CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE ARTEMISIA (*Artemisia annua* L.) SUBMETIDA A ESTRESSE SALINO

Eliane Batista Viudes, Ana Cláudia Pacheco Santos

[1] Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Presidente Prudente – SP E-mail: eliane-viudes@hotmail.com

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi identificar através de análises fisiológicas e bioquímicas as alterações em plantas de artemísia sob estresse salino. O experimento foi conduzido em casa de vegetação e a imposição do estresse se deu através da irrigação com solução de NaCl (0, 100 e 200 mM) na frequência de 3 vezes por semana, durante 45 dias. O efeito do estresse foi avaliado pelas variáveis: altura, massa seca, teores foliares de Na e K, índice de estabilidade de membrana e teor de malondealdeído. O arranjo experimental foi o inteiramente casualizado, com 3 tratamentos e 15 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias. Concluiu-se que em níveis muito elevados (200 mM) o estresse salino pode ser considerado prejudicial à espécie, caracterizando um estresse severo. Na presença do NaCl as plantas diminuem a produção de biomassa e apresentam alterações fisiológicas e bioquímicas, indicadoras de oxidação das células. Assim sendo, não é aconselhável a produção desta planta medicinal em solos com salinidade muito elevada.

Palavras-chave: planta medicinal; cloreto de sódio, IEM; MDA.

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION IF ARTEMISIA PLANT (*ARTEMISIA ANNUA* L.) UNDER SALINE STRESS

ABSTRACT

The goal of this study was to identify through physiological and biochemical analyzes changes in artemisia plants under salt stress. Plants under greenhouse conditions were irrigated with solutions of NaCl (0, 100 and 200 mM), 3 times a week, for 45 days. The effect of stress was evaluated by the variables: plant height; dry matter production; foliar concentrations of Na and K; membrane stability index; and malondealdeide content. The experimental arrangement was completely randomized with 15 treatments and 3 replications. Data were subjected to analysis of variance and means comparison. It was concluded that at very high levels (200 mM) stress can be considered detrimental to the specie, featuring a severe stress. In the presence of NaCl, the plants decrease its dry matter production and show physiological and biochemical changes indicative of cell oxidation damage. Therefore, it is not advisable the production of this medicinal plant in soils with very high salinity.

Keywords: medicinal plant; sodium chloride; IEM; MDA.

INTRODUÇÃO

A artemísia (*Artemisia annua* L.), também conhecida como artemísia-chinesa, é uma erva anual e aromática, da família Asteraceae, nativa da Ásia (BRUNETON, 1995). Esta planta vem sendo usada há séculos na medicina tradicional da China e da Índia no tratamento das crises de febre e lúpus eritematoso.

A artemisinina, constituinte desta planta, foi descoberta em 1972 e revolucionou a terapêutica antimalárica. Ela age especialmente sobre o *Plasmodium falciparum,* um dos mais virulentos agentes causadores da malária. Além disso, o artesunato também é capaz de devolver rapidamente a consciência dos pacientes com malária cerebral (LORENZI ; MATOS, 2002).

Em condições naturais e agricultáveis, as plantas estão frequentemente expostas ao estresse ambiental. A manifestação desse estresse nas plantas pode levar desde alguns minutos, dias, semanas e até meses (BOYER, 1982).

O estresse salino é em geral definido como um fator externo, que exerce uma influência desvantajosa sobre a planta. Esse estresse pode ser medido em relação à sobrevivência, produtividade, acúmulo de biomassa ou o processo primário de assimilação, que estão relacionados ao crescimento geral da planta. Através destes parâmetros identificamos a aptidão da planta para enfrentar um ambiente desfavorável, ou seja, se ela é capaz de tolerar este tipo de estresse. Assim, exposta ao estresse e não apresentando efeito negativo, diz-se que a planta está aclimatada (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As plantas tolerantes a elevadas concentrações de sal são classificadas como halófitas, as quais apresentam a capacidade de acumular uma grande quantidade de Na^+ e Cl^- (UNGAR, 1991). As glicófitas, por sua vez, apresentam pouca tolerância à salinidade. Enquanto que as halófitas crescem em ambientes com concentrações salinas que variam de 50 a 500 mM, a maioria das glicófitas apresenta redução do crescimento quando a salinidade supera os 10 mM (ORCUTT; NIELSEN, 2000).

A salinidade causa alguns efeitos no crescimento e desenvolvimento das plantas. O efeito osmótico ocorre porque a elevada concentração salina diminui o potencial osmótico do solo, fazendo com que este retenha mais água, disponibilizando-a em menor quantidade para a planta (GHEYI, 2000). O efeito tóxico é caracterizado pelo acúmulo de íons específicos na planta. Por exemplo, um excesso de Na^+ e de Cl^- no protoplasma ocasiona distúrbios, afetando a fotofosforilação, a cadeia respiratória, a assimilação de nitrogênio e o metabolismo das proteínas. Esses íons começam a inibir a maioria das enzimas envolvidas nesses

processos, a uma concentração acima de 100 mM (LARCHER, 2000; MUNNS ; TERMAAT, 1986). Por fim, tem-se o efeito nutricional, no qual o excesso de um íon no solo inibe a absorção de outros íons. Por exemplo, quando a concentração de Na^+ e Cl^- no solo é alta, a absorção de nutrientes minerais, especialmente NO^{3-}, K^+ e Ca^{2+} é quase sempre reduzida (MARSCHNER, 1995). Este conjunto de danos permanentes pode provocar a morte da planta.

Os solutos dissolvidos na zona das raízes geram um potencial osmótico baixo, que diminui o potencial hídrico do solo. Assim, o balanço hídrico geral das plantas é afetado. Esse efeito de solutos dissolvidos é similar ao de um déficit hídrico do solo e a maioria das plantas responde aos níveis excessivos de salinidade no solo do mesmo modo para o déficit hídrico (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi identificar por meio de análises fisiológicas e bioquímicas as alterações ocorridas em plantas de artemísia cultivadas em condições de estresse salino.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação, no município de Presidente Prudente-SP. As mudas foram obtidas a partir de sementes de artemísia (*Artemisia annua* L.) doadas pelo CPQBA/UNICAMP. Após 60 dias, quando as mudas atingiram uma altura média de 15 cm, foi realizado o transplante das mesmas para vasos com capacidade de 8 kg, preenchidos com mistura de substrato comercial, terra e areia (proporção 1:1:1).

A imposição de estresse salino foi iniciada aos 15 dias após o transplante, através da irrigação com solução de NaCl nas concentrações 0, 100 e 200 mM. As regas foram efetuadas numa frequência de 3 vezes por semana, durante um período de 45 dias. A quantidade de solução aplicada em cada vaso foi determinada em função da capacidade de vaso, de acordo com a saturação do substrato. Para tanto, foi determinada a capacidade de vaso pelo método gravimétrico, o qual consiste na reposição da água evapotranspirada diariamente.

O efeito do estresse salino foi avaliado pelas seguintes variáveis: altura de plantas, massas secas de parte aérea e raiz, teores foliares de Na^+ e K^+, análise de malondealdeído (MDA) e condutividade elétrica (IEM).

A altura de plantas (cm) foi determinada através de uma fita métrica aos 50 dias após o início do estresse. As massas secas de parte aérea e raiz foram determinadas através da secagem do material em estufa de circulação de ar à 60ºC, até obtenção de massa constante. Os

teores foliares de Na^+ e K^+ foram determinados no Laboratório de Análise de Solos e Tecido Foliar da UNOESTE.

A análise de MDA (malondealdeído) foi baseada na metodologia de Cakmak e Horst (1991) com algumas modificações. O índice de estabilidade de membrana (IEM) foi avaliado indiretamente pela condutividade elétrica, através de medições de dispersão de íons para verificar o grau de integridade da membrana plasmática, de acordo com Rizhsky et al. (2002).

O experimento foi realizado em arranjo inteiramente casualizado, com 3 tratamentos e 15 repetições em cada tratamento. Os dados obtidos em todas as análises foram submetidos à análise de variância através do programa estatístico ASSISTAT, avaliando-se o comportamento das variáveis em função das concentrações de NaCl aplicadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De modo geral, o estresse salino influenciou negativamente os parâmetros biométricos de altura e massa seca da raiz e parte aérea (Tabela 1). As plantas submetidas às concentrações de 100 e 200 mM de NaCl sofreram uma redução na altura de 26,4 e 41,6% respectivamente, em relação às plantas controle. Em relação à massa seca de parte aérea e raiz, as plantas submetidas ao estresse com 100 mM não apresentaram alterações significativas. Porém, as plantas submetidas à concentração de 200 mM apresentaram reduções de 78,6 e 73,5% nas massas seca de raiz e parte aérea respectivamente em relação às plantas controle (Tabela 1). Deste modo, podemos afirmar que a concentração de 100 mM resulta em um grau de estresse suportável pela artemísia, já a concentração de 200 mM se caracterizou como um estresse severo, interferindo na produção de biomassa da planta.

Desta forma, podemos considerar a artemísia como uma planta halófita, ou seja, que suporta ambientes com concentrações salinas elevadas, de 50 a 500 mM de NaCl, diferente das plantas glicófitas que apresentam redução de crescimento quando a salinidade supera 10 mM de NaCl (ORCUTT; NIELSEN, 2000).

Tabela 1. Altura de plantas, massa seca de raiz e massa seca de parte aérea em plantas de Artemísia (*Artemisia annua*) submetidas ao estresse salino.

	Altura (cm)
Controle	51,61 a
100 mM NaCl	38,00 b
200 mM NaCl	30,15 c
F	42,4925 **
	Massa seca de raízes (g)
Controle	12,31 a
100 mM NaCl	8,00 ab
200 mM NaCl	2,63 b
F	3,83 *
	Massa seca da parte aérea (g)
Controle	17,64 a
100 mM NaCl	12,77 a
200 mM NaCl	4,67 b
F	19,61 **

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey.
*Significativo a 5% de probabilidade. ** Significativo a 1% de probabilidade.

Na análise de MDA (malondealdeído), que é feita para indicar o grau de dano oxidativo nas membranas, onde os lipídeos são transformados em aldeído por ação do estresse, não houve grandes diferenças estatísticas entre as plantas controle e as submetidas à concentração de 100 mM de NaCl (Tabela 2). Mas houve uma diferença de 81,7% entre as plantas controle e as submetidas à concentração de 200 mM de NaCl, indicando que o grau de dano oxidativo nas membranas, onde a peroxidação lipídica formando aldeído por ação do estresse é alta. Este dano é um efeito de toxicidade iônica que ocorreu devido à concentração de Na^+ acumulada nas células (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Já na análise de IEM (índice de estabilidade da membrana), técnica que permite avaliar a integridade das membranas celulares como indicadora de estresse, observa-se que a concentração de 100 mM de NaCl não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos, mas o valor do IEM foi 14% menor nas plantas submetidas à concentração de 200 mM de NaCl, comprovando a ocorrência de danos à integridade de suas membranas, verificados pelo extravasamento de eletrólitos celulares. Assim, quanto mais alta a concentração de sais na água tanto maior é a sua condutividade elétrica e tanto mais baixo é o seu potencial osmótico (mais alta a pressão osmótica) (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Tabela 2. Teor de malondealdeído (MDA) e índice de estabilidade de membrana (IEM) em plantas de artemísia (*Artemisia annua*) submetidas ao estresse salino.

	MDA (nmol.ml^{-1})
Controle	1,160 b
100 mM NaCl	1,263 b
200 mM NaCl	2,108 a
F	25,49 **
	IEM (%)
Controle	82,53 a
100 mM NaCl	78,78 ab
200 mM NaCl	72,36 b
F	7,01 **

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey.
*Significativo a 5% de probabilidade. ** Significativo a 1% de probabilidade.

Com relação à análise da quantidade de K^+ e Na^+ presentes nas folhas, podemos observar que a quantidade de Na interfere na absorção de K^+, pois na concentração de 200 mM a quantidade de Na^+ foi bem elevada e de K bem baixa (Tabela 3). Na presença de estresse salino ocorre uma alta relação Na^+/K^+, bem como uma concentração elevada de sais totais, inativando enzimas e inibindo a síntese proteica (TAIZ; ZEIGER, 2004). Tal alteração interfere na produção de biomassa da planta, já que o K desempenha um papel considerável na regulação do potencial osmótico das células vegetais, além de ser um ativador enzimático importantíssimo, inclusive na fotossíntese e respiração.

A diminuição do K^+ ocorre em decorrência do aumento de Na^+, pois a presença do Na no meio radicular pode inibir a absorção de K devido à relação competitiva entre estes cátions monovalentes (KAWASAKI et al., 1983). Em um trabalho com a cultura do milho, os resultados foram similares, pois a salinidade do solo afetou significativamente os teores de K nas folhas do milho aos 120 DAP (dias após o plantio) decrescendo linearmente seus valores com o aumento dos níveis de salinidade do solo (GARCIA et. al., 2007).

Tabela 3. Teores foliares de potássio e sódio presentes nas folhas de plantas de artemísia (*Artemisia annua*) submetidas ao estresse salino.

	K	**Na**
	($mg.kg^{-1}$)	
Controle	20,2	97,5
100 mM	28,2	475,7
200 mM	14,0	477,8

Na literatura podemos encontrar poucos trabalhos referentes ao efeito da salinidade em plantas medicinais. Keshavarzi (2012), em um estudo sobre o efeito da salinidade na germinação e desenvolvimento inicial *de Artemisia annua*, afirma-se que em todos os parâmetros avaliados as plantas controle foram as que obtiveram um melhor resultado. A partir da concentração de 100 mM de NaCl, a germinação e o desenvolvimento diminuíram significativamente e em 150 mM já não houve germinação das sementes. Este trabalho indica a extrema sensibilidade dessa planta à salinidade, não sendo aconselhável o seu cultivo em solos salinos.

Em outro trabalho com a mesma espécie, onde o objetivo era aumentar a quantidade do composto artemisinina (antimalárico) na planta como resposta ao estresse, foi constatado que nas plantas tratadas com NaCl (4 a 6 $g.L^{-1}$), a quantidade de artemisinina aumentou significativamente, até 2-3% do peso seco, em comparação com a planta controle que foi 1% do peso seco (QIAN et al., 2007). Desta forma, a indução de estresse por salinidade pode se constituir em uma ferramenta para a promoção de maiores teores de artemisinina em plantas de artemísia, aumentando o seu valor como matéria prima para a indústria de medicamentos. Entretanto, a relação custo-benefício para a planta deve ser considerada ao se utilizar este procedimento, desde que em concentrações mais elevadas de NaCl ocorre uma diminuição drástica da produção de biomassa associada com alterações metabólicas que tornam desvantajosa a utilização de estresse para aumento da artemisinina.

CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos, concluiu-se o estresse salino em níveis muito elevados (200 mM) pode ser considerado prejudicial à *Artemisia annua* L., caracterizando-se um estresse severo. Na presença do NaCl as plantas reduziram a produção de biomassa e apresentaram danos fisiológicos e bioquímicos indicadores de estresse oxidativo das células, podendo levar à clorose, necrose e até morte da planta, se

houver permanência por muito tempo em situação de estresse salino. Assim sendo, não é aconselhável a produção desta planta medicinal em solos com salinidade muito elevada.

REFERÊNCIAS

BOYER, J.S. Plant productivity and environment. **Science,** v. 218, n. 4571, p. 443-448, 1982. http://dx.doi.org/10.1126/science.218.4571.443

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, phytochensnistry, medicinal plants.** Paris: TEC & DOC, 1995.

CAKMAK, I.; HORST, J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v. 83, p. 463–468, 1991.

GARCIA, G.O.; FERREIRA P.A.; MIRANDA, G.V.; MORAES, W.B.; SANTOS, D.B. Teores foliares dos macronutrientes catiônicos e suas relações com o sódio em plantas de milho sob estresse salino. **Idesia**, v.25, n.3, p. 93-106, 2007.

GHEYI, H. R. Problemas de salinidade na agricultura irrigada. In: OLIVEIRA, T. S.; ASSIS JR., R. N.; ROMERO, R. E.; SILVA, J. R. C. (eds). **Agricultura, sustentabilidade e o semi-árido.** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 2000, p. 329-346.

KAWASAKI, T.; AKIBA, T.; MORITSUGU, M. Effects of high concentrations of sodium chloride and polyethylene glycol on the growth and ion absorption in plants: I. Water culture experiments in a greenhouse. **Plant and Soil**, v.75, p.75-85, 1983.

KESHAVARZI, M. H. B. The effect of different nacl concentration on germination and early seedling growth of *Artemisia annua* L. **International Journal of Agriculture: Research and Review,** v.2, n.3, p.135-140, 2012.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal.** São Carlos: Rima Artes e Textos, 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil:** Nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants.** 2. ed. London: Academy Press,1995.

MUNNS, R.; TERMAAT, A. Whole-plant responses to salinity. **Australian Journal Plant Physiology**, v.13, n.1, p.143-160, 1986. http://dx.doi.org/10.1071/PP9860143

ORCUTT, D.M.; NILSEN, E.T. **Physiology of plants under stress**. New York: John Willey and Sons, 2000.

QUIAN, Z. et. al. A simple and efficient procedure to enhance artemisinin content in Artemisia annua L. by seeding to salinity stress. **African Journal of Biotechnology**, v.6, n.12, p.1410-1413, 2007.

RIZHSKY, L.; HALLAK-HERR, E.; VAN BREUSEGEM, F.; RACHMILEVITCH, S.; BARR, J.E.; RODERMEL, S.; INZÉ, D.; MITTLER, R. Double antisense plants lacking ascorbate peroxidade and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidade or catalase. **The Plant Journal**, v.32, p.329-342, 2002. http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01427.x

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

UNGAR, I.A. **Ecophysiology of vascular halophytas**. Boca Raton: CRC, 1991.