

Notas Científicas

Biomassa e composição química de genótipos melhorados de espécies medicinais cultivadas em quatro municípios paulistas

Ana Paula Artimonte Vaz⁽¹⁾, Ciro Scaranari⁽¹⁾, Luiz Alberto Rocha Batista⁽²⁾, Glyn Mara Figueira⁽³⁾, Adilson Sartoratto⁽³⁾ e Pedro Melillo de Magalhães⁽³⁾

⁽¹⁾Embrapa Transferência de Tecnologia, Av. Anchieta, nº 173, CEP 13015-100 Campinas, SP. E-mail: ana@campinas.snt.embrapa.br, ciro@campinas.snt.embrapa.br ⁽²⁾Embrapa Pecuária Sudeste, Rod. Washington Luis, Km 234, CEP 13560-970 São Carlos, SP. E-mail: lbatista@cppse.embrapa.br ⁽³⁾Universidade Estadual de Campinas, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Av. Alexandre Cazalatto, nº 999, CEP 13081-970 Paulínia, SP. E-mail: glyn@cpqba.unicamp.br, adilson@cpqba.unicamp.br, pedro@cpqba.unicamp.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de biomassa e a composição química de genótipos selecionados de *Artemisia annua* (artemisia), *Cordia verbenacea* (erva-baleeira), *Phyllanthus amarus* (quebra-pedra) e *Mikania laevigata* (guaco), nos municípios de Altinópolis, Campinas, Jales e São Carlos, no Estado de São Paulo. Ocorrem variações na produção de biomassa, assim como diferenças qualitativas e quantitativas, na composição química das plantas, em função dos locais de cultivo, destacando-se os maiores rendimentos de princípios ativos na região de Jales.

Termos para indexação: *Artemisia annua*, *Cordia verbenacea*, *Mikania laevigata*, *Phyllanthus amarus*, produção, variabilidade química.

Biomass and chemical composition of improved genotypes of medicinal plant species cultivated in four cities of São Paulo State, Brazil

Abstract – The objective of this work was to evaluate the production and chemical constituents of selected genotypes of *Artemisia annua*, *Cordia verbenaceae*, *Phyllanthus amarus* and *Mikania laevigata* cultivated in Altinópolis, Campinas, Jales and São Carlos. Biomass variations, and qualitative and quantitative differences in plants chemical composition are observed among the locations, with higher values of interesting substances being detected in Jales.

Index terms: *Artemisia annua*, *Cordia verbenacea*, *Mikania laevigata*, *Phyllanthus amarus*, production, chemical variability.

A produção de plantas medicinais representa uma alternativa inovadora e interessante para o agronegócio brasileiro (Lourenzani et al., 2004). No entanto, os compostos de interesse são metabólitos secundários, cuja produção e concentração são influenciadas por fatores ambientais e fisiológicos – principais obstáculos ao seu processamento nas indústrias de fitomedicamentos e cosméticos (Zaroni et al., 2004).

As espécies *Artemisia annua* L. (Asteraceae), *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae), *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. (Euphorbiaceae) e *Mikania laevigata* Sprengel (Asteraceae) são objetos de estudos de melhoramento no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – Unicamp, tendo sido selecionados genótipos interessantes quanto aos seus aspectos agrônômicos e à composição química relacionada com sua atividade.

Artemisia annua é uma espécie nativa da China, cujo princípio ativo, a artemisinina, tem propriedade anti-malárica bem estabelecida, enquanto seu óleo essencial tem características de produto sanitário (Magalhães et al., 1997).

A *Cordia verbenacea*, erva-baleeira, é uma espécie nativa do litoral brasileiro, tradicionalmente usada no tratamento de hematomas e contusões. Seu óleo teve suas propriedades antiinflamatórias confirmadas, e é utilizado na elaboração de medicamentos.

A espécie *Mikania laevigata*, popularmente conhecida no Brasil como guaco, é extensivamente utilizada nos tratamentos de afecções respiratórias, associada à atividade da cumarina e outros compostos (Moura et al., 2002).

Phyllanthus é um gênero com mais de 550 espécies, cuja diversidade se reflete na composição química, e possibilita diferentes aplicações medicamentosas. Das plantas de *P. amarus*, popularmente conhecido como quebra-pedra, são extraídos os compostos filantina e hipofilantina, cuja ação anti-viral, nos tratamentos de hepatite B e outras doenças crônicas do fígado, tem sido extensivamente estudada (Wongnawa et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de biomassa e a composição química de genótipos selecionados de *A. annua*, *C. verbenacea*, *M. laevigata* e *P. amarus*, nos municípios paulistas de Altinópolis, Campinas, Jales e São Carlos.

As mudas foram formadas a partir de sementes, em bandejas de isopor de 72 células e 120 cm³, com substrato enriquecido de adubo orgânico, exceção feita às plantas de *M. laevigata*, obtidas por meio de estaquia. Efetuou-se o plantio de 51 mudas de *A. annua* (1,0x0,6 m), 20 mudas de *C. verbenacea* e de *M. laevigata* (1,0x2,0 m), e 200 mudas de *P. amarus* (0,4x0,2 m), nos campos experimentais de Altinópolis (produtor privado), Campinas (Unicamp), Jales (Estação Experimental de Viticultura Tropical) e São Carlos (Embrapa Pecuária Sudeste).

Após 80 dias de cultivo, foram coletados os ramos e folhas de *A. annua* e a parte aérea de *P. amarus*; em seguida, o material vegetal foi submetido à secagem em estufa, com ventilação forçada (45°C), para a quantificação de biomassa. A colheita de *M. laevigata* e *C. verbenacea* foi realizada após 1 ano de cultivo em campo, e o material fresco foi pesado e submetido à extração de seus óleos essenciais.

Das plantas de *A. annua* extraiu-se a artemisinina, a partir de 100 mg de material seco e moído, em 5 mL de solução de acetonitrila, durante 1 minuto. O extrato foi centrifugado durante 6 minutos a 1.673 g, e alíquotas de 1 mL foram transferidas para tubos de reação de 25 mL, para derivatização com solução de NaOH 0,2%, a 40°C, durante 15 minutos. Depois do resfriamento, as soluções foram neutralizadas com 4 mL de HOAc 0,1 M (Zhao & Zeng, 1986).

Das plantas de *P. amarus* foram obtidas a hipofilantina e filantina, a partir de 200 mg de material seco e moído, em 5 mL de MeOH, durante 1 minuto. Após centrifugação por 6 minutos a 1.673 g, o sobrenadante foi filtrado em algodão e o precipitado re-extraído em 5 mL de MeOH, para posterior filtração e ajuste de volume (Souza et al., 2002).

Das plantas de *M. laevigata* extraiu-se a cumarina, a partir de 200 mg de folhas secas e moídas, em 30 mL de MeOH, durante 2 minutos. O sobrenadante foi filtrado sobre funil de placa sinterizada, e o precipitado re-extraído em 20 mL de MeOH. O extrato foi secado em rotoevaporador, e o precipitado ressuspenso em solução de acetonitrila:água (40:60 v/v) e submetido ao filtro Millex 0,45 µm (Celeghini et al., 2001).

As quantificações de artemisinina, hipofilantina, filantina e cumarina foram realizadas em cromatógrafo líquido Shimadzu (coluna C-18, 250,0x4,6 mm), com os respectivos eluentes: tampão fosfato:acetonitrila (80:20 v/v); ácido acético 3%:metanol (40:60 v/v); e acetonitrila:água (40:60 v/v).

Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação de 100 g de planta fresca, em sistema Clevenger, em balão de 1 L, adicionado de 700 mL de água destilada, durante 3 horas. A fase aquosa foi extraída com diclorometano (três vezes 50 mL), e a fase orgânica foi submetida à secagem com sulfato de sódio anidro, filtrada com algodão, e o solvente foi evaporado até a secura. O material resultante foi solubilizado em acetato de etila, e o α -humuleno foi quantificado no óleo essencial de *C. verbenacea*, em cromatógrafo a gás HP-5890, com detector de ionização de chama, e a análise qualitativa do óleo essencial de *A. annua* foi realizada em cromatógrafo a gás HP-5890, com detector seletivo de massas HP-5971, nas seguintes condições cromatográficas: coluna capilar HP-5 (30,00 m x 0,25 mm x 0,25 µm); 60°C, 3°C por minuto, 240°C; temperaturas do injetor e detector, 220 e 250°C; vazão do gás de arraste (He), 1,0 mL por minuto (Adams, 1995).

Verificou-se correlação negativa entre a produção de biomassa de *A. annua* (Tabela 1) e os teores de artemisinina, que foram mais elevados em Altinópolis e Jales (Tabela 2). O valor médio de produção de artemisinina em plantas de *A. annua*, relatado na literatura, é de 0,01 a 0,4%, atingindo, em alguns clones, o teor de 1% (Delabays et al., 1993); os resultados obtidos evidenciaram rendimentos superiores (Tabela 2). Baixos teores de óleo essencial foram extraídos das folhas de *A. annua* (Tabela 2), associados, possivelmente, ao estágio vegetativo de desenvolvimento das plantas, não adequado para a síntese e acúmulo dessas substâncias (Ferreira & Janick, 1996).

É interessante notar a variação na concentração relativa dos componentes majoritários do óleo (cânfora,

germacreno-D e trans-cariofileno), destacando-se um maior teor relativo de cânfora nas plantas cultivadas em Jales, enquanto um maior teor de germacreno-D foi observado no material colhido em São Carlos (Tabela 2).

Phyllanthus amarus apresentou pouca variação na produção de biomassa (Tabela 1), o que indica uma boa adaptabilidade aos ambientes dos municípios estudados. Os teores de hipofilantina e filantina também foram semelhantes, porém valores discretamente mais elevados foram identificados nas plantas cultivadas em Jales (Tabela 2).

As plantas de *M. laevigata*, cultivadas em São Carlos, apresentaram uma produção de biomassa três vezes superior àquela observada em Jales (Tabela 1). Porém, no material colhido neste último Município, o teor de cumarina foi até dez vezes superior ao obtido em Altinópolis – o menor de todas as análises (Tabela 2). O teor mais baixo de cumarina observado em São Carlos, quando comparado aos valores de Campinas e Jales, pode estar associado ao ciclo de vida mais curto das plantas, já florescidas na data da colheita, o que pode ter modificado a relação fonte/dreno e, conse-

qüentemente, a síntese e acúmulo de metabólitos secundários (Vaz et al., 2004).

Nos quatro municípios avaliados, as plantas de *C. verbenacea* atingiram o teor mínimo de 2,3% de α -humuleno, necessário para uso como matéria-prima em medicamentos fitoterápicos, destacando-se o material vegetal obtido em Jales e São Carlos, com maior produção de biomassa (Tabela 1), assim como de α -humuleno e de óleo essencial (Tabela 2).

Para as quatro espécies estudadas, as plantas cultivadas em Jales destacaram-se pelo maior acúmulo de metabólitos secundários de interesse, o que indica o potencial da região para o cultivo comercial de plantas medicinais.

Agradecimentos

À Embrapa Uva e Vinho e ao Dr. Jair Costa Nachtigal; à Fazenda Cruzeiro do Sul e ao Sr. Jean-Ives Rivière e Sra. Caroline Rivière, pela colaboração no plantio e condução das plantas em campo.

Referências

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. 3rd ed. Carol Stream: Allured Pub., 1995. 456p.
- CELEGHINI, R.M.S.; VILEGAS, J.H.Y.; LANÇAS, F.M. Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Spreng. (guaco) leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.12, p.706-709, 2001.
- DELABAYS, N.; COLLET, G.; BENAKIS, A. Selection and breeding for high artemisinin (qinghaosu) yielding strains of *Artemisia annua*. **Acta Horticulturae**, v.330, p.203-206, 1993.
- FERREIRA, J.F.S.; JANICK, J. Distribution of artemisinin in *Artemisia annua*. In: JANICK, J. (Ed.). **Progress in new crops**. Arlington: ASHS Press, 1996. p.579-584.
- LOURENZANI, A.E.B.S.; LOURENZANI, W.L.; BATALHA, M.O. Barreiras e oportunidades na comercialização de plantas medicinais provenientes da agricultura familiar. **Informações Econômicas**, v.34, p.15-25, 2004.
- MAGALHÃES, P.M. de; DELABAYS, N.; SARTORATTO, A. New hybrid lines of antimalarial species *Artemisia annua* L. guarantee its growth in Brazil. **Cultura e Ciência**, v.49, p.413-415, 1997.
- MOURA, R.S. de; COSTA, S.S.; JANSEN, J.M.; SILVA, C.A.; LOPES, C.S.; BERNARDO-FILHO, M.; SILVA, V.N. da; CRIDDLE, D.N.; PORTELA, B.N.; RUBENICH, L.M.S.; ARAÚJO, R.G.;

Tabela 1. Biomassa (g de MS por planta) de *Artemisia annua*, *Phyllanthus amarus*, e biomassa (g de MF por planta) de *Cordia verbenacea* e *Mikanica laevigata*, cultivadas em quatro municípios do Estado de São Paulo.

Espécie	Município			
	Altinópolis	São Carlos	Campinas	Jales
<i>A. annua</i>	45,35	127,45	113,33	65,39
<i>P. amarus</i>	20,75	18,80	20,62	16,97
<i>C. verbenacea</i>	0,32	3,15	0,86	2,86
<i>M. laevigata</i>	0,13	6,30	0,73	2,21

Tabela 2. Teores de marcadores químicos e princípios ativos de plantas de *Artemisia annua*, *Phyllanthus amarus*, *Cordia verbenacea* e *Mikanica laevigata*, cultivadas em quatro municípios do Estado de São Paulo.

Espécie	Composto (%)	Município			
		Altinópolis	São Carlos	Campinas	Jales
<i>A. annua</i>	Artemisinina	2,07	1,49	1,86	2,39
	Óleo essencial	0,08	0,08	0,03	0,10
	Cânfora	12,72	11,97	31,17	39,97
	Transcariofileno	16,38	14,90	10,36	12,45
	Germacreno D	33,35	36,82	29,12	27,06
<i>P. amarus</i>	Filantina	0,66	0,60	0,52	1,00
	Hipofilantina	0,19	0,16	0,13	0,24
<i>C. verbenacea</i>	α -Humuleno	2,38	4,05	2,92	4,42
	Óleo essencial	0,10	0,20	0,10	0,20
<i>M. laevigata</i>	Cumarina	0,06	0,30	0,42	0,56

- CARVALHO, L.C.R.M. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.54, p.249-256, 2002.
- SOUZA, T.P. de; HOLZSCHUH, M.H.; LIONÇO, M.I.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; PETROVICK, P.R. Validation of a LC method for the analysis of phenolic compounds from aqueous extract of *Phyllanthus niruri* aerial parts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.30, p.351-356, 2002.
- VAZ, A.P.A.; SANTOS, H.P.; ZAIDAN, L.B.P. Floração. In: KERBAUY, G.B. (Ed.). **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. v.1, p.366-385.
- WONGNAWA, M.; THAINA, P.; BUMRUNGWONG, N.; NITIRUANGJARAT, A.; MUSO, A.; PRASARTTHONG, V. Effect of *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. and its protective mechanism on paracetamol hepatotoxicity in rats. **Acta Horticulturae**, v.680, p.195-201, 2005.
- ZARONI, M.; PONTAROLO, R.; ABRAHÃO, W.S.M.; FÁVERO, M.L.D.; CORREA JÚNIOR, C.; STREMEL, D.P. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, p.29-39, 2004.
- ZHAO, S.; ZENG, M. Y. Application of precolumn reaction to high-performance liquid chromatography of qinghaosu in animal plasma. **Analytical Chemistry**, v.58, p.289-292, 1986.

Recebido em 11 de março de 2005 e aprovado em 28 de novembro de 2005