herbácea altamente aromática, pertencente à família *Asteraceae*, nativa da China e aclimatada no Brasil. As folhas são fonte abundante de artemisinina, metabólito secundário que apresenta comprovada eficácia no controle das cepas do

gênero *Plasmodium*, parasita causador da malária (Klayman, 1985; WHO, 1998). A síntese química industrial da artemisinina é complexa, envolvendo inúmeras etapas e apresentando baixos rendimentos e altos custos, tornando o isolamento a partir da espécie *A. annua* a melhor forma para obtenção deste princípio ativo (Woerdenbag *et al.*, 1991; Chan *et al.*, 1995; Ferreira & Janick, 1996; Geldre *et al.*, 1997).

Recebido para publicação em 13/02/01 e aceito para publicação em 07.11.01.

A produção de artemisinina em *A.annua* é afetada pela variação das condições de ambiente em que a espécie é cultivada (Singh *et al.*, 1986; Chen & Zhang, 1987; Ferreira *et al.*, 1995; Geldre *et al.*, 1997). Ferreira (1994) conduzindo experimentos em casa de vegetação, encontrou diferenças no teor de artemisinina em plantas cultivadas em épocas distintas, atribuindo a variação ao efeito da temperatura, sugerindo que altas temperaturas reduzem o teor de artemisinina em *A.annua*. Magalhães (1996) em experimento comparando diferentes genótipos, realizado em câmara de crescimento, observou que temperaturas entre 22°C e 26°C induziram um teor de artemisinina maior que temperaturas entre 25°C e 31°C. Todavia, este comportamento não foi padrão para todos os genótipos testados. Além do mais, o decréscimo nos teores de artemisinina, em consequência da maior temperatura ambiente foi compensado por aumento da fitomassa foliar, resultando em rendimentos de artemisinina por planta, semelhantes nas duas faixas de temperatura.

Todavia, Chen & Zhang (1987) comparando o efeito de três diferentes temperaturas no crescimento de *A.annua*, verificaram que o conteúdo de artemisinina analisado aos 35 e 70 dias de crescimento, foi significativamente maior em plantas submetidas à temperatura de $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$, comparativamente às plantas submetidas às temperaturas de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ou $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Porém, também neste caso, o comportamento não foi padrão para todos os genótipos.

Wallaart *et al.* (2000) evidenciaram a existência de dois quimiotipos distintos de *A.annua* em seus experimentos, com base nas diferenças encontradas para os teores de artemisinina e seus bioprecursores nos genótipos estudados, demonstrando que populações de plantas oriundas do Vietnã produzem mais artemisinina que populações originárias da China. Estes resultados reforçam a existência de variação genotípica dentro da espécie *A.annua*, a qual já foi observada por Chen & Zhang (1987) e Magalhães (1996).

Informações sobre o efeito de condições ambientais no metabolismo secundário de plantas, são derivadas principalmente de esforços da pesquisa para maximizar a produção de constituintes ativos de espécies medicinais e aromáticas. Como aplicação prática, avanços no sentido de compreender a influência de fatores ambientais na regulação da síntese de metabólitos secundários podem contribuir para a maximização da produção de compostos de interesse nestas espécies (Gershenzon, 1984; Dey & Harborne, 1997).

O objetivo deste trabalho foi verificar a influência da temperatura no rendimento de

artemisinina em plantas do híbrido CPQBA 2/39x1V de *Artemisia annua* L..

MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento CONVIRON, modelo CMP 4030. O material vegetal utilizado foi o híbrido CPQBA 2/39x1V, desenvolvido pelo programa de melhoramento do Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA/UNICAMP), Brasil, cujos parentais são originários de uma população de plantas do Vietnã. Às plantas foram cultivadas em vasos plásticos de 700 ml, contendo 630g de substrato. O substrato utilizado para o crescimento das plantas foi uma mistura de terra vegetal e solo de banhado, com textura uniforme (peneirado). Os vasos foram dispostos sobre bandejas, nas quais foi mantida uma lâmina de água de aproximadamente 2 cm, onde a água ascendia no substrato via capilaridade. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com 9 repetições para cada tratamento, onde cada repetição foi constituída de uma única planta. Os tratamentos consistiram em submeter plantas do híbrido de *A.annua* CPQBA 2/39x1V com 88 dias a duas diferentes amplitudes de temperatura (noite/dia), 11/20°C e 18/28°C, durante 16 dias. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste *t de Student* no programa SYSTAT 5.0. Às plantas de ambos os tratamentos foram cultivadas inicialmente em temperaturas entre 21°C e 24°C, umidade relativa de aproximadamente 70%, fotoperíodo de 10 horas e 30 minutos e uma PAR (radiação fotossinteticamente ativa) de $220 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Quando as plantas se encontravam com 88 dias, no estádio B (alongamento) da escala fenológica descrita por Delabays (1997), estas foram divididas em duas câmaras de crescimento com diferentes amplitudes de temperatura (noite/dia), 11/20°C e 18/28°C. Para ambos os tratamentos, a umidade relativa e a PAR foram de aproximadamente 70% e de $320 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente. O fotoperíodo foi aumentado para 11 horas. Após 16 dias, as plantas foram cortadas e colocadas para secar em estufa com circulação de ar a uma temperatura de $34^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, pelo período de 48 horas. Foram determinadas a massa seca de folhas (MSF) e ramos (MSR), e a relação massa seca de folhas/massa seca de ramos (MSF/MSR). A determinação dos teores de artemisinina na MSF (mg.g^{-1}) foi feita em cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta, conforme técnica descrita por Zhao & Zheng (1986), com algumas adaptações.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Foi observada diferença significativa para o teor de artemisinina na MSF entre os tratamentos de amplitudes térmicas a que foram submetidas as plantas de *A. annua*, cultivadas em câmara de crescimento (Figura 1), evidenciando que o tratamento com 18/28°C apresentou maior teor de artemisinina do que o tratamento 11/20°C. Isto indica que nas condições deste experimento, para o genótipo CPQBA 2/39x1V, as temperaturas maiores induziram um aumento no teor de artemisinina nas plantas testadas. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Chen & Zhang (1987), onde plantas de *A. annua* submetidas à temperatura de $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$, apresentaram um aumento significativo no teor

de artemisinina em relação às temperaturas de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ou $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Contrariamente, Ferreira (1994) e Magalhães (1996), sugeriram que altas temperaturas reduzem o teor de artemisinina em *A. annua*. Tais divergências levam a concluir que o comportamento desta espécie em relação à influência da temperatura na produção de artemisinina não é padrão, sendo variável para diferentes genótipos. Resultados demonstrando respostas diferentes entre genótipos distintos numa mesma temperatura, foram encontrados por Chen & Zhang (1987), Magalhães (1996) e Wallaart *et al.* (2000).

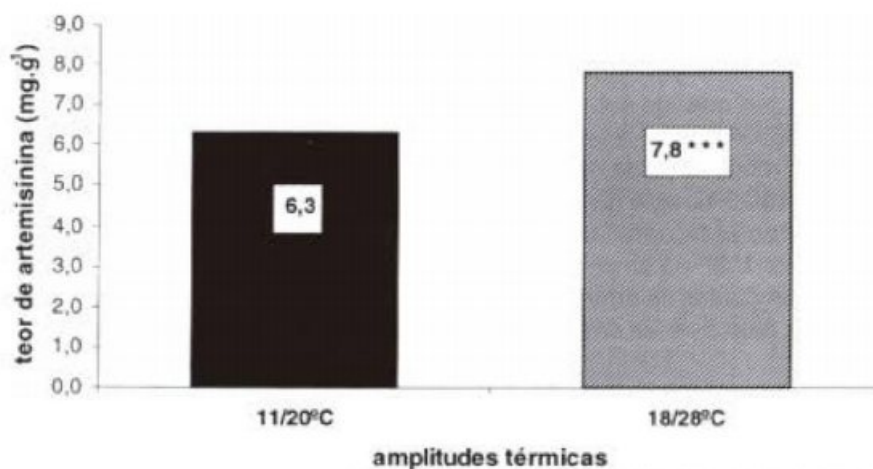


FIGURA 1. Teor de artemisinina na massa seca de folhas em plantas de *A. annua* com 88 dias, submetidas às amplitudes térmicas 11/20°C e 18/28°C, durante 16 dias. *** Significativo ($p \leq 0,003$) pelo teste *t* de Student.

Para rendimento de artemisinina por planta (Tabela 1), independente do resultado obtido para o teor de artemisinina, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos 18/28°C e 11/20°C, apesar de ter sido observado aumento do rendimento da molécula por planta na amplitude 18/28°C. Para a produção de MSF, também não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos 18/28°C e 11/20°C (Tabela 1). Contrariamente, Magalhães (1996) havia verificado aumento da MSF em temperaturas mais elevadas.

Os outros parâmetros analisados foram a MSR e a relação MSF/MSR (Tabela 1). Para as plantas submetidas à amplitude 18/28°C,

verificou-se redução significativa na MSR e, por conseqüência, aumento significativo na relação MSF/MSR, quando comparadas às plantas do tratamento 11/20°C. Resultado semelhante para a relação MSF/MSR foi encontrado por Magalhães (1996), onde temperaturas mais elevadas aumentaram significativamente este parâmetro. A relação MSF/MSR trata-se de parâmetro importante a ser observado no processamento industrial de *A. annua*, uma vez que os ramos contém substâncias graxas que dificultam o isolamento e a purificação da artemisinina, e quanto maior for a relação, melhor é a extração da molécula (Magalhães, 1996).

TABELA 1. Rendimento de artemisinina/planta, massa seca foliar (MSF), massa seca de ramos (MSR) e relação massa seca foliar/massa seca de ramos (MSF/MSR) em plantas de *A. annua* com 88 dias submetidas às amplitudes térmicas 11/20°C e 18/28°C, durante 16 dias.

parâmetro analisado	amplitudes térmicas (noite/dia)	
	11/20°C	18/28°C
rendimento de artemisinina ¹ (mg/planta)	36,43	41,33
MSF ¹ (g/planta)	5,80	5,30
MSR ¹ (g/planta)	9,79**	7,57
relação MSF/MSR ¹	0,60	0,72***

¹ Média de 09 repetições.

** ($p \leq 0,024$) e *** ($p \leq 0,008$) são significativos pelo teste *t* de Student.

Pode-se concluir que quando submetidas à amplitude térmica de 18/28°C, plantas do híbrido 2/39x1V apresentam maiores teores de artemisinina na MSF do que quando submetidas à amplitude de 11/20°C. Todavia, apesar de observar-se aumento do rendimento da molécula por planta na amplitude 18/28°C, este ganho não é significativo estatisticamente, uma vez que ocorreu maior produção de MSF na amplitude 11/20°C. Isto resulta em rendimentos de artemisinina (por planta), semelhantes para as duas amplitudes térmicas estudadas.

AGRADECIMENTO

Agradecemos às Divisões de Agrotecnologia e de Química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA/UNICAMP e à Seção de Fisiologia Vegetal do CNPT/EMBRAPA pelo apoio na execução deste trabalho. Também, agradecemos à CAPES pela bolsa PICDT e à Fundação Banco do Brasil pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- CHAN, K.L., TEO, C.K.H., JINADASA, S., YUEN, K.H. Selection of high artemisinin yielding *Artemisia annua*. *Planta Medica*, v.61, p.285-7, 1995.
- CHEN, F.T., ZHANG, G.H. Studies on several physiological factors in artemisinin synthesis in *Artemisia annua*. *Plant Physiology Communications*, v.5, p.26-30, 1987.
- DELABAYS, N. *Biologie de la reproduction chez L'Artemisia annua L. et genétique de la production en artemisinine*. Lausanne, 1997. 169p. Tese (Doutorado em Biologia) - Université de Lausanne.

- DEY, P.M., HARBORNE, J.B. *Plant Biochemistry*. London: Academic Press, 1997. 554p.
- FERREIRA, J.F.S. *Production and detection of Artemisinin in Artemisia annua L.* Indianapolis, 1994. 125p. Tese (Doutorado) - Purdue University.
- FERREIRA, J.F.S., SIMON, J.E., JANIK, 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. Immunoquantitative analysis of artemisinin from *Artemisia annua* using polyclonal antibodies. *Phytochemistry*, v.41, n.1, p.97-104, 1996.
- GELDRE, E.V., VERGAUWE, A., EEKHOUT, E.V. State of the art of the production of the antimalarial compound artemisinin in plant. *Plant Molecular Biology*, v.33, p.199-209, 1997.
- GHERSHENZON, J. Changes in levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. In: TIMMERMANN, B.N., STEELIN, C., LOEWUS, F.A. *Recent advances in phytochemistry - phytochemical adaptations to stress*. New York: Plenum Press, 1984. v.18. p. 273-320.
- KLAYMAN, D.L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*, v.228, p.1049-55, 1985.
- MAGALHÃES, P.M. *Seleção, melhoramento e nutrição da Artemisia annua L., para cultivo em região intertropical*. Campinas, 1996. 117p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia, universidade de Campinas.
- SINGH, A., KAUL, U.K., MAHAJAN, V.P., SINGH, A., MISRA, L.N., THAKUR, R.S., HUSAIN, A. Introduction of *Artemisia annua* in India and isolation of artemisinin, a promising antimalarial drug. *Indian Journal Pharmaceutical Sciences*, v.48, p.137-8, 1986.

- WALLAART, T.E., PRAS, N., BEEKMAN, A.C., QUAX, W.J. Seasonal variation of artemisinin and its biosynthetic precursors in plants of *Artemisia annua* of different geographical origin: proof for the existence of chemotypes. **Planta Medica**, v.66, p.57-62, 2000.
- WHO (World Health Organization). "**Malaria.**" *Fact Sheet n° 94*, 10/1998. Disponível em: <<http://www.who.int/inffs/en/fact094.html>>, Acesso em: 01 set. 2000.
- 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.215-9, 1991.
- ZHAO, S., ZENG, M.Y. Application of precolumn reaction to high-performance liquid chromatography of qinghaosu in animal plasma. **Analytical Chemistry**, v.58, p.289-92, 1986.