

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

SILVIA LETICIA ZANMARIA

**MELHORAMENTO DE *Artemisia annua* L.: INDUÇÃO DE
POLIPLOIDIA, EXPRESSÃO GÊNICA E SELEÇÃO DE
GENÓTIPOS DE ALTO RENDIMENTO**

TESE

PATO BRANCO

2016

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

SILVIA LETICIA ZANMARIA

**MELHORAMENTO DE *Artemisia annua* L.: INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA
EXPRESSÃO GÊNICA E SELEÇÃO DE GENÓTIPOS
DE ALTO RENDIMENTO**

TESE

PATO BRANCO

2016

SILVIA LETICIA ZANMARIA

**MELHORAMENTO DE *Artemisia annua* L.: INDUÇÃO DE
POLIPLOIDIA, EXPRESSÃO GÊNICA E SELEÇÃO DE
GENÓTIPOS DE ALTO RENDIMENTO**

Tese 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 Doutor em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. José Abramo Marchese

Coorientadora: Profa. Dra. Taciane Finatto

PATO BRANCO

2016

Z31m Zanmaria, Silvia Leticia.
 Melhoramento de *Artemisia annua* L.: indução de poliploidia, expressão
 gênica e seleção de genótipos de alto rendimento / Silvia Leticia Zanmaria.
 – 2016.
 115 f. : il. ; 30 cm.

 Orientador: Prof. Dr. José Abramo Marchese
 Coorientadora: Profa. Dra. Taciane Finatto
 Tese (Doutorado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
 Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, PR, 2016.
 Bibliografia: f. 99 – 110.

 1. Artemisia. 2. Melhoramento de cultivos agrícolas. 3. Melhoramento
 genético. I. Marchese, José Abramo, orient. II. Finatto, Taciane, coorient. III.
 Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação
 em Agronomia. IV. Título.

CDD (22. ed.) 630



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



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Tese

MELHORAMENTO DE *Artemisia annua* L.: INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA, EXPRESSÃO GÊNICA E SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE ALTO RENDIMENTO

por

SILVIA LETICIA ZANMARIA

Tese apresentada às 14:00 horas do dia 05 de setembro de 2016 como requisito parcial para obtenção do título de DOUTORA EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Sistemas de Produção Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Câmpus* Pato Branco. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos membros abaixo designados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Taciane Finatto
UTFPR
Coorientadora

Prof. Dr. Giovani Benin
UTFPR

Prof. Dra. Janaina Dartora
IAPAR

Prof. Dr. José Abramo Marchese
UTFPR
Orientador

Prof. Dr. Giovani Benin
Coordenador do PPGA

A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa.

Dedico este trabalho àqueles que de alguma forma contribuem para a melhoria das condições de vida das pessoas, do ambiente em que vivemos e preocupam-se em deixar ao próximo um mundo sustentável e melhor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e à espiritualidade, pela orientação e pela oportunidade da evolução.

À minha família, por participar com seu carinho, paciência e amor não só no período de execução deste trabalho, mas pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Ao meu parceiro, amigo e amor Diego, por participar ativamente em todas as etapas desse processo, com paciência, amor e positividade.

Ao orientador Dr. José Abramo Marchese e coorientadora Dra. Taciane Finatto pela orientação, contribuição e aprendizado ao longo da realização deste trabalho.

À Professora Dra. Sandra Patussi Brammer pela participação na Banca do Exame de Qualificação.

Ao professor Dr. Giovani Benin, pela sua contribuição e participação nas Bancas do Exame de Qualificação e Defesa da Tese.

À Dra. Janaína Dartora pela sua colaboração e participação na Banca de Defesa da Tese.

Aos meus colegas de doutorado, bolsistas de iniciação científica, graduação e ensino médio, pela parceria, cooperação e construção conjunta de conhecimentos.

Ao Instituto Federal do Paraná - IFPR, Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, à Universidade de Campinas – UNICAMP, à CAPES e CNPq, todas entidades colaboradoras e envolvidas no processo de execução do presente trabalho.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma estiveram presentes e participaram deste processo, que nada mais é do que um passo na caminhada que deve seguir sempre.

Que eu jamais me esqueça de que Deus me ama infinitamente, que um pequeno grão de alegria e esperança dentro de cada um é capaz de mudar e transformar qualquer coisa, pois...

A vida é construída nos sonhos e concretizada no amor.

Chico Xavier

RESUMO

ZANMARIA, Silvia Leticia. Melhoramento de *Artemisia annua* L.: indução de poliploidia, expressão gênica e seleção de genótipos de alto rendimento. 134f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2016.

Artemisia annua L. é uma espécie vegetal herbácea nativa da Ásia que possui folhas aromáticas que contém artemisinina, uma lactona sesquiterpênica que tem demonstrado eficácia contra doenças como câncer e malária. Para atender a demanda pela molécula, técnicas de manejo e melhoramento genético podem ser utilizadas para obtenção de genótipos superiores. Os objetivos deste estudo foram: obter genótipos de *A. annua* de alto rendimento de artemisinina e biomassa por meio da indução de poliploidia utilizando colchicina; analisar a expressão de genes relacionados com as vias de biossíntese em artemisinina em plantas sob diferentes níveis nutricionais; realizar um ensaio a campo visando identificar genótipos de alto rendimento para artemisinina e biomassa. A indução de poliploidia foi realizada em sementes de *A. annua* e na cultivar Artemis (F2) com solução de colchicina 1% nas doses de 0%, 0,05%, 0,1%, 0,15% e 0,2% durante 0, 6, 12, 18, 24 e 30 horas, totalizando 25 tratamentos. Para análise da expressão gênica foi utilizada a técnica de RT-PCR semiquantitativa onde os genótipos B23, B24, C23, C32 foram submetidos, em casa de vegetação, a diferentes doses de solução nutritiva, sendo utilizados 25%, 50% e 100% da dose completa (solução de Hoagland), com 3 repetições em delineamento inteiramente casualizado. Para o ensaio a campo, os mesmos genótipos e a cultivar Artemis (F2) foram analisados em delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições. Foram realizadas, em todos os experimentos, avaliações agrônômicas, fisiológicas e fitoquímicas. Foi constatado efeito da colchicina no teor de artemisinina, sendo o valor máximo 0,60% para a dose de 0,10% sendo que não foi possível afirmar se houve poliploidização. Na avaliação da produção de metabólitos secundários e a expressão dos genes de enzimas envolvidas na síntese de artemisinina dos genótipos de *A. annua* submetidos a diferentes níveis de nutrição observou-se que a aplicação de doses crescentes de solução nutritiva para plantas de *A. annua* possibilita incremento linear para produção de biomassa, com relação contrária na produção de artemisinina. Genótipos submetidos à níveis nutrição de 50% apresentam melhor relação para a produção de biomassa e artemisinina e óleo essencial. Os genes ADS1 e CYP71AV aumentam a transcrição em plantas submetidas a níveis de 50% de solução nutritiva. No experimento de seleção de genótipos superiores a campo, foi possível observar que a variedade Artemis (F2) apresentou melhor desempenho em produtividade de biomassa e óleo essencial que os demais genótipos. A maior produção de biomassa para Artemis (F2) justifica o maior rendimento de óleo essencial. Essa variedade possui arquitetura de planta diferenciada das demais, apresentando maior estatura e maior adensamento entre ramos.

Palavras – chave: artemisinina, poliploidização, seleção artificial.

ABSTRACT

ZANMARIA, Silvia Leticia. Improvement in *Artemisia annua* L.: inducing polyploidy, selection of high-yield genotypes and genic expression. 134 p. Thesis Project (Doctor in Agronomy) – Post Graduation in Agronomy Program (Concentration Area: Plant Production), Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, 2015.

Artemisia annua L. is a native herbaceous plant species from Asia that has aromatic leaves containing artemisinin, a sesquiterpene lactone that has shown efficacy against diseases such as cancer and malaria. To meet the demand for the molecule, management techniques and genetic improvement can be used to obtain superior genotypes. The objectives of this study were: to obtain *A. annua* genotypes with high yield of artemisinin and biomass by inducing polyploidy using colchicine; to analyze the genes expression related to artemisin biosynthesis pathways in plants under different nutritional levels; to perform a field assay to identify high yield genotypes for artemisinin and biomass. The polyploidy induction was tested in *A. annua* seeds and Artemis F2 variety with colchicine solution in 1% on doses of 0%, 0.05%, 0.1%, 0.15% and 0.2% for 0, 6, 12, 18, 24 and 30 hours, totaling 25 treatments. For gene expression analysis, a semi-quantitative RT-PCR technique was used, where the B23, B24, C23, C32 genotypes were submitted to different doses of nutrient solution in a greenhouse, using 25%, 50% and 100% of the complete dose (Hoagland's solution), with 3 replicates in a completely randomized design. To the field assay the same genotypes and variety Artemis F2 were tested in randomized block design with four replications. Agronomic, physiological and phytochemical evaluations were performed in all experiments. It has been found colchicine effect on artemisinin content, with maximum 0.60% for 0.10% dose, and it was not possible to confirm if polyploidization occurred. In the assessment of the production of secondary metabolites and the genes expression of enzymes involved in the synthesis of artemisinin from *A. annua* genotypes submitted to different levels of nutrition, it was observed the application of increasing doses of nutrient solution to *A. annua* plants allows linear increase for the production of biomass, with a contrary relation in the artemisinin production. Genotypes submitted to nutrition levels of 50% present better relation for the production of biomass, artemisinin and essential oil. The genes ADS1 and CYP71AV increase transcription in plants submitted to 50% levels of nutrient solution. These enzymes are directly involved in the artemisinin biosynthesis pathway. In the experiment of selecting superior genotypes, it was observed the variety Artemis F2 showed better performance in productivity of biomass and essential oil than other genotypes. The increased production of biomass for Artemis F2 justifies the higher oil yield. This variety has a differentiated plant architecture from the others, with greater height and greater density of branches.

Keywords: artemisinin, polyploidization, artificial selection.

LISTA DE SIGLAS DE ACRÔNIMOS

ADS1	<i>Amorpha-4,11Diene Synthase</i>
ANAMED	Ação para a Medicina Natural nos Trópicos
ANSM	Agência Francesa de Segurança de Medicamentos e Produtos de Saúde
ART	Artemisinina
ASMQ	Artesunato + Mefloquina
ASS	Artemisinina semissintética
CC	Capacidade de campo
CIA	Clorofórmio-álcool isoamílico
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Cond	Condutância estomática
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
CTAB	Cethyltrimethylammonium bromide
CV (%)	Coeficiente de Variação
CYP71AV1	<i>Citocromo P450 mono-oxigenase</i>
DDT	Diclorofeniltricloroetano
DEPC	Diethylpirocarbonato
Di	Diâmetro da seção inferior do dossel
Dm	Diâmetro da seção média do dossel
DnDi	Drugs for neglected Diseases initiative
Ds	Diâmetro da seção superior do dossel
DXR2	<i>1-Deoxy-DXylulose 5-phosphate Reductoisomerase 2</i>
F/C	Relação folha-caule
FarMANGUINHOS	Instituto de Tecnologia em Fármacos
FDP	Farnesil difosfato
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GL	Graus de Liberdade
Hd	Altura de Dossel

HDR	<i>Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase</i>
HMGR1	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase
HPLC	High performance liquid chromatography,
Ht	Altura de planta
IPP	Isopentenil-difosfato
MEP	Metil-etritritol Fosfato
MMLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MSC	Massa seca de caule
MSF	Massa seca de folha
MSPA	Massa seca da parte aérea
MST	Massa Seca Total
MVA	Ácido Mevalônico
NPK	Nitrogênio-Fósforo-Potássio
NR	Número de Ramificações
OE	Óleo Essencial
Opas	Organização Pan-Americana da Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDC	Planta de dias curtos
PDI	Planta de dias intermediários
PHOTO	Taxa de assimilação de CO ₂
QM	Quadrado Médio
QTLs	Locos Quantitativos Controladores de Caracteres
RART	Rendimento de artemisinina
SUS	Sistema Único de Saúde
TCA	Terapia Combinada de Artemisinina
Tr	Taxa de transpiração
UNICAMP	Universidade de Campinas
UNICAMP	Universidade de Campinas
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
Vd	Volume de dossel
WHO	World Health Organization
WUE	Eficiência no uso de água

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – A) Variedade Artemis em F2 (Mediplant – Suíça); B) Genótipo B24 variedade 2/39x5x3M – CPQBA/Campinas). Ambos genótipos cultivados na área experimental da UTFPR – Pato Branco.	6
Figura 2 – A) Folha de <i>A. annua</i> ; B, C e D) Inflorescências de <i>A. annua</i> cultivadas e coletadas na área experimental da UTFPR – Pato Branco.	2
Figura 3 – Estruturas químicas da artemisinina e análogos.	7
Figura 4 – Vias metabólicas independentes de produção de IPP	8
Figura 5 – A Rota específica da artemisinina, a partir da síntese de IPP.	9
Figura 6 – Processo de Síntese semissintética da artemisinina.	11
Figura 7 - Síntese da artemisinina em fluxo contínuo.	12
Figura 8 - Processo otimizado para síntese da artemisinina em fluxo contínuo.	13
Figura 9 - Substâncias semissintéticas produzidas a partir dos antimaláricos naturais quinina e artemisinina.	14
Figura 10: Regiões mais afetadas por casos de malária no mundo destacadas em vermelho.	15
Figura 11 – Perspectiva de produção e preço da artemisinina no período de 2014-2016.	19
Figura 12 - Identificação de QTLs para identificação de caracteres-chave.	26
Figura 13 – Estabelecimento e condução do experimento de indução de poliploidia.	
Figura 14 – Tamanho de plantas de <i>A. annua</i> tratadas com diferentes doses de colchicina.	40
Figura 15 – Imagens dos estômatos de plantas de <i>A. annua</i> face abaxial, tratadas com doses de colchicina.	43
Figura 16 – Imagens dos estômatos de plantas de <i>A. annua</i> face adaxial, tratadas com doses de colchicina.	44

Figura 17 - Teores de artemisinina (%) em relação ao tratamento de sementes de <i>A. annua</i> com diferentes doses de colchicina (%).	47
Figura 18 – Teor de óleo essencial (%), obtido por plantas de <i>A. annua</i> tratadas com diferentes doses de colchicina (%) e submetidas a diferentes tempos de exposição (horas).	49
Figura 19 – Processo de colheita e separação das amostras de <i>A. annua</i> para avaliações fitoquímicas.	57
Figura 20 – Processo de preparação dos extratos para determinação do teor de artemisinina.	60
Figura 21 – Processo de extração de RNA de amostras de <i>A. annua</i>	62
Figura 22 - Teores de massa seca de caule (MSC), massa seca de folhas (MSF) e Massa Seca Total (MST) considerando diferentes doses de solução nutritiva.	68
Figura 23 – Teor de óleo essencial de genótipos de <i>A. annua</i> submetidos a diferentes doses de solução nutritiva.	69
Figura 24 – Rendimento de Artemisinina e Teor de Artemisinina baseados em três doses de solução nutritiva.	70
Figura 25 - Géis de agarose 2% visualizados sob luz ultravioleta contendo as sequências de bandas geradas a partir do produto da PCR com os primers alvo.	72
Figura 26 – Experimento instalado a campo na unidade experimental da UTFPR – Pato Branco, com quatro genótipos (C23, C32, B23 e B24) e uma variedade Artemis F2 de <i>A. annua</i> L.	80
Figura 27 – Secagem de amostras de <i>A. annua</i> armazenadas em sacos de papel e acondicionadas em secador de ar forçado à temperatura de 35°C.	82
Figura 28 – Mensurações dos parâmetros fisiológicos com o aparelho IRGA 6400xT em quatro genótipos e uma variedade de <i>A. annua</i> cultivadas em campo na Unidade Experimental da UTFPR – Pato Branco.	83
Figura 29 – Processo de extração de óleo essencial de <i>A. annua</i> em laboratório. ...	84

Figura 30 – Dendrograma de dissimilaridade genética com agrupamento pelo método UPGMA mostrando as relações genéticas entre os quatro genótipos e uma variedade de *A. annua* L. cultivados em campo considerando as características agronômicas e fitoquímicas avaliadas.....92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações biológicas de enzimas envolvidas na biossíntese de artemisinina.	10
Tabela 2 – Taxa de sobrevivência das plantas de <i>A. annua</i> tratadas com diferentes doses de colchicina e diferentes tempos de exposição.	38
Tabela 3 – Médias e desvio padrão do número, largura e comprimento de estômatos da face abaxial e adaxial de folhas de <i>A. annua</i> L., considerando os tratamentos de dose de colchicina e tempos de exposição.	42
Tabela 4 – Média e desvio padrão de altura de plantas (Ht), altura de dossel (Hd), volume de dossel (Vd), número de ramos (NR), massa seca de folhas (MSF), massa seca de caule (MSC) e relação folha/caule (F/C) em plantas de <i>A. annua</i> , considerando os tratamentos de dose de colchicina e tempos de exposição.	45
Tabela 5 – Média e desvio padrão dos parâmetros fisiológicos WUE: eficiência no uso de água; PHOTO: taxa de assimilação de CO ₂ ; COND: condutância estomática; Tr: taxa de transpiração de plantas de <i>A. annua</i> , considerando os tratamentos de dose de colchicina e tempos de exposição.	46
Tabela 6 - Resumo da análise de variância para o parâmetro fitoquímico Artemisinina para plantas de <i>A. annua</i> L. tratadas com diferentes doses de colchicina.	47
Tabela 7 - Média e desvio padrão do parâmetro fitoquímico OE: óleo essencial (%) de <i>A. annua</i> , considerando os tratamentos de dose de colchicina e tempos de exposição.	49
Tabela 8 –Iniciadores, sequência de nucleotídeos, temperatura de anelamento, código de acesso e tamanho fragmento amplificado dos genes codificadores das enzimas chave envolvidas nas rotas biossintéticas do IPP e Artemisinina em plantas de <i>A. annua</i> L.	65

Tabela 9 - Resumo da análise de variância para os parâmetros agronômicos de quatro genótipos de <i>A. annua</i> expostas a diferentes doses de solução nutritiva (Hoagland).	66
Tabela 10 - Altura do Dossel (Hd) de quatro genótipos de <i>A. annua</i> expostos a diferentes doses de solução nutritiva.	67
Tabela 11 - Resumo da análise de variância para os caracteres fitoquímicos de quatro genótipos de <i>Artemisia annua</i> L. cultivadas a campo.....	68
Tabela 12 – Médias e desvio padrão dos parâmetros fisiológicos WUE: eficiência no uso de água; PHOTO: taxa de assimilação de CO ₂ ; COND: condutância estomática; Tr: taxa de transpiração de plantas de <i>A. annua</i> L., considerando os tratamentos com diferentes doses de solução nutritiva...71	71
Tabela 13 - Resumo da análise de variância para os parâmetros agronômicos de quatro genótipos e uma variedade de artemisia (<i>Artemisia annua</i> L.) cultivadas a campo.....	86
Tabela 14 – Médias obtidas para os parâmetros agronômicos dos genótipos B23, B24, C23, C32 e a variedade Artemis – F2.	87
Tabela 15 - Resumo da análise de variância para os parâmetros fisiológicos de quatro genótipos e uma variedade de artemisia (<i>Artemisia annua</i> L.) cultivadas a campo.....	89
Tabela 16 – Médias obtidas para os parâmetros fisiológicos dos genótipos B23, B24, C23, C32 e a variedade Artemis – F2.....	90
Tabela 17 - Resumo da análise de variância para os parâmetros fitoquímicos de quatro genótipos e uma variedade de artemisia (<i>Artemisia annua</i> L.) cultivadas a campo.....	90
Tabela 18 – Médias obtidas para os parâmetros fitoquímicos dos genótipos B23, B24, C23, C32 e a variedade Artemis – F2.	91
Tabela 19 – Contribuição relativa dos caracteres agronômicos e fitoquímicos de quatro genótipos e uma variedade de <i>A. annua</i> cultivadas em campo para a divergência genética calculada com base no critério de Singh (1981).	92

Tabela 20 – Matriz de correlação de Pearson construída através da análise das características agronômicas, fisiológicas e fitoquímicas de quatro genótipos e uma variedade de <i>A. annua</i> L. cultivados em campo.	95
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 <i>Artemisia annua</i> L.....	1
1.2 <i>Artemisia annua</i> L. e os compostos bioativos.....	4
1.3 Rotas Metabólicas da Planta e Biossíntese.....	7
1.4 A Malária e a Terapia Combinada com Artemisinina (TCA)	14
1.5 O mercado da Artemisinina.....	17
1.6 Melhoramento de <i>Artemisia annua</i>	19
1.7 Genes Alvo para Análise da Expressão Gênica em <i>A. annua</i>	26
2 <i>Artemisia annua</i> L. : RESPOSTA À APLICAÇÃO DE COLCHICINA NO TEOR DE ARTEMISININA E INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA	29
2.1 RESUMO	29
2.2 ABSTRACT	30
2.3 INTRODUÇÃO.....	31
2.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
2.6 CONCLUSÕES.....	51
3 EFEITO DA DEFICIÊNCIA NUTRICIONAL EM CARACTERES AGRONÔMICOS, FISIOLÓGICOS E FITOQUÍMICOS E EXPRESSÃO GÊNICA EM GENÓTIPOS DE <i>Artemisia annua</i> L.	52
3.1 RESUMO	52
3.2 ABSTRACT	53
3.3 INTRODUÇÃO.....	54
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
3.6 CONCLUSÕES.....	75

4 SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE ALTO RENDIMENTO E VARIABILIDADE PARA PARA CARACTERES AGRONÔMICOS, FISIOLÓGICOS E FITOQUÍMICOS DE <i>Artemisia annua</i> L.	76
4.1 RESUMO	76
4.2 ABSTRACT	77
4.3 INTRODUÇÃO.....	78
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	79
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86
4.6 CONCLUSÕES.....	96
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
REFERÊNCIAS.....	99

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 *Artemisia annua* L.

Espécies do gênero *Artemisia* são plantas medicinais tradicionais da família Asteraceae largamente utilizadas para tratamentos de saúde no senso popular e na indústria farmacêutica. Dentre elas está *A. annua* L., uma espécie vegetal herbácea que pode atingir aproximadamente 3 metros de altura (BOLINA *et al.* 2014) que produz biomoléculas de grande interesse farmacêutico. Os principais biocompostos são a artemisinina e o ácido artemisinínico.

Oriunda da Ásia ocorre naturalmente em planícies na China e em regiões de clima temperado com variações de altitude entre 1000 e 1500 metros, *A. annua* também apresenta boa aclimatação em locais de clima tropical, através da utilização da diversidade de sementes e híbridos existentes que são testados em diferentes tipos de solos e climas (LAUGHLIN, 2002; FERREIRA *et al.*, 2005; QUITERIO, 2006; MARCHESE, 2006). *A. annua* é uma espécie diploide e apresenta genoma $2n = 18$ (DELABAYS, 2010; LIN, *et al.* 2011). A Figura 1 apresenta plantas da variedade Artemis F2 e o genótipo B24 de *A. annua* testado pelo Grupo de Pesquisa de Fisiologia Vegetal da UTFPR – Pato Branco.

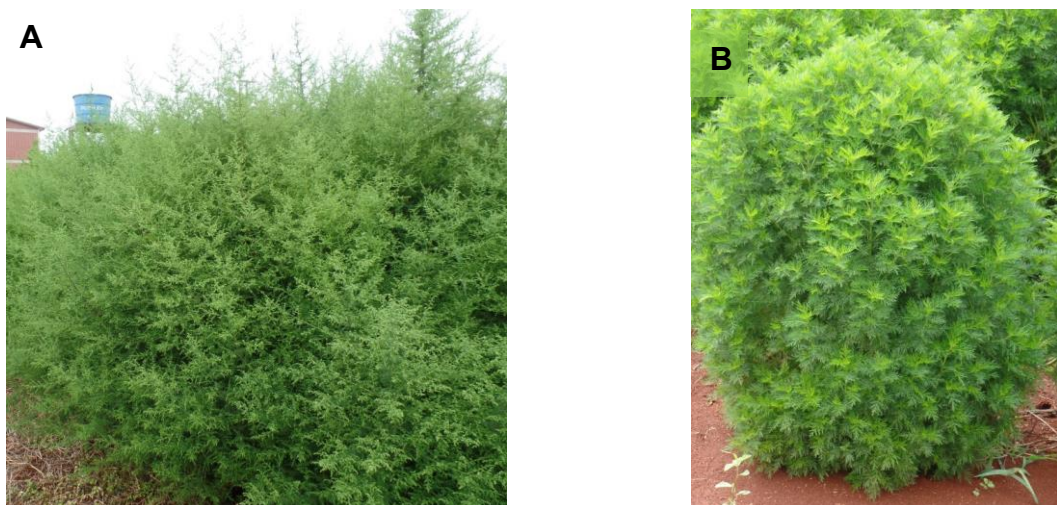


Figura 1 – A) Variedade Artemis em F2 (Mediplant – Suíça); B) Genótipo B24 variedade 2/39x5x3M – CPQBA/Campinas). Ambos genótipos cultivados na área experimental da UTFPR – Pato Branco.

Fonte: Zanmaria, UTFPR *Campus* Pato Branco, 2016.

A. annua é uma planta alógama, anual e altamente aromática, com hábito de crescimento determinado e responde às condições de clima e solo da região onde é cultivada. Suas folhas são simples e alternadas e suas flores são pequenas, entre 2 e 3 mm, amarelo-esverdeadas e cercadas por numerosas brácteas imbricadas reunidas em capítulos (Figura 2). Os capítulos são dispostos em panículas e contem um grande número de flores, sendo monóclinas as flores centrais e pistiladas as que se encontram nas margens (BOLINA, 2012).

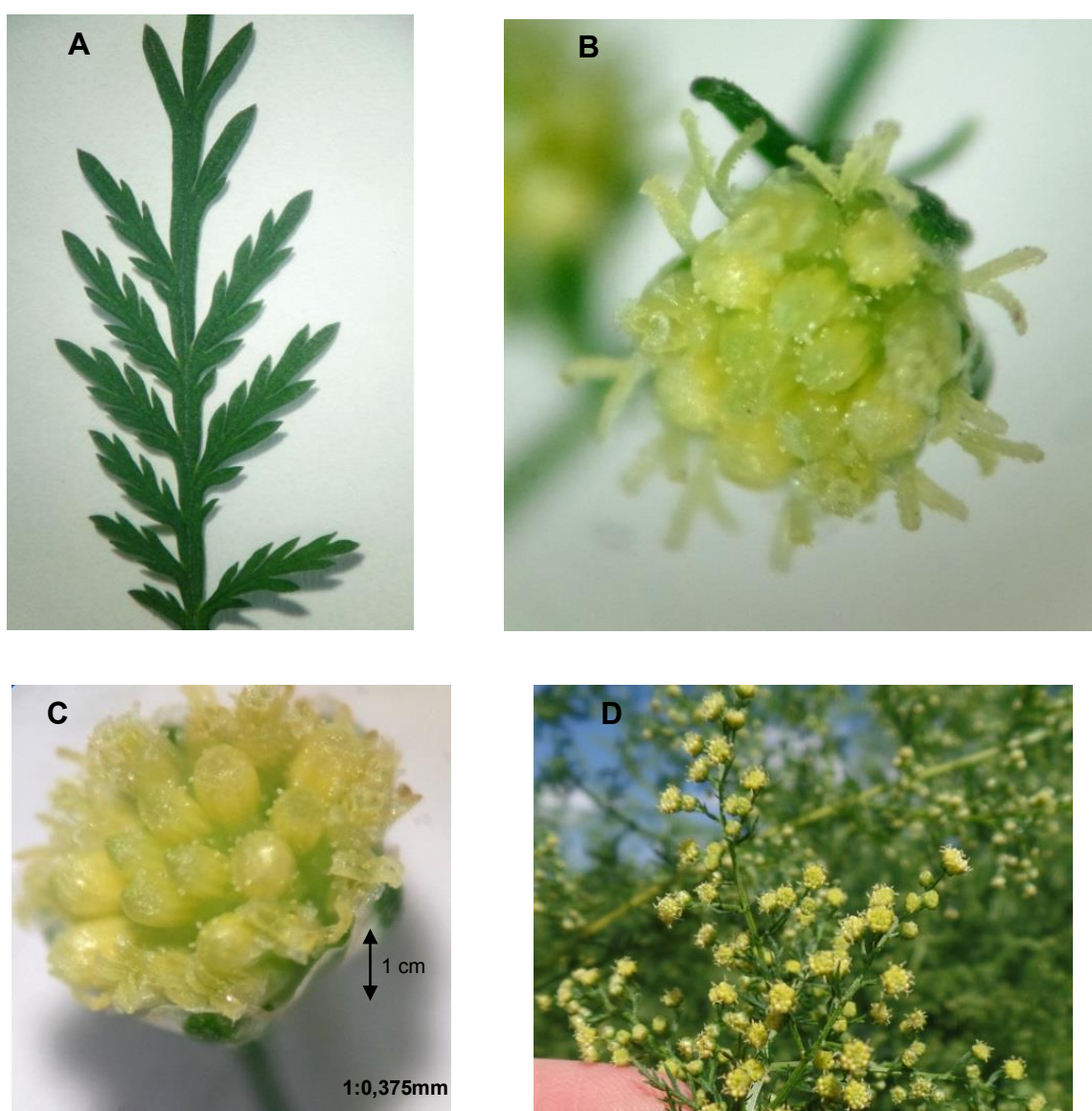


Figura 2 – A) Folha de *A. annua*; B, C e D) Inflorescências de *A. annua* cultivadas e coletadas na área experimental da UTFPR – Pato Branco.

Fonte: Zanmaria, UTFPR *Campus* Pato Branco, 2016.

Marchese *et al.* (2005) identificaram o mecanismo fotossintético de *A. annua*, confirmando ser essa espécie uma planta do tipo C3. Marchese *et al.* (2002) avaliaram o efeito de condições de temperatura e fotoperíodo no crescimento da *A. annua*, concluindo que é uma planta de dias curtos obrigatória, e alguns genótipos apresentam necessidade quantitativa de temperaturas baixas para florescer.

É importante ressaltar que *A. annua* necessita de um fotoperíodo crítico de 13 horas (FERREIRA *et al.*, 1980; MARCHESE *et al.*, 2002). Isso significa que a planta necessita dessa duração do dia para que floresça ou duração de dia maior para que permaneça em seu estado vegetativo. Assim, a partir da diminuição do fotoperíodo, a planta entra em estágio de pré-florescimento e necessita de 25 a 30 períodos fotoindutivos para entrar em florescimento (FERREIRA *et al.*, 1980; MARCHESE *et al.*, 2002). Esse fator é de extrema importância no manejo agrônomo da cultura, pois é a partir desse controle que se pode programar a colheita com alto teor dos metabólitos secundários de interesse (artemisinina e/ou óleo essencial).

O horário de colheita também é um fator a ser considerado priorizando a maior produção dos biocompostos (MARCHESE e FIGUEIRA, 2005). Bressan (2006), em estudos relacionados com horário de colheita considerou os horários entre 9:00 e 10:00 o pico de produção e metabólitos secundários na planta.

A densidade de plantio é variável e depende do que se pretende obter, óleo essencial, biomassa foliar ou artemisinina. Capelin (2012) identificou a densidade de cultivo mais adequada para o maior rendimento de óleo essencial de 91.272 plantas ha^{-1} com a produção de 38,92 L ha^{-1} . Para maximizar a produção de biomassa de folhas, a densidade de plantio mais adequada foi de 93.966 plantas ha^{-1} . Para obter a maior produtividade de artemisinina, a densidade ideal de cultivo foi de 80.071 plantas ha^{-1} . O maior teor de artemisinina na massa seca de folhas foi encontrado em uma densidade de 81.969 plantas ha^{-1} .

Marchese (2006) identificou o mecanismo fotossintético e avaliou o efeito de condições de temperatura e fotoperíodo no crescimento da *A. annua*. Para aumentar a produção de biomassa, óleo essencial e concentração de artemisinina na planta encontrou a melhor época para cultivar a espécie em Pato Branco – PR e os resultados determinaram que o transplante de mudas para o campo deve ser feito prioritariamente entre o último decêndio de setembro e a primeira quinzena de

outubro - começo da primavera - para se alcançar um maior rendimento de massa seca de folhas e artemisinina.

1.2 *Artemisia annua* L. e os compostos bioativos

A. annua possui folhas aromáticas contendo vários compostos, dentre eles artemisinina, uma lactona sesquiterpênica que tem demonstrado, juntamente com seus análogos, eficácia contra doenças como câncer (POSNER *et al.*, 1999; SINGH e LAI, 2004; EFFERTH, 2005) e parasitas que afetam a saúde de humanos e animais, tais como em espécies transmissoras de malária (RODRIGUES *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2006). Atualmente a artemisinina é considerada a droga mais eficaz no tratamento da malária (JELODAR *et al.*, 2014). A artemisinina é encontrada em maior concentração nos tricomas glandulares das folhas, nas flores e no caule da planta (MARCHESE, 2006; MARCHESE, 2010; WHO, 2013; AFTAB *et al.*, 2014; BOLINA *et al.*, 2014).

Esta planta vem sendo utilizada há muito tempo pelos chineses no tratamento de doenças e, atualmente, ao menos 40 compostos voláteis e vários não voláteis já foram extraídos e identificados (AFTAB *et al.*, 2014). Compostos da planta revelaram-se eficazes no tratamento de várias doenças parasitárias (MISHINA *et al.*, 2007; UTZINGER *et al.*, 2001; XIAO *et al.*, 2004). O extrato etanólico de partes aéreas de *A. annua* e artemisinina exibiu efeito contra *Epilachna paenulata* e *Spodoptera eridania* (MAGGI *et al.*, 2005).

Ainda, estudos recentes comprovam que extratos de *A. annua* contêm substâncias anti-inflamatórias, antioxidantes e substâncias antimicrobianas e devem ser considerados para utilização em produtos farmacêuticos para o tratamento de doenças odontológicas (KIM, *et al.*, 2015).

A. annua tem sido estudada também no tratamento de diversos tipos de cânceres. Resultados positivos de sua ação anticancerígena foram encontrados por Mondal e Chatterji (2015) detectaram os efeitos positivos da artemisinina na apoptose (morte celular) de câncer do colo do útero humano (HPV – 39).

Recentemente An *et al.* (2016), estudaram os efeitos benéficos de vários

fármacos antipalúdicos, incluindo a artemisinina, sobre as características clínicas das doenças auto-imunes como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide e desordens monogênicas. Ainda sobre doenças autoimunes, Hunt *et al.* (2016) comprovaram o uso de artemisinina como uma alternativa segura e eficaz para a administração dos sintomas de osteoartrite de joelho durante períodos prolongados.

Para o tratamento de osteosarcoma humano, estudado por Jirangkul *et al.* (2014), linhas celulares de osteosarcoma foram cultivadas continuamente e o ensaio MTT foi utilizado para avaliar as propriedades citotóxicas dos derivados de artemisinina em 48 horas de incubação, observando a inibição do desenvolvimento celular pela ação da artemisinina.

Efeito antialérgico em ratos foi observado utilizando-se extrato de *A. annua* com administração de doses de 200 e 400 mg Kg⁻¹, suprimindo o choque anafilático sistêmico induzido e ocorrendo a liberação de histamina pelo organismo (DENG *et al.*, 2016).

Ainda, recentemente, tem sido estudada a utilização de *A. annua* de forma tradicional, ou seja, através da ingestão de infusão de folhas (chás) e ainda soluções preparadas à base de extrato da planta, os chamados xaropes caseiros (LAGARCE *et al.* 2016). Muitas divergências sobre essa forma de administração são encontradas. Magalhães (2016) comparou a eficácia da infusão de folhas secas de *A. annua* (regime de tratamento preconizado pela ANAMED: 5g/L, 1L/dia, durante 7dias), versus o tratamento de 1ª linha no Brasil, com o Coartem®, no tratamento de malária *falciparum*, não complicada. As administrações foram chá de artemisia na concentração de 1,25g/250mL (em forma de saches contendo folhas selecionadas de *A. annua*, preparados pela Agrotecnologia- CPQBAUNICAMP / FARMANGUINHOS) a cada 6 horas, por 7 dias e comprimido: 20 mg de artemeter e 120 mg de lumefantrina, durante 3 dias, em duas doses diárias (2 comprimidos pela manhã e dois a noite), totalizando seis doses (Coartem®). Foi detectado que houve eficácia total para o medicamento Coartem® e nos casos de administração por chá, houve eficácia de 100% em 50% dos casos, entretanto, com recrudescência após 28 dias. Ainda Lagarce *et al.* (2016), relatam dois casos de *Plasmodium falciparum* graves que necessitaram de internação em Unidade de Terapia Intensiva após profilaxia com *A. annua* em forma de chá. Nesses casos, foi observado que não

houve eficácia pela dosagem utilizada, o que levou a Agência Francesa de Segurança de Medicamentos e Produtos de Saúde (ANSM) suspender a comercialização, fabricação ou distribuição gratuita, importação e exportação de formas não farmacêuticas de *A. annua* que foram promovidas e vendidas pela Internet.

A necessidade de estudos mais precisos sobre a administração de formas não farmacêuticas de *A. annua* ainda é premente em todo o mundo, pois ainda é observada grande variação de princípio ativo nessas formas de administração, o que pode comprometer a saúde do paciente infectado.

Embora o principal uso de *A. annua* seja a produção de artemisinina, o óleo essencial é muito utilizado comercialmente na perfumaria e cosmética (GALAMBOSI, 1980). Por ser uma planta aromática, *A. annua* possui grande capacidade de produção de óleo essencial (QUITÉRIO, 2006), cujo teor pode chegar a 0,49% da matéria fresca da planta variando de acordo com as condições ambientais e de cultivo (BAGCHI *et al.*, 2003).

A maior produção desse metabólito está concentrada nas inflorescências da planta (FLOGIO, 1996). Apresenta como componentes principais monoterpenos e sesquiterpenos (MA *et al.*, 2007). A composição do óleo essencial de *A. annua*, é composto por cânfora e 1,8 cineol como constituintes principais (PERAZZO *et al.*, 2003; MOHAMMADREZA, 2008; BOLINA, 2011; HAIDER *et al.*, 2003). Ainda, conforme o local da planta, a composição do óleo essencial pode variar. Goel *et al.* (2007) encontraram 93 constituintes que variaram de acordo com a porção da planta em estudo, e Malik (2009) encontrou vinte componentes no óleo desta espécie, sendo os principais cis-limoneno 1,2-epóxido (22,1%), β -cariofileno (12,2%), artemisia cetona (11,5%), isopinocanfona (11,4%) e cânfora (8,4%).

O óleo essencial está sendo estudado na medicina, dentre algumas áreas, para controle de obesidade (HWANG *et al.*, 2016), no controle de algumas estirpes de *Candida spp.* (SANTOMAURO *et al.*, 2016), no combate à Leishmaniose visceral (ISLAMUDDIN, *et al.*, 2014). Também apresenta ação inseticida (JAIN *et al.*, 1996; BAGCHI *et al.*, 2003) e efeito alelopático em algumas plantas cultivadas e plantas daninhas (MAGIERO *et al.*, 2009; MORVILLO *et al.*, 2011).

1.3 Rotas Metabólicas da Planta e Biossíntese

Em 1972, os cientistas chineses conseguiram isolar a artemisinina de plantas de *A. annua*, tendo sucesso na elucidação de sua estrutura anos mais tarde, em 1979 (KLAYMAN, 1985; VAN AGTAMAEEL *et al.*, 1999; BALINT, 2001). Quimicamente, a artemisinina é uma lactona sesquiterpênica que possui uma ligação peróxido, essencial para a atividade antimalárica (BALINT, 2001). No processo de extração de artemisinina são extraídas outras lactonas sesquiterpênicas, como a deoxiartemisinina e dihidro-epideoxiartenuína B, conhecidas como análogos da artemisinina (Figura 3). A deoxiartemisinina é estruturalmente semelhante à artemisinina, exceto pela ausência da ligação peróxido (O-O) que a torna inativa (ARAÚJO, 2006).

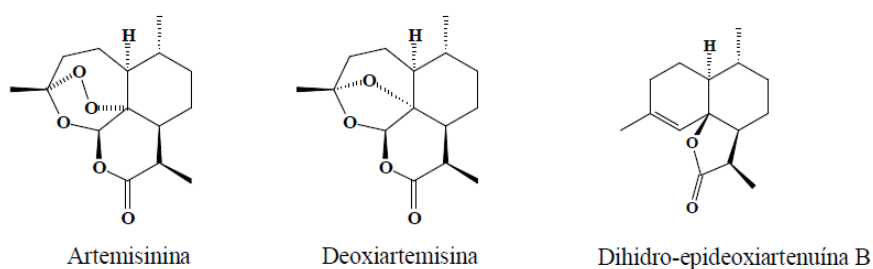


Figura 3 – Estruturas químicas da artemisinina e análogos.
Fonte: FOGLIO, 2002.

Na biossíntese da artemisinina, segundo Pulido *et al.* (2012), há duas vias independentes que produzem IPP (isopentenil-difosfato), precursor dos terpenos. Uma delas é a via do ácido mevalônico (MVA), que é citosólica originado da acetil-CoA, e a outra a via metil-eritritol fosfato (MEP), plastidial, a partir de piruvato (Figura 4).

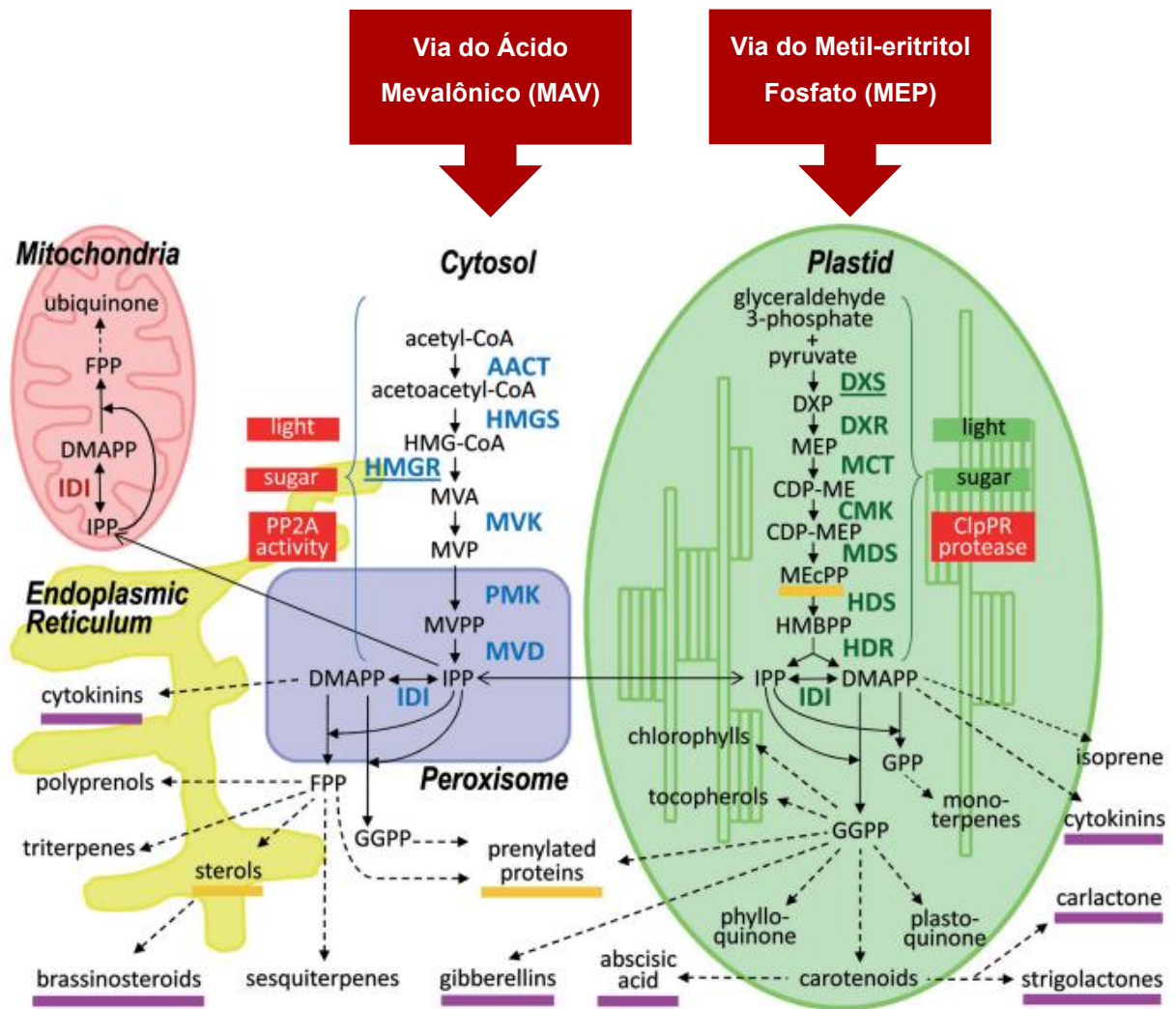


Figura 4 – Vias metabólicas independentes de produção de IPP (isopentenil-difosfato), precursor dos terpenos: as enzimas da Via do ácido mevalônico (MVA) são destacadas em azul e as enzimas da Via do metil-eritritol fosfato (MPE) em verde. Vias biossintéticas isoprenóides na célula vegetal. As enzimas da via MVA são mostradas em azul e as enzimas da via MEP em verde. As enzimas sublinhadas sugerem ter maior grau de controle sobre o fluxo metabólico: (DXS – via MEP) e (HMGR via MVA). Os destaques em verde e vermelho são os reguladores positivos e negativos respectivamente de ambas as vias na via pós-transcricional. As setas marcadas marcam várias etapas e as setas abertas representam o transporte de metabólitos entre os compartimentos celulares. Os isoprenóides com funções reguladoras estão sublinhados em roxo (compostos semelhantes a hormônios) e laranja. CDP-ME, 4- (citidina 5'-difosfo) -2-C-metil-D-eritritol; CDP-MEP, CDP-ME 2-fosfato; DMAPP, difosfato de dimetilalilo; DXP, 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato; FPP, difosfato de farnesil; GGPP, difosfato de geranylgeranilo; GPP, geranyl difosfato; HBMPP, 1-hidroxi-2-metil-2-butenilo 4-difosfato; HMG-CoA, 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA; IPP, difosfato de isopentenilo; MEcPP, 2,4-ciclodifosfato de 2-C-metil-D-eritritol; MEP, 4-fosfato de 2-C-metil-D-eritritol; MVA, ácido mevalônico; MVP, 5-fosfomevalonato; MVPP, 5-difosfomevalonato.

Fonte: Pulido *et al.*, (2012).

Apesar de ter sido geralmente aceito que o IPP é fornecido pela via do MVA, descobriu-se que a via MEP plastidial também pode produzir IPP para a biossíntese de sesquiterpenos em *A. annua*. Em estudos observou-se que a via do MVA forneceu a maior parte do esqueleto de carbono para a biossíntese de artemisinina, entretanto, ambas as vias MVA e MEP estão envolvidas no fornecimento de IPP para biossíntese de artemisinina. A rota específica da artemisinina pode ser visualizada na Figura 5, sendo que as informações biológicas sobre as enzimas envolvidas na biossíntese da artemisinina podem ser visualizadas na Tabela 1. As enzimas em destaque na tabela foram selecionadas, no presente estudo, para teste de expressão gênica em plantas de *A. annua*, o que será discutido posteriormente.

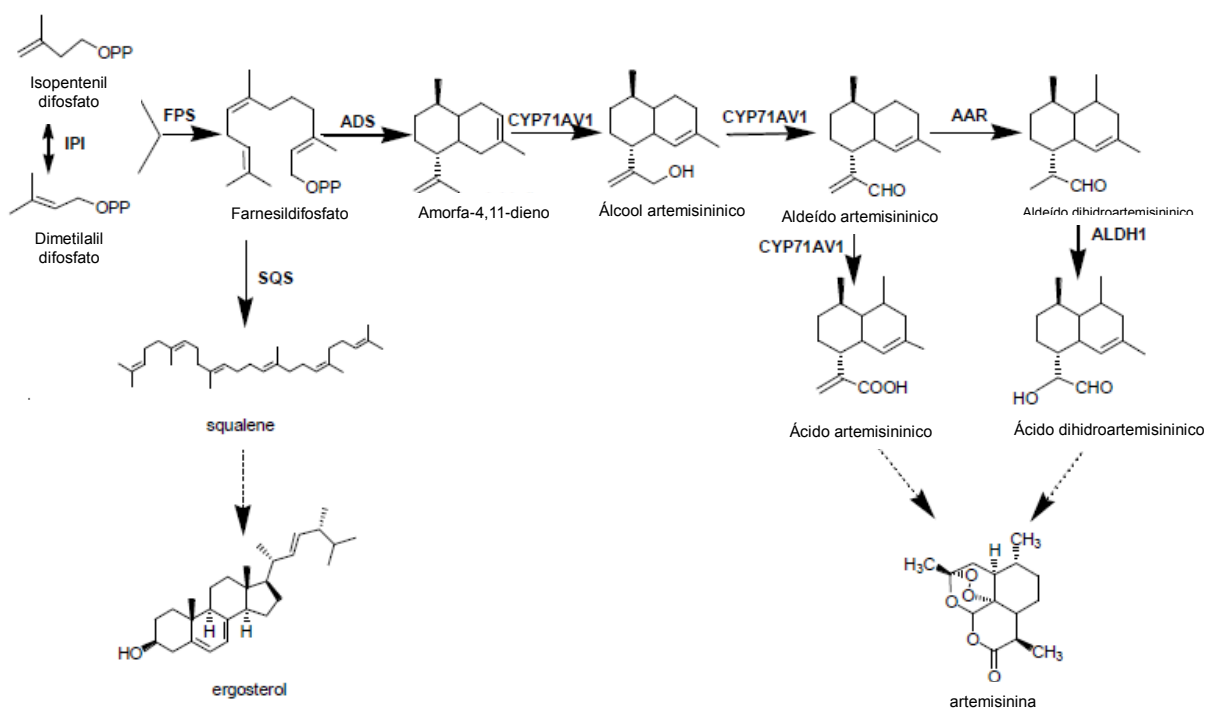


Figura 5 – A Rota específica da artemisinina, a partir da síntese de IPP.
Fonte: ZENG *et al.*, 2012.

Tabela 1 - Informações biológicas de enzimas envolvidas na biossíntese de artemisinina.

Enzima	Substrato	Produto	Planta de origem	Nº GenBank	Referências
ACCT	Acetil-CoA	Acetoacetil-CoA	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AF364059	Gual <i>et al.</i> (1992)
HMGS	Acetoacetil-CoA	HMG-CoA	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_117251	Luskel <i>et al.</i> (1985)
HMGR	HMG-CoA	MVA	<i>Catharanthus roseus</i>	AY623812	Adin <i>et al.</i> (2003)
MK	MVA	MVP	<i>Artemisia annua</i>	AF142473	Chen <i>et al.</i> (2000)
PMK	MVP	MVPP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_198097.1	Lluch <i>et al.</i> (2000)
MDC	MVPP	IPP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AC079041.4	Tsay <i>et al.</i> (1991)
IPI	IPP e DMAPP	IPP ou DMAPP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_115285.1	Dhe-Paganon <i>et al.</i> (1994)
DXS	Piruvato e G3P	DXP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	U49259	Wouters <i>et al.</i> (2003)
DXR	DXP	MEP	<i>Artemisia annua</i>	AF182286.2	Sprenger <i>et al.</i> (1997)
MECT	MEP	CDP-ME	<i>Artemisia annua</i>	AF182287.2	Graham <i>et al.</i> (2010)
CMK	CDP-ME	CDP-MEP	<i>Taxus x media</i>	EF534010	Rohdich <i>et al.</i> (2000)
MECPS	CDP-MEP	ME-cPP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAG01340	Steinbacher <i>et al.</i> (2003)
HDS	ME-cPP	HMBPP	<i>Ginkgo biloba</i>	AY971576	Herz <i>et al.</i> (2000)
HDR	HMBPP	IPP ou DMAPP	<i>Artemisia annua</i>	FJ479720	Baker <i>et al.</i> (1992)
FPS	IPP e DMAPP	FPP	<i>Artemisia annua</i>	GQ119345	Peng <i>et al.</i> (2011)
ADS	FPP	Amorfa-4, 11-dieno	<i>Artemisia annua</i>	AF112881	Matsushita <i>et al.</i> (1996)
CYP71AV1	Amorfa-4,11dieno	Álcool artemisinínico, aldeído artemisinínico ou ácido artemisinínico	<i>Artemisia annua</i>	EF197888	Mercke <i>et al.</i> (2000)
AAR	Aldeído artemisinínico	Aldeído dihidroartemisinínico	<i>Artemisia annua</i>	DQ268763	Ro <i>et al.</i> (2005) e Teoh <i>et al.</i> (2006)
ALDH1	Aldeído dihidroartemisinínico	Ácido dihidroartemisinínico	<i>Artemisia annua</i>	EU704257	Zhang <i>et al.</i> (2008)
SQS	Farnesil difosfato	Esqualeno	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_566749	Teoh <i>et al.</i> (2009)
CPR			<i>Artemisia annua</i>	AY445506	Yang <i>et al.</i> (2008)
AaWRKY			<i>Artemisia annua</i>	DQ984181	Jing <i>et al.</i> (2008)
			<i>Artemisia annua</i>	FJ390842	Ma <i>et al.</i> (2009)

Fonte: ZENG *et al.*, (2012) adaptado por Zanmaria, 2016.

Considerando a produtividade, dentre todas as espécies, *Artemisia annua* é a que mais produz artemisinina, a qual já apresentou no sudoeste do Paraná, em apenas uma colheita, produtividades de até 48,4 Kg ha⁻¹ (CAPELIN, 2012 , 2006), em contrapartida da média de produção das espécies silvestres de 1,0 Kg ha⁻¹ (MAGALHÃES *et al.*, 2004; BOLINA *et al.*, 2014). As melhores variedades comerciais, quando colhidas multiplas vezes no mesmo ano, podem produzir até 70 Kg de artemisinina ha⁻¹ (KUMAR *et al.* 2004).

O ácido artemisínico, precursor da artemisinina, demonstra grande importância econômica, pois está presente no processo de produção de artemisinina por reator. Pinho, Miranda e Souza (2014) relatam que o processo industrial consiste na produção do ácido artemisínico por meio de fermentação e sua transformação sintética por via fotoquímica. É descrito como um processo em fluxo contínuo para a preparação da artemisinina utilizando como material de partida o ácido dihidroartemisínico, obtido pela redução do ácido artemisínico produzido por leveduras geneticamente modificadas. O processo utiliza fotoreator e tem como etapa chave uma sequência de reações iniciada pela oxidação com oxigênio isolado (Figura 6).

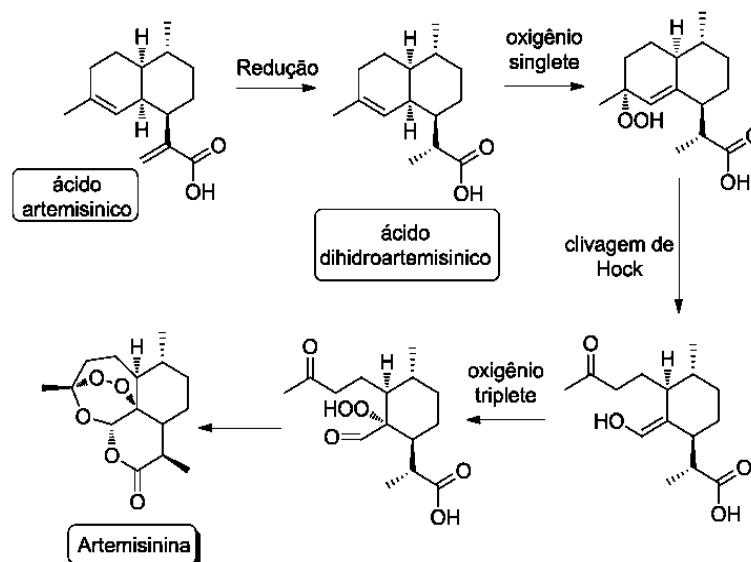


Figura 6 – Processo de Síntese semissintética da artemisinina.
Fonte: PINHO, MIRANDA E SOUZA (2014).

Ainda segundo os mesmos autores, no sistema desenvolvido, após um tempo de residência de 4,5 min a artemisinina foi obtida em 39 % de rendimento após purificação por cromatografia (Figura 7), produzindo cerca de 200 g de artemisinina

por dia. A estimativa é que sejam necessários em torno de 1500 reatores para suprir a demanda de 225 milhões de doses de artemisinina por ano no mundo para o tratamento da malária.

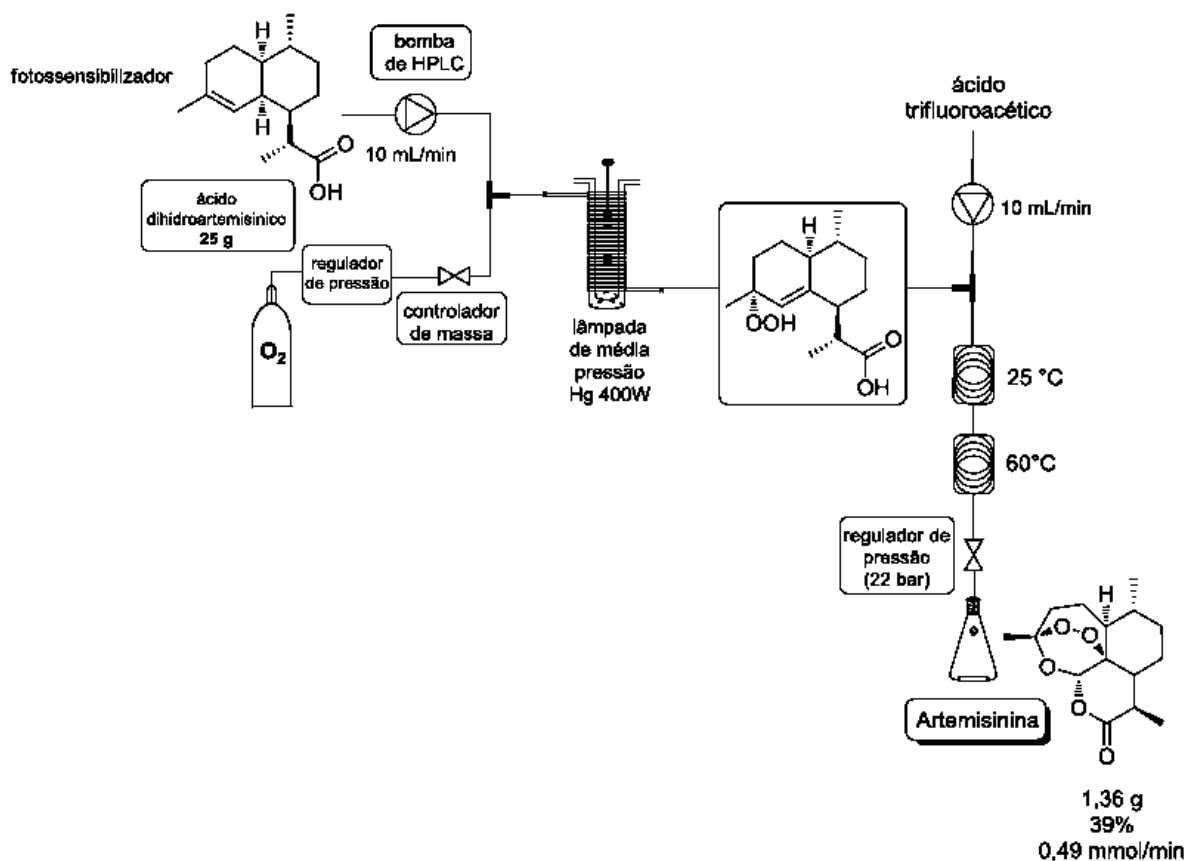


Figura 7 - Síntese da artemisinina em fluxo contínuo.
Fonte: PINHO, MIRANDA e SOUZA (2014).

Considerando isso, uma versão otimizada desse processo utiliza um reator mais robusto, simplificado e de menor custo operacional (Figura 8). Consiste em um tubo de FEP envolto em uma lâmina de vidro. O reator é irradiado por um módulo constituído de lâmpadas do tipo LED de 72 W e 420 nm o que garante maior eficiência energética. O tempo de residência para o processo completo é de aproximadamente 11,5 minutos, sendo obtido um rendimento de 65 %, o que significa que o reator é capaz de produzir 165 g por dia de artemisinina. Neste sistema simplificado o processo em fluxo contínuo requer apenas uma bomba de HPLC e um fornecimento inicial de oxigênio. A configuração compacta conta com uma lâmpada LED com comprimento de onda exato para o sensibilizador, resultando

em uma eficiência de fótons de 24%.

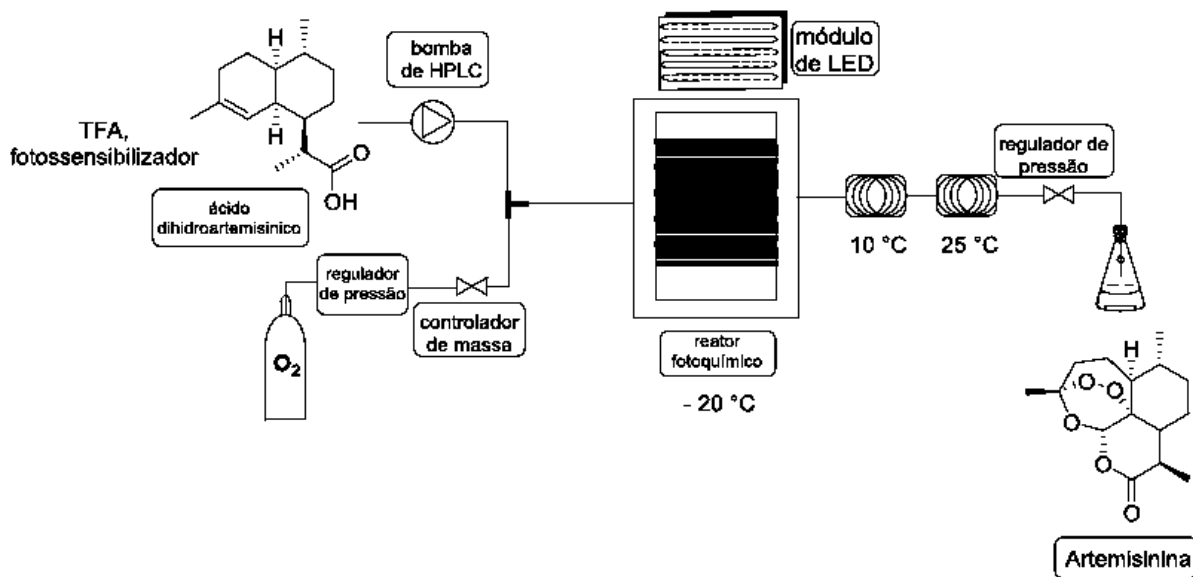


Figura 8 - Processo otimizado para síntese da artemisinina em fluxo contínuo.
Fonte: PINHO, MIRANDA e SOUZA (2014).

Portanto, como a artemisinina pode ser sintetizada a partir do ácido artemisínico, entende-se que também a partir desse composto, pode-se conseguir a matéria prima para a produção do medicamento, daí a importância farmacêutica do ácido artemisínico.

Da obtenção da biomolécula objetiva-se a produção do medicamento contra a malária propriamente dito. Esse medicamento é atualmente denominado como terapia combinada de artemisinina (TCA), ou seja, a combinação de duas substâncias ativas que visa evitar que os *Plasmodium spp.* adquiram resistência para artemisinina. Desta forma, está sendo considerada como o tratamento mais eficaz contra malária. A terapia combinada é composta por derivados da artemisinina associados a outros antimaláricos, como a mefloquina. A TCA baseada em artesunato + mefloquina é chamada de ASMQ e está sendo produzida e distribuída pela FIOCRUZ – FarManguinhos, no Brasil.

Tanto o artesunato de sódio como a mefloquina são substâncias semissintéticas produzidas a partir da artemisinina e quinina, respectivamente, que são, portanto, dois antimaláricos naturais de extrema importância para produção de

outras substâncias semissintéticas também ativas: cloroquina, primaquina, artemether, arteether (Figura 9). Daí a importância desses dois antimaláricos naturais como fonte de fármacos e de matéria-prima (BRAZ FILHO, 2014).

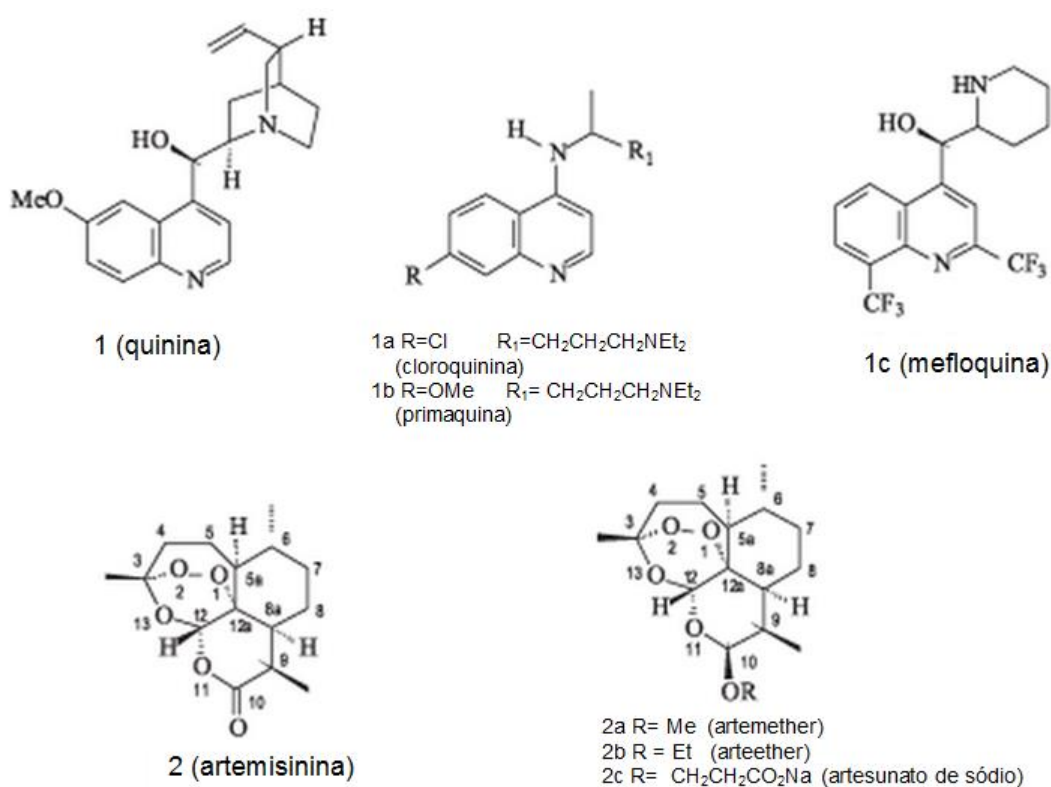


Figura 9 - Substâncias semissintéticas produzidas a partir dos antimaláricos naturais quinina e artemisinina.

Fonte: adaptado de BRAZ FILHO (2014).

1.4 A Malária e a Terapia Combinada com Artemisinina (TCA)

Como já comentado, a malária é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium spp.* que atingiu, no último levantamento da Organização Mundial da Saúde, somente no ano de 2012, 207 milhões de pessoas em todo mundo com morte de 627.000 pessoas, em sua maioria crianças menores de cinco anos. A combinação terapêutica à base de artemisinina, então, é o tratamento

mais efetivo contra esta doença, sendo de baixa toxicidade, poucos efeitos colaterais e ação rápida contra o parasita (WHO, 2014).

As áreas em vermelho na Figura 10 demonstram as maiores concentrações de casos de malária em todo o mundo. Acredita-se que a malária retarde o crescimento econômico anual em 1,3% em áreas endêmicas com alta prevalência. O custo econômico da malária é estimado, somente na África, em US\$ 12 bilhões por ano (DnDi 2015).

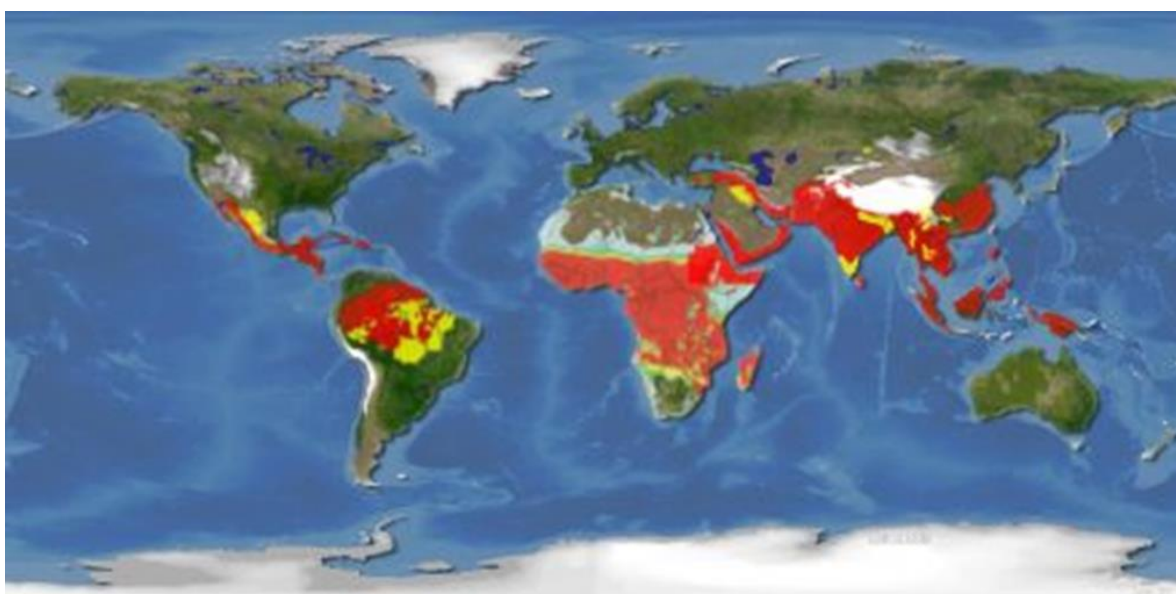


Figura 10: Regiões mais afetadas por casos de malária no mundo destacadas em vermelho.
Fonte: DnDi (2015)

No Brasil, em 2013, aproximadamente 244 mil pessoas foram infectadas por esta doença (WHO, 2014).

Até 1960, o combate à malária era baseado em duas estratégias: exterminar o mosquito vetor com diclorofeniltricloroetano (DDT) e tratar a doença com drogas baseadas em quinina e seu derivado, cloroquina. Infelizmente, o DDT resultou em efeitos negativos sobre animais e a presença persistente do pesticida nas cadeias alimentares. Além disso, o *Plasmodium* spp. desenvolveu resistência a essas drogas, o que dificultou ainda mais o controle da doença (AFTAB *et al.*, 2014).

Na década de 1970, a artemisinina passou a ser identificada como um princípio ativo natural muito eficaz para o combate à malária (AFTAB *et al.*,

2014). Diante disso, a terapia combinada ASMQ = Artesunato + Mefloquina, é o tratamento mais efetivo contra a malária cerebral causada por *Plasmodium falciparum* (WHO, 2015; FIOCRUZ, 2015). No Brasil a Fundação Oswaldo Cruz em São Paulo através de umas de suas unidades, o Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos – produz o medicamento para ser distribuído no tratamento da doença. O Instituto atende a programas específicos do Ministério da Saúde que tratam de problemas endêmicos, e entre os principais produtos fornecidos ao governo está o ASMQ. O medicamento está incluso desde 2008 na lista de produtos estratégicos, no âmbito do Sistema Único de Saúde, com a finalidade de colaborar com o desenvolvimento do Complexo Industrial da Saúde. A portaria N° 3.089, de 11 de dezembro de 2013 redefine a lista de produtos estratégicos para o Sistema Único de Saúde (SUS) e as respectivas regras e critérios para sua definição, que substitui as portarias no 1.284, de 26 de maio de 2010 e a primeira, nº 978/GM/MS, de 16 de maio de 2008 (FIOCRUZ, 2015). Em 2013 foi incluso na lista de medicamentos essenciais pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2013).

Ainda segundo a Fiocruz (2015), a produção nacional de medicamentos dessa natureza representa uma redução importante nos custos do Sistema Único de Saúde do Governo Federal, o SUS, que pode direcionar seus investimentos para outras áreas da saúde. Farmanguinhos, nesse aspecto, representa um importante papel no fortalecimento das indústrias farmacêuticas nacionais e na regulação de preços do mercado farmacêutico brasileiro.

O Brasil atende ainda países vizinhos que demandam o medicamento para o tratamento adulto e infantil. Recentemente o Instituto Farmanguinhos enviou 160.050 comprimidos do antimalárico à Venezuela, sendo 25 mil unidades para tratamento infantil. A Organização Pan-Americana da Saúde (Opas) em parceria com o Núcleo de Assistência Farmacêutica no Brasil são apoiadores no combate à malária nos países latino-americanos (FIOCRUZ, 2015). Em todo o mundo já foram distribuídas 1.200.000 doses do medicamento (DNDi, 2015).

As perspectivas mundiais são de aumentar a produção de *A. annua* com redução de custos (ASSURED ARTEMISININ SUPPLY SYSTEM, 2013), além de atender não só a demanda nacional, mas dos países latino-americanos (FIOCRUZ,

2015). Para tanto, programas de melhoramento genético da espécie a partir de métodos modernos de biotecnologia que propaguem de forma rápida plantas com grande quantidade de artemisinina e seus análogos são de interesse global.

1.5 O mercado da Artemisinina

O mercado mundial de artemisinina teve seu ápice de produção no ano de 2013, com picos de produção de mais de 16 toneladas na Índia, local de maior produção no mundo. O valor de venda do produto tem sofrido queda ao longo desse período devido a algumas questões que se referem principalmente à redução de demanda e também pelo avanço na produção da molécula de artemisinina sintética e semissintética. A *A. annua*, até muito recentemente, era a única fonte de obtenção de artemisinina economicamente viável. Na Conferência de artemisinina em Nairobi (A2S2, 2014) a empresa Sanofi, através do Programa de Desenvolvimento de Medicamentos, anunciou que estaria produzindo até 35 Mt de artemisinina semissintética (ASS) para a sua utilização e para testes com clientes, no ano de 2013 e até 60 Mt de ASS para 2014. O valor de mercado seria de US\$ 400 Kg⁻¹. O ingresso no mercado de artemisinina semisintética produzida pela Sanofi objetivava exclusivamente regular o preço de mercado, evitando oscilações causadas pela retenção da produção por produtores, especialmente chineses, que levaram os valores do quilograma da molécula a patamares de US\$ 1000,00.

Todavia, estaria acordado entre a Organização Mundial de Saúde e Sanofi, a garantia do espaço para artemisina natural produzida por agricultores (A2S2, 2014).

Apesar das perspectivas de produção da molécula semissintética, a empresa Sanofi apresentou dificuldade e resistência perante o mercado mundial. Segundo Peplow (2016), a empresa, única responsável em produzir artemisinina semissintética no mundo, está desistindo de liderar esse desafio. Ao ser implantado comercialmente, o produto não sofreu o impacto esperado. Segundo a empresa, o objetivo seria oferecer uma fonte barata e abundante para combater uma doença que atinge quase meio milhão de pessoas no mundo a cada ano. No entanto, a

produção em 2015 não atingiu sua meta para a produção da terapia combinada de artemisinina (TCA) e, portanto está se desfazendo do protocolo de produção e de sua indústria localizada em Garessio, na Itália.

A empresa alega dificuldade no negócio diante da “complicada teia de forças econômicas que afeta o mercado de medicamentos contra a malária”. Ainda relata: “Este é um perfeito exemplo de como um novo processo de fabricação torna-se extremamente difícil em grande escala quando há um complexo sistema de interesses” (PEPLOW, 2016).

Com o mercado de Artemisia instável, a dificuldade em manter a oferta da planta é maior. Isso influencia os preços, com alta em períodos de escassez da planta. Esse cenário impulsionando os agricultores a produzirem, e, portanto, obtendo-se grande quantidade de produção, leva o preço à drástica queda (PEPLOW, 2016).

A empresa Sanofi desenvolveu um protocolo de produção com capacidade de 60 T/artemisinina/ano, ou seja, 30% da demanda mundial. Isso não ocorreu. Atendeu a demanda de somente 10% da necessidade mundial, observando como principal obstáculo a oferta da artemisinina agrícola e o seu valor de mercado: enquanto o quilo da artemisinina produzida naturalmente custa US\$ 250 por quilo (Figura 11) e em queda gradativa, a indústria consegue oferecer a molécula semissintética por US\$ 350-400 por quilo. Com os preços em baixa, e a safra abundante, a empresa não observa necessidade de fomento da tecnologia para o mundo. Além disso, os fabricantes da terapia combinada de artemisinina oferecem resistência à aquisição do ingrediente, considerando a empresa, uma concorrente direta. Com a demanda em seu patamar, atualmente, a necessidade de investimento na área tecnológica de produção da molécula tornou-se vulnerável (PEPLOW, 2016).

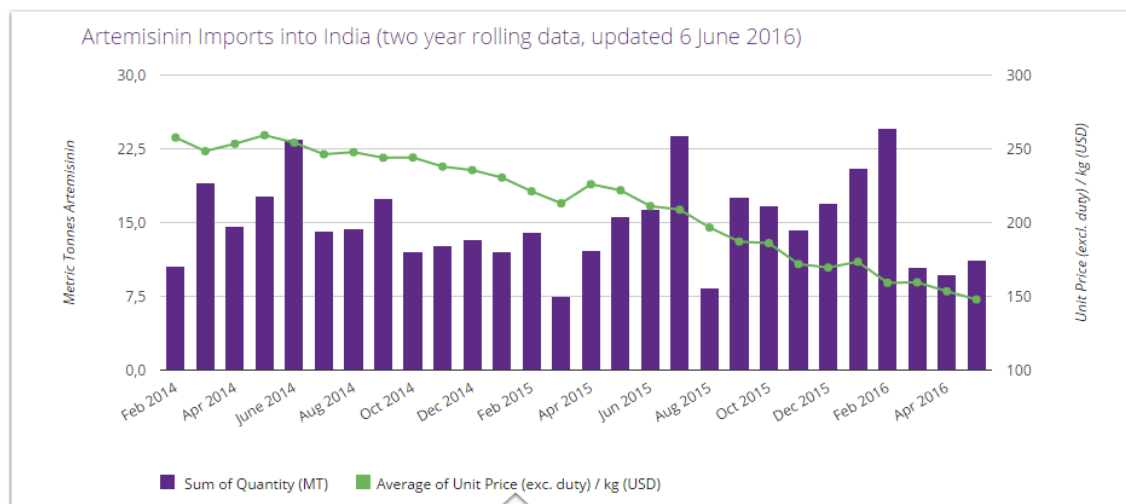


Figura 11 – Perspectiva de produção e preço da artemisinina no período de 2014-2016. Fonte: A2S2, 2016.

1.6 Melhoramento de *Artemisia annua*

A introdução da *A. annua* no Brasil aconteceu no final da década de 80 a partir de sementes procedentes da Europa e da China (MAGALHÃES, 1996). Os primeiros resultados obtidos com a espécie não foram promissores. Apresentaram plantas com crescimento e morfologia heterogêneos e principalmente, com baixos rendimentos de artemisinina (MAGALHÃES *et al.*, 2004; BOLINA *et al.* 2014). Genótipos oriundos do Vietnã foram introduzidos e melhorados pela MEDIPLANT, na Suíça, com especificidade para as condições brasileiras (MAGALHÃES *et al.*, 2004). A variedade Artemis produzida pela Mediplan é destacada por Graham *et al.* (2010) como sendo um híbrido considerado atualmente o líder em produção de artemisinina.

A obtenção de genótipos com características desejáveis é reforçada por Jelodar *et al.* (2014), que destaca a importância da seleção de indivíduos que apresentem maior potencial de produção em condições diversas, tanto favoráveis quanto desfavoráveis. Ainda destaca que o melhoramento de *A. annua* deve atingir quatro principais metas a fim de resultar em melhoria no rendimento: aumento do potencial produtivo da folha, o aumento do número de ramos, aumentando o conteúdo de artemisinina e aumento do número de tricomas nas plantas.

O melhoramento genético convencional, diante disso, tem sido utilizado na obtenção de maiores rendimentos dos metabólitos de *A. annua*. Delabays, Simonnet e Gaudin (2001) destacam que a variabilidade genética existente no conteúdo de artemisinina vem sendo usada com sucesso em programas de melhoramento buscando aperfeiçoar a produção agrícola da substância. Além disso, cultura de tecidos e práticas agrônômicas são linhas de pesquisa que visam aumentar a produtividade da espécie (BOLINA *et al.*, 2013 e 2014; JELODAR, *et al.*, 2014).

A produção de biomassa é uma das características agrônômicas que se busca aprimorar com o melhoramento da espécie. Em *A. annua* selvagem a produção de biomassa era de aproximadamente 100 Kg ha⁻¹ enquanto que atualmente, com a seleção de genótipos melhorados já chegou a pouco mais de 4.500 Kg ha⁻¹ (CAPELIN, 2012). Entretanto, ainda se busca melhores resultados a partir de técnicas agrônômicas de produção (adubação, espaçamento).

Em experimentos realizados em Pato Branco por Marchese (2006) com o objetivo de avaliar o rendimento de biomassa foliar e artemisinina para o acesso 2/39x1V de *A. annua* naquela região, foi observado que os rendimentos de biomassa e artemisinina encontrados em Pato Branco-PR foram superiores àqueles encontrados para o mesmo acesso por Magalhães *et al.* (1999) em Campinas-SP. O teor de artemisinina na biomassa foliar foi o mesmo em Pato Branco e Campinas, sugerindo que o rendimento de artemisinina (Kg ha⁻¹) está mais associado aos ganhos em biomassa foliar provocados pelas temperaturas mais amenas no sudoeste do Paraná, pois espécies C3 adaptam-se melhor a esses climas. Divergências no comportamento fisiológico desta espécie em relação à influência de fatores ambientais sugerem que seu comportamento não é padrão, sendo variável para diferentes genótipos e locais de cultivo (MARCHESE E REHDER, 2001).

O número de tricomas e a produção de óleo essencial também são considerados em um programa de melhoramento para *A. annua*. O óleo essencial retirado da planta possui grande demanda na produção de cosméticos e na medicina, sendo estes extraídos das glândulas secretoras da planta (tricomas). Plantas que apresentem alto índice de óleo essencial em sua extração devem ser selecionadas em busca de genótipos com essa característica.

Trabalhos desenvolvidos por Bolina *et al.* (2014) verificaram correlação

positiva e significativa entre os caracteres volume de dossel e rendimento de óleo essencial para o genótipo 2/39x5x3M, evidenciando que a seleção de plantas com maior volume de dossel possibilitaria a seleção indireta para o caráter rendimento de óleo essencial. Também, os mesmos autores observaram correlação negativa e significativa entre volume de dossel e teor de artemisinina indicando que se deve evitar a seleção de plantas com grande volume de dossel e número de ramificações, se o interesse do melhoramento for maior teor de artemisinina, contrariando Jelodar *et al.* (2014) que destacam que a maior produção de artemisinina está associada ao maior número de ramos na planta.

O rendimento de artemisinina é a característica principal que os programas de melhoramento consideram para selecionar plantas com características superiores de produção. Sabe-se que vários genes de várias enzimas estão envolvidos na produção de artemisinina. Esse mapeamento é de extrema relevância para selecionar genótipos nos programas de melhoramento.

Com esse objetivo, com transformação genética estão sendo desenvolvidos com *A. annua*. Plantas transformadas de *A. annua* foram desenvolvidas visando superexpressão das enzimas chave envolvidas na via biossintética de artemisinina (WANG *et al.*, 2014), a HDR (*hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase* - EU332141) e ADS (*amorpha-4,11-diene synthase* - AF138959) (OLOFSSON *et al.*, 2011). A análise da expressão do gene dada por PCR mostrou que todas as linhas transgênicas apresentaram níveis de expressão mais elevados de HDR e ADS do que o controle não transgênico. As análises por HPLC de artemisinina demonstraram que as plantas transgênicas de *A. annua* produziram um nível significativamente mais elevado de artemisinina do que as plantas não transgênicas (3,48 vezes) em comparação com as linhas não transgênicas (WANG *et al.*, 2014).

Diante da elevada relevância social, científica, e econômica nacional e internacional da produção de medicamentos derivados da *A. annua*, bem como o conhecimento de seus aspectos agrotecnológicos, farmacológicos e químicos, os compostos sesquiterpênicos presentes na mesma, vem sendo amplamente estudados (RODRIGUES *et al.*, 2006) em busca de plantas mais produtivas (BOLINA, *et al.*, 2013).

Apesar de a pesquisa estar trabalhando há tempos com a espécie, muito ainda há de se buscar dentro dos programas de melhoramento genético a fim de otimizar rendimentos no estabelecimento de plantios comerciais, para a obtenção de seus metabólitos secundários. Não só a artemisinina é foco de atenção nesse aspecto, mas o óleo essencial e os derivados da artemisinina também possuem demanda de mercado, como pôde ser observado.

1.6.1 Poliploidia

Pesquisas têm sido realizadas em busca de duplicação do genoma de plantas selvagens de *A. annua* com o objetivo principal de incrementar a produção de artemisinina e outros biocompostos de interesse na planta. O número original de cromossomos da *Artemisia* é $2n = 2x = 18$, enquanto que em uma planta tetraploide é de $2n = 4x = 36$. Consequentemente, em uma planta hexaploide seria de $2n = 6x = 54$. Mesmo sendo possível a obtenção de plantas com vários níveis de ploidia, o que se observa para essa espécie são trabalhos buscando a duplicação de seu genoma, ou seja, a maioria dos trabalhos encontrados relativos ao assunto usam a manipulação das plantas em busca de plantas tetraploides até então.

A poliploidia pode ser entendida como a existência, em um mesmo núcleo celular, de mais do que dois genomas. Um organismo diploide pode apresentar células ou tecidos poliploides, como na polissomatia, comum nas raízes das leguminosas. A poliploidia é amplamente distribuída nas plantas silvestres e cultivadas e é uma ferramenta utilizada para melhoramento de plantas com objetivos de melhorar a qualidade e porte de plantas, além de ser uma ponte para a transferência gênica entre diferentes níveis de ploidia (WITMANN E DALL'AGNOL, 2013).

Dolatyari, *et al.* (2013) realizaram uma pesquisa citológica em 28 espécies de *Artemisia* oriundas do Irã, todas selvagens, a fim de elaborar o cariótipos dos acessos estudados para avaliar variações citológicas e utilizar esses dados para discutir aspectos evolutivos no gênero *Artemisia*, à luz da mecanismos de variação cromossômica. Nesse diagnóstico foram encontradas espécies de *Artemisia*

diploides, tetraploides e hexaploides. Entretanto, para *A. annua*, foram encontradas somente plantas diploides.

Já Banyai (2010) realizou indução de poliploidia em *A. annua* com o uso de colchicina, verificando que plantas tetraplóides apresentaram maior tamanho do sistema radicular, estômatos e glândulas secretoras (tricomatos) em relação às plantas diploides, com folhas menores, entretanto, mais espessas. Ainda nesse estudo, a linhagem tetraplóide obteve uma concentração do teor de artemisinina de 1,6 vezes maior do que as plantas diplóides. Durante a transição do período de início de florescimento para o florescimento verificou-se 26% de aumento de artemisinina nas plantas diplóides e 111% pelas plantas tetraplóides. Um fator limitante observado nesse estudo foi a capacidade de regeneração das plantas tratadas com colchicina. Quanto maior foi a concentração do tratamento, menor foi a capacidade de regeneração dos tecidos vegetais, sendo que acima de 1% de colchicina não houve emissão de novos brotos.

Confirmou-se a tetraploidia em plantas de *A. annua* tratadas com colchicina, estudadas por Lin et al, (2011), nas quais observou-se maior comprimento dos estômatos mas em menor frequência e o nível médio de artemisinina em plantas tetraplóides foi de 39% a 56% superior às plantas diploides durante o período de vegetação.

Wallaar *et al.* (1999) usaram colchicina para indução de poliploidia em plantas de *A. annua* obtendo tetraploidia. Observaram que nível médio de artemisinina em tetraplóides era 38% mais elevada do que a do tipo selvagem tal como medido ao longo de todo o período de vegetação, em contrapartida o teor médio de óleo essencial das tetraplóides durante este período foi 32% menor. A biomassa média das folhas das plantas tetraplóides foi inferior em comparação com as plantas de tipo selvagem. Por isso, o rendimento por artemisinina tetraplóides m² foi reduzida em 25%. Observou-se nesse estudo que as plantas tetraplóides são menores do que as plantas de tipo selvagem, mas alguns órgãos individuais, como as folhas, foram consideravelmente maiores, e as sementes obtidas por polinização cruzada entre as plantas de *A. annua* tetraplóides tinha um tamanho muito grande.

De Jesus-Gonzales e Weathers (2003) conseguiram plantas tetraploides de *A. annua* com raízes mais espessas e pilosas, entretanto, as plantas diploides

selvagens obtiveram melhor crescimento que as linhas tetraploides.

O que se observa é que com a indução de poliploidia ocorre diminuição do porte da planta de maneira geral, entretanto, órgãos específicos aumentam seu tamanho. Estômatos diminuem sua quantidade nas folhas, entretanto aumentam de tamanho. Os tricomas glandulares diminuem em quantidade, mas aumentam de tamanho compensando a quantidade de óleo produzido. Raízes aumentam em espessura e pilosidade, facilitando a absorção nutricional.

A redução de biomassa pela diminuição do porte da planta é um limitante para obtenção de melhores resultados de rendimento. A pesquisa está voltada principalmente à busca da adequação dos tratamentos com os indutores químicos (colchicina) tanto em concentração como tempo de exposição dos tecidos, objetivando aumentar a sobrevivência das plantas poliploides. Outros níveis de ploidia ainda não são relatados, visto que a tetraploidia ainda apresenta inúmeros desafios a serem vencidos na busca de melhores resultados de rendimento para a espécie.

Segundo Marchese e Figueira (2005), plantas medicinais e aromáticas, tal como *A. annua*, podem ter a constituição de seus compostos secundários afetados, dentre outros fatores, pela variação do número de cromossomos.

A indução de poliploidia, ou seja, aumento no número de cromossomos da planta pode aumentar a produção de compostos medicinais presentes nos vegetais, aumentando a produção de metabolitos secundários em plantas poliplóides quando comparadas com suas plantas-mãe diplóides (DHAWAN e LAVANIA, 1996; DE JESUS-GONZALES e WEATHERS, 2003). Esta técnica também induz outras mudanças desejáveis como o aumento do tamanho de células e dos órgãos vegetativos, vigor reforçado, resistência a pragas e tolerância a estresse (KEHR, 1996; COMAI, 2005; RANNEY, 2006). O processo de poliploidização pode se dar através de inibidores de mitose, substâncias químicas que quebram o fuso acromático durante a divisão celular. Neste caso, os cromossomos, após duplicarem-se, não se movimentam para os polos da célula, ficando esta com o dobro do número de cromossomos que possuía no início do ciclo (SOUZA *et al.*, 1999). O sucesso da poliploidização depende da concentração dos agentes empregados, duração da exposição, tipo de explante e penetrabilidade do material

no tecido (ALLUM *et al.*, 2007). As plantas poliplóides são identificadas por meio de técnicas como análise citogenética, citometria de fluxo, quantidade e tamanho de estômatos e tricomas glandulares (SOUZA *et al.*, 1999; BANYAI, *et al.*, 2010).

A colchicina ($C_{22}H_{25}NO_6$), um alcaloide derivado de bulbos e sementes de *Colchicum autumnale* L. é um dos produtos antimitóticos mais utilizados e conhecidos na indução de poliploidia por via somática em plantas (WITTMANN e DALL'AGNOL, 2003). A indução de poliploidia com colchicina foi testada em cultura de raízes de *A. annua* por De Jesus-Gonzalez e Weathers (2003), para otimização e aumento da produção de artemisinina. Tratamentos usando colchicina numa concentração de 0,25% a 0,5% por 7 dias foram os mais efetivos para aumento de quantidade de artemisinina, porém, sem aumento de biomassa. Um dos clones utilizados produziu 5 vezes mais artemisinina que a variedade diploide.

Em *A. annua*, Banyai (2010), verificou que plantas tetraplóides apresentaram maior tamanho do sistema radicular, estômatos e glândulas secretoras (tricomas) em relação às plantas diploides, com folhas menores, entretanto, mais espessas. Ainda nesse estudo, a linhagem tetraplóide obteve uma concentração do teor de artemisinina de 1,6 vezes maior do que as plantas diplóides. Durante a transição do período de início de florescimento para o florescimento verificou-se 26% de aumento de artemisinina nas plantas diplóides e 111% pelas plantas tetraplóides.

Confirmou-se a tetraploidia em plantas de *A. annua* tratadas com colchicina, estudadas por Lin *et al.*, (2011), nas quais observou-se maior comprimento dos estômatos mas em menor frequência e o nível médio de artemisinina em plantas tetraplóides de 39% a 56% superior às plantas diploides durante o período de vegetação.

Estudos sobre indução de poliploidia em *A. annua* ainda são necessários para que se obtenham plantas selecionadas e registradas com características produtivas de rendimento elevado, podendo atender a demanda no mercado de fármacos nacional e internacional crescente e carente de matéria-prima nacional.

1.7 Genes Alvo para Análise da Expressão Gênica em *A. annua*

Pesquisas já foram realizadas buscando identificar os genes responsáveis pela produção de artemisinina em *Artemisia annua*. Várias são as enzimas responsáveis pela biossíntese da artemisinina, sendo que Graham *et al.* (2010) realizaram uma pesquisa de sequenciamento detalhada sobre o transcriptoma de *A. annua* para identificar genes e marcadores que possam agilizar o processo de reprodução e multiplicação da espécie. A grande variabilidade genética encontrada nos genótipos permitiu construir um mapa genético detalhado com nove grupos de ligação. Foram identificados locos quantitativos controladores de caracteres (QTLs) possibilitando a construção de um mapa que representa uma quantidade significativa da variação nas características fundamentais que controlam o rendimento de artemisinina. Foi utilizado o híbrido F1 Artemis (Mediplant) sendo que foram realizados cruzamentos entre dois genótipos heterozigotos, chamados C4 e C1. Foram identificados QTLs estáveis para a concentração de artemisinina em C4 LG1, LG4, e LG9, que podem ser visualizados na Figura 12.

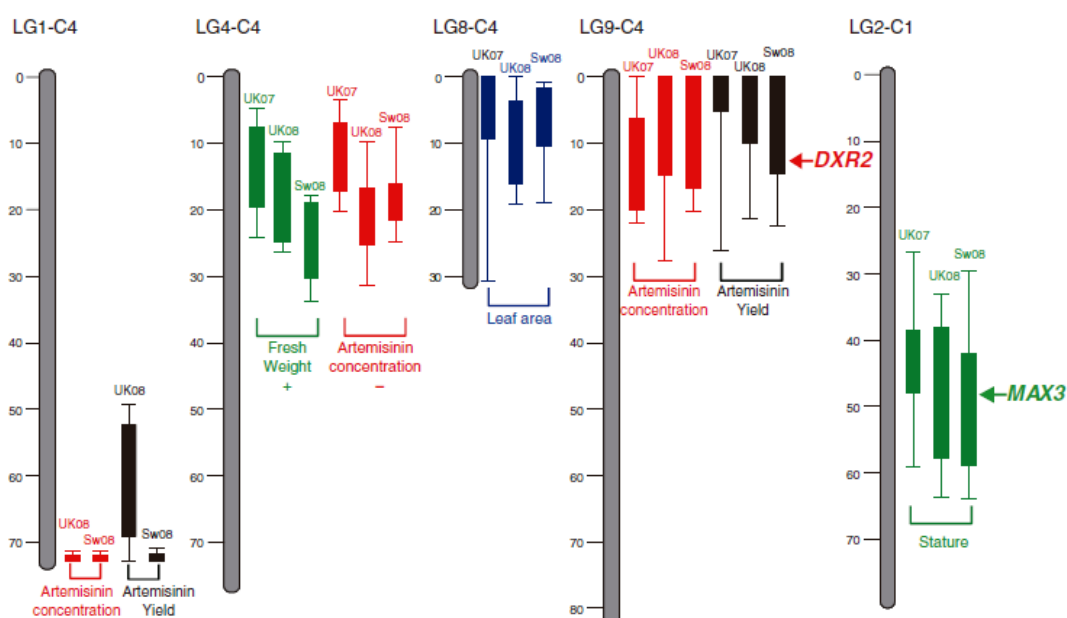


Figura 12 - Identificação de QTLs para identificação de caracteres-chave. QTLs são mostrados para a concentração de artemisinina (em vermelho), o rendimento de artemisinina (artemisinina concentração × massa fresco) (em preto), arquitetura (massa fresca e estatura) (em verde), e área foliar (em azul). Genes candidatos associados com QTLs são DXR2 (1-Deoxy-DXylulose 5-phosphate Reductoisomerase 2) e MAX3 (More Axillary Branching 3). Fonte: Graham *et al.* (2010)

O rendimento de artemisinina é um produto da concentração de artemisinina e massa fresca, portanto, os QTLs LG1 e LG9, representam informações importantes para um programa de melhoramento.

Os genes candidatos ao melhoramento genético, segundo os autores Graham *et al.* (2010), foram identificados em relação ao rendimento de artemisinina e relacionados a arquitetura da planta. O gene DXR2 (*1-Deoxy-DXylulose 5-phosphate Reductoisomerase 2*) associado ao QTL para rendimento de artemisinina e MAX3 com o QTL para estatura de planta.

Tang *et al.* (2013), afirmam que uma das enzimas chave envolvidas na via biossintética da artemisinina é a ADS (*Amorpha-4,11-diene synthase* - AF1389590) (OLOFSSON *et al.*, 2011). O ponto de ramificação que alterna farnesil difosfato (FPP) para a biossíntese de artemisinina é catalisado por essa enzima. ADS é considerada a primeira limitante da velocidade da via biossintética da artemisinina. Investigando o promotor do gene ADS, dois grupos revelaram que o gene ADS foi especificamente expresso em células dos tricomas glandulares. A artemisinina é produzida e armazenada nos tricomas glandulares de *A. annua* sendo, portanto, ADS um alvo razoável para engenharia metabólica da artemisinina.

Outra enzima chave na biossíntese da artemisinina é o 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMGR), com derivações HMG-CoA para a via isoprenóide. Tem sido demonstrado que a atividade HMGR limita a biossíntese de artemisinina e seu acúmulo em plantas de *A. annua*. Além disso, o gene de *A. annua* HMGR também provou ser importante na biologia sintética que produz ácido artemisínico, um precursor da artemisinina (TANG *et al.*, 2014).

A citocromo P450 mono-oxigenase (CYP71AV1) é uma sesquiterpeno-oxidase multifuncional que também possui um papel chave na biossíntese de artemisinina: ela converte amorfa-4,11-dieno para ácido artemisínico, álcool artemisínico e aldeído artemisínico. Citocromo P450 oxidoreductase (CPR) também foi isolada a partir de *A. annua*, e tem ação redox conjunta a CYP71AV1 catalisando a conversão de amorfa-4,11- dieno. Como a ADS, CYP71AV1 é também especificamente expressa em tricomas glandulares de *A. annua* (WANG *et al.* 2011b, 2013.).

Estudos tem relatado que a transcrição do gene CYP71AV1 reduz significativamente quando as plantas são pulverizadas com a artemisinina ou ácido artemisínico. Para melhorar o conteúdo de artemisinina, genes de CYP71AV1 (*Cytochrome P450 monooxygenase*) e CPR (*Cytochrome P450 oxidoreductase*) clonados a partir de *A. annua* e com super expressão induzida por promotores CaMV35S foram introduzidos em *A. annua*, e teor de artemisinina em linhagens transformadas foi 38% maior do que nos controles não transformados. Estes estudos demonstram que a transformação induziu a co-superexpressão dos genes CYP71AV1 e CPR podendo aumentar, portanto, o teor de artemisinina em *A. annua* (TANG *et al.*,2014).

2 *Artemisia annua* L. : RESPOSTA À APLICAÇÃO DE COLCHICINA NO TEOR DE ARTEMISININA E INDUÇÃO DE POLIPLOIDIA

ZANMARIA, Silvia Leticia. *Artemisia annua*: Resposta à Aplicação de Colchicina no teor de Artemisinina e Indução de Poliploidia. 21f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2016.

2.1 RESUMO

Artemisia annua L., é uma espécie vegetal herbácea nativa da Ásia que possui folhas aromáticas contendo vários compostos, dentre eles artemisinina, uma lactona sesquiterpênica que tem demonstrado eficácia contra doenças como câncer e doenças parasitárias como a malária. A combinação terapêutica à base de artemisinina é o tratamento mais efetivo contra esta doença, aumentando a demanda pelos compostos sintetizados pela planta. Para atender esta demanda, técnicas de melhoramento genético podem ser utilizadas para obtenção de genótipos com maior rendimento dessa biomolécula. O objetivo deste estudo, portanto, foi obter resposta à aplicação de colchicina no teor de artemisinina e indução de poliploidia em plantas de *Artemisia annua* L. Sementes de *A. annua* foram submetidas a cinco doses de colchicina (0%, 0,05%, 0,1%, 0,15% e 0,2%) em cinco tempos diferentes (6, 12, 18, 24 e 30 horas), em delineamento inteiramente casualizado, sendo cada semente considerada uma repetição. Foram realizadas avaliações agrônômicas - altura da planta (Ht, m); altura do dossel (Hd, m); diâmetro da seção inferior do dossel (Di, m); diâmetro da seção média do dossel (Dm, m); diâmetro da seção superior do dossel (Ds, m); número de ramificações (NR), volume do dossel (Vd, m³), massa seca de folhas (MSF, g), massa seca de caule (MSC, g), relação Folha/Caule (F/C), avaliações fisiológicas - taxa de assimilação de CO₂ (PHOTO, μmol CO₂ m⁻² s⁻¹), condutância estomática (Cond, mol H₂O m⁻² s⁻¹), taxa de transpiração (Tr, mmol H₂O m⁻² s⁻¹) e eficiência no uso de água (WUE, %) e avaliações fitoquímicas – teor de óleo essencial (OE, %) e teor de artemisinina (ART, %). Não houve efeito no uso da colchicina para os parâmetros agrônômicos e fisiológicos avaliados. Não foi possível afirmar se houve poliploidização das sementes tratadas, porém foi observado efeito positivo da dose 0,10% de colchicina no teor de artemisinina com teor máximo de 0,60 %.

Palavras-chave: Malária, metabólitos secundários, poliploides.

***Artemisia annua* L.: RESPONSE TO THE APPLICATION OF COLCHICINE IN THE CONTENT OF ARTEMISININ AND INDUCTION OF POLYPLOIDY**

ZANMARIA, Silvia Leticia. *Artemisia annua* L: Response to the Application of Colchicine in the Content of Artemisinin and Induction of Polyploidy. 21f. Thesis (Ph.D. in Agronomy) Graduate Program in Agronomy (Concentration Area: Crop), Federal University of Technology Paraná. Pato Branco, 2016.

2.2 ABSTRACT

Artemisia annua L., is a native herbaceous plant species from Asia that has aromatic leaves containing various compounds, including artemisinin a sesquiterpene lactone that has demonstrated efficacy against diseases like cancer and parasitic diseases such as malaria. The therapeutic combination artemisinin based is the most effective treatment against this disease, increasing demand for the compounds synthesized by the plant. To meet this demand, breeding techniques can be used to obtain genotypes with higher yield this biomolecule. The purpose of this study, therefore, was an answer to the application of colchicine in the artemisinin content and polyploidy induction in plants. *A. annua* seeds were treated with five doses of colchicine (0%, 0.05%, 0.1%, 0.15% and 0.2%) in five different times (6, 12, 18, 24 and 30 hours), in a randomized design. Agronomic evaluations were carried out - plant height (Ht, m); canopy height (Hd, m); diameter of the lower section of the canopy (Di, m); diameter of the middle section of the canopy (Dm, m); diameter of the upper section of the canopy (Ds, m); number of branches (NR), canopy volume (Vd, m³) Mass Weight Dry (PMS, g), Stem Dry weight (PCS, g), leaf / stem ratio (F / C), physiological assessments - rate CO₂ assimilation (PHOTO CO₂ mmol m⁻² s⁻¹), stomatal conductance (Cond mol H₂O m⁻² s⁻¹), transpiration rate (E, mmol H₂O m⁻² s⁻¹) and efficiency water usage (WUE%) and phytochemical reviews -essential oil content (OE%) and artemisinin content (ART%). There was no effect on the use of colchicine for the agronomic and physiological parameters evaluated. It was not possible to confirm if there was polyploidization of the treated seeds, but a positive effect of the 0.10% dose of colchicine was observed in the artemisinin content with a maximum content of 0.60%.

Key words: Malaria, secondary metabolites, polyploid.

2.3 INTRODUÇÃO

A *Artemisia annua* L. é nativa da Ásia sendo introduzida no Brasil no final da década de 80, através de sementes oriundas da Europa e da China (MAGALHÃES, 1996), sendo então aclimatada nas regiões de clima subtropical e temperado do Brasil, esta espécie é caracterizada como sendo uma planta aromática, de fecundação cruzada (MAGALHÃES, 1999), de dias curtos possuindo fotoperíodo crítico de aproximadamente 13 horas (MARCHESE, 2006; MAGIERO *et al.*, 2009), multiplicando-se por sementes ou vegetativamente sendo caracterizada como uma espécie diploide com genoma $2n=18$ (LIN *et al.*, 2011).

Esta espécie vem ganhando destaque no meio científico. Devido à produção de compostos medicinais úteis para a medicina e indústria, estudos estão demonstrando resultados positivos no combate à malária e também no combate ao câncer, com resultados efetivos e positivos sobre a citotoxicidade às células cancerígenas (LAI, 2006; IVANESCU, 2014). Além disso, por se tratar de uma planta aromática seu óleo essencial é utilizado pela indústria na confecção de perfumes e cosméticos (MAGALHÃES, 2004) e também na medicina, dentre algumas áreas, para controle de obesidade (HWANG *et al.*, 2016), no controle de algumas estirpes de *Candida spp.* (SANTOMAURO *et al.*, 2016), no combate à Leishmaniose visceral (ISLAMUDDIN, *et al.*, 2014). Também apresenta ação inseticida (JAIN *et al.*, 1996; BAGCHI *et al.*, 2003) e efeito alelopático em algumas plantas cultivadas e plantas daninhas (MAGIERO *et al.*, 2009; MORVILLO *et al.*, 2011).

A artemisinina, composto medicinal produzido pela planta, é uma lactona sesquiterpênica (RODRIGUES *et al.*, 2006), que ao ser combinada com outras moléculas como a mefloquinina apresenta um efeito muito significativo para o controle da malária (WHO, 2014). As maiores concentrações dessas moléculas são encontradas nas folhas e inflorescências da *A. annua* (FERREIRA, 1980), isso porque a artemisinina é armazenada nos tricomas glandulares da planta (ZHANG *et al.*, 2006).

Devido ao aumento da demanda pela molécula, tem-se a necessidade de impulsionar a produção destes compostos, através do aumento da produção das plantas ou, além disso, aumentar o rendimento desses biocompostos na planta.

Para isso, técnicas de melhoramento genético vêm sendo utilizadas, como por exemplo, o uso de inibidores de mitose, como a colchicina. A colchicina ($C_{22}H_{25}NO_6$), um alcaloide derivado de bulbos e sementes de *Colchicum autumnale* L. é um dos produtos antimitóticos mais utilizados e conhecidos na indução de poliploidia por via somática em plantas (WITTMANN e DALL'AGNOL, 2003). Ela inibe o fuso acromático, resultando em núcleos com mais de dois genomas, tendo o dobro de cromossomos que uma célula normal (SOUZA, 1999). Plantas como a *A. annua* podem ser afetadas quanto aos metabolitos secundários pela alteração cromossômica, o que explica o presente estudo, tendo em vista que essa alteração pode gerar um ganho na produtividade dos compostos medicinais (MARCHESI, 2005).

Vários estudos comprovam o aumento do teor de artemisinina com o uso de colchicina. De Jesus-Gonzalez e Weathers (2003), para otimização e aumento da produção de artemisinina utilizou a colchicina no tratamento de raízes. Tratamentos usando colchicina numa concentração de 0,25% a 0,5% por 7 dias foram os mais efetivos para aumento de quantidade de artemisinina. Em sementes embebida em solução de colchicina sementes de espécies ornamentais africanas de *Watsonia* durante 24, 48 e 72 horas foi observado resultado positivo de ploidia em até 60% das sementes germinadas com exposição à colchicina de 72 horas (THOMPSON, et al, 2010).

Já Banyai (2010) realizou indução de poliploidia em *A. annua* com o uso de colchicina, verificando que plantas tetraplóides apresentaram maior tamanho do sistema radicular, estômatos e glândulas secretoras (tricomas) em relação às plantas diploides, com folhas menores, entretanto, mais espessas. Ainda nesse estudo, a linhagem tetraplóide obteve uma concentração do teor de artemisinina de 1,6 vezes maior do que as plantas diplóides. Durante a transição do período de início de florescimento para o florescimento verificou-se 26% de aumento de artemisinina nas plantas diplóides e 111% pelas plantas tetraplóides.

Portanto, para obtenção de genótipos com maior rendimento de metabólitos secundários, o objetivo deste estudo foi obter resposta à aplicação de colchicina no teor de artemisinina e indução de poliploidia em plantas de *Artemisia annua* L.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

A indução de poliploidia foi testada em sementes de *A. annua* variedade *Artemis* em F2 - Médiplant, com a utilização de colchicina.

As sementes de *A. annua* foram embebidas em água destilada e centrifugadas por cinco minutos e armazenadas até obterem massa constante. Para tanto, foi realizado previamente teste para estabelecer o tempo de embebição para massa constante. A massa de mil sementes secas de *A. annua* (0,056g) colocadas em microtubo (volume 1,5 mL) adicionado 1 mL água destilada e pesada a amostra a cada 15 minutos até obter massa constante. Determinou-se que o tempo para embebição foi de 50 minutos até atingir massa constante. Após definido o tempo de embebição, as sementes foram embebidas em solução de colchicina (0%, 0,05%, 0,10%, 0,15% e 0,2%) durante 6, 12, 18, 24 e 30 horas, totalizando 25 tratamentos com 30 sementes cada, em delineamento inteiramente casualizado, caracterizando fatorial 5 x 5. Após a exposição as sementes (Figura 13A) foram transferidas para placas de Petri (Figura 13B) com uma camada de papel filtro umedecido em água destilada e armazenados em câmara incubadora com controle de temperatura e fotoperíodo (T° de $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas) até a germinação. Posteriormente as plântulas sobreviventes de cada tratamento foram transplantadas em embalagem plástica transparente contendo areia autoclavada e irrigadas com solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950) (Figura 13C, D).

Quando as plantas atingiram 5 cm foram transplantadas individualmente para copos plásticos transparentes contendo substrato orgânico esterilizado (Figura 13E) e irrigado com solução nutritiva sendo mantidas em câmara de crescimento com ambiente controlado (24°C e fotoperíodo de 16 h) até a época de plantio da espécie, que ocorre na segunda quinzena de setembro até a primeira quinzena de outubro para a região sudoeste do Paraná (MARCHESE, 2006). No dia 09 de outubro de 2015, as plantas foram transplantadas em vasos plásticos de 5 litros (Figura 13F, G), contendo solo e areia, numa proporção de 70-30% e adubado conforme análise de solo e recomendação da SBCS (2009).

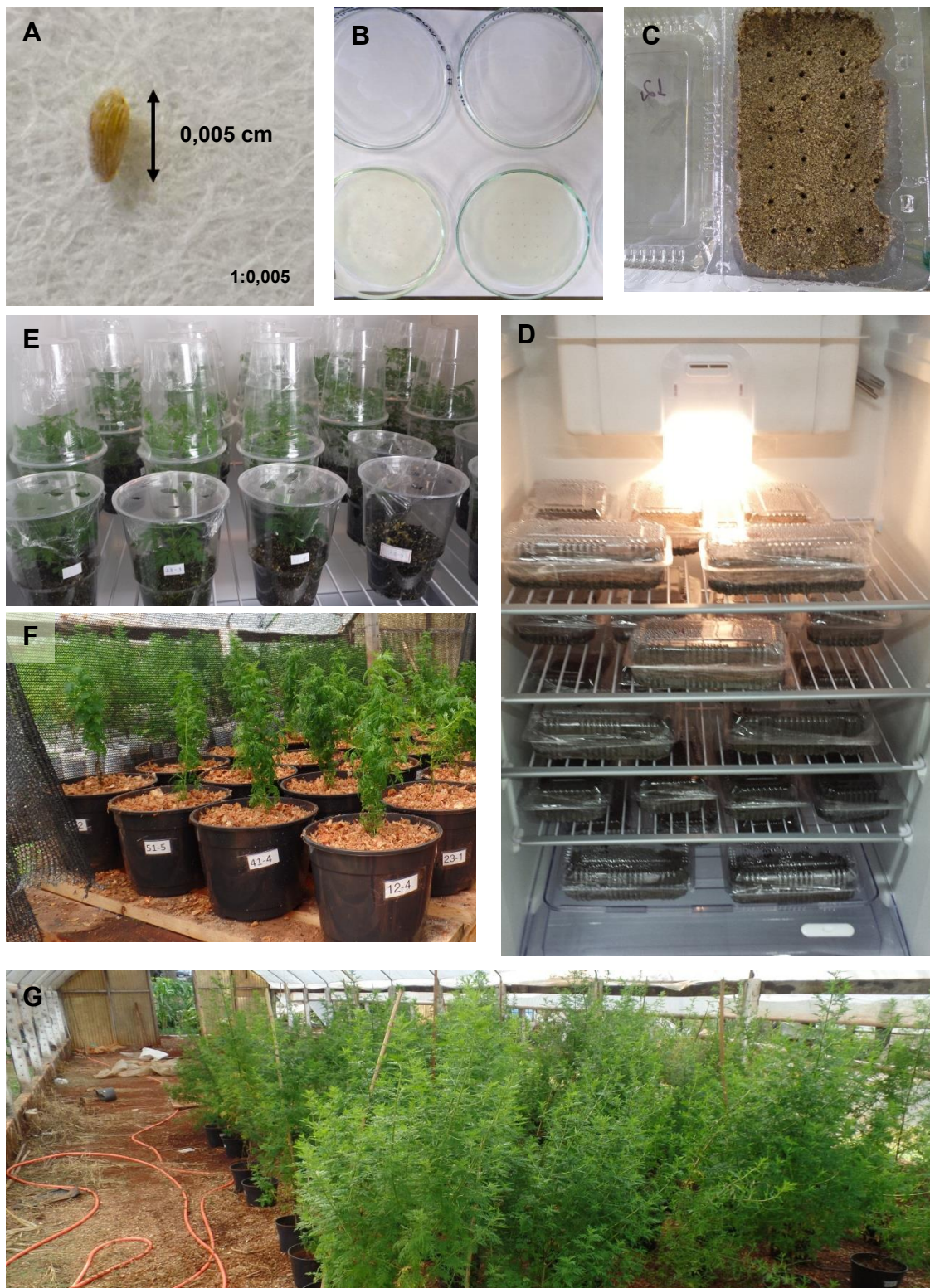


Figura 13 – Estabelecimento e condução do experimento de indução de poliploidia. A) Semente de *A. annua* na escala de 1:0,005. B) Instalação do experimento de *A. annua* com tratamentos de colchicina, colocadas em placas de petri. C) Bandeja plástica onde foram transplantadas as plântulas de artemisia. D) Desenvolvimento das plantas de *A. annua* em ambiente controlado de temperatura, fotoperíodo e UR%. E) Transplante das plantas para copos individuais. F) Transplante das plantas para vasos em casa de vegetação. G) Plantas distribuídas em casa de vegetação para desenvolvimento até a colheita.

2.4.1 Análise da densidade tamanho dos estômatos

Para confirmar a poliploidização foram realizadas análises morfológicas de tamanho e quantidade de estômatos da epiderme.

Para o estudo da densidade estomática foi utilizado o método descrito por Voleníková e Tichá (2001), que consiste em cobrir as superfícies foliares com uma camada de esmalte incolor, que ao se solidificar retrata a imagem da superfície da folha. As camadas de esmalte foram aplicadas nas regiões apical, mediana e basal de uma das folhas mais velhas de cada planta, completamente expandida, de coloração e aspecto uniformes, nas superfícies adaxial e abaxial (CABRAL *et al.*, 2004). Após secas, as camadas de esmalte foram removidas e montadas em lâminas, em seguida levadas para microscópio binocular com aumento de 400 vezes. Foram analisadas áreas área de 1mm^2 , obtida com auxílio de uma ocular milimetrada. Para cada planta, foi realizada a contagem de estômatos em três folhas por planta, três regiões (região do topo, mediana e basal da planta) e em duas superfícies, totalizando 09 contagens por planta. Os estômatos foram aferidos transversalmente (largura) e longitudinalmente (comprimento) na sua região mediana em microscópio Olympus® BX41 lente wh10X/22 e micrômetro com aumento de 40X e fator de conversão ($\times 2,49 \mu\text{m}$).

2.4.2 Avaliações Agronômicas

As avaliações agronômicas foram realizadas quando as plantas atingiram seu período de pré-florescimento, ou seja, no período da emissão dos botões florais, que ocorreu na primeira semana de março de 2016.

Os parâmetros analisados foram altura da planta (Ht, m); altura do dossel (Hd, m); diâmetro da seção inferior do dossel (Di, m); diâmetro da seção média do dossel (Dm, m); diâmetro da seção superior do dossel (Ds, m); número de ramificações (NR), volume do dossel (Vd, m^3), Massa Seca de Folhas (MSF, g), Massa Seca de Caule (MSC,g), relação Folha/Caule (F/C). O volume do dossel foi estimado pela equação $Vd = \pi Di^2 Hd / 12$, conforme metodologia utilizada por Favarin *et al.* (2002).

2.4.3 Avaliações Fisiológicas

As avaliações fisiológicas foram realizadas no período de pré-florescimento da espécie, ou seja, no período da emissão dos botões florais. As variáveis fisiológicas avaliadas foram taxa de assimilação de CO₂ (PHOTO, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (Cond, $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), taxa de transpiração (Tr, $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e eficiência no uso de água (WUE, %). A avaliação das trocas gasosas foi realizada utilizando-se um sistema de medição de trocas gasosas, equipado com um analisador infravermelho de gases (IRGA) com injetor automático de CO₂ e fonte artificial de luz vermelho e azul. As mensurações foram realizadas próximo às 10 horas da manhã utilizando as folhas jovens, medianas e velhas do dossel da planta.

2.4.4 Avaliações Fitoquímicas

Quando mais de 50% das plantas iniciaram o florescimento foi realizada a colheita. Isso ocorreu em 25 de março de 2016. As plantas foram cortadas, separados os ramos das folhas e colocados para secar até massa constante em estufa com circulação de ar e temperatura de 35°C. Após secagem foram pesadas as frações de massa seca e caule seco e separadas amostras para realização das análises fitoquímicas. Os caracteres fitoquímicos avaliados foram: teor de óleo essencial (OE, %) e teor de artemisinina (ART, %).

O teor de óleo essencial de *Artemisia annua* foi estimado pela extração por hidrodestilação, onde 50 g de massa seca de folhas de cada genótipo das plantas poliploides de *A. annua* foram transferidas para um balão de 2 L contendo 1,5 L de água destilada, acoplado a um sistema Clevenger, onde foi realizada a hidrodestilação durante 3 horas após o início da condensação. Depois de aferir o volume de óleo extraído, foi armazenado hermeticamente em vidros âmbar em geladeira a 4° C.

Para quantificação do teor de artemisinina em *A. annua*, o processo foi realizado em duas etapas.

Inicialmente, os extratos foram obtidos a partir de 0,3 g de folhas secas e moídas extraídas com 5 mL de acetato de etila por 3 minutos em Politron e centrifugados por 20 minutos. O extrato separou-se em duas frações, sendo retirados 4 ml do extrato da fração aquosa. A fração foi evaporada à secura sob vácuo em evaporador rotativo.

As amostras foram ressuspensas em balão volumétrico de 5 mL com metanol grau CLAE, filtradas e analisadas em triplicata em cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado ao detector de índice de refração por CLAE/IR. Foi utilizado um cromatógrafo líquido Waters, bomba Waters 515, válvula injetora Rheodyne, com alça de amostragem de 20 µl. O sistema foi acoplado a um detector de índice de refração Waters 2414; temperatura interna do detector 35 °C. Os dados cromatográficos foram analisados usando-se software Empowerpro build 1154/Waters. Foi utilizada coluna com fase estacionária ciano, Luna CN 5 µm 250 x 4,6 mm; fase móvel H₂O:Metanol (60:40 v/v); modo isocrático e vazão 1,0 mL/min. As quantificações do teor de artemisinina dos extratos foram realizadas utilizando a metodologia validada desenvolvida por Celeghini (2009), a partir do método do padrão externo.

Os dados foram verificados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e homoscedasticidade das variâncias pelo teste de Bartlett. Após os dados foram submetidos à análise de variância e foi realizada análise de regressão para as doses. O programa estatístico utilizado foi o Genes (CRUZ, 2013).

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na presente pesquisa, foram observadas diferenças significativas nas avaliações fitoquímicas, não sendo registrada interação entre tempo e dose entre os tratamentos. Pela análise de variância, considerando o parâmetro de rendimento (teor de artemisinina, %) observou-se diferença significativa ($p < 0,01$) somente para o fator dose. Para os parâmetros agrônômicos e fisiológicos não foi observada diferença entre os tratamentos.

As análises morfológicas foram realizadas buscando confirmar a ocorrência de poliploidização, sendo avaliados tamanho e quantidade de estômatos. Para tanto, também nessas análises não foram observadas diferenças estatísticas.

2.5.1 Avaliações Morfológicas

Observando a Tabela 2, a taxa de sobrevivência das plantas em relação às doses de colchicina foi decrescente. Para a dose de 0,20% de colchicina, com exposição das sementes nos tempos de 18, 24 e 30 apresentaram taxa de sobrevivência de 0% apresentando, portanto, efeito citotóxico da colchicina para as sementes, o mesmo ocorrendo com a dose inferior, de 0,15% de colchicina com maiores tempos de exposição, ou seja, 24 e 30 horas.

Tabela 2 – Taxa de sobrevivência das plantas de *A. annua* tratadas com diferentes doses de colchicina e diferentes tempos de exposição.

Dose de Colchicina (%)	Tempos de exposição (h)					TOTAL de plantas	Taxa de sobrevivência (%)
	6	12	18	24	30		
0,00	8	6	3	7	8	32	21,33%
0,05	5	11	0	1	1	17	11,33%
0,10	1	11	2	1	2	17	11,33%
0,15	6	4	2	0	0	12	8,00%
0,20	9	1	0	0	0	10	6,67%

Zanmaria, UTFPR, Campus Pato Branco, 2016.

Para o fator tempo de exposição, não houve efeito significativo para o teor de artemisinina, pois este parâmetro foi avaliado considerando somente as plantas

sobreviventes.

As plantas tratadas com maiores doses de colchicina apresentaram menor desenvolvimento que as tratadas com doses menores (Figuras 14 C,D comparadas com Figuras A,B,C). Isso também ocorreu no ensaio de De Jesus-Gonzales & Weathers (2003), que obtiveram plantas tetraploides de *A. annua* com raízes mais espessas e pilosas, entretanto, as plantas diploides selvagens obtiveram melhor crescimento que as linhas tetraploides expostas à ação do antimitótico.

Ainda, a maioria dos estudos com colchicina em sementes utiliza doses antimitótico correspondendo ao tamanho das sementes das espécies trabalhadas. Mendes (1947), em seus primeiros estudos testando métodos de tratamento com colchicina utilizou doses de até 0,6% em sementes de *Coffea*, ou seja, dose maior para sementes de maior porte. Considerando que as sementes de artemisia possuem tamanho de 0,5 mm (MAGALHÃES, 1999), doses menos concentradas foram utilizadas a fim de reduzir a mortalidade por toxicidade nas sementes.

Como a colchicina é utilizada como antimitótico e mutagênico e caracteriza-se como um alcaloide ($C_{22}H_{25}NO_6$), derivado de bulbos e sementes de *Colchicum autumnale* L. (WITTMANN, 2003), em concentrações adequadas pode induzir à poliploidia ou também a mutações em nível somático, com resultados positivos ou negativos para as plantas. Apesar de induzir as plantas sobreviventes à maior produção de metabólitos secundários, também causa dificuldade de regeneração. Banyai (2010), afirma que um fator limitante observado é a capacidade de regeneração das plantas tratadas com colchicina. Quanto maior a concentração do tratamento, menor a capacidade de regeneração dos tecidos vegetais, sendo ainda que, em seu estudo, em doses acima de 1% de tratamento com colchicina não obteve emissão de novos brotos nas plantas.

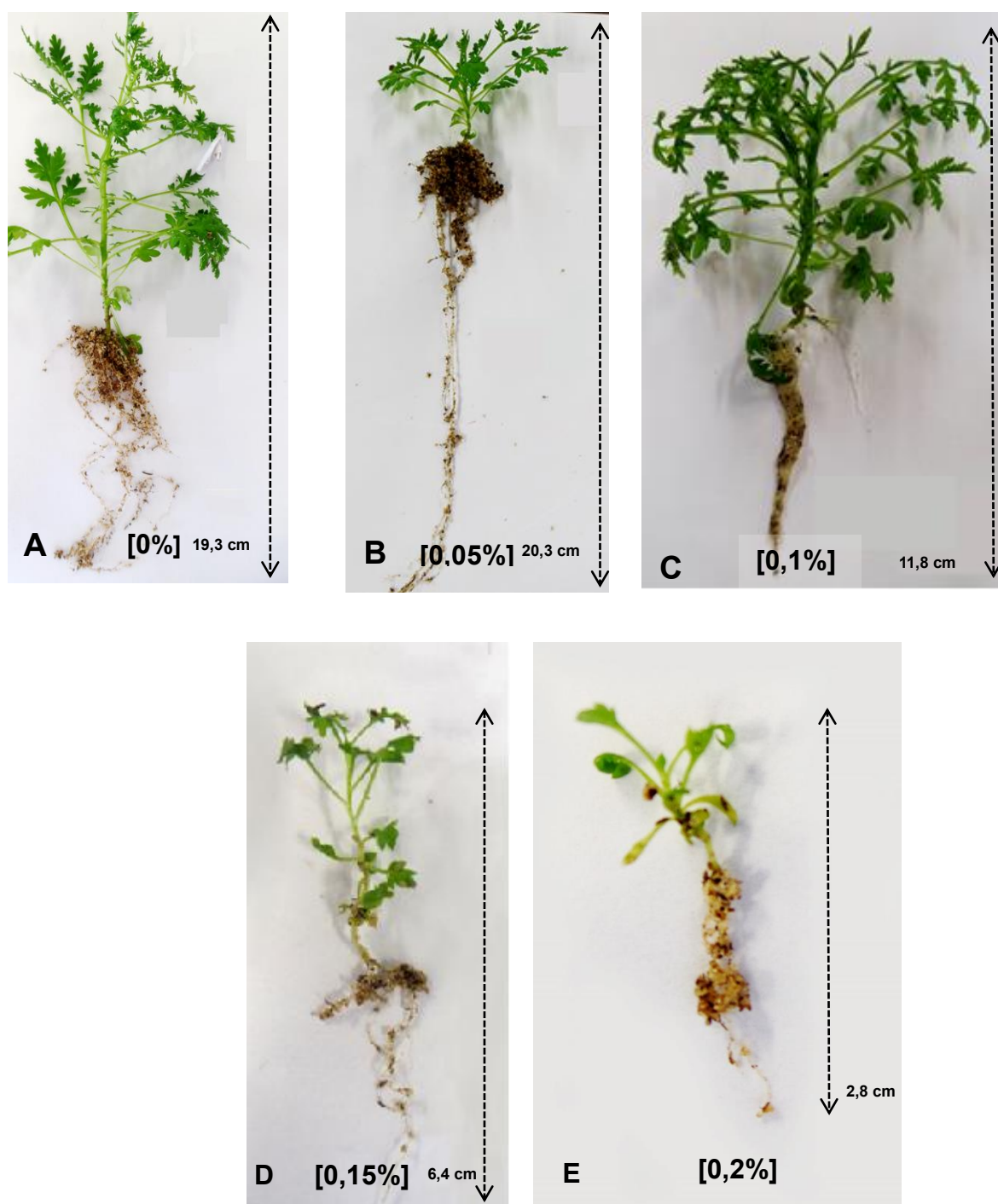


Figura 14 – Tamanho de plantas de *A. annua* tratadas com diferentes doses de colchicina. A) Planta 11-1: tratamento com 0% de colchicina; B) Planta 23-3: tratamento com 0,05% de colchicina; C) Planta 31-1: tratamento com 0,10% de colchicina; D) Planta 41-4: tratamento com 0,15% de colchicina; e) dose de 0,20% de colchicina.

Fonte: Zanmaria,UTFPR, Campus Pato Branco, 2016.

Além disso é importante ressaltar que as mutações metafásicas induzidas nesse processo são de raro sucesso. Poucas são as plantas induzidas que atingem

a duplicação do genoma (MENDES, 1947; JESUS-GONZALES e WEATHERS, 2003, BANYAI, 2010; LIN, 2011). O tratamento de sementes com soluções de colchicina possui a dificuldade de a semente estar envolvida em um endosperma. Nesse caso, existem duas possibilidades de metodologia que podem ser lançadas mão: induzir as sementes em seu processo de germinação, tornando facilitada a ação da solução do alcaloide sobre o embrião já em sementes germinadas, aumentando as chances de se obter plantas com número duplicado de cromossomos (MENDES, 1947), ou ainda, como foi testado, considerar tempos de exposição das sementes à solução. Como foi observado nesse estudo, não houve diferença do tempo de exposição para o teor final de artemisinina para as plantas. O que pode ter ocorrido foi a dificuldade da solução entrar em contato com o embrião da semente, e ter ficado concentrada no endosperma, gerando, além disso, toxicidade à semente no caso dos tratamentos com maior tempo de exposição; outro aspecto a ser considerado é que as sementes de *artemisia* ficaram embebidas em água até atingirem seu peso constante, para que o processo de germinação também pudesse iniciar. A embebição da semente em água é fundamental para que o processo de germinação possa ocorrer. Inicialmente a semente foi colocada em água para que ocorresse embebição completa, ou seja, quando a semente atinge peso constante. Entretanto, uma hipótese que pudesse ter facilitado o processo seria aumentar o intervalo de embebição da semente em água, o que poderia ser uma condição favorável à atuação da solução da colchicina no embrião, aumentando as chances de duplicação do genoma das sementes.

Para número, largura e comprimento de estômatos não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos (Tabela 3). Esse parâmetro também é de extrema relevância para considerar a incidência de poliploidia. Plantas tetraploides apresentam menor número de estômatos nas folhas com maior tamanho. Lin *et al.* (2011) confirmou a tetraploidia em plantas de *A. annua* tratadas com colchicina, nas quais observou maior comprimento dos estômatos mas em menor frequência. Nas figuras 15 e 16 observa-se contagem de estômatos da face abaxial e adaxial respectivamente de plantas de *A. annua* tratadas com as cinco doses do antimitótico, podendo-se constatar regularidade de tamanho (comprimento e largura) entre os tratamentos.

Tabela 3 – Médias e desvio padrão do número, largura e comprimento de estômatos da face abaxial e adaxial de folhas de *A. annua* L., considerando os tratamentos de dose de colchicina e tempos de exposição.

Dose de colchicina (%)	Tempo (horas)									
	6		12		18		24		30	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Número de Estômatos na Face Adaxial										
0.00	1.83	0.71	1.00	.	2.17	1.26	4.44	4.35	1.00	0.47
0.05	2.58	1.42	1.25	1.42	1.22	1.26	4.00	.		
0.10	1.33	.	2.33	2.38	3.50	2.12				
0.15	4.89	2.36	5.17	1.18	1.83	2.12				
0.20	1.58	0.74								
Número de Estômatos na Face Abaxial										
0.00	24.50	8.25	29.67	.	25.92	2.44	24.78	9.76	26.67	4.71
0.05	24.75	9.63	28.17	4.00	21.44	7.12	34.67	.		
0.10	17.33	.	30.13	8.86	18.83	0.24				
0.15	33.22	4.55	28.17	7.78	20.83	5.89				
0.20	25.42	7.05								
Largura dos Estômatos (µm) na Face Adaxial										
0.00	12.03	0.60	13.27	.	15.36	2.59	15.49	1.72	15.36	0.60
0.05	14.94	1.52	14.32	0.42	13.00	0.47	12.45	.		
0.10	14.94	.	13.60	2.27	14.94	0.00				
0.15	14.67	0.47	13.70	0.60	14.12	0.00				
0.20	15.56	1.72								
Largura dos Estômatos (µm) na Face Abaxial										
0.00	14.94	2.34	13.27	.	15.56	0.42	14.94	1.44	13.70	0.60
0.05	15.99	2.99	14.32	4.13	14.12	0.82	14.94	.		
0.10	14.12	.	13.70	1.82	14.94	1.17				
0.15	14.12	0.82	15.36	1.77	16.61	0.00				
0.20	15.36	1.72								
Comprimento dos Estômatos (µm) na Face Adaxial										
0.00	23.66	2.94	24.90	.	25.95	5.80	27.12	5.33	24.48	1.77
0.05	24.28	1.84	26.77	2.07	26.29	1.27	24.90	.		
0.10	27.39	.	24.60	3.06	29.46	2.94				
0.15	24.90	0.82	22.41	3.51	26.15	5.28				
0.20	28.44	4.41								
Comprimento dos Estômatos (µm) na Face Abaxial										
0.00	25.32	0.60	25.72	.	25.95	0.80	26.29	3.93	24.90	2.34
0.05	24.28	3.14	24.70	2.74	24.90	1.67	25.72	.		
0.10	24.90	.	22.73	2.42	23.23	2.34				
0.15	25.45	2.54	24.08	5.88	26.15	0.60				
0.20	26.77	1.42								

Fonte: Zanmaria, UTFPR, Campus Pato Branco, 2016.

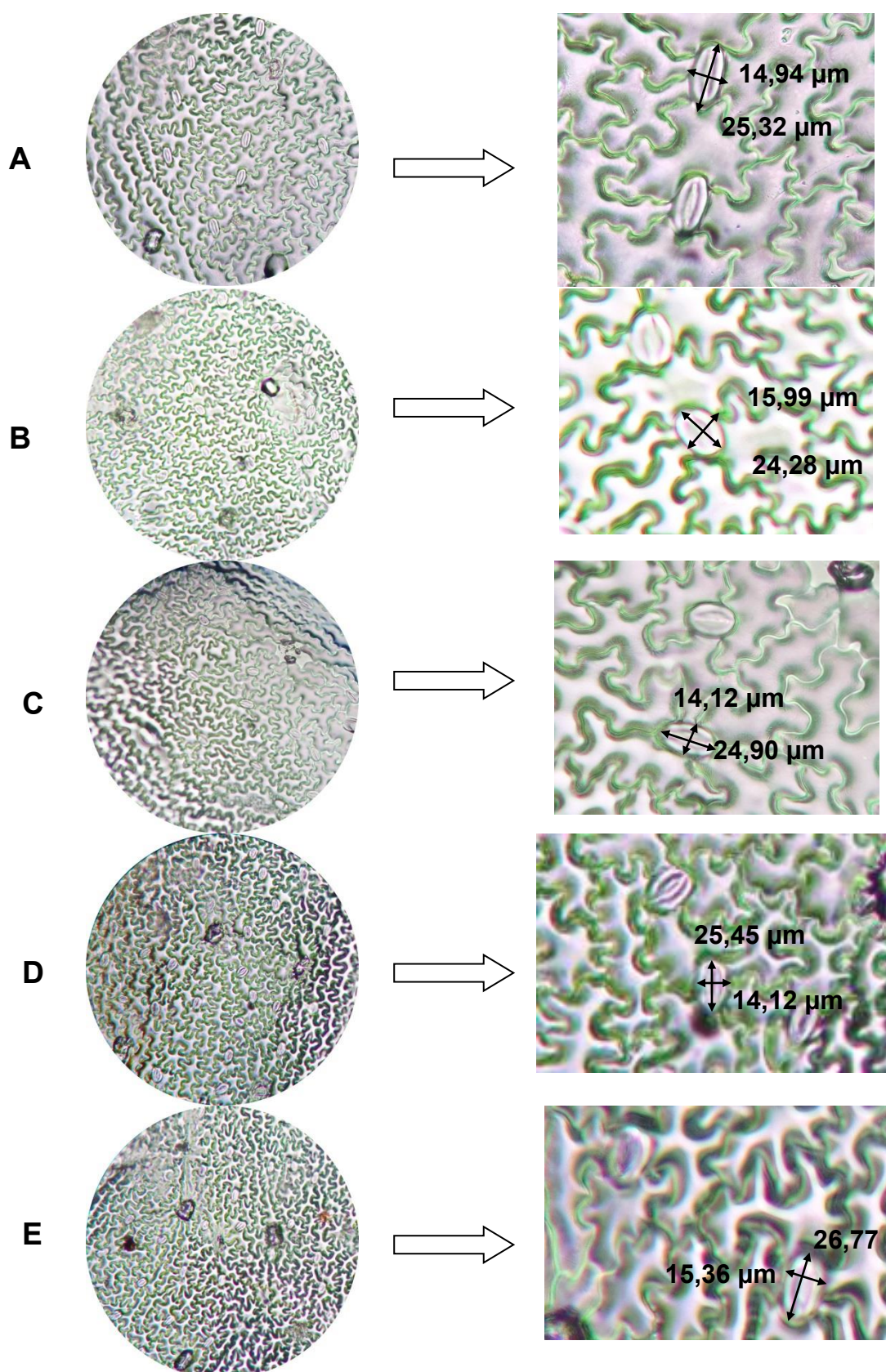


Figura 15 – Imagens dos estômatos de plantas de *A. annua* face abaxial, tratadas com doses de colchicina. A) dose 0% de colchicina; B) dose de 0,05% de colchicina; C) dose de 0,10% de colchicina; D) dose de 0,15% de colchicina; E) dose de 0,2% de colchicina.

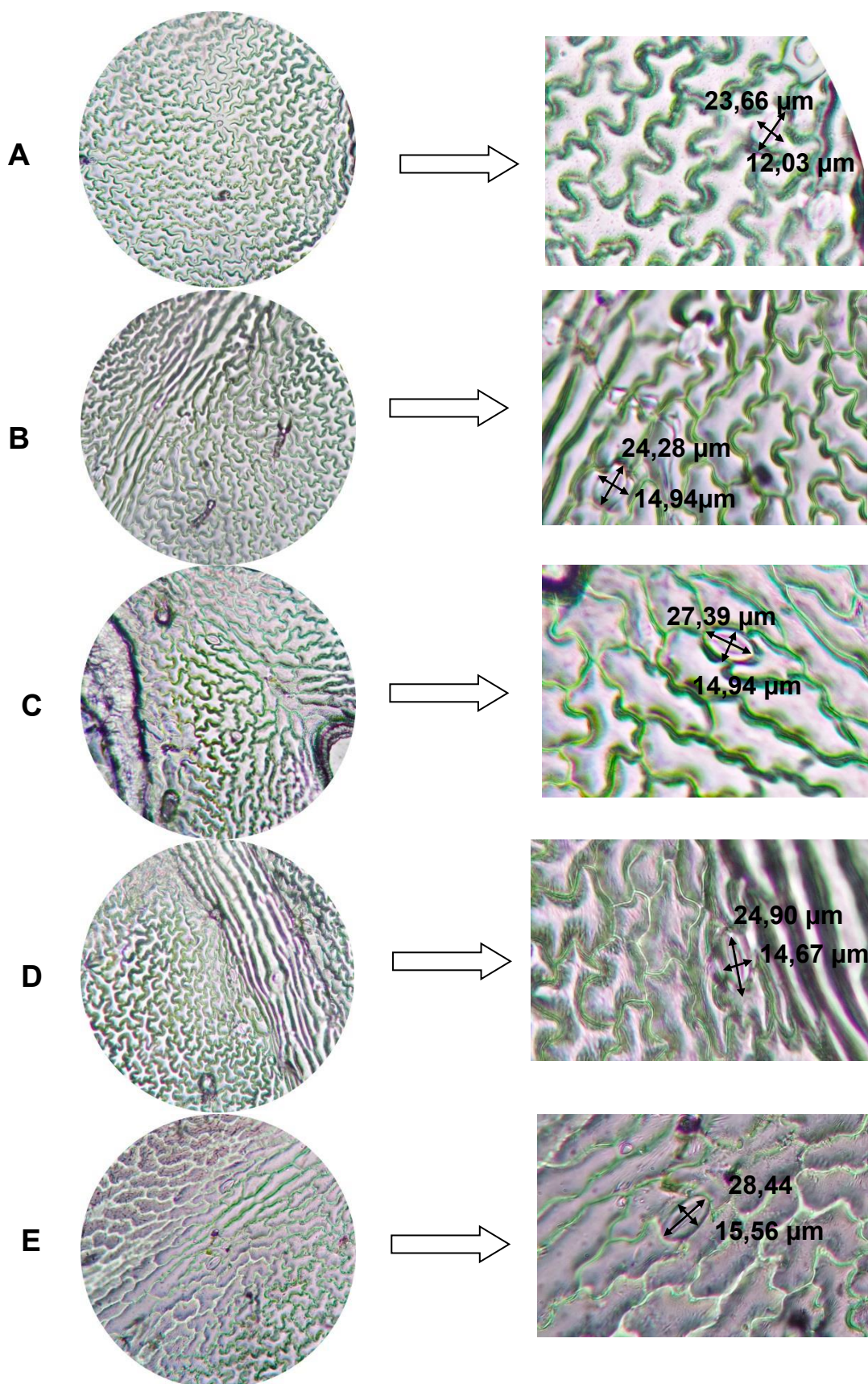


Figura 16 – Imagens dos estômatos de plantas de *A. annua* face adaxial, tratadas com doses de colchicina. a) dose 0% de colchicina; b) dose de 0,05% de colchicina; c) dose de 0,10% de colchicina; d) dose de 0,15% de colchicina; e) dose de 0,2% de colchicina.

3.5.2 Avaliações Agronômicas e Fisiológicas

Para os parâmetros agronômicos e fisiológicos também não foram observadas diferenças entre os tratamentos (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 – Média e desvio padrão de altura de plantas (Ht), altura de dossel (Hd), volume de dossel (Vd), número de ramos (NR), massa seca de folhas (MSF), massa seca de caule (MSC) e relação folha/caule (F/C) em plantas de *A. annua*, considerando os tratamentos de dose de colchicina e tempos de exposição.

Dose de colchicina (%)	Tempo (horas)									
	6		12		18		24		36	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Altura de Plantas (Ht) (cm)										
0.00	144.60	56.00	131.00	.	122.10	38.87	127.70	28.20	156.75	15.20
0.05	154.18	9.01	155.76	24.46	148.83	12.36	210.00	.	.	.
0.10	175.50	.	115.34	25.48	154.55	21.71
0.15	146.90	18.28	124.20	9.90	151.11	26.74
0.20	141.95	22.91
Altura do Dossel (Hd) (cm)										
0.00	1.34	0.52	1.20	.	1.11	0.45	1.16	0.33	1.40	0.13
0.05	1.48	0.10	1.43	0.22	1.38	0.10	1.95	.	.	.
0.10	1.57	.	1.06	0.24	1.44	0.22
0.15	1.30	0.16	1.17	0.11	1.35	0.23
0.20	1.29	0.20
Volume do Dossel (Vd) (m³)										
0.00	0.02	0.00	0.01	.	0.04	0.03	0.01	0.01	0.02	0.02
0.05	0.02	0.02	0.05	0.04	0.04	0.04	0.06	.	.	.
0.10	0.01	.	0.03	0.03	0.02	0.00
0.15	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
0.20	0.03	0.02
Número de Ramos (NR)										
0.00	37.00	7.07	28.00	.	42.00	7.12	14.33	10.69	29.00	4.24
0.05	24.50	5.00	38.75	14.73	34.67	28.02	43.00	.	.	.
0.10	36.00	.	27.50	16.28	18.50	10.61
0.15	20.67	9.24	17.00	15.56	20.00	11.31
0.20	28.75	7.27
Massa Seca de Folhas (MSF) (g/planta)										
0.00	66.07	14.24	61.33	.	57.23	9.64	43.44	17.73	59.80	10.18
0.05	58.35	23.57	81.00	25.45	78.26	12.42	84.90	.	.	.
0.10	67.57	.	58.87	19.72	74.33	29.69
0.15	64.94	16.97	49.37	19.95	50.73	25.39
0.20	62.81	26.70
Massa Seca de Caule (MSC) (g/planta)										
0.00	55.56	11.83	51.67	.	70.95	18.32	49.90	18.67	79.77	23.23
0.05	62.19	12.65	81.64	9.63	84.49	11.98	111.09	.	.	.
0.10	85.07	.	61.26	19.17	86.66	13.46
0.15	82.43	12.63	38.03	13.17	67.22	12.42
0.20	69.60	28.68
Relação Folha/Caule (F/C)										
0.00	1.19	0.00	1.19	.	0.83	0.20	0.88	0.13	0.76	0.09
0.05	0.95	0.37	1.00	0.32	0.95	0.26	0.76	.	.	.
0.10	0.79	.	0.97	0.22	0.84	0.21
0.15	0.78	0.09	1.28	0.08	0.73	0.24
0.20	0.90	0.10

Fonte: Zanmaria, UTFPR, Campus Pato Branco, 2016.

Tabela 5 – Média e desvio padrão dos parâmetros fisiológicos WUE: eficiência no uso de água; PHOTO: taxa de assimilação de CO₂; COND: condutância estomática; Tr: taxa de transpiração de plantas de *A. annua*, considerando os tratamentos de dose de colchicina e tempos de exposição.

Dose de colchicina (%)	Tempo (horas)									
	6		12		18		24		36	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
WUE (%)										
0.00	0.515	0.101	0.389	.	0.447	0.117	0.293	0.146	0.326	0.014
0.05	0.330	0.048	0.434	0.052	0.339	0.174				
0.10	0.382	.	0.361	0.095	0.491	0.125				
0.15	0.474	0.124	0.357	0.036	0.305	0.074	0.442	.		
0.20	0.440	0.120								
PHOTO ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)										
0.00	6.487	0.541	6.040	.	9.133	3.455	6.272	4.463	8.641	4.286
0.05	8.423	4.056	10.262	3.886	4.881	4.006				
0.10	9.622	.	8.605	5.797	7.105	3.438				
0.15	3.530	6.213	11.612	1.875	8.048	0.373	12.328	.		
0.20	11.472	3.930								
Cond ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)										
0.00	0.045	0.059	0.104	.	0.087	0.054	0.030	0.025	0.079	0.057
0.05	0.081	0.130	0.182	0.285	0.051	0.045				
0.10	0.078	.	0.094	0.593	0.095	0.078				
0.15	0.088	0.248	0.158	0.080	0.056	0.018	0.186	.		
0.20	0.038	0.076								
Tr ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)										
0.00	1.273	0.144	1.553	.	2.090	1.458	2.141	1.915	2.679	1.428
0.05	2.669	1.180	2.382	1.155	1.689	1.347				
0.10	2.519	.	2.714	2.426	1.588	1.105				
0.15	0.744	2.277	3.298	0.861	2.736	0.786	2.788	.		
0.20	2.112	1.069								

Fonte: Zanmaria, UTFPR, *Campus* Pato Branco, 2016.

3.5.3 Avaliações Fitoquímicas

Em relação ao nível dos teores de artemisinina, foi observada diferença significativa somente para o fator dose. O fator tempo de exposição não apresentou influência sobre os teores de artemisinina (Tabela 6).

Tabela 6 - Resumo da análise de variância para o parâmetro fitoquímico Artemisinina para plantas de *A. annua* L. tratadas com diferentes doses de colchicina. UTFPR, Campus Pato Branco – PR, 2016.

Fonte de Variação	GL	QM
		ART
Dose	4	0.08 *
Média		0.56
Erro	11	0.019
CV(%)		24.40

* significativo a 1% e ns não significativo; GL: Graus de Liberdade; QM: quadrado médio; CV(%): Coeficiente de Variação. ART: Artemisinina (%).
Fonte: Zanmaria, UTFPR, Campus Pato Branco, 2016.

Na análise de regressão (Figura 17), foi observado aumento gradativo do teor de artemisinina conforme o aumento da dose, até o ponto de máxima, o qual ocorre na dose de 0,10% (0,65% de ART) havendo redução do teor para as doses de 0,15 e a 0,20%, entretanto, todos os tratamentos houve aumento do teor de artemisinina em relação ao controle.

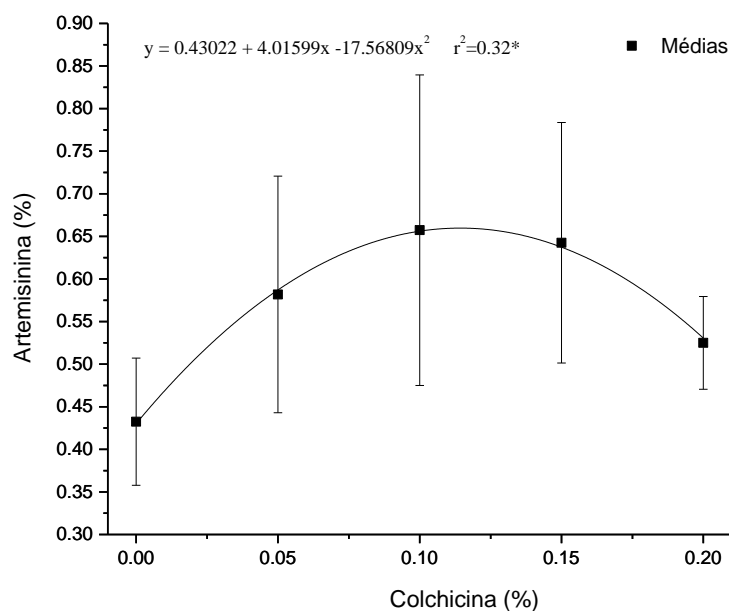


Figura 17 - Teores de artemisinina (%) em relação ao tratamento de sementes de *A. annua* com diferentes doses de colchicina (%).

Fonte: Zanmaria, UTFPR, Campus Pato Branco, 2016.

Plantas não domesticadas (silvestres) de *A. annua* no campo produziam em torno de 0,3% de artemisinina (BOLINA, 2014), enquanto que em estudos realizados

por Marchese (2006) já obtiveram rendimentos de até 0,99% do teor da molécula. Comparando com resultados já obtidos pela pesquisa, o rendimento obtido no presente estudo foi menor: Marchese, (2006); Capelin, (2012) e Paladini, (2012) obtiveram rendimentos de até 1,1% em plantas diploides cultivadas a campo. Dilshad et al (2015), através do projeto de pesquisa de Artemisia do Centro de Produtos Agrícolas da Universidade de York – Reino Unido, em seu programa de melhoramento desenvolveram híbridos superiores para produção de artemisinina e alta produtividade de sementes, fazendo cruzamentos entre linhas parentais com desempenho em campo satisfatório com dois híbridos comercializados, o Hyb1209r (Shennong, artemisinina 1,5%) e Hyb8001r (Zenith, artemisinina 1,4%). Paul *et al.* (2015) obtiveram rendimentos entre 0,1 a 1% de artemisinina testando três tempos colheita para *A. annua* (100, 126 e 204 dias após o transplante) sendo o tempo de 126 dias o que obteve o maior teor da molécula. Já em casa de vegetação, a produção de *A. annua*, observaram-se teores reduzidos na produção de artemisinina comparando-se com condições de campo. Quitério (2006), obteve produção que variou de 0,32 a 0,81% no teor de artemisinina em vasos, testando colonização de fungos na produção da biomolécula. Já Banyai (2010), alcançou rendimentos com plantas poliploides cultivadas *in vitro* de até 3,0% no teor de artemisinina. Constata-se uma possível diferença de rendimento entre plantas cultivadas em campo e em ambiente controlado, podendo justificar o menor rendimento obtido neste estudo. Entretanto, o que deve ser considerado, nesse caso, é o efeito positivo da colchicina no aumento do teor de artemisinina. Para a dose 0% de colchicina obteve-se a média de produção da biomolécula em 0,43%. O ponto de máxima chegou em 0,65%. Isso representa um aumento de rendimento de 53% no teor de artemisinina na planta, sem ainda ser comprovado se houve poliploidização do genoma. Considerando as variedades com alto potencial de rendimento pode-se ainda incrementar o rendimento utilizando a colchicina não só como indutora de poliploidia, mas, além disso, como eliciadora na produção de metabólitos secundários.

Em relação à produção de óleo essencial, entende-se que plantas poliploides tendem a produzir maior quantidade desse metabólito pelo fato de aumentarem o tamanho dos tricomas, local onde fica depositado o óleo na planta (BANYAI, 2010), elevando, conseqüentemente a sua quantidade armazenada nesse órgão. Istopoisto,

observando a Tabela 7, onde estão relacionados as médias e desvios padrão do teor de óleo essencial das plantas de *A. annua* tratadas com colchicina, e a Figura 18, a qual demonstra observou-se que não houve diferença estatística entre tratamentos.

Tabela 7 - Média e desvio padrão do parâmetro fitoquímico OE: óleo essencial (%) de *A. annua*, considerando os tratamentos de dose de colchicina e tempos de exposição.

Dose de colchicina (%)	Tempo (horas)									
	6		12		18		24		30	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0.00	0.37	0.13	0.46	.	0.53	0.20	0.46	0.03	0.40	0.10
0.05	0.52	0.23	0.55	0.19	0.44	0.08	0.49	.		
0.10	0.41	.	0.44	0.22	0.60	0.42				
0.15	0.33	0.05	0.49	0.02	0.47	0.04				
0.20	0.59	0.23								

Fonte: Zanmaria, UTFPR, Campus Palmas, 2016.

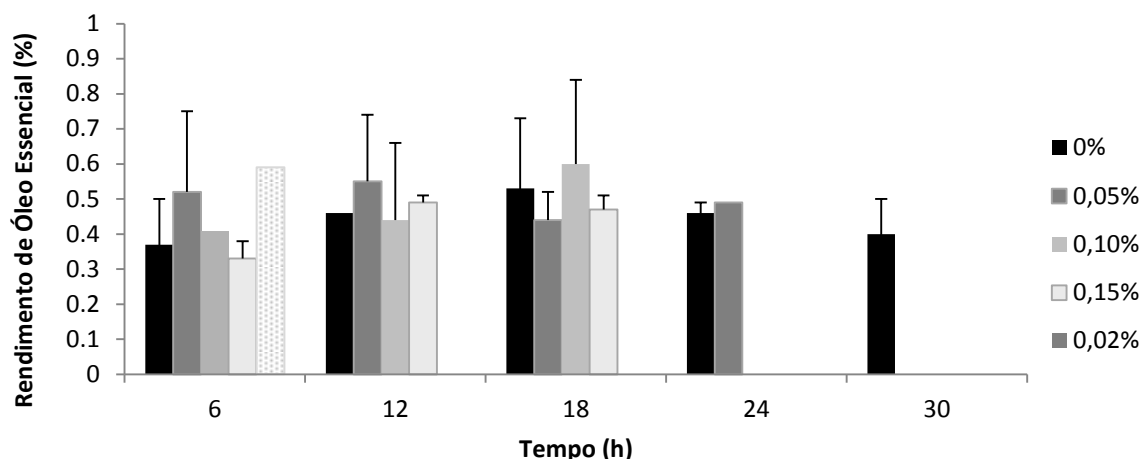


Figura 18 – Teor de óleo essencial (%), obtido por plantas de *A. annua* tratadas com diferentes doses de colchicina (%) e submetidas a diferentes tempos de exposição (horas).

Fonte: Zanmaria, UTFPR, Campus Pato Branco, 2016.

Pelo observado nos resultados apresentados, não se pode afirmar se houve poliploidização nas sementes tratadas com colchicina, ou seja, os resultados apontam para um aumento do teor de artemisinina com o uso de colchicina, entretanto, nenhuma modificação morfológica foi observada. Uma hipótese do que pode ter ocorrido, foi a ocorrência de mosaicismos ou quimeras no genoma, formando plantas mixoplóides. Quimeras são tecidos ou plantas com setores duplicados e

outros não duplicados, pois nem sempre todas as células do tecido tratado com um antimitótico se poliploidizam (WITTMANN e DALL'AGNOL, 2003). O antimitótico mais usado para indução da poliploidização é a colchicina, um alcaloide extraído de plantas de *Colchicum autumnale* (EIGSTI & DUSTIN, 1955) e para muitas espécies vegetais pode ser muito tóxica e provocar efeitos secundários, tais como esterilidade, crescimento anormal, perdas ou rearranjos cromossômicos e mutações (LUCKETT, 1989). Nesse caso, portanto, as plantas podem conter em seu genoma células diplóides, tetraploides ou mesmo haplóides, sendo chamadas de mixoplóides. As chamadas mixoplóides ou quimeras são plantas que apresentam células com variações no número cromossômico ou na ploidia em um mesmo tecido ou entre órgãos de uma mesma planta. A mixoploidia pode ocorrer porque o tratamento com o agente antimitótico age sobre as células dos explantes que estão em diferentes estágios do ciclo celular, resultando na desuniformidade do tecido. Essa variação no número cromossômico compromete a fertilidade e a estabilidade das plantas no campo, sendo indesejável sob o ponto de vista comercial e ou para fins de melhoramento genético (PEREIRA, *et al.*, 2012). Dixier *et al* (1976) já detectaram quimeras no processo de poliploidização com colchicina em berinjela, observando a ocorrência de microsporócitos diplóides e tetraplóides num mesmo botão ou numa mesma antera e a existência de pólen regular e irregular em flores diferentes e distribuídas ao acaso pela planta sugindo a natureza mixoplóide das plantas quiméricas analisadas. Também, Paredes e Matos (2008), através do processo de indução de poliploidia em bulbos de *Aloe vera* com doses de tratamento com colchicina de 0,1% e 0,15% e período de exposição de 12 e 24 horas obtiveram várias plantas poliploides estáveis e algumas plantas quimeras ou mixoplóides, ou seja, células diploides $2n = 2x = 14$ e células tetraploides $2n = 4x = 28$ observadas na mesma planta. Já nas plantas tetraploides estáveis foram observadas diferenças significativas no tamanho de flores, folhas e diâmetro de caule em relação às plantas controle, diferentemente do presente trabalho, no qual não se observou diferença nas características morfológicas da planta.

2.6 CONCLUSÕES

A colchicina aumenta o teor de artemisinina na dose de 0,10% de colchicina aplicada em sementes de Artemis geração F2 em 53% em relação às plantas não tratadas.

Não há diferenças na largura e comprimento dos estômatos entre as plantas tratadas e não tratadas com colchicina por isso, considera-se possível a ocorrência do processo de mixoploidia ou formação de quimeras nas plantas tratadas com colchicina, ou seja, duplicação do número de cromossomos de células isoladas na planta e não poliploidia total, o que supostamente fez com que houvesse aumento do teor de artemisinina nas plantas tratadas.

Para comprovação da hipótese da ocorrência de mixoploidia, a contagem de cromossomos e a análise de citometria de fluxo seriam métodos seguros, entretanto, não foi possível lançar mão dessas ferramentas no presente trabalho.

3 EFEITO DA DEFICIÊNCIA NUTRICIONAL EM CARACTERES AGRONÔMICOS, FISIOLÓGICOS E FITOQUÍMICOS E EXPRESSÃO GÊNICA EM GENÓTIPOS DE *Artemisia annua* L.

Efeito da Deficiência Nutricional em Caracteres Agronômicos, Fisiológicos e Fitoquímicos e Expressão Gênica em Genótipos de *Artemisia annua* L. 27f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2016.

3.1 RESUMO

Artemisia annua L., é uma espécie vegetal herbácea nativa da Ásia que possui folhas aromáticas contendo artemisinina, uma lactona sesquiterpênica que tem demonstrado eficácia contra doenças como câncer e principalmente a malária. O óleo essencial da planta também possui interesse comercial, principalmente na indústria cosmética. Considerando que as condições de fertilidade do solo podem influenciar na produção de artemisinina, óleo essencial e biomassa da espécie, o objetivo desse estudo foi verificar os parâmetros de agrônômicos, fitoquímicos e fisiológicos de *A. annua*, considerando níveis de adubação com solução nutritiva completa. Foram testados os genótipos B23, B24, C23 e C32 de *A. annua* com 03 doses de solução nutritiva, sendo 25%, 50% e 100% da solução completa. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 3 repetições, no esquema fatorial 4 x 3. Foram realizadas avaliações agrônômicas - altura da planta (Ht, m); altura do dossel (Hd, m); diâmetro da seção inferior do dossel (Di, m); diâmetro da seção média do dossel (Dm, m); diâmetro da seção superior do dossel (Ds, m); número de ramificações (NR), volume do dossel (Vd, m³), massa seca de folhas (MSC, g), massa seca de caule (MSF, g), relação Folha/Caule (F/C), avaliações fisiológicas - taxa de assimilação de CO₂ (PHOTO, μmolCO₂.m⁻².s⁻¹), condutância estomática (Cond, mol H₂O.m⁻².s⁻¹), taxa de transpiração (Tr, mmol H₂O m⁻².s⁻¹) e eficiência no uso de água (WUE, %) e avaliações fitoquímicas – teor de óleo essencial (OE, %) e teor de artemisinina (ART, %). A aplicação de doses crescentes de solução nutritiva para plantas de *A. annua* possibilita incremento linear para produção de biomassa, entretanto, com relação contrária para produção de artemisinina. O estresse nutricional causado nas plantas submetidas à dose de 25% de solução nutricional completa apresentou maior teor de artemisinina com uma produção de biomassa muito baixa. Genótipos submetidos à níveis nutrição de 50% apresentam melhor relação para a produção de biomassa e artemisinina e óleo essencial. Os genes ADS1 e CYP71AV aumentam a transcrição em plantas submetidas a níveis de 50% de solução nutritiva. Estas enzimas estão diretamente envolvidas da via de biossíntese da artemisinina.

Palavras-chave: artemisinina, óleo essencial, estresse nutricional.

EFFECT OF FERTILIZATION LEVELS IN AGRONOMICS, PHYSIOLOGICALS AND PHYTOCHEMICALS PARAMETERS, IN GENOTYPES OF *Artemisia annua* L.

ZANMARIA, Silvia Leticia. Effect of Nutritional Deficiency in Agronomic, PHYSIOLOGICAL and Phytochemical Characters and Gene Expression in Genotypes of *Artemisia annua* L. 27f .Thesis (Ph.D. in Agronomy) - Graduate Program in Agronomy (Concentration Area: Crop), Federal University of Technology Paraná. Pato Branco, 2016.

3.2 ABSTRACT

Artemisia annua L. is an herbaceous plant species native from Asia that has aromatic leaves containing artemisinin, a sesquiterpene lactone that has demonstrated efficacy against diseases like cancer and malaria. The essential oil of the plant also has commercial interest, mainly in the cosmetic industry. To meet this demand, management techniques can be used to obtain higher yields of these biomolecules. Whereas soil fertility conditions may influence the production of artemisinin, essential oil and biomass of the species, the aim of this study was to evaluate the agronomic performance parameters, phytochemical and evaluate physiological parameters of *A. annua*, considering fertilization levels with complete nutrient solution. It was tested the *A. annua* genotypes B23, B24, C23 and C32 with 03 doses of nutrient solution, 25%, 50% and 100% of the total solution. The experimental design was completely randomized with 03 repetitions, in factorial 4 x 3. Agronomic evaluations were carried out - plant height (Ht, m); canopy height (Hd, m); diameter of the lower section of the canopy (Di, m); diameter of the middle section of the canopy (Dm, m); diameter of the upper section of the canopy (Ds, m); number of branches (NR), canopy volume (Vd, m³), Dry Mass Weight (PMS, g), Dry Stem weight (PCS, g), leaf / stem ratio (F / C), physiological assessments - CO₂ rate assimilation (PHOTO μmolCO₂. m⁻².s⁻¹), stomatal conductance (Cond, mol H₂O.m⁻². s⁻¹), transpiration rate (Tr, mmolH₂O.m⁻².s⁻¹) and efficiency water usage (WUE, %) and phytochemical reviews - essential oil content (OE, %) and artemisinin content (ART, %). The application of increasing doses of nutrient solution for the plant *A.annua* showed linear increase in biomass production, however, with opposite relation to the production of artemisinin content. The nutritional stress in plants submitted to dose 25% complete nutritional solution showed higher artemisinin content, however, with a very low biomass production. In plants subjected to nutrition levels of 50%, there is a cost / benefit ratio for the production of biomass, artemisinin and essential oil. ADS1 and CYP71AV genes increase transcription in plants submitted to 50% levels of nutrient solution. These enzymes are directly involved in the biosynthesis pathway of artemisinin.

Keywords: Artemisinin, essential oil, nutritional stress.

3.3 INTRODUÇÃO

A *Artemisia annua* L. é nativa da Ásia sendo introduzida no Brasil no final da década de 80, através de sementes oriundas da Europa e da China (MAGALHÃES, 1996), sendo então aclimatada nas regiões de clima subtropical e temperado do Brasil, esta espécie é caracterizada como sendo uma planta aromática, de fecundação cruzada e alta variabilidade genética (MAGALHÃES, 1999), de dias curtos possuindo fotoperíodo de aproximadamente 13 horas (Marchese, 2006; Magiero *et al.*, 2009), multiplicando-se por sementes ou vegetativamente, sendo caracterizada como uma espécie diploide com genoma $2n=18$ (LIN *et al.*, 2011).

Esta espécie é destaque no meio científico devido à produção de compostos medicinais com ação antimalárica comprovada, além de apresentar citotoxicidade às células cancerígenas (LAI, 2006; IVANESCU, 2014), ação anti-inflamatória, atividade neuroprotetora (MARTINEZ *et al.*, 2014). Por se tratar de uma planta aromática, seu óleo essencial é utilizado na confecção de perfumes e cosméticos (MAGALHÃES, *et al.*, 2004).

A artemisinina, composto medicinal produzido pela planta, é uma lactona sesquiterpênica (RODRIGUES *et al.*, 2006), que ao ser combinada com outras moléculas como a mefloquinina apresenta efeito significativo no controle da malária (WHO, 2014). As maiores concentrações dessas moléculas são encontradas nas folhas e inflorescências da *A. annua* (FERREIRA, 1980), isso porque a artemisinina é armazenada nos tricomas glandulares da planta (ZHANG *et al.*, 2006).

Artemisia annua é a espécie que mais produz artemisinina, a qual já apresentou no sudoeste do Paraná, em apenas uma colheita, produtividades de até 48,4 Kg ha⁻¹ (CAPELIN, 2012), em contrapartida da média de produção das espécies silvestres de 1,0 Kg ha⁻¹ (BOLINA *et al.*; 2014). As melhores variedades comerciais, quando colhidas multiplas vezes no mesmo ano, podem produzir até 70 Kg de artemisinina ha⁻¹ (KUMAR *et al.* 2004).

Devido ao aumento da demanda pela molécula, tem-se a necessidade de impulsionar a produção destes compostos, através do aumento de produção, ou ainda, investir no incremento do rendimento desses biocompostos na planta.

Entretando, não só variedades selecionadas podem influenciar na produção

de artemisinina e biomassa da espécie, mas também a fertilidade do solo, segundo Magalhães (1996) e JHA *et al.* (2011), possuem relação direta com a produtividade de *A. annua*. Paladini (2012) testou níveis de adubação relacionados à produtividade de *A. annua* e à produção de seus biocompostos secundários, considerando como parâmetro a recomendação para cultura do milho (N: 160 Kg ha⁻¹; P₂O₅: 175 Kg ha⁻¹; K₂O: 90 Kg ha⁻¹) testando meia dose, uma dose e duas doses desta adubação. Determinou que o rendimento de massa seca de folhas obteve máxima eficiência em 1,57 doses de adubação com NPK e para os parâmetros fitoquímicos não observou diferença para o teor de artemisinina. Para o teor de óleo essencial houve redução linear com o aumento da dose de adubação (PALADINI,2012).

Considerando que a deficiência nutricional pode interferir no teor de artemisinina, possivelmente poderá causar alteração na expressão de genes relacionados à via biossintética de artemisinina, como os genes codificadores das enzimas ADS1 e CYP71AV.

O objetivo desse estudo foi verificar os parâmetros de rendimento agrônômicos, fitoquímicos e avaliar os parâmetros fisiológicos de *A. annua*, considerando níveis de adubação com solução nutritiva completa de Hoagland e Arnon (1950).

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na casa de vegetação do curso de Agronomia da UTFPR Pato Branco-PR, latitude 26°11' S, longitude 52°36' W, altitude de 760 m, clima Cfa subtropical (KÖPPEN, 1948).

Foram testados 4 genótipos de *A. annua* com 03 doses de solução nutritiva (Hoagland e Arnold, 1950), sendo 25%, 50% e 100% da solução completa. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 genótipos, 3 tratamentos e 3 repetições.

No dia 15 de maio de 2015 foram feitas estacas dos genótipos B23 e B24 (variedade 2/39x5x3M), C23 e C32 (variedade 2/39x1V) oriundas da poda de plantas instaladas em campo. Foram preparadas 30 estacas semilenhosas de cada genótipo

em tubetes de 120 cm³ de substrato Plantmax®. Dia 20 de julho as estacas já enraizadas foram transferidas para copos com 200 g do mesmo substrato com fornecimento de luz artificial completando fotoperíodo mínimo de 13 horas. Dia 14 de outubro as mudas foram transplantadas em vasos de 5 litros contendo substrato vermiculita expandida de granulometria média. Esse substrato foi utilizado baseando-se na principal característica deste ser inerte e possuir alta capacidade de retenção de água e nutrientes.

Ao serem transplantadas, as estacas foram cuidadosamente retiradas dos copos e retirado o máximo de substrato inicial, procurando não danificar o sistema radicular das plantas. A primeira irrigação nos vasos com vermiculita foi realizada com água pura abundante, até que houvesse absorção total da água pelo substrato.

A frequência de fornecimento de solução nutritiva (HOAGLAND e ARNON, 1950), foi baseada na capacidade de campo do substrato. A capacidade de campo (CC) foi determinada previamente preenchendo o vaso com volume conhecido de substrato mais água, deixando-o reservado para escoamento da água ao nível de peso constante. Conhecendo-se o peso do vaso em CC, procedeu-se o acompanhamento de perda de água no vaso pela redução de peso, até que atingisse 70% de sua capacidade de retenção de água, ou seja, 70% do peso inicial. Nesse momento realizava-se a irrigação dos vasos conforme os tratamentos. Cada irrigação era fornecido 1 litro de solução nutritiva com a devida diluição, ou seja, para o tratamento de 25% a irrigação era determinada com 250 ml de solução nutritiva + 750 ml de água; para o tratamento de 50%, 500 ml de solução + 500 ml de água e para o tratamento de 100% foi fornecido 1 L de solução completa a cada irrigação. Após o transplante para os vasos a iluminação artificial foi retirada.

No dia da colheita amostras de cada tratamento foram colhidas e imediatamente congeladas em Nitrogênio Líquido e acondicionadas em freezer a -80°C para realização da extração do RNA para análise de RT-PCR semi-quantitativa.

A colheita foi realizada no dia 30 de março de 2016, quinze dias após a data regular de colheita da espécie. O parâmetro utilizado para definir a data da colheita é baseado na época de plantio para a região seguido de número de períodos fotoindutivos para o florescimento. A época de plantio para a região, segundo

Marchese (2006), deve ocorrer na segunda quinzena de setembro, sendo que o florescimento deve ocorrer após 28 períodos fotoindutivos após o fotoperíodo crítico que ocorre em 13 horas de luz. Considerando isso, a data de colheita ocorre na primeira quinzena de março para a região de Pato Branco. As plantas foram cortadas, separados os ramos das folhas e colocados para secar até peso constante em estufa com circulação de ar e temperatura de 35°C (Figura 19 A,B,C). Após secagem foram pesadas as frações de massa seca e caule seco e separadas amostras para realização das análises fitoquímicas (Figura 19 D,E,F).



Figura 19 – Processo de colheita e separação das amostras de *A. annua* para avaliações fitoquímicas. A) Separação das folhas verdes dos ramos. B) Massa verde de folhas e caules verdes são separados para secagem a 40 °C. C) A massa seca de folhas e caules secos são pesados. D) A amostra depois de triturada é armazenada em saco de alumínio, mantendo baixa umidade e T °C para posteriores avaliações de rendimento.

Fonte: Zanmaria,UTFPR, Campus Pato Branco, 2016.

3.4.1 Avaliações Agronômicas

As avaliações agronômicas foram realizadas na primeira semana de março, período que antecede a colheita e também o período de pré-florescimento da espécie para a região sudoeste do Paraná.

Os parâmetros analisados foram altura da planta (Ht, m); altura do dossel (Hd, m); diâmetro da seção inferior do dossel (Di, m); diâmetro da seção média do dossel (Dm, m); diâmetro da seção superior do dossel (Ds, m); número de ramificações (NR), volume do dossel (Vd, m³), Massa Seca de Folhas (MSF, g), Massa Seca de Caule (MSC, g), relação Folha/Caule (F/C). O volume do dossel foi estimado pela equação $Vd = \pi Di^2 Hd / 12$, conforme metodologia utilizada por Favarin *et al.* (2002), observado no Anexo A.

3.4.2 Avaliações Fisiológicas

As avaliações fisiológicas foram realizadas no período de pré-florescimento da espécie. As variáveis fisiológicas avaliadas foram taxa de assimilação de CO₂ (PHOTO, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (Cond, $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), taxa de transpiração (Tr, $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e eficiência no uso de água (WUE, %). A avaliação das trocas gasosas foi realizada utilizando-se um sistema de medição de trocas gasosas, equipado com um analisador infravermelho de gases (IRGA) com injetor automático de CO₂ e fonte artificial de luz vermelho e azul. As mensurações foram realizadas próximo às 10 horas da manhã utilizando as folhas jovens e medianas do dossel da planta. Foram realizadas duas leituras por planta.

3.4.3 Avaliações Fitoquímicas

Os caracteres fitoquímicos avaliados foram teor de óleo essencial (OE, %), teor de artemisinina (ART, %) e rendimento de artemisinina (RART g/planta).

O teor de óleo essencial de *Artemisia annua* foi estimado pela extração por hidrodestilação, realizada no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal da

Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 50 g de massa seca de folhas de cada genótipo das plantas poliploides de *A. annua* foram transferidas para um balão de 2 L contendo 1,5 L de água destilada, acoplado a um sistema Clevenger, onde foi realizada a hidrodestilação durante 3 horas após o início da condensação. Depois de aferir o volume de óleo extraído, foi armazenado hermeticamente em vidros âmbar em geladeira a 4° C.

Para quantificação do teor de artemisinina em *A. annua*, o processo foi realizado em duas etapas. A preparação dos extratos foi realizada no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Pato Branco e após as amostras foram enviadas para o CPQBA - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - UNICAMP – SP, para mensuração.

Para obtenção dos extratos foram pesados 0,3 g de folhas secas e moídas de plantas de *A. annua* de cada tratamento (Figura 20 A,B), extraídas com 5 mL de acetato de etila por 3 minutos em Politrón e centrifugados por 20 minutos (Figura 20 C,D,E,F). O extrato separou-se em duas frações, sendo retirados 4 mL do extrato da fração aquosa. A fração foi evaporada à secura sob vácuo em evaporador rotativo (Figura 20 G,H).

As amostras foram ressuspensas em balão volumétrico de 5 mL com metanol grau CLAE, filtradas e analisadas em triplicata em cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado ao detector de índice de refração por CLAE/IR. Foi utilizado um cromatógrafo líquido Waters, bomba Waters 515, válvula injetora Rheodyne, com alça de amostragem de 20 µL. O sistema foi acoplado a um detector de índice de refração Waters 2414; temperatura interna do detector 35 °C. Os dados cromatográficos foram analisados usando-se software Empowerpro build 1154/Waters. Foi utilizada coluna com fase estacionária ciano, Luna CN 5 µm 250 x 4,6 mm; fase móvel H₂O:Metanol (60:40 v/v); modo isocrático e vazão 1,0 mL/min. As quantificações do teor de artemisinina dos extratos foram realizadas utilizando a metodologia validada desenvolvida por Celeghini (2009), a partir do método do padrão externo. Os dados foram verificados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e homoscedasticidade das variâncias pelo teste de Bartlett. Após os dados foram submetidos à ANOVA – análise de variância - e foi realizada análise de regressão.

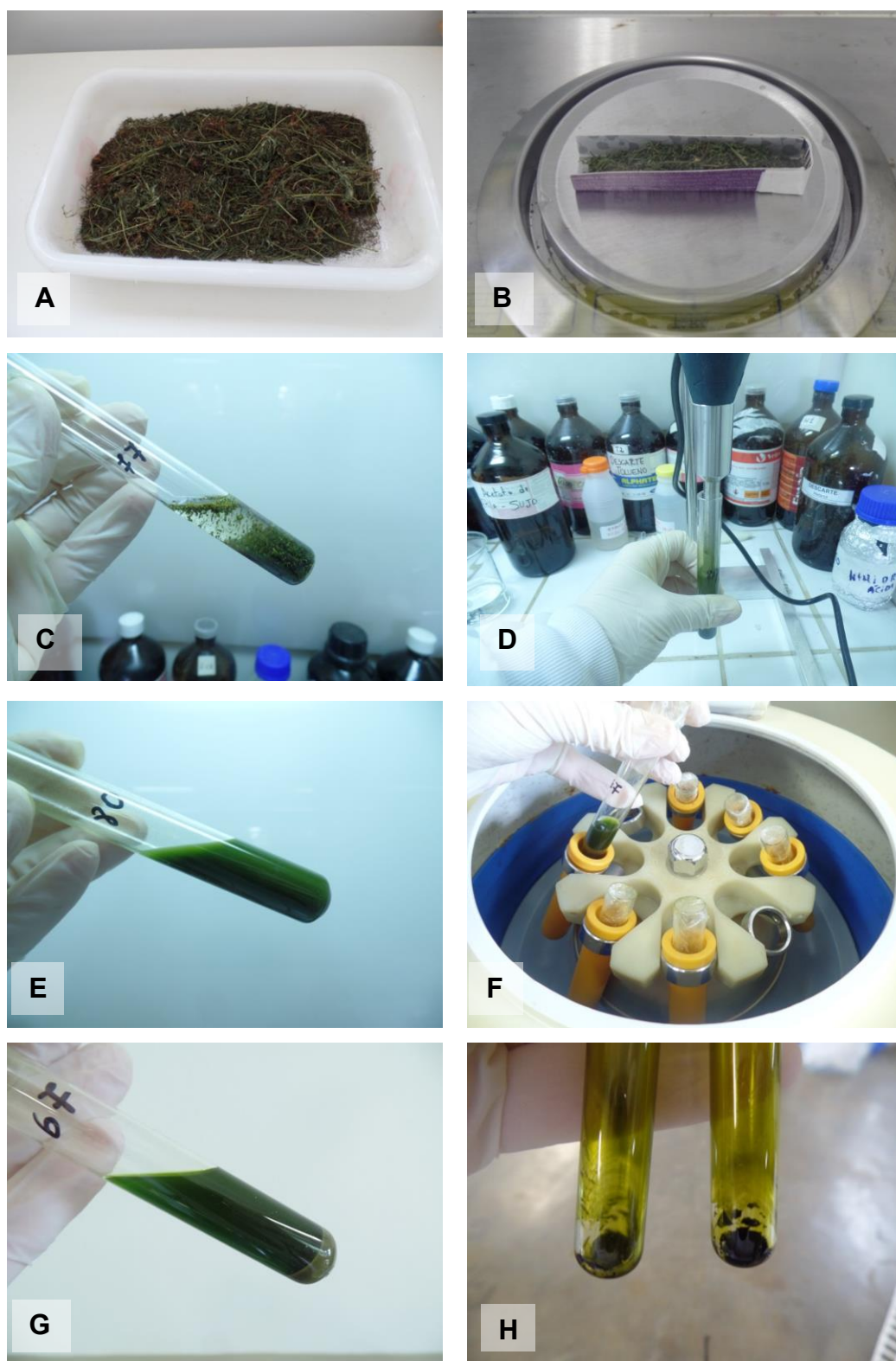


Figura 20 – Processo de preparação dos extratos para determinação do teor de artemisinina. A) Separação da massa seca de folhas das amostras de *A. annua*. B) Pesagem de 0,3 g de amostra. C) Tubos de ensaio contendo 0,3 g de massa seca de folhas de *A. annua* e 5,0 ml de acetato de etila. D) Amostra sendo moída em politron com rotação de 12.000 rpm. E) Extrato de *A. annua* mais solvente. F) Separação do extrato e solvente com centrifugação. G) Frações solvente e extrato sepadas. H) Extrato após total evaporação.

3.4.4 Análise Molecular

3.4.4.1 Extração do RNA

Para a extração de RNA total, todos os materiais utilizados para extração foram tratados com solução diethylpircarbonato (DEPC) a 0,5%, para inativar RNAses, e as soluções utilizadas foram preparadas com água ultrapura autoclavada RNase-free.

O RNA total foi extraído de acordo com o protocolo de Chang *et al.* (1993) com modificações. As folhas de cada amostra foram trituradas em nitrogênio líquido, com auxílio de almofariz e pistilo, até obter um pó fino (Figura 21 A,B,C). Em cada microtubo de 2 mL foram transferidos 100 mg do material macerado e adicionados 750 µL de tampão de extração [2% (p/v) CTAB (cethyltrimethylammonium bromide), 2% (p/v) PVP-40, 300 mM de Tris-HCL pH 8,0, 25 mM de EDTA, 2 M de NaCl e 2% de β-mercaptoetanol]. Após as amostras serem incubadas a 65° C, por 10 minutos, foram adicionados 750 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (CIA) e, em seguida, agitadas em vórtex e centrifugadas por 15 minutos, a 10000 g, à 4°C (Figura 21 D, E,F). O procedimento de extração com 750 µL de CIA foi repetido, para garantir a qualidade do RNA por meio da máxima extração de impurezas. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionado 0,6 volumes de isopropanol e 0,1 volume de NaOAc (3M). As amostras foram deixadas por 25 minutos a -80°C e posteriormente centrifugadas a 29000g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 100 µL de TE. A seguir, adicionou-se 0,25 volumes de cloreto de lítio (7,5M) e as amostras foram mantidas *overnight* a 4°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante 45 minutos, a 29000 g, à temperatura de 4° C e o sobrenadante descartado. O *pellet* formado foi lavado com 500 µL de etanol por três vezes e seco em estufa a 37°C por dez minutos. Após, o RNA foi ressuscitado em 20 µL de TE e armazenado a -80°C.

A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com Gel Red (Biotium®) e observado sob luz ultravioleta em transiluminador. A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro, onde foram feitas leituras

da absorbância (OD) a 230, 260 e 280 nm. A razão 260/230 deve ser superior a 2.0. A razão entre as absorbâncias a 260/280 deve estar entre 1,8 e 2,0 para que não haja contaminação com proteínas. Com base na absorbância foi calculada a concentração do RNA em $\text{mg } \mu\text{L}^{-1}$. O processo completo desde a extração do RNA pode ser visualizado na Figura 21G.

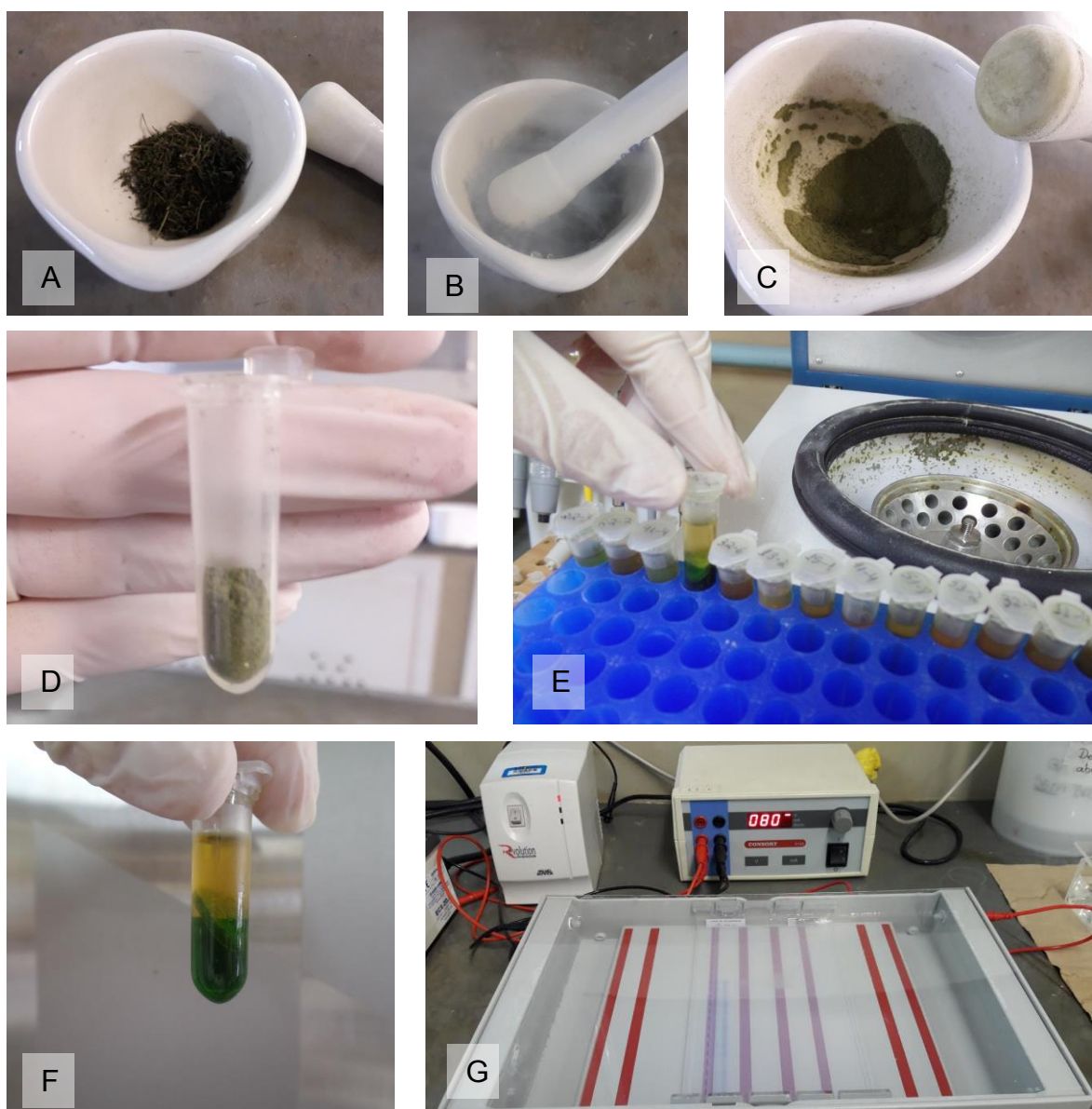


Figura 21 – Processo de extração de RNA de amostras de *A. annua*. A) Massa seca de folhas congelada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. B) Maceração da amostra com N líquido. C) Amostra após maceração, com aspecto de pó. D) adição de aproximadamente 100 mg de amostra triturada em um tubo microtubo 2 mL. E) Colocação das amostras em centrífuga para separação dos extratos líquido e sólido. F) Amostra com o sobrenadante que será transferido para nova extração. G) Após amostras prontas, teste com a eletroforese para testar a integridade do RNA.

Fonte: Zanmaria, UTFPR Campus Pato Branco, 2016.

3.4.4.2 Tratamento do RNA com DNase e Síntese da Primeira Fita de DNA complementar cDNA)

A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 2 µg de RNA de cada amostra. Em seguida foi adicionado 1 µL de buffer 10 x e 1 µL da enzima Dnase I (*Amplification Grade Dnase I*, Invitrogen™) para eliminação do DNA. A amostra foi misturada e incubada à 37 °C por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 µL de *stop solution* para cessar a reação, deixando em banho maria a 70 °C por 10 minutos.

Após o tratamento, foi realizada PCR e eletroforese para comprovar a total digestão do DNA. Em seguida foi realizado o protocolo de síntese da primeira fita de cDNA.

Após a confirmação da ausência de contaminação do RNA com DNA, foi realizada a síntese do cDNA por meio de transcrição reversa pela utilizando a enzima MMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) transcriptase reversa (Ludwig Biotecnologia Ltda) de acordo com as recomendações do fabricante utilizando o iniciador Oligo d(T)₁₂₋₁₈ (Invitrogen) para que a síntese da primeira fita de cDNA fosse a partir cauda poli-A da molécula de RNAm (RNA mensageiro).

3.4.4.3 Análise dos perfis de expressão gênica por reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) semiquantitativa

Inicialmente foram desenhados com cinco pares de iniciadores em sequencias codificadoras de genes associados com a rota biossintética da artemisinina e de seu precursor isopentenil difosfato (IPP) (Tabela 8). Os genes alvo escolhidos foram: HMGR1, ADS1, CYP71AV e HDR que estão presentes nas rotas metabólicas que envolvem a produção de artemisinina. Os genes HMGR1 presente no citosol pela via do Ácido Mevalônico (MVA) e HDR, plastidial, pela via do Metil-eritritol fosfato (MEP) fazem parte da rota biossintética do IPP (isopentenil-difosfato), precursor da artemisinina, enquanto que os genes ADS1 e CYP71AV estão presentes na rota de biossíntese da artemisinina. O gene GAPDH codificador da enzima gliceraldeído 3-

fosfato desidrogenase foi considerado considerado referência.

Os iniciadores foram desenhados no programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/primer3plus>) (Untergasser *et al.*, 2007) e foram sintetizados artificialmente, utilizando-se como parametros o tamanho de 20 pares de bases, o tamanho do amplicon variou de 200 a 350 pares de bases, temperatura de anelamento entre 60 a 63 °C e o conteúdo GC variando entre 40 a 55%.

A RT-PCR semiquantitativa foi conduzida em termociclador PxE 0.2 Thermal Cycler – Thermo Electron Corporation. As reações, foram realizadas em volume total de 12,5 µL, seguiram as seguintes etapas: desnaturação com 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 1 minuto a 95°C e 1 minuto à temperatura de anelamento do primer, 1 minuto a 72 °C e por fim, extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% a 80 V durante 2 h. As bandas formadas pela migração dos produtos das ampliações foram comparadas ao marcador de peso molecular de 100 pb DNA Ladder com o intuito de confirmar o tamanho do fragmento amplificado esperado.

As imagens dos géis foram armazenadas, e os perfis de expressão de cada gene alvo e referência (GAPDH) para cada concentração de solução nutritiva e genótipo foi avaliada pela densitometria das bandas utilizando o software ImageJ (RASBAND 1997- 2015). Onde os perfis de expressão foram calculados conforme metodologia proposta por COOLS e ISHII (2002). O Cálculo utilizado foi: $[(PA/ PR)+ PA] * 100$, sendo PA = primer alvo, PR = primer referência.

Tabela 8 –Iniciadores, sequência de nucleotídeos, temperatura de anelamento, código de acesso e tamanho fragmento amplificado dos genes codificadores das enzimas chave envolvidas nas rotas biossintéticas do IPP e Artemisinina em plantas de *A. annua* L.

Nº	Código do Gene	Enzima	Sequência do Iniciador		T °C Anelamento	Acesso GenBank	Tamanho Fragmento amplificado
			Forward	Reverse			
1	HMGR1	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 1</i>	CGGCGATTTTGTGAAAGAT	TCACATCCATGTCTGGGAAA	60 °C	AF142473	303bp
2	ADS1	<i>amorpha-4,11-diene synthase</i>	ATTATTCAGGCCGAGCAAGA	GCTATGCACGAAGGATTGGT	62 °C	JQ319661	325bp
3	CYP71AV	cytochromo P450 monooxygenase	GGCGATTTTCGGAACTCATAA	AAAGCTTCAGCGTCTTTCCA	61 °C	HQ315834	297bp
4	HDR	<i>1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase</i>	TTGGTTTTTGTGGGGTGTT	CATGGGCATGTTGTATCGAC	62 °C	GQ119345	289 bp
5	GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	GCCTTCCGTGTACCAACTGT	GTGCTGTATCCCCATTCGTT	63 °C	GQ870632	272 bp

Fonte: Zanmaria, UTFPR Campus Pato Branco, 2016.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Avaliações agronômicas

A análise de variância para os parâmetros agronômicos avaliados dos genótipos de *A. annua* aponta que houve diferença significativa ($p < 0,05$), (Tabela 9), para altura de dossel (Hd) para o fator genótipo e massa seca de folhas (MSF) e massa seca de caule (MSC) para o fator dose. Somente para o parâmetro altura de dossel pôde-se observar interação entre os fatores genótipo e dose.

Tabela 9 - Resumo da análise de variância para os parâmetros agronômicos de quatro genótipos de *A. annua* expostas a diferentes doses de solução nutritiva (Hoagland).

Fonte de Variação	GL	QM							
		Ht	Hd	Vd	DC	NR	MSF	MSC	F/C
Genótipo	3	0.00607 ^{ns}	0.006405 [*]	0.00372 ^{ns}	1.158 ^{ns}	42.85 ^{ns}	0.286 ^{ns}	1.57 ^{ns}	0.103 ^{ns}
Dose	2	0.00091 ^{ns}	0.01039 ^{ns}	0.00272 ^{ns}	0.990 ^{ns}	57.53 ^{ns}	5.255 [*]	15.14 [*]	0.022 ^{ns}
Interação G x D	6	0.01332 ^{ns}	0.01224 [*]	0.00669 ^{ns}	0.344 ^{ns}	24.16 ^{ns}	0.042 ^{ns}	0.22 ^{ns}	0.012 ^{ns}
Erro	24	0.01616	0.003618	0.00554	0.403	19.50	0.108	0.67 ^{ns}	0.024 ^{ns}
CV(%)		10.48	9.38	38.55	17.55	22.52	7.72	15.73	37.28

^{*} significativo a 5%; ^{**} significativo a 1% e ^{ns} não significativo pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); GL: Graus de Liberdade; QM: quadrado médio; CV(%): Coeficiente de Variação. Ht: Altura de Planta (m); Vd: Volume de Dossel (m³); DC: Diâmetro de Caule (cm); NR: Número de ramificações; MSF: Massa Seca de Folhas (g); MSC: Massa seca de Caule (g) e Relação Folha/Caule. O parâmetro MSF foi transformado por raiz quadrada e MSC por Box-Cox. Fonte: Zanmaria, UTFPR, *Campus* Pato Branco - PR, 2016.

Dentre os parâmetros agronômicos avaliados, o único parâmetro que mostrou diferença entre genótipos e interação entre dose e genótipo foi altura de dossel (Hd), sendo que o genótipo C23 apresentou menor porte para a dose de 50%, conforme Tabela 10. Para os demais parâmetros não houve diferença significativa entre os genótipos avaliados, e sim, entre doses avaliadas.

Tabela 10 - Altura do Dossel (Hd) de quatro genótipos de *A. annua* expostos a diferentes doses de solução nutritiva.

Nutrição (%)	Genótipos							
	C23		C32		B23		B24	
100	0.601	Aa	0.610	Aa	0.677	Aa	0.631	Aa
50	0.545	Ab*	0.718	Aa	0.706	Aa	0.735	Aa
25	0.659	Aa	0.650	Aa	0.573	Aa	0.600	Aa

* Letra minúscula indica a comparação entre genótipos e letra maiúscula comparação entre doses. Letras diferentes diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey a $p < 0,05$.

Fonte: Zanmaria, UTFPR, *Campus Pato Branco* - PR, 2016.

O teor de massa seca de folhas (MSF) e massa seca total (MST) seguiu um crescimento linear com o fornecimento de solução nutritiva. Para a dose de 100% de solução, a MSF foi 47% superior que a dose de 25% (Figura 22), o que corrobora com Paladini (2012), o qual encontrou o mesmo aumento linear para os mesmos parâmetros conforme a elevação do nível de adubação, sendo a maior dose a aplicação de duas vezes a dose recomendada para a cultura, com resultados de massa seca da parte aérea (MSPA, 14,21 t ha⁻¹) em plantas de *A. annua* cultivadas em campo. Também encontrou maiores índices de massa seca de folhas em dose de 1,5 vezes a dose completa de NPK (PALADINI, 2012). Magalhães (1996) também determinou que maiores doses de adubação nitrogenada proporcionaram maiores rendimentos de massa seca de folhas. Ferreira (2007) também afirma que a produção de biomassa de *A. annua* é afetada pela supressão de adubação. Com a supressão de K obteve decréscimo de 30,5% da produção de biomassa da parte aérea; com a supressão de P obteve decréscimo de 48,1% de biomassa da parte aérea; já com a supressão de N houve decréscimo de 80%; a supressão de calagem demonstrou decréscimo de 81,5% de biomassa da parte aérea e o solo não tratado, ou seja, com supressão de N,P, K e calagem resultou em decréscimo de 91,2% (FERREIRA, 2007). Para MSC observou-se diferença estatística com a dose de 25% de solução nutritiva, obtendo-se menor produção de ramos com menor disponibilidade de nutrientes. Conforme houve maior disponibilidade nutricional, ocorreu o aumento da MSC, entretanto, para as dosagens de 50% e 100% não houve diferença significativa, em detrimento dos resultados para esse parâmetro obtidos por Paladini (2012) obteve crescimento linear com o aumento do fornecimento de adubação.

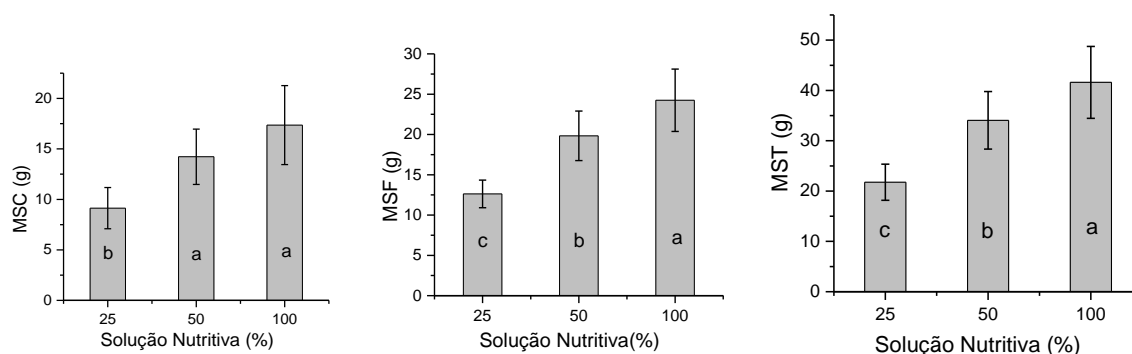


Figura 22 - Teores de massa seca de caule (MSC), massa seca de folhas (MSF) e Massa Seca Total (MST) considerando diferentes doses de solução nutritiva.

* Letras diferentes diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey a $p < 0,05$.

Fonte: Zanmaria, UTFPR, *Campus Pato Branco* - PR, 2016.

3.5.3 Avaliações Fitoquímicas

A análise de variância dos parâmetros fitoquímicos avaliados dos genótipos de *A. annua* aponta que houve diferença significativa ($p < 0,05$), (Tabela 11), entre os fatores dose, genótipo e interação entre os dois fatores. Para o teor de artemisinina (ART%) observou-se diferença para o fator dose. Para o teor de óleo essencial (OE%) houve diferença entre dose e interação entre genótipo e dose.

Tabela 11 - Resumo da análise de variância para os caracteres fitoquímicos de quatro genótipos de *Artemisia annua* L. cultivadas a campo.

Fonte de Variação	GL	QM	
		ART	OE
Genótipo	3	0.00599 ^{ns}	0.00309 *
Dose	2	0.12191 **	0.00661 ^{ns}
Interação Genótipo x Dose	6	0.02649 ^{ns}	0.00167 **
Erro	24	0.01865	0.07929
CV(%)		24.16	176.24

* significativo a 5%; ** significativo a 1% e ^{ns} não significativo pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); GL: Graus de Liberdade; QM: quadrado médio; CV(%): Coeficiente de Variação. ART: artemisinina; OE: Óleo essencial.

Fonte: Zanmaria, UTFPR, *Campus Pato Branco* - PR, 2016.

Em relação aos parâmetros fitoquímicos, para o teor de óleo essencial pôde-se observar que o teor de óleo essencial para a dose de 50% de solução nutritiva foi superior para todos os genótipos testados (Figura 23), com teor máximo de 0,41%. Paladini (2012) determinou maior produtividade de óleo essencial com o tratamento de uma dose da adubação padrão estabelecida, o dobro da dose fornecida aos genótipos que obtiveram maiores teores de óleo essencial.

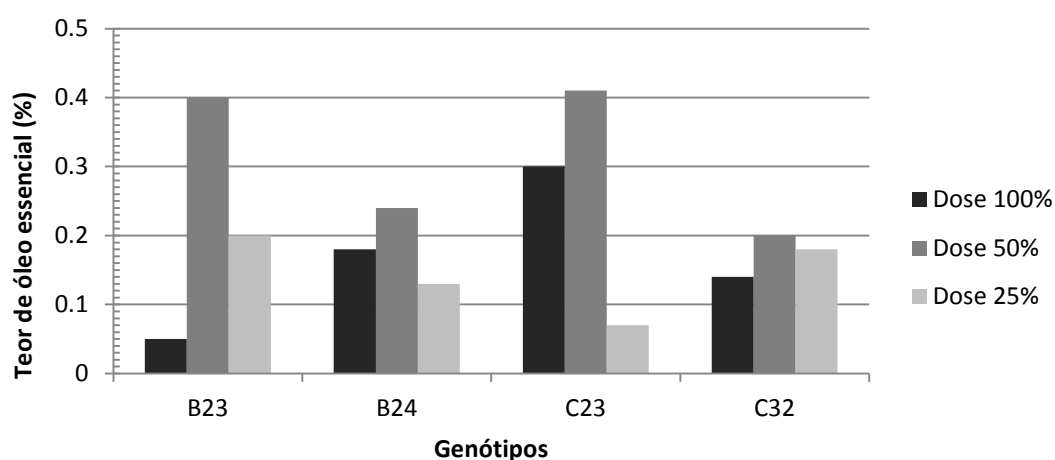


Figura 23 – Teor de óleo essencial de genótipos de *A. annua* submetidos a diferentes doses de solução nutritiva.

Fonte: Zanmaria, UTFPR, Campus Pato Branco – PR, 2016.

Já para o rendimento de artemisinina (RART) os resultados apresentaram diferenças estatísticas para as dose de 50 e 100% em relação à dose de 25% de solução nutritiva, enquanto que para o teor de artemisinina (ART) o melhor índice de rendimento foi para a dose de 25%. O teor de artemisinina foi maior na menor concentração de solução nutritiva (25%), ou seja, as plantas que foram suprimidas em relação à adubação produziram maior teor de artemisinina. Essa situação vem confirmar o que Ferreira (2007) relatou sobre a supressão no fornecimento de nutrientes em relação à produção de artemisinina. O autor demonstrou que a deficiência de K resultou em aumento do teor de artemisinina de 75% no teor (g/100g), comparando-se com plantas que receberam adubação completa ((+N, +P, +K e +Calagem; pH 5,08). Ainda, Marchese *et al.* (2010) observaram aumento no teor de artemisinina em *A. annua* submetida ao estresse hídrico (em nível de -1,39 Mpa) (Figura 24).

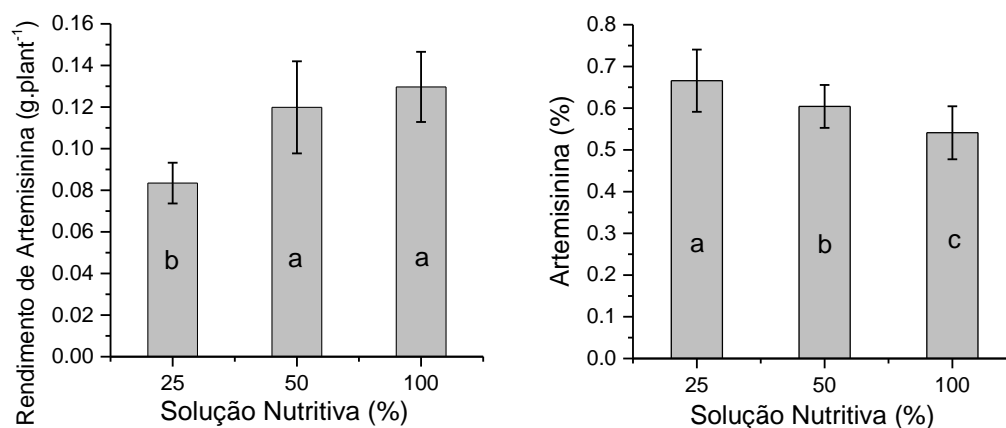


Figura 24 – Rendimento de Artemisinina e Teor de Artemisinina baseados em três doses de solução nutritiva.

* Letras diferentes diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey a $p < 0,05$.

Fonte: Zanmaria, UTFPR, *Campus Pato Branco* - PR, 2016.

Considerando os resultados obtidos, foi possível observar que as plantas submetidas ao estresse nutricional produziram maior teor de artemisinina que as plantas supridas nutricionalmente. Isto posto, entende-se que em situação de estresse o metabolismo secundário é ativado, em detrimento do metabolismo primário, o que Dey & Harbone (1997), Harbone (1993) já confirmavam afirmando que as adaptações bioquímicas de plantas poderiam ocorrer entre os dois metabolismos, e que estresses ambientais podem resultar em aumento desses metabólitos secundários.

Já quando se trata de rendimento por planta, os valores podem ser explicados pelo maior índice de massa seca de folha, que foi obtido com os tratamentos com doses mais concentradas de solução nutritiva, condição essa que corrobora com Ferreira (2007) em relação à resposta positiva de adubação à produção de biomassa da parte aérea.

Portanto, deve-se observar a relação entre a produção de biomassa e artemisinina, para que, comercialmente se obtenha os melhores rendimentos. Nesse caso, doses de 50% de solução nutritiva apresentam valores médios entre produção de biomassa, rendimento e teor de artemisinina.

3.5.4 Avaliações Fisiológicas

Em relação às avaliações fisiológicas (Tabela 12), não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, ou seja, as doses de solução nutritiva em diferentes níveis de nutrição não afetaram a condição de funcionamento do metabolismo primário das plantas, mesmo tendo-se observado menor produção de biomassa em doses menores de fornecimento de nutrientes. Isso pode ser justificado, possivelmente, pelo nível de estresse das plantas não ter atingido um patamar que limitasse a atividade primária do metabolismo, concordando com Hermes & Matson (1992), Kramer e Boyer (1995) e Larcher (1995) que afirmam que em condições de estresse moderado a fotossíntese pode não ser afetada.

Tabela 12 – Médias e desvio padrão dos parâmetros fisiológicos WUE: eficiência no uso de água; PHOTO: taxa de assimilação de CO₂; COND: condutância estomática; Tr: taxa de transpiração de plantas de *A. annua* L., considerando os tratamentos com diferentes doses de solução nutritiva.

Tratamentos	WUE (%)		PHOTO ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)		Cond ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)		Tr ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
C23-100	0.173	0.087	15.176		0.346	0.243	9.662	
C32-100	0.184	0.084	11.596	1.313	0.458	0.240	6.835	2.408
B23-100	0.165		15.287		0.976		9.248	
B24-100	0.258	0.052	14.577	0.610	0.374	0.096	5.738	0.926
C23-50	0.116	0.044	9.778	4.167	0.648	0.090	8.347	0.399
C32-50	0.165		15.287		0.976		9.248	
B23-50	0.172	0.063	18.400	6.715	1.036	0.458	10.701	0.015
B24-50	0.116	0.044	9.778	4.167	0.648	0.090	8.347	0.399
C23-25	0.231		17.681		0.570		7.657	
C32-25	0.269	0.053	13.494	6.866	0.292	0.134	4.855	1.591
B23-25	0.152	0.010	16.136	0.225	0.999	0.192	10.608	0.563
B24-25	0.166		16.866		0.935		10.136	

Fonte: Zanmaria, UTFPR, *Campus* Pato Branco, 2016.

3.5.5 Análise dos perfis de expressão gênica por reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) semiquantitativa

Os resultados dos géis de agarose que trazem a comparação entre os quatro genótipos e as três doses de adubação estão representados na Figura 25, considerando a expressão dos genes em relação ao nível de adubação em que foram submetidos.

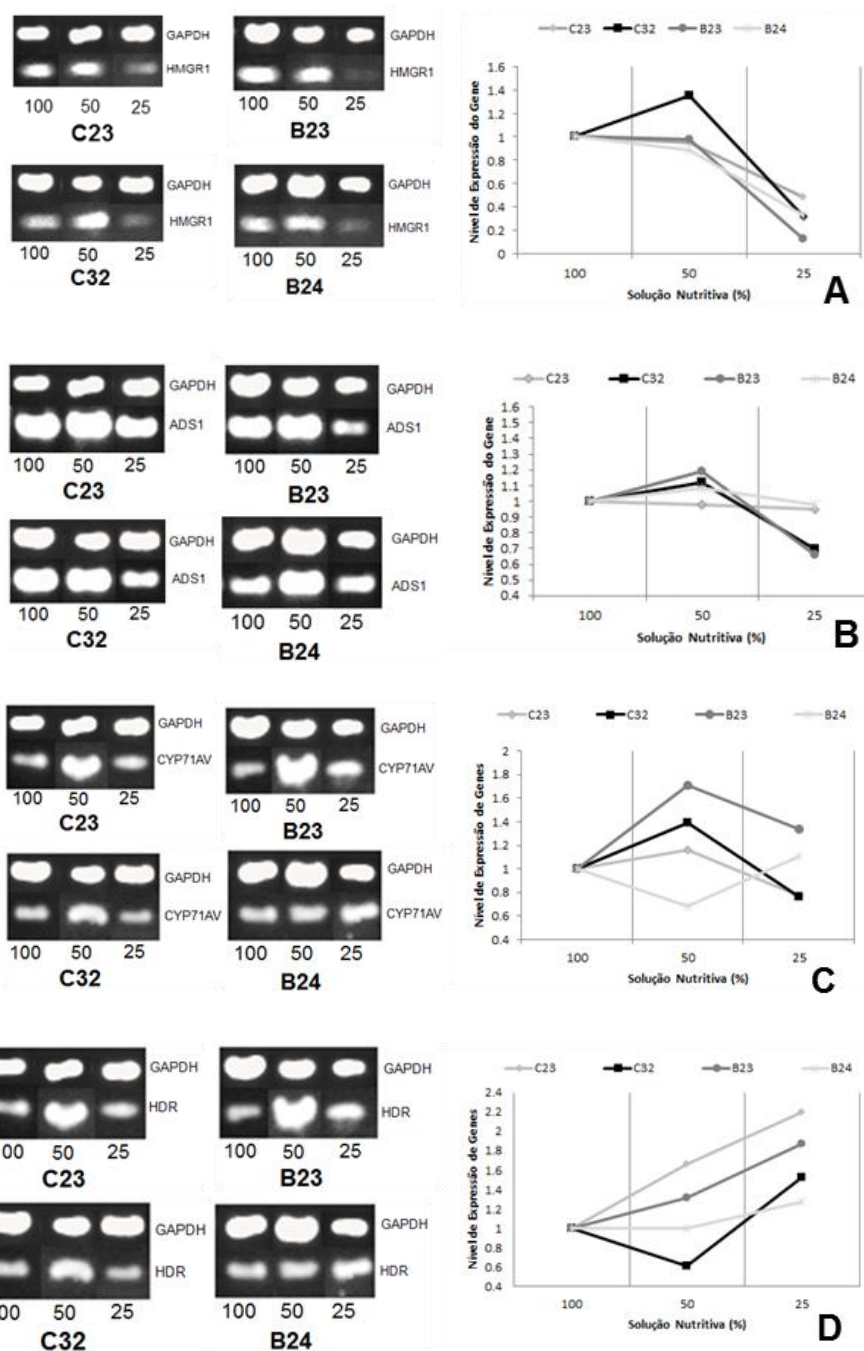


Figura 25 - Géis de agarose 2% visualizados sob luz ultravioleta contendo as sequências de bandas geradas a partir do produto da PCR com os primers alvo: A) Primer 1 - HMGR1 (HMG-CoA redutase), B) Primer 2 - ADS1 (amorpha-4,11-diene synthase), C) Primer 3 - CYP71AV (cytochromo P450 monooxygenase), D) Primer 4 - HDR (1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase) e o primer referência: E) Primer 5 - GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) e os níveis de expressão gênica de 4 genótipos de *Artemisia annua*: C23, B23, C32 e B24.

Fonte: Zanmaria, UTFPR Campus Pato Branco - PR, 2016.

Pode-se observar que houve uma tendência de maior expressão dos genes alvo nos tratamentos com dosagem de 50% de solução nutritiva, em detrimento às soluções de 100% e 25% (Figura 25) quando comparados com o gene referência. Esse resultado reforça os resultados obtidos pela produção de artemisinina com dosagem de 50%, considerando o estresse nutricional como ativador do metabolismo secundário. Além disso, apesar de não ter sido observada diferença entre genótipos para teor de artemisinina, foi observado que houve variações no padrão de acúmulo de transcritos entre eles.

A HMGR1 (3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase) é uma enzima chave na produção de artemisinina. Está presente na via do mevalonato, e Olofsson *et al.*, 2011 mostraram que a sua expressão limita a formação da artemisinina em *A. annua*. A regulação da HMGR1 está relacionada, segundo os autores, com a idade dos tecidos vegetais. Observaram que a expressão dessa enzima foi 20 e 8 vezes maior em botões de flores altamente ativos e biosinteticamente ativos e folhas jovens, respectivamente, do que em folhas velhas. Também puderam detectar a maior expressão (20 vezes maior) nas raízes, devido ao seu rápido crescimento. (OLOFSSON *et al.*, 2011). Portanto, em tecidos em crescimento ativo, essa enzima está expressa em maior intensidade. Observando o comportamento dessa enzima pela Figura 25, os genótipos submetidos a 25% de solução nutritiva estão condicionados a um crescimento limitado pelo fornecimento de nutrientes, o que pode explicar a menor expressão dessa enzima nesse tratamento, pois com menor atividade enzimática na via precursora do IPP, pode ocorrer reflexo na redução da produção de artemisinina. Para esta enzima, HMGR1, o genótipo C32 se destacou por apresentar aumento de 34% em sua expressão na dose de 50% em relação à dose de 100% de solução nutritiva completa (Figura 25 A).

As enzimas ADS, CYP71AV1 apresentaram maior expressão nos níveis de 50% de solução nutritiva para três dos quatro genótipos testados: ADS (B23 – 19% superior em relação à dose de 100% de solução nutritiva completa; C32 – 12% e B24 – 8%) e CYP71AV1 (C23 – 16% superior em relação à dose de 100% de solução nutritiva completa; B23 – 70%; e C32 – 39%) (Figuras 25 B e C). Estas estão envolvidas diretamente na biossíntese da artemisinina e são fundamentais na conversão de FDP (farnesil difosfato) em ácido artemisínico que é um precursor da

artemisinina. Olofsson *et al.*, (2011) obtiveram superexpressão dessas enzimas trabalhando com plantas transgênicas obtendo até 9 vezes maior concentração de artemisinina com a superexpressão dessas enzimas.

Já a enzima HDR (*1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase*), apresentou maior expressão nas doses de 25% de solução nutritiva para os quatro genótipos testados (C23 – 120% maior a expressão em relação à dose de 100% de solução nutritiva completa; B23 – 87%; C32 – 53% e B24 – 27%) (Figura 25 D). As plantas submetidas a essa dosagem apresentaram crescimento limitado, havendo, conseqüentemente, menor crescimento vegetal e formação de novas folhas (tecidos jovens). Considerando isso, uma possível explicação para esse comportamento seria que houve maior expressão gênica nesse tratamento por este possuir mais tecidos maduros que os tratamentos de 100% e 50% de solução nutritiva, os quais apresentavam-se em maior crescimento devido ao fornecimento de maior concentração de nutrientes. Isso corrobora com os dados de Olofsson *et al.* (2011) que detectaram que a superexpressão dessa enzima foi 10-30 vezes mais elevada em folhas velhas do que nos outros tecidos.

3.6 CONCLUSÕES

A aplicação de doses crescentes de solução nutritiva para plantas de *A. annua* possibilita incremento linear para produção de biomassa, entretanto, com relação contrária para produção de artemisinina.

O estresse nutricional causado nas plantas submetidas à dose de 25% de solução nutritiva completa apresentou maior teor de artemisinina, entretanto, com uma produção de biomassa muito baixa, situação esta, que, comercialmente, não é rentável.

Genótipos submetidos à níveis nutrição de 50% apresentam melhor relação para a produção de biomassa e artemisinina e óleo essencial, o que leva a considerar que para se obter plantas com maiores rendimentos, a aplicação de doses elevadas podem afetar a produção de metabólitos secundários de interesse comercial.

Os genes ADS1 e CYP71AV aumentam a transcrição em plantas submetidas a níveis de 50% de solução nutritiva. Estas enzimas estão diretamente envolvidas da via de biossíntese da artemisinina.

4 SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE ALTO RENDIMENTO E VARIABILIDADE PARA CARACTERES AGRONÔMICOS, FISIOLÓGICOS E FITOQUÍMICOS DE *Artemisia annua* L.

ZANMARIA, Silvia Leticia. Seleção de Genótipos de Alto Rendimento e Variabilidade para Caracteres Agronômicos, Fisiológicos e Fitoquímicos de *Artemisia annua* L. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2016.

4.1 RESUMO

Artemisia annua L. é uma planta herbácea nativa da Ásia que possui folhas aromáticas e produz a artemisinina e óleo essencial, biomoléculas de interesse comercial. Busca-se, através do melhoramento, aumentar o rendimento desses metabólitos na planta, pois por ser alógama, *A. annua* apresenta alta variabilidade genética intrapopulacional. O objetivo deste estudo foi avaliar a variabilidade de genótipos de *A. annua* para caracteres agronômicos, fisiológicos e fitoquímicos. Os genótipos B23, B24, C23, C32 e a variedade Artemis F2 foram avaliados a campo em delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições. Foram avaliados os caracteres agronômicos: altura de planta (Ht), número de ramificações (NR), volume de dossel (Vd), massa seca de folhas (MSF), massa seca de caule (MSC), relação folha/caule (F/C), caracteres fitoquímicos: artemisinina (ART) e óleo essencial (OE) e caracteres fisiológicos: taxa de assimilação de CO₂ (PHOTO, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (Cond, $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), taxa de transpiração (Tr, $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e eficiência no uso de água (WUE, %). Os dados foram submetidos à análise de variância e comparação múltipla de médias pelo teste de Schott-Knott. Foi realizada a análise de agrupamento pelo método UPGMA (método da ligação média não ponderada), com base na matriz de distância generalizada de Mahalanobis. A contribuição relativa dos caracteres no total da divergência genética foi analisada utilizando o critério de Singh. Artemis F2 se destacou para altura de planta (Ht), volume de dossel (Vd) e massa seca de folha (MSF), em relação aos genótipos analisados ($p < 0,05$). Os caracteres que mais contribuíram para determinar a dissimilaridade genética foram altura de planta (Ht), relação folha/caule (F/C) e volume de dossel (Vd). Considerando a análise de agrupamento, os genótipos C32 e B24, C23 e B23 apresentaram menor dissimilaridade entre si, enquanto Artemis F2 foi a mais dissimilar. Não houve diferença significativa para artemisinina entre os genótipos testados, enquanto que para o óleo essencial, Artemis F2 diferiu significativamente dos demais genótipos. Os caracteres fitoquímicos de rendimento apresentaram baixa contribuição para determinar a dissimilaridade genética entre os tratamentos (ART - 0,22% e OE - 3,83%). A maior produção de biomassa para Artemis F2 justifica o maior rendimento de óleo essencial por possuir maior estatura e maior adensamento entre ramos.

Palavras-chave: artemisinina, dissimilaridade genética, óleo essencial.

GENOTYPE SELECTION OF HIGH PERFORMANCE AND VARIABILITY FOR AGRONOMIC, PHYSIOLOGICAL AND PHYTOCHEMICALS CHARACTERS OF *Artemisia annua* L.

ZANMARIA, Silvia Leticia. Genotype selection of High Performance and Variability for Agronomic, Physiological and Phytochemicals Characters of *Artemisia annua*. Thesis (Ph.D. in Agronomy) - Graduate Program in Agronomy (Concentration Area: Crop), Federal University of Technology Paraná. Pato Branco, 2016.

4.2 ABSTRACT

Artemisia annua L. is a native herb from Asia that has aromatic leaves and produces artemisinin, an effective sesquiterpene lactone against diseases such as malaria and essential oil, widely used in the cosmetic industry. Seeks, through the improvement, increase the yield of these metabolites in the plant, because to be alógama, *A. annua* has high genetic variability intrapopulation. The aim of this study was to evaluate the variability of *A. annua* genotypes for agronomic and phytochemical characters. The B23 genotypes, B24, C23, C32 and variety Artemis F2 were evaluated in field design of randomized blocks with four replications. We evaluated the agronomic traits: plant height (ES), number of branches (NR), canopy volume (RV), dry weight of leaf (LDM), stem dry weight (MSC), leaf relative / stem (F / C), phytochemicals characters: artemisinin (ART) and essential oil (EO) and physiological assessments - CO₂ rate assimilation (PHOTO $\mu\text{molCO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), stomatal conductance (gS, $\text{mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), transpiration rate (E, $\text{mmolH}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) and efficiency water usage (WUE, %). Data were submitted to analysis of variance and multiple comparison of means by Schott-Knott test. It performed the analysis of grouping by UPGMA (average linkage method unweighted), based on the matrix of Mahalanobis distance. The relative contribution of characters in the total genetic diversity was analyzed using the criteria of Singh. Artemis F2 stood for plant height (ES), canopy volume (RV) and dried dough sheet (MSF) in relation to the analyzed genotypes ($p < 0.05$). The characters that contributed most to determine the genetic dissimilarity were plant height (ES), leaf / stem ratio (F / C) and volume canopy (Vd). Considering the cluster analysis, the genotypes C32 and B24, C23 and B23 had lower dissimilarity each other, while Artemis F2 was the most dissimilar, forming a single group. There was no significant difference for artemisinin among the tested genotypes, whereas for the essential oil, Artemis F2 differ significantly from the other genotypes. The yield phytochemicals characters showed low contribution to determine the genetic dissimilarity between treatments (ART - 0.22% and OE - 3.83%). The increased production of biomass for Artemis F2 justifies the higher oil yield. This variety has a differentiated plant architecture to the other, with greater height and greater density of branches.

Keywords: Artemisinin, genetic dissimilarity, essential oil.

4.3 INTRODUÇÃO

A *Artemisia annua* L. é nativa da Ásia e foi introduzida no Brasil no final da década de 80, através de sementes oriundas da Europa e da China (MAGALHÃES, 1996), sendo então aclimatada nas regiões de clima subtropical e temperado do Brasil, esta espécie é caracterizada como sendo uma planta aromática, de fecundação cruzada e alta variabilidade genética (MAGALHÃES, 1999), de dias curtos possuindo fotoperíodo de aproximadamente 13 horas (MARCHESE *et al.*, 2002), multiplicando-se por sementes ou vegetativamente, sendo caracterizada como uma espécie diploide com genoma $2n=18$ (LIN *et al.*, 2011).

Esta espécie conhecida devido à produção de compostos medicinais com ação antimalárica comprovada, além de apresentar citotoxicidade às células cancerígenas (LAI, 2006; IVANESCU, 2014), ação anti-inflamatória, atividade neuroprotetora (MARTINEZ *et al.*, 2014). Por se tratar de uma planta aromática, seu óleo essencial é utilizado na confecção de perfumes e cosméticos (MAGALHÃES, 2004).

A artemisinina, composto medicinal produzido pela planta, é uma lactona sesquiterpênica (RODRIGUES *et al.*, 2006), que ao ser combinada com outras moléculas como a mefloquina apresenta efeito significativo no controle da malária (WHO, 2014). As maiores concentrações dessas moléculas são encontradas nas folhas e inflorescências da *A. annua* (FERREIRA, 1980), isso porque a artemisinina é armazenada nos tricomas glandulares da planta (ZHANG *et al.*, 2006).

A. annua é a espécie que mais produz artemisinina, a qual já apresentou no sudoeste do Paraná, em apenas uma colheita, produtividades de até $48,4 \text{ Kg ha}^{-1}$ (CAPELIN, 2012), em contrapartida da média de produção das espécies silvestres de $1,0 \text{ Kg ha}^{-1}$ (BOLINA, 2014). As melhores variedades comerciais, quando colhidas múltiplas vezes no mesmo ano, podem produzir até $70 \text{ Kg de artemisinina ha}^{-1}$ (KUMAR *et al.* 2004).

Devido ao aumento da demanda pela molécula, tem-se a necessidade de impulsionar a produção destes compostos, através do aumento de produção, ou ainda, investir no incremento do rendimento desses biocompostos na planta.

Trabalhos realizados por Marchese (2006), Magiero (2009), Bolina (2011), Paladini (2012) e Capelin (2012), obtiveram resultados promissores com variedades

de *A. annua* oriundas do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas CPQBA – Campinas. Bolina *et al.* (2014), selecionaram materiais a partir das variedades 2/39x5x3M e 2/39x1V. Para a variedade 2/39x5x3M, obteve os genótipos B23 e B24 como promissores em termos de rendimento, e para a variedade 2/39x1V, foram selecionado os genótipos C23 e C32.

Artemis F2 é uma variedade de *A. annua* melhorada pela Mediplant, na Suíça, e é um material já conhecido por seu alto rendimento e foi utilizado no presente estudo como parâmetro para os indicadores de produtividade avaliados. O programa de melhoramento desenvolvido pela empresa selecionou genótipos de uma população base, com índices superiores de rendimento, como teor de artemisinina, óleo essencial e produção de biomassa. Esses materiais foram clonados e cruzados entre si, tendo-se conhecimento dos dois progenitores. Os genótipos originários destes cruzamentos foram de híbridos, embora os progenitores não fossem linhagens puras obtidas por endogamia e sim, clonagens de materiais segregantes com características superiores (MAGALHÃES, 1996).

Portanto, na presente pesquisa utilizaram-se esses quatro genótipos juntamente com a variedade Artemis F2 com o objetivo de selecionar os genótipos de alto rendimento e avaliar a variabilidade para caracteres agrônômicos, fisiológicos e fitoquímicos de *A. annua* cultivadas em campo.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na área experimental do curso de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (Figura 27 A-D), localizada em Pato Branco-PR, latitude 26°11' S, longitude 52°36' W, altitude de 760 m, clima Cfa subtropical (KÖPPEN, 1948) e solo pertencente à unidade de mapeamento Latossolo Vermelho Distroférico Úmbrico, textura argilosa, álico, fase floresta subtropical perenifólia, relevo ondulado (BHERING *et al.*, 2008). A condição de fertilidade do solo inicial pode ser visualizado no Apêndice C.



Figura 26 – Experimento instalado a campo na unidade experimental da UTFPR – Pato Branco, com quatro genótipos (C23, C32, B23 e B24) e uma variedade Artemis F2 de *A. annua* L. A) Transplante das mudas (ocorrido dia 17/10/16). B) Plantas de *A. annua* em desenvolvimento 90 dias após o transplante. C) Plantas de *A. annua* em desenvolvimento 110 dias após o transplante. D) Somente os genótipos em campo, prontos para colheita (ocorrida no dia 30/04/16).

Fonte: Zanmaria, UTFPR *Campus* Pato Branco – PR, 2016.

Plantas de *A. annua* foram pré-selecionadas a partir dos resultados obtidos por Bolina *et al.* (2014). No dia 15 de maio de 2015 foram feitas estacas dos genótipos B23, B24, C23 e C32 de *A. annua* oriundos de estacas de plantas instaladas em campo por Bolina (2014). Foram preparadas 150 estacas semilenhosas de cada genótipo em tubetes de 120 cm³ de substrato Plantmax®. Também foram semeadas Artemis F2 em bandeja de isopor de 144 células com substrato plantmax®, sendo que todas as plantas receberam irrigação diária e ficaram sob dias longos em casa de vegetação da UTFPR. Após 30 dias do plantio foi realizada aplicação de solução nutritiva de Hoagland & Arnon em meia força e após 15 dias novamente em força inteira. Dia 20/07/2015 as estacas já enraizadas e as mudas oriundas da semeadura foram transferidas para copos com 200 g do

mesmo substrato com fornecimento de luz artificial suplementando fotoperíodo natural de ± 13 horas, em mais 4 horas. Dia 17 de outubro as mudas foram transplantadas a campo, com espaçamento de 1,0 m x 1,0 m, totalizando 825 m² e 480 plantas, utilizando delineamento em blocos ao acaso com 4 repetições e cinco tratamentos. Cada unidade experimental foi composta por 24 plantas, sendo distribuídas na proporção de 4 x 6 plantas (Apêndice A). A adubação foi realizada conforme recomendação para produtividade de 10.000 Kg ha⁻¹ para cultura do milho (conforme Comissão Brasileira de Fertilidade do Solo), conforme Paladini (2012), na formulação 5-20-20 (140 Kg de N; 135 Kg ha⁻¹ de P₂O₅, 120 Kg ha⁻¹ de K₂O), sendo o N distribuído em três doses, sendo uma na base e duas em cobertura. No dia 15 de dezembro foi realizada a primeira aplicação de N em cobertura totalizando 50 Kg de N ha⁻¹. A segunda aplicação de N foi realizada no dia 04 de janeiro de 2016 na dosagem de 50 Kg de N ha⁻¹. O sistema de irrigação foi imediatamente instalado para rega das mudas. As plantas invasoras foram controladas por capina manual semanalmente.

A colheita das plantas de Artemis F2 foi realizada no dia 26 de março de 2016, quando mais de 50% delas entraram em processo de pré-florescimento. As plantas foram cortadas rente ao solo e foram colhidas 04 plantas por unidade experimental. Todas as plantas foram desganhadas, sendo a massa verde da parte aérea colocada em sacos de papel e secas em secador com circulação de ar forçado até massa constante, à temperatura de 35°C (Figura 28) e os ramos separados e secos em estufa com temperatura de 40°C.

No dia 30/04/2016 os genótipos C23, C32, B23 e B24 foram colhidos, entretanto, sem entrar em florescimento. Foram colhidas 04 plantas por unidade experimental e realizado o mesmo processo da primeira etapa.

Foram realizadas avaliações agronômicas, fisiológicas e fitoquímicas no experimento para comparação e seleção dos melhores genótipos. As avaliações agronômicas foram realizadas quando as plantas entraram em seu período de pré-florescimento, no caso da Artemis F2, no dia 15 de março, e os demais genótipos foram avaliados no dia 12 de abril.

A avaliação agronômica considerou os parâmetros: altura da planta (Ht, m); altura do dossel (Hd, m); diâmetro da seção inferior do dossel (Di, m); diâmetro da

seção média do dossel (D_m , m); diâmetro da seção superior do dossel (D_s , m); diâmetro do caule (DC , cm); número de ramificações (NR), e volume do dossel (V_d , m^3). O volume do dossel foi estimado pela equação $V_d = \pi D_i^2 H_d / 12$, conforme metodologia utilizada por Favarin *et al.* (2002) (Anexo A).



Figura 27 – Secagem de amostras de *A. annua* armazenadas em sacos de papel e acondicionadas em secador de ar forçado à temperatura de 35°C.
Fonte: Zanmaria, UTFPR, Campus Pato Branco – PR, 2016.

As avaliações fisiológicas para a variedade Artemis foram realizadas no período de pré-florescimento (15/03/2016) e os demais genótipos no dia 12/04/2016. As variáveis fisiológicas avaliadas são taxa de assimilação de CO_2 (PHOTO, $\mu mol CO_2 m^{-2} s^{-1}$), condutância estomática (Cond, $mol H_2O m^{-2} s^{-1}$), taxa de transpiração (Tr, $mmol H_2O m^{-2} s^{-1}$) e eficiência no uso de água (WUE, %). A avaliação das trocas gasosas foi realizada utilizando-se um sistema de medição de trocas gasosas, equipado com um analisador infravermelho de gases (IRGA 6400xT, Li-Cor, USA) com injetor automático de CO_2 e fonte artificial de luz vermelho e azul. As mensurações foram realizadas próximo às 10 horas da manhã utilizando o as folhas jovens, medianas e velhas do dossel da planta (Figura 29).

As avaliações fitoquímicas foram realizadas posteriormente, após a secagem do material vegetal. Foram avaliados teor de óleo essencial (OE, $L ha^{-1}$) e teor de artemisinina (ART, %).



Figura 28 – Mensurações dos parâmetros fisiológicos com o aparelho IRGA 6400xT em quatro genótipos e uma variedade de *A. annua* cultivadas em campo na Unidade Experimental da UTFPR – Pato Branco. A) Sobreposição de folhas de *A. annua* para mensuração com o aparelho IRGA. Isso é necessário pela característica da folha ser composta. B,C) Momento da mensuração com IRGA: o período adequado para coletar uma medida confiável é a estabilização do CV(%) em no mínimo 0,5. D) Gravação dos dados no aparelho IRGA. Após os mesmos são descarregados em um computador para posterior análise.

Fonte: Zanmaria, UTFPR *Campus* Pato Branco – PR, 2016.

O rendimento de óleo essencial foi estimado pela extração por hidrodestilação, onde 50 g de massa seca de folhas de cada genótipo das plantas de *A. annua* foram transferidas para um balão de 2 L contendo 1,5 L de água destilada, acoplado a um sistema Clevenger, onde foi realizada a hidrodestilação durante 3 horas após o início da condensação. Depois de aferir o volume de óleo extraído, foi armazenado hermeticamente em vidros âmbar em geladeira a 4° C (Figura 30 A-D).

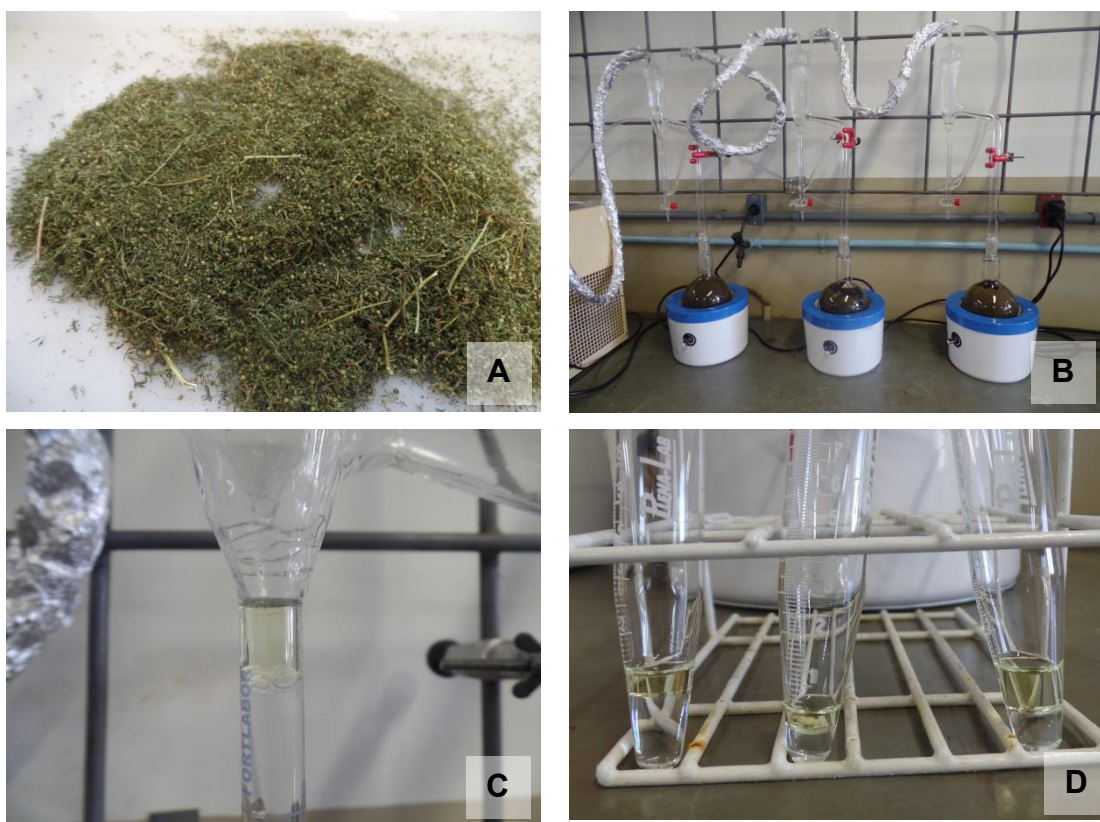


Figura 29 – Processo de extração de óleo essencial de *A. annua* em laboratório. A) Massa Seca de folhas (50g) de *A. annua* para extração. B) Conjunto de Clevengers realizando a hidrodestilação. C) Óleo essencial de *A. annua* em pipeta graduada sendo destilado. A quantidade é anotada para posterior cálculo de rendimento. D) Óleo de *A. annua* ainda com resíduos de água, onde será coletado com uma pipeta de Pasteur e acondicionado posteriormente em frasco âmbar.

Fonte: Zanmaria, UTFPR, Campus Pato Branco – PR, 2016.

Para quantificação do teor de artemisinina em *A. annua*, o processo foi realizado em duas etapas. A preparação dos extratos foi realizada no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Pato Branco e após as amostras foram enviadas para o Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - UNICAMP – SP, para mensuração.

Os extratos foram obtidos a partir de 0,3 g de folhas secas e moídas extraídas com 5 mL de acetato de etila por 3 minutos em Politron e centrifugados por 20 minutos. O extrato separou-se em duas frações, sendo retirados 4 mL do extrato da fração aquosa. A fração foi evaporada à secura sob vácuo em evaporador rotativo.

As amostras foram ressuspensas em balão volumétrico de 5 mL com

metanol grau CLAE, filtradas e analisadas em triplicata em cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado ao detector de índice de refração por CLAE/IR. Foi utilizado um cromatógrafo líquido Waters, bomba Waters 515, válvula injetora Rheodyne, com alça de amostragem de 20 µl. O sistema foi acoplado a um detector de índice de refração Waters 2414; temperatura interna do detector 35 °C. Os dados cromatográficos foram analisados usando-se software Empowerpro build 1154/Waters. Foi utilizada coluna com fase estacionária ciano, Luna CN 5 µm 250 x 4,6 mm; fase móvel H₂O:Metanol (60:40 v/v); modo isocrático e vazão 1,0 mL/min. As quantificações do teor de artemisinina dos extratos foram realizadas utilizando a metodologia validada desenvolvida por Celeghini (2009), a partir do método do padrão externo.

Foi realizada análise multivariada com intuito de verificar a contribuição relativa dos caracteres na divergência genética, considerando a análise baseada na distância de Mahalanobis, a importância relativa dos caracteres no total da dissimilaridade observada utilizando o critério de Singh. Visando identificar os genótipos com desempenho similar foi realizada a análise de agrupamento pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) utilizando a matriz obtida pela análise da distância generalizada de Mahalanobis.

Os dados quantitativos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Schott – Knott ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$), com auxílio do programa Genes (CRUZ, 2013).

Foi realizada a análise de agrupamento pelo método UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic means* - método da ligação média não ponderada), com base na matriz de distância generalizada de Mahalanobis. A contribuição relativa dos caracteres no total da divergência genética foi analisada utilizando o critério de Singh (1981).

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Avaliações Agronômicas

A análise de variância para os parâmetros agronômicos avaliados aponta que houve diferença significativa ($p < 0,05$), (Tabela 13), entre os quatro genótipos e a variedade de *A. annua* testados.

Tabela 13 - Resumo da análise de variância para os parâmetros agronômicos de quatro genótipos e uma variedade de artemisia (*Artemisia annua* L.) cultivadas a campo. UTFPR, Campus Pato Branco – PR, 2016.

Fonte de Variação	GL	QM						
		Ht	Vd	DC	NR	MSF	MSC	F/C
Genótipo	4	0,38 **	0,01 *	0,66 *	11,77 ^{ns}	59182,87 **	78654,95 *	0,05 **
Média		1,33	0,22	3,45	17,61	266,18	605,811	0,45
Erro	12	0,006	0,005	0,14	9,61	9085,82	18089,52	0,00
CV(%)		6,1	33,9	10,8	17,6	35,8	22,2	14,2

* significativo a 5%; ** significativo a 1% e ^{ns}; GL: Graus de Liberdade; QM: quadrado médio; CV(%): Coeficiente de Variação. Ht: Altura de Planta (m); Vd: Volume de Dossel (m³); DC: Diâmetro de Caule (cm); NR: Número de ramificações; MSF: Massa Seca de Folhas (g); MSC: Massa seca de Caule (g) e Relação Folha/Caule.

Fonte: Zanmaria, UTFPR Campus Pato Branco – PR, 2016.

O teste de médias indica diferenças significativas para altura de planta (Ht), volume de dossel (Vd) massa seca de folhas (MSF) e massa seca de caule (MSC) com superioridade para a variedade Artemis F2 (ART) em relação aos genótipos analisados. Os genótipos B23, C23 e ART foram superiores na relação folha/caule (F/C) em relação a B24 e C32. Os genótipos que apresentaram caules mais espessos, através do parâmetro diâmetro de caule (DC) foram B23, B24 e C32 (Tabela 14).

Tabela 14 – Médias obtidas para os parâmetros agronômicos dos genótipos B23, B24, C23, C32 e a variedade Artemis – F2. UTFPR, Campus Pato Branco – PR, 2016.

Genótipo	Ht	Vd	DC	NR	MSF	MSC	F/C
B23	1,19	b 0,20	b 3,61	a 16,12	a 275,315	b 543,43	b 0,51
B24	1,17	b 0,18	b 3,82	a 17,93	a 155,95	b 548,79	b 0,30
C23	1,21	b 0,18	b 3,21	b 17,00	a 241,01	b 491,77	b 0,52
C32	1,20	b 0,21	b 3,76	a 20,43	a 190,86	b 597,50	b 0,33
ART	1,88	a 0,34	a 2,87	b 16,56	a 467,78	a 847,55	a 0,55

* Ht: Altura de Planta (m); Vd: Volume de Dossel (m³); DC: Diâmetro de Caule (cm); NR: Número de ramificações; MSF: Massa Seca de Folhas (g); MSC: Massa seca de Caule (g) e Relação Folha/Caule.

** Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Scott-Knott (p<0,05).

Fonte: Zanmaria, UTFPR Campus Pato Branco – PR, 2016.

O rendimento de MSF para Artemis F2 foi de 4.677,80 Kg ha⁻¹, sendo este considerado um rendimento superior aos obtidos para a região até então. Capelin (2012), obteve níveis de produtividade de MSF de 4.206,7 Kg ha⁻¹, enquanto Marchese (2006), em estudos realizados na mesma região, com a variedade 2/39x1v, desenvolvida pelo programa de melhoramento do CPQBA- UNICAMP, encontrou rendimentos de 3.045,10 Kg ha⁻¹. Bolina (2010), testando a variedade (2/39 x 5)x3M, na mesma região do presente estudo, encontrou uma produção de 4.285 Kg ha⁻¹ para a variável MSF. Deste último dado, a produtividade obtida neste estudo obteve um incremento de 8,4%.

Os genótipos B23, B24, C23 e C32 apresentaram baixo rendimento de MSF: B23 = 2.750 Kg ha⁻¹, B24 = 1.559,50 Kg ha⁻¹, C23 = 2.410, 10 Kg ha⁻¹ e C32 = 1.908,60 Kg ha⁻¹, inferiores à variedade Artemis F2. As estacas desses genótipos são oriundas das variedades testadas por Bolina (2014), ou seja, os genótipos B23 e B24 são da variedade 2/39x5x3M, e os genótipos C23 e C32 da variedade 2/39x1V, desenvolvidas pelo programa de melhoramento do CPQBA- UNICAMP, as quais obtiveram índices mais elevados de produtividade naquele trabalho. Um aspecto que pode ter reduzido a produtividade foi o plantio tardio. Marchese (2006) estudou o potencial de rendimento da espécie para a região sudoeste e constatou que o melhor período para o plantio em campo é na primavera quinzena de setembro, ou seja, 30 dias antes do transplante realizado no presente estudo.

No presente trabalho foram testados dois materiais com diferentes origens. Os genótipos C23, C32, B23 e B24 são estacas oriundas de sementes dos acessos CPQBA 2/39x1V e 2/39x5x3M, melhorados a partir de uma população de plantas do Vietnã. Já a Artemis F2 tem origem na China e foi melhorada pela Mediplant na Suíça (FERREIRA *et al.*, 1995). Trabalhos realizados por Ferreira *et al.* (1995) afirmam que *A.annua* com origem da China é considerada uma espécie com comportamento de Planta de Dias Curtos (PDC), classificação dada por Marchese (2006) àquelas plantas que florescem quando o comprimento do dia é inferior ao fotoperíodo crítico ou indutivo. Entretanto, Magalhães (1996) e Magalhães *et al.* (1997) relataram em seus trabalhos que plantas provenientes de sementes dos acessos vietnamitas permaneceram vegetativas em fotoperíodos acima de 13 horas e abaixo de 11 horas, e floresceram em um fotoperíodo entre 11 e 13 horas, o que sugere um comportamento de Plantas de Dias Intermediários (PDI), classificação dada por Marchese (2006), àquelas plantas que florescem dentro de uma faixa de comprimento do dia, não florescendo acima ou abaixo dos limites superior e inferior desta faixa.

Além disso, Marchese (2006) observou que para os materiais de origem vietnamita ocorreu maior interação entre o fotoperíodo e temperatura na indução ao florescimento das plantas, sendo que em temperaturas mais baixas (máxima de 29°C e mínima de 13°C) houve maior indução de florescimento nas plantas. Nesse caso, as plantas tiveram um comportamento de dias curtos quando submetidas à temperaturas mais baixas naquele período.

Considerando isso, pode-se sugerir que a instalação tardia do experimento, aliado à temperaturas mais elevadas que ocorreram no período e a natureza dos genótipos (PDI) foram fatores limitantes para o não florescimento dessas plantas em campo.

Volume de dossel (Vd) e altura de planta (Ht) também apresentaram diferenças significativas entre genótipos com superioridade para a variedade Artemis F2. Observa-se que a arquitetura das plantas de Artemis e dos genótipos é diferente. A primeira apresenta estatura maior, que pode chegar até 3,0m de altura (Marchese *et al.*, 2006; Bolina *et al.* 2014), com ramos mais finos e adensados, enquanto que os genótipos apresentam porte menor e formato mais arredondado com ramos de

maior espessura. Entretanto, considerando a relação folha/caule, os genótipos B23 e C23 não diferiram estatisticamente da variedade Artemis, o que pode ser considerado positivo no sentido de maior incremento na produção de biomassa de folhas em detrimento aos ramos.

4.5.2 Avaliações Fisiológicas

Para os parâmetros fisiológicos avaliados, a análise de variância aponta que houve diferença significativa ($p < 0,05$), (Tabela 15), entre os quatro genótipos e uma variedade de *A. annua* testados.

Tabela 15 - Resumo da análise de variância para os parâmetros fisiológicos de quatro genótipos e uma variedade de artemisia (*Artemisia annua* L.) cultivadas a campo. UTFPR, Campus Pato Branco – PR, 2016.

Fonte de Variação	GL	QM			
		WUE	PHOTO	Cond	Tr
Genótipo	4	0,003 ^{ns}	39,15 *	0,01 ^{ns}	5,80 ^{ns}
Média		0,184	13,42	0,624	7,621
Erro	12	0,003	11,11	0,07	4,1
CV(%)		31,5	24,8	43,9	26,6

* significativo a 5% e ^{ns} não significativo pelo teste de schott-knott; GL: Graus de Liberdade; QM: quadrado médio; CV(%): Coeficiente de Variação. WUE: eficiência no uso de água (%); PHOTO: taxa de assimilação de CO₂ ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); COND: condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); Tr: taxa de transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Fonte: Zanmaria, UTFPR Campus Pato Branco – PR, 2016.

Observando o teste de médias (Tabela 16), a taxa de assimilação líquida de CO₂ (PHOTO, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) apresentou menor atividade para a variedade Artemis em relação aos genótipos testados. Com menor taxa fotossintética, a variedade Artemis F2 apresentou resultados mais promissores, concordando com Marchese (2006), que afirma que espécies vegetais com metabolismo fotossintético C3, como é o caso de *A. annua*, adaptam-se melhor à climas mais amenos, como é o caso da região sudoeste, tendo menores perdas de CO₂ através da fotorrespiração em comparação ao que ocorre em climas mais quentes. Como consequência da menor perda por fotorrespiração é possível o maior acúmulo de biomassa.

Tabela 16 – Médias obtidas para os parâmetros fisiológicos dos genótipos B23, B24, C23, C32 e a variedade Artemis – F2. UTFPR, Campus Pato Branco – PR, 2016.

Genótipo	WUE	PHOTO	COND	Tr
B23	0,2043 a	14,7586 a	0,6236 a	7,7463 a
B24	0,1857 a	15,4553 a	0,7315 a	8,8954 a
C23	0,1651 a	13,4431 a	0,5872 a	8,3907 a
C32	0,2211 a	15,4378 a	0,594 a	7,3166 a
ART	0,1429 a	8,0207 b	0,5859 a	5,7569 a

* WUE: eficiência no uso de água (%); PHOTO: taxa de assimilação de CO₂ ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); COND: condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); Tr: taxa de transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

** Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Zanmaria, UTFPR Campus Pato Branco – PR, 2016.

A variedade artemis, no momento da colheita, apresentava floração, diferentemente dos genótipos, colhidos sem sinais de florescimento. A menor atividade fotossintética de Artemis está relacionada ao processo de florescimento em que se encontrava no momento da medição. Com maior atividade do metabolismo secundário, algumas atividades do metabolismo primário podem sofrer redução, como foi o caso observado. Entretanto, o fato da taxa fotossintética estar reduzida, esta não alcança um patamar limítrofe que prejudique a planta em termos de produtividade.

4.5.2 Avaliações Fitoquímicas

Para os caracteres fitoquímicos a análise de variância indicou diferença significativa ($p < 0,05$) somente para o teor de óleo essencial para os genótipos e variedade avaliados (Tabela 17).

Tabela 17 - Resumo da análise de variância para os parâmetros fitoquímicos de quatro genótipos e uma variedade de artemisia (*Artemisia annua* L.) cultivadas a campo.

Fonte de Variação	GL	QM	
		ART	OE
Genótipo	4	0,00417 ^{ns}	0,06 ^{**}
Média		0,604	0,513
Erro	12	0,004	0,01
CV(%)		10,6	20,0

** significativo a 1% e ^{ns}; GL: Graus de Liberdade; QM: quadrado médio; CV(%): Coeficiente de Variação. ART (% de artemisinina); OE (% de óleo essencial).

Fonte: Zanmaria, UTFPR Campus Pato Branco – PR, 2016.

Para a característica teor de artemisinina, as plantas testadas não diferiram estatisticamente entre si, apresentando um teor médio de 0,61% de artemisinina na massa seca de folhas, apesar da variedade Artemis F2 ter apresentado melhores resultados, nos demais caracteres (Tabela 18). Para esta característica Ferreira *et al.* (1995), Delabays *et al.* (2001) e Marchese *et al.* (2010) afirmam que há influência somente dos fatores genéticos na produtividade da molécula. Já para o teor de óleo essencial observou-se melhor produtividade para a variedade Artemis, teor de 0,72%. Deve-se considerar, nesse caso, que as plantas de Artemis F2 colhidas no experimento estavam em fase de florescimento, ao contrário dos genótipos que foram colhidos sem apresentarem sinais de florescimento. Esse fato é importante, pois a fase fenológica que apresenta maior produção de óleo essencial é a partir do pré-florescimento (MAGALHÃES, 1996). Outro aspecto relevante é que o teor de biomassa para variedade Artemis F2 foi superior aos demais genótipos, obtendo-se portanto, além de maior teor de óleo, maior rendimento para esta variedade (Tabela 18).

Tabela 18 – Médias obtidas para os parâmetros fitoquímicos dos genótipos B23, B24, C23, C32 e a variedade Artemis – F2. UTFPR, *Campus* Pato Branco – PR, 2016.

Genótipo	ART	OE
B23	0,62 a	0,4275 B
B24	0,6375 a	0,5 B
C23	0,6075 a	0,4875 B
C32	0,6275 a	0,425 B
ART	0,53 a	0,725 A

* ART (% de artemisinina) e OE (% de óleo essencial)

** Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Zanmaria, UTFPR - *Campus* Pato Branco – PR, 2016.

Os caracteres que mais contribuíram para determinar a dissimilaridade genética foram relação folha/caule (F/C), Massa Seca de Folhas (MSF) e Taxa de Assimilação de CO₂ (PHOTO). Os caracteres fitoquímicos de rendimento apresentaram baixa contribuição para determinar a dissimilaridade genética entre os tratamentos (ART - 0,13% e OE – 2,73%) (Tabela19).

Tabela 19 – Contribuição relativa dos caracteres agrônômicos e fitoquímicos de quatro genótipos e uma variedade de *A. annua* cultivadas em campo para a divergência genética calculada com base no critério de Singh (1981).

Variável	(%)
Relação Folha/Caule (F/C)	21,33
Massa Seca de Folhas (MSF)	19,90
Taxa de Assimilação de CO ₂ (PHOTO)	16,56
Eficiência no uso da água (WUE)	10,53
Altura de Planta (Ht)	9,95
Massa Seca de Caule (MSC)	8,63
Taxa de Transpiração (Trmmol)	5,57
Teor de Óleo Essencial (OE)	2,73
Condutância Estomática (Cond)	1,67
Número de Ramificações (NR)	1,47
Volume de Dossel (Vd)	0,93
Diâmetro de Caule (DC)	0,60
Teor de Artemisinina (ART)	0,13

Fonte: Zanmaria, UTFPR *Campus* Pato Branco – PR, 2016.

Considerando a análise de agrupamento, os genótipos C32 e B24, C23 e B23 apresentaram menor dissimilaridade entre si, enquanto Artemis F2 foi a mais dissimilar, formando um grupo isolado (Figura 31).

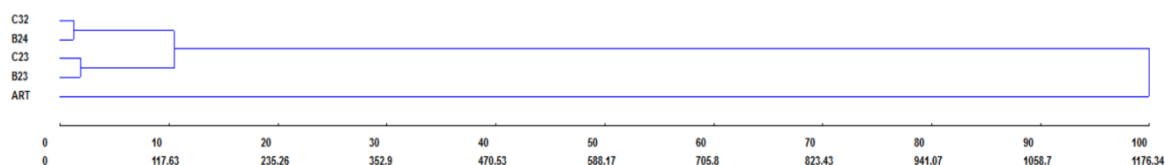


Figura 31 – Dendrograma de dissimilaridade genética com agrupamento pelo método UPGMA mostrando as relações genéticas entre os quatro genótipos e uma variedade de *A. annua* L. cultivados em campo considerando as características agrônômicas e fitoquímicas avaliadas.

Fonte: Zanmaria, UTFPR - *Campus* Pato Branco – PR , 2016.

Considerando a análise de correlações, obteve-se a matriz de correlação (Pearson), onde foi possível observar correlações positivas e negativas entre os parâmetros agrônômicos, fisiológicos e fitoquímicos entre os genótipos e variedade Artemis F2 analisados (Tabela 20).

As correlações positivas e significativas foram observadas entre altura de planta (Ht) e volume de dossel (Vd), massa seca de folhas (MSF), massa seca de caule (MSC) e teor de óleo essencial (OE); entre volume de dossel (Vd) e massa

seca de folhas (MSF), massa seca de caule (MSC) e teor de óleo essencial (OE); entre diâmetro do caule (DC) e teor de artemisinina (ART) e taxa de assimilação de CO₂ (PHOTO); entre massa seca de caule (MSC) e teor de óleo essencial (OE); entre teor de artemisinina (ART) e taxa de assimilação de CO₂ (PHOTO).

O volume de dossel (Vd) apresentou alta correlação positiva e significativa com altura de planta (Ht) ($r = 0,982$), significando que quanto maior é a altura da planta, maior será o volume de dossel e conseqüentemente, maior possibilidade de produção de biomassa. Esta, por sua vez também apresentou correlação positiva e significativa com volume de dossel (Vd) e teor de óleo essencial (OE) ($r = 0,8894$). Essa correlação é bastante relevante, pois indica que plantas com maior volume de dossel e massa seca de folhas produzem maior quantidade de óleo essencial. Nesse caso, em programas de melhoramento, sugere-se optar na obtenção de plantas altas com maior volume de biomassa quando se busca plantas mais produtivas em óleo essencial. Esse resultado corrobora com vários autores, que também obtiveram esses índices de correlação (CARVALHO, 2007; MATTANA *et al.*, 2010; BOLINA *et al.*, 2014).

Os parâmetros que apresentaram correlação negativa e significativa entre os genótipos e variedade Artemis F2 analisados foram entre altura de planta (Ht) e teor de artemisinina (ART), taxa de assimilação de CO₂ (PHOTO) e taxa de transpiração (Tr); entre volume de dossel (Vd) e teor de artemisinina (ART), taxa de assimilação de CO₂ (PHOTO) e taxa de transpiração (Tr); entre diâmetro de caule (DC) e massa seca de folhas (MSF); entre massa seca de caule (MSC) e teor de artemisinina (ART) e taxa de assimilação de CO₂ (PHOTO); entre teor de artemisinina (ART) e teor de óleo essencial (OE); e teor de óleo essencial (OE) e taxa de assimilação de CO₂ (PHOTO).

Considerando a correlação negativa e significativa ($r = -0,9485$) entre taxa de assimilação de CO₂ (PHOTO) e teor de óleo essencial (OE) entende-se que as plantas que possuem alta taxa de assimilação de CO₂ possuem a tendência de produzir menor quantidade de óleo essencial e ao contrário, em uma relação positiva e significativa ($r = 0,9957$) produzem maior quantidade de artemisinina.

Essa relação corrobora com a análise de correlação entre os teores de artemisinina (ART) e óleo essencial (OE), que se apresentou negativa e significativa

($r = -0,9251$), ou seja, plantas que produzem maior quantidade de um metabólito produzem menos quantidade de outro. Considera-se de extrema relevância esse resultado na seleção de plantas quanto ao objetivo que se quer alcançar, devendo-se optar por plantas que apresentem maior rendimento no metabólito de interesse. Bolina *et al.*, (2014) encontraram a mesma correlação negativa e significativa entre os dois parâmetros de rendimento (ART e OE) ($r = -0,65$), o qual indicou a mesma tendência. Wallart *et al.*, (1999) também reforçam esses índices, considerando que plantas tetraploides de *A. annua* que produziram maior quantidade de artemisinina, produziram menor quantidade de óleo essencial .

Ainda considerando as correlações negativas e significativas entre altura de planta (Ht) e teor de artemisinina (ART) ($r = -0,9754$), observou-se que plantas maiores produzem menos artemisinina, corroborando com os resultados obtidos por Bolina *et al.* (2014) ($r = -0,72$) e Magalhães *et al.* (2006) ($r = -0,99$).

Tabela 20 – Matriz de correlação de Pearson construída através da análise das características agrônômicas, fisiológicas e fitoquímicas de quatro genótipos e uma variedade de *A. annua* L. cultivados em campo.

	Ht	Vd	DC	NR	MSF	MSC	F/C	ART	OE	WUE	PHOTO	COND	TR
Ht	1	0.982 **	-0.8239 ^{ns}	-0.3323 ^{ns}	0.9333 *	0.9606 **	0.5389 ^{ns}	-0.9754 **	0.9556 **	-0.738 ^{ns}	-0.9715 **	-0.3913 ^{ns}	-0.8778 *
Vd		1	-0.744 ^{ns}	-0.2552 ^{ns}	0.9263 *	0.9847 **	0.496 ^{ns}	-0.9431 *	0.8894 *	-0.6002 ^{ns}	-0.9234 *	-0.4277 ^{ns}	-0.9424 *
DC			1	0.55 ^{ns}	-0.8819 *	-0.6434 ^{ns}	-0.8387 ^{ns}	0.9229 *	-0.8155 ^{ns}	0.8759 ^{ns}	0.9324 *	0.6121 ^{ns}	0.6611 ^{ns}
NR				1	-0.5491 ^{ns}	-0.1384 ^{ns}	-0.7727 ^{ns}	0.4366 ^{ns}	-0.393 ^{ns}	0.6108 ^{ns}	0.4669 ^{ns}	0.0314 ^{ns}	0.1033 ^{ns}
MSF					1	0.8493 ^{ns}	0.7826 ^{ns}	-0.97 **	0.8444 ^{ns}	-0.7033 ^{ns}	-0.9546 *	-0.5442 ^{ns}	-0.8732 ^{ns}
MSC						1	0.339 ^{ns}	-0.8856 *	0.8814 *	-0.5436 ^{ns}	-0.8685 ^{ns}	-0.3141 ^{ns}	-0.9126 *
F/C							1	-0.6988 ^{ns}	0.4691 ^{ns}	-0.6195 ^{ns}	-0.69 ^{ns}	-0.6553 ^{ns}	-0.4983 ^{ns}
ART								1	-0.9251 *	0.7923 ^{ns}	0.9957 **	0.5246 ^{ns}	0.8591 ^{ns}
OE									1	-0.8674	-0.9485 *	-0.1927 ^{ns}	-0.6993 ^{ns}
WUE										1	0.8431 ^{ns}	0.1725 ^{ns}	0.3714 ^{ns}
PHOTO											1	0.4692 ^{ns}	0.8115 ^{ns}
COND												1	0.6348 ^{ns}

** : significativo a 1% ; * : significativo a 5% pelo teste t.

Fonte: Zanmaria, UTFPR – *Campus* Pato Branco – PR, 2016.

4.6 CONCLUSÕES

A variedade Artemis F2 apresenta melhor desempenho em produtividade de biomassa e óleo essencial que os demais genótipos.

Os teores de artemisinina não variam entre genótipos, entretanto, como a variedade Artemis – F2 apresenta maior produção de biomassa, mostra-se como a melhor opção para o agricultor ou indústria.

A maior produção de biomassa para Artemis F2 justifica o maior rendimento de óleo essencial. Essa variedade possui arquitetura de planta diferenciada das demais, apresentando maior estatura e maior adensamento entre ramos.

Os caracteres que mais contribuem para distinguir os genótipos B23, B24, C23, C32 de Artemis F2 são aqueles relacionados a arquitetura de planta: Altura de Planta, Relação Folha/Caule, Volume de Dossel e Diâmetro de Caule.

Considerando as correlações entre os parâmetros agronômicos e fitoquímicos, entende-se que plantas maiores e com maior volume de dossel produzem maior quantidade de óleo essencial e menor quantidade de artemisinina. Portanto, devem-se selecionar plantas com maior produção do metabólito de interesse que se busca. Entretanto é necessário observar a relação produtividade/produção como um todo, pois plantas menores, apesar de produzirem maior quantidade de artemisinina, por exemplo, podem proporcionar menor volume de produção total em unidade de área.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Constata-se, portanto, que a colchicina teve ação no aumento do teor de artemisinina através do processo de indução de poliploidia, entretanto, em nossos estudos, não houve comprovação se houve a duplicação total do genoma. Considera-se possível a ocorrência do processo de mixoploidia ou formação de quimeras nas plantas tratadas com colchicina, ou seja, duplicação do número de cromossomos de células isoladas na planta e não poliploidia total, o que supostamente fez com que houvesse aumento do teor de artemisinina nas plantas, que ocorreu, portanto, na dose de 0,10% de colchicina, correspondendo a 0,65% no teor de artemisinina (ART%).

Para comprovação da hipótese da ocorrência de mixoploidia, a contagem de cromossomos e a análise de citometria de fluxo seriam métodos seguros, entretanto, não foi possível lançar mão dessas ferramentas no presente trabalho.

Para a avaliação dos níveis de adubação para as plantas e a produtividade de metabólitos secundários, conclui-se que a aplicação de doses crescentes de solução nutritiva para plantas de *A. annua* apresentaram crescimento linear para produção de biomassa, entretanto, com relação contrária para produção de artemisinina. O estresse nutricional causado nas plantas submetidas à dose de 25% de solução nutritiva completa apresentou maior teor de artemisinina, entretanto, com uma produção de biomassa muito baixa, situação esta, que, comercialmente, não é rentável. Observou-se maior expressão dos genes ADS1 e CYP71AV em plantas submetidas à níveis de 50% de solução nutritiva. Estas enzimas estão diretamente envolvidas da via de biossíntese da artemisinina. Ainda, em plantas submetidas à níveis nutrição de 50%, observou-se uma melhor relação para a produção de biomassa e artemisinina e óleo essencial, o que leva a considerar que para se obter plantas com maiores rendimentos a aplicação de doses elevadas podem afetar a produção de metabólitos secundários de interesse comercial.

aplicação de doses crescentes de solução nutritiva para plantas de *A. annua* apresentaram crescimento linear para produção de biomassa, entretanto, com relação contrária para produção do teor de artemisinina. O estresse nutricional causado nas plantas submetidas à dose de 25% de solução nutritiva completa

apresentou maior teor de artemisinina, entretanto, com uma produção de biomassa muito baixa, situação esta, que, comercialmente, não é rentável. Em plantas submetidas a níveis nutrição de 50%, observou-se uma relação de custo/benefício para a produção de biomassa e artemisinina e óleo essencial, o que leva a considerar que para se obter plantas com maiores rendimentos a aplicação de doses elevadas podem afetar a produção de metabólitos secundários de interesse comercial.

No experimento de seleção de genótipos superiores observou-se que a variedade Artemis F2 apresentou melhor desempenho em produtividade de biomassa e óleo essencial que os demais genótipos. Os teores de artemisinina não variaram, entretanto, como a variedade Artemis – F2 apresentou maior produção de biomassa, esta acaba sendo a melhor opção para o agricultor ou indústria. A maior produção de biomassa para Artemis F2 justifica o maior rendimento de óleo essencial. Essa variedade possui arquitetura de planta diferenciada das demais, apresentando maior estatura e maior adensamento entre ramos.

Em relação à contribuição relativa dos caracteres agronômicos e fitoquímicos para a divergência genética observou-se que os parâmetros fitoquímicos de rendimento possuem baixa contribuição (OE% - 2,73% e ART 0,13%), devendo-se observar, em termos de seleção as características de relação folha/caule (F/C - 21,33%) e Massa Seca de Folhas (MSF - 19,90%) como principais contribuições para variabilidade.

Considerando as correlações entre os parâmetros agronômicos e fitoquímicos, entende-se que plantas maiores e com maior volume de dossel produzem maior quantidade de óleo essencial e menor quantidade de artemisinina. Portanto, devem-se selecionar plantas com maior produção do metabólito de interesse que se busca. Entretanto é necessário observar a relação produtividade/produção como um todo, pois plantas menores, apesar de produzirem maior quantidade de artemisinina, por exemplo, podem proporcionar menor volume de produção total em unidade de área.

REFERÊNCIAS

A2S2 - . ASSURED ARTEMISIN SUPPLY SYSTEM.. August, 2013. Disponível em: <http://www.a2s2.org/market-data/a2s2-market-update-aug13.html> Data de acesso: 04/02/2013.

AFTAB, M. T.; MASROOR, A. K.; FERREIRA, J. F. S. Effect of Mineral Nutrition, Growth Regulators and Environmental Stresses on Biomass Production and Artemisin Concentration of *Artemisia annua* L. In: **Artemisia annua – Pharmacology and Biotechnology**. Berlim: Springer, 2014.

AN, J.; MINIE, M.; SASAKI, T.; WOODWARD, J.J.; ELKON, K.B.; **Antimalarial Drugs as Immune Modulators: New Mechanisms for Old Drugs**. Annu Rev Med., Oct, 2016.

BANYAI, W.; SANGTHONG, R.; KARAKET, N.; INTHIMA, P.; MII, M.; SUPAIBULWATANA, K.; **Overproduction of artemisinin in tetraploid *Artemisia annua* L.** The Japanese Society for Plant Cell and Molecular Biology. Plant Biotechnology 27, 427–433, 2010.

BHERING, S. B. *et al.* **Mapa de solos do Estado do Paraná: legenda atualizada**. Rio de Janeiro: EMBRAPA/IAPAR. 2008.

BOLINA, C. O. **Variabilidade genética e associação entre caracteres agronômicos, fisiológicos e fitoquímicos em variedades de *Artemisia annua* L.** Dissertação. UTFPR, 2012.

BOLINA, C. O.; MARCHESE, J. A.; CAPELIN, D.; BERTONCELLI, D. J.; PINNOW, C.; BENIN, G.; FOGLIO, M. A. **Correlation among agronomic, physiological and phytochemical traits in *Artemisia annua* L. varieties.***Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 2013. p.135-141.

BOLINA, C. O.; MARCHESE, J. A.; PALADINI, M. V.; PINNOW, C.; BENIN, G.; SOUSA, I. M. O.; FOGGIO, M. A. **Dissimilaridade genética em variedades de *Artemisia annua* L. embasada em caracteres agrônômicos, fisiológicos e fitoquímicos.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 2014, p. 356-363.

CAPELIN, D. ***Artemisia annua* L.: produção de biomassa, artemisinina, rendimento e composição de óleo essencial em função de diferentes variedades e densidades de plantio.** Dissertação (Mestrado), UTFPR, Pato Branco, 2012.

CARVALHO, J.M.F.C.; SENA, D.V. **Hibridação Somática.** 27p. Embrapa Algodão. Documentos, 181. Campina Grande, 2007.

CELEGHINI, Renata M. dos S. *et al.* **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE-IR para determinação de artemisinina em *Artemisia annua* L.** Quim. Nova, v. 32, n. 4, p. 875-878, 2009.

COMAI, L. The advantages and disadvantages of being polyploidy. **Nat. Rev. Genet.**, v. 6, p. 836-864, 2005.

COOLS, H. J.; ISHII, H. **Pre-treatment of cucumber plants with acibenzolar-S-methyl systemically primes a phenylalanine ammonia lyase gene (PAL1) for enhanced expression upon attack with a pathogenic fungus.** Physiological and Molecular Plant Pathology, v. 61, n. 5, p. 273-280, 2002.

CRUZ, C.D. **GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics.** Acta Scientiarum. v.35, n.3, p.271-276, 2013

DE JESUS-GONZALEZ, L.; WEATHERS, P. J. **Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinina than diploids.** Plant Cell Rep., v. 21, p. 809-913, 2003.

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.

DHAWAN, O. P.; LAVANIA, U. C. **Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review.** Euphytica, v. 87, p. 81-89, 1996.

DILSHAD, E.; CUSIDO, R. M.; PALAZON, J.; ESTRADA, K. R.; BONFILL, M.; MIRZA, B. **Enhanced artemisinin yield by expression of rol genes in *Artemisia annua* L.** *Malaria journal*, 14(1),2015.

DIXIER M. M.; DA CRUZ, N. D.; LONGO, C.R.L.; CANGIN, C. H. T. M.; AZZINI, L.E. **Poliploidização em berinjela (*Solanum melongena* L.) - observações em plantas resultantes de tratamentos com colchicina.** Boletim Científico do Instituto Agrônomo de São Paulo – Bragantia. Vol. 31, nº 24. Campinas, 1972.

DNDi – Drugs for Neglected Diseases initiative. Disponível em <http://www.dndi.org/treatments/asmq.html>. Acesso em 20 de março de 2015.

EFFERTH T. **Mechanistic perspectives for 1,2,4-trioxanes in anti-cancer therapy.** Drug Resist, 2005, Update 8: 85-97.

EIGSTI, O.; DUSTIN, P. **Colchicine in agriculture, medicine, biology, chemistry.** Ames: Iowa University, 1955. 441p. 2011.

FAVARIN, José Laércio *et al.* **Equações para a estimativa do índice de área foliar do cafeeiro.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 37, n. 6, p. 769-773, 2002.

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.; RITCHEY, K. D.; CASSIDA, K. A.; TURNER, K. E.; GONZALEZ, J. M. **Agrotechnological aspects of the anti-malarial plant *Artemisia annua* and its**

potential use in animal health in Appalachia. In: International Center For Agricultural Research In Dry Areas, International Symposium On Perfume, Aromatic And Medicinal Plants, 2006, Jerba, Tunisia. Proceedings... Jerba: CGIAR, 2006. p. 797-804.

FERREIRA, J. S.; JANICK, J. **Cultivation and genetics of *Artemisia annua* L. for increased production of the antimalarial artemisinin.** Plant Genetic Resources, v.3, n.2, p.206–229, 2005.

FERREIRA, J.F.S.; SIMON, J.E; JANICK, J. ***Artemisia annua*: botany, horticulture, pharmacology.** Horticult. Rev., 19, p. 319-371, 1997.

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz, 2015. Disponível em <http://portal.fiocruz.br/pt-br>. Acesso em 19 de março de 2015.

FOGLIO, Mary Ann. **Um estudo químico de *Artemisia annua* L. aclimatada no Brasil.** 1996. 185 p. Tese (Doutorado em Química). Campinas, Universidade Estadual de Campinas. 1996. Disponível em: <http://biq.iqm.unicamp.br/arquivos/teses/vtIs000107936.pdf>

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

GENBANK - National Center for Biotechnology Information. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em 04/11/2016.

GRAHAM, I. A., BESSER, K., BLUMER, S., BRANIGAN, C. A., CZECHOWSKI, T., ELIAS, L., e BOWLES, D. (2010). **The genetic map of *Artemisia annua* L. identifies loci affecting yield of the antimalarial drug artemisinin.** *Science*, 327(5963), 328-331.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method of growing lants without soil**. Berkeley, University. Of California, 1950. 32p.

HUNT, S., MCNAMARA, D., STEBBINGS, S. **An open-label six-month extension study to investigate the safety and efficacy of an extract of *Artemisia annua* for managing pain, stiffness and functional limitation associated with osteoarthritis of the hip and knee**. *The New Zealand Medical Journal*. Vol. 129 N. 1444. Oct 2016,.

HWANG, D. I., WON, K. J., KIM, D. Y., YOON, S. W., PARK, J. H., KIM, B., e LEE, H. M. (2016). **Anti-adipocyte Differentiation Activity and Chemical Composition of Essential Oil from *Artemisia annua***. *Natural product communications*, 11(4), 539.

HWANG, D. I., WON, K. J., KIM, D. Y., YOON, S. W., PARK, J. H., KIM, B., & LEE, H. M. (2016). **Anti-adipocyte Differentiation Activity and Chemical Composition of Essential Oil from *Artemisia annua***. *Natural product communications*, 11(4), 539.

ISLAMUDDIN, M., CHOUHAN, G., WANT, M. Y., TYAGI, M., ABDIN, M. Z., SAHAL, D., e AFRIN, F. (2014). **Leishmanicidal activities of *Artemisia annua* leaf essential oil against visceral leishmaniasis**. *Frontiers in microbiology*, 5.

IVANESCU, B.; CORCIOVA, A. **Artemisinin in Cancer Therapy**. In: *Artemisia annua- Pharmacology and Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg, p. 205-227. 2014.

JELODAR, N. B.; BHATT, A.; MOHAMED, K.; KENG, C. L. **New cultivation approaches of *Artemisia annua* L. for a sustainable production of the antimalarial drug artemisinin**. *Medicinal Plant Research*. Vol. 8(10), pp. 441-447 Journal of, 2014.

JIRANGKUL, P.; SRISAWAT, P.; PUNYARATABANDHU, T.; SONGPATTANASLIP, T.; MUNGTHIN, M. **Cytotoxic effect of Artemisinin and its derivatives on human**

osteosarcoma cell lines. *Journal of the Medical Association of Thailand - Chot-maihet thangphaet*, 2014, 97, S215-21.

KEHR, A. E. **Woody plant polyploidy.** *Amer. Nurse*, v. 183, p. 38-47, 1996.

KIM, W. S.; CHOI, W. J.; LEE, S.; KIM, W. J.; LEE, D. C.; SOHN, U. D.; KIM, W. **Anti-inflammatory, Antioxidant and Antimicrobial Effects of Artemisinin Extracts from *Artemisia annua* L.** *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 2015, 19(1), 21-27.

KÖEPPEN, W. **Climatologia: con um estúdio de los climas de la Tierra.** México: Fondo de Cultura Economica, 1948. 478p

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. **Post-harvest drying treatment effects on anti-malarial constituents of *Artemisia annua* L.** *Acta Horticulturae*, v. 576, P. 315-320, 2002.

LIN, X.; ZHOU, Y.; ZHANG, J.; LU, X.; ZHANG, F.; SHEN, Q.; WU, S.; CHEN, Y.; WANG, T.; and TANG, K. **Enhancement of artemisinin content in tetraploid *Artemisia annua* plants by modulating the expression of genes in artemisinin biosynthetic pathway.** *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2011, 58, 50–57.

LUCKETT, D. **Colchicine mutagenesis is associated with substantial heritable variation in cotton.** *Euphytica*, v.42, n.1-2, p.177-182, 1989.

MAGALHÃES, P. M. **Cultivo de Plantas Mediciniais: o Exemplo da *A. annua*.** Palestra ministrada no VIII Simpósio Ibero-Americano de Plantas Medicinias e III Simpósio Ibero-Americano de Investigação em Câncer. UNIVALI, 2016.

MAGALHÃES, P. M. de. **Seleção, melhoramento e nutrição da *Artemisia annua* L., para cultivo em região intertropical.** 1996. 132 p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

MAGALHÃES, P. M.; DELABAYS N.; SARTORATTO A. **New hibrid lines of the antimalarial species *Artemisia annua* L. guaramtee its growth in Brazil.** Ciência e Cultura: Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science. v. 49. 1997.

MAGALHÃES, P. M.; PEREIRA, B.; SARTORATTO, A. Yields of antimalarial *Artemisia annua* L. species. **Acta Hort.** 629, 2004.

MAGALHÃES, P.M. et. al. New hybrid lines of the antimalarial species *Artemisia annua* L. **Acta Horticulturae** 502, 1999.

MAGGI M.E.; MANGEAUD A.; **Laboratory evaluation of *Artemisia annua* L. extract and artemisinin activity against *Epilachna paenulata* and *Spodoptera eridania*.** J. Chem. Ecol., 2005, 31: 1527-1536.

MAGIERO, E. C.; ASSMANN, J. M.; MARCHESE, J. A.; CAPELIN, D.; PANADINI, M. V.; TREZZI, M. M. **Efeito alelopático de *Artemisia annua* L. na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e leiteiro (*Euphorbiaheterophylla*L.).** Rev. Bras. Pl. Med., v. 11, n. 3, p. 317-324, 2009.

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

MARCHESE, J. A. **Produção e detecção de artemisinina em plantas de *Artemisia annua* L. submetidas a estresses abióticos.** Dissertação. UNICAMP. São Paulo, (1999).

MARCHESE, J. A.; FERREIRA, J. F.; REHDER, V. L.; RODRIGUES, O. **Water deficit effect on the accumulation of biomass and artemisinin in annual wormwood (*Artemisia annua* L., Asteraceae).** *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2010, p. 1-9.

MARCHESE, J. A.; FIGUEIRA, J.M. **O uso de tecnologias pré e pós-colheita e boas práticas agrícolas na produção de plantas medicinais e aromáticas.** REV. BRAS. PL. MED., Botucatu, v.7, n.3, p.86-96, 2005.

MARCHESE, J. A.; REHDER, V. L. G.; SARTORATTO, A. **Quantificação de artemisinina em *Artemisia annua* L. – Uma comparação entre as técnicas de cromatografia em camada delgada com detecção densitométrica e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta.** Ver. Bras. Pl. Med., v. 4, n.1, p. 81-87, 2001.

MENDES, A.J.T. **Observações citológicas em *Coffea*: XI-Métodos de tratamento pela colchicina.** *Bragantia* 7.9-10 (1947): 221-230.

MISHINA Y.V.; KHRISHNA S.; HAYNES R.K.; MEADE J.C. **Artemisinins inhibit *Trypanosoma brucei rhodesiense* in vitro growth.** *Antimicrob. Agents Chemother*, 2007, 51: 1852-1854.

MONDAL, A.; CHATTERJI, U. **Artemisinin Represses Telomerase Subunits and Induces Apoptosis in HPV-39 Infected Human Cervical Cancer Cells.** *Journal of cellular biochemistry*, 2015, Mar 9. doi: 10.1002/jcb.25152.

OLOFSSON, L.; ENGSTRÖM, A.; LUNDGREN, A.; BRODELIUS, P. E. **Relative expression of genes of terpene metabolism in different tissues of *Artemisia annua* L.** *BMC plant biology*, 2011, 11(1), 45.

PALADINI, M. V. ***Artemisia annua* L.: produção de biomassa, artemisinina, rendimento e composição de óleo essencial influenciados por diferentes**

eliciadores e níveis de adubação NPK. Dissertação. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2012, 91 f.

PAUL, S.; KHANUJA, S. P. S.; GUPTA, M. M. **Transplanting and harvesting effect on artemisinin biosynthesis and herb yield in *Artemisia annua* L.** Agroforestry Systems, 89(4), 751-757, 2015.

PEREIRA, R.C.; DAVIDE, L. C.; TECHIO, V.H.; TIMBÓ, A. L.O. **Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético.** Ciência Rural, Santa Maria, v.42, n.7, p.1278-1285, jul, 2012.

PINHO, V. D.; MIRANDA, L. S .M.; SOUZA, R. O. **Fotoquímica sob Condições de Fluxo Contínuo.** Revista Virtual de Química, v. 7, n. 1, p. 144-164, 2014.

POSNER G.H.; PLOYPRADITH P.; PARKER M.H.; O'DOWD H.; WOO S.H.; NORTHROP J.; KRASAVIN M.; DOLAN P.; KENSLER T.W.; XIE S.; SHAPIRO T.A. **Antimalarial, antiproliferative, and antitumor activities of artemisinin-derived, chemically robust, trioxane dimers.** J. Med. Chem, 1999, 42: 4275-4280.

PULIDO, Pablo; PERELLO, Catalina; RODRIGUEZ-CONCEPCION, Manuel. **New insights into plant isoprenoid metabolism.** Molecular plant, v. 5, n. 5, p. 964-967, 2012.

QUITÉRIO, G. C. M. **Produção de artemisinina por *Artemisia annua* L. sob influência de micorriza arbuscular.** 2006. 48 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

RASBAND, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2015

RODRIGUES, R.A.F.; FOGGIO, M.A.; BOAVENTURA JÚNIOR, S.; SANTOS, A.S.; REHDER, V.L.G. **Otimização do processo de extração e isolamento do antimalárico artemisinina a partir de *Artemisia annua* L.** Quimica Nova, v.29, p. 368-372, 2006.

SANTOMAURO, F., DONATO, R., SACCO, C., PINI, G., FLAMINI, G., e BILIA, A. R. (2016). **Vapour and Liquid-Phase *Artemisia annua* Essential Oil Activities against Several Clinical Strains of *Candida*.** *Planta medica*.

SINGH N.P.; LAI H.C. **Artemisinin induces apoptosis in human cancer cells.** Anticancer Res, 2004, 24: 2277-2280.

SOUZA, F. de F.; QUEIROZ, M. A. de; DIAS, R. de C. de S. **Melancia sem Sementes.** Ciência, Biotecnologia e Desenvolvimento, ano II, n. 9, p. 90-95, 1999.

TANG, K., SHEN, Q., YAN, T., & FU, X. (2014). **Transgenic approach to increase artemisinin content in *Artemisia annua* L.** *Plant cell reports*, 33(4), 605-615.

THOMPSON, D. I.; ANDERSON, N.O.;STADEN, J. V. **Colchicine-induced Somatic Polyploids from In Vitro-germinated Seeds of South African *Watsonia* Species.** HORTSCIENCE 45(9):1398–1402, 2010.

UTZINGER J.; CHOLLET J.; JIQING Y.; JINYAN M.; TANNER M.; SHUHUA X. **Effect of combined treatment with praziquantel and artemether on *Schistosoma mansoni* in experimentally infected animals.** Acta Trop, 2001, 80: 9-18.

VOLENÍKOVÁ, M., TICHÁ, I.; **Insertion Profiles in Stomatal Density and Sizes in *Nicotiana Tabacum* L. Plantlets.** Biologia Plantarum 44, 161–165, 2001.

WALLAART T.; PRAS, Niesko; QUAX, Wim J. **Seasonal variations of Artemisinin and its biosynthetic precursors in tetraploid *Artemisia annua* plants compared with the diploid wild-type.** *Planta medica*, v. 65, n. 8, p. 723-728, 1999.

WANG, Y.X.; LONG, S.P.; ZENG, L.X.; XIANG, L.E.; LIN, Z., CHEN, M.; LIAO, Z.H. **Enhancement of artemisinin biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* L. by overexpressed HDR and ADS genes.** Yao Xue Xue Bao, 2014.

WHO – World Health Organization. Disponível em <http://www.who.int/en/>. Acesso em 20 de março de 2015.

WHO - World Health Organization. **Draft Global Technical Strategy for Malaria 2016 – 2030.** Geneva, 2014.

WHO – World Health Organization. **The selection and use of essential medicines: report of the WHO Expert Committee** (including the 18th WHO model list of essential medicines and the 4th WHO model list of essential medicines for children), 2013.

WITTMANN, M. T. S.; DALL'AGNOL, M. **Indução de Poliploidia no Melhoramento de Plantas.** PESQ. AGROP. GAÚCHA, v. 9, n. 1-2, p. 155-164, 2003.

XIAO S.H.; GUO J.; CHOLLET J.; WU J.T.; TANNER M., UTZINGER U. **Effect of artemether on *Schistosoma mansoni*: dose-efficacy relationship, and changes in morphology and histopathology.** Chinese J. Parasitol. Parasitic. Dis., 2004, 22: 148-153.

YAN, D.; ZIJUN, L.; YIWEI, G.; **Anti-allergic effect of *Artemisia* extract in rats.** Experimental and Therapeutic Medicine. **12(2): 1130–1134. Aug, 2016.**

ZENG, Lixia *et al.* Metabolic regulation of the artemisinin biosynthetic pathway in *Artemisia annua* L. **J. Med. Plants Res**, v. 6, n. 1, p. 7-13, 2012.

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.

APÊNDICES

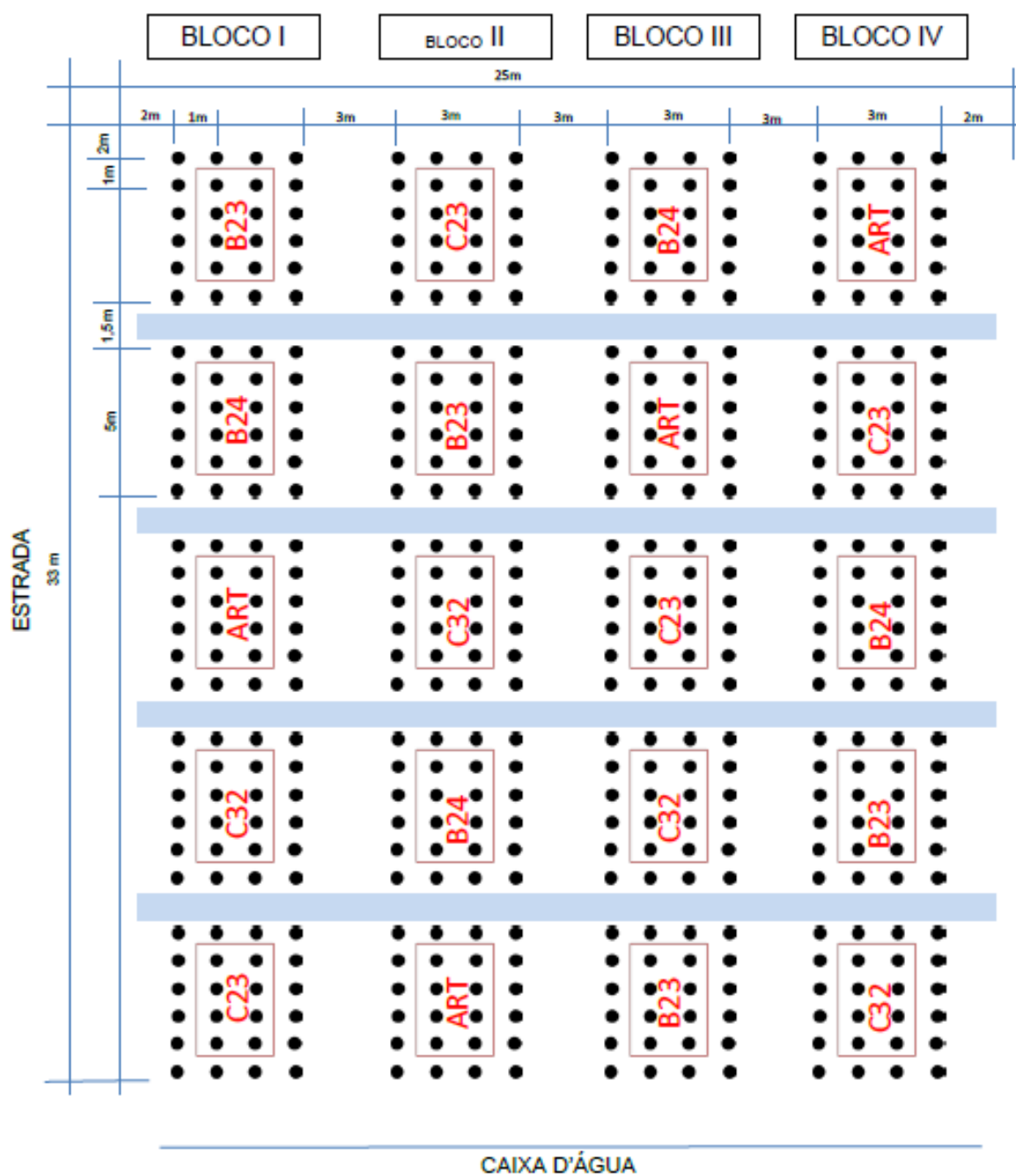
APÊNDICE A – Croqui do Experimento dos Genótipos em campo.

Croqui do Experimento

Orientador: José Abramo Marchese

Doutoranda Responsável: Silvia Leticia Zanmaria

Área experimental: 825 m² – 120 PLANTAS/BLOCO



APÊNDICE B – Características químicas do solo antes da instalação do experimento Resposta à Aplicação de Colchicina no teor de Artemisinina e Indução de Poliploidia, para a etapa de transplante para a casa de vegetação. Camada 0 – 20 cm. Área experimental UTFPR – Pato Branco, 2015.

pH CaCl ₂	P	K	MO	Ca	Mg	Al	H + Al	V	Sat. Al
	mg dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³	g dm ⁻³	-----	cmol _c dm ⁻³	-----	-----	-----	% -----
5,7	4,62	0,23	36,19	4,40	2,40	0,04	4,28	62,16	0,57

pH CaCl₂ = pH em Cloreto de cálcio; P = Fósforo; K = Potássio; MO = Matéria orgânica; Ca = Cálcio; Mg = Magnésio; Al = Alumínio; H + Alumínio = Hidrogênio + Alumínio; V = saturação por bases; m = saturação por

APÊNDICE C – Características químicas do solo antes da instalação do experimento Seleção de Genótipos de Alto Rendimento e Variabilidade para Caracteres Agronômicos, Fisiológicos e Fitoquímicos de Artemisia annua.. Camada 0 – 20 cm. Área experimental UTFPR – Pato Branco, 2015.

pH CaCl ₂	P	K	MO	Ca	Mg	Al	H + Al	V	m
	mg dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³	g dm ⁻³	-----	cmol _c dm ⁻³	-----	-----	-----	% -----
5,7	14,96	0,13	48,25	5,99	2,89	0,00	3,97	69,41	0,0

pH CaCl₂ = pH em Cloreto de cálcio; P = Fósforo; K = Potássio; MO = Matéria orgânica; Ca = Cálcio; Mg = Magnésio; Al = Alumínio; H + Alumínio = Hidrogênio + Alumínio; V = saturação por bases; m = saturação por alumínio.

ANEXOS

ANEXO A – Variáveis de arquitetura da parte aérea da planta do café: Altura da planta (H_t), altura de dossel (H_d), Diâmetro da seção inferior do dossel (D_i), Diâmetro da seção mediana do dossel (D_m), Diâmetro da seção superior do dossel (D_s) (FAVARIN *et al.*, 2012).

