

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO DO MECANISMO FOTOSSINTÉTICO E
ASPECTOS RELACIONADOS À FLORAÇÃO DE *Artemisia annua* L.**

JOSÉ ABRAMO MARCHESE

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp - Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia - Área de Concentração em Horticultura.

BOTUCATU-SP
Fevereiro - 2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO DO MECANISMO FOTOSSINTÉTICO E
ASPECTOS RELACIONADOS À FLORAÇÃO DE *Artemisia annua* L.**

JOSÉ ABRAMO MARCHESE

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Fernando Broetto

Co-orientadora: Dra. Rita M. Moraes

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp - Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia - Área de Concentração em Horticultura.

BOTUCATU - SP

Fevereiro – 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E
TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO
UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Marchese, José Abramo, 1967-
M316c Caracterização do mecanismo fotossintético e aspectos
relacionados à floração de *Artemisia annua* L. / José Abra-
mo Marchese. - Botucatu : [s.n.], 2006.
xiii, 68 f. : il. color., gráfs., tabs.

Tese (Doutorado) -Universidade Estadual Paulista, Fa-
culdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2005
Orientador: Fernando Broetto
Co-orientador: Rita Maria Moraes
Inclui bibliografia.

1. Fotossíntese. 2. Carbono - Isótopos. 3. Fotoperiodismo
vegetal. 4. Plantas - Efeito da temperatura. 5. Artemísia
- Floração. I. Broetto, Fernando. II. Moraes, Rita Maria.
III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Fi-
lho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômi-
cas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

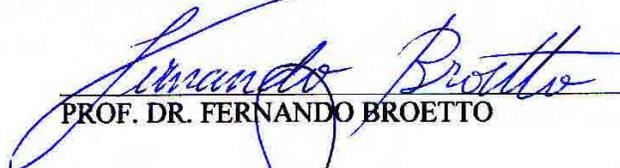
**TÍTULO: "CARACTERIZAÇÃO DO MECANISMO FOTOSSINTÉTICO E ASPECTOS
RELACIONADOS À FLORAÇÃO DE Artemisia annua L."**

ALUNO: JOSÉ ABRAMO MARCHESE

ORIENTADOR : PROF. DR. FERNANDO BROETTO

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. RITA MARIA MORAES

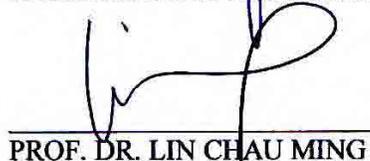
Aprovado pela Comissão Examinadora:



PROF. DR. FERNANDO BROETTO



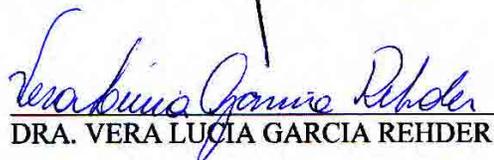
PROF. DR. JOÃO DOMINGOS RODRIGUES



PROF. DR. LIN CHAU MING



PROF. DR. CICERO DESCHAMPS



DRA. VERA LUCIA GARCIA REHDER

Data da Realização: 03 de fevereiro de 2006.

OFERECIMENTOS

Aos milhões de seres humanos,
principalmente as crianças africanas,
que já morreram por causa da malária....

Aos milhões de seres humanos,
principalmente as crianças africanas,
que estão morrendo por causa da malária....

Aos milhões de seres humanos,
principalmente as crianças africanas,
que infelizmente,
ainda vão morrer por causa da malária....

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mostrar que perseverar no bem é sinônimo de boa colheita, e por sempre permitir um recomeço;

À minha mãe, Leda Marchese, exemplo de vida, viúva, mãe de quatro filhos, pelo apoio e educação;

À minha esposa, Cristine, por ser paciente, companheira e estar ao meu lado nos momentos difíceis e nos agradáveis da nossa vida, e, principalmente, pelo amor dedicado a mim e nossas filhas;

Às minhas crianças, Cibele, Amanda e Julia, motivo do meu viver;

Aos meus irmãos, Victor Hugo, Adriana e Nelsa Alessandra, pela amizade;

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, por ter concedido licença para eu cursar o doutorado;

À Pós-Graduação em Agronomia – Horticultura da FCA/UNESP, pela oportunidade de cursar o doutorado;

À CAPES/PICDT, pela concessão da bolsa de estudos e financiamento;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Broetto, pela amizade, orientação, confiança e liberdade de expressão das minhas idéias;

Aos docentes da PPG em Agronomia – Horticultura, em especial aos Professores Dr. Lin Chau Ming, Dra. Romy Goto e Dr. João Domingos Rodrigues, pelas contribuições, amizade, confiança e momentos de descontração;

Ao CPQBA/UNICAMP, especialmente a Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder, pela amizade e auxílio na execução deste trabalho;

À Dra. Rita Maria Moraes, pelo apoio, amizade e auxílio na revisão e discussão deste trabalho;

Aos Professores Dr. Carlos Ducatti, Dr. Antonio Rodella e Dra. Marília Ventrella, pelo apoio nos experimentos;

Aos funcionários da Seção de Horticultura, especialmente a Rosimeire, e as Sras. Ana e Neusa, pelo apoio e amizade;

À acadêmica Patrícia Fernandes Vendramini e aos funcionários do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do IBB/UNESP, Evandro e Cibele, pela amizade e auxílio na execução deste trabalho;

Aos agrônomos Rodrigo Lira e Ângela Tedesco, egressos do curso de Agronomia da UTFPR (ex-bolsistas PIBIC/CNPq) pelo auxílio na execução deste trabalho;

Aos colegas da FCA, Mirian Baptista Stefanini, Maria Izabel Radomski, Francisco Celio Maia Chaves, Ari de Freitas Hidalgo, Magnólia Aparecida Silva da Silva, Marcos Paron, Polyana Aparecida Ehlert, Marcelo Leonardo, Ieoshua katz, Deborah Beniacar Castro Hermínio, Magali Regina, Santino Seabra Júnior, Valdemir Antonio Laura, Milena Andréa Curitiba Pilla, Raquel de Souza Mattana, Crystian Iezid Maia de Almeida, Sílvio César Pantano, Roselaine Facanali, Marco Antonio Tecchio, Luís Felipe Villani Purquerio, Cristiane Porto Viegas Guerreiro, Lenita Lima Haber, Clayton Debiasi, Luciana Maestro Borges, Luciana Costa Lima, Carlos Luiz Milhomem de Abreu, Cristiaini Kano, Fábio Bechelli Tonin, Rerison Catarino da Hora, Evelize de Fátima Saraiva David, Elisangela Clarete Camili, Cássia Regina Yuriko Ide Vieira, Ernesto Oliveira Serra Pinto, Haydée Siqueira Santos, Ulise Ramon Arias Bazan, Rosa de Belem Alves, Ary Gertes Carneiro Junior, Maria dos Anjos Gonçalves Costa, Maria Aparecida Ribeiro Vieira, pelo companherismo nos momentos de amizade, estudo, trabalho e lazer;

Enfim, agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
1 RESUMO	01
2 SUMMARY	03
3 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	05
4 JUSTIFICATIVAS.....	16
5 OBJETIVOS.....	18
6 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
6.1 Experimentos com isótopos de carbono e anatomia foliar para identificar o mecanismo fotossintético de <i>A. annua</i>	19
6.2 Experimentos em câmara fotoperiódica para o estudo da fisiologia da floração do genótipo CPQBA 2/39X1V de <i>A. annua</i>	22
6.2.1 Experimento 01 (primavera/verão).....	22
6.2.2 Experimento 02 (outono/inverno)	23
6.3 Experimentos com aplicação exógena de artemisinina	26
6.3 Experimento em campo para definição da época de plantio e fisiologia da floração do genótipo CPQBA 2/39X1V de <i>A. annua</i>	27
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
7.1 Experimentos com isótopos de carbono e anatomia foliar para identificar o mecanismo fotossintético de <i>A. annua</i>	33
7.2 Experimentos em câmara fotoperiódica para o estudo da fisiologia da floração do genótipo CPQBA 2/39X1V.....	37
7.3 Experimento em campo para definição da época de plantio e fisiologia da floração do genótipo CPQBA 2/39X1V.....	48
8 CONCLUSÕES.....	59
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Relação das datas e temperaturas das geadas ocorridas nos anos de 2000 e 2001, na área onde foi instalado o experimento em Pato Branco - PR (26°11'S e 52°36'W – 760 m alt.)	29
2	Valor médio da composição isotópica de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) _{PDB} , para <i>A. annua</i> (genótipo CPQBA 2/39x1V)	34
3	Efeito de distintos fotoperíodos na indução da floração (emissão dos botões florais) em plantas de dois genótipos de <i>A. annua</i> (chinês e vietnã) cultivados na primavera/verão	38
4	Efeito de distintos fotoperíodos e temperaturas na indução da floração (emissão dos botões florais) em plantas do genótipo vietnã de <i>A. annua</i> cultivadas em primavera/verão e outono/inverno	38
5	Datas de plantio, transplante e florescimento do genótipo 2/39x1V de <i>A. annua</i> em Pato Branco-PR, Brasil (26°07'S e 52°41'W – 760 m alt.)	50
6	Efeito de diferentes épocas de transplante na produção de artemisinina, rendimento da fitomassa seca e razão folha/caule no genótipo CPQBA 2/39x1V de <i>A. annua</i>	53
7	Comparação dos dados de rendimento de fitomassa e artemisinina obtidos em Pato Branco-PR (26°07'S e 52°41'W – 760m alt.) e Campinas-SP (22°47'S e 47°06'W – 606m alt.) para o genótipo CPQBA 2/39x1V de <i>A. annua</i>	56

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Endemicidade da malária no mundo segundo a organização mundial de saúde (WHO, 2005)	6
2	Casos de malária reportados no Brasil no período 1990-2003, segundo a Organização Mundial de Saúde – OMS (WHO, 2005)	7
3	Artemisinina e alguns de seus derivados semi-sintéticos antimaláricos (TARANTO et al., 2005)	9
4	Ao fundo, plantas do acesso CPQBA 2/39x1V de <i>Artemisia annua</i> L. cultivadas no CPQBA/UNICAMP, Campinas-SP (22 ^o 47'S, 47 ^o 06'W, alt. 606 m).	11
5	Folhas secas de <i>A. annua</i> sendo moídas em moinho criogênico a -196 ^o C (A); adição de amostras finamente moídas em cápsulas de estanho (B); espectrômetro de massas acoplado a um analisador elemental (C)	20
6	Câmaras fotoperiódicas individuais com temporizador para fotoperíodo usadas nos experimentos para determinar o fotoperíodo indutivo e o número de ciclos fotoindutivos aproximados para os genótipos chinês e vietnã de <i>A.annua</i> . UTFPR, Pato Branco-PR, 2000	24
7	Temperaturas máxima e mínima diárias no período de realização dos experimento primavera/verão e outono/inverno. UTFPR, Pato Branco-PR (26 ^o 11'S e 52 ^o 36'W – 760 m alt.)	25
8	Temperaturas máxima e mínima (^o C) diárias no período de realização do experimento (18/08/00 a 09/08/01) em Pato Branco, PR. Fonte: IAPAR	28
9	Médias mensais de precipitação e temperaturas máx. e mín. no período de realização do experimento (18/08/00 a 09/08/01) em Pato Branco – PR. Fonte: IAPAR	28
10	Detalhe de uma das parcelas do experimento em campo para definição da época de plantio e fisiologia da floração do acesso CPQBA 2/39x1V. B - Detalhe do processamento das plantas após a colheita e previamente a secagem. UTFPR, Pato Branco-PR, 2000.	30
11	Conversão de artemisinina em Q260, segundo ZHAO & ZENG (1986)	32
12	Corte transversal de folha de <i>A. annua</i> com teste com Xylidine Ponceau para proteínas totais. Celulas do parênquima paliçádico (CPP); células do parênquima esponjoso (CPE); bainha vascular (BV); células da bainha vascular (CBV); epiderme adaxial (EAD); epiderme abaxial (EAB); cloroplastos (C). **Verifica-se a presença de cloroplastos em todo o parênquima clorofiliano (CPP e CPE) e a *ausência destas estruturas nas células da bainha vascular (CBV)	35
13	Corte transversal de folha de <i>A. annua</i> com teste PAS (Ácido periódico/reagente de Schiff) para carboidratos totais. Células do parênquima paliçádico (CPP); células do parênquima esponjoso (CPE); bainha vascular (BV); celulas da bainha vascular (CBV); epiderme adaxial	36

- (EAD); epiderme abaxial (EAB); estômato (EST); amido (A). **Verifica-se a presença de grãos de amido em todo o parênquima clorofiliano (CPP e CPE) e a *ausência destas estruturas nas células da bainha vascular (CBV)
- 14 Efeito de diferentes fotoperíodos no comprimento do caule e número de entrenós dos genótipos vietnã (A) e chinês (B) de *A. annua* cultivados em temperaturas médias de 37°C (máx.) e 19°C (mín.) durante a primavera/verão. IF = início do florescimento (emissão dos botões florais). DAT = dias após o transplante 40
- 15 Efeito de diferentes fotoperíodos no comprimento do caule e número de entrenós do genótipo vietnã de *A. annua* cultivado em temperaturas médias de 37°C (máx.) e 19°C (mín.) durante a primavera/verão (A) e 29°C (máx.) e 13°C (mín.) durante o outono/inverno (B). IF = início do florescimento (emissão dos botões florais). DAT = dias após o transplante 41
- 16 Efeito de dias curtos (dados agrupados dos tratamentos com 7, 9, 11 horas de luz) e dias longos (dados agrupados dos tratamentos com 13, 15 e 17 horas de luz) no comprimento do caule dos genótipos vietnã (A) e chinês (B) de *A. annua* cultivados em temperaturas médias de 37°C (máx.) e 19°C (mín.) durante a primavera/verão. IF = início do florescimento (emissão dos botões florais). DAT = dias após o transplante 42
- 17 Efeito de dias curtos (dados agrupados dos tratamentos com 7, 9, 11 horas de luz) e dias longos (dados agrupados dos tratamentos com 13, 15 e 17 horas de luz) no comprimento do caule e número de entrenós do genótipo vietnã de *A. annua* cultivado em temperaturas médias de 37°C (máx.) e 19°C (mín.) durante a primavera/verão (A) e 29°C (máx.) e 13°C (mín.) durante o outono (B). IF = início do florescimento (emissão dos botões florais). DAT = dias após o transplante 43
- 18 Efeito de dias curtos (dados agrupados dos tratamentos com 7, 9, 11 horas de luz) e dias longos (dados agrupados dos tratamentos com 13, 15 e 17 horas de luz) no teor de artemisinina do genótipo vietnã de *A. annua* cultivado em temperaturas médias de 29°C (máx.) e 13°C (mín.) durante o outono/inverno. IF = início do florescimento (função da média de ciclos fotoindutivos dos tratamentos 7, 9, 11 horas de luz). DAT = dias após o transplante 46
- 19 Influência de diferentes concentrações de artemisinina no número de entrenós e no comprimento do caule de plantas dos genótipos CPQBA 3MxPOP (A) e vietnã (B) de *A. annua* cultivados em dias curtos 47
- 20 Fotoperíodo anual em Pato Branco-PR, Brasil (latitude 26°07' S, longitude 52°41' W, altitude de 760m) e caracterização do florescimento de *A. annua* (CPQBA 2/39x1V). FI = fotoperíodo indutivo; TP = transplante para o campo; FL = emissão do botão floral; CF = número de ciclos fotoindutivos 49
- 21 Médias das temperaturas médias mensais em Campinas-SP (22°47'S e 47°06'W – 606m alt.) e Pato Branco-PR (26°07'S e 52°41'W – 760m alt.). Fonte: IAPAR, 1994; CIIAGRO/IAC, 2005 51
- 22 Rendimento da fitomassa seca e artemisinina, razão folha/caule e teor de artemisinina do genótipo CPQBA 2/39x1V de *A. annua* em função de diferentes datas de plantio: 23/09/2000 (165 DAT) ; 20/11/2000 (111 DAT); 54

- 16/01/2001 (63 DAT); 07/02/2001 (41 DAT); 05/03/2001 (28 DAT);
10/07/2001 (31 DAT)
- 23 Épocas de plantio (primavera) e colheita (outono) em função do fotoperíodo anual em diferentes locais de cultivo de *A. annua* nos hemisférios Sul (5°S = Teresina-PI; 22°S = Campinas-SP; 26°S = Pato Branco-PR; 43°S = Tasmania, Australia) e Norte (47°N = Bulgária; 40°N = West Lafayette, IN, EUA e 26°N = Lucknow, India). Fonte: GALAMBOZI (1980); LAUGHLIN (1993); MAGALHÃES *et al.* (2004); HAIDER *et al.* (2004); KUMAR *et al.* (2004); FERREIRA *et al.* (2005) 55

1 RESUMO

Artemisia annua L. (Asteraceae) é uma planta herbácea altamente aromática, nativa da Ásia e aclimatada no Brasil. As folhas são fonte abundante de artemisinina, uma lactona sesquiterpênica que, conjuntamente aos seus derivados semi-sintéticos, apresentam ação efetiva contra as cepas resistentes das espécies de *Plasmodium* causadoras da malária. Os objetivos deste trabalho foram identificar o mecanismo fotossintético e avaliar o efeito de diferentes condições de temperatura e fotoperíodo no crescimento e desenvolvimento do acesso CPQBA 2/39x1V de *A. annua*. Para identificar o mecanismo fotossintético foram realizados experimentos para determinar composição dos isótopos do carbono ($\delta\%^{13}\text{C}$) e a anatomia foliar associada a testes histoquímicos. Para avaliar o efeito da temperatura e fotoperíodo no crescimento e desenvolvimento de *A. annua* foram realizados dois experimentos em câmaras fotoperiódicas (o primeiro com temperaturas médias máx. de 37°C e mín. de 19°C e o segundo com máx. de 29°C e mín. de 13°C) e um experimento com 6 épocas de plantio em campo no município de Pato Branco-PR (26°11' S, 52°36' W e 760 m de altitude), sul do Brasil. Um último experimento realizado, foi a aplicação exógena de artemisinina em plantas de *A. annua* para verificar o papel da molécula na indução do florescimento. Como resultados, *A. annua* apresentou uma $\delta\%^{13}\text{C} = - 31.76 \pm 0.07$, valor típico de espécies com mecanismo fotossintético C_3 , que apresentam em média valores de

$\delta_{\text{‰}}^{13}\text{C} = -28$. Os estudos da anatomia foliar e testes histoquímicos confirmaram os resultados encontrados para a $\delta_{\text{‰}}^{13}\text{C}$, onde, a despeito da existência de células parenquimáticas formando um anel ao redor do feixe vascular, estas não apresentaram cloroplastos e amido, confirmando ser *A. annua* uma espécie de mecanismo fotossintético C_3 . A aplicação exógena de artemisinina não induziu as plantas de *A. annua* ao florescimento e esse resultado sugere que a molécula de artemisinina não está diretamente relacionada com a indução floral na espécie, ainda que o acúmulo da artemisinina ocorra nas fases de pré-floração e floração. Nos experimentos em casa de vegetação, uma das principais observações para o acesso 2/39x1V foi uma forte interação entre fotoperíodo e temperatura na indução ao florescimento das plantas testadas, onde as temperaturas menores ocorridas no experimento outono, máx. de 29°C e mín. de 13°C, induziram a um maior florescimento nas plantas dos tratamentos com dias curtos, em detrimento daquelas submetidas às temperaturas maiores no experimento primavera/verão, com máx. de 37°C e mín. de 19°C. Pode-se afirmar que os clones do acesso 2/39x1V apresentaram um comportamento fotoperiódico de Planta de Dias Curtos qualitativa ou absoluta com requerimento de baixas temperaturas ou vernalização para ter seu florescimento acelerado. No experimento em campo, o número de ciclos fotoindutivos encontrado para o acesso CPQBA 2/39x1V de *A. annua* foi de aproximadamente 28 ciclos ou 4 semanas e o fotoperíodo indutivo aproximado foi de 13,07 horas, que ocorreu na data de 07/02/2001 em Pato Branco-PR. A época de plantio que alcançou significativamente os maiores rendimentos de fitomassa e artemisinina foi a 1ª época, 23/09/2000, 165 dias do transplante até a colheita. Estes resultados determinaram que o transplante de mudas para o campo em Pato Branco-PR, deve ser feito prioritariamente no último decêndio de setembro ou no início de outubro - começo da primavera - para se alcançar um maior rendimento de massa seca de folhas e artemisinina. Não recomenda-se o plantio nos dois primeiros decêndios de setembro devido ao fato de estarem ocorrendo geadas extemporâneas na região sudoeste do Paraná.

Palavras-chave: fotossíntese C_3 e C_4 ; discriminação isotópica; épocas de plantio; fotoperiodismo; termoperiodismo; florescimento.

CHARACTERIZATION OF PHOTOSYNTHETIC MECHANISM AND THE FLOWERING ASPECTS OF *Artemisia annua* L. Botucatu, 2006. 68p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: JOSÉ ABRAMO MARCHESE

Adviser: FERNANDO BROETTO

Co-Adviser: RITA M. MORAES

2 SUMMARY

Leaves of *Artemisia annua* L. are a plentiful source of artemisinin, a drug with proven effectiveness against malaria. One of the objectives of this work was to identify the photosynthetic type of *A. annua* through studies of the carbon isotope composition ($\delta\text{‰}^{13}\text{C}$) and the leaf anatomy. We also verified the growth and development of the CPQBA 2/39x1V accession under moist subtropical climate. Two experiments were carried out in greenhouse using photoperiodic chambers. The plants were submitted to photoperiods of 7, 9, 11, 13, 15 and 17 h, in two natural conditions of temperature: spring/summer (maximum of 37°C and minimum of 19°C) and autumn/winter (maximum of 29°C and minimum of 13°C). Another experiment with different planting dates at field was carried out in Pato Branco, PR (26°11' S, 52°36' W and 760 m), Southern part of Brazil. The last experiment was the application of artemisinin (0, 500, 5000, and 10000 mg L⁻¹) in *A. annua* plants to verify the role of the molecule on the flowering induction. *A. annua* presented a $\delta\text{‰}^{13}\text{C} = - 31.76 \pm 0.07$, what characterizes it as typical species with a C₃ photosynthetic mechanism, with an average of $\delta\text{‰}^{13}\text{C} = - 28$, while C₄ species possess an average of $\delta\text{‰}^{13}\text{C} = - 14$. The study of *A. annua* leaf anatomy confirms the results of $\delta\text{‰}^{13}\text{C}$, where, in spite of the existence of parenchymatic cells forming a different sheath surrounding of the vascular tissue, these cells do not have chloroplast or starch. These features do not describe the Kranz anatomy typical of C₄ species. The application of artemisinin did not induce the flowering of *A. annua* at any of the concentrations used. The results suggest that the accumulation of the artemisinin in the pre-

flowering and flowering phases in *A. annua* is not the physiological signal of floral induction in this species. One of the main observations verified in both experiments carried out in photoperiodic chambers with the CPQBA 2/39x1V accession, was a strong interaction between photoperiod and temperature in the flowering induction, where the lower temperatures during in the autumn/winter experiment (maximum of 29°C and minimum of 13°C) induced a larger number of flowered plants in the short day treatment (7, 9 and 11 h), in detriment of those submitted to the higher temperatures in the spring/summer experiment (maximum of 37°C and minimum of 19°C). It can be affirmed that the 2/39x1V accession clones presented a photoperiodic behavior of *Short-Day Plants* (qualitative or absolute) with low temperature or vernalization requirement to have their flowering accelerated. In field experiment, the critical or inductive photoperiod was approximately 13.07 h (02/07/2001) and the plants flowered about 28 days after submitted to the inductive photoperiod. The best transplanting date was the first, 09/23/2000, 165 days from the transplant to harvest (50% bud initiation). These results identify the end of September through beginning of October (spring) as ideal season to transplant *A. annua* seedlings to field in Pato Branco-PR. Transplanting *A. annua* in the beginning of September or earlier is not recommended due the occurrence of late frost in Pato Branco-PR region.

Keywords: C₃ and C₄ plants; isotope discrimination; Kranz anatomy; photosynthesis; transplanting date; photoperiodism; thermoperiodism; flowering.

3 INTRODUÇÃO

Em termos de morbidade e mortalidade, a malária é a mais importante doença parasitária humana e apresenta um sério impacto na saúde e economia do mundo tropical (MUELLER *et al.*, 2000; WHO, 2005). A estimativa mundial de ocorrência da doença é da ordem de 300 milhões de casos clínicos por ano e a mortalidade causada pela malária é superior a 1 milhão de mortes/ano, principalmente crianças. Mais de 3,2 bilhões de pessoas no mundo, em 107 países e territórios vivem sob o risco da doença, que pode matar em questão de horas. Para cada 10 casos de malária reportados, 9 ocorrem na África tropical, região considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como a de mais alto endemismo da doença no mundo (Figura 1) (WHO, 2005).

Nas Américas, segundo a OMS, ocorre a transmissão de malária em 9 países que compartilham a região da selva amazônica, e em 8 países da América Central e Caribe (WHO, 2005). Em 2004, os Estados membros da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) indicaram que dos calculados 865 milhões de habitantes das Américas, aproximadamente 250 milhões vivem em zonas de risco ecológico de transmissão da malária, que continua sendo um problema de saúde pública na região, com transmissão registrada em 21 dos Estados membros da OPAS (OPAS, 2005).

No Brasil, em 1996, foram reportados aproximadamente 450 mil casos clínicos da doença (80% na região amazônica), 100 mil a menos que nos anos anteriores, com

aproximadamente 13.500 óbitos. O Brasil apresentou uma redução de 53,6% dos casos de malária em 2001 quando comparado com o ano de 2000, com 40,1% (388.658) dos casos da doença nas Américas, sendo a Amazônia responsável por 99,6% dos casos no país. Para os anos de 2002 e 2003 o número de casos no Brasil foi de 349.873 (menor número dos últimos 10 anos) e 379.551, respectivamente (Figura 2). Todavia, apesar da redução dos casos da doença a partir de 2001, o número de mortes aumentou significativamente em 2003, 30.000 óbitos, comparando-se com 1996, 13.500 óbitos. Infelizmente, o Brasil ocupa a incômoda posição de líder em casos de malária nas Américas (OPS, 2001; OPS, 2002; OPAS, 2005; WHO, 2005).

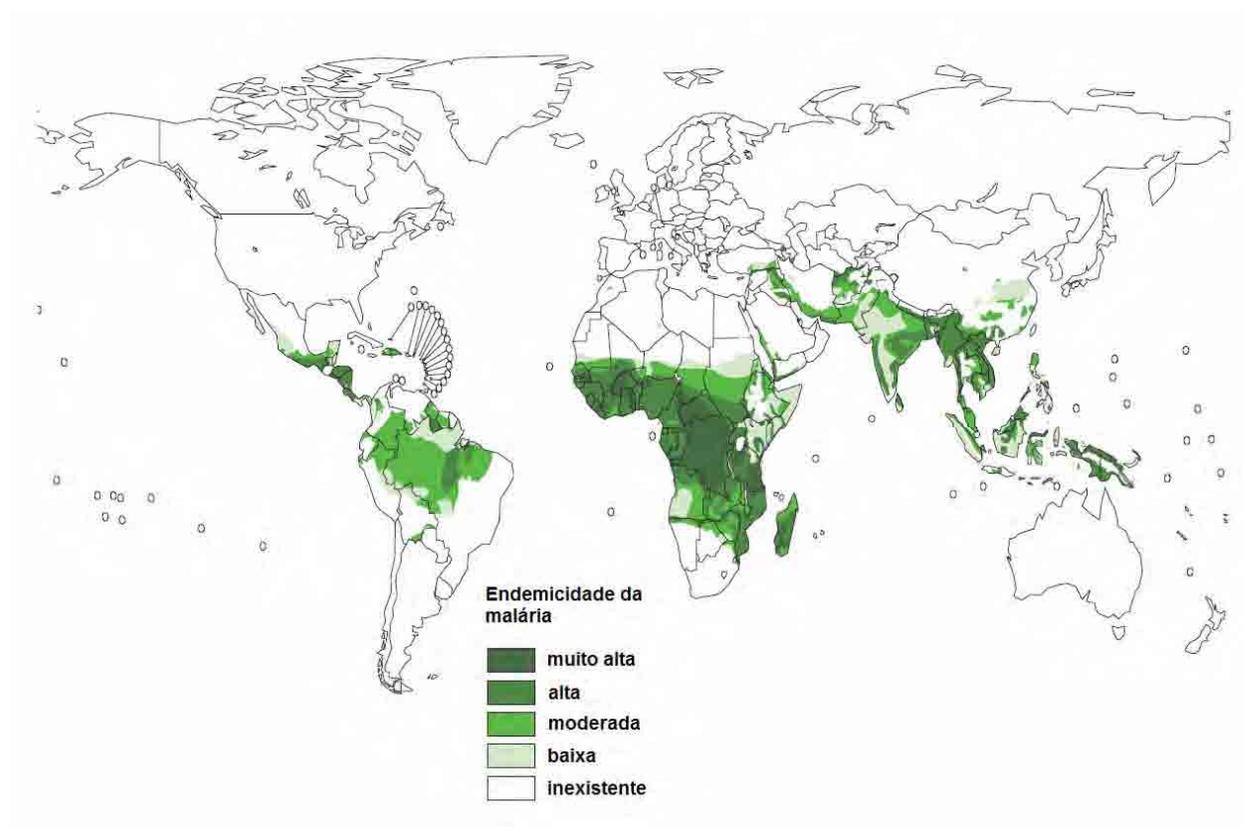


Figura 1. Endemicidade da malária no mundo segundo a organização mundial de saúde (WHO, 2005)

Apesar desse crescimento de mais de 1.000% nos casos de malária num espaço de tempo de menos de duas décadas, a doença desapareceu virtualmente na

porção extra-Amazônica do país, onde se concentra a quase totalidade da população. Quando o Brasil iniciou ações sistemáticas de controle da malária, no início da década de 1950, a imensa maioria dos casos de malária do país ocorria fora da região Amazônica, então virtualmente despovoada. Ao longo de vinte anos, a malária foi eliminada da região costeira do país e das áreas urbanas, restando alguns focos remanescentes, muitos de provável origem zoonótica, nas áreas de mata atlântica da região Sudeste. A malária da Amazônia torna-se representativa numericamente a partir da década de 1970, quando essa região passa a ser povoada por migrantes do Sul, Sudeste e Nordeste do país, em busca de trabalho nas obras de infraestrutura (hidrelétricas, rodovias, projetos de mineração), no garimpo, na extração de madeira e nos projetos agropecuários. O crescimento da doença na Amazônia foi resultado da inexistência de um projeto específico de controle (SILVA, 2003).

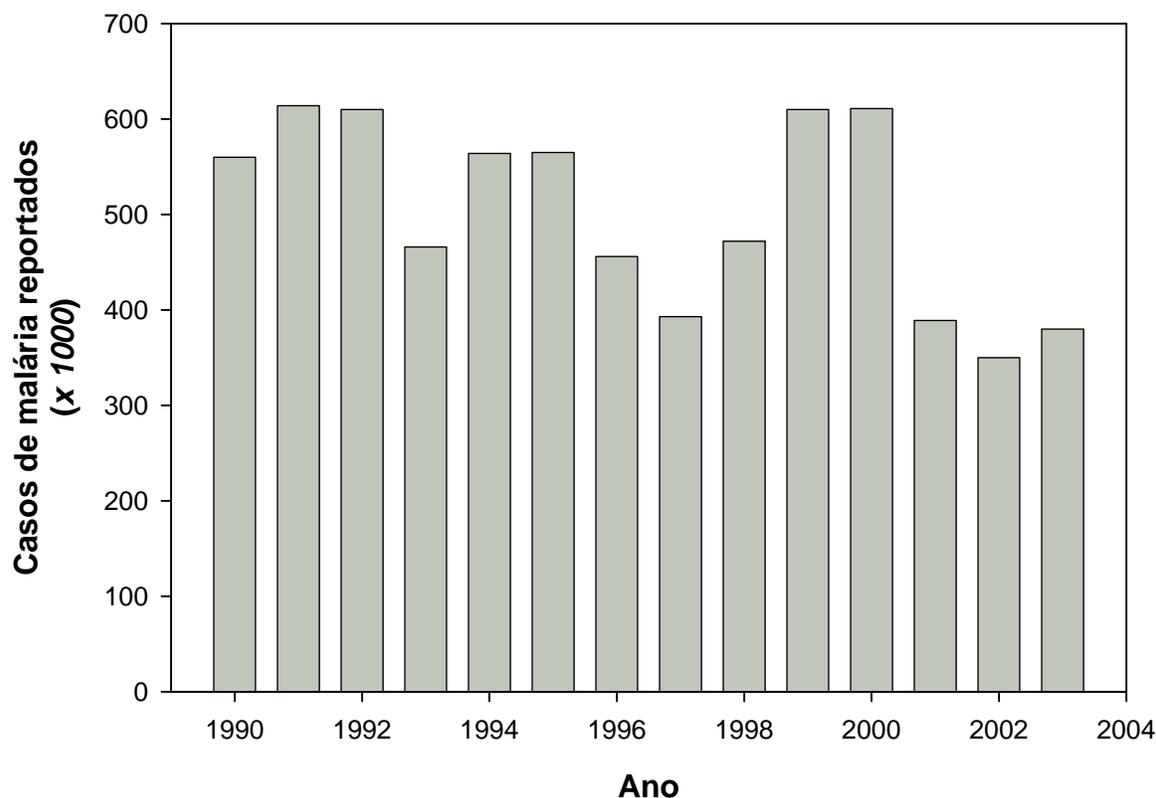


Figura 2. Casos de malária reportados no Brasil no período 1990-2003, segundo a Organização Mundial de Saúde – OMS (WHO, 2005)

A malária humana é causada por protozoários parasitas do gênero *Plasmodium* e o vetor que transmite os parasitas é a fêmea do mosquito *Anopheles* (WHO, 2005). Muitos são os fatores que contribuíram e contribuem para o aumento alarmante dos casos de malária no mundo, dentre eles, podem ser citados as mudanças climáticas, a deterioração dos serviços de saúde locais, problemas econômicos, conflitos armados, redução nos fundos de combate a doença, etc. Todavia, a resistência do mosquito *Anopheles* aos inseticidas e o aparecimento de cepas do *Plasmodium*, principalmente do *P. falciparum*, resistentes às drogas para o combate da malária, particularmente a cloroquina, são os fatores que mais colaboram para o crescimento dos casos clínicos e mortes causadas pela doença (KLAYMAN, 1985; BUTLER *et al.*, 1997; WHO, 2005). Durante os anos 90 em algumas partes do Saara, na África, a morte de crianças causada pela malária chegou a duplicar. A malária também ressurgiu na Ásia (central e sudoeste) e Leste Europeu (WHO, 2005).

A estimativa mundial atual dos custos para suportar as ações de combate a malária estão na ordem de US\$ 3,2 bilhões por ano considerando apenas os 82 países com maior incidência da doença (US\$ 1,9 bilhões para a África e US\$ 1,2 bilhões para os outros países). Porém, somente uma fração desta soma está disponível (WHO, 2005). Recentemente, o fundo global de combate a AIDS, tuberculose e malária (GFATM), começou a financiar recursos para o combate da malária, liberando mais de US\$ 200 milhões entre 2003–2004, e já está aprovado para o biênio 2005–2006 um montante de US\$ 881 milhões. Todavia, os governos locais são responsáveis pela maior parte do financiamento ao combate da doença (71% do total dos fundos na África, 80% na Ásia, e 96% nas Américas), impedindo uma ação efetiva dos países mais pobres no combate à malária. O Brasil não obteve sucesso na aprovação de recursos junto ao GFATM e o governo federal é o responsável pelas campanhas de combate a malária (WHO, 2005).

Com o aumento da resistência do parasita, há uma necessidade urgente de alternativas seguras para as drogas que estão perdendo eficácia. Até o momento, a melhor alternativa para o tratamento da malária grave, causada pelo *P. falciparum*, é a utilização dos derivados semi-sintéticos da artemisinina (Figura3), um produto natural extraído da planta *Artemisia annua* L. (Asteraceae), que demonstra comprovada eficácia no controle das cepas de *P. falciparum* resistentes às múltiplas drogas, além de apresentar pouco ou nenhum efeito

colateral (KLAYMAN, 1985; LUO & SHEN 1987; BALINT 2001; WHO, 2005; ENSERINK, 2005).

A terapia combinada com artemisinina (TCA) é o tratamento mais efetivo contra a malária causada pelo *P. falciparum*, porém é de 10 a 20 vezes mais caro que a terapia com cloroquina. A demanda por TCA aumentou rapidamente desde que GFATM iniciou o apoio financeiro aos países atingidos pela enfermidade (WHO, 2005; ENSERINK, 2005). Temendo a resistência demonstrada contra a cloroquina (80%) e sulfadoxina-pirimetamina (20%) pelo *P. falciparum*, 8 dos 9 países amazônicos, exceto Brasil, modificaram recentemente suas políticas farmacêuticas para tratar a malária falciparum com TCA (WHO, 2005).

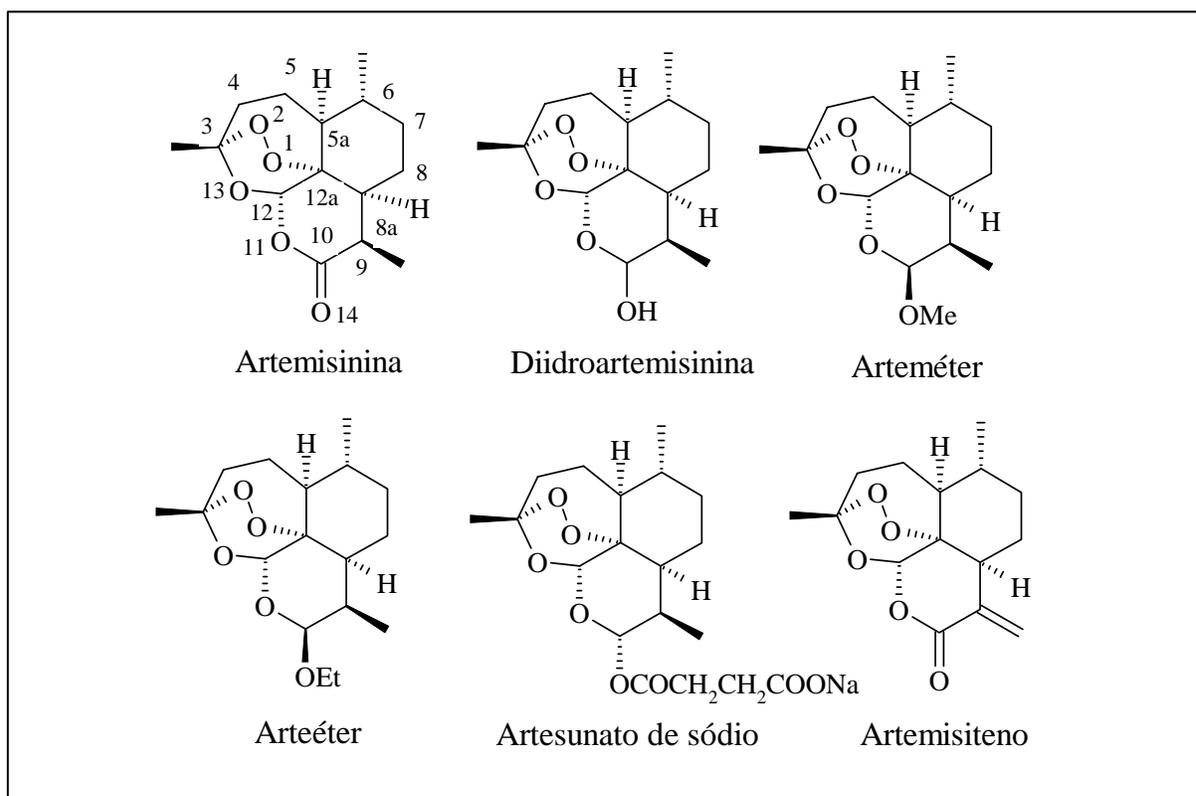


Figura 3. Artemisinina e alguns de seus derivados semi-sintéticos antimaláricos (TARANTO et al., 2005).

Recentemente, um grupo de pesquisadores da Universidade de Nebraska, EUA, anunciou a síntese de um composto chamado OZ177 baseado na molécula de

artemisinina, que apresentou bons resultados em testes *in vitro* e em animais, e encontra-se na fase de testes clínicos (VENNERSTROM *et al.*, 2004; ENSERINK, 2005). Existe a possibilidade deste sintético estar disponível no mercado em 4-5 anos (2010-11) e sua utilização poderá ser parte da terapia combinada com artemisinina (TCA) (ENSERINK, 2005).

A. annua é utilizada há séculos na medicina tradicional chinesa, para o tratamento de febre e malária (KLAYMAN, 1985; SIMON *et al.*, 1990), e em 1971, químicos chineses isolaram a artemisinina ou qinghaosu (em chinês: *su* = de extrato e *qing hau* = erva verde) (Figura 3), descrevendo-a como uma lactona sesquiterpênica que possui um grupo endoperóxido-1,2,4-trioxano e, diferentemente de outros antimaláricos, não possui nitrogênio na sua estrutura. O composto tem sido usado com sucesso em milhares de pacientes na China, incluindo aqueles acometidos com ambas as cepas do *P. falciparum*, a resistente e a sensível à cloroquina (KLAYMAN, 1985). Desde seu isolamento, vários derivados da artemisinina foram sintetizados, obtendo-se substâncias mais ou menos ativas do que a artemisinina. Entre os derivados mais comuns estão o diidroartemisinina (DQHS), arteméter, artemisitenol e artesunato de sódio (Figura 3), todos contendo o grupamento peróxido. Estes compostos foram denominados de endoperóxidos de primeira geração e são empregados na quimioterapia da malária na Tailândia, Vietnã, Brasil e China, onde a resistência ao parasita é comum (MESHNICK *et al.*, 1996). Derivados desprovidos de ligação peróxido, tal como a deoxiartemisinina, embora com estrutura geral bastante similar à artemisinina, são completamente inativos (KLAYMAN 1985).

A síntese química da artemisinina é complexa, envolvendo inúmeras etapas e apresentando baixos rendimentos (CHAN *et al.*, 1995; GELDRE *et al.*, 1997). Corroborando, os baixos rendimentos via cultivo de células e tecidos (DELABAYS *et al.*, 2001) e os altos custos da síntese da molécula tornam o isolamento a partir da planta de *A. annua* a melhor forma para obtenção da droga (WOERDENBAG *et al.*, 1991; FERREIRA & JANICK, 1996; GELDRE *et al.*, 1997; DELABAYS *et al.*, 2001). Os maiores fornecedores mundiais são a China e o Vietnã (ENSERINK, 2005).

A. annua é uma planta herbácea altamente aromática, pertencente à família Asteraceae, com hábito de crescimento determinado e altura variando entre 0,8 e 2,0 metros (Figura 4) (FERREIRA & JANICK, 1996). Por ser aromática, a espécie também é

utilizada comercialmente na perfumaria e cosmética (GALAMBOSI, 1980; JAIN *et al.*, 1996). A planta reproduz-se naturalmente por fecundação cruzada e multiplica-se por sementes, além de propagar-se vegetativamente com facilidade (MAGALHÃES, 1996).

A. annua ocorre naturalmente como parte da vegetação das planícies ao norte das províncias de Chadar e Suiyuan (40° N e 109° E), região de clima temperado na China, entre 1000 e 1500 metros de altitude (GALAMBOSI, 1980; GELDRE *et al.*, 1997; BAGCHI *et al.*, 1997b; FERREIRA *et al.*, 2005). No Brasil, a introdução da *A. annua* ocorreu em 1987, por pesquisadores do CPQBA/UNICAMP (FIGUEIRA, 1995). Atualmente, através de seleção para aumentar a fitomassa e o teor de artemisinina, o programa de melhoramento de *A. annua* do CPQBA/UNICAMP conta com materiais selecionados que chegam a produzir 25 kg ha^{-1} da molécula, enquanto que nas populações base, o rendimento é apenas de 5 kg ha^{-1} (MAGALHÃES *et al.*, 1997).



Figura 4. Ao fundo, plantas do acesso CPQBA 2/39x1V de *Artemisia annua* L. cultivadas no CPQBA/UNICAMP em Campinas-SP ($22^{\circ}47'S$, $47^{\circ}06'W$, alt. 606 m).

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 caules 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, caules e flores são os prováveis sítios de acumulação de artemisinina em *A. annua*.

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).

Segundo MORALES *et al.* (1993) a concentração máxima de artemisinina aparenta estar mais diretamente relacionada com o fotoperíodo específico, do que com o estágio específico de desenvolvimento da planta.

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; DEY & HARBORNE, 1997). ABDIN *et al.* (2002) relatam vários experimentos em que substâncias reguladoras de crescimento como ácido indolacético, ácido giberélico (GA₃), triacontanol e cloromequat foram testadas em *A. annua*, todavia, nenhuma apresentou efeito indutor ao florescimento. ZHANG *et al.* (2005) relatam que a aplicação exógena de GA₃ em *A. annua* não induziu seu florescimento, mas aumentou significativamente o teor de artemisinina. DUKE *et al.* (1987), CHEN & LEATHER (1990) e BAGCHI *et al.* (1997a) e DAYAN *et al.* (1999) encontraram atividade reguladora de crescimento e/ou fitotóxica em diferentes espécies vegetais 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, principalmente em latitudes maiores que 25° S, como é o caso do sul do Brasil. Portanto, estudos relativos à descoberta de substâncias indutoras ao florescimento de *A. annua* seriam bem vindos para auxiliar no manejo agrícola da espécie.

A. annua demonstra sensibilidade ao comprimento do dia e floresce aproximadamente duas semanas após ser submetida ao fotoperíodo indutivo (FI) (FERREIRA, 1994; ZHANG et al., 2005). Plantas sensíveis à duração do fotoperíodo têm seu desenvolvimento condicionado ao FI (MARCHESE & FIGUEIRA, 2005). A literatura relata diferentes fotoperíodos críticos para induzir a floração em *A. annua*: 11 horas (MAGALHÃES, 1996); 13,5 horas (FERREIRA et al., 1995); 13,2 horas (BAGCHI et al., 1997b) e 12 a 14 horas (GELDRE et al., 1997). Segundo CHEN & ZHANG (1987), MAGALHÃES (1996), MARCHESE (1999) e MARCHESE & REHDER (2001), divergências no comportamento fisiológico desta espécie em relação à influência de fatores ambientais sugerem que seu comportamento não é padrão, sendo variável para diferentes genótipos.

Em resposta à indução ao florescimento sob condições de dias curtos (fotoperíodo indutivo), ocorre um rápido aumento 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, 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. 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 (FERREIRA et al., 1995).

FERREIRA et al. (1995) conduzindo experimentos (40°21'N) com plantas de uma população proveniente da China, afirmam que *A.annua* é considerada uma espécie com comportamento de *Planta de Dias Curtos* (PDC), classificação dada àquelas plantas que florescem quando o comprimento do dia é inferior ao fotoperíodo crítico ou indutivo. Todavia, MAGALHÃES (1996) e MAGALHÃES et al. (1997) em observações feitas em campo (22°48'S), relataram que plantas provenientes de sementes do acesso CPQBA

2/39x1V, acesso melhorado a partir de uma população de plantas do Vietnã, permaneceram vegetativas em fotoperíodos acima de 13 horas e abaixo de 11 horas, e floresceram em um fotoperíodo entre 11 e 13 horas, o que sugere um comportamento de *Plantas de Dias Intermediários* (PDI), classificação dada àquelas plantas que florescem dentro de uma faixa de comprimento do dia, não florescendo acima ou abaixo dos limites superior e inferior desta faixa.

A despeito dos estudos existentes sobre fatores do ambiente afetando a produção de biomassa e de artemisinina (CHEN & ZHANG, 1987; FERREIRA *et al.*, 1995, MARCHESE, 1999; MARCHESE & REHDER, 2001), pouca informação relacionada à fisiologia de *A. annua* é encontrada na literatura. Devido à importância da planta como única fonte de artemisinina economicamente viável, em muitos países com ocorrência de casos de malária, existem esforços na introdução e aclimação de *A. annua* (MUELLER *et al.*, 2000), visando seu cultivo comercial para a produção de fitofármacos ou para o uso como fitoterápico. No caso da introdução de uma espécie exótica, como *A. annua*, o conhecimento do mecanismo fotossintético é fundamental para seu cultivo. Em geral, plantas com mecanismo fotossintético C_4 são melhores adaptadas a climas quentes, enquanto que plantas C_3 adaptam-se melhor em climas mais amenos (LOOMIS & CONNOR, 1992; RUDALL, 1994; HALL & RAO, 1999; KÖRNER & BAZZAZ, 1996; LAMBERS *et al.*, 1998; LAWLOR, 2001). Não há na literatura nenhuma informação disponível sobre o mecanismo fotossintético da *A. annua*.

As rotas metabólicas da fotossíntese são altamente conservadas. A maioria das plantas apresentam tipo fotossintético C_3 , onde o primeiro produto estável da fotossíntese é 3-fosfoglicerato, um composto de três carbonos. Uma segunda rota metabólica que possibilita a fixação do CO_2 , ocorre nas plantas C_4 , onde inicialmente há a fixação do carbono nas células do mesófilo formando o oxaloacetato, um composto de quatro carbonos. Nas plantas C_4 o oxaloacetato é convertido para malato ou aspartato, que em seguida se difundem nas células da bainha vascular que rodeiam o feixe vascular, onde são descarboxilados, fornecendo uma alta concentração de CO_2 para a enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxidase (RUBISCO). Plantas superiores C_4 apresentam modificações anatômicas e bioquímicas, mas não está claro qual dessas modificações ocorreu primeiro. Algumas espécies que possuem características de plantas C_3 e C_4 , são classificadas como

plantas intermediárias C₃-C₄, e podem representar um estágio transitório na evolução da fotossíntese C₃ para C₄ (VON CAEMMERER, 1992; LAWLOR, 2001; HIBBERD & QUICK, 2002).

Técnicas que estudam a composição isotópica da biomassa das plantas são consideradas simples e eficazes para a determinação do tipo/mecanismo fotossintético quando esse é desconhecido em uma espécie vegetal (FARQUHAR *et al.*, 1989).

As plantas fracionam os isótopos do carbono durante a fotossíntese. O dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera terrestre é composto de diferentes isótopos do carbono. A maioria dos isótopos do carbono são ¹²CO₂ (98,9 átomos %) e somente 1,1 átomos % da quantidade total do CO₂ atmosférico é ¹³CO₂, enquanto a menor fração (10⁻¹⁰ átomos %) é da espécie radioativa ¹⁴CO₂. A pesquisa em ecofisiologia moderna faz uso abundante do fato de que a composição isotópica da biomassa das plantas difere daquela da atmosfera. Há um especial interesse nas diferenças da composição isotópica do carbono (δ‰¹³C) entre as plantas, provocadas pelas diferentes rotas fotossintéticas (LAMBERS *et al.*, 1998).

As propriedades químicas do ¹³CO₂ são idênticas aquelas do ¹²CO₂, mas devido a pequena diferença de massa (2,3%), as plantas usam menos ¹³CO₂ do que o ¹²CO₂. Plantas C₃ (δ‰¹³C ≅ -28 ‰) discriminam mais ¹³CO₂ do que as plantas C₄ (δ‰¹³C ≅ -14 ‰). O maior passo da discriminação isotópica é a reação de carboxilação da fotossíntese, catalisada pela ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RUBISCO), a primeira enzima a fixar o CO₂ nas plantas C₃, que possui um valor de discriminação intrínseca (Δ¹³C) de -30 ‰. Por outro lado, a fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilase, a primeira enzima que fixa o CO₂ em plantas C₄, apresenta um menor efeito de discriminação isotópica (Δ¹³C = -2 to 5,7 ‰) (STERNBERG *et al.*, 1984; FARQUHAR *et al.*, 1989; O'LEARY *et al.*, 1992; O'LEARY, 1993; LAMBERS *et al.*, 1998; CONDON *et al.*, 2002).

Estudos anatômicos e técnicas histoquímicas também contribuem para a determinação do tipo/mecanismo fotossintético das espécies vegetais. Existem diferenças na anatomia foliar entre plantas C₃ e C₄. Cortes transversais de uma típica folha C₃, revelam a presença de cloroplastos e grãos de amido apenas nas células do mesofilo. Em contraste, uma típica folha C₄ apresenta cloroplastos em ambas as células, do mesofilo e da bainha que envolve o feixe vascular (MAUSETH, 1988; RUDALL, 1994; LAWLOR, 2001).

4 JUSTIFICATIVA

O Brasil é o país que apresenta o maior índice de casos de malária das Américas (OPS, 2001; OPS, 2002; WHO, 2005) e com o aumento da resistência do parasita causador da doença, há uma necessidade urgente de alternativas seguras para as drogas que estão perdendo eficácia. Neste momento, a melhor alternativa para o tratamento da malária, causada pelo *P. falciparum*, é a terapia combinada com artemisinina (TCA) (WHO, 2005; ENSERINK, 2005).

A síntese química da artemisinina é complexa, envolvendo inúmeras etapas e apresentando baixos rendimentos (CHAN *et al.*, 1995; GELDRE *et al.*, 1997). Corroborando, os baixos rendimentos via cultivo de células e tecidos (DELABAYS *et al.*, 2001) e os altos custos da síntese da molécula tornam o isolamento a partir da planta de *A. annua* a melhor forma para obtenção da droga (WOERDENBAG *et al.*, 1991; FERREIRA & JANICK, 1996; GELDRE *et al.*, 1997; DELABAYS *et al.*, 2001).

A demanda por TCA aumentou rapidamente desde que GFATM iniciou o apoio financeiro aos países atingidos pela enfermidade (WHO, 2005), mas por uma cruel ironia, apesar do recurso disponível, a Organização Mundial da Saúde (OMS) não conseguiu entregar em tempo metade das 60 milhões de doses do medicamento programado para o início de 2005, devido ao insucesso dos produtores chineses e vietnamitas em fornecer

a matéria prima (folhas de *A. annua*) demandada pela empresa NOVARTIS, fornecedora da OMS (ENSERINK, 2005). Uma outra variável que poderá em breve provocar um aumento na demanda por artemisinina, foi a recente descoberta de atividade anti-câncer para a molécula (POSNER *et al*, 1999; SINGH & LAI, 2004; EFFERTH, 2005),

O CPQBA/UNICAMP está patenteando o processo de extração de artemisinina e a derivatização em artesunato de sódio foi otimizada podendo ser usada em escala piloto ou industrial. Algumas indústrias farmacêuticas nacionais estão demonstrando interesse na locação ou compra da patente da UNICAMP para fabricarem fármacos derivados da artemisinina, uma vez que o Ministério da Saúde está demandando lotes deste anti-malárico, que até o momento são importados da China.

O centro de origem da *A. annua* é a China, em regiões de clima subtropical e temperado, similares aos do Sul do Brasil. Com o cultivo do acesso CPQBA 2/39x1V de *A. annua*, no sudoeste do Paraná, informações relativas ao comportamento de *A. annua* diante de distintos fotoperíodos e épocas de plantio serão obtidas, fornecendo subsídios para que se possa otimizar a produção de fitomassa e dos teores de artemisinina, adequando a época de plantio com o fotoperíodo da região. *A. annua* pode tornar-se uma nova opção para o pequeno produtor diversificar a renda em sua propriedade, comercializando a produção para a indústria farmacêutica, uma vez que existe demanda nacional e internacional para a matéria prima da espécie.

5 OBJETIVOS

Classificar o mecanismo fotossintético de *A. annua* através de estudos da composição dos isótopos do carbono ($\delta\%^{13}\text{C}$) e da anatomia foliar.

Avaliar em casa de vegetação o efeito de diferentes concentrações de artemisinina, aplicadas exógenamente, na indução do florescimento de *A. annua*.

Verificar em casa de vegetação, o efeito de diferentes condições de temperatura e fotoperíodo no florescimento das plantas do acesso CPQBA 2/39x1V de *A.annua* com parentais provenientes do Vietnã, comparando-as com outro acesso cujos parentais são originários da China, acesso estudado por FERREIRA *et al.* (1995).

Determinar em casa de vegetação e em campo, o fotoperíodo indutivo e o número de ciclos fotoindutivos aproximados para o acesso CPQBA 2/39x1V de *A.annua*.

Verificar os efeitos de diferentes épocas de plantio e da interação fotoperíodo *versus* temperatura, no crescimento, desenvolvimento e produção de artemisinina no acesso CPQBA 2/39x1V de *A.annua*.

Determinar a melhor época de plantio do acesso CPQBA 2/39x1V em Pato Branco – Pr.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Experimentos com isótopos de carbono e anatomia foliar para identificar o mecanismo fotossintético de *A. annua*.

O material vegetal utilizado foram as folhas de plantas do acesso CPQBA 2/39x1V, desenvolvido pelo programa de melhoramento do Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA/UNICAMP).

Os estudos da composição isotópica do carbono ($\delta\text{‰}^{13}\text{C}$) da *A. annua* foram realizados no Centro de Isótopos Estáveis do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu. Amostras de folhas de *A. annua* foram secas a 80°C até peso constante em estufa com circulação de ar e moídas finamente em moinho criogênico (Spex-modelo 6700 freezer/mill) à temperatura de -196°C (Figura 5-A). Após isto, alguns microgramas da amostra finamente moída foram adicionados em cápsulas de estanho em triplicata (Figura 5-B) e analisadas em um espectrômetro de massas DELTA-S (Finnigan Mat) acoplado ao analisador elementar EA-1108-CHN (Figura 5-C) para a determinação da razão isotópica R ($R = {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) com erro de análise da ordem de 0,2‰. A composição isotópica do carbono

($\delta\text{‰}^{13}\text{C}$) é a medida da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em uma amostra de planta dividida pela medida da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ padrão PDB. Desta forma,

$$\delta\text{‰}^{13}\text{C} = [(R_p/R_s) - 1] \times 1000$$

onde R_p é a razão do isótopo pesado sobre o leve ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) mensurada na amostra vegetal e R_s é a razão do padrão (PDB). O padrão internacional utilizado é o fósil belemnite da formação calcária Pee Dee (PDB) na Carolina do Sul/EUA. Como os valores numéricos das diferenças são pequenas, costuma-se multiplicar a expressão por 1000, obtendo-se a terminologia em delta per mil ($\delta\text{‰}$). Amostras de material vegetal contemporâneo apresentam valores negativos de $\delta\text{‰}^{13}\text{C}$ porque a razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na atmosfera é menor do que o padrão internacional Pee Dee belemnite (PDB), além de também ocorrer discriminação contra ^{13}C pelas plantas durante os processos de absorção e fixação de CO_2 na fotossíntese (O'LEARY *et al.*, 1992; O'LEARY, 1993; CONDON *et al.*, 2002; DAWSON *et al.*, 2002).

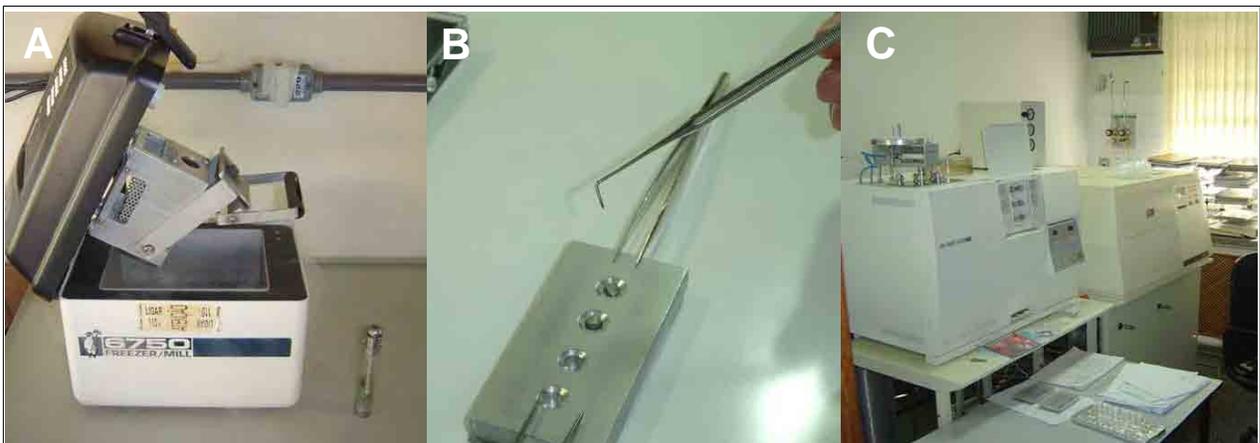


Figura 5. Folhas secas de *A. annua* sendo moídas em moinho criogênico a -196°C (A); adição de amostras finamente moídas em cápsulas de estanho (B); espectrômetro de massas acoplado a um analisador elemental (C).

O equipamento espectrômetro de massas ioniza moléculas gasosas e separa os feixes de íons em um espectro de massas de acordo com a relação massa/carga (q/m), utilizando campo elétrico e magnético. As abundâncias relativas (concentrações) das moléculas isotópicas de diferentes massa/carga são determinadas pelas medidas das correntes elétricas geradas por estes feixes iônicos separados (CRISS, 1999; EHLERINGER *et al.*, 2000).

Os estudos de anatomia foliar/testes histoquímicos foram realizados em cooperação com o Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, MG.

Porções da região mediana de folhas de *A. annua* foram fixadas em FAA₅₀ e armazenadas em etanol 70% (JOHANSEN, 1940). As amostras foram desidratadas em série etílica progressiva e embebidas em glicol-metacrilato (Historesin-Leica®) de acordo com as recomendações do fabricante (GERRITS, 1991). O material embocado foi seccionado transversalmente em micrótomo rotativo com 8µm de espessura e corado com azul de toluidina (O'BRIEN *et al.*, 1964; RUZIN, 1999) para metacromasia. Para a análise de proteínas, os cortes foram corados com Xylidine Ponceau (XP) pH 2,5 (VIDAL, 1977), onde a coloração vermelha indica a presença de enzimas, como a ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RUBISCO), presente nos cloroplastos. Mais de 50% do nitrogênio presente nas plantas herbáceas encontra-se na maquinaria fotossintética e deste total a maior parte é contituente da enzima RUBISCO (CHAPMAN & BARRETO, 1997; DIETZ & HARRIS, 1997; LAMBERS *et al.*, 1998).

Para a detecção de polissacarídeos, incluindo amido, o material foi submetido ao ácido periódico/reagente de Schiff (PAS) (PEARSE, 1968; O'BRIEN & MCCULLY, 1981). Este teste baseia-se na oxidação, pela ação do ácido periódico, dos grupos 1,2-gicol dos resíduos de glicose constituintes das macromoléculas glicídicas. Para cada resíduo de glicose formam-se duas funções aldeído, em consequência da quebra da ligação entre os carbonos portadores de radicais -OH. Os grupos carbonilos assim formados dão origem, em presença do reagente de Schiff, a um produto de condensação magenta. Todas as lâminas foram montadas com resina sintética (Permound®) e lamínula, para observação em microscópio de luz.

6.2 Experimentos em câmaras fotoperiódicas para o estudo da fisiologia da floração de *A. annua*.

Os experimentos foram conduzidos em câmaras fotoperiódicas (Figura 6), localizadas dentro de estufa plástica, na Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, em Pato Branco/PR, Brasil (26°11' S, 52°36' W e 760 m de altitude).

6.2.1 Experimento 01 (primavera/verão)

O primeiro experimento foi conduzido no período entre 20/10/1999 e 15/02/2000 (primavera/verão). Foram utilizados clones de dois acessos de *A. annua* com origens geográficas diferentes. O acesso CPQBA 2/39x1V foi denominado para este experimento “vietnã”, devido aos parentais serem originários de uma população de plantas do Vietnã, segundo MAGALHÃES *et al.* (1997), e um segundo acesso denominado “chinês”, proveniente de um acesso da China, cedido pelo Horticulture and Landscape Architecture Department at Purdue University, USA, que foi utilizado nos experimentos de Ferreira *et al.* (1995). Os clones foram obtidos por estacas provenientes de uma única planta mãe de cada acesso, cultivados inicialmente em tubetes e mantidos em condição de fotoperíodo de 15 horas para evitar o florescimento das mesmas até atingirem a altura de 30 cm (fase de alongamento, estágio B da escala de DELABAYS (1997), quando foram transplantadas para vasos contendo 3000 cm³ de substrato (solo acrescido de composto orgânico). Os vasos foram dispostos em bandejas e foi fornecida água por sub-irrigação. Foram separados 06 grupos de 30 plantas com 30 cm de altura selecionadas ao acaso e submetidos a seis diferentes condições de fotoperíodo (7, 9, 11, 13, 15 e 17 horas de luz). Os tratamentos receberam 7 horas de luz natural e a extensão do fotoperíodo foi feita em câmaras fotoperiódicas individualizadas (Figura 6), por meio de lâmpada fluorescente 40 W (1,6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e outra incandescente de 100 W (1,6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), acionadas por computador, fornecendo uma densidade de fluxo de fótons de aproximadamente 3,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Durante 56 dias, diariamente, eram identificadas as plantas que floresceram (iniciaram a emissão dos botões florais). Semanalmente, em 6 plantas aleatoriamente escolhidas e marcadas nos diferentes tratamentos foram avaliados o comprimento do caule (da base ao ápice) e o número de brotações laterais ou de entrenós

(brotações vegetativas e florais do caule principal). Durante o experimento, as temperaturas médias diárias foram: máxima de 37°C e mínima de 19°C (Figura 7).

6.2.2 Experimento 02 (outono)

Em face aos resultados observados no experimento 01 e a hipótese da temperatura ambiente estar influenciando o florescimento das plantas, outro experimento foi conduzido no mesmo local, somente com o acesso vietnã (CPQBA 2/39x1V), no período de 29/02/2000 a 26/06/2000 (outono). Durante 56 dias, em 6 plantas de cada tratamento, foram verificadas as mesmas variáveis de avaliação do primeiro experimento. Em adição, semanalmente, foram colhidas aleatoriamente 02 plantas de cada tratamento, para a determinação do teor de artemisinina na massa seca de folhas (mg g^{-1}). Estas plantas foram cortadas rente aos vasos e colocadas para secar até peso constante em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 35°C, de acordo com FIGUEIRA & SARTORATO (1997), que sugerem temperaturas de no máximo 40°C para a secagem de *A. annua*. A determinação dos teores de artemisinina nas folhas foi feita no Laboratório de Síntese Química do CPQBA-UNICAMP, através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta (CLAE-UV), descrita por MARCHESI (1999) e detalhada no ítem 6.3. As temperaturas médias diárias foram: máxima de 29°C e mínima de 13°C (Figura 7).



Figura 6. Câmaras fotoperiódicas individuais com temporizador para fotoperíodo usadas nos experimentos para determinar o fotoperíodo indutivo e o número de ciclos fotoindutivos aproximados para os acessos chinês e vietnã de *A.annua*. UTFPR, Pato Branco-PR, 2000.

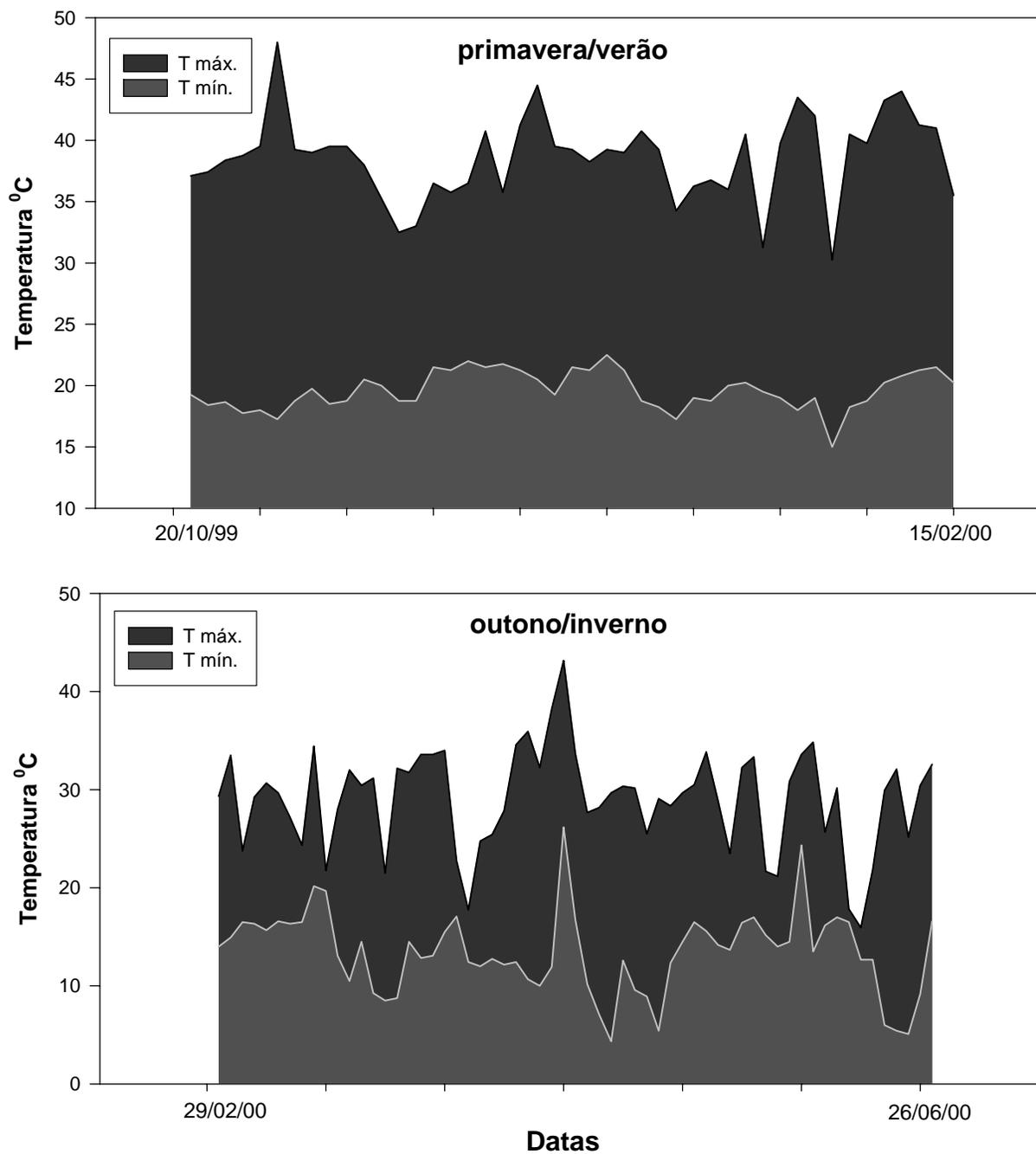


Figura 7. Temperaturas máxima e mínima diárias no período de realização dos experimento primavera/verão e outono. UTFPR, Pato Branco-PR ($26^{\circ}11'S$ e $52^{\circ}36'W$ – 760 m alt.).

6.2.3 Experimentos com aplicação exógena de artemisinina

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 acessos CPQBA 2/39x1V e 3MxPOP de *A.annua*, e a semeadura foi feita em bandejas de 72 células contendo substrato orgânico Plantmax®, em 25/04/2002. O transplântio 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 acessos de *A. annua* em dois experimentos independentes (um experimento para cada acesso), 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 na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica 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 estádio 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.

6.3 Experimento em campo para definição da época de plantio e fisiologia da floração do acesso CPQBA 2/39X1V

O experimento foi conduzido em campo nos anos de 2000 e 2001, na estação experimental do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), localizado na cidade de Pato Branco – PR, em latitude 26°07' S, longitude 52°41' W, altitude de 760m e clima subtropical úmido (Cfa), segundo classificação de Köppen.

Foram utilizados clones do acesso CPQBA 2/39x1V desenvolvido pelo programa de melhoramento de *A. annua* do CPQBA-UNICAMP. Os clones foram obtidos por estacas provenientes de uma única planta de aproximadamente 01 ano, mantida em condição de fotoperíodo de 15 horas em estufa (a luz natural foi complementada com luz artificial), para evitar o florescimento da mesma. As estacas foram plantadas em tubetes contendo substrato orgânico, e ficaram enraizando em estufa por aproximadamente 30 dias. Os tratamentos foram 06 diferentes épocas de plantio e transplante (ver Tabela 5). Cada repetição ou parcela experimental foi constituída de 25 plantas, com espaçamento entre plantas de 0,6 m na linha de plantio e 1 m nas entre linhas.

A análise do solo apresentou os seguintes resultados: M.O. - 40,21 g dm⁻³; Ca - 4,9; Ca+Mg - 7,44; K - 0,33 cmol(+) dm⁻³; P - 6,49 mg dm⁻³; pH 5,2; V(%) 62,75. Os dados climatológicos foram coletados junto a estação climatológica do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), localizada a 50 m da área onde o experimento foi instalado, e são apresentados nas figuras 8 e 9. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso. As médias das repetições nos tratamentos foram submetidas a análise de variância e análise de regressão nos programas SYSTAT[®] 11 e SigmaPlot[®] 9.0, respectivamente.

Diariamente, foram avaliados o número de plantas que iniciaram a emissão dos botões florais. As 09 plantas centrais de cada tratamento, descartadas às das bordaduras, foram colhidas para a determinação da massa seca de folha e caules, relação folha/caule e teor de artemisinina na massa seca de folhas (mg g⁻¹) quando 50% das plantas da parcela iniciaram a emissão dos botões florais (Figura 10). Estas plantas foram cortadas rente ao solo e colocadas para secar até peso constante em estufa com circulação de ar a uma temperatura de ± 35°C, de acordo com FIGUEIRA & SARTORATO (1997), que sugerem temperaturas de no máximo 40°C para a secagem de *A. annua*.

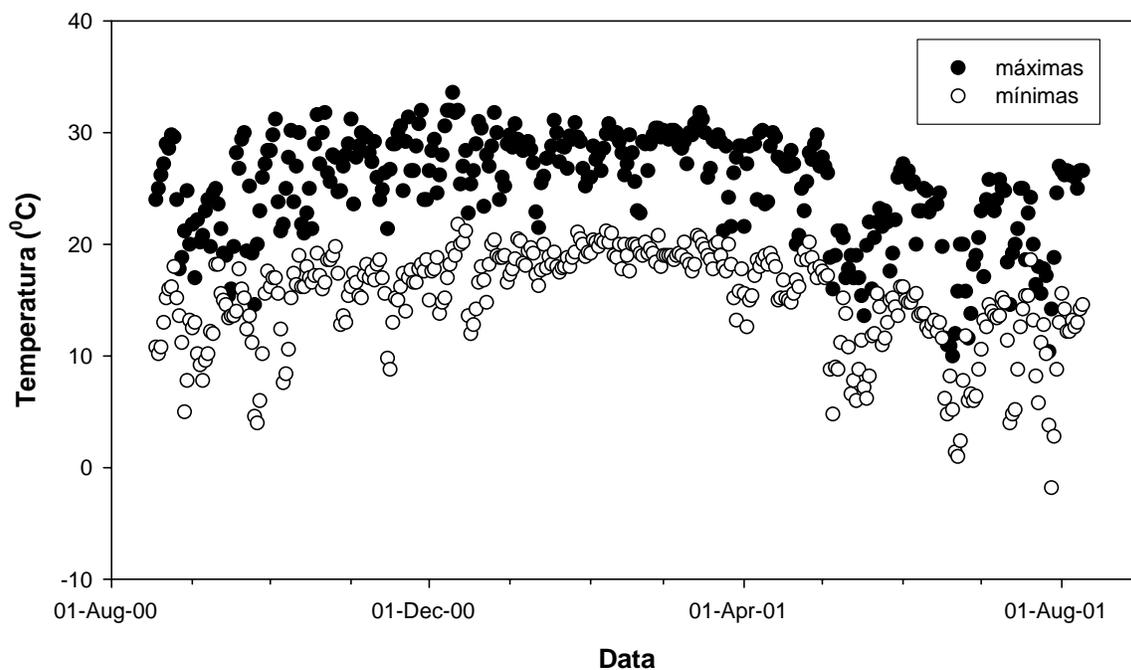


Figura 8. Temperaturas máxima e mínima ($^{\circ}\text{C}$) diárias no período de realização do experimento (18/08/00 a 09/08/01) em Pato Branco, PR. Fonte: IAPAR.

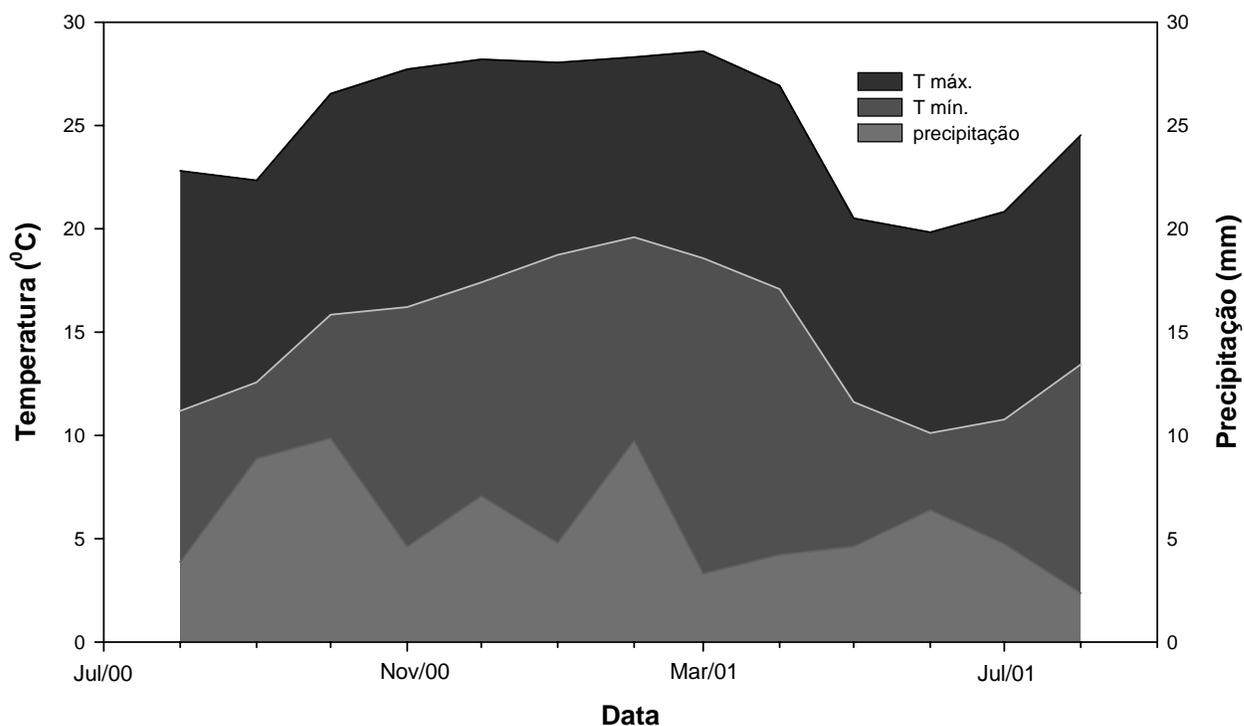


Figura 9. Médias mensais de precipitação e temperaturas máx. e mín. no período de realização do experimento (18/08/00 a 09/08/01) em Pato Branco – PR. Fonte: IAPAR.

Tabela 1. Relação das datas e temperaturas das geadas ocorridas nos anos de 2000 e 2001, na área onde foi instalado o experimento em Pato Branco - PR (26^o11'S e 52^o36'W – 760 m alt.).

Datas	Temperaturas na relva (°C)
28/05/2000	-2,001
29/05/2000	-1,201
22/06/2000	-3,803
23/06/2000	-1,201
13/07/2000	-8,403
14/07/2000	-9,803
16/07/2000	-4,402
17/07/2000	-11,203
18/07/2000	-5,002
20/07/2000	-9,803
21/07/2000	-7,002
24/07/2000	-5,402
25/07/2000	-1,801
26/07/2000	-1,601
29/08/2000	-0,201
21/06/2001	-3,002
22/06/2001	-3,802
23/06/2001	-1,801
28/06/2001	-0,801
13/07/2001	-1,601
28/07/2001	-5,803
29/07/2001	-0,201
16/09/2001	-0,801
17/09/2001	-4,002

Fonte: IAPAR.



Figura 10. **A** - Detalhe de uma das parcelas do experimento em campo para definição da época de plantio e fisiologia da floração do acesso CPQBA 2/39x1V. **B** - Detalhe do processamento das plantas após a colheita e previamente a secagem. UTFPR, Pato Branco-PR, 2000.

A determinação dos teores de artemisinina nas folhas foi feita através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta (CLAE-UV), descrita por MARCHESE *et al.*(2001) e adaptada de ZHAO & ZHENG (1986). A técnica CLAE-UV é considerada sensível e seletiva para análises quantitativas de artemisinina (MARCHESE *et al.*, 2001). Este método utiliza inicialmente um tratamento pré-coluna da artemisinina, com solução alcalina, para a produção do composto Q292, que é transformado em meio ácido para Q260, este último perfeitamente detectável em ultravioleta (Figura 11). Aproximadamente 100 mg de folhas finamente moídas em moinho de facas foram extraídas com 5 mL de solução de extração contendo acetonitrila, mais 0,5 mg mL⁻¹ de acetofenona, usada como padrão interno. A extração foi feita em um ultra-dispersor por 30 segundos a 20.000 RPM, seguida de uma centrifugação a 3200 g por 6 minutos. Para a derivatização da artemisinina (Figura 11), foram adicionadas em um tubo de reação, alíquotas (em duplicata) de 1,0 mL de cada extrato, 1,0 mL de EtOH 95% e 4,0 mL de solução aquosa de NaOH 0,2%. Os tubos foram fechados com tampas de borracha e a mistura foi aquecida a 40°C durante exatos 15 minutos (com agitação magnética), para depois ser rapidamente resfriada em banho de gelo e neutralizada com a adição de 4 mL de ácido acético 0,1 M. Para a derivatização dos padrões de artemisinina, foi substituído 1,0 mL de EtOH 95% por 1 mL da solução de extração. Três diferentes concentrações de artemisinina foram utilizadas como padrão, respectivamente, 0,04; 0,2 e 1,0 mg de artemisinina por mL de EtOH 95%. Anteriormente à injeção, a mistura foi filtrada em filtro GVWP 0,22 µm.

O equipamento utilizado para dosar o Q260, foi um cromatógrafo líquido de alta pressão, com injeção manual e um compartimento de aquecimento para a coluna, onde a temperatura foi mantida a 47°C. A separação foi efetuada em uma coluna C18/4µm/3,9 x 150 mm. Como fase móvel, foi utilizada uma solução de tampão fosfato 10 mM mais acetonitrila, numa proporção de 80:20, com uma vazão de 1,0 mL minuto⁻¹. Nestas condições, o tempo de retenção para Q260 foi de aproximadamente 3 minutos e para o padrão interno acetofenona de aproximadamente 8,5 minutos. O tempo necessário para a análise de cada amostra, foi de aproximadamente 50 minutos, já que após a detecção de Q260 e acetofenona, o fluxo da fase móvel foi mantido por mais 40 min, limpando a coluna para a análise subsequente. A detecção foi feita no modo absorbância, em um comprimento de onda

de 260nm, através de um detector ultravioleta universal. O volume de amostra injetado foi de 10 μ L. O teor de artemisinina foi avaliado por comparação da área dos picos dos padrões com os das amostras.

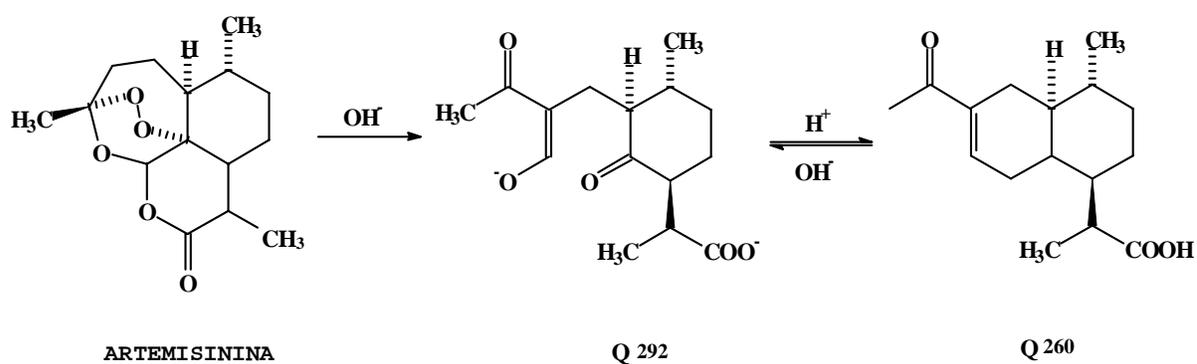


Figura 11. Conversão de artemisinina em Q260, segundo ZHAO & ZENG (1986).

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Experimentos com isótopos de carbono e anatomia foliar para identificar o mecanismo fotossintético de *A. annua*.

A. annua apresentou uma $\delta^{13}\text{C} = -31,76 \pm 0,07\text{‰}$ (Tabela 2), resultado que a caracteriza como uma típica espécie de mecanismo fotossintético C_3 , classe de plantas que apresentam valores médios para $\delta^{13}\text{C}$ de -28‰ , enquanto espécies com mecanismo fotossintético C_4 apresentam valores médios de $\delta^{13}\text{C} = -14\text{‰}$ (STERNBERG *et al.*, 1984; FARQUHAR *et al.*, 1989; O'LEARY *et al.*, 1992; O'LEARY, 1993; LAMBERS *et al.*, 1998; CONDON *et al.*, 2002). A razão (*R*) $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na massa seca de espécies C_3 é o resultado da discriminação contra o carbono pesado ^{13}C durante vários processos. Esses processos incluem discriminação que ocorre durante a difusão do $^{13}\text{CO}_2$ através dos estômatos; discriminação pela enzima RUBISCO durante o processo de carboxilação da ribulose-1,5-bifosfato no primeiro produto da fotossíntese 2-carboxi-3-cetoarabinitol-1,5-bifosfato e algumas perdas associadas com fracionamento do ^{13}C durante o metabolismo e (possivelmente) respiração (CONDON *et al.*, 2002).

Tabela 2. Valor médio da composição isotópica de carbono ($\delta^{13}\text{C}$)_{PDB}, para *A. annua* (acesso CPQBA 2/39x1V).

amostra	($\delta^{13}\text{C}$) _{PDB}
01	-31,69
02	- 31,82
03	-31,78
*média	- 31,76 ± 0,07

*Média \pm desvio padrão da média.

As análises da anatomia foliar de *A. annua* confirmaram os resultados da $\delta^{13}\text{C}$ de que a espécie possui mecanismo fotossintético C_3 , e apesar de terem sido verificadas células parenquimáticas envolvendo o tecido vascular, não foi observada a presença de proteínas/cloroplastos ou grãos de amido nas referidas células, condição necessária para uma espécie ser considerada C_4 (Figuras 12 e 13). A folha é anfiestomática (pode apresentar estômatos em ambas as faces, adaxial e abaxial) e o mesofilo é dorsiventral, com uma pequena diferenciação entre os parênquimas paliçádico e lacunoso. Foi verificada a presença de grãos de amido e cloroplastos em toda a extensão do mesofilo das folhas de *A. annua* (Figuras 12 e 13), o que indica que não há uma área específica para a produção daquelas, como ocorre nas células Kranz ou células da bainha do feixe vascular, dotadas de cloroplastos e encontradas somente nas plantas C_4 (MAUSETH, 1988; RUDALL, 1994; LAWLOR, 2001).

Todavia, verifica-se nas figuras 12 e 13 a existência de uma evidente bainha de células envolvendo o feixe vascular e uma pequena diferenciação das células do mesofilo, porém, a anatomia Kranz consiste em uma camada de células que obrigatoriamente contém grandes cloroplastos e amido (MAUSETH, 1988; RUDALL, 1994).

Os resultados da $\delta^{13}\text{C}$ e a ausência de cloroplastos e grãos amido nas células parenquimáticas envolvendo o tecido vascular confirmam que a espécie *A. annua* possui um mecanismo fotossintético C_3 .

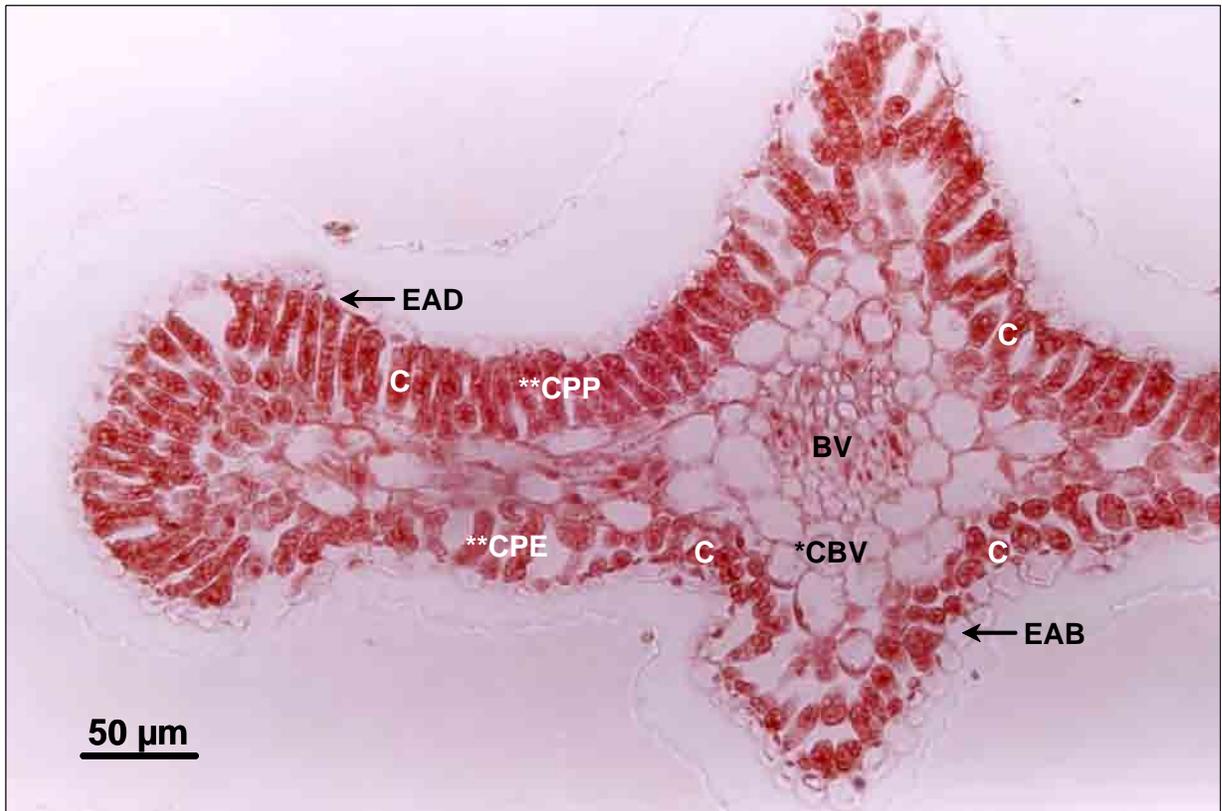


Figura 12. Corte transversal de folha de *A. annua* com teste com Xylidine Ponceau para proteínas totais. Celulas do parênquima paliçádico (**CPP**); células do parênquima esponjoso (**CPE**); bainha vascular (**BV**); células da bainha vascular (**CBV**); epiderme adaxial (**EAD**); epiderme abaxial (**EAB**); cloroplastos (**C**). **Verifica-se a presença de cloroplastos em todo o parênquima clorofiliano (CPP e CPE) e a *ausência destas estruturas nas células da bainha vascular (**CBV**).

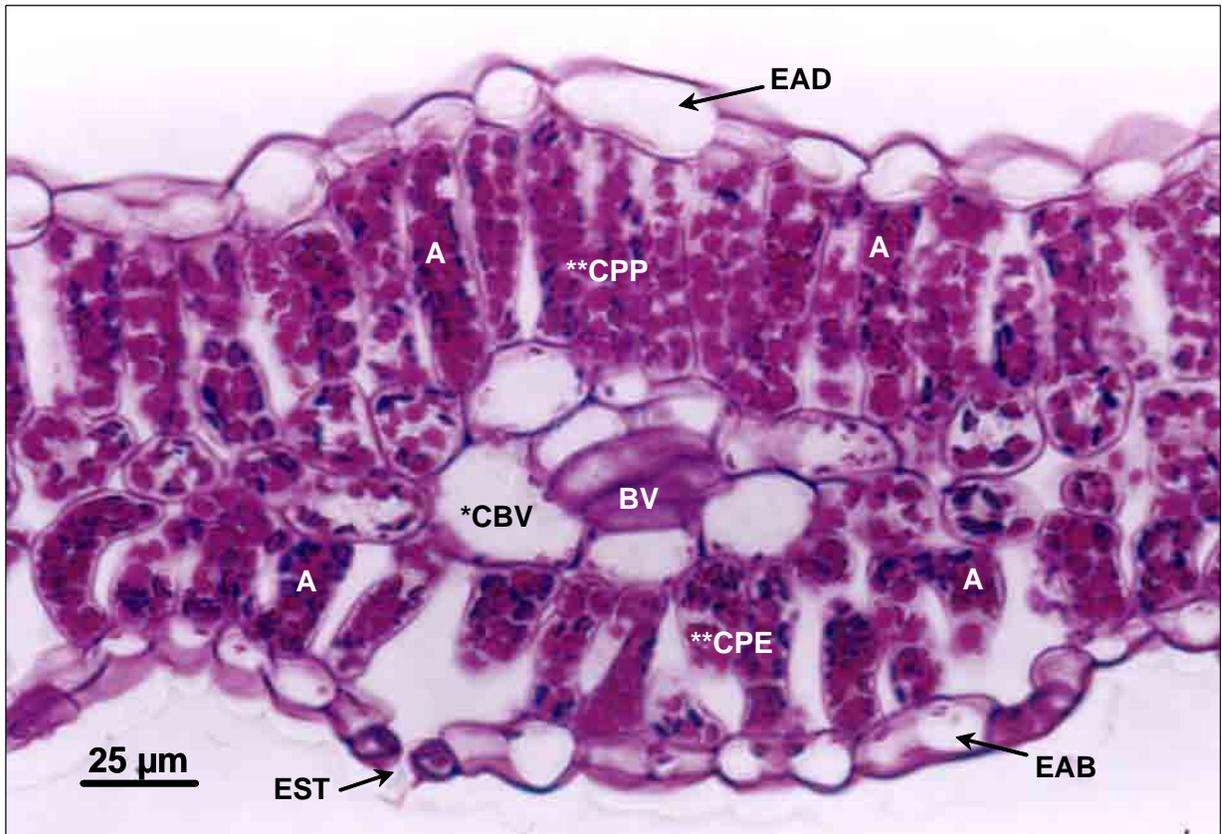


Figura 13. Corte transversal de folha de *A. annua* com teste PAS (Ácido periódico/reagente de Schiff) para carboidratos totais. Células do parênquima paliçádico (**CPP**); células do parênquima esponjoso (**CPE**); bainha vascular (**BV**); células da bainha vascular (**CBV**); epiderme adaxial (**EAD**); epiderme abaxial (**EAB**); estômato (**EST**); amido (**A**). **Verifica-se a presença de grãos de amido em todo o parênquima clorofiliano (**CPP** e **CPE**) e a *ausência destas estruturas nas células da bainha vascular (**CBV**).

7.2 Experimentos em câmaras fotoperiódicas para o estudo da fisiologia da floração de *A. annua*.

No experimento primavera/verão (Tabela 3), 100% das plantas do acesso chinês iniciaram a emissão dos botões florais aproximadamente duas semanas (média de 14,75 ciclos fotoindutivos) após serem submetidas aos tratamentos 7, 9, 11 e 13 horas de luz. Todavia, para os tratamentos 15 e 17 horas de luz, não se observou a emissão de botões florais durante todo o período em que as plantas ficaram submetidas aos tratamentos (56 dias), o que classifica o acesso chinês como uma planta de dias curtos. Estes dados estão de acordo com aqueles encontrados por FERREIRA *et al.* (1995) usando o mesmo material.

Para as plantas do acesso vietnã no experimento primavera/verão (Tabela 3), os resultados foram diferentes daqueles encontrados para o acesso chinês, onde um percentual relativamente menor de plantas emitiram botões florais, mas só a partir da quarta semana (média de 29,3 ciclos fotoindutivos), com 33,3%, 33,3% e 16,7% de florescimento para os tratamentos 7, 9 e 11 horas de luz, respectivamente. Nos tratamentos 13, 15 e 17 horas de luz, nenhuma planta floresceu. Quando o experimento foi repetido somente com o acesso vietnã no outono (Tabela 4), verificou-se que a partir da quinta semana (média de 36,6 ciclos fotoindutivos), 100% das plantas dos tratamentos 7 e 9 horas floresceram, enquanto que no tratamento 11 horas, 83,33% das plantas floresceram, observando-se um percentual de florescimento bem maior que o apresentado pelo mesmo acesso quando o experimento foi realizado na primavera/verão. Já, nos tratamentos 13, 15 e 17 horas de luz, nenhuma das plantas floresceram, uma típica resposta de planta de dias curtos.

Considerando-se todos os tratamentos com dias curtos e ambas as épocas em que os experimentos foram conduzidos, o número médio de ciclos fotoindutivos necessários para o acesso vietnã florescer é aproximadamente 32 ciclos ou dias (Tabelas 3 e 4).

Para o acesso vietnã, independentemente da época em que os experimentos foram realizados, o fotoperíodo crítico encontra-se entre 11 e 13 horas (Tabelas 3 e 4). Já, para o acesso chinês, o fotoperíodo crítico encontra-se entre 13 e 15 horas (Tabela 3). Estes dados também estão de acordo com aqueles encontrados por FERREIRA *et al.* (1995).

Tabela 3. Efeito de distintos fotoperíodos na indução da floração (emissão dos botões florais) em plantas de dois acessos de *A. annua* (chinês e vietnã) cultivados na primavera/verão¹.

Fotoperíodo (horas)	nº ciclos fotoindutivos (24 horas) necessários para indução floral		% de plantas florescidas ao término do experimento	
	chinês	vietnã	chinês	vietnã
7	14	30	100	33,3
9	14	24	100	33,3
11	14	34	100	16,7
13	17	-	100	-
15	-	-	-	-
17	-	-	-	-

¹ Temperaturas médias de cultivo: máxima de 37°C e mínima de 19°C.

Tabela 4. Efeito de distintos fotoperíodos e temperaturas na indução da floração (emissão dos botões florais) em plantas do acesso vietnã de *A. annua* cultivadas em primavera/verão e outono.

Fotoperíodo (horas)	nº ciclos fotoindutivos (24 horas) necessários para indução floral		% de plantas florescidas ao término do experimento	
	primavera/verão ¹	outono ²	primavera/verão ¹	outono ²
7	30	34	33,3	100
9	24	32	33,3	100
11	34	44	16,7	83,33
13	-	-	-	-
15	-	-	-	-
17	-	-	-	-

¹ Temperaturas médias de cultivo: máxima de 37°C e mínima de 19°C.

² Temperaturas médias de cultivo: máxima de 29°C e mínima de 13°C.

Um rápido aumento no número de entrenós e comprimento do caule é verificado em *A. annua* quando ocorre a indução floral, após a planta receber a quantidade necessária de ciclos fotoindutivos para florescer (FERREIRA *et al.*, 1995). Já na fase de floração, há uma interrupção no crescimento em altura, no incremento de entrenós e na produção de órgãos vegetativos, devido à conversão do meristema apical de vegetativo para

reprodutivo. Nesse aspecto, as diferenças são acentuadas entre os dois materiais utilizados, verificando-se para o acesso chinês sob dias curtos que o aumento dos entrenós e do comprimento do caule inicia com aproximadamente duas semanas e na quarta semana já percebe-se a interrupção no crescimento em altura e do incremento de entrenós (Figura 14-B). Para o acesso vietnã, tanto nos experimentos primavera/verão como no outono (Figura 15), o rápido aumento dos entrenós e do comprimento do caule para os tratamentos sob dias curtos, inicia-se aproximadamente com 4 semanas e a interrupção do crescimento aproximadamente com 6 semanas. Para ambos os acessos e épocas (primavera/verão e outono), nos tratamentos com dias longos as curvas de crescimento para comprimento de caule e número de entrenós apresentaram tendências lineares e as plantas ficaram vegetando até o término do experimento (Figuras 14 e 15). Com os dados agrupados em dias curtos e longos na primavera/verão (Figura 16), há uma percepção melhor e verifica-se nas curvas de crescimento sob dias curtos uma defasagem de duas semanas entre os dois acessos, tanto para o rápido aumento de entrenós e altura, quanto para a parada no crescimento. Esses resultados suportam aqueles encontrados para número de ciclos fotoindutivos, onde verifica-se que o acesso vietnã necessita do dobro de ciclos fotoindutivos do acesso chinês para começar a florescer (Tabela 3).

Observando apenas o acesso vietnã nos experimentos realizados na primavera/verão e no outono, quando os dados foram agrupados em dias curtos e longos (Figura 17), o rápido aumento dos entrenós e do comprimento do caule nos tratamentos com dias curtos ficou mais evidente, mas não percebeu-se diferença nas curvas de crescimento entre as duas épocas, o que era de se esperar devido ao número de plantas florescidas ter sido maior no outono (Tabela 4).

FERREIRA *et al.* (1995) alertam para o fato de que algumas plantas propagadas por sementes em seus experimentos, sob um fotoperíodo de 8 horas, apresentaram o fenômeno de juvenilidade, só vindo a florescer após dois meses, quando atingiram a fase adulta. Todavia, em nossos experimentos trabalhamos com estacas de plantas adultas, para ambos os acessos, o que inviabiliza a existência de juvenilidade nos clones e reforça a existência de diferenças entre os acessos para o número de ciclos fotoindutivos e fotoperíodo indutivo.

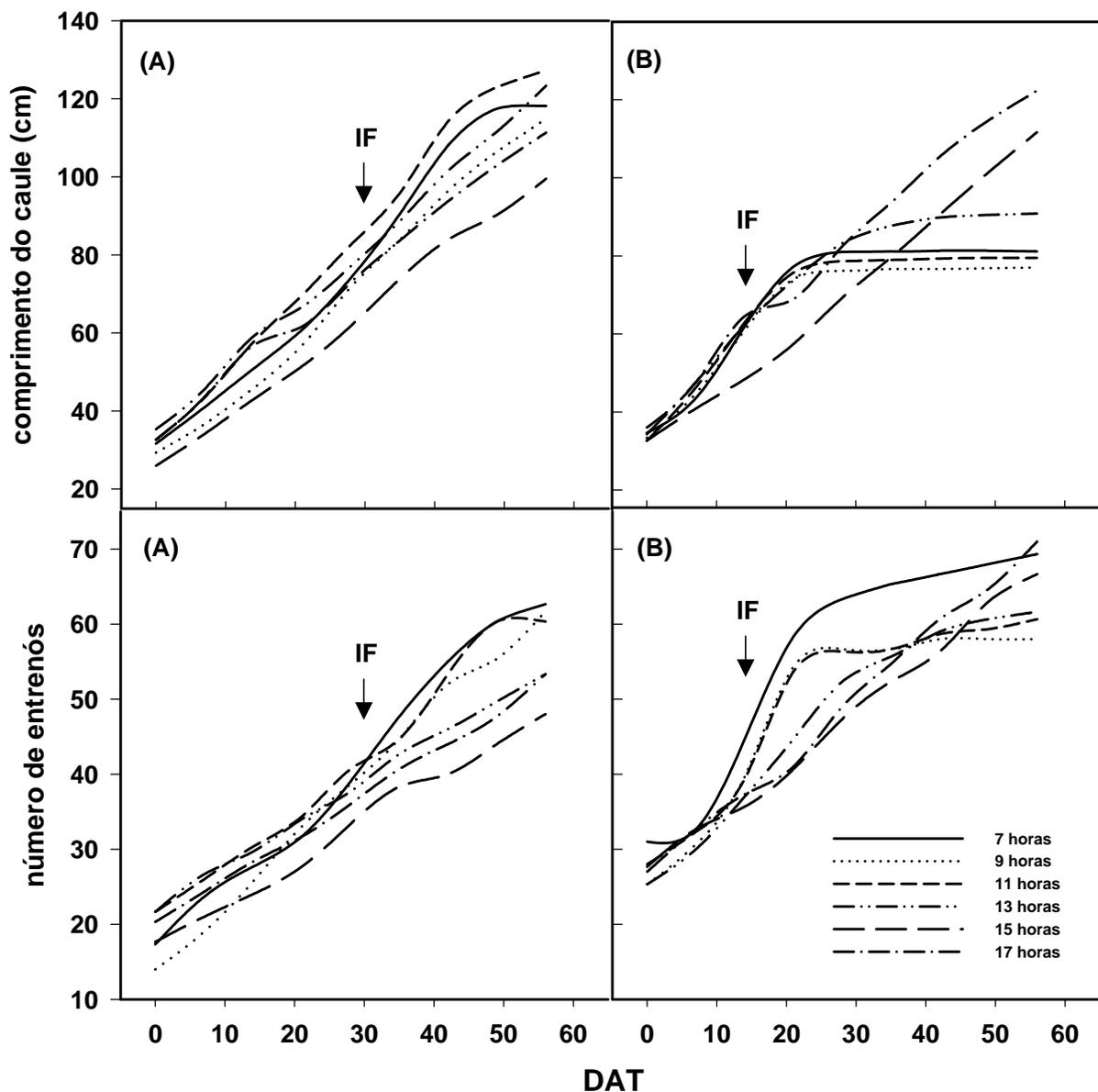


Figura 14. Efeito de diferentes fotoperíodos no comprimento do caule e número de entrenós dos acessos vietnã (A) e chinês (B) de *A. annua* cultivados em temperaturas médias de 37°C (máx.) e 19°C (mín.) durante a primavera/verão. IF = início do florescimento (emissão dos botões florais). DAT = dias após o transplante.

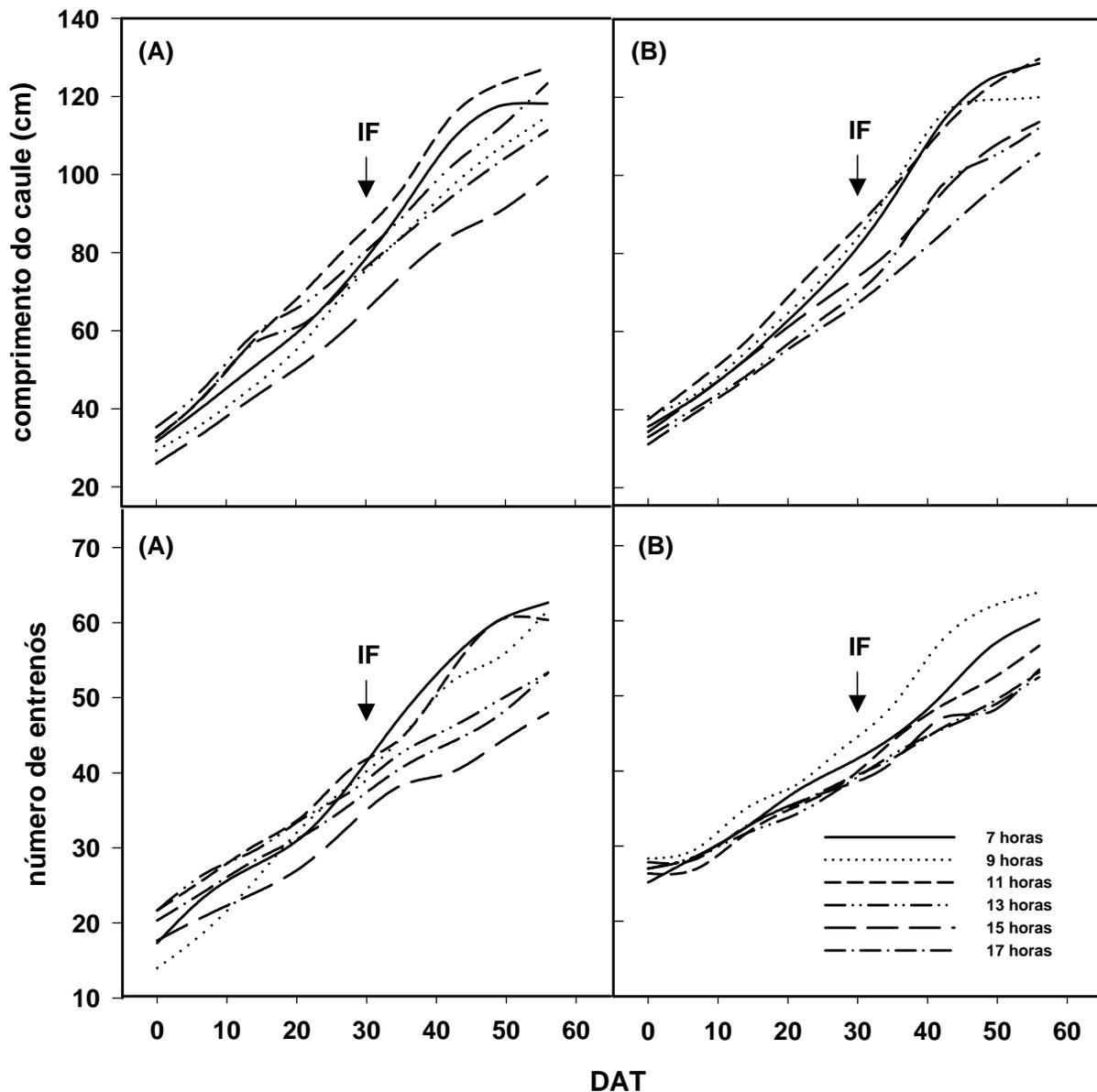


Figura 15. Efeito de diferentes fotoperíodos no comprimento do caule e numero de entrenós do acesso vietnã de *A. annua* cultivado em temperaturas médias de 37°C (máx.) e 19°C (mín.) durante a primavera/verão (A) e 29°C (máx.) e 13°C (mín.) durante o outono (B). IF = início do florescimento (emissão dos botões florais). DAT = dias após o transplante.

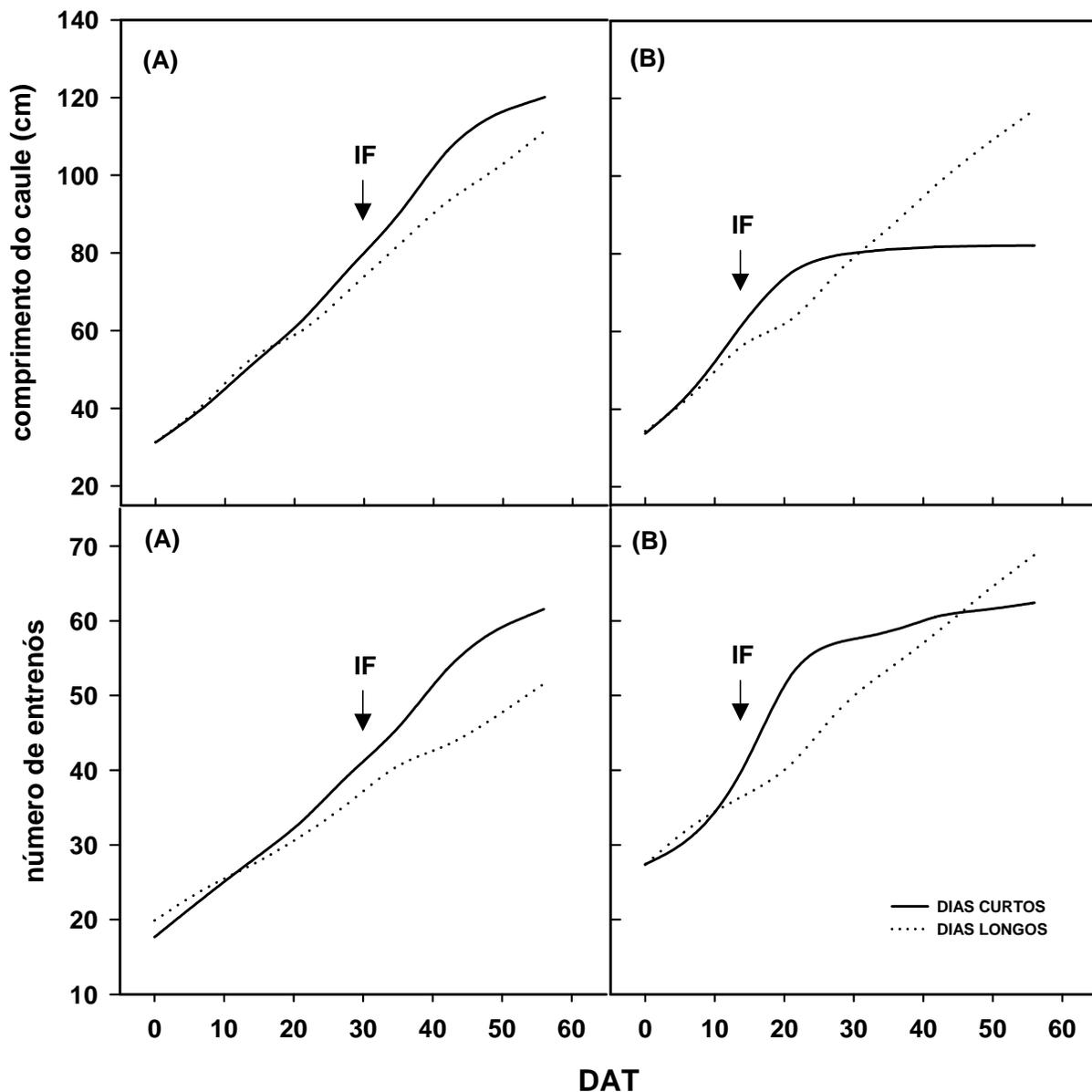


Figura 16. Efeito de dias curtos (dados agrupados dos tratamentos com 7, 9, 11 horas de luz) e dias longos (dados agrupados dos tratamentos com 13, 15 e 17 horas de luz) no comprimento do caule dos acessos vietnã (A) e chinês (B) de *A. annua* cultivados em temperaturas médias de 37°C (máx.) e 19°C (mín.) durante a primavera/verão. IF = início do florescimento (emissão dos botões florais). DAT = dias após o transplante.

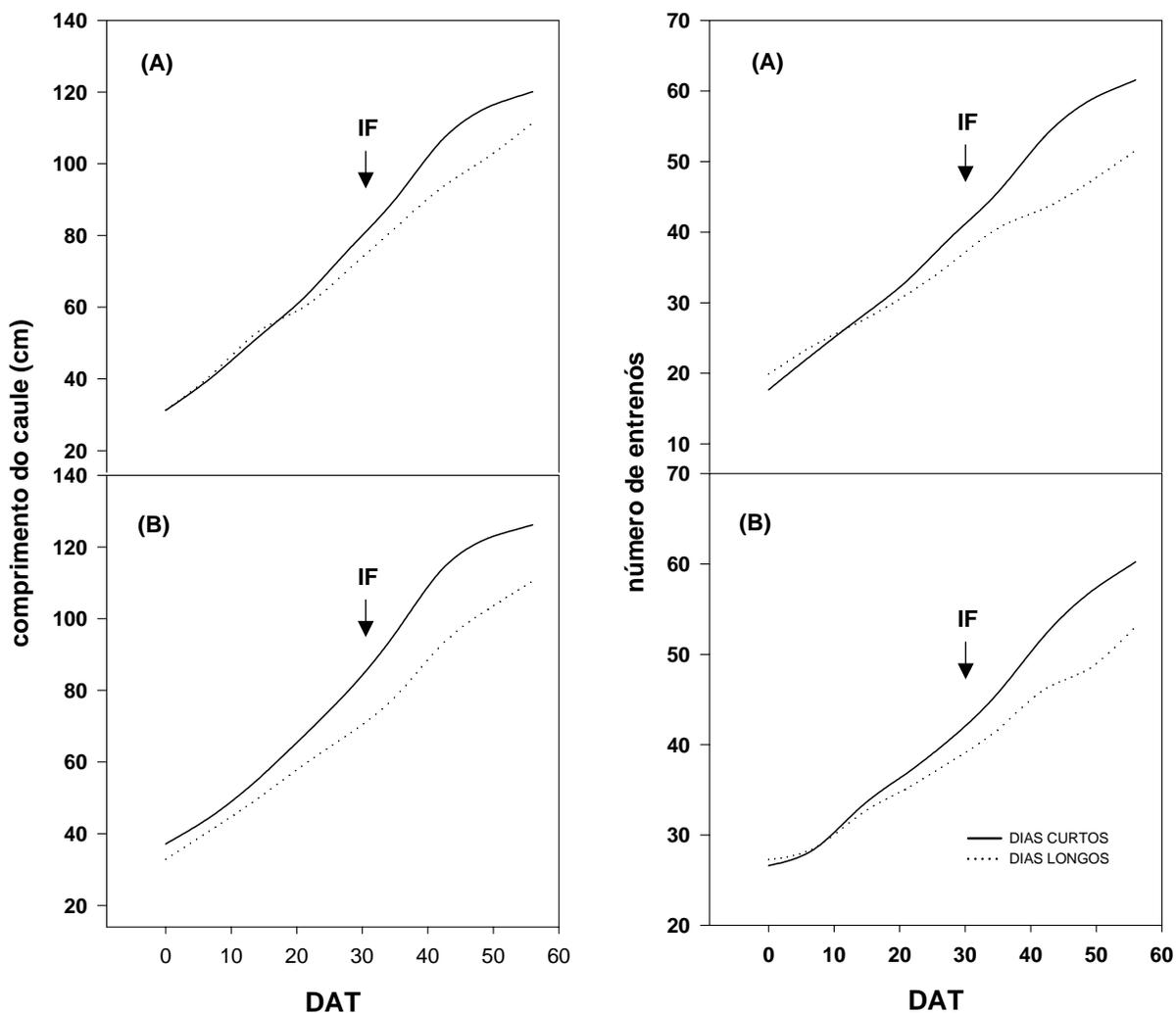


Figura 17. Efeito de dias curtos (dados agrupados dos tratamentos com 7, 9, 11 horas de luz) e dias longos (dados agrupados dos tratamentos com 13, 15 e 17 horas de luz) no comprimento do caule e número de entrenós do acesso vietnã de *A. annua* cultivado em temperaturas médias de 37°C (máx.) e 19°C (mín.) durante a primavera/verão (A) e 29°C (máx.) e 13°C (mín.) durante o outono (B). IF = início do florescimento (emissão dos botões florais). DAT = dias após o transplante.

Os resultados encontrados neste estudo demonstraram que há uma variação na resposta ao ambiente e no comportamento fisiológico entre populações de *A. annua* oriundas de diferentes regiões geográficas. CHEN & ZHANG (1987), MAGALHÃES (1996) e MARCHESE (1999), estudando o efeito da temperatura na produção de artemisinina, sugerem que o comportamento da espécie *A. annua* não é padrão, sendo variável para diferentes genótipos. WALLAART *et al.* (2000) sugerem a existência de quimiotipos de *A. annua* em função da origem geográfica.

Uma das principais observações verificadas em ambos os experimentos conduzidos com o acesso vietnã foi uma forte interação entre fotoperíodo e temperatura na indução ao florescimento das plantas testadas, onde as temperaturas menores ocorridas no experimento outono (máxima de 29°C e mínima de 13°C) induziram a um maior florescimento nas plantas dos tratamentos com dias curtos (7, 9 e 11 horas), em detrimento daquelas submetidas às temperaturas maiores no experimento primavera/verão (máxima de 37°C e mínima de 19°C) (Tabela 4).

Pode-se afirmar que os clones do acesso vietnã (CPQBA 2/39x1V) apresentaram um comportamento fotoperiódico de Planta de Dias Curtos qualitativa ou absoluta (não floresce na ausência do fotoperíodo indutivo), com requerimento de baixas temperaturas para ter seu florescimento acelerado. O acesso vietnã apresentou um hábito de crescimento determinado, pois a partir da indução floral nos tratamentos com dias curtos, observou-se uma interrupção no crescimento em altura e no incremento de entrenós (Figura 17), além de uma redução na produção dos órgãos vegetativos e rápida senescência destes, devido à conversão do meristema apical vegetativo em reprodutivo. Esse comportamento é padrão em plantas que possuem hábito de crescimento ou florescimento determinado (LOOMIS & CONNOR, 1992).

Também, foi observado um decréscimo acentuado no teor de artemisinina nas folhas das plantas submetidas a dias curtos no experimento outono, na 4ª semana após o início do florescimento (Figura 18). Rápido decréscimo no conteúdo de artemisinina durante a fase reprodutiva também foi verificado por WANG *et al.*, (2004) e LAUGHLIN (1993). Essa informação sugere que não se deve aguardar muito tempo após o início da floração para proceder a colheita de *A. annua*. Em dias curtos, a maior concentração

de artemisinina foi observada três semanas após o florescimento, sendo este o momento adequado para a colheita (Figura 18).

Uma hipótese que poderia explicar os resultados descritos acima, onde as temperaturas menores induziram a um maior florescimento nas plantas dos tratamentos com dias curtos em detrimento daquelas submetidas as temperaturas maiores, seria que em plantas submetidas a temperaturas menores, ocorre uma maior produção de artemisinina (FERREIRA, 1994; MAGALHÃES, 1996; FERREIRA *et al.*, 1995; WALLAART *et al.*, 2000) e o aumento no teor da molécula pode induzir a um aumento na quantidade de plantas florescidas. É fato conhecido que o maior teor de artemisinina em *A. annua* ocorre quando as plantas encontram-se nas fases de pré-floração e floração (PRAS *et al.*, 1991; MORALES *et al.*, 1993; FERREIRA, 1994; LAUGHLIN, 1995; FERREIRA & JANICK, 1996) (ver Figura 18), o que sugere que a molécula possa estar de alguma forma relacionada com a indução da floração na espécie. Corroborando com essa hipótese, WALLAART *et al.* (2000) verificaram que plantas originárias do Vietnã apresentaram um teor de artemisinina muito maior quando estas foram submetidas a condições de baixas temperaturas, o que não foi observado em plantas provenientes de populações da China.

Para confirmar a hipótese descrita acima, foi feita a aplicação exógena de artemisinina no acesso vietnã e em um segundo acesso, CPQBA 3MxPOP, cujos parentais também são provenientes do Vietnã. Como resultado, a aplicação exógena de artemisinina não induziu ao florescimento e não provocou rápido aumento na altura e no número de entrenós das plantas de ambos os acessos de *A. annua* testados, em nenhuma das concentrações utilizadas, e as curvas de crescimento para comprimento de caule e número de entrenós foram lineares, ficando as plantas vegetando até o término do experimento (Figura 19). Dando suporte a esses resultados, WANG *et al.* (2004) não observaram relação direta entre florescimento e biossíntese de artemisinina, comparando plantas de *A. annua* transformadas geneticamente (que tiveram inserido em seu genoma o fator promotor de florescimento *fpfl* de *Arabidopsis thaliana*) e não-transformadas. Sob as mesmas condições de dias curtos não foram observadas diferenças no conteúdo de artemisinina entre plantas transgênicas florescidas e não-transgênicas vegetativas. As plantas transgênicas tiveram seu florescimento antecipado em duas semanas quando comparadas as não-transgênicas.

Esses resultados sugerem que a molécula de artemisinina pode não está diretamente relacionada com a indução floral na espécie, ainda que o acúmulo da artemisinina ocorra nas fases de pré-floração e floração.

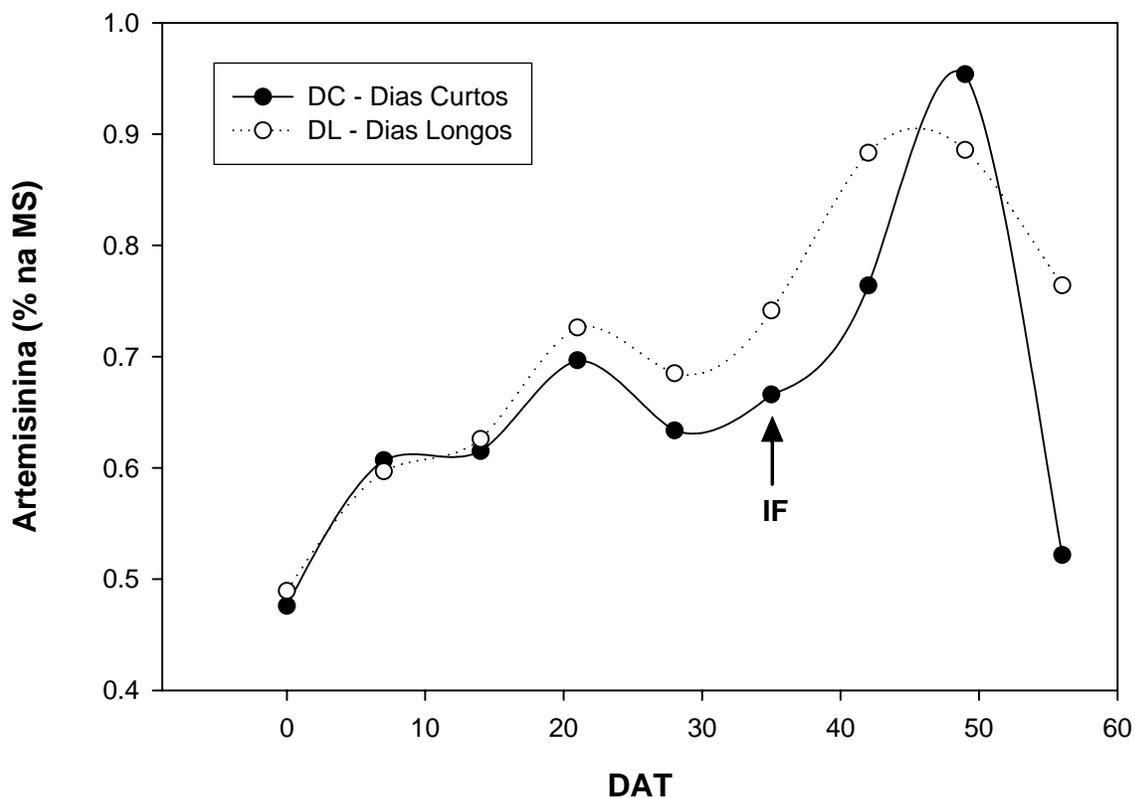


Figura 18. Efeito de dias curtos (dados agrupados dos tratamentos com 7, 9, 11 horas de luz) e dias longos (dados agrupados dos tratamentos com 13, 15 e 17 horas de luz) no teor de artemisinina do acesso vietnã de *A. annua* cultivado em temperaturas médias de 29°C (máx.) e 13°C (mín.) durante o outono. IF = início do florescimento (função da média de ciclos fotoindutivos dos tratamentos 7, 9, 11 horas de luz). DAT = dias após o transplante.

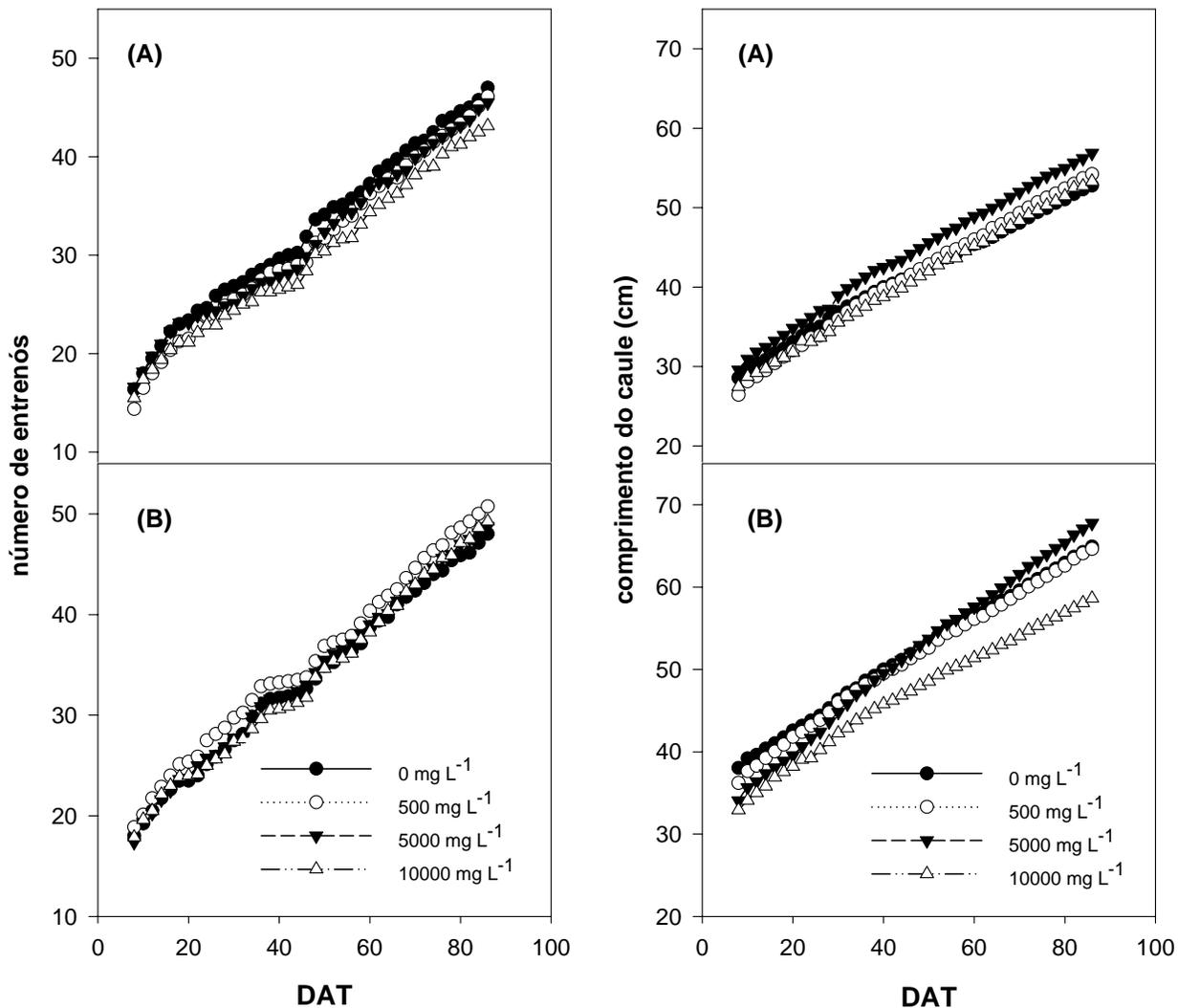


Figura 19. Influência de diferentes concentrações de artemisinina no número de entrenós e no comprimento do caule de plantas dos acessos CPQBA 3MxPOP (A) e vietnã (B) de *A. annua* cultivados em dias curtos.

7.3 Experimento em campo para definição da época de plantio e fisiologia da floração do acesso CPQBA 2/39X1V

O número de ciclos fotoindutivos (CF) encontrado no experimento em campo para o acesso CPQBA 2/39x1V de *A. annua* foi de aproximadamente 28 ciclos (dias) (Figura 20), muito próximo do número médio de CF de 32 dias encontrado nos experimentos em câmaras fotoperiódicas. Se observar a 5ª época de plantio (Tabela 5 e Figura 20), verifica-se que a mesma foi levada ao campo em março, período em que as épocas anteriores estavam florescendo, ou seja, dentro do período fotoindutivo. Então, para calcular o número de CF necessários para o florescimento do acesso 2/39x1V, basta determinar o número de dias existentes entre a data do transplante em campo da 5ª época e a data do seu florescimento (Tabela 5 e Figura 20), que foi de 28 dias ou 28 ciclos fotoindutivos. Esse resultado é diferente daquele encontrado por FERREIRA (1994) e largamente reportado na literatura, em que *A. annua* floresce aproximadamente 14 dias após ser submetida ao fotoperíodo indutivo (FI). Esse resultado comprova que não existe um padrão nas respostas de *A. annua* ao ambiente, sendo variável para diferentes genótipos.

Uma vez encontrado o número $CF = 28$, basta verificar a data do florescimento da 1ª época, subtrair 28 dias, e encontra-se o FI para o acesso CPQBA 2/39x1V de *A. annua*, que ocorreu aproximadamente na data de 07/02/2001, cujo comprimento do dia foi de 13,07 horas, ou seja, $FI = 13,07$ horas (Figura 20). Também, verificou-se que as plantas floresceram abaixo do fotoperíodo indutivo, confirmando os dados dos experimentos em câmaras fotoperiódicas de que o acesso vietnã (CPQBA 2/39x1V) é uma planta de dias curtos (PDC) (Tabela 5). O valor do FI próximo de 13,07 horas suporta aquele encontrado em câmaras fotoperiódicas, que mostraram um FI para o acesso CPQBA 2/39x1V entre 11-13 horas (Tabela 4). BAGCHI *et al.* (1997b) em experimento conduzido em Lucknow, Índia (Latitude 26,5⁰N), em 1994/95, relatam que fotoperíodos entre 11-13h promoveram um rápido crescimento das plantas e que o FI para *A. annua* foi em média 13,2 horas, muito similar ao de Pato Branco-PR. FERREIRA (1994) reporta um FI de 13,5 h em experimento de campo realizado em West Lafayette, IN, EUA (Latitude 40⁰N).

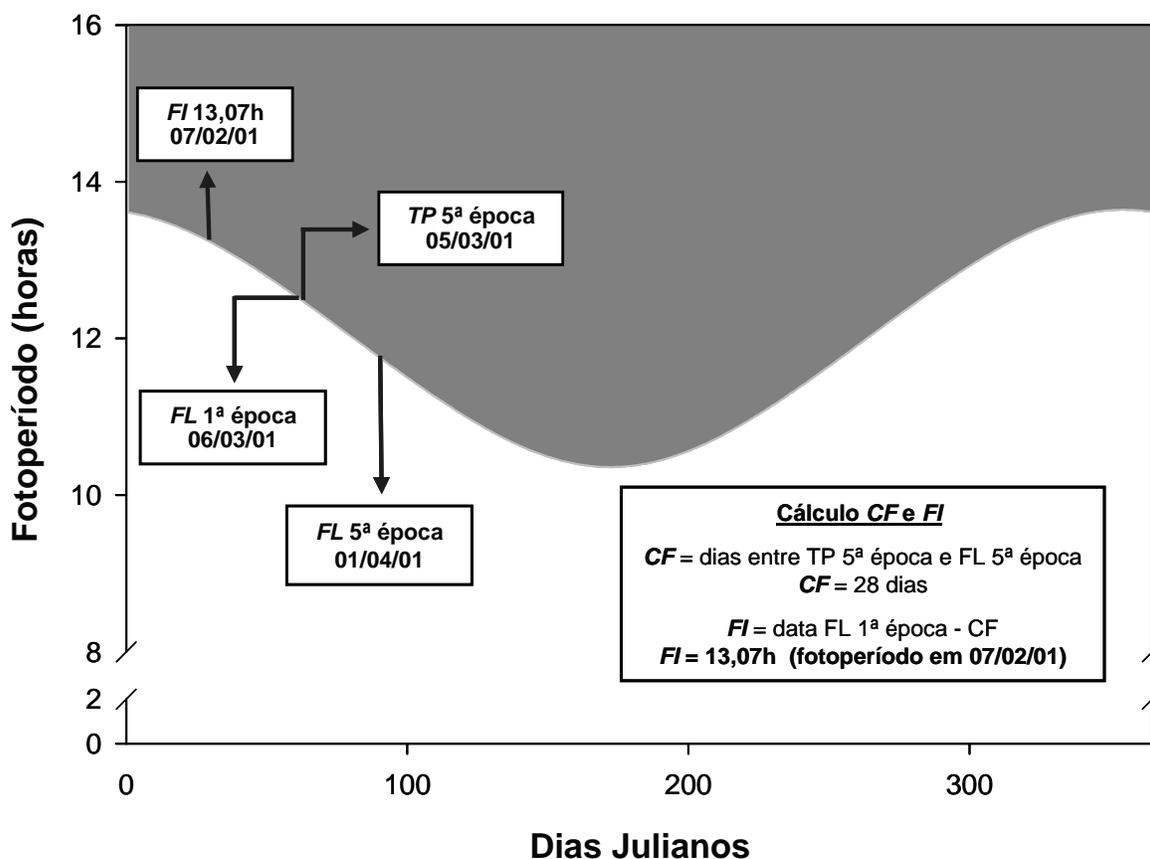


Figura 20. Fotoperíodo anual em Pato Branco-PR, Brasil (latitude 26°07' S, longitude 52°41' W, altitude de 760m) e caracterização do florescimento de *A. annua* (CPQBA 2/39x1V). FI = fotoperíodo indutivo; TP = transplante para o campo; FL = emissão do botão floral; CF = número de ciclos fotoindutivos.

MAGALHÃES *et al.* (1997) cultivando o mesmo acesso CPQBA 2/39x1V, observaram em campo que as plantas permaneceram vegetativas em fotoperíodos acima de 13 horas e abaixo de 11 horas, e floresceram em um fotoperíodo entre 11 e 13 horas, o que sugere um comportamento de *Plantas de Dias Intermediários* (PDI). Essa afirmação é questionável, pois MAGALHÃES *et al.* (1997) relatam que seus experimentos foram conduzidos em campo no município de Campinas-SP (lat. 22°48'S), onde o menor fotoperíodo é observado no solstício de inverno, e não é inferior 10,6 horas. Para afirmar que as plantas do acesso CPQBA 2/39x1V não florescem abaixo de 11 horas, os autores deveriam ter elaborado

um experimento com câmaras fotoperiódicas, nos moldes dos apresentados nesta tese, testando o acesso em fotoperíodos menores do que 11 horas.

Tabela 5. Datas de plantio, transplante e florescimento do acesso 2/39x1V de *A. annua* em Pato Branco-PR, Brasil (26⁰07'S e 52⁰41'W – 760 m alt.).

Data	1ª época	2ª época	3ª época	4ª época	5ª época	6ª época
08/2000	P 18	---	---	---	---	---
09/2000	T 23	---	---	---	---	---
10/2000	---	P 21	---	---	---	---
11/2000	---	T 20	P 25	---	---	---
12/2000	---	---	---	P 15	---	---
01/2001	---	---	T 16	---	P 20	---
02/2001	---	---	---	T 07	---	---
03/2001	F 06	F 10	F 19	F 19	T 05	---
04/2001	---	---	---	---	F 01	---
05/2001	---	---	---	---	---	P 15
06/2001	---	---	---	---	---	---
07/2001	---	---	---	---	---	T 10
08/2001	---	---	---	---	---	F 09

P = data de plantio das estacas; T = data do transplante para o campo; F = data em que 50% das plantas iniciaram o florescimento, também a data da colheita.

Porém, dos resultados encontrados por MAGALHÃES *et al.* (1997), chama atenção o fato de que as plantas foram transplantadas para o campo em abril de 1996, durante o fotoperíodo indutivo, e permaneceram vegetativas até o aparecimento dos botões florais em 06/12/96, momento da colheita. O atraso no florescimento encontrado por MAGALHÃES *et al.* (1997) para o acesso CPQBA 2/39x1V, provavelmente, é uma resposta às temperaturas mais elevadas que ocorrem no período outono no clima intertropical de Campinas-SP, em comparação com as temperaturas no mesmo período observadas em Pato

Branco-PR (Figura 21). Na Tabela 5, verifica-se que não houve atraso no florescimento para 5ª e 6ª épocas em Pato Branco, cujos transplantes foram feitos sob fotoperíodo indutivo no outono. Os resultados dos experimentos em campo de Campinas-SP (MAGALHÃES *et al.*, 1997) e Pato Branco-PR, suportam os resultados encontrados nos estudos com câmaras fotoperiódicas sobre a necessidade de baixas temperaturas para acelerar o florescimento do acesso CPQBA 2/39x1V (Tabela 4).

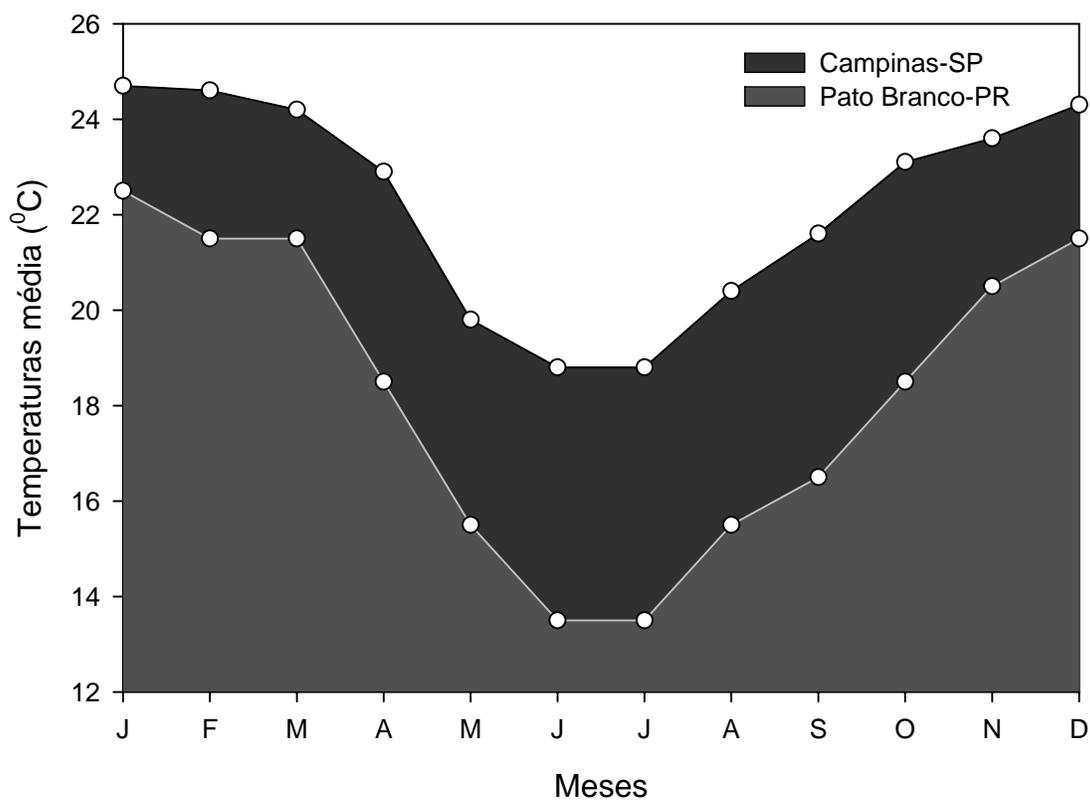


Figura 21. Médias das temperaturas médias mensais em Campinas-SP (22⁰47'S e 47⁰06'W – 606m alt.) e Pato Branco-PR (26⁰07'S e 52⁰41'W – 760m alt.). Fonte: IAPAR, 1994; CIIAGRO/IAC, 2005.

A informação de que o FI para o acesso CPQBA 2/39x1V em Pato Branco-PR ocorre na primeira quinzena de janeiro e o florescimento e colheita em março (Tabela 5), permite inferir sobre época ideal de plantio deste material. Uma vez que o maior

acúmulo da artemisinina ocorre nas fases de pré-floração ou floração (Figura 18) e que aproximadamente 90% da artemisinina total da planta está nas folhas, deve-se escolher uma data de plantio o mais distante possível do período indutível ao florescimento, para que as plantas possam vegetar ao máximo, e acumular biomassa foliar e artemisinina. Devido à espécie ser de hábito determinado, após o florescimento há uma rápida senescência e decréscimo do teor de artemisinina, devendo-se colher as plantas logo no início do florescimento (Figura 18).

Com relação ao rendimento de massa seca de folhas, caules, folhas + caules e produção de artemisinina para o acesso CPQBA 2/39x1V, a época de plantio que alcançou significativamente os maiores rendimentos foi a 1ª época (Tabela 6 e Figura 22), devido ao maior tempo de permanência das plantas no campo antes do florescimento, 165 dias do transplante até a colheita, 23/09/2000 à 06/03/2001, respectivamente. As plantas que foram transplantadas em 20/11/00, 16/01/01 e 07/02/01, respectivamente 2ª, 3ª e 4ª épocas, acabaram florescendo em março (final do verão), junto com as da 1ª época, e conseqüentemente permaneceram menos tempo vegetando no campo e apresentaram rendimentos de fitomassa e artemisinina menores. Já, as plantas das 5ª e 6ª épocas ficaram de 4 a 5 semanas sob fotoperíodo indutivo no campo, floresceram rapidamente, e apresentaram os menores rendimentos de todo o experimento (Tabela 6 e Figura 22).

Estes resultados determinam que o transplante de mudas para o campo deve ser feito prioritariamente no último decêndio de setembro ou no início de outubro (começo da primavera), para alcançar um maior rendimento de massa seca de folhas e artemisinina. Não recomenda-se o plantio nos dois primeiros decêndios de setembro devido ao fato de estarem ocorrendo geadas extemporâneas na região de Pato Branco-PR (Tabela 1). Plantas da 6ª época, transplantadas em 10/07/01 e colhidas em 09/08/01, apresentaram sintomas de queima devido às geadas ocorridas no período (Tabela 1).

LAUGHLIN (1993) realizou experimento similar na Tasmânia, Austrália (Latitude 42⁰S), usando um acesso iugoslavo, e encontrou resultados muito similares aos de Pato Branco, comparando transplantes na primavera, 28/10 e 28/11, com transplante no verão, 21/12. Todas as épocas de plantio floresceram em março de 1989 (outono), e a maior produção de fitomassa e artemisinina foi encontrada no transplante de outubro. Em experimento realizado em Campinas-SP (Latitude 23⁰S) no período 2000/2001,

MAGALHÃES *et al.* (2004) encontraram resultado semelhantes aos do Paraná para época de colheita, com as plantas sendo colhidas em março (início do outono).

Tabela 6. Efeito de diferentes épocas de transplante na produção de artemisinina, rendimento da fitomassa seca e razão folha/caule no acesso CPQBA 2/39x1V de *A. annua*.

Épocas de transplante	¹ DAT	--- ² Artemisinina ---		² MS folhas	² MS caules	² MS total	² Razão Folha/caule
		% MS	----- Kg ha ⁻¹ -----				
23/09/00	165	0,99 A	30,38 A	3.045,1 A	14.974,9 A	18.020,0 A	0,21 B
20/11/00	111	1,05 A	17,20 B	1.643,9 B	5.383,2 B	7.027,1 B	0,32 B
16/01/01	63	0,81 B	4,55 C	561,3 C	864,8 C	1.426,1 C	0,67 B
07/02/01	41	0,53 C	0,87 C	161,5 C	186,9 C	348,4 C	0,87 B
05/03/01	28	0,55 C	0,10 C	20,9 C	14,6 C	35,6 C	1,46 A
10/07/01	31	0,50 C	0,22 C	39,6 C	32,1 C	71,7 C	1,35 A

¹DAT = dias após o transplante; ** Valores seguidos da mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Bonferroni a 5%.

Alguns experimentos conduzidos no hemisfério Norte, também apresentaram resultados similares aos de Pato Branco. Em um dos primeiros experimentos agronômicos de *A. annua* reportados, realizado na Bulgária entre 1975 e 1978, GALAMBOZI (1980) recomenda o plantio da espécie no final de março e início de abril, primavera no hemisfério Norte. HAIDER *et al.* (2004) em experimento conduzido em Lucknow, Índia (Latitude 26,5^oN), em 2001, relatam o início do florescimento para 5 diferentes épocas de plantio em 12 de outubro (início do outono), enquanto KUMAR *et al.* (2004) conduzindo experimento no mesmo local em 2001, com a cultivar Jeevan-raksha, relata o florescimento das plantas no final de agosto. Baseando-se nos resultados reportados nos experimentos com *A. annua* em ambos os hemisférios, pode-se generalizar que a estação ideal de plantio é a primavera, e que a colheita durante florescimento deve ocorrer no outono. A Figura 23 é uma síntese destas informações.

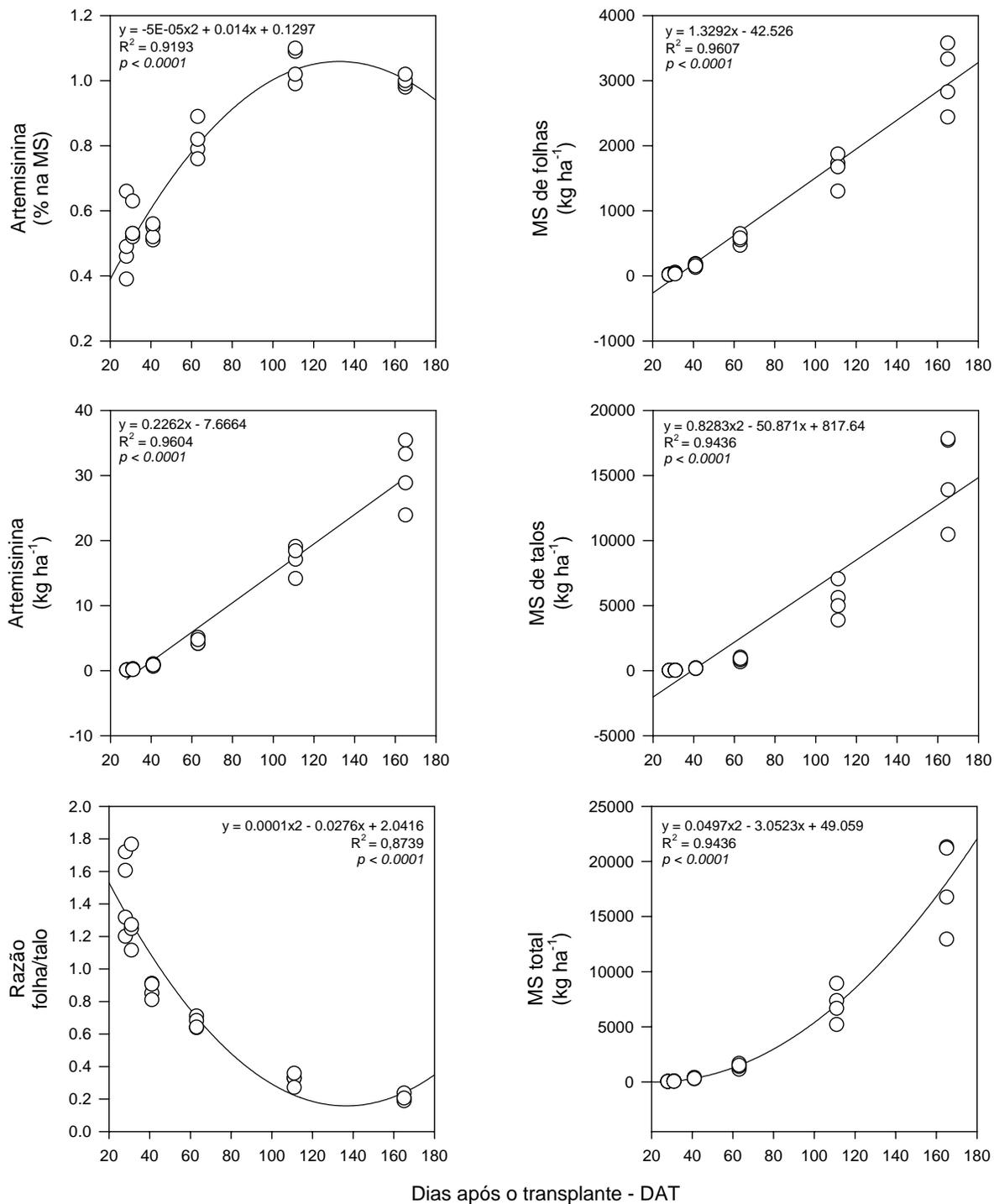


Figura 22. Rendimento da fitomassa seca e artemisinina, razão folha/caule e teor de artemisinina do acesso CPQBA 2/39x1V de *A. annua* em função de diferentes datas de plantio: 23/09/2000 (165 DAT) ; 20/11/2000 (111 DAT); 16/01/2001 (63 DAT); 07/02/2001 (41 DAT); 05/03/2001 (28 DAT); 10/07/2001 (31 DAT).

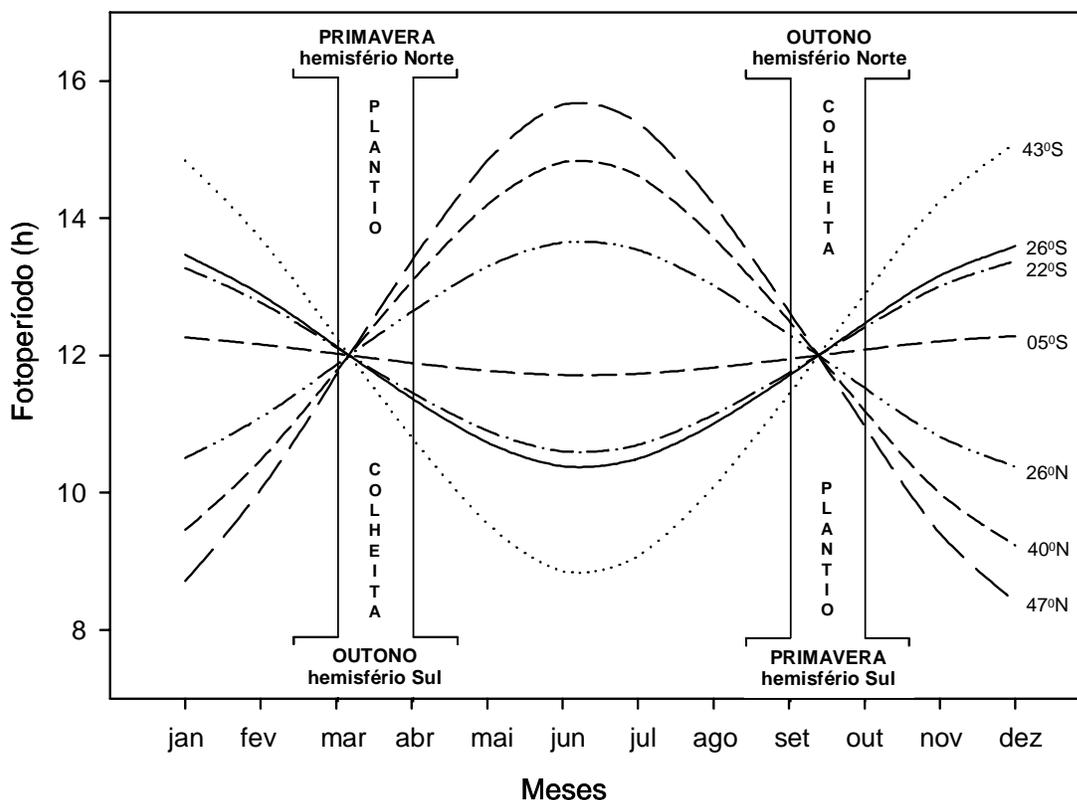


Figura 23. Épocas de plantio (primavera) e colheita (outono) em função do fotoperíodo anual em diferentes locais de cultivo de *A. annua* nos hemisférios Sul (5°S = Teresina-PI; 22°S = Campinas-SP; 26°S = Pato Branco-PR; 43°S = Tasmania, Austrália) e Norte (47°N = Bulgária; 40°N = West Lafayette, IN, EUA e 26°N = Lucknow, Índia). Fonte: GALAMBOZI (1980); LAUGHLIN (1993); MAGALHÃES *et al.* (2004); HAIDER *et al.* (2004); KUMAR *et al.* (2004); FERREIRA *et al.* (2005).

As plantas da 1ª época, que passaram mais tempo vegetando no campo (165 dias), apresentaram uma razão folha/caule menor (0,21) devido ao aumento no peso do caule, em face da lignificação dos tecidos de sustentação (Tabela 6 e Figura 22). MAGALHÃES *et al.* (1999) encontraram em Campinas-SP, uma razão folha/caule de 0,20 em plantas do acesso CPQBA 2/39x1V, que permaneceram 163 dias no campo, praticamente igual aquela encontrada no experimento em Pato Branco-PR. Esses valores sugerem um padrão genético para essa característica, sem efeito do ambiente. A razão folha/caule é uma característica importante no processamento industrial de *A. annua*, uma vez que o caule

contém ceras que dificultam o isolamento e a purificação da artemisinina. Quanto maior a razão, menor é a quantidade de caules, facilitando a extração da artemisinina e precursores. KUMAR *et al.* (2004) relata para a cv. Jeevan-raksha razões folha/caule de 0,61 e 0,51, para 155 e 180 dias após o transplante, respectivamente. Esta é uma importante característica a ser observada num programa de melhoramento de *A. annua*.

Com relação ao teor de artemisinina na massa seca de folhas para as diferentes épocas de plantio, a 1ª e a 2ª épocas foram significativamente superiores às outras (Tabela 6 e Figura 22), comprovando ser o teor de artemisinina função da ontogenia. Essa informação já é corrente na literatura (MORALES *et al.*, 1993; FERREIRA *et al.*, 2005).

Embora não tenha sido planejado um ensaio nacional para *A. annua*, o acesso CPQBA 2/39x1V foi cultivado durante anos em Campinas-SP, e os resultados podem ser comparados com Pato Branco-PR, embora os anos agrícolas tenham sido diferentes.

Conforme pode-se observar na Tabela 7, há uma superioridade de 32% no rendimento de massa seca de folhas em Pato Branco (26°07'S) quando comparado com Campinas (22°47'S), o que representa um incremento de quase 1 ton ha⁻¹. A diferença se mantém próxima a 30% se compararmos o rendimento de artemisinina de 30,38 kg ha⁻¹ em Pato Branco contra 21,38 kg ha⁻¹ em Campinas. O ciclo das plantas foi praticamente o mesmo, 165 dias para Pato Branco e 163 dias para Campinas.

Tabela 7. Comparação dos dados de rendimento de fitomassa e artemisinina obtidos em Pato Branco-PR (26°07'S e 52°41'W – 760m alt.) e Campinas-SP (22°47'S e 47°06'W – 606m alt.) para o acesso CPQBA 2/39x1V de *A. annua*.

Localidade	¹ DAT	Ano agrícola	MS folha (kg ha ⁻¹)	% artemisinina	Artemisinina (kg ha ⁻¹)
Pato Branco-PR	165	2000/2001	3.045,10	0,99	30,38
² Campinas-SP	163	1996/1997	2.056,05	1,04	21,38

¹DAT = dias após o transplante; ²MAGALHÃES *et al.* (1999).

A resposta para esta diferença de rendimento em um mesmo acesso de *A. annua*, reside, possivelmente, na fisiologia da espécie e nas diferenças de temperatura entre as localidades em questão. Conforme descrito no item 7.1, *A. annua* é uma espécie com metabolismo fotossintético tipo C₃. Em geral, as espécies C₃ adaptam-se melhor em climas mais amenos, e isso ocorre porque em altas temperaturas as reações de oxigenação da enzima RUBISCO aumentam proporcionalmente as reações de carboxilação, devido ao decréscimo da solubilidade do CO₂ e um efeito na cinética da enzima (ex., K_m e V_{máx}). Esse fenômeno fisiológico é denominado fotorespiração, cujo efeito na assimilação líquida de carbono é desprezível nas plantas C₄, mas muito importante nas plantas C₃, quando estas são cultivadas em localidades de menores latitudes e altitudes, com elevada temperatura. No processo fotorespiratório a enzima RUBISCO atua como oxigenase, acoplado em seu sítio ativo uma molécula de O₂, ao invés de CO₂, e nas subsequentes reações ocorre a perda líquida de um CO₂. Isso quer dizer que aumentos significativos na fotorrespiração diminuem a assimilação de CO₂ nas plantas C₃, com consequente perda de rendimento em fitomassa (LOOMIS & CONNOR, 1992; RUDALL, 1994; HALL & RAO, 1995; KÖRNER & BAZZAZ, 1996; LAMBERS *et al.*, 1998; LAWLOR, 2001).

As temperaturas médias mensais maiores que ocorrem em Campinas-SP (Figura 21), provocam um aumento da fotorrespiração no acesso 2/39x1V e possivelmente são responsáveis pela diferença de rendimento de biomassa, e consequentemente de artemisinina, observado em favor de Pato Branco-PR (Tabela 7). MARCHESE & REHDER (2001) conduzindo experimentos em câmara de crescimento observaram um aumento de fitomassa para o acesso 2/39x1V na amplitude térmica de 11/20°C (noite/dia) comparada com 18/28°C, sugerindo que temperaturas menores afetam positivamente a produção de *A. annua*.

O maior rendimento de artemisinina observado em Pato Branco parece estar mais associado aos ganhos em biomassa foliar do que ao teor de artemisinina nas folhas, que foi similar em ambas as localidades, aproximadamente 1% (Tabela 7).

FERREIRA *et al.* (2005) sugere que baixas temperaturas aumentam o teor de artemisinina nas folhas. FERREIRA (1994) 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*. Todavia, MARCHESE & REHDER (2001) conduzindo experimentos em câmara de

crescimento observaram que o teor de artemisinina para o acesso 2/39x1V de *A. annua* apresentou maior teor de artemisinina na amplitude térmica de 18/28°C (noite/dia) do que o tratamento 11/20°C, sugerindo que temperaturas maiores induzem um aumento no teor de artemisinina nas folhas. 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 $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

MAGALHÃES (1996) em experimento comparando diferentes acessos, 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, o mais importante a se considerar é o relato de que este comportamento não foi padrão para todos os acessos testados. Além do mais, o decréscimo nos teores de artemisinina, em consequência da maior temperatura ambiente foi compensado por aumento da biomassa foliar, resultando em rendimentos de artemisinina por planta, semelhantes, nas duas faixas de temperatura.

Tais divergências levam a concluir que o comportamento desta espécie em relação à influência da temperatura no teor de artemisinina na fitomassa não é padrão, sendo variável para diferentes genótipos, e que o rendimento de artemisinina (kg ha^{-1}) realmente parece estar mais associado aos ganhos em biomassa foliar do que ao teor de artemisinina nas folhas.

A maior produtividade de *A. annua* em temperaturas amenas não inviabiliza o cultivo da espécie nas latitudes menores dos trópicos, região onde ocorre o maior número de casos de malária, e sugere-se para tal que o cultivo seja fomentado em locais de grande altitude, com temperaturas menores.

8 CONCLUSÕES

Os resultados da composição isotópica do carbono ($\delta^{13}\text{C} = -31,76 \pm 0,07\text{‰}$) e a ausência de cloroplastos e grãos amido nas células parenquimáticas envolvendo o tecido vascular das folhas confirmam que *A. annua* possui um mecanismo fotossintético do tipo C_3 .

A aplicação exógena de artemisinina não induziu as plantas de *A. annua* ao florescimento e esse resultado sugere que a molécula de artemisinina não está diretamente relacionada com a indução floral na espécie.

Nos experimentos em câmara fotoperiódica, uma das principais observações verificadas em ambos os experimentos conduzidos com o acesso CPQBA 2/39x1V foi uma interação entre fotoperíodo e temperatura na indução ao florescimento das plantas testadas, onde as temperaturas menores ocorridas no experimento outono, máximo de 29°C e mínimo de 13°C, induziram maior florescimento nas plantas dos tratamentos com dias curtos, em detrimento daquelas submetidas as temperaturas maiores no experimento primavera/verão, com máximo de 37°C e mínimo de 19°C.

Considerando-se todos os tratamentos com dias curtos e ambas as épocas em que os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, o número médio de ciclos fotoindutivos necessários para o acesso CPQBA 2/39x1V florescer foi de

aproximadamente 32 ciclos. O fotoperíodo indutivo em casa de vegetação foi encontrado no intervalo dos tratamentos 11 e 13 horas.

Pode-se afirmar que os clones do acesso CPQBA 2/39x1V apresentaram um comportamento fotoperiódico de Planta de Dias Curtos qualitativa ou absoluta com requerimento de baixas temperaturas para ter seu florescimento acelerado.

No experimento em campo, o número de ciclos fotoindutivos encontrado para o acesso CPQBA 2/39x1V de *A. annua* foi de aproximadamente 28 ciclos ou 4 semanas e o fotoperíodo indutivo aproximado foi de 13,07 horas, que ocorreu na data de 07/02/2001 em Pato Branco-PR.

A época de plantio que alcançou significativamente os maiores rendimentos de fitomassa e artemisinina foi a 1ª época, devido ao maior tempo de permanência das plantas no campo antes do florescimento, 165 dias do transplante até a colheita, 23/09/2000 a 06/03/2001. Estes resultados determinaram que o transplante de mudas para o campo em Pato Branco-PR, deve ser feito prioritariamente no último decêndio de setembro ou no início de outubro - começo da primavera - para se alcançar um maior rendimento de massa seca de folhas e artemisinina. Não recomenda-se o plantio nos dois primeiros decêndios de setembro devido ao fato de estarem ocorrendo geadas extemporâneas na região sudoeste do Paraná.

Os rendimentos de fitomassa e artemisinina encontrados em Pato Branco-PR foram superiores aqueles encontrados para o mesmo acesso 2/39x1V por MAGALHÃES *et al.* (1999) em Campinas-SP. O teor de artemisinina na biomassa foliar do acesso não variou nos dois locais de cultivo, sugerindo que o rendimento de artemisinina (kg ha^{-1}) está mais associado aos ganhos em biomassa foliar provocados pelas temperaturas mais amenas no sudoeste do Paraná.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDIN, M.Z., ISRAR, M., REHMAN, R.U., JAIN, S.K. Artemisinin, a novel antimalarial drug: biochemical and molecular approaches for enhanced production. **Planta Med.**, v.69, p.289-299, 2002.
- ACTON, N., KLAYMAN, D.L., ROLLMAN, I.J. Reductive electrochemical HPLC assay for artemisinin (qinghaosu). **Planta Med.**, v.5, p.445-446, 1985.
- BAGCHI, G.D., JAIN, D.C., KUMAR, S. Arteether: a potent plant growth inhibitor from *Artemisia annua*. **Phytochemistry**, v.45, n.6, p.1131-1133, 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 Med.**, v.5, p.445-446, 1997b.
- BALINT, G. A. Artemisinin and its derivatives. An important new class of antimalarial agents. **Pharmacol. Therapeut.**, v.90, n.2-3, p.261-265, 2001.
- BUTLER, D., MAURICE, J., O'BRIEN, C. Time to put malaria control on the global agenda. **Nature**, v.386, p.535-541, 1997.
- CHAN, K.L., TEO, C.K.H., JINADASA, S., YUEN, K.H. Selection of high artemisinin yielding *Artemisia annua*. **Planta Med.**, v.61, p.285-287, 1995.
- CHAPMAN, S.C., BARRETO, H.J. Using a chlorophyll meter to estimate specific leaf nitrogen of tropical maize during vegetative growth. **Agronomy Journal**, v.89, p.557-562, 1997.
- 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. **J. Nat. Prod.**, v.53, p.157-160, 1990.
- CHEN, F.T., ZHANG, G.H. Studies on several physiological factors in artemisinin synthesis in *Artemisia annua*. **Plant Physiol. Commun.**, v.5, p.26-30, 1987.
- 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.1867-1876, 1990.
- CIIAGRO/IAC – Instituto Agronômico de Campinas, 2005. **Médias mensais de temperaturas médias em Campinas-SP.** Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/Ciiagro>>. Acesso em: 11 de out. 2005.

- CONDON, A.G., RICHARDS, R.A., REBETZKE, G.J., FARQUHAR, G.D. Improving intrinsic water-use efficiency and crop yield. **Crop Sci.**, v.42, p.122-131, 2002.
- CRISS, R.E. **Principles of Stable Isotope Distribution**. New York: Oxford Univ. Press., 1999. 254p.
- DAWSON TE, MAMBELLI S, PLAMBOECK AH, TEMPLER PH, TU KP Stable Isotopes in Plant Ecology. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v.33, p.507–559, 2002.
- DAY, P.M., HARBORNE, J.B. **Plant Biochemistry**. 1.ed. London: Academic Press, 1997. 554p.
- DAYAN, F.E., HERNÁNDEZ, A., ALLEN, S.N., MORAES, R.M., VROMANC, J.A., AVERY, M.A., DUKE, S.O. Comparative phytotoxicity of artemisinin and several sesquiterpene analogues. **Phytochemistry**, v.50, p.607-614, 1999.
- DELABAYS, N. **Biologie de la reproduction chez L'Artemisia annua L. et genetique de la production en artemisinine**. 1997. 169p. Tese (Doutorado) - Universite de Lausanne, France.
- DELABAYS, N., SIMONNET, X., GAUDIN, M. The genetics of artemisinin content in *Artemisia annua* L. and the breeding of high yielding cultivars. **Current Medicinal Chemistry**, v.8, n.15, p.1795-1801, 2001.
- DIETZ, K.J, HARRIS, G.C. Photosynthesis under nutrient deficiency. In: Pessaraki, M. (ed.) **Handbook of Photosynthesis**. New York: Marcel Dekker, 1997, pp. 951-975.
- DUKE, S.O., VAUGHAN, K.C., CROOM, E.M., ELSOHLY, H.N. Artemisinin, a constituent of annual wormwood (*Artemisia annua*), is a selective phytotoxin. **Weed Science**, v.35, p.499-505, 1987.
- EFFERTH, T. Mechanistic perspectives for 1,2,4-trioxanes in anti-cancer therapy. **Drug Resistance Updates**, v.8, n.1-2, p.85-97, 2005.
- EHLERINGER J.R, RODEN J., DAWSON, T.E. Assessing ecosystem-level water relations through stable isotope ratio analyses. In: SALA, O.E., JACKSON, R.B., MOONEY, H.A., HOWARTH, R.W. (Eds.) **Methods in Ecosystem Science**. New York: Oxford University Press, 2000, p.181-195.
- ENSERINK, M. Source of new hope against malaria is in short supply. **Science**, v.307, p.33, 2005.

- FARQUHAR, G.D., EHLERINGER, J.R., HUBICK, K.T. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.40, p.503-537, 1989.
- FERREIRA, J.F.S. **Production and detection of artemisinin in *Artemisia annua* L.** 1994. 125p. Tese (Doutorado) - Purdue University, Purdue, EUA.
- 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.
- FERREIRA, J.F.S., LAUGHLIN, J.C., DELABAYS, N., MAGALHÃES, P.M. Cultivation and genetics of *Artemisia annua* L. for increased production of the antimalarial artemisinin. **Plant Genetic Resources**, v.3, n.2, p.206–229, 2005.
- FERREIRA, J.F.S., SIMON, J.E. & JANICK, J. Developmental studies of *Artemisia annua*: flowering and artemisinin production under greenhouse and field conditions. **Planta Med.**, v.61, p.167-170, 1995.
- FERREIRA, J.F.S.; JANICK, J. Floral morphology of *Artemisia annua* with special reference to trichomes. **International Journal of Plant Sciences**, v.156, p.807–815, 1995.
- FIGUEIRA, G.M. **Nutrição mineral, produção e concentração de artemisinina em *Artemisia annua* L.** 1995. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo/ESALQ, Piracicaba.
- FIGUEIRA, G.M., SARTORATTO, A. Avaliação dos teores de artemisinina em *Artemisia annua* L. após secagem e durante o armazenamento das folhas. In: III Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, 1997, Campinas. **Resumos da III Jornada Paulista de Plantas Mediciniais**. Brasil: Campinas, 1997. p.69-70.
- GALAMBOSI, B. Results of cultivation of some wildflower medicinal plants in the “szilasmenti” cooperative. **Acta Hort.**, v.96, p.343-352, 1980.
- GELDRE, E.V., VERGAUWE, A., EEKHOUT, E.V. State of the art of the production of the antimalarial compound artemisinin in plant. **Plant Mol. Biol.**, v.33, p.199-209, 1997.
- GERRITS, P.O. **The application of glycol metacrylate in histotechnology, some fundamental principles**. Germany: Leica GmbH, 1991. 80p.
- HAIDER, F., DWIVED, P., SINGH, S., NAQVI, A.A., BAGHI, G. Influence of transplanting time on essential oil yield and composition in *Artemisia annua* plants grow under the climatic conditions of subtropical north India. **Flavour and Fragrance Journal**, v.19, p.51-53, 2004.
- HALL, D.O., RAO, K.K. **Photosynthesis**. 6.ed. Cambridge: University Press, 1999. 214p.

- HARBORNE, J.B. **Ecology Biochemistry**. 4.ed., London: Academic Press, 1993. 318 p.
- HIBBERD, J.M., QUICK, W.P. Characteristics of C₄ photosynthesis in stems and petioles of C₃ flowering plants. **Nature**, v.415, p.451-454, 2002.
- INSTITUTO AGRONÔMICO DO ESTADO DO PARANÁ. **Cartas climáticas do Estado do Paraná 1994**. Londrina: IAPAR, 1994. 49 p.
- JAIN, D.C., MATHUR, A.K., GOPTA, M.M., SINGH, A.K., VERMA, R.K., GUPTA, A.P., KUMAR, S. Isolation of high artemisinin-yielding clones of *Artemisia annua*. **Phytochemistry**, v.43, n.5, p.993-1001, 1996.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc., 1940. 423p.
- KLAYMAN, D.L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. **Science**, v.228, p.1049-1055, 1985.
- KÖRNER, C., BAZZAZ, F.A. **Carbon dioxide, populations, and communities**. San Diego: Academic Press, 1996. 465p.
- KUMAR, S., GUPTA, S.K., SINGH, P., BAJPAI, P., GUPTA, M.M., SINGH, D., GUPTA, A.K., RAMB, G., SHASANY, A.K., SHARMA, S. High yields of artemisinin by multi-harvest of *Artemisia annua* crops. **Industrial Crops and Products**, v.19, p.77-90, 2004.
- LAMBERS, H., CHAPIN III, F.S., PONS, T.L. **Plant physiological ecology**. 3.ed. New York: Springer Verlag, 1998. 520p.
- LAUGHLIN, J.C., Effect of agronomic practices on plant yield and antimalarial constituents of *Artemisia annua* L. **Acta Hortic.**, v.331, p.53-61, 1993.
- LAUGHLIN, J.C., The influence of distribution of antimalarial constituents in *Artemisia annua* L. on time and method of harvest. **Acta Hortic.**, v.390, p.67-73, 1995.
- LAWLOR, D.W. **Photosynthesis: molecular, physiological and environmental processes**, 3.ed. New York: Springer Verlag, 2001. 540p.
- LIERSCH, R., SOICKE, H., STEHR, C., TÜLLNER, H.U. Formation of artemisinin in *Artemisia annua* during one vegetation period. **Planta Med.**, v.52, p.387-390, 1986.
- LOOMIS, R.S., CONNOR, D.J. **Crop ecology: productivity and management in agricultural systems**. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. 538 p.
- LUO, X. D.; SHEN, C. C. The Chemistry, pharmacology, and clinical applications of qinghaosu (artemisinin) and its derivatives. **Med. Res. Rev.**, v.7, n.1, p.29-52, 1987.

- MAGALHÃES, P.M. **Seleção, melhoramento e nutrição da *Artemisia annua* L., para cultivo em região intertropical.** 1996. 117p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- MAGALHÃES, P.M., DELABAYS, N., SARTORATTO, A. New hybrid lines of the antimalarial species *Artemisia annua* L. guarantee its growth in Brazil. **Ciência e Cultura**, v.49, p.413-415, 1997.
- MAGALHÃES, P.M., PEREIRA, B., SARTORATTO, A. Yields of antimalarial *Artemisia annua* L. species. **Acta Hortic.**, v.629, p.421-424, 2004.
- MAGALHÃES, P.M., PEREIRA, B., SARTORATTO, A., OLIVEIRA, J., DEBRUNNER, N. New hybrid lines of the antimalarial species *Artemisia annua* L. **Acta Hortic.**, v.502, p.377-381, 1999.
- MAIA, V. **Técnica histológica.** 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1979. 246p.
- MARCHESE, J.A., KATZ, I., SOUSA, A.P., RODRIGUES, J.D. Gas exchange in lisianthus plants (*Eustoma grandiflorum*) submitted to different doses of nitrogen. **Photosynthetica**, v.43, n.2, p.303-305, 2005
- MARCHESE, J.A. **Produção e detecção de artemisinina em plantas de *Artemisia annua* L. submetidas a estresses abióticos.** 1999. 88p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- MARCHESE, J.A., FIGUEIRA, G.M. O uso de tecnologias pré e pós-colheita e boas práticas agrícolas na produção de plantas medicinais e aromáticas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.3, p.86-96, 2005.
- MARCHESE, J.A., REHDER, V.L.G. Influência da temperatura na produção de artemisinina em *Artemisia annua* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.4, n.1, p.89-93, 2001.
- MARCHESE, J.A., REHDER, V.L.G., SARTORATTO, A. Quantificação de artemisinina 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.81-87, 2001.
- MAUSETH, J.D. **Plant anatomy.** Menlo Park: Benjamin/Cummings, 1988. 560p.
- MESHNICK, S.R.; TAYLOR, T.E. KAMCHONWONGPAISAN, S. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. **Microb. Rev.**, v.60, n.2, p.301-315, 1996.

- MORALES, M.R., CHARLES, D.J., SIMON, J.E. Seasonal accumulation of artemisinin in *Artemisia annua* L. **Acta Hortic.**, v.344, p.416-420, 1993.
- MUELLER, M.S., KARHAGOMBA, I.B., HIRT, H.M., WEMAKOR, E. The potential of *Artemisia annua* as a locally produced remedy for malaria in the tropics, agricultural, chemical and clinical aspects. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, p.487-493, 2000.
- O'BRIEN, T.P., FEDER, N., McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p.368-373, 1964.
- O'BRIEN, T.P., McCULLY, M.E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne: Termarcarphy, 1981. 357p.
- O'LEARY, M.H. Biochemical basis of carbon isotope fractionation. In: EHLERINGER, J.R., HALL, A.E., FARQUHAR, G.D. (Eds). **Stable Isotopes and Plant Carbon-Water Relations**. New York: Academic Press, 1993. p.19-28.
- O'LEARY, M.H., MADHAVAN, S., PANETH, P. Physical and chemical basis of carbon isotope fractionation in plants. **Plant Cell Environ.**, v.15, p.1099-1104, 1992.
- OPAS - ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **A malária e as metas de desenvolvimento internacionalmente acordadas, inclusive as constantes de declaração do milênio**. 46º CONSELHO DIRETOR e 57ª SESSÃO DO COMITÊ REGIONAL. Washington, D.C., EUA, 26-30 de setembro 2005, 20p. Disponível em: <<http://www.paho.org/English/GOV/CD/cd46-17-e.pdf>>. Acesso em: 14 de out. 2005.
- OPS – ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Informe de la situación de los programas de malaria em las Américas. 26ª Conferencia Sanitária Panamericana. Washington - EUA, 2002.
- OPS – ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Situación de los programas de malaria em las Américas. **Boletim Epidemiológico**, v.22, n.1, p.10-16, 2001.
- PEARSE, A.G.E. **Histochemistry: theoretical and applied**. London: Churchill, 1968. 998p.
- POSNER, G.H, PLOYPRADITH, P., PARKER, M.H., O'DOWD, H., WOO, S.H., NORTHROP, J., KRASAVIN, M., DOLAN, P., KENSLER, T.W., XIE, S., SHAPIRO, T.A. Antimalarial, antiproliferative, and antitumor activities of artemisinin-derived, chemically robust, trioxane dimers. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.42, n.21, p.4275-80, 1999.

- PRAS, N., VISSER, J.F., BATTERMAN, S., WOERDENBAG, H.J., MALINGRÉ, T.M.. Laboratory selection of *Artemisia annua* L. for high artemisinin yielding types. **Phytochem. Anal.**, v.2, p.80-83, 1991.
- RUDALL, P. **Anatomy of flowering plants – An introduction to structure and development**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. 80p.
- RUZIN, S.E. **Plant microtechnique and microscopy**. New York: Oxford University Press, 1999. 322p.
- SILVA, L.J. O controle das endemias no brasil e sua história. **Ciência e Cultura**, v.55, n.1, p.44-47, 2003.
- SIMON, J.E., CHARLES, D., CEBERT, E., GRANT, L., JANICK, J., WHIPKEY, A. *Artemisia annua* L.: A promising aromatic and medicinal. In: Janick, J., Simon, J.E. (Eds.) **Advances in new crops**. Portland: Timber Press, 1990. p.522-526.
- SINGH, N.P., LAI, H.C. Artemisinin induces apoptosis in human cancer cells. **Anticancer Research**, v.24, n.4, p.2277-2280, 2004.
- STERNBERG, L., DENIRO, M.J., TING, I.P. Carbon, hydrogen and oxygen isotope ratios of cellulose from plants having intermediary photosynthetic modes. **Plant Physiol.**, v.74, p.104-107, 1984.
- TARANTO, A.G., CARNEIRO, J.W. de M., ARAUJO, M. T. de, SILVA, B. M. Estudos sobre o mecanismo de ação da artemisinina e dos endoperóxidos, a mais nova classe de agentes antimaláricos. Parte I. **Sitientibus**, v.30, n.2, 2005 (no prelo).
- VIDAL, B.C. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cell Mol. Biol.**, v.22, p.45-64, 1977.
- VON CAEMMERER, S. Carbon isotope discrimination in C₃-C₄ intermediates. **Plant Cell Environ.**, v.15, p.1063-1072, 1992.
- 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 Med.**, v.66, p.57-62, 2000.

- WANG, H., GE, L., HE-CHUNG, Y., BEN-YE, L., GUO-FENG, L. Studies on effects of *fpfl* gene on *Artemisia annua* flowering time and on the linkage between flowering and artemisinin biosynthesis. **Planta Med.**, v.70, p.347-352, 2004.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2005**. Geneva: WHO, 2005. 294p.
- 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. **Phytochem. Anal.** v.2, p.215-219, 1991.
- ZHANG, Y.S., YE, H.C., LIU, B.Y., WANG, H., LI, G.F. Exogenous GA3 and flowering induce the conversion of artemisinic acid to artemisinin in *Artemisia annua* plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.52, n.1, p.68-73, 2005
- ZHAO, S., ZENG, M.Y. Application of precolumn reaction to high-performance liquid chromatography of qinghaosu in animal plasma. **Anal. Chem.**, v.58, p.289-292, 1986.