



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS PATO BRANCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA



EMANUELLE CAVAZINI MAGIERO

**FISIOLOGIA DA FLORAÇÃO E ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE
Artemisia annua L. CULTIVAR ARTEMIS CULTIVADA EM CLIMA
SUBTROPICAL ÚMIDO**

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO
2009

EMANUELLE CAVAZINI MAGIERO

**FISIOLOGIA DA FLORAÇÃO E ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE
Artemisia annua L. CULTIVAR ARTEMIS CULTIVADA EM CLIMA
SUBTROPICAL ÚMIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus* Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Dr. José Abramo Marchese
Co-Orientadora: Dr^a. Mary Ann Foglio

PATO BRANCO

2009

M194f

Magiero, Emanuelle Cavazini

Fisiologia da floração e atividade alelopática de *Artemisia annua* L. cultivar Artemis cultivada em clima subtropical úmido / Emanuelle Cavazini Magiero. Pato Branco. UTFPR, 2009.

56 f. : il. ; 30 cm

Orientador: Prof. Dr. José Abramo Marchese

Co-orientador: Prof. Dr^a. Mary Ann Foglio

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, 2009.

Bibliografia: f. 49 - 56

1. Artemísia. 2. Fotoperiodismo. 3. Florescimento. 4. Época de colheita. 5. Alelopatia. 6. Inibição do crescimento. I. Marchese, José Abramo, orient. II. Foglio, Mary Ann, co-orient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDD: 630



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Pato Branco
Gerência de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



TERMO DE APROVAÇÃO

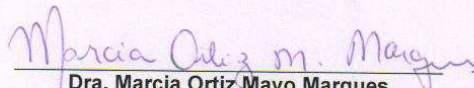
Título da Dissertação n° 006

Fisiologia da floração e atividade alelopática de *Artemisia annua* L. var.
Artemis cultivada em clima subtropical úmido
por

Emanuelle Cavazini Magiero

Dissertação apresentada às quatorze horas do dia dezenove de fevereiro de dois mil e nove, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Sistemas de Produção Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco. A candidata foi argüida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho. *Aprovado..*

Banca examinadora:

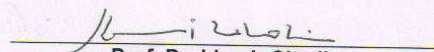

Dra. Marcia Ortiz Mayo Marques
UNESP


Dr. Marisa de Cacia Oliveira
UTFPR


Dr. Giovanni Benin
UTFPR


Dr. José Abramo Marchese
UTFPR
Orientador

Visto da Coordenação:


Prof. Dr. Idemir Citadin
Coordenador do PPGA

Dedico este trabalho a metade da humanidade que vive em regiões endêmicas e aos milhões de seres humanos que morrem a cada ano por causa da malária, principalmente as crianças africanas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por ter conduzido este trabalho.

Aos meus pais Cleodi Antoninho e Maria Rita pelo amor, pela presença, pela compreensão e estímulo, sem pedir nada em troca.

À minha irmã Juanna Maria e toda minha família.

Aos colegas pelo apoio.

Aos amigos, sem a ajuda dos quais a tarefa jamais seria cumprida.

À ARCAFAR/SUL por ter concedido licença para eu concluir o mestrado.

À Pós-Graduação em Agronomia da UTFPR – Campus Pato Branco pela oportunidade de cursar o mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Abramo Marchese pela amizade, dedicação, paciência, inteligência, repasse do conhecimento e correção desta dissertação.

A Dra. Mary Ann Foglio pela co-orientação.

Aos estagiários do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal da UTFPR, em especial aos acadêmicos Diogo Capelin e Marcos Vily Paladini pelo apoio, amizade e auxílio na execução deste trabalho.

À Divisão de Fitoquímica do CPQBA/UNICAMP pelas análises de artemisinina realizadas.

A todos os docentes e funcionários do PPGA em Agronomia, que me ajudaram com informações, esclarecimentos e idéias.

À Coordenação de Agronomia da UTFPR – Campus Pato Branco, em especial aos funcionários Otávio e Sérgio, pelo auxílio na execução deste trabalho.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

“Quando eu aprendi que aquela malária mata tantas pessoas só porque eles não podem adquirir um simples medicamento ou um mosquiteiro para dormir, eu disse, 'Isto não é possível, nós temos que fazer algo’” Youssou N’Dour, Musician, descrevendo a motivação pelo “Africa Live – Roll Back Malaria Concert” Dakar, 12-13 March 2005 (WHO, 2005).

RESUMO

MAGIERO, Emanuelle Cavazini. Fisiologia da floração e atividade alelopática de *Artemisia annua* L. cultivar Artemis cultivada em clima subtropical úmido. 56 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção Vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2009.

A *Artemisia annua* L. (Asteraceae) é uma planta herbácea, nativa da Ásia e aclimatada no Brasil. As folhas apresentam até 1,4% do peso seco em artemisinina, sendo fonte abundante desta lactona sesquiterpênica que, conjuntamente aos seus derivados semi-sintéticos, apresentam ação efetiva contra as cepas resistentes das espécies de *Plasmodium* causadoras da malária. A artemisinina também está sendo testada com sucesso no tratamento de câncer e apresenta-se efetiva contra inúmeros parasitas que afetam a saúde humana e animal. Os objetivos deste trabalho foram determinar as épocas de plantio e colheita da cultivar Artemis de *A. annua* em Pato Branco-PR, como também, determinar em campo o fotoperíodo crítico e o número de ciclos fotoindutivos necessários para o florescimento desta cultivar. Um segundo experimento foi realizado com o objetivo de determinar o potencial alelopático desta espécie sobre sementes de alface e leiteiro. No experimento em campo, os tratamentos utilizados foram seis diferentes épocas de plantio, sendo as 09 plantas centrais das parcelas colhidas para a determinação da massa seca de folha e caules, relação folha/caule e teor de artemisinina na massa seca de folhas quando 50% das plantas da parcela iniciaram a emissão dos botões florais. O número de ciclos fotoindutivos encontrado para a cultivar Artemis foi de aproximadamente 36 ciclos e o fotoperíodo crítico aproximado foi de 13 horas, que ocorreu em 09/02/2007 em Pato Branco-PR. Esse resultado determinou que a época de colheita para a cultivar Artemis, na região de Pato Branco-PR, deve ser na segunda quinzena do mês de março. O maior rendimento de biomassa nesse experimento ocorreu no plantio de 27/07/2007, 231 dias após o transplante, mas recomenda-se tomar cuidado com as geadas que podem ocorrer até a primeira quinzena de setembro, sugerindo-se optar pelo plantio na segunda quinzena de setembro, período livre de geadas na região. Os maiores teores de artemisinina (em média 0,80% na matéria seca de folhas) foram obtidos nas épocas que mais vegetaram a campo devido à maior produção de biomassa. Para o experimento de alelopatia, o extrato aquoso bruto foi preparado a partir de folhas frescas na proporção de 1 L de água destilada para 250 g do material. Foram utilizadas as seguintes concentrações do extrato aquoso: 100%, 75%, 50%, 25% e 0% (água destilada). Foram analisadas as variáveis germinabilidade, velocidade média de germinação, tempo médio de germinação, comprimento da radícula e massa seca das plântulas. Extratos aquosos de *A. annua* apresentaram ação alelopática inibitória sobre a germinação de sementes e o desenvolvimento de plântulas de alface e leiteiro.

Palavras-chave: Artemísia. Fotoperiodismo. Florescimento. Época de colheita. Alelopatia. Inibição do crescimento.

ABSTRACT

MAGIERO, Emanuelle Cavazini. Flowering physiology and allelopathic effect of *Artemisia annua* L. cultivar Artemis cultivated moist subtropical climate. 56 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2009.

The *Artemisia annua* L. (Asteraceae) is a herbaceous plant, native of Asia and acclimated in Brazil. The leaves are abundant source of artemisinin, a sesquiterpene lactone that, jointly to yours derived semi-synthetic, they present effectiveness action against the resistant stumps of the species of *Plasmodium* against malaria. The artemisinin is also being tested with success in the cancer treatment and against countless parasites that affect the human and animal health. The objectives of this work went to determine the planting times and crop of the cultivar Artemis of *A. annua* in Pato Branco-PR, as well as, to determine in field the critical photoperiod and the number of inductive photoperiod for the flowering of this cultivar. A second experiment was accomplished with the objective of determining the allelopathic effect of this species on lettuce seeds and wild poinsettia. In the experiment in field, the treatments were six different transplant times, being the 09 central plants of the portions picked for the determination of the mass dries of leaf and stems, relationship leaf/stems and artemisinin in the mass dries of leaves when 50% of the plants of the portion began the emission of the floral buttons. The number of cycles inductive found for the cultivar Artemis was of approximately 36 cycles and the critical photoperiod was approximately 13 hours, that happened in 09/02/2007 in Pato Branco-PR. This results determines that the crop time for cultivar Artemis, in Pato Branco-PR will be in the second fortnight of the month of March. The largest biomass income in that experiment happened in the planting of 27/07/2007, 231 days after the transplant, but it is recommended to take care with the frost that can happen until the first fortnight of September, suggesting choose for the transplant in the second fortnight of September, period free from frost in the area. The largest artemisinin tenor (0,88% in dry matter leaves) was obtained in the times that more they vegetated to field due to the largest biomass production. Besides this experiment, a second experiment was developed to determine the allelopathic effects of this species on lettuce seeds and wild poinsettia. The aqueous extract was prepared starting from fresh leaves in the proportion of 1 L of water distilled for 250 g of the material, after, the extract was filtrate and centrifuged, being used the sobrenadante. The following concentrations of the extract were used: 100%, 75%, 50%, 25% and 0% (distilled water). They were analyzed the variables germinability, germination velocity, germination time, length of the radicle and weight of the dry matter of the seedlings. Aqueous extracts of *A. annua* is allelopathic on the germination and development of lettuce and wild poinsettia seedlings.

Keywords: Annual wormwood. Photoperiodism. Flowering. Crop time. Allelopathy. Inhibition of the growth. *A. annua*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Distribuição mundial das áreas potenciais, livres e onde ocorre e transmissão da malária.....16
- Figura 2** – Artemisinina e seus derivados semi-sintéticos19
- Figura 3** – Esquema simplificado da biossíntese de terpenos.....21
- Figura 4** – Épocas de plantio (primavera) e colheita (outono) em função do fotoperíodo anual em diferentes locais de cultivo de *A. annua* nos hemisférios Sul (5^oS = Teresina-PI; 22^oS = Campinas-SP; 26^oS = Pato Branco-PR; 43^oS = Tasmania, Austrália) e Norte (47^oN = Bulgária; 40^oN = West Lafayette, IN, EUA e 26^oN = Lucknow, Índia).....25
- Figura 5** – Fotoperíodo anual em Pato Branco-PR, Brasil (26^o07' S, 52^o41' W e 760m) e caracterização do florescimento de *A. annua* cultivar Artemis. FC = fotoperíodo crítico; TP = plantio para o campo; FL = emissão de 50% botões florais; CF = número de ciclos fotoindutivos. UTFPR, Campus Pato Branco, 2009.....34
- Figura 6** – Rendimento de biomassa seca de folha (A), Rendimento de biomassa seca de caules (B), Rendimento MS total (C) e Relação folha/caule (D) da cultivar Artemis de *A. annua* em função das diferentes épocas de plantio. UTFPR, Campus Pato Branco, 2009.36
- Figura 7** – Teor de artemisinina e produção de artemisinina por hectare para a cultivar Artemis de *A. annua* nas condições de Pato Branco-PR. UTFPR, Campus Pato Branco, 2009.....39
- Figura 8** – Altura média das plantas das seis épocas de plantio da cultivar Artemis de *A. annua* em Pato Branco-PR, Brasil. UTFPR, Campus Pato Branco, 2009.....40
- Figura 9** – Germinabilidade de sementes de leiteiro (A) e alface (B) sob o efeito de diferentes concentrações do extrato aquoso de *A. annua* L. UTFPR, Campus Pato Branco, 2009.....41
- Figura 10** – Efeito de diferentes concentrações do extrato aquoso de *A. annua* L. no comprimento da raiz primária de alface (A) e leiteiro (B). UTFPR, Campus Pato Branco, 2009.....44

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Datas de semeadura e plantio da cultivar Artemis de *A. annua* em Pato Branco-PR, Brasil (26⁰07'S e 52⁰41'W – 760 m alt.). UTFPR, Campus Pato Branco, 2009.....28
- Tabela 2** – Caracterização do solo da área experimental. Pato Branco-PR, Brasil. UTFPR, Campus Pato Branco, 2009.....28
- Tabela 3** – Datas de semeadura, plantio, colheita e dias de permanência das plantas a campo após o plantio da cultivar Artemis de *A. annua* em Pato Branco-PR, Brasil. UTFPR, Campus Pato Branco, 2009.....32
- Tabela 4** – Efeito das diferentes épocas de plantio na produção de biomassa seca de folhas, caule, biomassa total e relação folha/caule, da cultivar Artemis de *A. annua*. UTFPR, Campus Pato Branco, 2009.37
- Tabela 5** – Germinabilidade de leiteiro sob o efeito de diferentes concentrações do extrato aquoso de *A. annua* L. UTFPR, Campus Pato Branco, 2009.....41
- Tabela 6** – Germinabilidade de alface sob o efeito de diferentes concentrações do extrato aquoso de *A. annua* L. UTFPR, Campus Pato Branco, 2009.....42
- Tabela 7** – Tempo médio e velocidade média de germinação de alface e leiteiro sob o efeito de diferentes concentrações do extrato aquoso de *A. annua* L. UTFPR, Campus Pato Branco, 2009.....43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA	14
4 REVISÃO DE LITERATURA	16
5 MATERIAL E MÉTODOS	27
5.1 DEFINIÇÃO DA ÉPOCA DE PLANTIO E COLHEITA, E PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA E ARTEMISININA DA CULTIVAR ARTEMIS DE <i>A. annua</i>	27
5.2 EFEITO ALELOPÁTICO DE <i>A. annua</i> L. NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE ALFACE (<i>Lactuca sativa</i> L.) E LEITEIRO (<i>Euphorbia heterophylla</i> L.)	30
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6.1 DEFINIÇÃO DA ÉPOCA DE PLANTIO E COLHEITA, E PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA E ARTEMISININA DA CULTIVAR ARTEMIS DE <i>A. annua</i>	32
6.2 EFEITO ALELOPÁTICO DE <i>A. annua</i> L. NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE ALFACE (<i>Lactuca sativa</i> L.) E LEITEIRO (<i>Euphorbia heterophylla</i> L.)	40
7 CONCLUSÕES	47
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

O continente mais atingido pela malária é o Africano, com mais de 80% das mortes mundiais. Nas Américas, 14% da população vive em áreas de risco de transmissão do parasita, sendo a América do Sul a área onde há maior transmissão da malária (WHO, 2005; WHO, 2006). No Brasil, 99% dos casos ocorrem na região amazônica (JÚNIOR, 2006). A malária é transmitida pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles* e pode ser causada pelos protozoários, *Plasmodium falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax* e *P. malariae*. A infecção mais grave é a causada *P. falciparum* (WHO, 2005; WHO, 2008).

Os tratamentos químicos utilizados para os infectados pelo protozoário são limitados, sendo a quinina, a tetraciclina e a cloroquina os mais utilizados (BLOLAND, 2001). O maior empecilho encontrado na utilização destes medicamentos é a resistência do parasita aos mesmos, principalmente o *P. falciparum*. A principal alternativa encontrada no tratamento contra parasitas resistentes é a utilização da terapia combinada com artemisinina, uma lactona sesquiterpênica proveniente da planta *Artemisia annua* (WHO, 2005).

A. annua é originária da China (FERREIRA et al., 2005) e a descoberta do agente antimalárico deu-se em 1967 (FIGUEIRA, 1998). 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*, visando seu cultivo comercial para a produção de fitofármacos. Os estudos existentes sobre a ecofisiologia da *A. annua* cultivar Artemis no Brasil são limitados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Gerar tecnologias de cultivo para *A. annua* cultivar Artemis de maneira a favorecer a produção de biomassa e de artemisinina e determinar o efeito alelopático dessa espécie.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar, em campo, o fotoperíodo crítico e o número de ciclos fotoindutivos aproximados para *A. annua* cultivar Artemis, nas condições de Pato Branco-PR.

Determinar a melhor época de plantio e colheita para *A. annua* cultivar Artemis em Pato Branco-PR.

Determinar o efeito alelopático do extrato aquoso de folhas de *A. annua* sob a germinação de sementes e o desenvolvimento de plântulas de alface e leiteiro.

3 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA

O clima do Sul do Brasil é semelhante ao do centro de origem da *A. annua* (China), regiões de clima subtropical e temperado. Os melhores rendimentos de artemisinina, em torno de 1% foram obtidos na Região Sul, em torno de 1% (MARCHESE, 2006a). Dados obtidos por este autor, com o cultivar CPQBA 2/39x1V de *A. annua*, trouxeram informações quanto à resposta fotoperiódica desta espécie, além das épocas de plantio e colheita. Marchese (2006a) concluiu que esta planta pode tornar-se uma opção para o pequeno produtor diversificar a renda em sua propriedade, comercializando a biomassa para a indústria farmacêutica. Assim, há necessidade da execução de mais experimentos com diferentes cultivares de *A. annua* nas condições locais de Pato Branco-PR.

Perante as Américas, o Brasil é o país que apresenta o maior índice de casos de malária das Américas (WHO, 2006). Os tratamentos químicos utilizados para os infectados com o protozoário são limitados, pois o parasita está resistente a cloroquina, quinina e tetraciclina, principalmente o *P. falciparum* (BLOLAND, 2001). Assim, no momento, a melhor alternativa para o tratamento da malária é a Terapia Combinada com Artemisinina (TCA), que se apresenta efetiva contra todas as cepas do parasita (ENSERINK, 2005; WHO, 2005; WHO, 2008).

As demandas por TCA aumentaram de seis milhões em 2005 para 49 milhões em 2006 (WHO, 2008). Além do aumento da demanda por TCA, há relatos na literatura que indicam que a molécula artemisinina apresenta diversas atividades, como anti-câncer (POSNER et al., 1999; SINGH & LAI, 2004; EFFERTH, 2005; LAI & SINGH, 2006), larvicida (SHARMA et al., 2006), inseticida para *Xanthogaleruca luteola* (SHEKARI et al., 2008), anti-fúngica (LIU et al., 2001), antimicrobiana (EFFERTH et al., 2008), herbicida e alelopática (DUKE et al., 1987; CHEN & LEATHER, 1990; BACGHI et al., 1997a; DAYAN et al., 1999; DELABAYS et al., 2008), além da ação contra parasitas que afetam a saúde humana e animal, como *Coccidia* spp. (ALLEN et al., 1997), *Leishmania* spp. (YANG & LIEW, 1993) e *Neospora caninum* (KIM et al., 2002). Isto possivelmente aumentará a demanda por plantas de *A. annua* e/ou artemisinina.

Além das possibilidades de aumento da demanda já citadas, no ano de 2008 o Laboratório Estatal Farmanguinhos, ligado à Fundação Oswaldo Cruz, após

estudos de eficácia, segurança e padronização, lançou um medicamento para combater a malária que será distribuído na América Latina e na Ásia. Assim, haverá demandas pelo Ministério da Saúde para a produção do fitofármaco a nível nacional (ÚLTIMO SEGUNDO, 2008).

A melhor forma para se obter a artemisinina é através de plantas de *A. annua* (WOERDENBAG et al., 1991; FERREIRA & JANICK, 1996; GELDRE et al., 1997; DELABAYS et al., 2001), devido aos baixos rendimentos e altos custos via síntese química da molécula (CHAN et al., 1995; GELDRE et al., 1997).

Um dos genótipos de Artemísia mais estudados em Pato Branco-PR é o CPQBA 2/39x1V, que apresentou localmente um elevado teor de artemisinina na biomassa foliar seca (1%) e elevados rendimentos de biomassa foliar e artemisinina por hectare (MARCHESE, 2006a), quando comparado ao ano de maior produção em Campinas-SP, outro centro de pesquisa desta planta no Brasil. Outros genótipos são citados na literatura por apresentarem altos teores de artemisinina na biomassa foliar seca, como a cultivar Artemis - 1,4% na biomassa seca e um rendimento de 38 kg ha⁻¹ da molécula, quando cultivada na Suíça (DELABAYS, 1997; DELABAYS et al., 2001), o que justifica testar este material em Pato Branco-PR. No Brasil, esta planta ainda é considerada exótica, havendo pouca literatura nacional sobre seu cultivo.

Na área de bioprospecção há busca por recursos biológicos e/ou produtos derivados com finalidades de exploração comercial para indústria, menos impactantes ao ambiente, sendo a *A. annua*, a artemisinina e seus derivados, produtos potenciais para esta finalidade, como descritos por Duke et al. (1987); Chen & Leather (1990); Bacghi et al. (1997); Dayan et al. (1999); Delabays et al. (2008), os quais citam a atividade alelopática dessa espécie. Justifica-se testar *A. annua* em plantas de alface (*Lactuca sativa* L.), já que são consideradas plantas testes em estudos de alelopatia e leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.), que é uma planta daninha de grande importância em nossa região.

4 REVISÃO DE LITERATURA

Os principais sintomas da malária, considerada a mais importante doença parasitária mundial (RÄTH et al., 2004) são inespecíficos: dores de cabeça, fadiga, febre, náuseas e calafrios são típicos (WHO, 2005). Estes sintomas são decorrentes de imensa destruição de hemácias, com descarga de substâncias imunogênicas tóxicas na corrente sanguínea, sendo este, o fim de cada ciclo reprodutivo do parasita *Plasmodium*, após ser transmitido pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles* (WHO, 2008). As espécies encontradas no Brasil são: *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax* e *P. malariae* (WHO, 2008).

A infecção mais grave, que apresenta sintomas adicionais como desmaios, convulsões, delírios, hemorragia e infarto é a causada pelo *P. falciparum*, denominada malária maligna. Além dos sintomas adicionais, há probabilidade de ocorrer danos renais e hepáticos, causando deficiências mentais e coma seguidos de morte ou danos mentais irreversíveis. As formas de malária causadas pelas outras espécies, conhecidas como benignas são geralmente debilitantes, raramente chegando a óbito (WHO, 2005).

A malária é encontrada em regiões tropicais de todos os continentes e em muitas regiões subtropicais, como demonstrado na Figura 01.

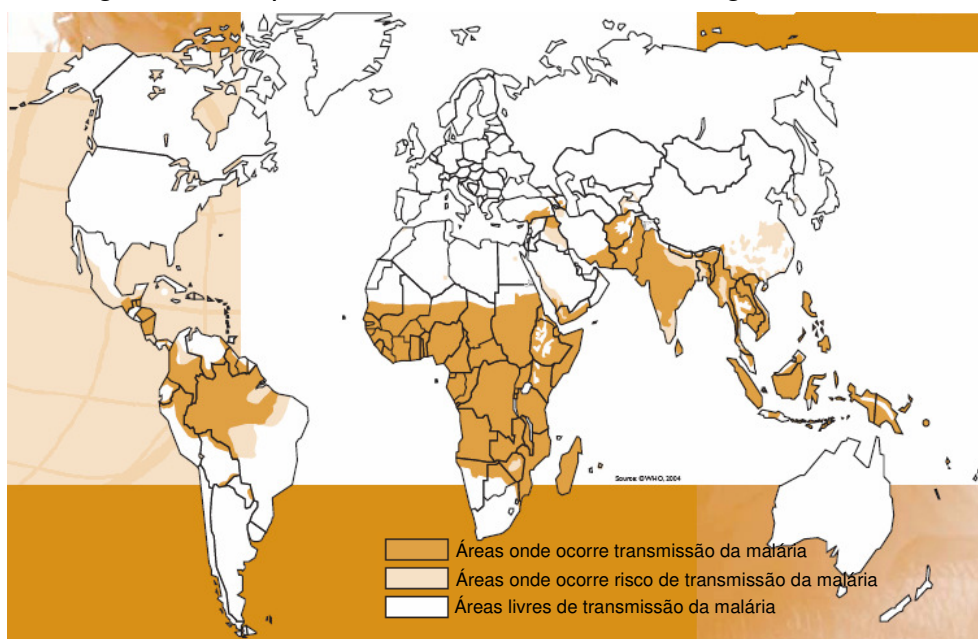


Figura 01 - Distribuição mundial das áreas potenciais, livres e onde ocorre e transmissão da malária. Fonte: WHO (2005).

Metade da humanidade vive em regiões endêmicas, totalizando 109 países, sendo que destes, 45 estão localizados na África. Em 2006, em torno de 3,3 bilhões de pessoas viviam em áreas que apresentaram algum risco de transmissão de malária e destes, 1,2 milhões de pessoas viviam em áreas de alto risco e 2,1 milhões em áreas de baixo risco (WHO, 2008). A estimativa mundial de ocorrência da doença é em torno 247 milhões de casos, onde 91% ou 230 milhões são por *P. falciparum*. Em torno de 2 milhões de mortes ocorrem a cada ano, onde 85% dos óbitos são crianças com menos de 5 anos de idade (WHO, 2005; WHO 2008). Kakkilaya (2006) ressalta que os óbitos anuais provenientes de pessoas acometidas por malária, podem ser comparados com os gerados pelo HIV em quinze anos.

O continente mais atingido pela doença é o Africano (Figura 01), sendo o responsável por 80% dos casos registrados e 90% das mortes mundiais por malária, podendo este índice ser explicado pelo fato de que o parasita mais comumente encontrado é o *P. falciparum*. Neste continente, 66% da população vive em áreas de risco (WHO, 2006). Em 2007, ocorreram em torno de 20 milhões de casos de malária na África, com 30 mil mortes (WHO, 2008). Já a realidade no continente Asiático é oposta, menos de 15% das mortes globais aí ocorrem e 49% da população está em áreas potenciais para contrair a doença. Nas Américas, 14% da população vive em área potencial de contaminação (WHO, 2005).

A América do Sul, perante as Américas, é a região que apresenta a maior porcentagem de transmissão da malária. Especificamente no Brasil, 99% dos casos ocorrem na região amazônica (JÚNIOR, 2006). No ano de 2007 ocorreram 458 mil casos com 64 óbitos (WHO, 2008). Apesar da redução de 25% no número de casos de 2005 para 2007, há dificuldades na manutenção das estratégias para o controle da malária (WHO, 2008). Vale ressaltar que o Brasil, nas Américas é o país que apresenta o maior número de casos de malária, totalizando 40% da ocorrência mundial (WHO, 2006).

Na Amazônia Legal, a maior parte dos casos de malária é devida ao *P. vivax*. Mas, é preocupante o incremento do percentual de casos de malária causada por *P. falciparum*, o que favorece a ocorrência de formas graves e óbitos provenientes deste parasita. Entre 1999 e 2005, houve aumento de 33,9% de malária causada por *P. falciparum*, o que reforça a atenção dos órgãos competentes para com os métodos de controle. Assim, no ano de 2005, os casos de internação

de malária acometidos pelo *P. vivax* foram de 36%, em contrapartida aos 33% pelo *P. falciparum* (JÚNIOR, 2006).

Os tratamentos químicos utilizados para os infectados pelo protozoário são limitados, sendo a quinina, seus derivados, a combinação de medicamentos e a tetraciclina os mais utilizados (BLOLAND, 2001). O maior empecilho encontrado na utilização destes medicamentos é a resistência do parasita à cloroquina, quinina e tetraciclina, principalmente o *P. falciparum*. Segundo OPS (2001), em algumas localidades da Amazônia, em 20% dos casos o tratamento empregado é ineficiente.

As principais combinações eficientes utilizadas são o artesunato e o arteméter associados à tetraciclina ou mefloquina (SALCEDO et al., 1997; ALECRIM et al., 2003). A utilização de derivados da artemisinina apresenta poucos efeitos colaterais, mas quando usada isoladamente, a porcentagem de cura é baixa (SALCEDO et al., 1997). Assim, com os empecilhos citados para a utilização destes farmoquímicos no tratamento da enfermidade, a principal alternativa encontrada é a utilização de derivados da artemisinina, uma lactona sesquiterpênica, proveniente de *A. annua*. A descoberta de que a artemisinina era eficaz contra a malária, deu-se em 1967 por pesquisadores chineses (FIGUEIRA, 1998).

A forma de tratamento mais efetivo contra a malária causada pelo *P. falciparum* é a TCA (terapia combinada com artemisinina), que é de 10 a 20 vezes mais cara que a terapia com cloroquina (WHO, 2005). Esta terapia produz rápida redução da parasitemia e dos sintomas, reduzindo em cada ciclo assexuado, aproximadamente 10.000 parasitas, número elevado quando comparado aos tratamentos antimaláricos corriqueiros, que reduzem de 100 a 1.000 parasitas por ciclo (WHO, 2008). A TCA é utilizada para retardar o aparecimento da multirresistência, aumentando a porcentagem de cura e a eficiência dos derivados da artemisinina.

A partir de 2006, houve um incremento significativo na distribuição de TCA no mundo e somente quatro países não aderiram à utilização até o momento (WHO, 2008). Estimou-se, no ano de 2006, que a demanda por TCA seria de 266 milhões de doses, sendo a produção por hectare de 25.000 doses, com aproximadamente 11.000 hectares de área necessária para suprir esta necessidade (NAS, 2004 citado por FERREIRA, 2007).

Os derivados da artemisinina: diidroartemisinina, arteéter, arteméter e artesunato de sódio (Figura 02) apresentam alta eficiência de cura nas combinações

realizadas, devido à rápida ação que possuem, negativamente a parasitemia. Assim, a associação com outros medicamentos de ação lenta (mefloquina e tetraciclina) devem ser utilizados conjuntamente para não haver possível recrudescência (ALECRIM et al., 2003).

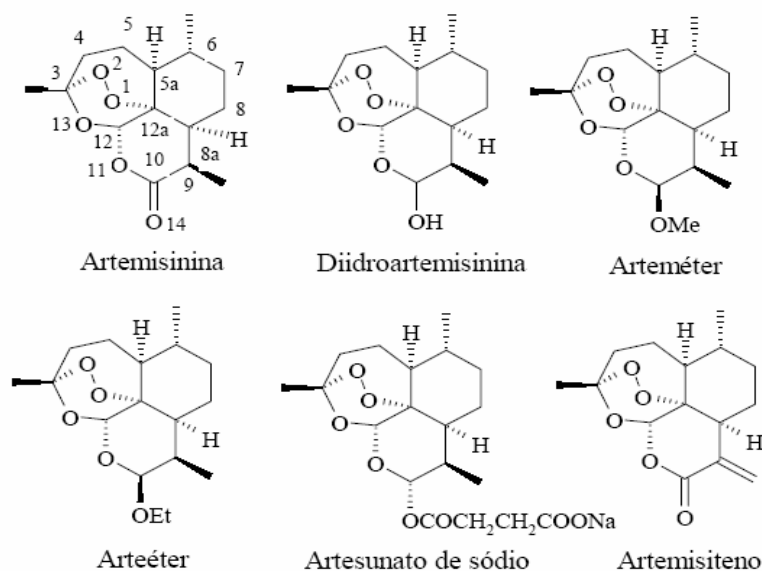


Figura 02 - Artemisinina e seus derivados semi-sintéticos. Fonte: Marchese (2006a).

A. annua pertence à família Asteraceae, que é a maior e mais dispersa família do reino vegetal, compreendendo aproximadamente 23.000 espécies e mais de 1.500 gêneros (SCHIMIDT, 1999). Essa planta é originária de uma região de clima temperado, com altitude entre 1.000 e 1.500 metros na China (FERREIRA et al., 2005) e é cultivada a mais de quinze séculos no país de origem (FIGUEIRA, 1998). *A. annua* é uma planta aromática, de fecundação cruzada (GALAMBOSI, 1980), multiplica-se por sementes ou vegetativamente (MAGALHÃES, 1996), apresenta crescimento determinado e pode atingir até 3 metros de altura (GUPTA et al., 2002; MARCHESE, 2006a). Por apresentar este tipo de crescimento, quando não ocorre a indução floral, a planta vegeta indefinidamente, com crescimento em altura e produção de entrenós linearmente. Já, quando ocorre a indução floral, há um rápido aumento na altura das plantas e no número de entrenós, sendo esse crescimento paralisado durante a floração e, ao final da floração, ocorre a produção de sementes e inicia-se a fase de senescência das plantas (FERREIRA et al., 1994; MARCHESE et al., 2002; MARCHESE, 2006a).

No Brasil, os pioneiros na introdução de *A. annua* foram os pesquisadores do CPQBA/UNICAMP, em 1987 (FIGUEIRA, 1998). Magalhães et al. (1997) selecionaram materiais de populações base, onde o rendimento era de apenas 5 kg ha⁻¹ de artemisinina e implementaram um programa de melhoramento genético, aumentando a biomassa e o teor de artemisinina, chegando a produzir 25 kg ha⁻¹ da molécula.

A via da biossíntese da molécula de artemisinina ainda não está completamente elucidada. Os sesquiterpenos são formados a partir da ligação de três moléculas do Acetil-CoA e uma série de etapas; inicialmente, é formado o ácido mevalônico – importante intermediário de seis carbonos – que é pirofosforilado, descarboxilado e desidratado para produzir o isopentenil difosfato (IPP). O IPP e seu isômero, o dimetilalil difosfato (DMAPP), reagem e formam o geranyl difosfato (GPP), que é uma molécula de 10 carbonos, originando os monoterpenos; em seguida, o GPP liga-se a outra molécula de IPP, formando um composto de 15 carbonos, o farnesil difosfato (FPP), sendo o precursor dos sesquiterpenos (TAIZ & ZEIGER, 2004; WEATHERS et al., 2006). A partir da produção do FPP, a primeira etapa é a ciclização do mesmo, originando os precursores até a formação do ácido diidroartemisinínico para posterior formação da artemisinina (Figura 03) (WEATHERS et al., 2006). Acredita-se que a rota do ácido mevalônico ocorra no citosol (WEATHERS et al., 2006) e que os terpenos são sintetizados nas células dos tricomas e armazenados no espaço extracelular que se forma quando a cutícula e uma parte da parede celular separam-se do restante da célula (glândulas capitatas) (TAIZ & ZEIGER, 2004).

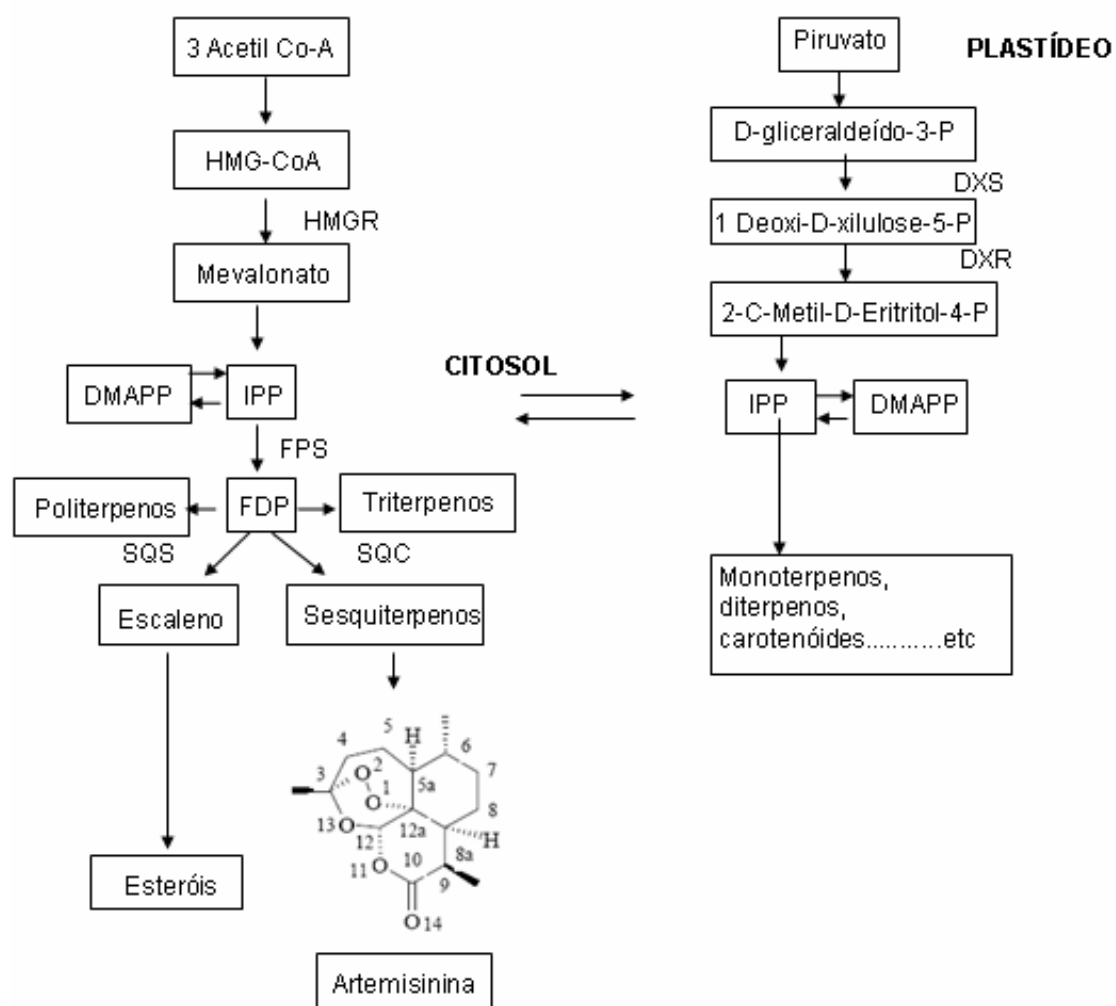


Figura 03 – Esquema simplificado da biossíntese de terpenos. Fonte: Adaptado de Weathers et al. (2006).

Ferreira & Janick (1995), Ferreira et al. (2005) e Delabays et al. (2001) detectaram as maiores concentrações de artemisinina nas folhas e inflorescências de plantas de *A. annua*. Não há relatos para a presença dessa molécula nas raízes, porém, sementes podem apresentar o composto quando resquícios florais se apresentam em mistura (FERREIRA et al., 1995). A artemisinina é acumulada nos tricomas glandulares (DUKE et al., 1994; FERREIRA, 1994; ZHANG et al., 2006) presentes na superfície das folhas, corola, receptáculo floral e caules, justificando a ausência da molécula de artemisinina em raízes e sementes. Em diferentes cultivares de *A. annua* foram observadas concentrações entre 0,02 e 1,4% de artemisinina na matéria seca das folhas (DELABAYS et al., 2001; FERREIRA, 1994; FERREIRA et al., 2005); essa variação nas concentrações de artemisinina pode ser

explicada pela existência de quimiotipos de *A. annua* em função da origem geográfica (WALLAART et al., 2000) e/ou do método de extração e análise (CHARLES et al., 1990; DELABAYS et al., 2001). Charles et al. (1990) encontraram 88,9% da artemisinina total da planta nas folhas, estando os 11,1% restantes presentes nas gemas florais.

Quanto ao acúmulo de artemisinina, há controvérsias na literatura. Acton et al. (1985), Liersch et al. (1986), Charles et al. (1990) e Woerdenbag et al. (1991) reportam que o maior acúmulo da molécula artemisinina ocorre na fase de pré-floração, no entanto, Pras et al. (1991), Morales et al. (1993), Ferreira (1994), Laughlin (1995), Ferreira & Janick (1996) e Marchese (2006a) enfatizam que o maior acúmulo da artemisinina ocorre durante a floração. Apesar desses resultados indicarem que a molécula de artemisinina pode estar relacionada com a indução floral nessa espécie, autores afirmam que a mesma não está diretamente relacionada com a indução floral de *A. annua*. Marchese et al. (2005) aplicaram diferentes concentrações de artemisinina exogenamente em plantas de *A. annua* submetidas a dias longos e não observaram a indução do florescimento nas plantas testadas. Wang et al. (2004) transformaram geneticamente plantas de *A. annua* através da inserção, em seu genoma, do fator promotor de florescimento *fpf1* de *Arabidopsis thaliana* e não observaram relação direta entre florescimento e o conteúdo de artemisinina, quando comparadas com plantas de *A. annua* não-transformadas.

Marchese (2006a) observou decréscimo acentuado no teor de artemisinina nas folhas das plantas na 4^a semana após o início do florescimento. Laughlin (1993) e Wang et al. (2004) também verificaram decréscimo no conteúdo de artemisinina durante a fase reprodutiva. Isto indica que a colheita deve ser realizada pouco tempo após o início do florescimento. Marchese (2006a) indica que a colheita deve ser realizada até três semanas após o florescimento. O conteúdo de artemisinina se mantém durante todo o estágio vegetativo, sendo influenciado pelo estágio de desenvolvimento das folhas. A correlação entre o conteúdo de artemisinina e a densidade das glândulas capitatas (tricomas) é próximo de um (ZHANG et al., 2006).

A biossíntese de metabólitos secundários é geneticamente determinada e influenciada por aspectos fisiológicos e ambientais (bióticos e abióticos). Marchese (1999) afirma que plantas de *A. annua* com 84 dias submetidas

a deficiência hídrica (DH) moderada apresentaram um aumento nos teores de artemisinina em relação aos seus controles, enquanto que plantas de 147 dias submetidas a DH não apresentaram diferenças nos teores da molécula. Charles et al. (1993) não verificaram relação entre teor de artemisinina e DH prolongada. Estes resultados provavelmente ocorreram devido aos distintos estádios fenológicos (ontogenia) ou idade em que as plantas encontravam-se e indicam que estresses moderados em curtos períodos de tempo afetam a produção do metabólito secundário artemisinina. No entanto, o aumento dos teores de artemisinina nos tratamentos com DH foram anulados por uma redução na massa seca foliar, não resultando em maiores rendimentos de artemisinina por planta (MARCHESE, 1999).

Quanto à aplicação de ativadores de defesa química, ASM e HARPINA, Marchese (2006b) não obteve aumento nos teores da molécula de artemisinina e seus análogos, sugerindo que estes compostos terpênicos podem não estar diretamente envolvidos nos processos de defesa química contra patógenos das plantas de *A. annua*.

Substâncias reguladoras de crescimento em *A. annua* foram testadas por Abdin et al. (2002), que relataram vários experimentos utilizando ácido indolacético, ácido giberélico (GA₃), triacontanol e cloromequat, todavia, nenhuma apresentou efeito indutor ao florescimento. Zhang et al. (2005) relataram que a aplicação exógena de GA₃ em *A. annua* não induziu seu florescimento, mas aumentou significativamente o teor de artemisinina.

Quitério (2006) testou a inoculação de fungos micorrízicos (*Glomus macrocarpum*) em plantas *A. annua*, que promoveram aumento no teor e acúmulo de artemisinina. Kapoor et al. (2007) testou a inoculação com micorriza e a utilização de adubação fosfatada. A inoculação de micorriza arbuscular demonstrou agregação na concentração de artemisinina, no entanto, plantas não micorrizadas, mas com aplicação de fósforo também incrementaram a concentração de artemisinina quando comparada com a testemunha, mas neste caso o incremento foi menor quando comparado a plantas micorrizadas, tanto com a aplicação ou omissão de fósforo. Isto sugere que o incremento na concentração de artemisinina pode não estar diretamente relacionado com o aumento da nutrição fosfatada.

Ferreira (2007) em experimento avaliando a deficiência nutricional e a produção de artemisinina concluiu que o tratamento com omissão de K aumentou a concentração de artemisinina em 75,5% quando comparado ao que recebeu solução

completa, visto que a produção de folhas foi reduzida em 69,5% quando comparado ao tratamento com solução completa. Estes dados demonstram que o rendimento de artemisinina está mais associado aos ganhos em biomassa foliar do que ao teor de artemisinina nas folhas.

Há na literatura controvérsias sobre a resposta fotoperiódica de plantas de *A. annua*. Marchese (2006a) cita que *A. annua* apresenta resposta fotoperiódica de plantas de dias curtos obrigatória. No entanto, Magalhães et al. (1997) consideram *A. annua* uma planta de dias intermediários. Marchese (2006a) realizou testes em campo e em câmaras fotoperiódicas, trazendo uma confirmação da resposta fotoperiódica desta espécie, como planta de dias curtos obrigatória. Plantas de *A. annua* florescem entre duas (FERREIRA, 1994; ZHANG et al., 2005) e quatro semanas (MARCHESE et al., 2002; MARCHESE, 2006a) após receberem estímulo de dias curtos, sob fotoperíodo indutivo (MARCHESE & FIGUEIRA, 2005).

Marchese (2006a) em experimento realizado para obtenção da época ideal de plantio para o cultivar CPQBA 2/39x1V, avaliou a produção de biomassa e o teor de artemisinina nas condições de Pato Branco-PR, Brasil (26⁰07'S e 52⁰41'W – 760m de altitude), obtendo 3.045,1 kg ha⁻¹ de matéria seca de folhas e o rendimento de artemisinina de 30,38 kg ha⁻¹. O ciclo das plantas foi de 165 dias, sendo recomendado o plantio na segunda quinzena de setembro ou no início de outubro – devido às geadas extemporâneas ocorridas na região – e a colheita em março. Pode-se generalizar, através de experimentos realizados em ambos os hemisférios (Norte e Sul), de que a época ideal de plantio é a primavera e a colheita no outono (Figura 04).

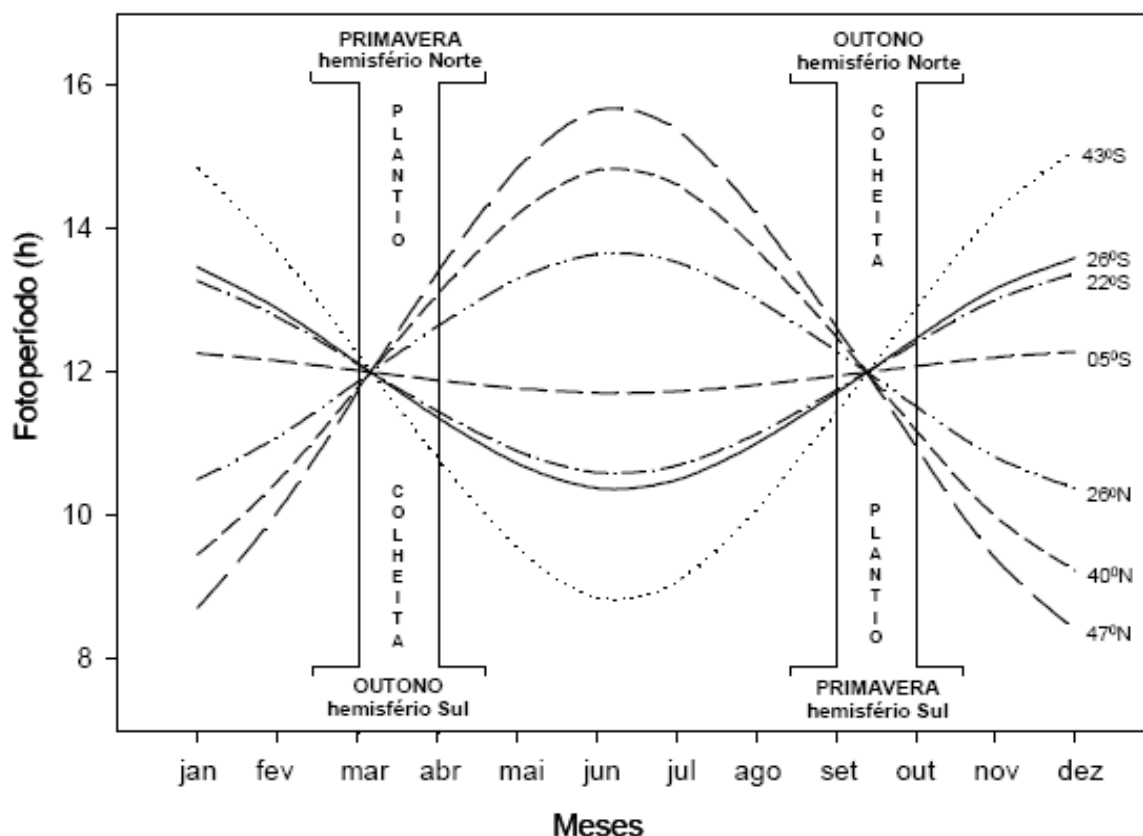


Figura 04 - Épocas de plantio (primavera) e colheita (outono) em função do fotoperíodo anual em diferentes locais de cultivo de *A. annua* nos hemisférios Sul (5°S = Teresina-PI; 22°S = Campinas-SP; 26°S = Pato Branco-PR; 43°S = Tasmania, Austrália) e Norte (47°N = Bulgária; 40°N = West Lafayette, IN, EUA e 26°N = Lucknow, Índia). Fonte: Marchese (2006a).

Quando comparadas às produções de biomassa de Pato Branco-PR e Campinas-SP, a de Pato Branco-PR é superior, possivelmente devido ao mecanismo fotossintético da planta e as temperaturas mais amenas na região Sul do Brasil. Esta espécie é proveniente de clima subtropical e temperado, similares ao Sul do Brasil. O mecanismo fotossintético desta espécie foi estudado por Marchese et al. (2005), que concluiu que *A. annua* possui metabolismo fotossintético tipo C3, sendo adaptada a temperaturas mais amenas, devido ao efeito fisiológico da fotorespiração.

Nessa família foram identificadas mais de 4.000 lactonas sesquiterpênicas, um dos maiores grupos de metabólitos secundários de plantas, os quais vêm recebendo considerável atenção nas últimas décadas por possuírem uma larga variedade de atividades biológicas, e que aparentam ter um excepcional valor ecológico para as plantas que sintetizam essa classe de moléculas, responsáveis pelo sucesso evolucionário desta família. Acredita-se que a maioria desses

compostos exerce sua atividade alelopática através de um mecanismo químico de ação comum que é a alquilação de moléculas orgânicas. Um grande número de enzimas e outras macromoléculas essenciais são inibidas por lactonas sesquiterpênicas, usualmente, em baixas concentrações (SCHIMIDT, 1999). Como a maioria das espécies da família Asteraceae, *A. annua* também produz lactonas sesquiterpênicas, principalmente a artemisinina. Esta lactona sesquiterpênica apresentou atividade alelopática, atuando sobre diferentes espécies, em trabalhos desenvolvidos por Duke et al. (1987), Chen & Leather (1990), Bagchi et al. (1997a), Dayan et al. (1999) e Delabays et al. (2008).

Apesar dos estudos existentes sobre a ecofisiologia da *A. annua* no Brasil, fatores do ambiente afetando a produção de biomassa e de artemisinina (MAGALHÃES et al., 1997; MARCHESI, 1999; MARCHESI & REHDER, 2001; MARCHESI et al., 2002; MARCHESI, 2006a; MARCHESI, 2006b) e a condução agrônômica dos campos de produção, pouca informação é encontrada na literatura, se compararmos com outras espécies cultivadas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 DEFINIÇÃO DA ÉPOCA DE PLANTIO E COLHEITA, E PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA E ARTEMISININA DE *A. annua* CULTIVAR ARTEMIS

O experimento para definição da época de plantio e colheita para *A. annua* cultivar Artemis foi conduzido em campo durante os anos de 2007 e 2008, na área experimental da UTFPR (Universidade Tecnológica Federal do Paraná), localizada 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 e, o solo da área é classificado como Latossolo Vermelho aluminoférrico de textura argilosa, situado em relevo suave ondulado (EMBRAPA, 1999).

Sementes de *A. annua* cultivar Artemis obtidas do Centro de Pesquisa de Plantas Medicinais e Aromáticas – MEDIPLANT, na Suíça, foram semeadas em tubetes contendo substrato orgânico esterilizado. As mudas provenientes do cultivo, com aproximadamente 60 dias ou 15 cm foram mantidas em casa de vegetação, sob condição de fotoperíodo de 15 horas em estufa (a luz natural foi complementada com luz artificial), para evitar o florescimento das mesmas.

No plantio a campo, o delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições, sendo que cada repetição ou parcela experimental foi constituída de 25 plantas, com espaçamento entre plantas de 0,60 m na linha de plantio e 1,00 m nas entre linhas. Os tratamentos foram 06 diferentes épocas de plantio (Tabela 01) em sistema plantio direto. As médias das repetições nos tratamentos foram submetidas à análise de variância e a comparação de médias foi realizada através do teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro no programa Statgraphics Plus® 4.1 e as análises de regressão e os gráficos no programa SigmaPlot® 10.0.

Tabela 01 - Datas de semeadura e plantio da cultivar Artemis de *A. annua* em Pato Branco-PR, Brasil (26°07'S e 52°41'W – 760 m alt.). UTFPR, Campus Pato Branco, 2008.

Mês/ano	1ª época	2ª época	3ª época	4ª época	5ª época	6ª época
10/2006	S	---	---	---	---	---
11/2006	---	---	---	---	---	---
12/2006	---	---	---	---	---	---
01/2007	P	S	---	---	---	---
02/2007	---	P	S	---	---	---
03/2007*	---	---	---	---	---	---
04/2007	---	---	---	---	---	---
05/2007	---	---	P	S	---	---
06/2007	---	---	---	---	---	---
07/2007	---	---	---	P	S	---
08/2007	---	---	---	---	---	---
09/2007	---	---	---	---	---	---
10/2007	---	---	---	---	P	S
11/2007	---	---	---	---	---	---
12/2007	---	---	---	---	---	P
01/2008	---	---	---	---	---	---
02/2008	---	---	---	---	---	---
03/2008*	---	---	---	---	---	---

S = data de semeadura; P = data do plantio no campo; * possível época de colheita segundo Marchese (2006a).

Na Tabela 02 apresenta-se a caracterização química do solo da área experimental, na camada de 0,00 a 0,20 m de profundidade, antes da instalação do experimento. Efetuou-se apenas correção de acidez, elevando a saturação de bases para 65%.

Tabela 02 - Caracterização do solo da área experimental. UTFPR, Campus Pato Branco, 2008.

Matéria Orgânica	P	K ⁺	Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	pH	Saturação de Bases
%	---	mg dm ⁻³	---	cmol _c dm ⁻³	---	CaCl ₂	%
6,30	4,63	187,68	0,63	3,60	2,11	4,40	35,84

Quando do início da emissão dos botões florais, diariamente, foram avaliados o número de plantas que iniciaram a emissão dos botões florais. O fotoperíodo crítico e o número de ciclos fotoindutivos aproximados para o cultivar

Artemis foram calculados segundo Marchese (2006a). Nas nove plantas centrais de cada tratamento, descartadas às das bordaduras, semanalmente, foi medida a altura das plantas. Essas mesmas nove plantas foram colhidas para a determinação da massa seca de folhas e caules, relação folha/caule e teor de artemisinina na massa seca de folhas, quando 50% das plantas da parcela iniciaram a emissão dos botões florais. Estas plantas foram cortadas rente ao solo e colocadas para secar até peso constante em estufa com circulação de ar à temperatura de 35°C, de acordo com Figueira & Sartoratto (1997), que sugerem temperaturas de no máximo 40°C para a secagem de *A. annua*. Na determinação da massa seca de folhas e caules e relação folha/caule pesou-se em separado cada uma das nove plantas da parcela. Já, para a determinação do teor de artemisinina na massa seca de folhas foi feita uma amostragem na parcela. Para o cálculo da produção por hectare de artemisinina, multiplicou-se a biomassa seca de folhas ha⁻¹ pelo teor de artemisinina do respectivo tratamento.

A determinação do teor de artemisinina nas folhas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração. O material vegetal foi seco a 35 °C em estufa com ventilação forçada e moído. A extração das amostras foi realizada em Ultra Turrax marca Quimis, utilizando-se 0,5g de folhas secas, em duplicatas, com 5 mL de metanol, por 3 minutos, 1000 rpm, a temperatura ambiente. O processo foi repetido por mais três vezes. Os extratos foram filtrados a vácuo em funil de placa porosa e evaporados à secura. Após a evaporação, dissolveram-se as amostras com 2 mL de diclorometano. Em seguida, eluiu-se com 3mL de hexano e 60 mL de diclorometano, coletando as frações separadamente, através de cartuchos de Florisil® que foram conectados ao Manifold®. A fração de diclorometano foi evaporada à secura e ressuspensa com 5 mL de metanol grau CLAE, em balão volumétrico. As amostras foram filtradas em membranas MILLEX® produto JBR6 10222 de 0,45 µm descartáveis e analisadas por cromatografia líquida de alta resolução com detector de índice de refração. Injetou-se 20 µL da amostra, o pico entre 7,8-8,4 minutos correspondeu a artemisinina. As análises foram realizadas com CLAE WATERS modelo 515 acoplada a detector de índice de refração WATERS modelo 2414; temperatura interna do detector 35 °C e volume de injeção 20 µL. Os dados cromatográficos foram analisados usando software do equipamento Empower-Waters. Utilizou-se

coluna CN 100Ao, Agilent (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m); fase móvel metanol:água (40:60 v/v) e vazão de 1 mL/min.

5.2 EFEITO ALELOPÁTICO DE *A. annua* L. NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.) E LEITEIRO (*Euphorbia heterophylla* L.)

O experimento foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Pato Branco. Foram coletadas folhas de planta adulta de *A. annua*, cultivar Artemis, em novembro/2007.

Para a obtenção do extrato aquoso, foram trituradas 250 g de folhas frescas em 1 L de água destilada, com o auxílio de um liquidificador, por um minuto. Filtrou-se o extrato, e em seguida centrifugou-se por 5 min a 3.000 rpm. Retirou-se o sobrenadante, considerado a concentração de 100%. A partir deste, foram feitas diluições com água destilada para 75%, 50% e 25%. Os efeitos das quatro concentrações foram comparados com o de água destilada, considerada como controle (0%).

Nos bioensaios de germinação foram realizadas quatro repetições de 25 sementes de alface e de leiteiro, distribuídas equidistantemente em placas de Petri (\varnothing = 9 cm) contendo três discos de papel-filtro (Whatman nº 1). Cada placa recebeu 4 mL do extrato do respectivo tratamento, antes da semeadura. Para evitar a evaporação dos extratos, selaram-se as placas com filme de PVC. Os discos de papel filtro foram mantidos úmidos com água destilada, quando necessário. Após, as placas de Petri foram levadas para câmaras climatizadas com temperatura de ± 25 °C e fotoperíodo de 12 horas e ± 27 °C e 24 horas, para sementes de alface e de leiteiro, respectivamente.

As avaliações foram realizadas às 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a semeadura. Procedeu-se a contagem das sementes germinadas e mediu-se o comprimento (mm) das raízes primárias das plântulas, onde se considerou a distância do colo da planta até o ápice meristemático do sistema radicular (GATTI et al., 2004), com a utilização de papel milimetrado. Considerou-se germinada a

semente que apresentava em torno de 5 mm de protusão radicular. As plantas foram consideradas normais ou anormais, segundo as Regras para Análise de Sementes do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária (BRASIL, 1992).

Os cálculos de germinabilidade (G), tempo médio (t) e velocidade de germinação (V) foram realizados conforme as fórmulas (1), (2) e (3) citadas por Labouriau & Valadares (1976):

$$\textbf{Germinabilidade: } G = (N/A).100 \quad (1)$$

onde: G = germinabilidade (%); N = número de sementes germinadas; A = número total de sementes colocadas para germinar.

$$\textbf{Tempo médio de germinação: } t = (\sum n_i t_i) / \sum n_i , \quad (2)$$

onde: t = tempo médio de incubação (horas); n_i = número de sementes germinadas por dia; t_i = tempo de incubação (dias).

$$\textbf{Velocidade média de germinação: } V = 1/t , \quad (3)$$

onde: V = velocidade média de germinação (sementes germinadas hora⁻¹); t = tempo médio de germinação.

O delineamento utilizado foi um bifatorial inteiramente casualizado (concentração x períodos de avaliação), com quatro repetições para cada tratamento. Os valores de percentagem de germinação foram transformados para arcoseno $\sqrt{x}/100$. Os resultados das avaliações foram submetidos à análise da variância. As variáveis que se mostraram homogêneas tiveram os tratamentos avaliados pelo Teste F. Foram ajustadas regressões polinomiais para as concentrações de extrato e horas (variáveis independentes) com a variável dependente comprimento de radícula, buscando o modelo que melhor expressasse esta relação. Foram testados modelos linear e quadrático e a escolha foi baseada na significância ($p < 0,05$) e no coeficiente de determinação. Para as demais variáveis dependentes avaliadas, utilizou-se comparação de médias através do teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. O programa estatístico utilizado foi o GENES®.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 DEFINIÇÃO DA ÉPOCA DE PLANTIO E COLHEITA, E PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA E ARTEMISININA PARA A CULTIVAR ARTEMIS DE *A. annua*

Na Tabela 03 nota-se que, para a maioria das épocas testadas, a colheita foi realizada no mês de março, portanto, sob fotoperíodo indutivo. Este dado corrobora com os dados de Marchese (2006a) e Laughlin (1993).

Tabela 03 - Datas de semeadura, plantio, colheita e dias de permanência das plantas a campo após o plantio da cultivar Artemis de *A. annua* em Pato Branco-PR, Brasil. UTFPR, Campus Pato Branco, 2008.

Mês/ano	1ª época	2ª época	3ª época	4ª época	5ª época	6ª época
10/2006	S 16	---	---	---	---	---
11/2006	---	---	---	---	---	---
12/2006	---	---	---	---	---	---
01/2007	P 03	S 12	---	---	---	---
02/2007	---	P 28	S 13	---	---	---
03/2007	C 16	---	---	---	---	---
04/2007	---	C 05	---	---	---	---
05/2007	---	---	P 02	S 14	---	---
06/2007	---	---	C 12	---	---	---
07/2007	---	---	---	P 27	S 31	---
08/2007	---	---	---	---	---	---
09/2007	---	---	---	---	---	---
10/2007	---	---	---	---	P 02	S 22
11/2007	---	---	---	---	---	---
12/2007	---	---	---	---	---	P 27
01/2008	---	---	---	---	---	---
02/2008	---	---	---	---	---	---
03/2008	---	---	---	C 14	C 14	C 14
DAP	72	36	43	231	164	78

S = semeadura; P = plantio das mudas a campo; C = colheita, quando 50% das plantas iniciaram o florescimento; DAP = dias após o plantio.

O número de ciclos fotoindutivos (CF) encontrados a campo para a cultivar Artemis de *A. annua* foi de 36 ciclos ou dias (Figura 05), dado esse semelhante ao obtido por Marchese (2006a), no mesmo município, para o cultivar CPQBA 2/39x1V, que foi de aproximadamente 28 dias. Marchese et al. (2002) obtiveram em seus estudos, em ambiente controlado, 32 CF para o cultivar vietnã e 14,75 CF para o cultivar chinês de *A. annua*. Ferreira (2004) reporta que o florescimento para o cultivar chinês ocorre aproximadamente 14 dias após plantas de *A. annua* serem submetidas ao fotoperíodo crítico. Estes dados sugerem que a variação genotípica dos materiais utilizados reflete em respostas diferenciadas para o número de CF, pois existem quimiotipos de *A. annua* em função da origem geográfica do material (WALLAART et al., 2000).

Quanto ao fotoperíodo crítico (FC), verificou-se a data de florescimento da 1ª época (16/03/2007) e subtraiu-se o número de CF (36 ciclos), obtendo o fotoperíodo crítico, no qual o comprimento do dia foi de aproximadamente 13 horas, em 09/02/07. Verificou-se que as plantas floresceram abaixo do FC, indicando que a cultivar Artemis de *A. annua* apresentou uma resposta fotoperiódica de Planta de Dias Curtos; para a afirmação deste resultado, seria prudente um experimento em câmaras fotoperiódicas. Marchese (2006a) em estudos realizados em Pato Branco (26º S), Paraná, Brasil concluiu que o FC aproximado de 13,07 horas induziu o florescimento do cultivar CPQBA 2/39 x 1V. Ferreira (1994) em West Lafayette (40º N), IN, EUA, observou um FC aproximado de 13,5h e Bagchi et al. (1997b) em Lucknow (26º N), Índia, concluíram que o fotoperíodo aproximado de 13,2 h induziu o florescimento. Isso demonstra que independente do genótipo utilizado, o FC é semelhante para qualquer material.

Os resultados de que o FC ocorreu na primeira quinzena de fevereiro, determinou que a época de colheita para a cultivar Artemis, na região de Pato Branco-PR, deverá ser na segunda quinzena do mês de março. Assim, deve-se realizar o plantio desta espécie o mais distante possível do FC, pois após o florescimento, as plantas senescem rapidamente e o teor de artemisinina decai (LAUGHLIN, 1993; WANG et al., 2004; ZHANG et al., 2005; MARCHESE, 2006a). Por este motivo a colheita deve ser realizada nas fases de pré-floração ou floração, onde aproximadamente 90% da artemisinina localiza-se nas folhas (CHARLES et al., 1990; FERREIRA, 1994; MARCHESE, 2006a).

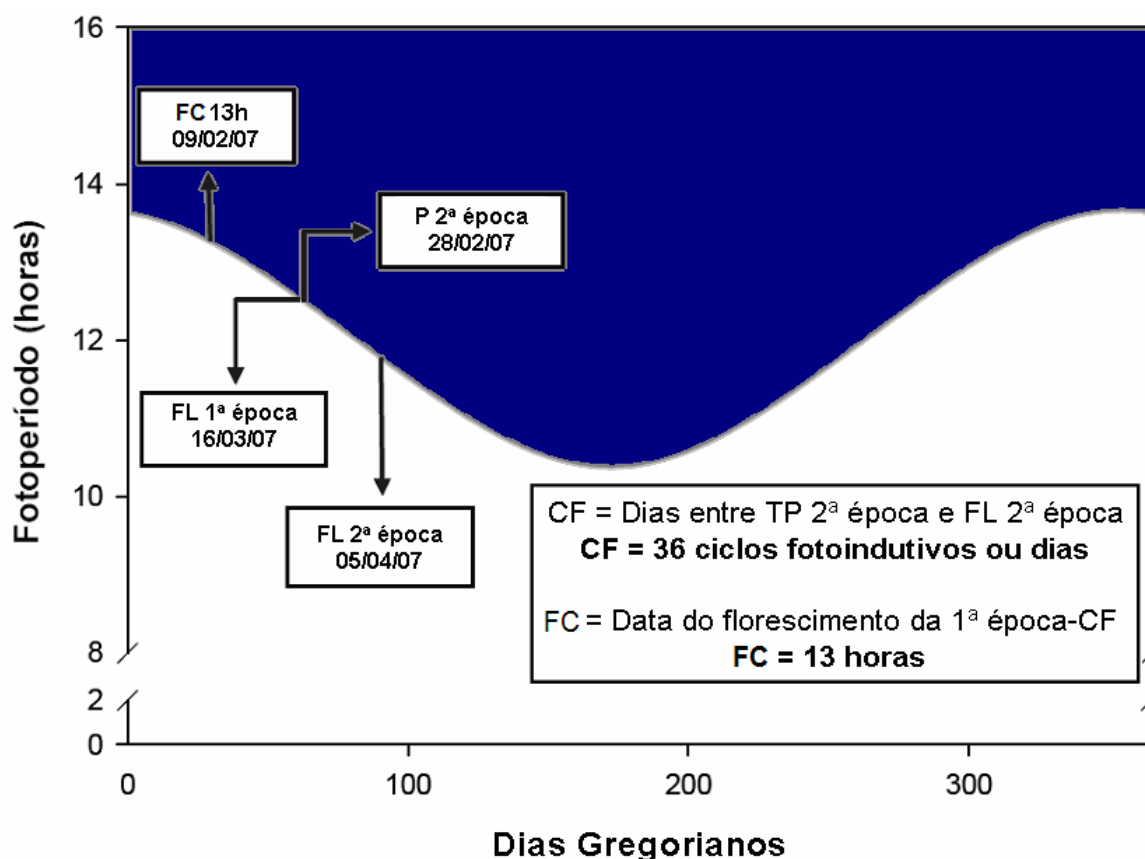


Figura 05 - Fotoperíodo anual em Pato Branco-PR, Brasil (26°07' S, 52°41' W e 760m) e caracterização do florescimento de *A. annua* cultivar Artemis. FC = fotoperíodo crítico; TP = plantio para o campo; FL = emissão de 50% botões florais; CF = número de ciclos fotoindutivos. UTFPR, Campus Pato Branco, 2008.

Nota-se que houve atraso no florescimento da 4ª época (Tabela 03), pois quando foi realizado o plantio a campo, em 27/07/2007, as plantas encontravam-se sob fotoperíodo indutivo e não floresceram naquele ano, sendo a colheita realizada somente em 14/03/2008. Nesta época de plantio, o fotoperíodo é o menor encontrado durante o ano, em torno de 11 horas. Resultado semelhante foi observado por Ferreira (1994), quando cultivou *A. annua* em dias curtos e algumas plantas iniciaram o florescimento dois meses mais tarde às demais plantas testadas. Este fenômeno somente ocorreu no tratamento de 08 horas de fotoperíodo, o menor fotoperíodo utilizado no experimento daquele autor. Todavia, em experimento realizado por Marchese et al. (2002) utilizando a mesma cultivar e o menor fotoperíodo de 07 horas não se observou atraso no florescimento das plantas. O atraso no florescimento indica que *A. annua* poderia apresentar um período de juvenilidade até atingir a fase reprodutiva. O fenômeno de juvenilidade é o período em que a planta se mantém vegetativa, não adentrando na fase reprodutiva (TAIZ &

ZEIGER, 2004). Estes autores enfatizam que o tamanho das plantas é um fator importante na transição da fase juvenil para a reprodutiva. A 4ª época foi plantada a campo no mês de julho, período em que ocorrem as menores temperaturas anuais, o que provavelmente retardou o crescimento das plantas, prolongando a fase juvenil. As demais épocas deste experimento não apresentaram este fenômeno, provavelmente devido às maiores temperaturas ocorridas durante a permanência das mesmas a campo, fator que não retardou o crescimento, reduzindo o período de transição da fase juvenil para a fase reprodutiva.

A maior produção de massa seca de folhas e caules foi obtida no plantio a campo da 4ª época (Tabela 03 e Tabela 04), realizado em 27/07/07 (inverno) no qual as plantas permaneceram mais tempo vegetando a campo, em torno de 231 dias após o plantio (DAP), com produção de massa seca (MS) de folhas de 946,71 kg ha⁻¹ e 2.137,28 kg ha⁻¹ de MS de caules. Esses rendimentos de massa seca de folhas e caules foram seguidos da 5ª época, que permaneceu 164 DAP, e produziu 761,32 kg ha⁻¹ de MS de folhas e 1.517,50 kg ha⁻¹ de MS de caules, diferindo estatisticamente da 4ª época. A 1ª e a 6ª épocas que permaneceram em torno de 70 dias a campo diferiram estatisticamente das 4ª e 5ª épocas, produzindo 232,10 e 260,39 kg ha⁻¹ de MS de folhas e 948,96 e 447,27 kg ha⁻¹ de MS de caules, respectivamente. E, os menores acúmulos de massa seca de folhas e caules, ocorreram nas 2ª e 3ª épocas, que permaneceram em torno de 40 dias a campo, com produção de 19,22 kg ha⁻¹ e 16,45 kg ha⁻¹ de MS de folhas e 72,12 e 64,91 kg ha⁻¹ de MS de caules, respectivamente (Figura 06 e Tabela 03).

Quanto a MS total (Figura 06 e Tabela 03), os rendimentos acompanharam a permanência das plantas a campo, ou seja, quanto maior a permanência a campo, maior o acúmulo de MS total, sendo que a 4ª época produziu 3.083,99 kg ha⁻¹ de MS total e diferiu estatisticamente da 5ª época, com produção de 2.278,82 kg ha⁻¹. A 1ª e a 6ª épocas diferiram da 5ª época, mas não entre si, com produção de MS total de 1.181,06 e 707,66 kg ha⁻¹ respectivamente. A 3ª e a 2ª época diferiram estatisticamente da 1ª e a 6ª épocas, com produção de MS total de 91,34 e 81,36 kg ha⁻¹, respectivamente.

As produções de MS de folhas e caules neste estudo foram baixas quando comparadas às produções obtidas por Marchese (2006a), no mesmo município deste estudo que obteve 3.045,10 kg ha⁻¹ de MS de folhas e 14.974,90 kg ha⁻¹ de MS de caules, totalizando 18.020,00 kg ha⁻¹ de MS total para a

cultivar CPQBA 2/39X1V. Marchese (2006a) comparou os rendimentos de biomassa obtidos em Pato Branco-PR com os rendimentos obtidos em Campinas-SP (ano agrícola mais produtivo), justificando que os 989,05 kg ha⁻¹ de folhas produzidos a mais em Pato Branco-PR são devidos ao clima mais ameno nessa região, pois o mecanismo fotossintético desta espécie é do tipo C3 (MARCHESE et al., 2005), e em temperaturas mais elevadas – como em Campinas-SP - aumenta a fotorrespiração, reduzindo a produção. Em consequência da redução dos ganhos de biomassa foliar em Campinas-SP, os rendimentos de artemisinina também foram menores quando comparados aos de Pato Branco-PR, pois o rendimento de artemisinina está associado mais aos ganhos em biomassa foliar do que no teor de artemisinina, pois em ambos os locais de cultivo, o teor nas folhas foi de aproximadamente 1% (MARCHESE, 2006a).

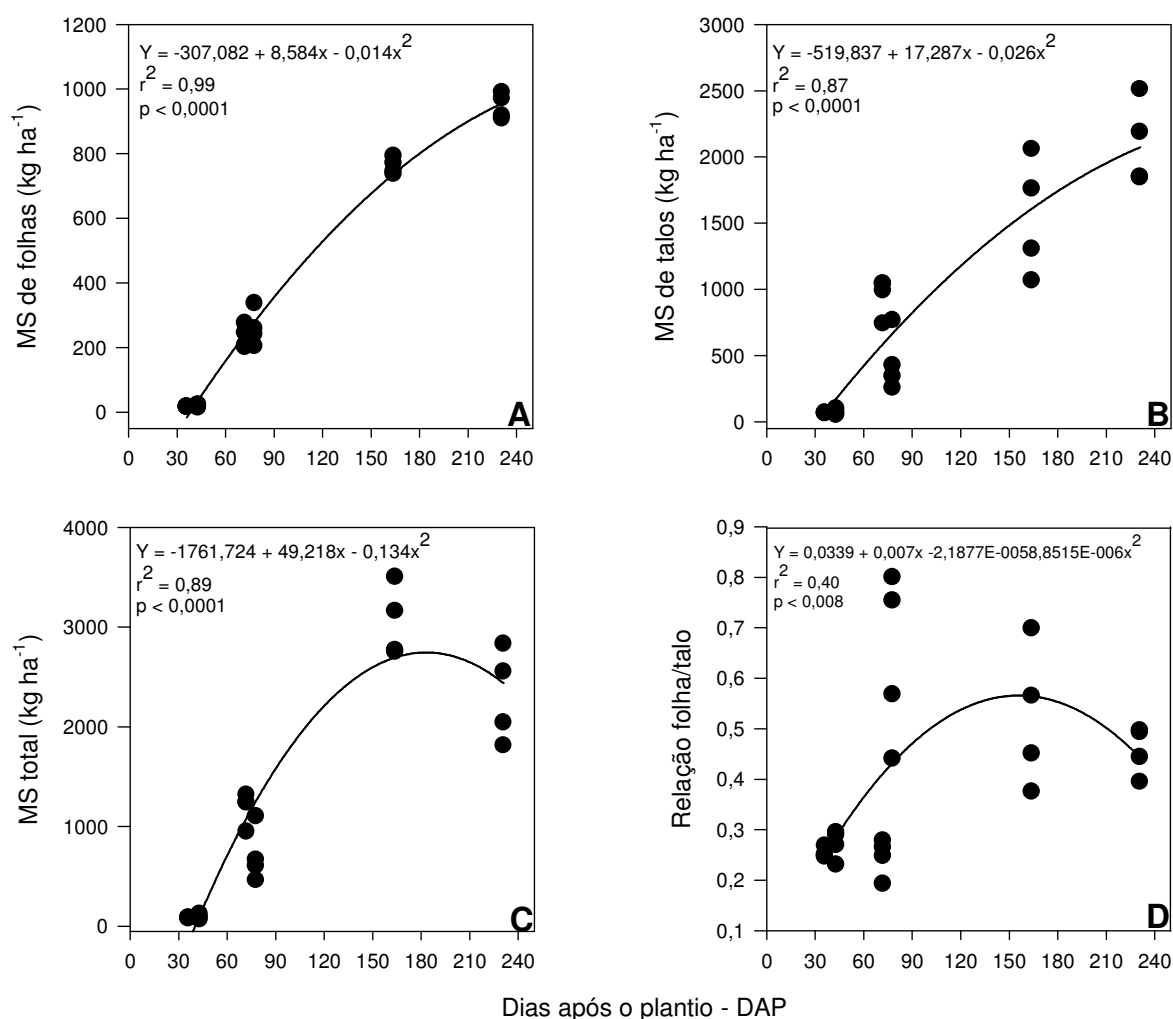


Figura 06 - Rendimento de biomassa seca de folha (A), rendimento de biomassa seca de caules (B), rendimento MS total (C) e relação folha/caule (D) da cultivar *Artemisia annua* em função das diferentes épocas de plantio. UTFPR, Campus Pato Branco, 2008.

Tabela 04 - Efeito das diferentes épocas de plantio na produção de biomassa seca de folhas, caule, biomassa total e relação folha/caule, para a cultivar Artemis de *A. annua*. UTFPR, Campus Pato Branco, 2008.

Época de plantio	DAP	kg ha ⁻¹						Relação folha/caule		
		MS folhas	MS caule	MS total	MS folhas	MS caule	MS total			
Julho/2007	4 ^a época	231	946,71	a	2137,28	a	3083,99	a	0,44	bc
Outubro/2007	5 ^a época	164	761,32	b	1517,50	b	2278,82	b	0,53	b
Janeiro/2007	1 ^a época	72	232,10	c	948,96	c	1181,06	c	0,24	c
Dezembro/2007	6 ^a época	78	260,39	c	447,27	cd	707,66	c	0,64	a
Maio/2007	3 ^a época	43	19,22	d	72,12	d	91,34	d	0,27	c
Fevereiro/2007	2 ^a época	36	16,45	d	64,91	d	81,36	d	0,25	c

DAP = dias após o plantio. *Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si, ao nível de significância de 5% de probabilidade de erro, pelo teste Tukey.

A relação folha/caule é um indicativo que deve ser observado nos programas de melhoramento genético, pois os caules apresentam ceras que dificultam o processo de extração. Quanto maior for esta relação, menor a quantidade de caules presentes, facilitando a industrialização (isolamento e purificação) da artemisinina (MARCHESE, 2006a). Diferente dos dados apresentados por outros autores, como os observados por Marchese (2006a) usando a cultivar CPQBA 2/39X1V, a cultivar Artemis apresentou maiores relações folha/caule nas épocas que permaneceram mais tempo no campo (4^a e 5^a épocas), 164 e 231 DAP (Tabela 03), sendo um bom indicativo para a indústria.

A não ocorrência do florescimento das plantas colocadas a campo em 27/07/2007 indicou que essa seria a melhor época de plantio, pois as plantas permaneceram por mais tempo vegetando até o florescimento, aproximadamente 231 dias, resultando em maior produtividade de folhas. Esses dados não corroboram os de Galambosi (1980), Laughlin (1993), Haider et al. (2004), Kumar et al. (2004) e Marchese (2006a).

Galambosi (1980) realizou experimento na Bulgária (43^o N) e recomenda o plantio de *A. annua* no final de março a início de abril (primavera no hemisfério Norte); Haider et al. (2004) e Kumar et al. (2004) desenvolveram experimentos na Índia (26,5^o N) e obtiveram, respectivamente, que o florescimento de *A. annua* ocorreu no início de outubro e no final agosto (outono no hemisfério Norte); Laughlin (1993) em experimento realizado na Austrália (42^o S) indica que a melhor época de plantio foi em outubro (primavera no hemisfério Sul) e o

florescimento ocorreu na 3ª semana de março (outono no hemisfério Sul) e Marchese (2006a) indica como melhor época de plantio a segunda quinzena de setembro (primavera no hemisfério Sul) no Paraná (43º S). Marchese (2006a) observando os resultados dos experimentos acima, generalizou que a melhor época de plantio é na primavera e a melhor época de colheita é o outono, para ambos os hemisférios.

Neste experimento, observou-se que a melhor época de plantio se dá no inverno e a colheita no outono. Mas, mesmo que a época de plantio não corrobore os dados dos demais autores, não recomenda-se o plantio desta espécie na melhor época obtida com este experimento, visto que na região Sudoeste do Paraná, há possibilidades de geadas extemporâneas, as quais podem ocorrer até a segunda quinzena de setembro. Assim, a recomendação de plantio segue a dos autores acima citados, ou seja, para o hemisfério Sul, o plantio deve ser na segunda quinzena de setembro e a colheita em março, seguindo os dados obtidos na região Sudoeste do Paraná por Marchese (2006a).

Esses dados sugerem que essa cultura se enquadra em sistema de sucessão de culturas para a região Sudoeste do Paraná, podendo-se cultivar: trigo/artemisia/aveia/soja ou soja/aveia/artemisia/trigo/milho. Sendo assim, com as sucessões citadas, a artemísia será plantada a campo em meados de outubro ou início de novembro, após a colheita do trigo ou da aveia.

Quanto ao teor de artemisinina na massa seca das folhas (Figura 07), as épocas 4ª, 5ª e 6ª, apresentaram teor de 0,72%, 0,88% e 0,74% de artemisinina na MS, respectivamente. Estas épocas foram as que permaneceram por mais tempo vegetando a campo e obtiveram os maiores teores e conseqüentemente os maiores rendimentos de artemisinina ha⁻¹, devido a maior produção de biomassa, justificando que o maior rendimento de artemisinina está relacionado mais a biomassa foliar do que o teor nas folhas. Essas diferiram estatisticamente da 1ª, 2ª e 3ª épocas, as quais respectivamente apresentaram 0,36%, 0,33%, 0,4% de artemisinina na MS. Apesar do teor de artemisinina ser altamente herdável, entre 0,95 e 1 (DELABAYS et al., 2001), a diferença do teor obtido nas diferentes épocas se dá em função da ontogenia, ou seja, o acúmulo de artemisinina está relacionado ao desenvolvimento das folhas, pois há incremento gradual no conteúdo de artemisinina durante o desenvolvimento e crescimento das mesmas (ZHANG et al., 2006). Além disso, a artemisinina é acumulada nas glândulas capitatas (DUKE et al., 1994; FERREIRA et

al., 1997, citado por FERREIRA et al., 2005) e a densidade dessas glândulas na superfície das folhas é maior quanto maior for o desenvolvimento das folhas. Em experimento desenvolvido por Zhang et al. (2006), o coeficiente de correlação entre o conteúdo de artemisinina e a densidade das glândulas capitatas foi de 0,987. Relatos na literatura reportam que a cultivar *Artemis* pode atingir 1,4% de artemisinina da MS de folhas (DELABAYS, 1997; DELABAYS et al., 2001).

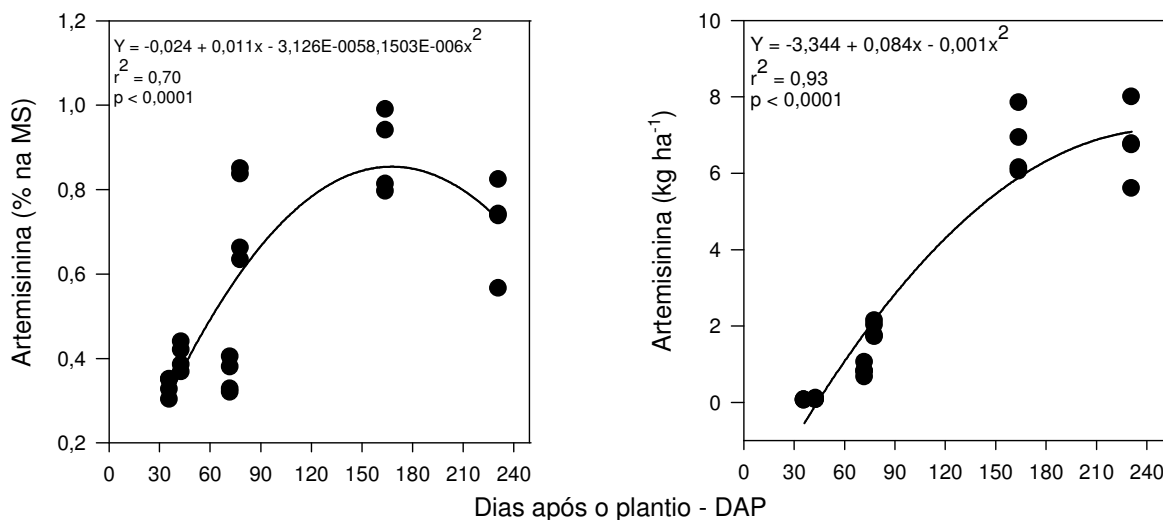


Figura 07 - Teor de artemisinina e produção de artemisinina por hectare para a cultivar *Artemis* de *A. annua* nas condições de Pato Branco-PR. UTFPR, Campus Pato Branco, 2008.

A. annua apresenta hábito de crescimento determinado, sendo a altura de plantas obtida neste experimento (Figura 08) semelhante aos reportados por Ferreira & Janick (1996), que foi entre 0,8 e 2 m. Como não foi realizada adubação na área experimental, somente foi corrigido o pH, as plantas apresentaram um porte baixo quando comparado aos dados apresentados por Gupta et al. (2002) e Marchese (2006a) onde as plantas atingiram em média 3m de altura. As plantas das épocas que mais tempo vegetaram no campo (4ª e 5ª) foram as que apresentaram as maiores alturas, devido ao maior incremento de biomassa.

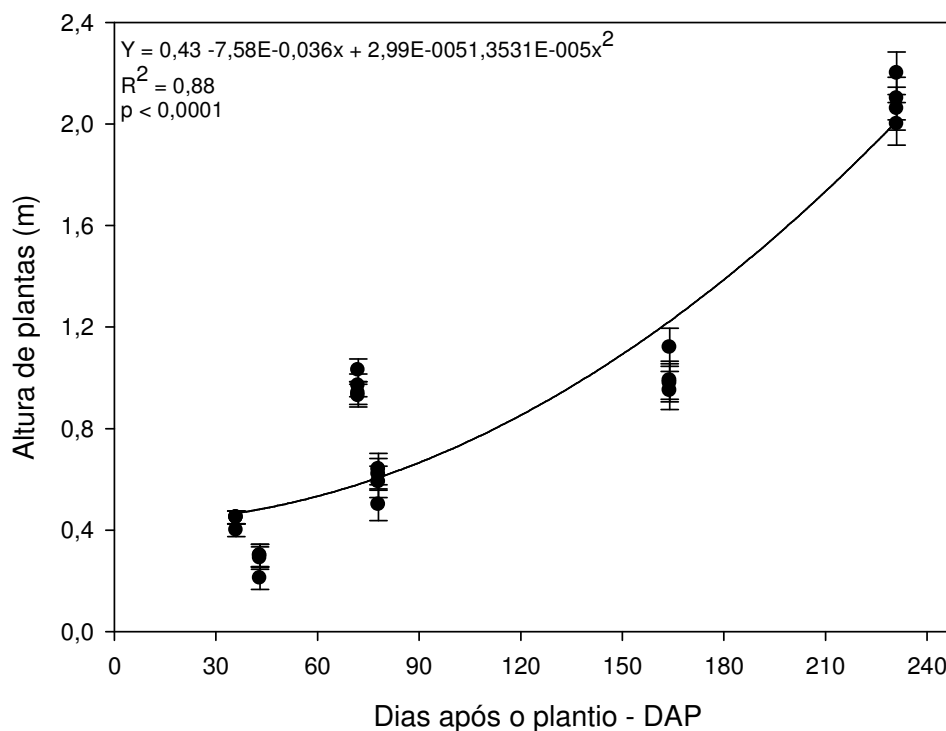


Figura 08 - Altura média final das plantas das seis épocas de plantio da cultivar Artemis de *A. annua* em Pato Branco-PR, Brasil. UTFPR, Campus Pato Branco, 2008.

6.2 EFEITO ALELOPÁTICO DE *A. annua* L. NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.) E LEITEIRO (*Euphorbia heterophylla* L.).

A análise da variância pelo teste F detectou interação significativa entre concentrações dos extratos e períodos de avaliação para as variáveis germinabilidade e comprimento de radícula de alface. Não houve interação significativa entre os fatores concentração e períodos de avaliação para a variável germinabilidade de leiteiro, mas sim para o comprimento de radícula.

Para sementes de leiteiro (Figura 09 A), não houve interação significativa entre os fatores para germinabilidade (Tabela 05), mas houve interação para comprimento de radícula. A inibição completa da germinação ocorreu na concentração de 75% do extrato aquoso. Na concentração de 25%, a germinabilidade média não diferiu da testemunha. Já, a concentração 50%, resultou em redução de 53,68% da germinabilidade em relação à testemunha e de 44,62% em relação à concentração de 25% (Tabela 05).

Com relação à alface (Figura 09 B), observou-se que na testemunha (água destilada) não houve diferença significativa para germinabilidade entre os períodos de avaliação. Na presença do extrato a 25%, a germinabilidade de alface foi menor do que 10% em todos os períodos avaliados. Nessa concentração de extrato, não houve diferenças de germinabilidade entre os diferentes períodos avaliados, com exceção do período 48 horas, em que não haviam ainda sementes germinadas (Tabela 06). Nesta concentração, houve redução de 97% na germinabilidade em relação à testemunha. Já, nas concentrações de 50% e acima houve total inibição da germinação das sementes de alface.

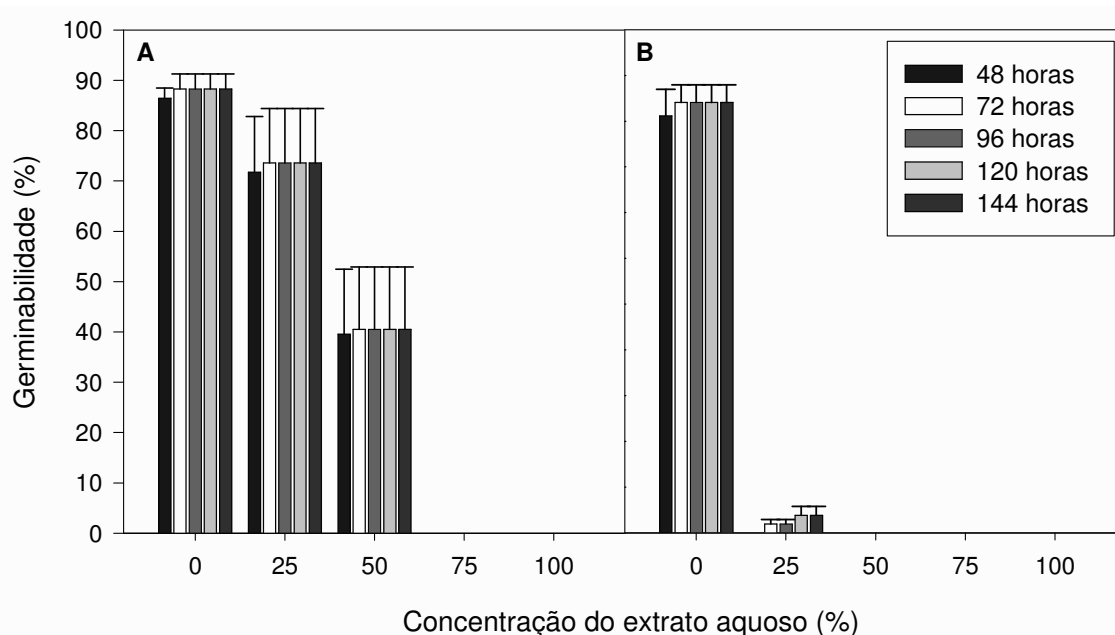


Figura 09 - Germinabilidade de sementes de leiteiro (A) e alface (B) sob o efeito de diferentes concentrações do extrato aquoso de *A. annua* L. UTFPR, Campus Pato Branco, 2008.

Tabela 05 - Germinabilidade de leiteiro sob o efeito de diferentes concentrações do extrato aquoso de *A. annua* L. UTFPR, Campus Pato Branco, 2008.

Concentração do extrato aquoso (%)	Período no Germinador					Médias*
	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas	
	Germinabilidade (%)					
0	86,42	88,26	88,26	88,26	88,26	87,89 a
25	71,76	73,06	73,06	73,06	73,06	72,80 a
50	39,58	40,50	40,50	40,50	40,50	40,31 b
75	00,00	00,00	00,00	00,00	00,00	00,00 c
100	00,00	00,00	00,00	00,00	00,00	00,00 c
CV (%)	15,04					

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 06 - Germinabilidade de alface sob o efeito de diferentes concentrações do extrato aquoso de *A. annua* L. UTFPR, Campus Pato Branco, 2008.

Concentração do extrato aquoso (%)	----- Período no Germinador -----				
	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
	Germinabilidade (%)*				
0	91,20 Aa	94,08 Aa	94,08 Aa	94,08 Aa	94,08 Aa
25	00,00 Bb	00,96 ABb	00,96 ABb	01,92 ABb	02,88 Ab
50	00,00 Ab	00,00 Ac	00,00 Ac	00,00 Ac	00,00 Ac
75	00,00 Ab	00,00 Ac	00,00 Ac	00,00 Ac	00,00 Ac
100	00,00 Ab	00,00 Ac	00,00 Ac	00,00 Ac	00,00 Ac
CV (%)	24,20				

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Segundo Ferreira & Borghetti (2004), freqüentemente, o efeito alelopático não ocorre através da redução da germinabilidade (percentual final de germinação), mas sobre a velocidade de germinação. Na concentração de 25%, para a alface, a velocidade média de germinação foi de 0,009 sementes hora⁻¹, menor do que a da testemunha (0,021 sementes hora⁻¹) e o tempo médio de germinação foi superior (112 horas) ao da testemunha (48,7 horas) (Tabela 07). Isso significa que o vigor dos aquênios de alface foi afetado e que a redução da velocidade média promoveu um aumento no número de horas para que ocorresse a germinação. Possivelmente, o aumento da germinabilidade de sementes de alface verificado a partir das 72 horas, no tratamento 25% (Tabela 06), deveu-se ao fenômeno de detoxificação, que ocorre durante a fase inicial do processo germinativo. Os processos de detoxificação incluem oxidação, conjugação de carboidratos, outras conjugações e incorporações de aleloquímicos em compartimentos de depósito (ex.: vacúolo) e sua excreção. Um importante passo na detoxificação é a formação de açúcares conjugados através da atividade de glicosil-transferases (INDERJIT & DUKE, 2003).

Para o leiteiro, o tempo médio de germinação nas concentrações de 0%, 25% e 50% do extrato aquoso foi de 48,5 horas, tendo uma velocidade média de germinação de 0,021 sementes hora⁻¹ (Tabela 07). Ou seja, a elevação da concentração de extratos até o limite de 50% não afetou a velocidade e o tempo de germinação. No entanto, concentrações acima da referida inibiram completamente a germinação do leiteiro (Tabela 07).

Tabela 07 - Tempo médio e velocidade média de germinação de alface e leiteiro sob o efeito de diferentes concentrações do extrato aquoso de *A. annua* L. UTFPR, Campus Pato Branco, 2008.

Concentração do extrato aquoso (%)	Alface		Leiteiro	
	t*	V**	t*	V**
0	48,70 b ¹	0,021 a	48,50 a	0,021 a
25	112,00 a	0,009 b	48,50 a	0,021 a
50	00,00 c	00,00 c	48,50 a	0,021 a
75	00,00 c	00,00 c	00,00 b	00,00 b
100	00,00 c	00,00 c	00,00 b	00,00 b

* O tempo médio de germinação foi expresso em horas;

** A velocidade média de germinação é expressa em sementes germinadas hora⁻¹

¹Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey (p<0,05).

Para a variável comprimento de radícula (CR), houve interação entre os fatores concentração de extrato e período de avaliação, tanto para a alface quanto para leiteiro, sendo realizadas somente regressões para as concentrações onde ocorreram germinação. Ocorreu crescimento radicular da alface com a utilização de 0% e 25% de extrato aquoso (Figura 10 A), nas quais se verificaram taxas de 0,27 mm hora⁻¹ e 0,02 mm hora⁻¹, respectivamente. Na concentração de 25% do extrato aquoso, o crescimento radicular foi reduzido em média 89% em relação à testemunha, ficando evidente o efeito alelopático de *A. annua* também sobre o crescimento radicular de alface. Redução no comprimento de radícula de alface foi observada por Hoffmann et al. (2007), usando extratos aquosos de *Nerium oleander* L. e *Dieffenbachia picta* Schott.

Já para o leiteiro, verificou-se crescimento radicular nos tratamentos com 0%, 25% e 50% de extrato aquoso (Figura 10 B), atingindo taxas de 1,06 mm hora⁻¹, 0,66 mm hora⁻¹ e 0,59 mm hora⁻¹, respectivamente. As reduções do crescimento radicular em relação à testemunha foram de 43% e 49%, respectivamente, nas concentrações de 50% e 25%.

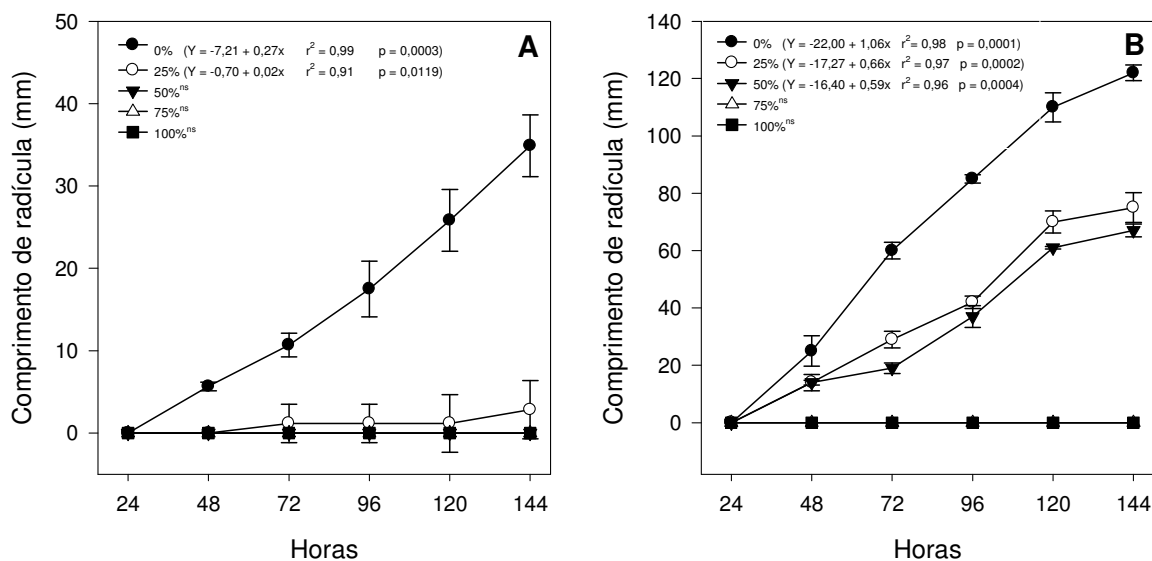


Figura 10 – Comprimento da raiz primária de alface (A) e leiteiro (B), nas concentrações 0, 25, 50, 75 e 100% em função das horas de avaliação. UTFPR, Campus Pato Branco, 2008.

Portanto, os resultados das variáveis germinabilidade, velocidade e tempo de germinação e comprimento de radícula, demonstram maior sensibilidade da alface às substâncias presentes nos extratos aquosos de *A. annua*, quando comparada ao leiteiro. Almeida et al. (2008) utilizando extratos de *Leonurus sibiricus* em sementes de *Lactuca sativa*, *Lepidium sativum* e *Raphanus sativus*, também observaram maior sensibilidade da alface às substâncias presentes nos extratos. Diferenças de sensibilidade entre espécies alvo são comuns em trabalhos verificando alelopatia (DELACHIAVE et al., 1999; HOFFMANN et al., 2007; ALMEIDA et al., 2008). O fato dos mecanismos de absorção, translocação e o local de ação de substâncias variarem entre espécies alvo distintas explicam as diferenças de seletividade entre as espécies testadas no presente experimento.

Verificou-se que as raízes primárias das plântulas de alface e de leiteiro do tratamento testemunha apresentaram desenvolvimento normal. Já nas demais concentrações, anomalias nas plântulas de alface foram evidentes, sendo que as raízes primárias apresentaram-se danificadas, ocorrendo deformação do hipocótilo (aumento ou diminuição do diâmetro) e desenvolvimento de pêlos radiculares atrofiados e de tamanho desproporcional em relação às outras estruturas da planta, além da oxidação da coifa. No tratamento com 25% de concentração do extrato aquoso para leiteiro, as anomalias nas plântulas foram: raízes primárias danificadas, ocorrendo deformação do hipocótilo e desenvolvimento de pêlos

radiculares atrofiados ou ausentes. No tratamento com 50% de concentração, as anomalias foram às mesmas apresentadas na concentração de 25%, acrescidas da não formação de folhas primordiais.

Desta forma, como observado por Hoffmann et al. (2007), neste trabalho também constatou-se que o sistema radicular das plantas é o mais sensível à ação de aleloquímicos, porque o seu alongamento depende da divisão celular que, se inibida, compromete o seu desenvolvimento normal. Muitos aleloquímicos inibem o crescimento das plantas e seu desenvolvimento por afetarem diretamente a divisão celular (HESS, 1987).

Não foi verificada influência das distintas concentrações de extratos no peso de matéria seca total das plântulas de alface e leiteiro, sendo as médias de 0,021 g e 0,19 g por 25 sementes, respectivamente. As avaliações foram realizadas até 144 horas após a semeadura, e avaliou-se apenas o início do processo de alongamento, onde não há acúmulo de matéria seca.

Delachiave et al. (1999) relataram que o extrato aquoso de *A. absinthium*, que é uma planta do mesmo gênero da *A. annua*, apresentou efeito sobre a germinação de pepino e tomate. Cruz et al. (2002) também observaram reduções da germinação de *B. pilosa* quando aplicaram extrato bruto aquoso de *A. absinthium*. Dudai et al. (1999) reportam inibição da germinação de trigo por *A. arborescens*, *A. judaica* (cultivars Israeli e Sinai).

Como a maioria das espécies da família Asteraceae, *A. annua* também produz lactonas sesquiterpênicas, principalmente a artemisinina. Esta lactona sesquiterpênica apresentou atividade herbicida em trabalhos desenvolvidos por Duke et al. (1987), Chen & Leather (1990), Bagchi et al. (1997a) e Dayan et al. (1999). Bagchi et al. (1997a) testaram artemisinina e dois de seus precursores, o ácido artemisinínico e arteanuina B, mais o derivado semi-sintético arteéter, em diversas espécies de mono e dicotiledôneas (*Hordeum vulgare*, *Secale cereale*, *Amaranthus blitum*, *A. annua*, *L. sativa*, *Portulaca oleracea* e *Raphanus sativus*). O derivado semi-sintético arteéter foi a molécula mais efetiva na inibição do desenvolvimento das plântulas. A artemisinina apresentou menos atividade na maioria das plantas testadas, apresentando-se mais tóxica a espécies monocotiledôneas, enquanto que o arteéter apresentou-se mais tóxico em sementes de dicotiledôneas.

Duke et al. (1987) estudaram a atividade alelopática da artemisinina em *Ipomoea lacunosa*, *A. annua* e *L. sativa*, e, nesta última espécie, observaram menor condensação dos cromossomos durante a mitose, sendo este processo similar a ação do herbicida cinmetilina. Dayan et al. (1999) verificaram inibição do crescimento radicular de sementes de alface e azevém (*Lolium multiflorum*) provocada pelos sesquiterpenos artemisinina, dihidroartemisinina e arteéter. A artemisinina reduziu a mitose em células do meristema apical de raízes de cebola e afetou diretamente a divisão celular das sementes alvo de alface e azevém. Foi observada a produção de fases mitóticas aberrantes, onde os cromossomos, apesar de bem definidos, não estavam corretamente arranjados dentro das células.

Neste trabalho, concluiu-se que o extrato aquoso bruto de plantas de *A. annua*, cultivar Artemis, apresentou efeito alelopático sobre a germinação e o crescimento radicular de plântulas de alface e leiteiro, não sendo constatado neste estudo qual foi o composto responsável pela ação alelopática, visto que o extrato utilizado não foi analisado sob o ponto de vista de composição química. Estudos posteriores devem ser conduzidos para determinar o composto ou compostos responsáveis pela ação alelopática. Além disso, constatou-se que alface apresenta-se mais sensível ao efeito alelopático do extrato aquoso de *A. annua* do que o leiteiro.

7 CONCLUSÕES

No experimento realizado a campo, o número de ciclos fotoindutivos encontrado para a cultivar Artemis de *A. annua* foi de aproximadamente 36 ciclos ou 5 semanas e o fotoperíodo crítico aproximado foi de 13 horas, que ocorreu em 09/02/2007, em Pato Branco-PR. Esse resultado determina que a época de colheita para a cultivar Artemis, na região de Pato Branco-PR, será na segunda quinzena do mês de março.

O maior rendimento de biomassa nesse experimento ocorreu no plantio de 27/07/2007, 231 dias após o plantio, mas recomenda-se tomar cuidado com as geadas que podem ocorrer até a primeira quinzena de setembro. Estes dados demonstram que quanto maior a permanência das plantas no campo, ou seja, maior intervalo de tempo entre as épocas de plantio e de colheita (dependente do fotoperíodo crítico), maior será a produção de MS de folhas.

O maior teor de artemisinina foi obtido nas épocas que mais vegetaram a campo (4^a, 5^a e 6^a) e conseqüentemente os maiores rendimentos de artemisinina ha⁻¹, devido à maior produção de biomassa. Estes dados comprovam que o teor de artemisinina se dá em função da ontogenia.

Extratos aquosos de *A. annua* apresentaram ação alelopática inibitória sobre a germinação de sementes e o desenvolvimento de plântulas de alface e leiteiro. Sementes de alface se mostraram-se mais sensíveis à ação dos extratos.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de ser determinada como a melhor época de plantio 27/07/2007, recomenda-se tomar cuidado com as geadas que podem ocorrer até o final da primeira quinzena de setembro, sugerindo-se optar pelo plantio na segunda quinzena de setembro, período livre de geadas na região.

Quanto aos estudos de extratos aquosos de *A. annua*, sugere-se na área de bioprospecção, o fracionamento do extrato, testando-se as frações em separado para indicar qual ou quais componentes do extrato estão atuando na ação alelopática. E, se *A. annua* fizer parte do sistema de sucessão de culturas, deve-se desenvolver pesquisas com extrato fresco, semi decomposto e decomposto, já que em experimentos posteriores, *A. annua* demonstrou efeito alelopático sob a germinação e o desenvolvimento de alface e leiteiro.

REFERÊNCIAS

- ABDIN, M. Z. et al. 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.
- ALECRIM, M. das G. C. et al. Tratamento de crianças com malária pelo *Plasmodium falciparum* com derivados de artemisinina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, p.223-226, 2003.
- ALLEN, P. C.; LYDON, J.; DANFORTH, H. D. Effects of components of *Artemisia annua* on coccidia infections in chickens. **Poultry Science**. v.76, p.1156-1163, 1997.
- ALMEIDA, L.F. R. de et al. In vitro allelopathic potential of *Leonurus sibiricus* L. leaves. **Journal of Plant Interactions**, v.3, n.1, p. 39-48, 2008.
- BAGCHI, G. D.; JAIN, D. C.; KUMAR, P. O. Arteether: a potent plant growth inhibitor from *Artemisia annua*. **Phytochemistry**, v.45, n.6, p.1131-1133, 1997a.
- BAGCHI, G. D. et al. Effect of the date on growth and development of *Artemisia annua* under subtropical climatic conditions. **Planta Med.**, v.5, p.445-446, 1997b.
- BAGCHI, G. D. et al. Essential oil constituents of *Artemisia annua* during different growth periods at monsoon conditions of subtropical north Indian plains. **J. Essenti. Oil. Res.**, v.15, p.248-250, 2003.
- BRASIL. **Regras para análise de sementes**. SNDA/DNDV/CLAV, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, Brasília, 1992. 365p.
- BLOLAND, P. B. Drug resistance in malaria. **Malaria Epidemiology Branch Centers for Disease Control and Prevention**. Chamblee, GA, USA, 2001.
- CHAN, K. L. et al. Selection of high artemisinin yielding *Artemisia annua*. **Planta Med.**, v.61, p.285-287, 1995.
- 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.
- CHARLES, D. J. et al. 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.
- CHARLES, D.J. et al. **Effect of water stress and post-harvest handling on artemisinin content in the leaves of *Artemisia annua* L.** IN: Proceedings of the

Second National Symposium: New crops, exploration, research and commercialization. Indiana, USA, p.640-643, 1993.

CRUZ, M. E. S. et al. Efeito alelopático de *Cymbopogon citratus* e *Artemisia absinthium* sobre sementes de *Bidens pilosa*. **Acta Horticulturae**, v.569, p.229-233, 2002.

DAYAN, F. E. et al. 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. 169 f. Tese (Doutorado) - Universite de Lausanne, França, 1997.

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.

DELABAYS, N.; SLACANIN, I.; BOHREN, C. Herbicidal potential of artemisinin and allelopathic properties of *Artemisia annua* L.: from the laboratory to the field. **Journal of Plant Diseases and Protection**. v. Special Issue: 21, p.317-322, 2008.

DELACHIAVE, M. E. AP.; RODRIGUES, J. D.; ONO, E. O. Efeitos alelopáticos de losna (*Artemisia absinthium* L.) na germinação de sementes de pepino, milho, feijão e tomate. **Revista Brasileira de Sementes**, v.21, n.2, p.265-269, 1999.

DUDAI, N. et al. Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. **Journal of Chemical Ecology**, v.25, n.5, p.1079-1089. 1999.

DUKE, S.O. et al. Artemisinin, a constituent of annual wormwood (*Artemisia annua*), is a selective phytotoxin. **Weed Science**, v.35, p.499-505, 1987.

DUKE, M. V. et al. Localization of Artemisinin and Artemisitene in Foliar Tissues of Glanded and Glandless Biotypes of *Artemisia annua* L. **Int. J Plant Sci.**, v.155, n.3, p.365, 1994.

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.

EFFERTH T. et al. The antiviral activities of artemisinin and artesunate. **Clinical infectious diseases**. v.47, n.6, p.804-811, 2008.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema brasileiro de classificação de solos. Brasília, 1999. 412p.

ENSERINK, M. Source of new hope against malaria is in short supply. **Science**, v.307, p.33, 2005.

FERREIRA, J. F. S. **Production and detection of Artemisinin in *Artemisia annua* L.** 1994. mmm f. Tese (Doutorado) - Purdue University, Purdue, EUA, 1994.

FERREIRA, J. F. S. et al. A comparison of gas chromatography and high performance liquid chromatography for artemisinin analyses. **Phytochem. Analysis**. v.5, p.116-120, 1994.

FERREIRA, J. F. S. Nutrient Deficiency in the Production of Artemisinin, Dihydroartemisinic Acid, and Artemisinic Acid in *Artemisia annua* L. **J. Agric. Food Chem.** v.55, p.1686-1694, 2007.

FERREIRA, A. G.; BORGUETTI, F. **Germinação do básico ao aplicado.** Porto Alegre: ARTMED, 2004. 323 p.

FERREIRA, J. F. S.; SIMON, J. E.; JANICK, J. Developmental studies of *Artemisia annua*: flowering and artemisinin production under greenhouse and field conditions. **Planta Medica**, v.61, p.351-371, 1995.

FERREIRA, J. F. S.; JANICK, J. Distribution of artemisinin in *Artemisia annua*. In: JANICK, J. (Ed.). **Progress in new crops**. Arlington: ASHS Press, p.579-584, 1996.

FERREIRA, J. F. S. et al. 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.

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, Campinas, Brasil, **Resumos**, p.69-70, 1997.

FIGUEIRA, G. M. Nutrição Mineral, produção e concentração de artemisinina em *Artemisia annua*. **Plantas Mediciniais Aromáticas e Condimentares: Avanços na Pesquisa Agrônômica (Volume I)**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 1998.

GALAMBOSI, B. Results of cultivation of some wildflower medicinal plants in the "szilasmenti" cooperative. **Acta Hort.**, v.96, p.343-352, 1980.

GATTI, A. B.; PEREZ, S. C. J. G. A.; LIMA, M. I. S. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasilica**, v.18, p.459-472, 2004.

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.

GUPTA, S. K. et al. Morphogenetic variation for artemisinin and volatile oil in *Artemisia annua*. **Industrial Crops and Products**, v.16, p.217-224, 2002.

HAIDER, F. et al. 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.

HESS, F. D. Herbicide effects on the cell cycle of meristematic plant cells. **Reviews of Weed Science**, v.3, p.183-203, 1987.

HOFFMANN, C. E. F. et al. Atividade alelopática de *Nerium Oleander* L. e *Dieffenbachia picta* Schott em sementes de *Lactuca Sativa* L. e *Bidens pilosa* L. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.6, n.1, p.11-21, 2007.

INDERJIT; DUKE, O.S. Ecophysiological aspects of allelopathy. **Planta**, v.217, n.4, p. 529-539, 2003.

JAIN, D. C. et al. Isolation of high artemisinin-yielding clones of *Artemisia annua*. **Phytochemistry**, v.43, n.5, p.993-1001, 1996.

JÚNIOR, J. B. da S. Vigilância em saúde: Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2006. **Ministério da Saúde**, Brasília-DF, 2006.

KAKKILAYA, B. S. Malaria Site: all about malaria. Disponível em: <<http://www.malariasite.com>>. Acesso em: 15 de Jul. 2006.

KAPOOR, R.; CHAUDHARY, V.; BHATNAGAR, A. K. Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on artemisinin concentration in *Artemisia annua*. **Mycorrhiza**. v.17, p.581-587, 2007.

KIM, J.T. et al. In vitro antiprotozoal effects of artemisinin on *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v.103, p.53-63, 2002.

KUMAR, S. et al. High yields of artemisinin by multi-harvest of *Artemisia annua* crops. **Industrial Crops and Products**, v.19, p.77-90, 2004.

LABOURIAU, L. G.; VALADARES, M. B. On the germination of seeds of *Calotropis procera*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.48, p.263-284, 1976.

LAI, H.; SINGH, N. P. Oral artemisinin prevents and delays the development of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced breast cancer in rat. **Cancer Letters**, v.231, p.43-48, 2006.

LAUGHLIN, J. C. Effect of agronomic practices on plant yield and antimalarial constituents of *Artemisia annua* L. **Acta Hort.**, 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 Hort.**, v.390, p.67-73, 1995.

LIERSCH, R. et al. Formation of artemisinin in *Artemisia annua* during one vegetation period. **Planta Med.**, v.52, p.387-390, 1986.

LIU, C. H. et al. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**, v.88, n.3, p.277-282, 2001.

MAGALHÃES, P.M. **Seleção, melhoramento e nutrição da *Artemisia annua* L., para cultivo em região intertropical.** 1996. 117 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 1996.

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.

MARCHESE, J. A. **Produção e detecção de artemisinina em plantas de *Artemisia annua* L. submetidas a estresses abióticos.** 1999. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

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. et al. Flowering in plants of *Artemisia annua* L. standed to diferent conditions of photoperiod and temperature. **Acta Horticulturae.** v. 569, p. 275-280, 2002.

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. et al. Carbon isotope composition and leaf anatomy as a tool to characterize the photosynthetic mechanism of *Artemisia annua* L. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.17, p.187-190, 2005.

MARCHESE, J.A. **Caracterização do mecanismo fotossintético e aspectos relacionados à floração de *Artemisia annua* L..** 2006a. 68 f. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

MARCHESE, J.A. **Conteúdo de artemisinina e produção de biomassa em plantas de *Artemisia annua* L. pulverizadas com os ativadores da defesa química Acibenzolar-S-metil e proteína Harpin.** 2006b. 24p. Relatório técnico final (bolsa CNPq/SWE - processo nº 20.0364/2004-9) - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasília.

MORALES, M. R., CHARLES, D. J., SIMON, J. E. Seasonal accumulation of artemisinin in *Artemisia annua* L. **Acta Hort.**, v.344, p.416-420, 1993.

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.

OPS – ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Informe de la situación de los programas de malaria em las Américas. 26 Conferencia Sanitaria Panamericana. Washington - EUA, 2002.

POSNER, G. H. et al. Antimalarial, antiproliferative, and antitumor activities of artemisinin-derived, chemically robust, trioxane dimers. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.42, n.21, p.4275-4280, 1999.

PRAS, N. et al. Laboratory selection of *Artemisia annua* L. for high artemisinin yielding types. **Phytochem. Anal.**, v.2, p.80-83, 1991.

QUITÉRIO, G. C. M. **Produção de artemisinina por *Artemisia annua* L. sob influência de micorriza arbuscular.** 2006. 48f. Dissertação (Mestrado), IAC – Instituto Agrônomo, Campinas-SP, 2006.

RÄTH, K. et al. Pharmacokinetic study of artemisinin after oral intake of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (annual wormwood). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.70, n.2, p.128-132, 2004.

SALCEDO, J. M. V. et al. Avaliação da eficácia do artesunato associado à tetraciclina na terapêutica da malária falciparum. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.30, p.215-222, 1997.

SCHIMIDT, T.J. Toxic activities of sesquiterpene lactones: structural and biochemical aspects. **Current Organic Chemistry**, v.3, n.3, p. 577-608, 1999.

SHARMA, P.; LALIT, M.; SRIVASTAVA, C. N. Growth Inhibitory Nature of Artemisia annua Extract against Culex quinquefasciatus (Say). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v.9, n.4, p.389-395, 2006.

SHEKARI, M. et al. Effects of Artemisia annua L. (Asteracea) on nutritional physiology and enzyme activities of elm leaf beetle, Xanthogaleruca luteola Mull. (Coleoptera: Chrysomellidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.91, n.1, p.66-74, 2008.

SINGH, N. P.; LAI, H. C. Artemisinin induces apoptosis in human cancer cells. **Anticancer Research**, v.24, n.4, p.2277-2280, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

ÚLTIMO SEGUNDO. Disponível em:
http://ultimosegundo.ig.com.br/brasil/2008/04/17/brasil_lanca_novo_remedio_mais_barato_para_malaria_1276626.html. Cultivar em: 01/05/2008.

WALLAART, T. E. et al. 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. et al. Studies on effects of *fpf1* gene on *Artemisia annua* flowering time and on the linkage between flowering and artemisinin biosynthesis. **Planta Med.**, v.70, p.347-352, 2004.

WEATHERS, P. J.; ELKHOLY, S.; WOBBE, K. K. Invited Review: Artemisinin: The biosynthetic pathway and its regulation in *Artemisia annua*, a terpenoid-rich species. **In Vitro Cell. Dev. Biol.** v.42, p.309-317, jul/ago, 2006.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2005**. Geneva: WHO, 2005. 294p.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the treatment of malaria**. Alemanha: WHO, 2006. 266p.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2008**. Alemanha: WHO, 2008. 215p.

WOERDENBAG, J. H. et al. Analysis of artemisinin and related sesquiterpenoids from *Artemisia annua* L. by combined gas chromatography/mass spectrometry. **Phytochem. Anal.**, v.2, p.215-219, 1991.

YANG, D. M.; LIEW, F. Y. Effects of qinghaosu (artemisinin) and its derivatives on experimental cutaneous leishmaniasis. **Parasitology**, v.106, p.7-11, 1993.

ZHANG, Y.S. et al. 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.

ZHANG, L.; YE, HE-CHUN; LI, GUO-FENG. Effect of Development stage on the artemisinin content and the sequence characterized amplified region (SCAR) marker of high-artemisinin yielding strains of *Artemisia annua*. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.48, n.9, p.1054-1062, 2006.