



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



CRISTIANE DE OLIVEIRA BOLINA

**VARIABILIDADE GENÉTICA E ASSOCIAÇÃO ENTRE
CARACTERES AGRONÔMICOS, FISIOLÓGICOS E FITOQUÍMICOS
EM VARIEDADES DE *Artemisia annua* L.**

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO
2011

CRISTIANE DE OLIVEIRA BOLINA

**VARIABILIDADE GENÉTICA E ASSOCIAÇÃO ENTRE
CARACTERES AGRONÔMICOS, FISIOLÓGICOS E FITOQUÍMICOS
EM VARIEDADES DE *Artemisia annua* L.**

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

Orientador: Dr. José Abramo Marchese

Co-Orientadores: Dr. Giovani Benin

Dra. Marcia Ortiz Mayo Marques

PATO BRANCO

2011

Catálogo na fonte por Elda Lopes Lira CRB9/1295

B689v Bolina, Cristiane de Oliveira
Variabilidade genética e associação entre caracteres agronômicos,
fisiológicos e fitoquímicos em variedades de *Artemisia annua* L. /
Cristiane de Oliveira Bolina. Pato Branco. UTFPR, 2011
91 f. : il. ; 30 cm

Orientador: Prof. Dr. José Abramo Marchese

Co-Orientadores: Prof. Dr. Giovani Benin e Prof. Dra. Marcia Ortiz Mayo

Marques

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco/PR, 2011.

Bibliografia: f. 73 – 84

1. Artemisinina. 2. Óleo essencial. 3. Dissimilaridade genética. 4. Seleção de genitores. I. Marchese, José Abramo, orient. II. Benin, Giovani, co-orient. III. Marques, Marcia Ortiz Mayo, co-orient. IV. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. V. Variabilidade genética e associação entre caracteres agronômicos, fisiológicos e fitoquímicos em variedades de *Artemisia annua* L.

CDD 630



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



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação nº 037

Variabilidade genética e associação entre caracteres agrônômicos, fisiológicos e fitoquímicos em variedades de *Artemisia annua* L.

por

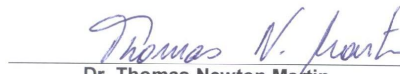
Cristiane de Oliveira Bolina

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

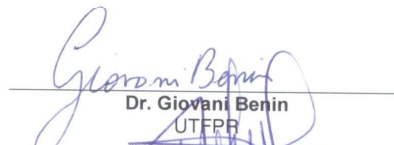
Banca examinadora:




Dr. Marcia Ortiz Mayo Marques
IAC



Dr. Thomas Newton Martin
UTFPR



Dr. Giovanni Benin
UTFPR



Dr. José Abramo Marchese
UTFPR
Orientador

Visto da Coordenação:

Prof. Dr. Idemir Citadin
Coordenador do PPGAG

*Aos meus amados pais, Daniel Francisco Bolina e Elaine José de Oliveira Bolina, fontes de amor infinito,
generosidade, humildade e sabedoria,*

Ao meu noivo Wander Humberto Duarte Costa, pelos anos de companheirismo,

As minhas irmãs Débora de Oliveira Bolina e Nathália de Oliveira Bolina, pelo carinho e amizade,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

“Aos que se tornaram familiares, aos que nasceram familiares e aos que conheci antes de ontem;

Aos que me deixaram louco e aos que enlouqueci;

Aos que me criticaram em tudo e a um ou outro que aturou minha “chatura”;

Aos amigos que passaram e aos que se estagnaram em mim;

Aos que me consideram muito e aos que com razão fizeram pouco;

Aos que conhecem o que penso e aos que só conhecem o que faço;

Aos que passam o dia todo comigo e aos que estão o tempo todo em mim.

Este trabalho é a soma de todos vocês. E se não é melhor, é por falta de memória,

mas não por falta de amigos”.

(Efraim Rodrigues)

É com imensa satisfação que agradeço a cada um...

A Deus pelo dom precioso da vida, por estar ao meu lado diariamente e me fazer forte para seguir em frente, principalmente quando a solidão parecia insuportável. Por colocar no meu caminho todas as pessoas abaixo mencionadas e me conceder saúde para dividir com elas os melhores ou os mais difíceis momentos da minha história.

Aos meus queridos pais, que mesmo longe, sempre se fizeram presentes. Por muitas vezes, abrirem mão do que precisavam para investirem em meus estudos. Vocês são meus verdadeiros heróis!

Aos meus parentes, irmãs, avô e avós, tios e tias, primos e primas, por constituírem uma família unida e acolhedora, com a qual sempre poderei contar.

Ao meu noivo, por todo amor, carinho e paciência, por compreender a minha ausência e apoiar todas as minhas decisões. Indiferente entre nós foi o tempo e a distância!

Aos professores Christiano Peres Coelho e Walter Vieira da Cunha que me incentivaram a trilhar o caminho da pesquisa ainda na graduação. Mais que mestres, grandes amigos!

A todos os meus amigos de Itumbiara-GO (Renata F., Naiana, Gislaine, Marielle, Renata S., Camila G., Bruno, Gefferson, Aline, Meiriele, Camilla A., Dayene, Fernanda, Marlos, Priscila, Wayne...) que acreditaram em mim e sempre me mandaram mensagens de apoio e carinho. Amizade verdadeira é isso!

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná e a Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade de cursar o mestrado.

A Capes pela concessão da bolsa.

Ao Dr. José Abramo Marchese pela orientação, dedicação, incentivo, paciência e por todos os conhecimentos transmitidos. Esses dois anos de convivência foram extremamente importantes para o meu amadurecimento profissional e principalmente pessoal. Muito obrigada!

Ao Dr. Giovani Benin pela co-orientação, auxílio e paciência. Por todos os conhecimentos transmitidos, idéias e sugestões que tanto contribuíram para a conclusão deste trabalho.

À Dra. Marcia Ortiz Mayo Marques pela co-orientação, atenção e paciência. Por disponibilizar estagiários, reagentes e equipamentos do Laboratório de Fitoquímica do Instituto Agrônomo de Campinas para a realização das análises do óleo essencial.

Aos funcionários da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, em especial, ao Sérgio e ao Sr. Otávio pela ajuda sempre disponível e pelas incansáveis conversas e exemplos de vida, ao Ricardo por me levar a área experimental sempre que necessário e à Polyane, pelo constante auxílio prestado junto à secretária da pós-graduação.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia pelos conhecimentos transmitidos.

Ao professor Jorge Jamhour pelos cálculos de área foliar.

À professora Dra. Marisa de Cacia Oliveira pelo auxílio, amizade e carinho. Pela agradável companhia em Manaus, durante o 61º Congresso Nacional de Botânica, seja no evento, nos passeios ou no “x-tudo” de cada dia.

A equipe do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal, antigos e atuais, Amanda Izabel dos Passos, Rafaela Cristina Negri, Diogo Capelin, Marcos Vily Paladini, Dayanne Fabrício Bressan, Tiago Belusso Santin, João Vitor N. Aquino, Emílio S. de Souza, Pollyana H. Almeida, Elouize Xavier, Jessica Faversoni, pelo auxílio e amizade.

Aos meus amigos Marcos Vily Paladini e Diogo Capelin, pela paciência que sempre tiveram comigo, pela companhia e pelos conhecimentos transmitidos com tamanha simplicidade e sabedoria.

Ao meu amigo Douglas Júnior Bertocelli (Douglinhas), pela incansável e sempre disponível ajuda, em todas as etapas deste trabalho. Pela amizade verdadeira e pela paciência em ouvir minhas histórias, reclamações e/ou insatisfações. Um pequeno grande amigo!

Ao Cilas por todo auxílio na utilização dos programas estatísticos, na obtenção dos dendrogramas e principalmente, por esclarecer minhas dúvidas.

A todos os colegas do mestrado, especialmente aos queridos amigos Eli Danieli Marchesan, Renata Moccasin, Gustavo Malagi e Douglas Alvarez Alamino, pela amizade, carinho e companhia. Juntos, vivemos ótimos e importantes momentos desta caminhada, seja escrevendo artigo até o dia amanhecer (coisa do Douglas), estudando estatística até altas madrugada (parceria total da Renata), nas longas conversas que se perdiam em meio ao sono (coisa da Eli, a partir das 23:00 h ela fica off line), na serenidade e no bom humor do Malagi (o número 1), seja nos almoços no RU, nas jantãs, nos chopps, no boliche, no pão com linguiça, no show da Ivete, no amigo secreto ou em um simples passeio na praça às vésperas do natal. Enfim, vocês me acolheram, me fizeram muito bem e se tornaram bons amigos, que levarei para sempre comigo!

Aos atuais companheiros de república Anelise, Manoel, Marquinhos, Felipe e Ários, e aos que trilharam outros caminhos, Jonas e Rogério; aos agregados e a todos os visitantes que por lá passaram diariamente. Agradeço pelo companheirismo, pela cantoria animada, pelos passeios, almoços, pizzas, conversas sérias ou bobas, e tudo mais que fizemos juntos. Sentirei saudades!

A minha grande amiga Anelise Basso, que antes mesmo de me conhecer me ofereceu moradia e sua companhia fez com que os dias longe da minha família fossem menos angustiantes, pois me ofereceu o carinho e a amizade de uma irmã. Amigos são irmãos que Deus nos permitiu escolher e você é minha irmã loira!

A minha amiga Vanessa Nataline Tomazeli, uma pessoa que tive imenso prazer em conhecer, um exemplo de determinação, responsabilidade e coragem. A prova de que para sermos felizes é preciso acreditar nos sonhos que se tem e ir à luta!

A equipe do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP) pelas análises de artemisinina, em especial a técnica Ilza Maria pela paciência e dedicação diária.

A todos os colegas que fizemos no CPQBA, principalmente a Leilane pelas caronas, pelos passeios, pela confiança e pelas longas conversas que tivemos.

A equipe do Laboratório de Fitoquímica do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), em especial a doutoranda Maria, pela atenção, ajuda e por realizar as análises de óleo essencial em meio à turbulência do seu doutorado.

Ao pessoal do alojamento do IAC, Alex (o cara do arroz com bife nervoso), Khalil (Paty do Alferes), Francisco (nosso guia), João (Viver e não ter a vergonha de ser feliz!), Vitor (mais conhecido como Sucesso), Rosane (mais conhecida como Carinho), Kênia (Sodinha na cantina da UFLA), em especial minhas companheiras de quarto, Simone (ê Goiás!) e Cibele (Aí Mano!), por me receberem tão bem, pela troca de experiências e por me proporcionarem 1 mês de muito aprendizado e descontração.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite de contribuir com o enriquecimento deste trabalho.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho se realizasse.

**Sonho que se sonha só
É só um sonho que se sonha só
Mas sonho que se sonha junto é realidade!
(Raul Seixas)**

“Pra mim, é terrível. Não consigo aceitar isso, era pra morrer zero.
Salvar uma vida é salvar a humanidade, portanto, perder uma vida é perder a humanidade.”
(Dr. José Maria de Souza, Instituto Evandro Chagas, sobre a redução de mortes por malária.)

RESUMO

BOLINA, Cristiane de Oliveira. Variabilidade genética e associação entre caracteres agronômicos, fisiológicos e fitoquímicos em variedades de *Artemisia annua* L. 2011. 91 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2011.

Artemisia annua L. (Asteraceae) é uma herbácea anual altamente aromática, nativa da Ásia e aclimatada no Brasil. As folhas são fontes abundantes de artemisinina, uma lactona sesquiterpênica utilizada no preparo de drogas para o tratamento de malária, e também de óleo essencial, utilizado na composição de cosméticos e produtos higiênicos. O presente estudo objetivou estimar a variabilidade genética e as correlações existentes entre caracteres agronômicos, fisiológicos e fitoquímicos em variedades de *A. annua*, além de caracterizar o teor, o rendimento e a composição de seu óleo essencial. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os tratamentos foram as variedades Artemis, 2/39x5x3M e 2/39x1V de *A. annua*, submetidas a avaliações agronômicas, fisiológicas e fitoquímicas. Para a realização das estimativas de distância genética foram geradas matrizes de dissimilaridade utilizando a distância Euclidiana e os métodos de agrupamento de Tocher e UPGMA. Além disso, avaliou-se a importância relativa dos caracteres para divergência genética pelo método de Singh. A relação existente entre os caracteres estudados foi estimada por meio do coeficiente de correlação de Pearson e o nível de significância analisado pelo teste t. As análises foram realizadas pelo software Genes e os dendrogramas obtidos pelo NTSYS. A separação e quantificação das substâncias presentes no óleo essencial foram realizadas em cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama e a identificação das mesmas foi feita em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas. Os métodos de Tocher e UPGMA foram concordantes entre si na formação dos grupos e a presença de variabilidade genética dentro das variedades permitiu a identificação de acessos dissimilares e com média elevada para as características estudadas. O número de ramificações, concentração intracelular de CO₂ e rendimento de óleo essencial foram os caracteres que mais contribuíram para a dissimilaridade genética de *A. annua*. Os acessos B24, C5 e C32 foram os mais promissores dentro das variedades e devem ser conservados para futuras hibridações, sendo que as hibridações mais promissoras na obtenção de populações segregantes desejadas são B24 x C5, B24 x C32 e C5 x C32. Encontrou-se correlação positiva e significativa entre os caracteres volume de dossel e rendimento de óleo essencial na variedade 2/39x5x3M, porém, esta correlação não foi encontrada na variedade 2/39x1V. Em ambas as variedades, observou-se correlação negativa e significativa entre volume de dossel e teor de artemisinina. A variedade 2/39x1V produziu a maior massa seca de folhas, maior teor e o maior rendimento de óleo essencial. Cânfora, γ -muuroleno e 1,8 cineol foram os constituintes químicos encontrados em maiores teores no óleo essencial das variedades 2/39x5x3M e 2/39x1V de *A. annua*.

Palavras-chave: Artemisinina. Óleo essencial. Dissimilaridade genética. Seleção de genitores.

ABSTRACT

BOLINA, Cristiane de Oliveira. Genetic variability and association between agronomic, physiological and phytochemicals traits in varieties of *Artemisia annua* L. 2011. 91 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2011.

Artemisia annua L. (Asteraceae) is a highly aromatic annual herb, native from Asia and acclimated in Brazil. The leaves are a rich source of artemisinin, a sesquiterpene lactone used in the preparation of drugs for the treatment of malaria, and also of essential oil used in cosmetics and hygienic products. This study aimed to estimate the genetic variability and correlation between agronomic, physiological and phytochemicals traits in varieties of *A. annua*, also to characterize the content, yield and essential oil composition. The design was completely randomized and treatments were the varieties Artemis, 2/39x5x3M and 2/39x1V of *A. annua*, submitted to agronomic, physiological and phytochemical evaluations. For the accomplishment of the genetic distance estimates dissimilarity matrices had been generated using the Euclidean distance and Tocher's and UPGMA's grouping methods. Moreover, relative importance of the characters for genetic divergence for the method of Singh was evaluated. The relationship between the studied characters was estimated using Pearson's correlation coefficient and the significance level was analyzed by test t. The analyses were performed in the Genes software and the dendrograms obtained from the NTSYS program. The separation and quantification of substances present in the essential oil were performed by gas chromatography with flame ionization detector and the identification of them were made in a gas chromatography coupled with mass spectrometer. Tocher's and UPGMA's methods agreed among themselves in the formation of groups and the presence of genetic variability within varieties allowed the identification of dissimilar individuals with high average for all traits. The number of branches, the intracellular concentration of CO₂ and oil yield were the traits that contributed most to the genetic dissimilarity of *A. annua*. The accesses B24, C5 and C32 were the most promising within populations and must be conserved for future crossings, and the most promising crosses for obtaining desired segregant populations B24 x C5, B24 x C32 e C5 x C32. Correlation met positive and significant between canopy volume of characters and essential oil yield in the variety 2/39x5x3M, however, this correlation was not found in the variety 2/39x1V. In both varieties, there was a negative and significant correlation between canopy volume and content of artemisinin. The variety 2/39x1V produced the greatest dry mass of leaves and consequently achieved the highest level and the highest yield of essential oil. Camphor, y-muuroleno and 1.8 cineole were the compounds found in higher concentrations in the essential oil of varieties 2/39x5x3M and 2/39x1V of *A. annua*.

Keywords: Artemisinin. Essential oil. Dissimilarity genetic. Selection of parents.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Distribuição da malária no mundo, áreas de risco de transmissão19
- Figura 2** - *Artemisia annua* L. cultivada em Pato Branco, PR. UTFPR, Pato Branco, 201022
- Figura 3** – Biossíntese de terpenos23
- Figura 4** – Estruturas químicas da artemisinina e análogos25
- Figura 5** – Dendrogramas resultantes da análise de agrupamento de quinze plantas das variedades Artemis (A), 2/39x5x3M (B) e 2/39x1V (C) de *Artemisia annua* L., a partir de nove caracteres agronômicos, utilizando a Distância Euclidiana e o método de agrupamento de UPGMA. Os valores encontrados nos grupos indicam o valor percentual de vezes que os genótipos agruparam juntos em 1000 ciclos de *bootstrapping*. Os valores dos coeficientes de correlação cofenética (r) foram de 0,62, 0,87 e 0,67, respectivamente. UTFPR, Pato Branco, 201044
- Figura 6** - Dendrograma resultante da análise de agrupamento intervarietal das variedades Artemis, 2/39x5x3M e 2/39x1V de *Artemisia annua* L., a partir de nove caracteres agronômicos, utilizando a Distância Euclidiana e o método de agrupamento de UPGMA. Os valores encontrados nos grupos indicam o valor percentual de vezes que os genótipos agruparam juntos em 1000 ciclos de *bootstrapping*. O valor do coeficiente de correlação cofenética (r) foi de 0,98. UTFPR, Pato Branco, 201045
- Figura 7** - Dendrogramas resultantes da análise de agrupamento de oito plantas das variedades Artemis (A), 2/39x5x3M (B) e 2/39x1V (C) de *Artemisia annua* L., a partir de seis caracteres fisiológicos, utilizando a Distância Euclidiana e o método de agrupamento de UPGMA. Os valores encontrados nos grupos indicam o valor percentual de vezes que os genótipos agruparam juntos em 1000 ciclos de *bootstrapping*. Os valores dos coeficientes de correlação cofenética (r) foram de 0,92, 0,75 e 0,79, respectivamente. UTFPR, Pato Branco, 201047
- Figura 8** - Dendrograma resultante da análise de agrupamento intervarietal das variedades Artemis, 2/39x5x3M e 2/39x1V de *Artemisia annua* L., a partir de seis caracteres fisiológicos, utilizando a Distância Euclidiana e o método de agrupamento de UPGMA. Os valores encontrados nos grupos indicam o valor percentual de vezes que os genótipos agruparam juntos em 1000 ciclos de *bootstrapping*. O valor do coeficiente de correlação cofenética (r) foi de 0,99. UTFPR, Pato Branco, 201048
- Figura 9** - Dendrogramas resultantes da análise de agrupamento de quinze plantas das variedades 2/39x5x3M (A) e 2/39x1V (B) de *Artemisia annua* L., a partir de quatro caracteres fitoquímicos, utilizando a Distância Euclidiana e o método de agrupamento de UPGMA. Os valores encontrados nos grupos indicam o valor percentual de vezes que os genótipos agruparam juntos em 1000 ciclos de

bootstrapping. Os valores dos coeficientes de correlação cofenética (r) foram de 0,71 e 0,90, respectivamente. UTFPR, Pato Branco, 201050

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Desempenho dos acessos avaliados na variedade Artemis para os caracteres agronômicos e fisiológicos; média da variedade e desvio padrão. UTFPR, Pato Branco - PR, 201038
- Tabela 2** - Desempenho dos acessos avaliados na variedade 2/39x5x3M para os caracteres agronômicos, fisiológicos e fitoquímicos; média da população e desvio padrão. UTFPR, Pato Branco - PR, 201039
- Tabela 3** - Desempenho dos acessos avaliados na variedade 2/39x1V para os caracteres agronômicos, fisiológicos e fitoquímicos; média da população e desvio padrão. UTFPR, Pato Branco - PR, 201040
- Tabela 4** - Agrupamento dos acessos/plantas das variedades Artemis, 2/39x5x3M e 2/39x1V de *Artemisia Annu* L. a partir de caracteres agronômicos, fisiológicos e fitoquímicos, pelo método de agrupamento de Tocher, utilizando a distância Euclidiana como medida de distância genética. UTFPR, Pato Branco - PR, 201041
- Tabela 5** - Contribuição relativa de caracteres agronômicos, fisiológicos e fitoquímicos, na divergência entre variedades de *Artemisia annua* L. UTFPR, Pato Branco - PR, 201051
- Tabela 6** - Coeficientes de correlação fenotípica entre caracteres agronômicos, fisiológicos e fitoquímicos avaliados na população B, variedade 2/39x5x3M, de *Artemisia annua* L, UTFPR, Pato Branco – PR, 201060
- Tabela 7** - Coeficientes de correlação fenotípica entre caracteres agronômicos, fisiológicos e fitoquímicos avaliados na população C, variedade 2/39x1V, de *Artemisia annua* L, UTFPR, Pato Branco – PR, 2010 62
- Tabela 8** - Componentes do óleo essencial de 15 acessos da população B, variedade 2/39x5x3M, de *Artemisia annua* L. UTFPR, Pato Braco – PR, 201069
- Tabela 9** - Componentes do óleo essencial de 15 acessos da população C, variedade 2/39x1V, de *Artemisia annua* L. UTFPR, Pato Braco – PR, 201070

LISTA DE ABREVIATURAS

ACT	Terapia Combinada com Artemisinina
AF	Área foliar
ART	Teor de artemisinina
ASMQ	Artesunato + Mefloquina
C_i	Concentração intracelular de CO_2
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
Dc	Diâmetro do caule
DEO	Teor de deoxiartemisinina
Di	Diâmetro da seção inferior do dossel
DIH	Teor de dihidro-epideoxiartenuína B
Dm	Diâmetro da seção média do dossel
Ds	Diâmetro da seção superior do dossel
E	Taxa de transpiração
g_s	Condutância estomática
Hd	Altura do dossel
Hi	Altura de inserção do primeiro par de ramos plagiotrópicos
Ht	Altura da planta
NR	Número de ramificações
OLS	Teor de óleo essencial
P_N	Taxa de assimilação de CO_2
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Vc	Volume do dossel

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	MALÁRIA	18
2.2	<i>Artemisia annua</i> L.	21
2.2.1	Artemisinina	24
2.2.2	Óleo Essencial	25
2.2.3	Melhoramento Genético de <i>Artemisia annua</i> L.	26
2.3	DISSIMILARIDADE GENÉTICA E CORRELAÇÃO	27
3	CAPÍTULO I – DISSIMILARIDADE GENÉTICA EM VARIEDADES DE <i>Artemisia annua</i> L. EMBASADA EM CARACTERES AGRONÔMICOS, FISIOLÓGICOS E FITOQUÍMICOS	31
3.1	INTRODUÇÃO	31
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.4	CONCLUSÕES	52
4	CAPÍTULO II – CORRELAÇÃO ENTRE CARACTERES AGRONÔMICOS, FISIOLÓGICOS E FITOQUÍMICOS EM VARIEDADES DE <i>Artemisia annua</i> L.	53
4.1	INTRODUÇÃO.....	53
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	54
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.4	CONCLUSÕES	63
5	CAPÍTULO III – CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE VARIEDADES DE <i>Artemisia annua</i> L.	64
5.1	INTRODUÇÃO	64
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	65
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.4	CONCLUSÕES	71
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
	APÊNDICES E ANEXOS	85

1 INTRODUÇÃO

A malária representa um forte entrave ao desenvolvimento de muitos países, pois como toda doença negligenciada, prevalece em condições de pobreza contribuindo para o quadro de desigualdade no mundo. Com as mudanças climáticas e o aumento da resistência, tanto do mosquito transmissor aos inseticidas como dos parasitas às drogas convencionais, as medidas sanitárias de prevenção e controle da malária, não estão sendo eficientes.

Até o momento, a artemisinina e seus derivados são a melhor alternativa para o tratamento da doença, pois apresentam eficácia contra cepas resistentes de *Plasmodium falciparum*, causador da forma grave da malária (BALINT, 2001; ENSERINK, 2005). A artemisinina é uma lactona sesquiterpênica extraída das folhas de *Artemisia annua* L. (FERREIRA; JANICK, 1996) e desde a descoberta de suas propriedades antimaláricas, o interesse na planta tem aumentado mundialmente (FERREIRA et al., 2006) buscando alternativas para a produção desta substância em grande escala.

A. annua é uma herbácea anual altamente aromática e suas folhas e inflorescências, a partir das quais se extrai a artemisinina, também são uma rica fonte de óleo essencial, comercialmente utilizado em perfumaria e cosméticos (JAIN et al., 1996). Com a variabilidade genética evidenciada para teores de artemisinina e de óleo essencial, têm-se obtido progressos nos programas de seleção e melhoramento desta espécie. Contudo, a existência de caracteres agronômicos ou fisiológicos correlacionados com a maior produção destes compostos do metabolismo secundário, pode favorecer a eficiência da seleção e a obtenção de progresso genético.

Devido à crescente demanda nacional e internacional por artemisinina e análogos, e a sua produção em escala industrial ser um fator limitante pelos baixos teores encontrados em populações base de *A. annua*, torna-se necessário conhecer a natureza e a magnitude da variabilidade genética disponível nas variedades, buscando identificar acessos promissores para serem usados em futuras hibridações, e também caracteres que se correlacionem com a maior produção de artemisinina e óleo essencial. Além disso, é importante conhecer os constituintes químicos do óleo de *A. annua* de diferentes variedades, tendo em vista, a tendência crescente do uso de óleos voláteis em indústrias alimentícias, de bebidas, farmacêuticas e cosméticas.

Neste sentido, o presente estudo objetivou estimar a variabilidade genética e as correlações existentes entre caracteres agronômicos, fisiológicos e fitoquímicos em

variedades de *Artemisia annua* L, além de caracterizar o teor, o rendimento e a composição química do óleo essencial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MALÁRIA

A malária é uma doença secular que teve influência na economia e no desenvolvimento das nações durante milênios (RIDDER; KOOY; VERPORT, 2008). Contudo, apesar dos esforços nos últimos 50 anos para tentar controlar esta doença (MUELLER et al., 2004), em termos de morbidade e mortalidade, a malária é a mais importante doença parasitária humana (MUELLER et al., 2000; MERCKE et al., 2000; MUELLER et al., 2004; van NIEUWERBURGH et al., 2006; SCHRAMEK et al., 2010) e continua causando um sério impacto sobre a saúde e a economia do mundo tropical (MUELLER et al., 2000; RIDDER; KOOY; VERPORT, 2008), principalmente na África, Ásia e Américas (LEWISON; SRIVASTAVA, 2008; RIDDER; KOOY; VERPORT, 2008).

A doença é endêmica em mais de 100 países (BILIA et al., 2002; WORLD..., 2010), com aproximadamente 40% da população mundial vivendo em áreas de risco (BALINT, 2001; BRASIL, 2005; SLADE et al., 2009; SCHRAMEK et al. 2010) (Figura 1). A estimativa da ocorrência da doença é de 250 a 500 milhões de novos casos por ano e em média um milhão de mortes (BALINT, 2001; BRASIL, 2005; SCHRAMEK et al., 2010), sendo que, cerca de 90% das mortes acontecem entre as crianças africanas com menos de 5 anos de idade (ROLL..., 2010).

O Brasil responde por mais da metade do número total de casos estimados de malária nas Américas e a maioria destes são registrados na região Amazônica (BRASIL, 2005), com 90 municípios identificados como sendo de alto risco, ou seja, com um Índice Parasitário Anual (IPA) igual ou maior que 50 casos por 1.000 habitantes (BRASIL, 2008). Dados do Ministério da Saúde de 2010 mostram que a malária tem sofrido uma tendência decrescente de incidência no Brasil, contudo, os números ainda são alarmantes, sendo confirmados em 2009, 306.908 casos, dos quais 99,8% ocorreram na Região Amazônica (MINISTÉRIO DE SAÚDE, 2010).

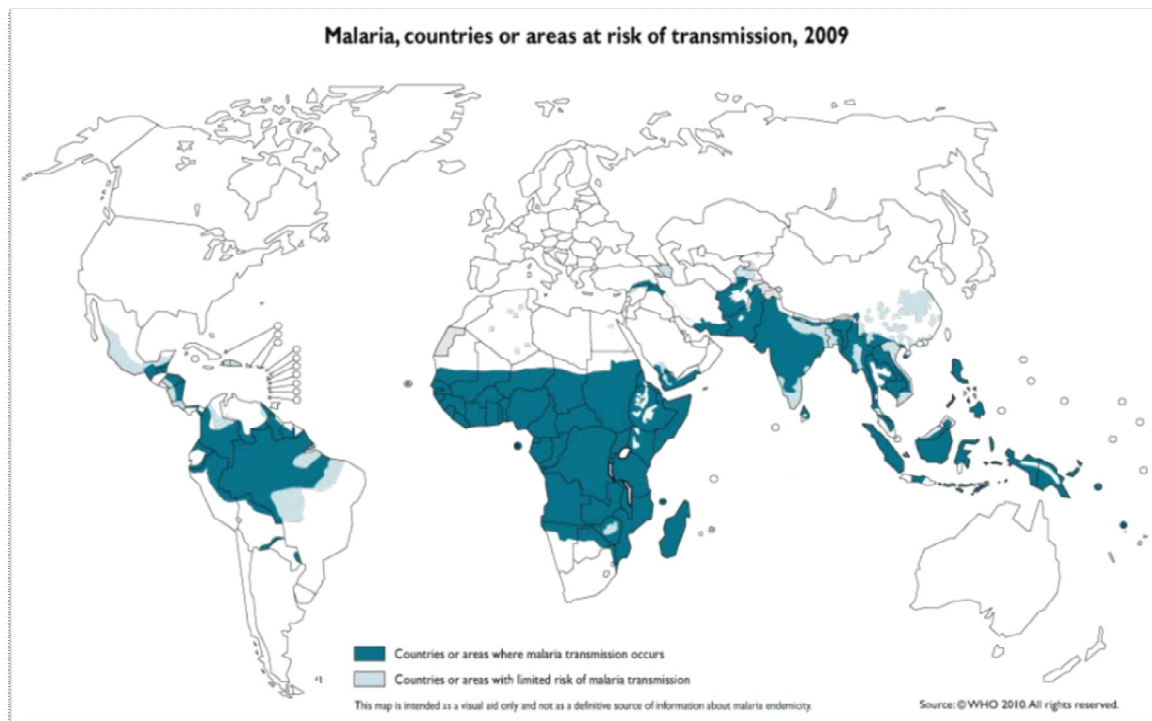


Figura 1 - Distribuição da malária no mundo, áreas de risco de transmissão.
Fonte: World Health Organization (2010).

A malária é uma doença febril aguda caracterizada por febre alta acompanhada de calafrios, suores e cefaléia, que ocorrem em padrões cíclicos dependendo da espécie do parasito infectante e não há transmissão direta da doença de pessoa a pessoa, com raros casos de transmissões por meio de transfusão de sangue infectado, uso compartilhado de seringas e por via congênita (BRASIL, 2008). A transmissão ocorre pela picada da fêmea infectada do mosquito *Anopheles* (WORLD..., 2010), gênero que compreende mais de 400 espécies (BRASIL, 2008). As principais espécies transmissoras da malária no Brasil, tanto na zona rural quanto na zona urbana, são: *Anopheles darlingi*, *A. aquasalis*, *A. albitarsis*, *A. cruzii* e *A. bellator*. A espécie *A. darlingi* é o principal vetor, destacando-se na transmissão da doença pela distribuição geográfica, antropofilia e capacidade de ser infectado por diferentes espécies de plasmódios (BRASIL, 2008).

Quanto ao *Plasmodium* causador da malária, existem três espécies no Brasil: *Plasmodium malariae*, *P. vivax* e *P. falciparum*. A malária causada por *P. ovale* ocorre apenas no continente africano. Entretanto, ocasionalmente podem ser diagnosticados no Brasil casos importados, devendo ser tratados da mesma forma que a malária por *P. vivax* (BRASIL, 2003, 2008). Tanto *P. falciparum* quanto *P. vivax* podem causar anemia severa, mas apenas *P. falciparum* causa malária cerebral, hipoglicemia, acidose metabólica e insuficiência

respiratória (MILLER et al., 2002) e pode matar em questão de horas (ABDIN et al., 2003). Além de ser o mais patogênico, *P. falciparum* é o único parasita cuja resistência aos antimaláricos, registrada primeiramente na Colômbia em 1958, é agora registrada mundialmente. Nas Américas, a resistência é suspeita e confirmada nos países que dividem a floresta amazônica (PAN..., 2005).

A transmissão da malária está relacionada a fatores: 1- biológicos (presença de alta densidade de mosquitos vetores); 2- geográficos (altos índices de pluviosidade, amplitude da malha hídrica e a cobertura vegetal); 3- ecológicos (desmatamentos, construção de hidroelétricas, estradas e de sistemas de irrigação) e 4- sociais, (presença de numerosos grupos populacionais, morando em habitações com ausência completa ou parcial de paredes laterais e trabalhando próximo ou dentro das matas e dos criadouros) (BRASIL, 2008).

Sua ocorrência depende principalmente de fatores climáticos, como temperatura, umidade e precipitação (RIDDER; KOOY; VERPORT, 2008). Sendo assim, centenas de casos estão sendo registrados fora de época na Amazônia, pois como as larvas do mosquito *A. darlingi* desenvolvem-se nas áreas alagadas pelas cheias dos rios, o aquecimento global vem adiantando em cerca de quatro meses esse processo, além de acelerar a reprodução dos mosquitos devido às altas temperaturas (HUCHE, 2009). Desta forma, as medidas sanitárias no combate aos mosquitos do gênero *Anopheles* não estão sendo eficazes e, além disso, o principal problema enfrentado no controle e tratamento da doença é a crescente resistência do parasita às monoterapias convencionais, como mencionado anteriormente (WORLD..., 2005).

Com esse aumento da resistência, a alternativa mais eficaz no controle da malária causada pelo *P. falciparum* é a utilização dos derivados semissintéticos da artemisinina, um produto natural extraído da planta *Artemisia annua* L. (ENSERINK, 2005). Em 2008, a Fiocruz/Farmanguinhos lançou o medicamento Artesunato+Mefloquina (ASMQ), produto que associa as substâncias cloridrato de mefloquina e artesunato, antes utilizadas separadamente contra a doença. O ASMQ se tornou um bem público, distribuído gratuitamente aos pacientes brasileiros e está disponível a preço de custo (US\$ 2.50) ao setor público dos países endêmicos (MATOS, 2010). A combinação resulta em baixos índices de efeitos colaterais, maior adesão dos pacientes e utilização de menores doses de comprimidos, apenas seis, em dose fixa, possibilitando uma cura mais rápida. Além disso, o produto também é fabricado sob a forma de líquido para as crianças (CUNHA, 2010).

Os resultados preliminares do primeiro ano da avaliação demonstraram o impacto significativo do ASMQ empregado em condições de uso programático. Após introdução da combinação em dose fixa em municípios da região norte do país, o número de casos de

malária reduziu 69,8% e o número de hospitalizações teve uma queda de 62,1% para o mesmo período (MATOS, 2010).

2.2 *Artemisia annua* L.

A *Artemisia annua* L. (Figura 2) é uma planta herbácea anual altamente aromática, pertencente à família Asteraceae (Compositae) (FERREIRA; SIMON; JANICK, 1995; MARCHESE; REHDER, 2001; FERREIRA, 2004). Sua provável origem foi em Sichuan, uma província chinesa de clima temperado, onde cresce naturalmente em altitudes acima de 1.000 metros (FERREIRA et al., 2006). Na China a planta é conhecida como *qinghao* (FERREIRA; JANICK, 1996; FERREIRA et al., 2005) e tem sido utilizada há mais de 2.000 anos para tratar febre, malária, hemorróidas e disenteria (JANICK, 1995; YANG et al., 1995; MUELLER et al., 2000; FERREIRA, 2004; MA et al., 2007).

O hábito de crescimento da espécie é determinado (FERREIRA; JANICK, 1996) com altura variando de 2 a 3,05 metros (KHANUJA et al., 2008; BRISIBE et al., 2009), dependendo da região onde é produzida e de aspectos agronômicos, principalmente espaçamento (QUITÉRIO, 2006). 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. 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 (JANICK, 1995).

A. annua possui mecanismo fotossintético do tipo C3 (MARCHESE et al., 2005). Além disso, é considerada planta de dias curtos (FERREIRA; SIMON; JANICK, 1995; JANICK, 1995; HUANG et al., 2010) qualitativa ou absoluta, com alguns genótipos apresentando o requerimento de baixas temperaturas para ter seu florescimento acelerado (MARCHESE et al., 2002; MARCHESE et al., 2005), e outros florescendo de duas a cinco semanas (FERREIRA, 1994; MARCHESE et al., 2002; ZHANG; YE; LI, 2006; MARCHESE, 2006) após serem submetidos ao fotoperíodo crítico, entre 11 e 14 h (FERREIRA; SIMON; JANICK, 1995; MAGALHÃES, 1996; BAGCHI et al., 1997; GELDRE; VERGAUWE; EEKHOUT, 1997; MARCHESE et al., 2002).

A planta é diplóide, com número de cromossomos $2n = 18$ (FERREIRA, 1994) e sua reprodução é predominantemente por fecundação cruzada, com ocorrência de polinização entomófila e anemófila (devido à grande quantidade de pólen produzido e este apresentar-se

quase sem ornamentação). A multiplicação é feita por sementes, além de propagar-se vegetativamente com facilidade (MAGALHÃES, 1996).



Figura 2 - *Artemisia annua* L. cultivada em Pato Branco, PR. UTFPR, Pato Branco - PR, 2010.

A. annua produz uma série de compostos bioativos incluindo flavonóides, cumarinas, esteróides, fenóis, purinas, lipídios, compostos alifáticos, além de terpenos (monoterpenos, triterpenos e sesquiterpenos) (BRISIBE et al., 2009) conforme rota biossintética apresentada na Figura 3. Contudo, o composto mais importante produzido pela espécie é a artemisinina, uma lactona sesquiterpênica eficaz contra cepas resistentes de *Plasmodium falciparum* causador da malária cerebral (FERREIRA; JANICK, 1996; MARCHESE; REHDER, 2001; MARCHESE et al., 2005). Por ser aromática, *A. annua* também é fonte de óleo essencial, comercialmente utilizado em perfumaria e cosméticos (JAIN, et al., 1996; MAGALHÃES; PEREIRA; SARTORATTO, 2004).

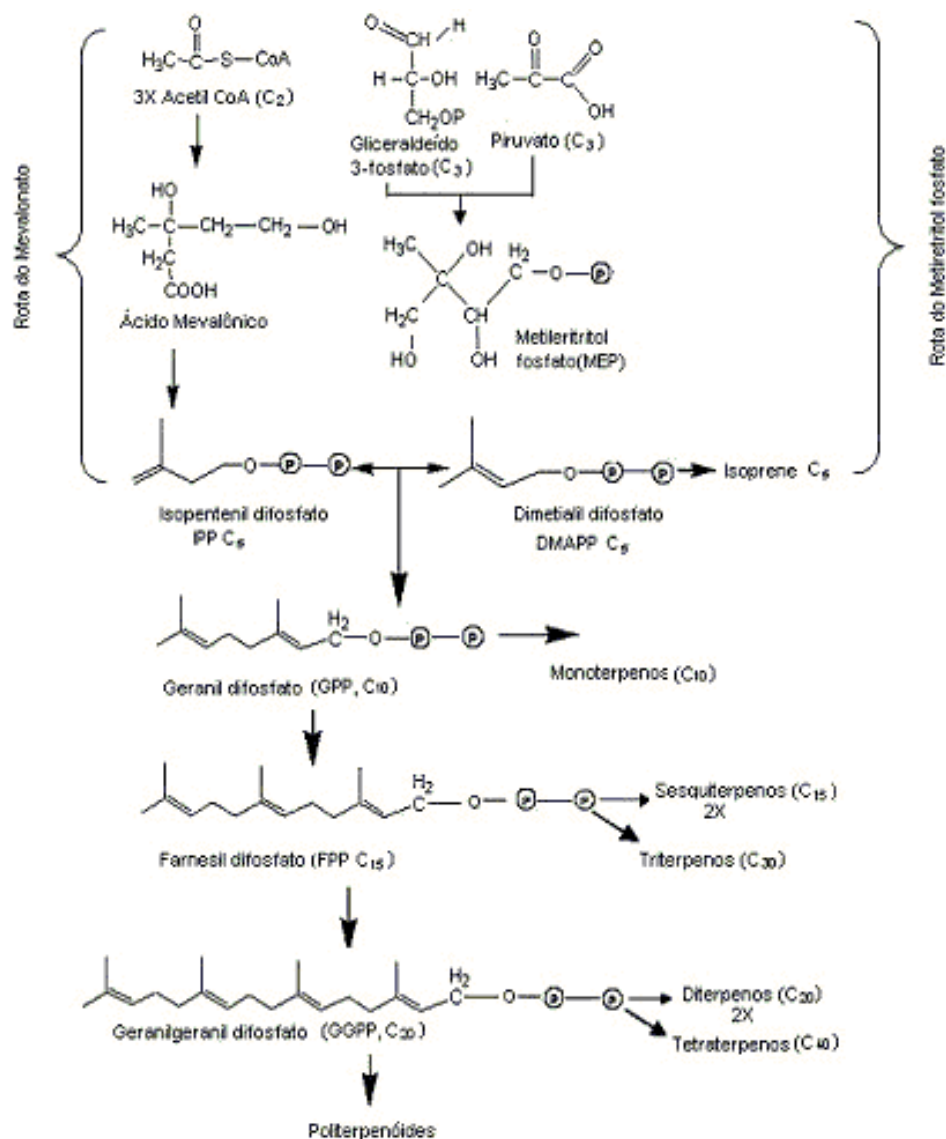


Figura 3 – Biossíntese de terpenos.

Fonte: Taiz e Zeiger (2004).

A parte aérea da planta, principalmente folhas e inflorescências, apresentam as maiores concentrações de artemisinina, sendo de 4 a 11 vezes maior nas inflorescências que nas folhas, com baixas concentrações nos caules e nenhuma artemisinina na raiz e pólen (FERREIRA; SIMON; JANICK, 1995; FERREIRA; JANICK, 1996). Os tricomas glandulares que ocorrem nas folhas, caules e flores são os prováveis sítios de acumulação desta substância (FERREIRA, 1994; MARCHESI, 2006). No entanto, os rendimentos relativamente baixos e inconsistentes de artemisinina limitam sua produção em larga escala (CHARLES; SIMON, 1990; JAIN et al., 1996).

Nos últimos cinco anos tem-se observado variações consideráveis nos plantios de *A. annua* e nos preços de artemisinina. A baixa produção até o ano de 2005 resultou em aumentos significativos dos preços da substância, mais de US\$ 1,100 kg⁻¹. Os preços atraentes levaram ao excesso de produção em 2006, cerca de 28.000 ha plantados em todo o mundo, gerando uma grande oferta. Mesmo com um decréscimo da área plantada em 2007, cerca de 14.500 ha, a oferta manteve-se excessiva, resultando em uma queda acentuada do preço da artemisinina (US\$ 140.00 kg⁻¹ em 2007/8). Os baixos preços e a falta de contratos de fabricantes de ACT (Terapia Combinada com Artemisinina) levaram a menos de 5.000 ha plantados em 2008, a maioria na China. A extração da substância nas folhas armazenadas em anos anteriores apresentou má qualidade e baixo teor de artemisinina, impossibilitando a venda do produto (ARTEPAL, 2009).

Atualmente, o cultivo mundial de *A. annua* é dominado pela Ásia, principalmente China e Vietnã, que produzem cerca de 70% da oferta global de artemisinina, o Leste da África produz 20% e uma pequena quantidade é produzida em outros países como Brasil, Índia, Ghana, Kenya, Tanzânia, Uganda, Nigéria, Moçambique e Madagascar (ROLL..., 2008; FERREIRA; LUTHRIA, 2010). Na Romênia e na Bulgária a planta é cultivada como fonte de óleo essencial (JANICK, 1995; HEEMSKERK; SCHALLIG; PETERS, 2006) e nos Estados Unidos para produção de coroas aromáticas (JANICK, 1995).

2.2.1 Artemisinina

A artemisinina ou *qinghaosu* foi isolada de *A. annua* em 1972 por cientistas chineses e sua estrutura foi elucidada em 1979 (KLAYMAN, 1985; van AGTAMAEL et al., 1999; BALINT, 2001). Quimicamente, a artemisinina é uma lactona sesquiterpênica contendo uma ligação peróxido (Figura 4), que é essencial para a atividade antimalárica (BALINT, 2001),

além de ser seletivamente citotóxica para células cancerígenas (FERREIRA, 2004; LAI; SINGH, 2006; EFFERTH, 2007; ARSENAULT; WOBBE; WEATHERS, 2008; OH et al., 2009) por causa do seu alto teor de ferro (LAI; SINGH, 2006). Como um agente fitotóxico, a artemisinina inibe a germinação de sementes e o crescimento de várias plantas cultivadas e plantas daninhas (BAGCHI et al., 1997; MAGIERO et al., 2009).

No processo de extração de artemisinina são extraídas outras lactonas sesquiterpênicas, como a deoxiartemisinina e dihidro-epideoxiartenuína B, conhecidas como análogos da artemisinina (Figura 4), apresentam atividade antiulcerogênica devido ao aumento das prostaglandinas na mucosa gástrica (FOGLIO et al., 2002; CELEGHINI et al., 2009). A deoxiartemisinina é estruturalmente semelhante à artemisinina, exceto pela ausência da ligação peróxido (O-O) que a torna inativa (ARAÚJO, 2006).

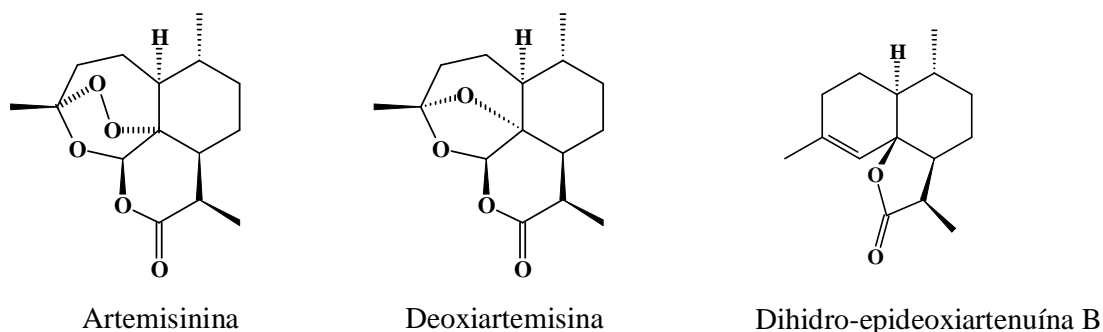


Figura 4 – Estruturas químicas da artemisinina e análogos. Fonte: Foglio (2002).

Desde seu isolamento, vários derivados da artemisinina foram sintetizados, obtendo-se substâncias mais ou menos ativas do que a artemisinina. Entre os derivados mais comuns, estão o diidroartemisinina (DQHS), arteméter, artemisiteno e artesunato de sódio, todos contendo o grupamento peróxido (BALINT, 2001).

2.2.2 Óleo essencial

As folhas e inflorescências a partir das quais se extrai a artemisinina também são uma rica fonte de óleo essencial (JAIN et al., 1996). Com aroma adocicado muito característico (WOERDENBAG et al., 1994) o óleo de *A. annua* apresenta como componentes principais monoterpenos e sesquiterpenos (MA et al., 2007) que são acumulados nos tricomas

glandulares (TELLEZ et al., 1999; OLSSON et al., 2009). Aspectos qualitativos e quantitativos do óleo têm sido amplamente estudados, mostrando que a proporção dos principais componentes varia para diferentes ecótipos (WOERDENBAG et al., 1994; POLICHUK et al., 2010) em função de diferentes locais de plantio, condições climáticas, pela parte da planta que é utilizada (QUISPE-CONDORI et al., 2005), e também para diferentes genótipos (WALLAART; PRAS; QUAX, 1999).

Vários relatos sugerem que o rendimento de óleo de *A. annua* varia entre 0,02% e 0,49% na massa fresca e de 0,04% a 1,9% na massa seca (BAGCHI et al., 2003). Woerdenbag et al. (1993) verificaram que o teor do óleo essencial de *A. annua* de variedade proveniente da China foi de aproximadamente 4,0% na massa seca e é constituído principalmente por artemísia cetona (63,9%), álcool artemísia (7,5%), mirceno (5,1%), α -guaiano (4,7%) e cânfora (3,3%). Já outra variedade de origem vietnamita apresentou um teor de aproximadamente 1,4% na massa seca e seus componentes principais foram cânfora (21,8%), germacreno-D (18,3%), α -cariofileno (5,6%), trans- α -farneseno (3,8%) e 1,8 cineol (3,1%). Segundo Holm et al. (1997) foram identificados cerca de 60 componentes no óleo de *A. annua*, sendo a artemísia cetona, cânfora, germacreno-D e 1,8 cineol os componentes majoritários.

O óleo essencial de *A. annua* é utilizado comercialmente em perfumaria e cosméticos, além de apresentar uma forte ação inseticida (JAIN et al., 1996) e bactericida (JUTEAU et al., 2002; MAGALHÃES; PEREIRA; SARTORATTO, 2004). Na Índia este óleo é utilizado na composição de cosméticos e produtos higiênicos (MAGALHÃES; PEREIRA; SARTORATTO, 2004). Segundo Biogenic Stimulants (2011), sitio web europeu de vendas on-line, o óleo essencial de *A. annua* (wormwood oil) custava em 20 de janeiro de 2011 US\$ 750.00 kg⁻¹ e US\$ 27.33 10 mL⁻¹.

2.2.3 Melhoramento genético de *Artemisia annua* L.

Desde 1984, tem sido avaliado o potencial de produção de plantas de *A. annua* para determinação de suas características hortícolas, a partir de ensaios para determinar o conteúdo de artemisinina de materiais vegetais. A composição do óleo essencial também tem sido caracterizada a fim de avaliar a planta como uma fonte de aromas químicos para a indústria de perfumaria (SIMON et al., 1990).

A. annua foi introduzida no Brasil em 1987 por pesquisadores do CPQBA/UNICAMP, partindo-se de sementes procedentes da Europa e da China (MAGALHÃES, 1996), porém pela ampla variabilidade, os primeiros ensaios apresentaram plantas com crescimento e morfologia heterogêneos, além de baixos rendimentos de artemisinina, aproximadamente 1 kg ha⁻¹, devido à influência fotoperiódica e o florescimento precoce. Com a introdução de genótipos superiores do Vietnã e as técnicas de seleção da MEDIPLANT, na Suíça, foi possível o desenvolvimento de híbridos específicos para as condições brasileiras (MAGALHÃES; PEREIRA; SARTORATTO, 2004).

O programa de melhoramento desenvolvido pela MEDIPLANT selecionou genótipos de uma população base, com elevado teor de artemisinina, óleo essencial, alta produção de biomassa e boas características agrônômicas, que eram clonados e, posteriormente, cruzados entre si, o que possibilitava o conhecimento dos dois progenitores. Os genótipos originários destes cruzamentos eram então chamados de híbridos, embora os progenitores não fossem linhagens puras obtidas por endogamia e sim, clonagens de materiais segregantes com características superiores (MAGALHÃES, 1996).

Após o processo de domesticação e cultivo agrotecnológico de *A. annua*, maiores rendimentos de artemisinina tem sido alcançados, por meio da seleção e do melhoramento genético convencional. Híbridos de alta produtividade foram obtidos e um aumento de 5 kg ha⁻¹ para 25 kg ha⁻¹ de artemisinina abre perspectivas para a produção de antimaláricos, podendo cultivar esses híbridos no Brasil com os mesmos rendimentos que na Suíça, onde foram desenvolvidos (MAGALHÃES et al., 1999).

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. Progressos podem ser esperados pela aplicação do melhoramento clássico, especialmente no desenvolvimento de híbridos por meio do cruzamento de linhagens com genes complementares.

Khanuja et al. (2008) desenvolveram uma nova cultivar de *A. annua* chamada CIM-Arogya. Desenvolvida a partir do melhoramento genético assistido por marcadores moleculares, esta cultivar apresenta características diferenciadas como altura variando de 2,80 a 3,05 metros, dossel oval, teor de artemisinina entre 0,9 e 1,1% e teor de óleo essencial de 0,35 a 0,45%.

2.4 DISSIMILARIDADE GENÉTICA E CORRELAÇÃO

O melhoramento de plantas é a mais valiosa estratégia para o aumento da produtividade de forma sustentável e ecologicamente equilibrada (BORÉM, 1998). Nos programas de melhoramento, a busca por genótipos superiores tem sido o principal objetivo. Estes genótipos são obtidos por técnicas que permitem ao melhorista selecionar por meio do fenótipo as melhores constituições genótípicas que podem resultar na obtenção de uma nova cultivar (CARVALHO et al., 2001).

Sendo assim, a existência de variabilidade na população de trabalho é que vai garantir o sucesso de um programa de melhoramento, por meio do inter cruzamento entre cultivares superiores e divergentes para a formação de população-base. Essa divergência pode ser avaliada a partir de características agronômicas, morfológicas, moleculares, entre outras (CRUZ, 2006; CRUZ; CARNEIRO, 2006). Uma população originada do cruzamento entre indivíduos superiores e geneticamente dissimilares terá grande probabilidade de originar populações com ampla variabilidade genética e com maior possibilidade de seleção de transgressivos para o caráter de interesse (BERTAN et al., 2006).

As informações múltiplas de cada cultivar são expressas em medidas de dissimilaridade, que representam a diversidade existente no conjunto de acessos estudados (CRUZ, 2006; CRUZ; CARNEIRO, 2006). Entre as medidas de dissimilaridade que podem evidenciar a intensidade de variabilidade genética, as mais utilizadas são a distância Euclidiana e a distância de Mahalanobis (MARCHIORO et al., 2003). A distância generalizada de Mahalanobis é a mais utilizada, no entanto, só é possível de ser estimada quando se dispõe da matriz de covariâncias residuais obtida a partir de ensaios experimentais com repetições (CRUZ; REGAZZI, 2001; LORENCETTI et al., 2006).

As estimativas de dissimilaridade atendem os objetivos do melhorista, por quantificarem e informarem sobre o grau de semelhança ou de diferença apresentado entre dois quaisquer genótipos. Entretanto, o número de estimativas obtidas é relativamente grande, o que torna impraticável o reconhecimento de grupos homogêneos pelo simples exame visual daquelas estimativas. Assim, para realizar esta tarefa faz-se uso de métodos de agrupamento ou de projeções de distâncias em gráficos bidimensionais, em que cada coordenada é obtida a partir da medida de dissimilaridade escolhida (CRUZ; CARNEIRO, 2006).

Os métodos de agrupamento são utilizados para reunir acessos, por meio de algum critério, que apresentam similaridade no padrão de comportamento em relação a um conjunto de caracteres (CRUZ, 2006). Dentre os métodos de agrupamento, os mais utilizados são os de otimização e os hierárquicos (CRUZ; CARNEIRO, 2006). Nos métodos de otimização os

grupos são estabelecidos aperfeiçoando determinado critério de agrupamento de forma que os grupos formados sejam mutuamente exclusivos. Um dos métodos de otimização mais comumente utilizados no melhoramento é o proposto por Tocher, citado por Rao (1952), onde adota-se o critério de que a média das medidas de dissimilaridade dentro de cada grupo deve ser menor que as distâncias entre quaisquer grupos (CRUZ; REGAZZI, 2001; CRUZ; CARNEIRO, 2006). Já nos métodos hierárquicos, os genótipos são agrupados por um processo que se repete em vários níveis, até que seja estabelecido o dendrograma ou o diagrama de árvore. Neste caso, não há preocupação com o número ótimo de grupos, uma vez que o interesse maior está na árvore e nas ramificações que são obtidas. As delimitações podem ser estabelecidas por um exame visual do dendrograma, em que se avaliam pontos de alta mudança de nível, tomando-os em geral como delimitadores do número de genótipos para determinado grupo (CRUZ; REGAZZI, 2001; CRUZ; CARNEIRO, 2006). Dentre os métodos hierárquicos, o método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) tem sido utilizado com maior frequência por ser um método não-ponderado de agrupamento aos pares, utilizando as médias aritméticas das medidas de dissimilaridade do grupo (CRUZ; CARNEIRO, 2006).

O estudo da diversidade genética entre um conjunto de acessos é feito a partir de um conjunto de informações, que em alguns casos, necessita da avaliação de muitos caracteres, demandando grande mão de obra e custo. Nesses estudos, é necessário avaliar a importância de cada um deles para a diversidade, identificando-se aqueles que menos contribuem, sendo recomendável seu descarte em estudos futuros (CRUZ, 2006). O método proposto por Singh (1981), baseado na estatística S_j , é comumente utilizado para quantificar a contribuição relativa dos caracteres avaliados, sendo que, os valores percentuais de S_j constituem a medida da importância relativa da variável j para o estudo da diversidade (CRUZ; CARNEIRO, 2006). Desta forma, as variáveis com estimativas de contribuição relativa de pequena magnitude não são consistentes na quantificação da dissimilaridade genética (BERTAN et al, 2006).

Além da variabilidade genética, a ocorrência de caracteres correlacionados pode auxiliar no processo de melhoramento de uma espécie, principalmente, quando a seleção de um deles apresenta dificuldades, devido à baixa herdabilidade ou problemas na mensuração e identificação (CRUZ; REGAZZI, 2001). Segundo Carvalho, Lorencetti e Benin (2004), há presença de correlação entre duas ou mais variáveis quando as alterações ocorridas em uma delas são acompanhadas por modificações nas outras. Deste modo, a seleção indireta em

caracteres menos complexos com maior herdabilidade e de fácil mensuração, poderá resultar em maior progresso genético em relação ao uso de seleção direta (HARTWIG et al., 2006).

3 CAPÍTULO I - DISSIMILARIDADE GENÉTICA EM VARIEDADES DE *Artemisia annua* L. EMBASADA EM CARACTERES AGRONÔMICOS, FISIOLÓGICOS E FITOQUÍMICOS

3.1 INTRODUÇÃO

Artemisia annua L. (Asteraceae) é uma espécie herbácea aromática anual, com hábito de crescimento determinado (FERREIRA; JANICK, 1996) e altura variando de 2 a 3 metros (BRISIBE et al., 2009). É uma planta de dias curtos obrigatória (MARCHESE et al., 2002), com fotoperíodo crítico entre 11 e 14 h (FERREIRA; SIMON; JANICK, 1995; MAGALHÃES, 1996; BAGCHI et al., 1997; GELDRE et al., 1997; MARCHESE et al., 2002) e mecanismo fotossintético do tipo C3 (MARCHESE et al., 2005). A sua reprodução ocorre predominantemente por fecundação cruzada, multiplicando-se por sementes e propagando-se vegetativamente com facilidade (MAGALHÃES et al., 1999).

As folhas e inflorescências de *A. annua* são importantes fontes de artemisinina, uma lactona sesquiterpênica eficaz contra cepas resistentes de *Plasmodium falciparum* causador da malária cerebral (FERREIRA; JANICK, 1996; MARCHESE; REHDER, 2001; MARCHESE et al., 2005), além de ser seletivamente citotóxica para células cancerígenas (FERREIRA, 2004; LAI; SINGH, 2006; EFFERTH, 2007; ARSENAULT; WOBBE; WEATHERS, 2008; OH et al., 2009). Por ser aromática, a espécie também é fonte de óleo essencial, comercialmente utilizado em perfumaria e cosméticos (JAIN, et al., 1996; MAGALHÃES; PEREIRA; SARTORATTO, 2004). A China e o Vietnã produzem cerca de 70% da oferta global de artemisinina (FERREIRA; LUTHRIA, 2010), porém, com a crescente demanda pela substância a oferta está aquém da procura (ERDEMOĞLU et al., 2007; ROOL..., 2008), uma vez que, os rendimentos relativamente baixos e inconsistentes, limitam sua produção em larga escala (CHARLES; SIMON, 1990; JAIN et al., 1996).

A. annua é originária da China (MARCHESE et al., 2005) e sua introdução no Brasil aconteceu no final da década de 80 a partir de sementes procedentes da Europa e da China (MAGALHÃES, 1996). Entretanto, com a ampla variabilidade existente, os primeiros ensaios apresentaram plantas com crescimento e morfologia heterogêneos, além de baixos rendimentos de artemisinina, aproximadamente 1 kg ha⁻¹, devido à influência fotoperiódica e o florescimento precoce. Com a introdução de genótipos superiores do Vietnã e as técnicas de seleção da MEDIPLANT, na Suíça, foi possível o desenvolvimento de híbridos específicos para as condições brasileiras (MAGALHÃES; PEREIRA; SARTORATTO, 2004). A

variedade Artemis é destacada por Graham et al. (2010) como sendo um desses híbridos, considerado atualmente o líder em produção de artemisinina.

A variabilidade interpopulacional para o rendimento de óleo essencial em plantas de *A. annua* de diferentes origens foi observada por Holm et al. (1997), que verificaram uma variação no conteúdo de 0,4 a 0,9% sobre o peso seco. Para o teor de artemisinina esta variabilidade foi evidenciada por Delabays, Simonnet e Gaudin (2001) ao reportar que genótipos originários de 14 locais diferentes apresentavam teores variando de 0,02 a 1,38% sobre peso seco. Além destes, Sangwan et al. (1999) também encontraram variabilidade entre os genótipos para os teores de óleo essencial e artemisinina, com o conteúdo de óleo variando de 0,69 a 2,93 (mg g⁻¹ de peso fresco), e o de artemisinina de 0,09 a 0,64 (mg g⁻¹ de peso seco).

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 fitomassa e artemisinina encontrados em Pato Branco-PR foram superiores aqueles 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 (FERREIRA; SIMON; JANICK, 1995; MARCHESE; REHDER, 2001).

Devido à crescente demanda nacional e internacional por artemisinina e análogos, e a sua produção em escala industrial ser um fator limitante pelos baixos teores encontrados em populações base de *A. annua*, torna-se necessário conhecer a natureza e a magnitude da variabilidade genética intra-específica disponível nas variedades, buscando identificar acessos promissores. Assim, o objetivo deste trabalho foi estimar a variabilidade genética inter e intrapopulacional de três variedades de *A. annua*, a partir de avaliações agronômicas, fisiológicas e fitoquímicas, e indicar acessos promissores para serem utilizados em hibridações.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na área experimental do curso de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 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).

Em 13 de julho de 2009 as variedades Artemis, 2/39x5x3M e 2/39x1V de *A. annua* foram semeadas em grades com 96 tubetes contendo 130 g de substrato orgânico Tecnomax® esterilizado. Utilizou-se 192 tubetes por variedade e estes foram mantidos em estufa plástica sob fotoperíodo de 15 horas para evitar o florescimento das plantas. Nos dias 21 e 24 de setembro de 2009 as mudas receberam aplicação de 1 L de solução nutritiva borrifada nas folhas, cuja as soluções estoques foram preparadas segundo Hoagland e Arnon (1950).

Em 08 de outubro de 2009, quando as plantas atingiram uma altura aproximada de 20 cm, foram transplantadas a campo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo os tratamentos as três variedades representadas por 15 plantas/acessos cada. A área experimental utilizada foi de 1050 m², sendo o espaçamento de 1x1 m entre as plantas e de 3 m entre as variedades (Apêndice A).

A correção da acidez e a adubação foram realizadas com base em análise química do solo (Apêndice B), seguindo as recomendações da Comissão de Química e Fertilidade do Solo - RS/SC (COMISSÃO..., 2004), para produção de 10 toneladas de grãos de milho por hectare (N: 160 kg ha⁻¹; P: 175 kg ha⁻¹; K: 90 kg ha⁻¹), nas formulações Uréia, Super Fosfato Simples e Cloreto de Potássio. A adubação baseou-se no milho porque a sua produção de massa é semelhante à de *A. annua* e não há uma recomendação específica para esta espécie (PALADINI, 2009). O nitrogênio (N) em cobertura foi parcelado em duas vezes de 28 kg ha⁻¹ durante o ciclo da cultura (16/11/2009 e 16/12/2009) e a adubação realizada em toda área do experimento.

3.2.1 Avaliações agronômicas

No dia 27 de janeiro de 2010 foi feita a primeira seleção das plantas que, visualmente, apresentavam maior porte e maior quantidade de folhas. Nesta etapa foram selecionadas 50 plantas de cada variedade e identificadas com etiquetas de acrílico amarradas no ápice das plantas, sendo que de A1 a A50 variedade Artemis, de B1 a B50 variedade 2/39x5x3M e de C1 a C50 variedade 2/39x1V. Quando 50% das plantas selecionadas iniciaram a emissão dos botões florais, fez-se uma segunda seleção visual, dentre as 50 plantas selecionadas

inicialmente, de 15 plantas que apresentavam maior altura e maior biomassa foliar em cada variedade, para avaliação de caracteres agrônômicos.

Os caracteres aferidos foram: altura da planta (Ht, m); altura de inserção do primeiro par de ramos plagiotrópicos (Hi, 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); diâmetro do caule (DC, cm); número de ramificações (NR) e volume do dossel (Vc, m³). O volume do dossel foi estimado pela equação $Vc = \pi Di^2 Hd / 12$, conforme metodologia utilizada por Favarin et al. (2002) para cálculo do dossel em cafeeiro (Anexo A).

3.2.2 Avaliações fisiológicas

As variáveis fisiológicas determinadas foram taxa de assimilação de CO₂ (P_N , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentração intracelular de CO₂ (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$), taxa de transpiração (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e eficiência no uso de água (WUE, %), e, além disso, mensurou-se a área foliar (AF, cm²) para a determinação das demais variáveis.

A avaliação das trocas gasosas foi realizada nas oito plantas de cada variedade que apresentaram o maior volume de dossel, utilizando-se um sistema de medição de trocas gasosas, equipado com um analisador infravermelho de gases (IRGA) modelo LI-6400XT (LI-COR, Lincoln, Nebraska – USA), com injetor automático de CO₂ e fonte artificial de luz vermelho e azul (Apêndice C-1). As condições microclimáticas na câmara de medidas das amostras foram mantidas constantes nas medições, 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de PAR (photosynthetic active radiation/radiação fotossinteticamente ativa), UR $53 \pm 7\%$, 400 ppm de CO₂ e temperatura das folhas em torno de $29,5 \pm 2,8$ °C. A amostragem de oito plantas foi definida devido à dificuldade de realização desta avaliação em um grande número de plantas, em função da fragilidade das folhas de *A. annua* que quando acopladas ao IRGA, se desprendem facilmente dos galhos, interrompendo a mensuração das trocas gasosas. As mensurações iniciaram-se aproximadamente as 10 h da manhã e foram realizadas nas folhas completamente desenvolvidas e sadias do terço médio das plantas. Devido ao formato recortado das folhas de *A. annua* e a necessidade de se estimar a área foliar nas avaliações de trocas gasosas, as folhas foram fotografadas (Apêndice C-2) e o cálculo da área (apenas aquela delimitada na câmara do IRGA) foi feito com o auxílio da ferramenta de cálculo de área do software livre GIMP (GNU Image Manipulation Program).

3.2.3 Avaliações fitoquímicas

Baseando-se nas características agrônômicas superiores, 15 plantas de cada uma das variedades 2/39x5x3M e 2/39x1V foram clonadas por estaquia e estão sendo mantidas em casa de vegetação sob fotoperíodo de 15 horas, para que, em trabalhos futuros, sejam utilizadas em cruzamentos. Devido a problemas na colheita do experimento, a variedade Artemis foi descartada e não fez parte das avaliações fitoquímicas.

No dia 20 de março de 2010, quando mais de 50% das plantas iniciaram o florescimento, foi realizada a colheita. As plantas foram cortadas rente ao solo e colocadas para secar até peso constante em estufa com circulação de ar e temperatura de $\pm 35^{\circ}\text{C}$. Após secagem, as folhas foram segregadas dos caules para realização das análises fitoquímicas.

Os caracteres fitoquímicos avaliados foram: rendimento de óleo essencial (OLS, L ha^{-1}), teor de artemisinina (ART, %), teor de dihidro-epideoxiartenuína B (DIH, %) e teor de deoxiartemisinina (DEO, %).

3.2.3.1 Rendimento de óleo essencial

A extração do óleo essencial foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Primeiramente, 150 g de massa seca de folhas de cada acesso das variedades B e C de *A. annua* foram transferidas para um balão de 2 L contendo 1,5 L de água destilada, acoplado a um sistema Clevenger (Apêndice D-1), onde procedeu-se a hidrodestilação durante 1 h e 30 min após o início da condensação. Depois de aferir o volume de óleo extraído (Apêndice D-2), este foi armazenado hermeticamente em vidros âmbar em geladeira a 4°C .

3.2.3.2 Teor de artemisinina e análogos

As análises de artemisinina e análogos procederam-se na Divisão de Fitoquímica do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA/UNICAMP). Os extratos foram obtidos a partir de 0,250 g de folhas secas e moídas extraídas com 5 mL de diclorometano por 2 minutos em Ultra Turrax (Marca Quimis modelo Q-252, São Paulo, Brasil) (Apêndice E-1), e em seguida, 2 x 5 mL de metanol, por 3 minutos e 6000 rpm à temperatura ambiente. O extrato foi filtrado a vácuo em

funil de placa porosa com papel de filtro e evaporado a secura em rotaevaporador (Marca Büchi modelo R2, Flawil, Switzerland) (Apêndice E-2).

Na etapa de purificação do extrato, cartuchos de Florisil® (Strata 8B-So13-hCh, Phenomenex, Califórnia, USA), foram completados com mais 5 g de Florisil® FX 0284-1 (60-100 Mesh) e depois de conectados ao sistema de extração a vácuo (Manifold) (J. T. Baker, New Jersey, USA) foram condicionados com 10 mL de hexano (Apêndice E-3). Em seguida, introduziu-se o extrato dissolvido em 2 mL de hexano, eluindo com 3 mL de hexano e 60 mL de diclorometano, coletando as frações separadamente. A fração de diclorometano foi evaporada à secura sob vácuo em evaporador rotativo e ressuspensa em balão volumétrico de 5 mL com metanol grau CLAE. As amostras foram 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 (Massachusetts, USA), 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 Empower pro build 1154/Waters. Utilizou-se coluna com fase estacionária ciano, Luna CN 5 µm 250 x 4,6 mm (Phenomenex, Califórnia, USA); 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 et al. (2009), a partir do método do padrão externo. As curvas de calibração e os dados da curva analítica encontram-se no Anexo B.

3.2.4 Análises dos dados

Na comparação de médias, foram classificados como superiores aqueles acessos que apresentaram média superior à média geral mais o desvio padrão e inferiores aqueles que apresentaram média inferior a média geral menos o desvio padrão.

Para a realização das estimativas de distância genética foram geradas matrizes de dissimilaridade empregando a Distância Euclidiana, com o auxílio do software estatístico GENES (CRUZ, 2001). Com base nessas matrizes foram feitas as análises de agrupamento pelo método de otimização de Tocher e pelo método hierárquico UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages). Pelo método UPGMA foram obtidos os dendrogramas de dissimilaridade intra e intervarietais, utilizando-se o programa NTSYS pc 2.1 (ROHLF, 2000). Os grupos formados nos dendrogramas de cada variedade foram

separados a partir do ponto de corte feito com base na distância genética média obtida. A estabilidade estatística dos agrupamentos foi estimada pela análise de *Bootstrapping* com 1.000 simulações. Além disso, avaliou-se a importância relativa dos caracteres para divergência genética pelo método de SINGH (1981).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 constam os desempenhos dos acessos da variedade Artemis. No caráter altura de planta (Ht) os acessos A10 e A18 apresentaram desempenho superior à média mais um desvio padrão, sendo classificados como superiores para este caráter. Quanto ao caráter volume de dossel (Vc) foram os acessos A10, A12 e A18 que tiveram o melhor desempenho. Observa-se que os acessos que apresentaram desempenho inferior a média menos o desvio padrão no caráter altura de planta também foram inferiores para o volume de dossel, indicando que plantas mais altas possuem um maior volume de dossel, o que já era esperado.

Na variedade 2/39x5x3M (Tabela 2) os acessos B14 e B24 apresentaram desempenho superior à média mais um desvio padrão para os caracteres volume de dossel (Vc) e rendimento de óleo essencial (OLS). Já no caráter teor de artemisinina (ART) foram os acessos B7, B33 e B35 que apresentaram desempenho superior.

Com relação ao desempenho dos acessos da variedade 2/39x1V (Tabela 3), observa-se que os acessos desta variedade apresentaram as maiores médias para o caráter altura de planta (Ht) e que os superiores à média mais um desvio padrão foram C4, C10, C17, C31 e C45. Quanto ao rendimento de óleo essencial (OLS), o acesso C32 se mostrou superior a média. Para os teores de artemisinina (ART) e análogos (DIH e DEO), o acesso que apresentou desempenho superior foi C5.

Tabela 1 - Desempenho dos acessos avaliados na variedade Artemis para os caracteres agrônômicos e fisiológicos; média da variedade e desvio padrão. UTFPR, Pato Branco - PR, 2010.

Artemis															
Planta	Ht	Hi	Hd	Di	Dm	Ds	Vc	DC	NR	AF	P_N	g_s	C_i	E	WUE
A4	2,01	0,13	1,88	1,55	1,71	0,50 ^I	1,99	0,40	80	2,02 ^I	19,00	0,63	321,16	9,58 ^S	0,20
A5	2,05	0,04	2,01	1,65 ^S	1,98 ^S	0,89	2,20	0,50	85	2,82 ^S	16,87	0,73	330,84	8,81	0,19
A7	1,89 ^I	0,14 ^S	1,75 ^I	1,27	1,75	0,26 ^I	1,64 ^I	0,40	80	2,51	24,40 ^S	0,76	309,15	9,44 ^S	0,26
A9	2,04	0,15 ^S	1,89	1,39	1,46	0,72	2,06	0,60 ^S	84	-	-	-	-	-	-
A10	2,09 ^S	0,07	2,02 ^S	1,23	1,18 ^I	0,73	2,31 ^S	0,30 ^I	77	-	-	-	-	-	-
A12	2,07	0,01 ^I	2,06 ^S	1,21	1,27	0,58	2,31 ^S	0,40	72	2,31	12,49	0,34	313,97	6,06	0,21
A18	2,11 ^S	0,05	2,06 ^S	1,32	1,65	0,70	2,40 ^S	0,40	88 ^S	-	-	-	-	-	-
A21	2,08	0,14 ^S	1,94	1,00 ^I	1,32	0,74	2,20	0,30 ^I	81	-	-	-	-	-	-
A22	1,88 ^I	0,08	1,80 ^I	1,92 ^S	2,18 ^S	0,80	1,67 ^I	0,50	72	2,52	17,12	0,74	335,47 ^S	6,75	0,25
A26	1,94	0,01 ^I	1,93	1,57	1,69	0,72	1,90	0,50	65 ^I	-	-	-	-	-	-
A28	2,03	0,11	1,92	1,16	1,61	0,96 ^S	2,07	0,50	88 ^S	2,32	11,51	0,40	331,72	4,79	0,24
A33	1,89 ^I	0,02 ^I	1,87	1,15	1,43	0,89	1,75 ^I	0,50	82	-	-	-	-	-	-
A38	2,04	0,07	1,97	1,09	1,33	0,43 ^I	2,15	0,40	84	-	-	-	-	-	-
A45	1,95	0,04	1,91	1,06 ^I	1,29	1,08 ^S	1,90	0,50	69 ^I	2,59	17,53	0,82	337,32 ^S	6,47	0,27
A46	1,90 ^I	0,09	1,81 ^I	1,26	1,47	0,80	1,71 ^I	0,40	90 ^S	2,92 ^S	4,30 ^I	0,09 ^I	309,20	1,31 ^I	0,33 ^S
Média	2,00	0,08	1,92	1,32	1,55	0,72	2,02	0,44	79,80	2,50	15,40	0,56	323,60	6,65	0,24
Desvio	0,08	0,05	0,09	0,25	0,28	0,21	0,25	0,08	7,43	0,29	5,98	0,26	11,72	2,76	0,05

Ht: altura da planta (m); Hi: altura de inserção do primeiro par de ramos plagiotrópicos (m); Hd: altura do dossel (m); Di: diâmetro da seção inferior do dossel (m); Dm: diâmetro da seção média do dossel (m); Ds: diâmetro da seção superior do dossel (m); Vc: volume do dossel (m³); DC: diâmetro do caule (cm); NR: número de ramificações; AF: área foliar (cm²); P_N : taxa de assimilação de CO₂ (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹); g_s : condutância estomática (mol H₂O m⁻² s⁻¹); C_i : concentração intracelular de CO₂ (μmol CO₂ mol⁻¹); E : taxa de transpiração (mmol H₂O m⁻² s⁻¹); WUE: eficiência no uso de água (%). (^S) e (^I) valores superiores e inferiores a média mais ou menos um desvio padrão, respectivamente. (-) Caracteres não avaliados para este acesso.

Tabela 2 - Desempenho dos acessos avaliados na variedade 2/39x5x3M para os caracteres agrônômicos, fisiológicos e fitoquímicos; média da população e desvio padrão. UTFPR, Pato Branco - PR, 2010.

2/39x5x3M																			
Planta	Ht	Hi	Hd	Di	Dm	Ds	Vc	DC	NR	AF	P_N	g_s	C_i	E	WUE	OLS	ART	DIH	DEO
B6	2,79 ^S	0,01 ^I	2,78 ^S	1,25	1,36	1,32 ^S	1,14	0,50	93	-	-	-	-	-	-	44,99	0,53	0,14	0,02
B7	2,65	0,03 ^I	2,62	1,13 ^I	1,27 ^I	0,94	0,88 ^I	0,40	75	-	-	-	-	-	-	22,02	0,88 ^S	0,12	0,05
B10	2,77 ^S	0,02 ^I	2,75 ^S	1,29	1,65	0,79 ^I	1,20	0,50	71	-	-	-	-	-	-	31,28	0,78	0,20 ^S	0,04
B13	2,32	0,11 ^S	2,21	1,29	1,65	1,32 ^S	0,96	0,50	81	-	-	-	-	-	-	26,72	0,85	0,10	0,05
B14	2,69	0,08	2,61	1,76 ^S	1,96 ^S	0,97	2,12 ^S	0,60	75	1,61	6,07 ^I	0,08 ^I	255,13 ^I	1,92 ^I	0,32 ^S	55,26 ^S	0,62	0,20 ^S	0,03
B15	2,28	0,10	2,18	1,50	1,42	1,12	1,28	0,60	98	1,17 ^I	7,93	0,17	307,73 ^S	3,94	0,20	20,48	0,72	0,09	0,06 ^S
B19	2,48	0,01 ^I	2,47	1,38	1,50	0,66 ^I	1,23	0,40	97	-	-	-	-	-	-	33,19	0,50	0,17	0,04
B20	2,72	0,08	2,64	1,50	1,57	1,18	1,56	0,40	85	1,78	11,44	0,20	283,28	4,59	0,25	45,41	0,81	0,26 ^S	0,03
B23	1,95 ^I	0,08	1,87 ^I	1,89 ^S	1,66	1,14	1,75	0,70 ^S	80	1,46	17,97 ^S	0,25	255,15 ^I	5,93	0,30 ^S	41,80	0,72	0,11	0,05
B24	2,56	0,08	2,48	1,99 ^S	2,01 ^S	1,35 ^S	2,57 ^S	0,30 ^I	181 ^S	1,58	11,93	0,33	317,93 ^S	7,16	0,17 ^I	71,85 ^S	0,31 ^I	0,12	0,03
B26	2,27	0,09	2,18	1,14 ^I	1,43	1,27	0,74 ^I	0,40	79	-	-	-	-	-	-	29,84	0,56	0,12	0,05
B28	2,25	0,10	2,15	1,49	1,63	0,55 ^I	1,25	0,50	75	1,80 ^S	16,74	0,26	268,96	6,28	0,27	26,00	0,69	0,11	0,05
B33	2,43	0,08	2,35	1,35	1,96 ^S	1,00	1,12	0,50	86	-	-	-	-	-	-	48,61	0,95 ^S	0,20 ^S	0,05
B35	2,28	0,07	2,21	1,47	1,36	0,98	1,25	0,60	76	1,10 ^I	19,00 ^S	0,41 ^S	297,03	9,80 ^S	0,19	7,64 ^I	0,89 ^S	0,12	0,06 ^S
B43	2,79 ^S	0,10	2,69 ^S	1,46	1,43	1,18	1,50	0,60	82	1,74	10,17	0,18	287,34	4,64	0,22	28,19	0,46 ^I	0,09	0,02
Média	2,48	0,07	2,41	1,46	1,59	1,05	1,37	0,50	88,93	1,53	12,66	0,23	284,07	5,53	0,24	35,55	0,68	0,14	0,04
Desvio	0,25	0,03	0,27	0,25	0,23	0,24	0,48	0,11	26,76	0,254	4,767	0,103	23,261	2,356	0,053	15,97	0,184	0,049	0,015

Ht: altura da planta (m); Hi: altura de inserção do primeiro par de ramos plagiotrópicos (m); Hd: altura do dossel (m); Di: diâmetro da seção inferior do dossel (m); Dm: diâmetro da seção média do dossel (m); Ds: diâmetro da seção superior do dossel (m); Vc: volume do dossel (m³); DC: diâmetro do caule (cm); NR: número de ramificações; AF: área foliar (cm²); P_N : taxa de assimilação de CO₂ (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹); g_s : condutância estomática (mol H₂O m⁻² s⁻¹); C_i : concentração intracelular de CO₂ (μmol CO₂ mol⁻¹); E : taxa de transpiração (mmol H₂O m⁻² s⁻¹); WUE: eficiência no uso de água (%); OLS: rendimento de óleo essencial (L ha⁻¹); ART: teor de artemisinina (%); DIH: teor de dihidro-epideoxiartenuína B (%); DEO: teor de deoxiartemisinina (%). (^S) e (^I) valores superiores e inferiores a média mais ou menos um desvio padrão, respectivamente. (-) Caracteres não avaliados para este acesso.

Tabela 3 - Desempenho dos acessos avaliados na variedade 2/39x1V para os caracteres agrônômicos, fisiológicos e fitoquímicos; média da população e desvio padrão. UTFPR, Pato Branco - PR, 2010.

2/39x1V																			
Planta	Ht	Hi	Hd	Di	Dm	Ds	Vc	DC	NR	AF	P_N	g_s	C_i	E	WUE	OLS	ART	DIH	DEO
C1	2,40 ^I	0,12	2,28	1,65 ^S	1,50	0,82	1,63 ^S	0,40	101 ^S	1,80	7,56 ^I	0,09 ^I	252,01	2,25 ^I	0,34 ^S	46,80	0,62	0,08	0,03
C4	2,84 ^S	0,12	2,72 ^S	1,32	1,37	1,22 ^S	1,24	0,50	79 ^I	2,58	20,62 ^S	0,30	254,53	5,50	0,37 ^S	31,29	0,57	0,13	0,04
C5	2,19 ^I	0,08	2,11 ^I	1,21	1,45	0,84	0,81 ^I	0,40	106 ^S	-	-	-	-	-	-	33,08	1,12 ^S	0,27 ^S	0,06 ^S
C10	2,64 ^S	0,08	2,56	1,23	1,50	0,79	1,01	0,50	81	1,69 ^I	16,20	0,25	266,00	5,91	0,27	22,63	0,70	0,28 ^S	0,03
C13	2,19 ^I	0,07	2,12 ^I	1,57 ^S	1,82 ^S	0,61	1,37 ^S	0,50	91	3,21 ^S	17,39	0,43 ^S	295,75 ^S	7,74 ^S	0,22	51,78	0,60	0,11	0,04
C14	2,15 ^I	0,11	2,04 ^I	1,50	1,60	0,73 ^I	1,20	0,40	84	2,22	10,51	0,16	269,48	3,97	0,26	41,60	0,58	0,14	0,03
C16	2,52	0,14	2,38	1,50	1,64	1,08	1,40 ^S	0,40	93	2,44	11,10	0,15	254,73	3,68	0,30	42,40	0,69	0,11	0,05 ^S
C17	2,87 ^S	0,09	2,78 ^S	1,27	1,42	1,24 ^S	1,17	0,50	79 ^I	1,90	10,97	0,20	283,76 ^S	5,61	0,20 ^I	49,41	0,67	0,11	0,05 ^S
C23	2,49	0,14	2,35	1,06	1,40	1,13	0,69 ^I	0,40	95 ^S	-	-	-	-	-	-	47,06	0,58	0,13	0,04
C24	2,59	0,13	2,46	1,14	1,32	1,18	0,84	0,40	78 ^I	-	-	-	-	-	-	33,61	0,66	0,15	0,05 ^S
C26	2,57	0,15	2,42	1,45	1,13 ^I	0,88	1,33 ^S	0,40	91	2,19	18,57	0,27	254,59	6,68	0,28	41,31	0,75	0,12	0,05 ^S
C31	3,00 ^S	0,15	2,85 ^S	0,98 ^I	1,18 ^I	0,83	0,72 ^I	0,50	83	-	-	-	-	-	-	19,51 ^I	0,77	0,11	0,05 ^S
C32	2,59	0,03 ^I	2,56	1,16	1,50	1,05	0,90	0,50	96 ^S	-	-	-	-	-	-	71,23 ^S	0,51 ^I	0,11	0,03
C38	2,21 ^I	0,12	2,09 ^I	1,22	1,50	0,67 ^I	0,81 ^I	0,50	85	-	-	-	-	-	-	40,91	0,66	0,12	0,03
C45	2,92 ^S	0,12	2,80 ^S	1,15	1,50	1,34 ^S	0,97	0,50	70 ^I	-	-	-	-	-	-	16,79 ^I	0,69	0,13	0,04
Média	2,54	0,11	2,43	1,29	1,46	0,96	1,07	0,45	87,47	2,25	14,11	0,23	266,36	5,17	0,28	39,30	0,68	0,14	0,04
Desvio	0,08	0,05	0,26	0,25	0,28	0,21	0,25	0,08	7,43	0,492	4,661	0,104	16,017	1,770	0,057	13,956	0,141	0,057	0,009

Ht: altura da planta (m); Hi: altura de inserção do primeiro par de ramos plagiotrópicos (m); Hd: altura do dossel (m); Di: diâmetro da seção inferior do dossel (m); Dm: diâmetro da seção média do dossel (m); Ds: diâmetro da seção superior do dossel (m); Vc: volume do dossel (m³); DC: diâmetro do caule (cm); NR: número de ramificações; AF: área foliar (cm²); P_N : taxa de assimilação de CO₂ (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹); g_s : condutância estomática (mol H₂O m⁻² s⁻¹); C_i : concentração intracelular de CO₂ (μmol CO₂ mol⁻¹); E : taxa de transpiração (mmol H₂O m⁻² s⁻¹); WUE: eficiência no uso de água (%); OLS: rendimento de óleo essencial (L ha⁻¹); ART: teor de artemisinina (%); DIH: teor de dihidro-epideoxiartemisinina B (%); DEO: teor de deoxiartemisinina (%). (^S) e (^I) valores superiores e inferiores a média mais ou menos um desvio padrão, respectivamente. (-) Caracteres não avaliados para este acesso.

Na Tabela 4, encontram-se os agrupamentos obtidos pelo método de otimização de Tocher utilizando a distância Euclidiana, com base em caracteres agronômicos, fisiológicos e fitoquímicos, nas três variedades avaliadas. A formação desses grupos representa valiosa informação na escolha de genitores dentro dos programas de melhoramento, pois as novas populações híbridas a serem estabelecidas devem ser embasadas na magnitude de suas dissimilaridades e no potencial “*per se*” dos genitores (BERTAN et al., 2006).

Tabela 4 - Agrupamento dos acessos/plantas das variedades Artemis, 2/39x5x3M e 2/39x1V de *Artemisia Annu* L. a partir de caracteres agronômicos, fisiológicos e fitoquímicos, pelo método de agrupamento de Tocher, utilizando a distância Euclidiana como medida de distância genética. UTFPR, Pato Branco - PR, 2010.

CARACTERES AGRONÔMICOS			
ACESSOS			
Grupos	Artemis	2/39x5x3M	2/39x1V
I	A10, A21, A38, A12, A18	B15, B35, B13, B26, B33, B28, B20, B43, B7, B19, B10, B6, B14, B23	C1, C26, C31, C4, C5, C32, C38, C10, C13, C45
II	A9, A28, A4	B24	C14
III	A33, A46, A45		C24
IV	A22, A26		C23
V	A5		C16
VI	A7		C17
CARACTERES FISIOLÓGICOS			
ACESSOS			
Grupos	Artemis	2/39x5x3M	2/39x1V
I	A22, A45, A5, A28, A12, A4, A7	B20, B43, B28, B23	C14, C16, C1, C10, C26, C17, C4
II	A46	B15, B24	C13
III		B35	
IV		B14	
CARACTERES FITOQUÍMICOS			
ACESSOS			
Grupos	2/39x5x3M	2/39x1V	
I	B7, B13, B28, B15, B23, B26, B35, B10, B19	C24, C45, C13, C38, C10	
II	B6, B43, B14	C1, C26, C14	
III	B20, B33	C17, C32, C5	
IV	B24	C4, C31, C16	
V		C23	

Com base nos caracteres agronômicos, observa-se a formação de seis grupos na variedade Artemis, dois grupos na variedade 2/39x5x3M e seis grupos na variedade 2/39x1V (Tabela 4). Na variedade 2/39x5x3M, o grupo II foi formado unicamente pelo acesso B24, em vista o desempenho superior deste acesso para a maioria dos caracteres agronômicos aferidos (Tabela 4).

Quanto aos caracteres fisiológicos foram formados dois grupos na variedade Artemis, quatro grupos na variedade 2/39x5x3M e dois grupos na variedade 2/39x1V (Tabela 4). Na variedade 2/39x5x3M, o grupo III foi formado apenas pelo acesso B35, que apresentou desempenho superior para a maioria dos caracteres fisiológicos avaliados, enquanto que, o grupo IV foi formado apenas pelo acesso B14, cujo desempenho foi inferior para a maioria dos caracteres fisiológicos (Tabela 2).

Em relação aos caracteres fitoquímicos evidencia-se a formação de quatro grupos na variedade 2/39x5x3M e de cinco grupos na variedade 2/39x1V (Tabela 4). Observa-se que em 2/39x5x3M, o grupo IV reuniu unicamente o acesso B24, que conforme verificado anteriormente na Tabela 2, apresentou desempenho superior à média mais um desvio padrão para o rendimento de óleo essencial (OLS).

O método hierárquico UPGMA apresentou resultados similares aos observados pelo método de Tocher. Com base em caracteres agronômicos, o ponto de corte correspondente a dissimilaridade genética média ($d_{gm} = 4,11$) caracterizou a formação de quatro grupos na variedade Artemis (Figura 5A). O grupo I formado por A4 + A7, foi o grupo mais consistente, estando juntos em 100% dos ciclos de *bootstrapping* realizados. O grupo II foi formado por A26 + A45, A33 + A46. O grupo III foi formado apenas por A22, o mais dissimilar dentro da variedade, por apresentar a menor Ht, Hd e Vc. O grupo IV foi subdividido em dois subgrupos, o A formado por A5 + A18 e A9 + A28, e o B formado por A10 + A21, A38 e A12. O coeficiente de correlação cofenética ($r=0,62$), não revelou um bom ajuste entre representação gráfica das distâncias e sua matriz original. Segundo Bertoni et al. (2007), somente valores de correlação cofenética superiores a 0,8 indicam um bom ajuste entre as matrizes originais de distâncias e as distâncias gráficas. No entanto, valores inferiores não significam que o dendrograma não tenha utilidade, apenas indica uma distorção, possibilitando ainda assim a utilização do dendrograma para a avaliação do agrupamento gerado.

Na variedade 2/39x5x3M o ponto de corte ($d_{gm} = 4,02$) evidenciou a formação de três grupos (Figura 5B). O grupo I foi constituído por dois subgrupos, sendo o subgrupo A formado por B6 + B7 e B10 + B19, e o subgrupo B formado por B13 + B26, B15 + B35, B28

+ B33, B14 e B20 + B43. O grupo II foi formado apenas pelo acesso B23 e o grupo III apenas pelo acesso B24, sendo estes os acessos mais dissimilares dentro da variedade. O acesso B23 apresentou a menor Ht, Hd e Vc, enquanto B24 apresentou as médias mais elevadas. Os acessos B6 e B7 constituíram o grupo mais consistente dentro desta variedade, agrupando conjuntamente em 100% das simulações. O coeficiente de correlação cofenética ($r=0,87$), revelou que a representação gráfica foi capaz de representar com confiança a sua matriz original.

No dendrograma obtido na variedade 2/39x1V, o ponto de corte ($d_{gm} = 4,09$) possibilitou a formação de três grupos (Figura 5C). O grupo I foi constituído por dois subgrupos, o A formado por C1 + C16, C14 e C26 e o B constituído por C5 + C38, C23 + C24. O grupo II foi constituído apenas por C13. O terceiro grupo foi formado por C4 + C17, C45, C10 + C32 e C31. Os acessos C13 e C31 são os mais dissimilares dentro desta variedade. O agrupamento formado por C4 + C17 é o mais consistente (100%). O dendrograma não revelou um bom ajuste com sua matriz original ($r=0,67$).

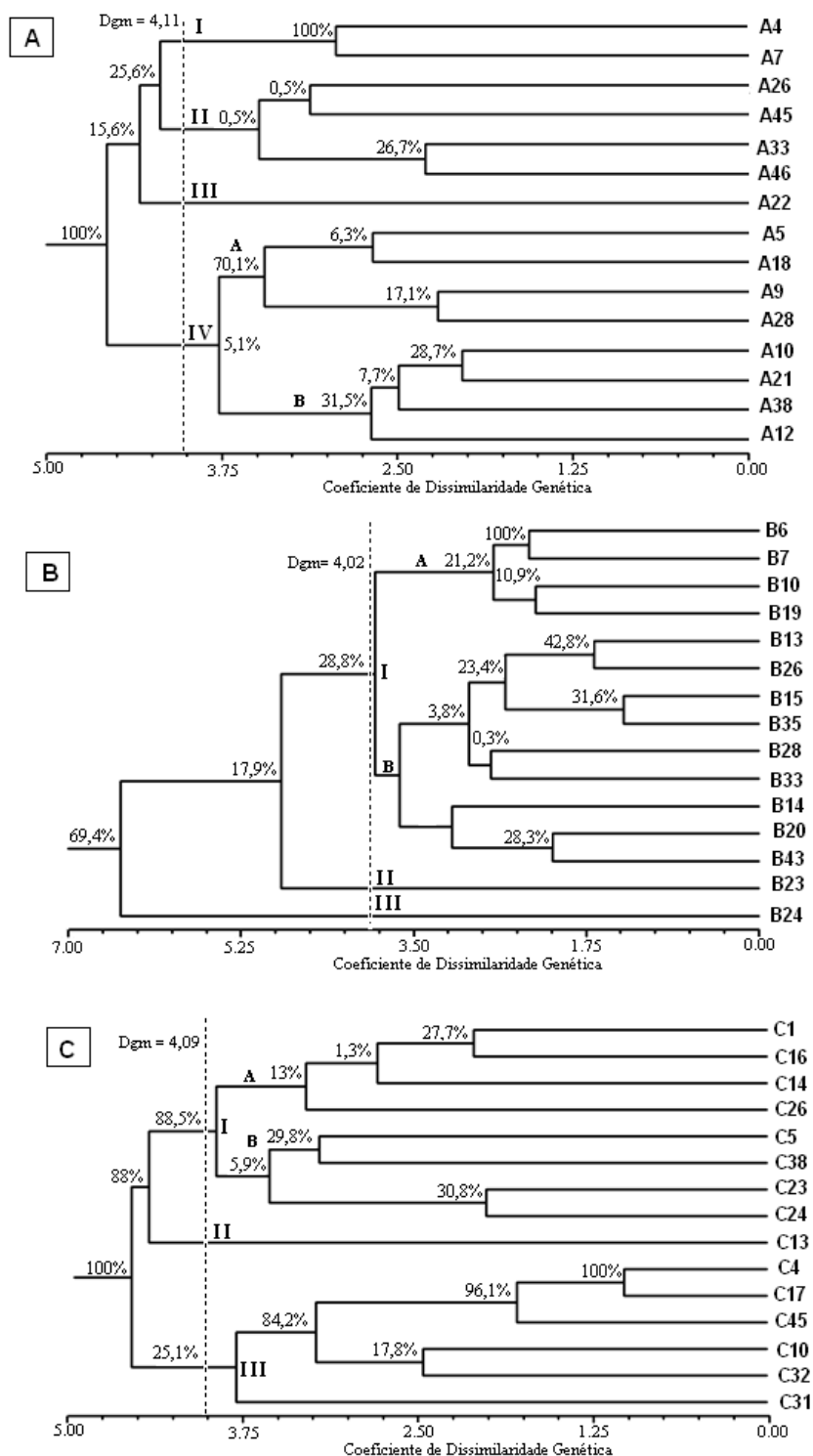


Figura 5 – Dendrogramas resultantes da análise de agrupamento de quinze plantas das variedades Artemis (A), 2/39x5x3M (B) e 2/39x1V (C) de *Artemisia annua* L., a partir de nove caracteres agrônômicos, utilizando a Distância Euclidiana e o método de agrupamento de UPGMA. Os valores encontrados nos grupos indicam o valor percentual de vezes que os genótipos agruparam juntos em 1000 ciclos de *bootstrapping*. Os valores dos coeficientes de correlação cofenética (r) foram de 0,62, 0,87 e 0,67, respectivamente. UTFPR, Pato Branco, 2010.

Quando avaliada a dissimilaridade intervarietal para os mesmos caracteres, observou-se a formação de dois grupos (Figura 6), sendo as variedades 2/39x5x3M e 2/39x1V reunidas em um único grupo e o segundo grupo foi formado apenas pela variedade Artemis, mais dissimilar. O coeficiente de correlação cofenética ($r=0,98$) revelou alta confiabilidade no ajuste entre o dendrograma e sua matriz original. A análise de *bootstrapping* revelou alta consistência interna dos dados, $B + C = 99,4\%$ e $A = 100\%$. A variedade Artemis foi desenvolvida pelo programa de melhoramento da MEDIPLANT na Suíça (DELABAYS; SIMONNET; GAUDIN, 2001), o que possivelmente, justifica a dissimilaridade encontrada para a mesma. Segundo Ferreira et al. (2005) esta variedade tem sido selecionada para biomassa, rendimento de artemisinina e florescimento tardio.

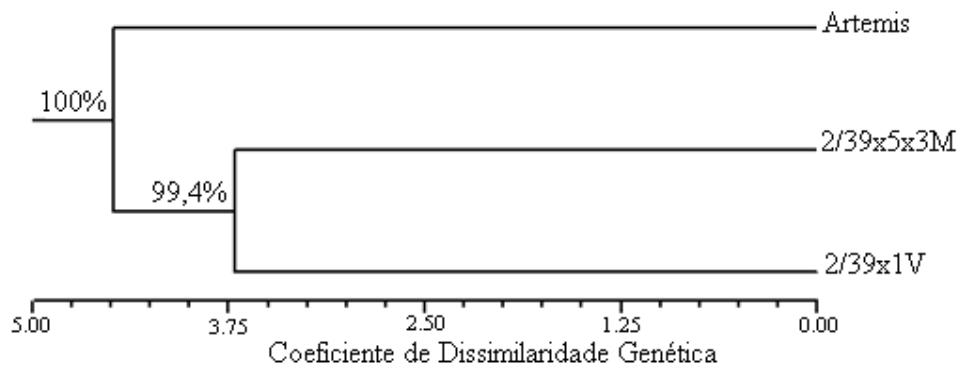


Figura 6- Dendrograma resultante da análise de agrupamento intervarietal das variedades Artemis, 2/39x5x3M e 2/39x1V de *Artemisia annua* L., a partir de nove caracteres agrônômicos, utilizando a Distância Euclidiana e o método de agrupamento de UPGMA. Os valores encontrados nos grupos indicam o valor percentual de vezes que os genótipos agruparam juntos em 1000 ciclos de *bootstrapping*. O valor do coeficiente de correlação cofenética (r) foi de 0,98. UTFPR, Pato Branco, 2010.

O dendrograma gerado na variedade Artemis, a partir de caracteres fisiológicos, caracterizou a formação de dois grupos (Figura 7A) após o ponto de corte ($d_{gm} = 3,22$). O primeiro grupo foi formado por A4, A12 + A 28, A5, A22 + A45, A7. O segundo agrupamento foi formado apenas por A46, o acesso mais dissimilar dentro da variedade, por apresentar a maior AF, menor E e a maior WUE. O primeiro grupo, excetuando-se o acesso A7, foi o mais consistente em 100% dos ciclos. Houve alta confiabilidade no ajuste entre o dendrograma e a matriz original ($r=0,92$).

Após o ponto de corte ($d_{gm} = 3,27$), o dendrograma gerado na variedade 2/39x5x3M evidenciou a formação de três grupos (Figura 7B). O grupo I constituído por B14, B20 + B43 e B23 + B28; o grupo II formado por B15 + B24 e o grupo III formado apenas por B35 o mais dissimilar para estes caracteres, apresentando as maiores P_N e g_s . O agrupamento formado

pelos grupos I e II foi o mais consistente nesta variedade (100%). O coeficiente de correlação cofenética ($r=0,75$), não revelou um bom ajuste entre a representação gráfica das distâncias e a sua matriz original.

Quanto à variedade 2/39x1V o ponto de corte ($d_{gm} = 3,27$) caracterizou a formação de dois grupos (Figura 7C). O grupo I foi subdividido em dois subgrupos, o A formado por C1, C14 + C16 e C17, e o B formado por C4, C10 + C26, sendo este o grupo mais consistente, pois apresentou o mesmo agrupamento em 100% dos ciclos. O grupo II foi constituído apenas por C13, o mais dissimilar, com os maiores valores para os caracteres AF, P_N e g_s . O coeficiente de correlação cofenética ($r=0,79$), revelou um bom ajuste entre a matriz original e sua representação gráfica.

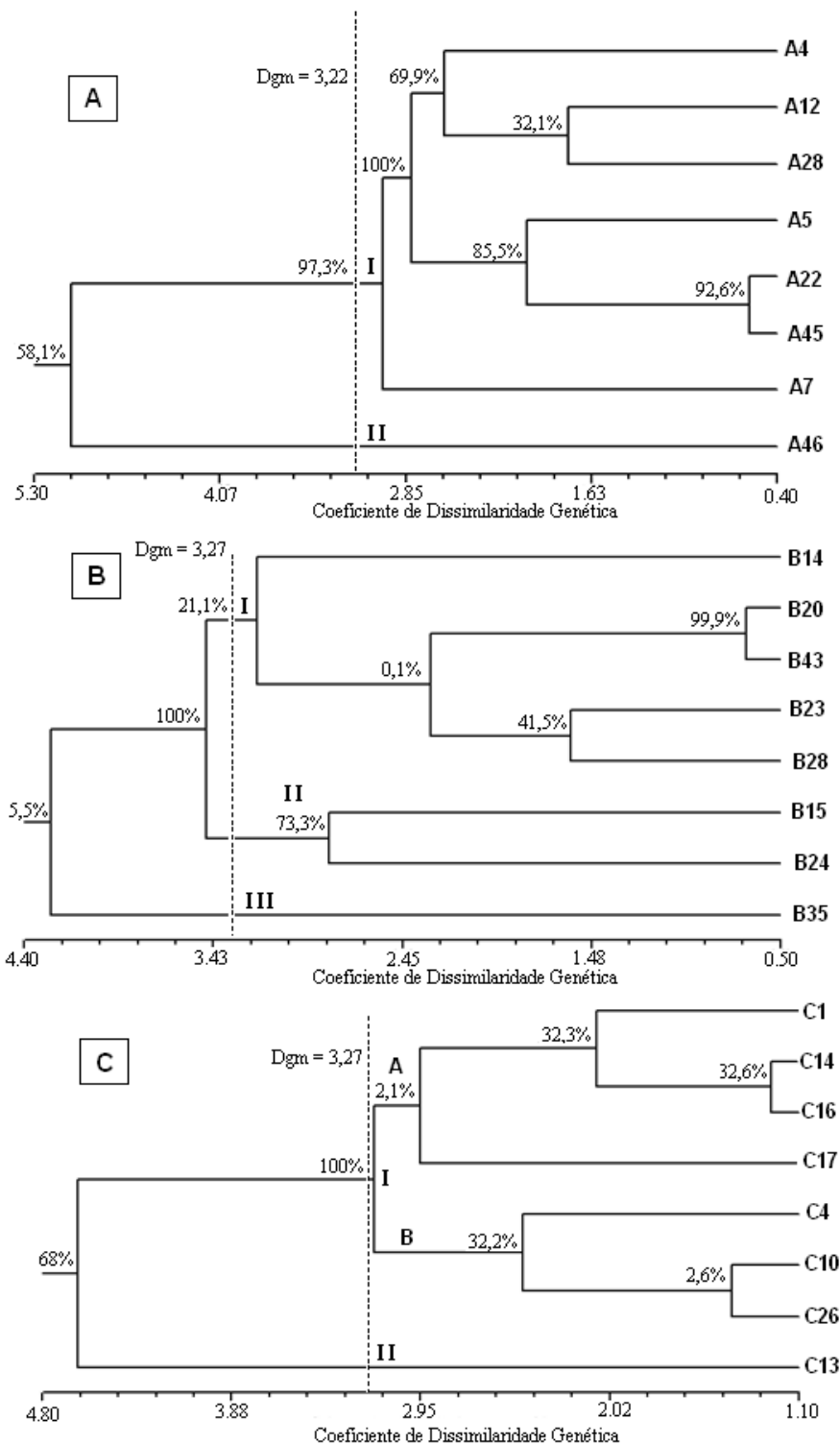


Figura 7 - Dendrogramas resultantes da análise de agrupamento de oito plantas das variedades Artemis (A), 2/39x5x3M (B) e 2/39x1V (C) de *Artemisia annua* L., a partir de seis caracteres fisiológicos, utilizando a Distância Euclidiana e o método de agrupamento de UPGMA. Os valores encontrados nos grupos indicam o valor percentual de vezes que os genótipos agruparam juntos em 1000 ciclos de *bootstrapping*. Os valores dos coeficientes de correlação cofenética (r) foram de 0,92, 0,75 e 0,79, respectivamente. UTFPR, Pato Branco, 2010.

O dendrograma intervarietal revelou que as variedades 2/39x5x3M e 2/39x1V são as mais similares (Figura 8). O coeficiente de correlação cofenética ($r=0,99$), indicou alta confiabilidade no ajuste entre o dendrograma e sua matriz original. A análise de *bootstrapping* indica que as variedades 2/39x5x3M e 2/39x1V agruparam juntas em 89,4% das simulações, enquanto que a variedade Artemis ficou classificada em um grupo distinto deste em 100% das simulações.

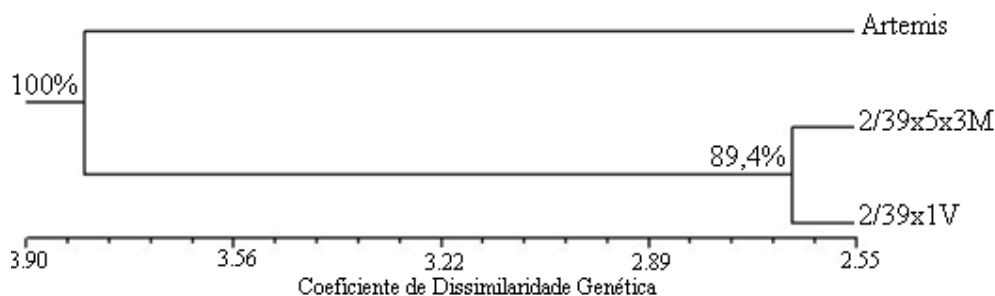


Figura 8 - Dendrograma resultante da análise de agrupamento intervarietal das variedades Artemis, 2/39x5x3M e 2/39x1V de *Artemisia annua* L., a partir de seis caracteres fisiológicos, utilizando a Distância Euclidiana e o método de agrupamento de UPGMA. Os valores encontrados nos grupos indicam o valor percentual de vezes que os genótipos agruparam juntos em 1000 ciclos de *bootstrapping*. O valor do coeficiente de correlação cofenética (r) foi de 0,99. UTFPR, Pato Branco, 2010.

O dendrograma de dissimilaridade entre 15 acessos da variedade 2/39x5x3M, a partir de quatro caracteres fitoquímicos, teve o ponto de corte ($d_{gm} = 2,64$) evidenciando a formação de quatro grupos (Figura 9A). O primeiro grupo foi constituído por B6 + B43 e B19. O segundo grupo foi formado apenas por B24, que apresentou o maior OLS ($71,85 \text{ L ha}^{-1}$). O terceiro grupo por B7 + B13, B15, B23, B26 + B28 e B35. O quarto grupo foi formado por B10 + B33, B14 + B20. O agrupamento mais consistente compreendeu os 4 grupos formados em 100% das simulações. O coeficiente de correlação cofenética ($r=0,71$) não apresentou um bom ajuste entre o dendrograma e a sua matriz original.

O ponto de corte no dendrograma da dissimilaridade da variedade 2/39x1V ($d_{gm} = 2,49$) caracterizou a formação de quatro grupos (Figura 9B), sendo que, o primeiro grupo foi subdividido em dois subgrupos, o subgrupo A formado por C1, C14 + C38 e C4; e o subgrupo B formado por C16 + C26, C17, C24, C31 + C45; o segundo grupo foi formado apenas por C32; o terceiro grupo apenas por C10 e o quarto grupo apenas por C5. Os acessos C32, C10 e C5 foram os mais dissimilares dentro da variedade, para os caracteres fitoquímicos avaliados. O acesso C32 apresentou o maior OLS ($71,23 \text{ L ha}^{-1}$) e o acesso C5 apresentou o maior ART

(1,12%). Segundo Heemskerk et al. (2006) o rendimento de *A. annua* varia de acordo com a variedade plantada e com fatores que interfiram no crescimento da planta, como a altitude, precipitação, umidade, tipo de solo e manejo correto, e de acordo com Delabays, Simonnet e Gaudin (2001), as plantas com mais de 1% de artemisinina devem ser propagadas e usadas em programas de melhoramento, tendo em vista a alta herdabilidade verificada para este caráter (0,98). O agrupamento mais consistente foi formado por C1, C14, C38 e C4, em 100% das simulações. O coeficiente de correlação cofenética ($r=0,90$) representou um bom ajuste entre o dendrograma e matriz original.

A variabilidade genética existente no conteúdo de artemisinina tem sido usada com sucesso em programas de melhoramento buscando aperfeiçoar a produção agrícola da substância. Progressos podem ser esperados pela aplicação do melhoramento clássico, especialmente no desenvolvimento de linhagens híbridas que expressam dominância na variação genética demonstrada pelo conteúdo de artemisinina em *A. annua* (DELABAYS; SIMONNET; GAUDIN, 2001).

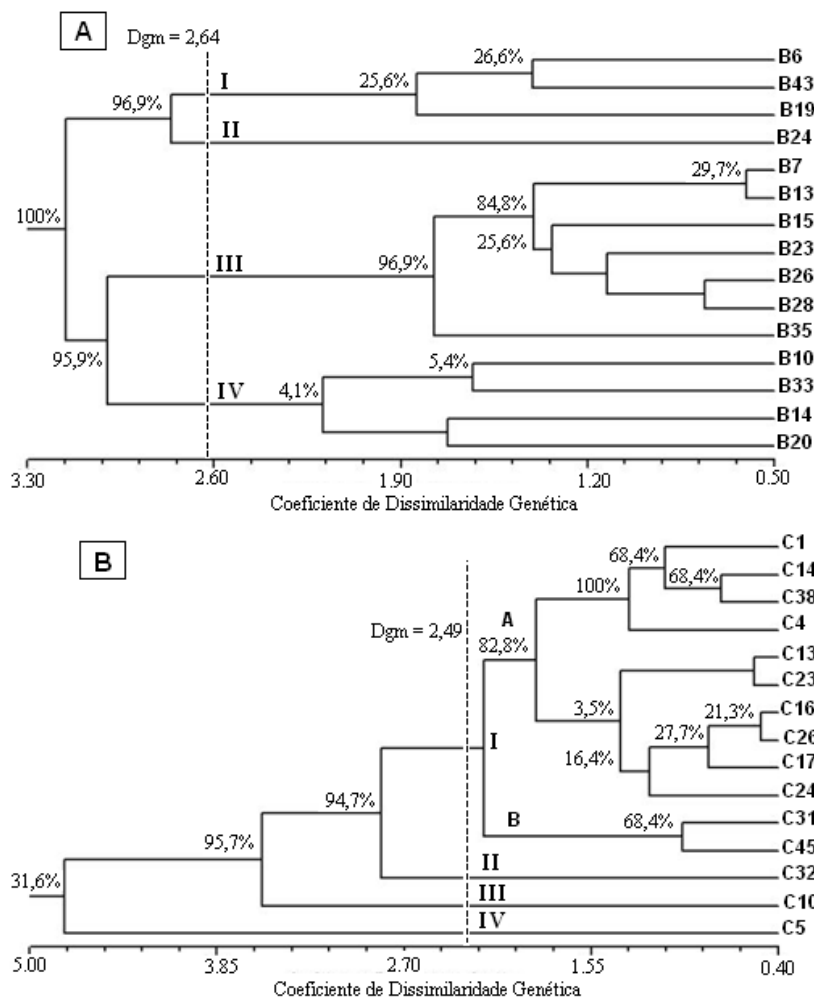


Figura 9 - Dendrogramas resultantes da análise de agrupamento de quinze plantas das variedades 2/39x5x3M (A) e 2/39x1V (B) de *Artemisia annua* L., a partir de quatro caracteres fitoquímicos, utilizando a Distância Euclidiana e o método de agrupamento de UPGMA. Os valores encontrados nos grupos indicam o valor percentual de vezes que os genótipos agruparam juntos em 1000 ciclos de *bootstrapping*. Os valores dos coeficientes de correlação cofenética (r) foram de 0,71 e 0,90, respectivamente. UTFPR, Pato Branco, 2010.

As características com maiores contribuições relativas para a avaliação da dissimilaridade nas variedades de *A. annua*, segundo o método de Singh (1981), foram: número de ramificações (99,4%), concentração intracelular de CO_2 (99,6%) e rendimento de óleo essencial (100%) (Tabela 5). O número de ramificações é um caráter agrônomo de fácil mensuração, sem custo algum e avaliado quando as plantas ainda estão no campo. A variabilidade para o rendimento de óleo essencial também foi encontrada por Holm et al. (1997), onde ele afirma que esta variação vai depender da origem das sementes, do local de cultivo e da época de colheita.

Após serem desconsiderados os caracteres número de ramificações, concentração intracelular de CO₂ e rendimento de óleo essencial, observou-se que houve uma nova distribuição da importância relativa dos caracteres para a dissimilaridade genética nas variedades. Desta forma, os caracteres que mais contribuíram para a dissimilaridade foram o volume do dossel (52,50%), condutância estomática (99,24%) e teor de deoxiartemisinina (93,07%). O volume de dossel é um caráter fácil de ser estimado, a partir da aplicação da equação $V_c = \pi D_i^2 H_d / 12$, em que se utilizam as medidas de altura do dossel e o diâmetro do dossel inferior da planta, enquanto que, a deoxiartemisinina é obtida no mesmo processo de extração de artemisinina.

Os demais caracteres apresentaram pouca ou nenhuma importância relativa e, de acordo com Bertan et al. (2006), as variáveis com estimativas de contribuição relativa de pequena magnitude, não são consistentes na quantificação da dissimilaridade genética, e podem significar pouco progresso genético no melhoramento.

Tabela 5 - Contribuição relativa de caracteres agronômicos, fisiológicos e fitoquímicos, na divergência entre variedades de *Artemisia annua* L. UTFPR, Pato Branco - PR, 2010

CARACTERES AGRONÔMICOS				
VARIÁVEL	S.j.	VALOR %	S.j.	VALOR %
Altura da planta	1,3926	0,0119	0,5370	20,156
Altura de inserção dos ramos	0,497	0,0043	0,0028	0,1058
Altura do dossel	14,3888	0,1234	0,4672	17,5346
Diâmetro da seção inferior do dossel	13,3926	0,1149	0,0469	1,7637
Diâmetro da seção média do dossel	16,4006	0,1407	0,0294	1,1063
Diâmetro da seção superior do dossel	9,336	0,0801	0,1759	6,6023
Volume do dossel	13,0748	0,1122	1,3991	52,5078
Diâmetro do caule	1,44	0,0124	0,0059	0,2235
Número de ramificações	11586	99,4001	-	-
CARACTERES FISIOLÓGICOS				
VARIÁVEL	S.j.	VALOR %	S.j.	VALOR %
Área foliar	1,53816	0,0297	1,5381	0,0695
Taxa de assimilação de CO ₂	11,31673	0,2189	11,3167	0,5116
Condutância estomática	0,21952	0,0042	2195,19	99,2423
Concentração intracelular de CO ₂	5154,204	99,6777	-	-
Taxa de transpiração	3,58649	0,0694	3,5864	0,1621
Eficiência no uso de água	0,003192	0,0001	0,3192	0,0144
CARACTERES FITOQUÍMICOS				
VARIÁVEL	S.j.	VALOR %	S.j.	VALOR %
Rendimento de óleo essencial	1401,724	100	-	-
Teor de artemisinina	0,000044	-	0,000044	6,2778
Teor de dihidro-epideoxiartemisinina B	0,000005	-	0,000005	0,6506
Teor de deoxiartemisinina	0,000007	-	0,000659	93,0716

S.j. = Estimativa da contribuição relativa de cada característica.

A variabilidade genética entre e dentro das variedades é essencial para o estabelecimento do vigor e eficaz conservação das plantas (HASAN; SHAFIE; SHAH, 2009). Assim, em concordância com o método de Tocher, a técnica de agrupamento de UPGMA identificou para os caracteres agronômicos e fitoquímicos o acesso B24, e para os fisiológicos os acessos A46, B14, B35 e C13, como os mais divergentes dentro das variedades.

No entanto, em um programa de melhoramento é necessário que os genitores além de divergentes apresentem médias elevadas para os caracteres alvo de melhoramento (BENIN et al., 2003), que para o presente estudo são, principalmente, rendimento de óleo essencial e teor de artemisinina. Neste sentido, os genitores que mais se ajustaram foram B24, C5 e C32, podendo ser consideradas as hibridações B24 x C5, B24 x C32 e C5 x C32 como as mais promissoras na obtenção de populações segregantes desejadas.

3.4 CONCLUSÕES

Os métodos de Tocher e UPGMA foram concordantes entre si na formação dos grupos possibilitando estimar a variabilidade genética existente entre e dentro das variedades.

Os acessos B24, C5 e C32 são os mais promissores dentro das variedades e devem ser conservados para futuras hibridações.

4 CAPÍTULO II – CORRELAÇÃO ENTRE CARACTERES AGRONÔMICOS, FISIOLÓGICOS E FITOQUÍMICOS EM VARIEDADES DE *Artemisia annua* L.

4.1 INTRODUÇÃO

Artemisia annua L. (Asteraceae) é uma herbácea aromática anual nativa da China e aclimatada no Brasil (MARCHESE; REHDER, 2001; MARCHESE et al., 2005). Suas folhas são fontes de artemisinina, uma lactona sesquiterpênica eficaz contra cepas resistentes de *Plasmodium falciparum* causador da malária cerebral (FERREIRA; JANICK, 1996), além de ser seletivamente citotóxica para células cancerígenas (FERREIRA, 2004; LAI; SINGH, 2006; EFFERTH, 2007; ARSENAULT; WOBBE; WEATHERS, 2008; OH et al., 2009). A espécie também é fonte de óleo essencial, comercialmente utilizado em perfumaria e cosméticos (JAIN et al., 1996; MAGALHÃES; PEREIRA; SARTORATTO, 2004).

Os baixos rendimentos de artemisinina tem sido o fator limitante para seu isolamento em grande escala (CHARLES; SIMON, 1990). Desta forma, os programas de melhoramento *A. annua* buscam selecionar genótipos de florescimento tardio, com elevado conteúdo de artemisinina e alta produção de biomassa foliar, o que possibilitou um incremento na produção de artemisinina de 5 kg ha⁻¹ para 25 kg ha⁻¹ (MAGALHÃES; DELABAYS; SARTORATTO, 1997; MAGALHÃES et al. 1999). Em trabalhos realizados por Magalhães et al. (1999), foi encontrado um rendimento de artemisinina de 21,38 kg ha⁻¹ e a produção de fitomassa foi de 2.056,05 kg ha⁻¹. Já Marchese (2006) encontrou um rendimento de 30,38 kg ha⁻¹ e a produção de fitomassa foi de 3.045,10 kg ha⁻¹. A maior produção de fitomassa encontrada por Marchese (2006) refletiu em maior rendimento de artemisinina por área plantada de *A. annua* e, de acordo com Kumar et al. (2004), aumentar a produção por área plantada é uma forma de melhorar o rendimento deste composto.

Com a crescente demanda nacional e internacional por artemisinina e análogos, a sua produção em escala industrial ser limitada pelos baixos rendimentos e o alto custo de extração e purificação da substância, torna-se necessário identificar caracteres correlacionados com o maior rendimento de biomassa e artemisinina. A existência de caracteres correlacionados pode auxiliar no processo de seleção, buscando diminuir custos em função da facilidade de praticar a seleção sobre o caráter que proporciona a maior praticidade de aferição, o que pode resultar em maior progresso genético. Correlação positiva entre a produção de biomassa e o rendimento de artemisinina foi encontrada por Magalhães (1996) e Marchese (2006), além disso, o teor de artemisinina apresentou correlação direta com a altura da planta, intensidade

de ramificação (LIAO et al., 2009; PAUL et al., 2010), e uma alta correlação (0,987) com a densidade de tricomas (ZHANG; YE; LI, 2006). Com relação ao rendimento de óleo essencial, Marchese e Figueira (2005) relataram que este pode ser correlacionado com a fotossíntese, pois geralmente, a maior produção de óleo está associada à maior radiação e maior taxa fotossintética das plantas.

Neste sentido, o conhecimento da associação entre caracteres é de grande importância no melhoramento de qualquer espécie, principalmente, quando a seleção de um deles apresenta dificuldades, devido à baixa herdabilidade ou problemas na mensuração e identificação (CRUZ; REGAZZI, 2001). Assim, caracteres menos complexos, com maior herdabilidade e correlações elevadas, favorecem a eficiência da seleção auxiliando no melhoramento da espécie (DAROS et al., 2004; NUNES et al., 2008; ALMEIDA; PELUZIO; AFFERRI, 2010). O objetivo deste trabalho foi estimar as correlações existentes entre caracteres agrônômicos, fisiológicos e fitoquímicos em duas variedades de artemísia e identificar correlações que possam ser utilizadas em processos de seleção e melhoramento de *A. annua*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na área experimental do curso de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 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).

Em 13 de julho de 2009 as variedades 2/39x5x3M e 2/39x1V de *A. annua* foram semeadas em grades com 96 tubetes contendo 130 g de substrato orgânico Tecnomax® esterilizado. Utilizou-se 192 tubetes por variedade e estes foram mantidos em estufa plástica sob fotoperíodo de 15 horas para evitar o florescimento das plantas. Nos dias 21 e 24 de setembro de 2009 as mudas receberam aplicação de 1 L de solução nutritiva borrifada nas folhas, cuja as soluções estoques foram preparadas segundo Hoagland e Arnon (1950).

Em 08 de outubro de 2009, quando as plantas atingiram uma altura aproximada de 20 cm, foram transplantadas a campo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo os tratamentos as duas variedades representadas por 8 plantas/acessos para cada. O espaçamento utilizado foi de 1x1 m entre as plantas e de 3 m entre as variedades.

A correção da acidez e a adubação foram realizadas com base em análise química do solo (Apêndice B), seguindo as recomendações da Comissão de Química e Fertilidade do Solo - RS/SC (COMISSÃO..., 2004), para produção de 10 toneladas de grãos de milho por hectare (N: 160 kg ha⁻¹; P: 175 kg ha⁻¹; K: 90 kg ha⁻¹), nas formulações Uréia, Super Fosfato Simples e Cloreto de Potássio. A adubação baseou-se no milho porque a sua produção de massa é semelhante à de *A. annua* e não há uma recomendação específica para esta espécie (PALADINI, 2009). O nitrogênio (N) em cobertura foi parcelado em duas vezes de 28 kg ha⁻¹ durante o ciclo da cultura (16/11/2009 e 16/12/2009) e a adubação realizada em toda área do experimento.

3.2.1 Avaliações agronômicas

No dia 27 de janeiro de 2010 foi feita a primeira seleção das plantas que, visualmente, apresentavam maior porte e maior quantidade de folhas. Nesta etapa foram selecionadas 50 plantas de cada variedade e identificadas com etiquetas de acrílico amarradas no ápice das plantas, sendo que de B1 a B50 variedade 2/39x5x3M e de C1 a C50 variedade 2/39x1V. Quando 50% das plantas selecionadas iniciaram a emissão dos botões florais, fez-se uma segunda seleção visual, dentre as 50 plantas selecionadas inicialmente, de 15 plantas que apresentavam maior altura e maior biomassa foliar em cada variedade para avaliação de caracteres agronômicos.

Os caracteres aferidos foram: altura da planta (Ht, m); altura de inserção do primeiro par de ramos plagiotrópicos (Hi, 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); diâmetro do caule (DC, cm); número de ramificações (NR) e volume do dossel (Vc, m³). O volume do dossel foi estimado pela equação $Vc = \pi Di^2 Hd / 12$, conforme metodologia utilizada por Favarin et al. (2002) para cálculo do dossel em cafeeiro (Anexo A).

3.2.2 Avaliações fisiológicas

As variáveis fisiológicas determinadas foram taxa de assimilação de CO₂ (P_N , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentração intracelular de CO₂ (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$), taxa de transpiração (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e eficiência no uso de água (WUE, %), e, além disso, mensurou-se a área foliar (AF, cm²) para a determinação das demais variáveis.

A avaliação das trocas gasosas foi realizada utilizando-se um sistema de medição de trocas gasosas, equipado com um analisador infravermelho de gases (IRGA) modelo LI-6400XT (LI-COR, Lincoln, Nebraska – USA), com injetor automático de CO₂ e fonte artificial de luz vermelho e azul (Apêndice C-1). As condições microclimáticas na câmara de medidas das amostras foram mantidas constantes nas medições, 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PAR (photosynthetic active radiation/radiação fotossinteticamente ativa), UR $53 \pm 7\%$, 400 ppm de CO₂ e temperatura das folhas em torno de $29,5 \pm 2,8$ °C. A amostragem de oito plantas foi definida devido à dificuldade de realização desta avaliação em um grande número de plantas, em função da fragilidade das folhas de *A. annua* que quando acopladas ao IRGA, se desprendem facilmente dos galhos, interrompendo a mensuração das trocas gasosas. As mensurações iniciaram-se aproximadamente as 10 h da manhã e foram realizadas nas folhas completamente desenvolvidas e sadias do terço médio das plantas. Devido ao formato recortado das folhas de *A. annua* e a necessidade de se estimar a área foliar nas avaliações de trocas gasosas, as folhas foram fotografadas (Apêndice C-2) e o cálculo da área (apenas aquela delimitada na câmara do IRGA) foi feito com o auxílio da ferramenta de cálculo de área do software livre GIMP (GNU Image Manipulation Program).

3.2.3 Avaliações fitoquímicas

No dia 20 de março de 2010, quando mais de 50% das plantas iniciaram o florescimento, foi realizada a colheita. As plantas foram cortadas rente ao solo e colocadas para secar até peso constante em estufa com circulação de ar e temperatura de $\pm 35^\circ\text{C}$. Após secagem, as folhas foram segregadas dos caules para realização das análises fitoquímicas.

Os caracteres fitoquímicos avaliados foram: rendimento de óleo essencial (OLS, L ha⁻¹), teor de artemisinina (ART, %), teor de dihidro-epideoxiartenuína B (DIH, %) e teor de deoxiartemisinina (DEO, %).

3.2.3.1 Rendimento de óleo essencial

A extração do óleo essencial foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Primeiramente, 150 g de massa seca de folhas de cada acesso das variedades 2/39x5x3M e 2/39x1V de *A. annua* foram transferidas para um balão de 2 L contendo 1,5 L de água destilada, acoplado a um sistema Clevenger (Apêndice D-1), onde procedeu-se a hidrodestilação durante 1 h e 30 min após o

início da condensação. Depois de aferir o volume de óleo extraído (Apêndice D-2), este foi armazenado hermeticamente em vidros âmbar em geladeira a 4°C.

3.2.3.2 Teor de artemisinina e análogos

As análises de artemisinina e análogos procederam-se na Divisão de Fitoquímica do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA/UNICAMP). Os extratos foram obtidos a partir de 0,250 g de folhas secas e moídas extraídas com 5 mL de diclorometano por 2 minutos em Ultra Turrax (Marca Quimis modelo Q-252, São Paulo, Brasil) (Apêndice E-1), e em seguida, 2 x 5 mL de metanol, por 3 minutos e 6000 rpm à temperatura ambiente. O extrato foi filtrado a vácuo em funil de placa porosa com papel de filtro e evaporado a secura em rotaevaporador (Marca Büchi modelo R2, Flawil, Switzerland) (Apêndice E-2).

Na etapa de purificação do extrato, cartuchos de Florisil® (Strata 8B-So13-hCh, Phenomenex, Califórnia, USA), foram completados com mais 5 g de Florisil® FX 0284-1 (60-100 Mesh) e depois de conectados ao sistema de extração a vácuo (Manifold) (J. T. Baker, New Jersey, USA) foram condicionados com 10 mL de hexano (Apêndice E-3). Em seguida, introduziu-se o extrato dissolvido em 2 mL de hexano, eluindo com 3 mL de hexano e 60 mL de diclorometano, coletando as frações separadamente. A fração de diclorometano foi evaporada à secura sob vácuo em evaporador rotativo e ressuspensa em balão volumétrico de 5 mL com metanol grau CLAE. As amostras foram 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 (Massachusetts, USA), 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 Empower pro build 1154/Waters. Utilizou-se coluna com fase estacionária ciano, Luna CN 5 µm 250 x 4,6 mm (Phenomenex, Califórnia, USA); 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 et al. (2009), a partir do método do padrão externo. As curvas de calibração e os dados da curva analítica encontram-se no Anexo B.

3.2.4 Análises dos dados

A relação existente entre os caracteres estudados foi estimada através do coeficiente de correlação de Pearson e o nível de significância pelo teste t, com o auxílio do software GENES (CRUZ, 2001).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando avaliadas as correlações entre caracteres agronômicos, fisiológicos e fitoquímicos na variedade 2/39x5x3M (Tabela 6), observou-se correlação positiva e significativa entre os caracteres altura da planta (Ht) e altura do dossel (Hd); entre diâmetro da seção inferior do dossel (Di) e os caracteres diâmetro da seção média do dossel (Dm), volume do dossel (Vc) e rendimento de óleo essencial (OLS); entre diâmetro da seção média do dossel (Dm) e os caracteres volume de dossel (Vc) e rendimento de óleo essencial (OLS); entre volume de dossel (Vc) e os caracteres número de ramificações (NR) e rendimento de óleo essencial (OLS); entre taxa de assimilação de CO₂ (P_N) e os caracteres condutância estomática (g_s) e taxa de transpiração (E); e entre condutância estomática (g_s) e taxa de transpiração (E).

De acordo com Favarin et al. (2002) o volume do dossel (Vc) apresenta associação positiva com o índice de área foliar (IAF) em cafeeiro que apresenta arquitetura cônica, similar a de *A. annua*. O IAF é um dos parâmetros biofísicos mais importantes do dossel, por caracterizar sua arquitetura e estar relacionada com a biomassa vegetal (LINHARES; PONZONI; SHIMABUKURO, 2000). Contudo, admite-se que o caráter Vc pode ser utilizado como estimativa da biomassa por planta em *A. annua*, e neste estudo apresentou correlação positiva e significativa com OLS ($r=0,94^{**}$) (Tabela 6), indicando que quanto maior o volume de dossel (biomassa) maior o rendimento de óleo essencial. A correlação positiva existente entre produção de biomassa e óleo essencial também tem sido relatada por vários autores (MARCHESE; FIGUEIRA, 2005; MARCHESE et al., 2005; NALEPA; CARVALHO, 2007; MATTANA et al., 2010).

A correlação positiva e significativa encontrada entre NR e Vc ($r=0,72^*$), indica que o caráter número de ramificações é eficiente na seleção de plantas com maior volume de dossel, o que também podem significar ganhos na produção de óleo essencial, pelo fato destes dois caracteres estarem altamente correlacionados, conforme discutido anteriormente.

Quanto às correlações positivas e significativas encontradas entre os caracteres fisiológicos P_N e g_s ($r=0,80^*$); P_N e E ($r=0,84^{**}$) e g_s e E ($r=0,99^{**}$), evidencia-se que quanto

maior a condutância estomática maior a assimilação de CO₂, e maior também será a taxa de transpiração, o que já era esperado.

Os caracteres que apresentaram correlações negativas indicam que o aumento de uma variável conduz a diminuição da outra (CARVALHO; LORENCETTI; BENIN, 2004). O Vc apresentou correlação negativa e significativa com ART ($r=-0,72^*$), indicando que quanto maior o volume de dossel menor a produção de artemisinina. Resultados similares foram encontrados por Magalhães et al. (2006) onde a biomassa apresentou correlação negativa ($r= -0,99$) com o teor de artemisinina, sugerindo que plantas com menor biomassa apresentam maior teor de artemisinina. Vaz et al. (2006) também encontraram correlação negativa entre a produção de biomassa e os teores de artemisinina. Esses resultados estão de acordo com Marchese e Figueira (2005) e Marchese et al. (2010), os quais relatam que plantas que priorizam o metabolismo primário (produção de biomassa, p.ex.) o fazem em detrimento do metabolismo secundário (teor de artemisinina, p.ex.). Em contrapartida, Shukla et al. (1992) encontraram correlação positiva ($r=0,67$) entre o rendimento de artemisinina e a produção de folhas (biomassa).

Evidenciou-se correlação negativa e significativa entre NR e ART ($r=-0,72^*$), indicando que quanto maior o número de ramificações menor o teor de artemisinina. Esse resultado se justifica pela não existência de artemisinina nas ramificações, além de existirem compostos graxos nestas, que dificultam a extração da substância (FOGLIO, 1996; MAGALHÃES; DELABAYS; SARTORATTO, 1997; RODRIGUES et al., 2006).

Ainda na Tabela 6, encontrou-se correlação negativa entre os caracteres fitoquímicos OLS e ART ($r=-0,65$), a qual mesmo não sendo significativa, devido ao baixo grau de liberdade, indica uma tendência de que quanto maior o rendimento de óleo essencial menor o de artemisinina. Resultados similares foram apresentados por Wallart, Pras e Quax (1999) ao estudarem plantas tetraplóides de *A. annua*, e verificarem que os níveis de sesquiterpenos (artemisinina) foram aumentados enquanto os níveis de monoterpenos (óleo essencial) decresceram, indicando uma correlação recíproca inversa entre estes dois caracteres.

Tabela 6 - Coeficientes de correlação fenotípica entre caracteres agrônômicos, fisiológicos e fitoquímicos avaliados na variedade 2/39x5x3M de *Artemisia annua* L. UTFPR, Pato Branco – PR, 2010.

Caracteres	Ht	Hi	Hd	Di	Dm	Ds	Vc	DC	NR	AF	P_N	g_s	C_i	E	WUE	OLS	ART	DIH
Hi	0,07																	
Hd	1,00**	0,03																
Di	-0,17	-0,41	-0,15															
Dm	0,21	-0,27	0,22	0,82*														
Ds	0,30	-0,29	0,32	0,43	0,15													
Vc	0,31	-0,38	0,32	0,88**	0,90**	0,53												
DC	-0,46	0,10	-0,46	-0,21	-0,45	-0,24	-0,47											
NR	0,16	-0,12	0,16	0,62	0,54	0,58	0,72*	-0,73*										
AF	0,50	0,30	0,49	0,05	0,39	-0,15	0,25	-0,40	0,01									
P_N	-0,67	-0,32	-0,66	-0,02	-0,30	-0,32	-0,33	0,13	-0,15	-0,18								
g_s	-0,41	-0,40	-0,39	0,05	-0,21	0,00	-0,09	-0,25	0,32	-0,37	0,80*							
C_i	0,19	0,06	0,18	-0,07	-0,17	0,48	0,09	-0,54	0,69	-0,37	-0,11	0,46						
E	-0,42	-0,40	-0,41	-0,02	-0,28	-0,05	-0,17	-0,16	0,21	-0,38	0,84**	0,99**	0,40					
WUE	-0,15	-0,04	-0,15	0,14	0,25	-0,41	-0,01	0,48	-0,62	0,37	-0,04	-0,58	-0,98**	-0,54				
OLS	0,36	-0,25	0,37	0,81*	0,91**	0,46	0,94**	-0,56	0,64	0,48	-0,38	-0,25	-0,04	-0,34	0,14			
ART	-0,42	-0,26	-0,41	-0,53	-0,59	-0,41	-0,72*	0,43	-0,72*	-0,40	0,39	0,11	-0,30	0,18	0,28	-0,65		
DIH	0,49	-0,43	0,51	0,01	0,31	0,09	0,22	-0,36	-0,14	0,43	-0,28	-0,36	-0,30	-0,37	0,38	0,42	0,25	
DEO	-0,82*	-0,01	-0,83*	-0,18	-0,41	-0,39	-0,51	0,29	-0,14	-0,71*	0,51	0,47	0,16	0,48	-0,17	-0,59	0,57	-0,46

Ht: altura da planta; Hi: altura de inserção do primeiro par de ramos plagiotrópicos; Hd: altura do dossel; Di: diâmetro da seção inferior do dossel; Dm: diâmetro da seção média do dossel; Ds: diâmetro da seção superior do dossel; DC: diâmetro do caule; NR: número de ramificações; Vc: volume do dossel, ⁽²⁾AF: área foliar; P_N : taxa de assimilação de CO₂; g_s : condutância estomática; C_i : concentração intracelular de CO₂; E : taxa de transpiração; WUE: eficiência no uso de água, ⁽³⁾OLS: rendimento de óleo essencial; ART: teor de artemisinina; DIH: teor de dihidro-epideoxiartenuína B; DEO: teor de deoxiartemisinina. ** e *, significativo ao nível de 1 e 5% de probabilidade pelo teste t.

Na variedade 2/39x1V (Tabela 7) evidenciou-se correlação positiva e significativa entre o caráter Ht e os caracteres Hd e Ds; entre Hd e Ds; entre o caráter Di e os caracteres Vc e NR; entre Vc e NR; entre g_s e os caracteres AF e P_N ; e entre o caráter E e os caracteres P_N e g_s . Estes resultados foram similares aos verificados para a variedade 2/39x5x3M (Tabela 6). Desta forma, observa-se que várias correlações se confirmaram nas duas variedades, pois assim como em 2/39x5x3M encontrou-se correlação positiva e significativa entre NR e Vc ($r=0,90^*$), indicando que o caráter número de ramificações é eficiente na seleção de plantas com maior volume de dossel. Outra correlação positiva e significativa encontrada nas duas variedades foi entre os caracteres fisiológicos P_N e g_s ($r=0,82^*$); P_N e E ($r=0,79^*$) e g_s e E ($r=0,92^{**}$).

Entretanto, na variedade 2/39x1V (Tabela 7) não foi evidenciada correlação positiva e significativa entre nenhum dos caracteres fitoquímicos (OLS, ART, DEO e DIH) e os caracteres agrônômicos. Resultados similares foram encontrados por Jain et al. (1996) e os permitiram concluir que a síntese e acúmulo de artemisinina são independentes do efeito de características métricas como altura de planta, diâmetro do caule e produção de matéria seca. Em contrapartida, Paul et al. (2010) encontraram correlação positiva entre o teor de artemisinina com altura de planta e com a intensidade de ramificações, assim como Liao et al. (2009) que sugerem que plantas mais altas, com caules espessos e moderado número de ramificações devem ser selecionadas para a criação de uma nova variedade de *A. annua* com alto teor e rendimento de artemisinina.

Nas condições deste trabalho, os resultados permitem inferir que se o melhoramento de *A. annua* visar à obtenção de óleo essencial, deve-se selecionar plantas com maior volume de dossel e conseqüentemente se terá ganhos no rendimento desta substância. No entanto, se o interesse for teor de artemisinina, deve-se selecionar plantas com menor volume de dossel e menor número de ramificações, e, por conseguinte, se irá obter maiores teores de artemisinina. Porém, deve-se ressaltar que o aumento na produção do princípio ativo, neste caso, é feito em detrimento do metabolismo primário, gerando uma redução na produção de biomassa e em função disso, o rendimento de artemisinina por área plantada deverá ser menor.

Tabela 7 - Coeficientes de correlação fenotípica entre caracteres agrônômicos, fisiológicos e fitoquímicos avaliados na variedade 2/39x1V de *Artemisia annua* L. UTFPR, Pato Branco – PR, 2010.

Caracteres	Ht	Hi	Hd	Di	Dm	Ds	Vc	DC	NR	AF	P_N	g_s	C_i	E	WUE	OLS	ART	DIH
Hi	0,12																	
Hd	0,99**	0,02																
Di	-0,76*	0,26	-0,79*															
Dm	-0,60	-0,57	-0,55	0,38														
Ds	0,86**	0,33	0,83*	-0,52	-0,44													
Vc	-0,35	0,43	-0,40	0,87**	0,12	-0,14												
DC	0,45	-0,76*	0,53	-0,64	0,16	0,20	-0,56											
NR	-0,53	0,37	-0,57	0,88**	0,18	-0,42	0,90**	-0,66										
AF	-0,36	-0,13	-0,35	0,34	0,48	-0,19	0,20	0,20	0,07									
P_N	0,29	-0,05	0,29	-0,41	-0,30	0,04	-0,39	0,50	-0,42	0,46								
g_s	-0,03	-0,44	0,02	-0,17	0,15	-0,23	-0,27	0,64	-0,29	0,72*	0,82*							
C_i	-0,25	-0,82*	-0,16	-0,08	0,55	-0,29	-0,29	0,58	-0,28	0,42	0,06	0,56						
E	0,11	-0,41	0,16	-0,38	-0,06	-0,15	-0,46	0,62	-0,41	0,48	0,79*	0,92**	0,59					
WUE	0,16	0,54	0,10	0,15	-0,26	0,22	0,34	-0,26	0,22	-0,05	0,16	-0,24	-0,82*	-0,47				
OLS	-0,38	-0,02	-0,38	0,63	0,30	-0,11	0,61	-0,24	0,47	0,36	-0,43	-0,01	0,45	-0,04	-0,46			
ART	0,32	0,33	0,29	-0,27	-0,49	0,10	-0,14	-0,21	0,12	-0,42	0,06	-0,12	-0,22	0,19	-0,26	-0,15		
DIH	0,16	-0,41	0,20	-0,65	-0,02	-0,20	-0,78*	0,40	-0,52	-0,37	0,30	0,14	0,02	0,25	-0,05	-0,83*	0,22	
DEO	0,37	0,43	0,33	-0,06	-0,27	0,47	0,17	-0,11	0,13	0,21	0,14	0,11	-0,03	0,26	-0,23	0,34	0,62	-0,41

Ht: altura da planta; Hi: altura de inserção do primeiro par de ramos plagiotrópicos; Hd: altura do dossel; Di: diâmetro da seção inferior do dossel; Dm: diâmetro da seção média do dossel; Ds: diâmetro da seção superior do dossel; DC: diâmetro do caule; NR: número de ramificações; Vc: volume do dossel, ⁽²⁾AF: área foliar; P_N : taxa de assimilação de CO₂; g_s : condutância estomática; C_i : concentração intracelular de CO₂; E : taxa de transpiração; WUE: eficiência no uso de água, ⁽³⁾OLS: rendimento de óleo essencial; ART: teor de artemisinina; DIH: teor de dihidro-epideoxiartenuína B; DEO: teor de deoxiartemisinina. ** e *, significativo ao nível de 1 e 5% de probabilidade pelo teste t.

4.4 CONCLUSÕES

A seleção de plantas com maior volume de dossel na variedade 2/39x5x3M possibilitaria a seleção indireta para o caráter rendimento de óleo essencial.

O caráter volume de dossel não foi eficiente na seleção de plantas com maior rendimento de óleo essencial na variedade 2/39x1V.

Em ambas as variedades, se o interesse do melhoramento for maior teor de artemisinina deve-se evitar a seleção de plantas com grande volume de dossel e número de ramificações.

5 CAPÍTULO III – CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE VARIEDADES DE *Artemisia annua* L.

5.1 INTRODUÇÃO

Artemisia annua L. é uma herbácea anual altamente aromática, pertencente a família Asteraceae, nativa da China e aclimatada no Brasil (MARCHESE; REHDER, 2001, MARCHESE et al., 2002). Suas folhas e inflorescências são fontes a partir das quais se extrai a artemisinina, uma lactona sesquiterpênica utilizada no preparo de drogas para o tratamento da malária (FERREIRA; JANICK, 1996; MARCHESE; REHDER, 2001; MARCHESE et al., 2005) e câncer (FERREIRA, 2004; LAI; SINGH, 2006; EFFERTH, 2007; ARSENAULT; WOBBE; WEATHERS, 2008; OH et al., 2009). As plantas de *A. annua* também são uma rica fonte de óleo essencial que é comercialmente utilizado em perfumaria e cosméticos, além de apresentar uma forte ação inseticida (JAIN et al., 1996; BAGCHI et al., 2003). A aplicação do óleo na perfumaria prevê um mercado adicional para a espécie (WOERDENBAG et al. 1994), de modo que na Índia o óleo vem sendo utilizado para este fim (MAGALHÃES; PEREIRA; SARTORATTO, 2004).

Com aroma adocicado muito característico (WOERDENBAG et al., 1994) o óleo de *A. annua* apresenta como componentes principais monoterpênicos e sesquiterpênicos (MA et al., 2007) que são biossintetizados nos tricomas glandulares (TELLEZ et al., 1999; OLSSON et al., 2009; POLICHUK et al., 2010). Aspectos qualitativos e quantitativos do óleo têm sido amplamente estudados, mostrando que a proporção dos principais componentes varia para diferentes ecótipos (WOERDENBAG et al., 1994; POLICHUK et al., 2010) em função de diferentes locais de plantio, condições climáticas e até mesmo pela parte da planta que é utilizada (QUISPE-CONDORI et al., 2005). Outro fator fundamental a ser considerado no estudo da variabilidade do teor e da composição do óleo essencial de *A. annua*, é a diferença genotípica.

Vários relatos sugerem que o rendimento de óleo essencial de *A. annua* varia entre 0,02% e 0,49% na massa fresca e de 0,04% a 1,9% na massa seca (BAGCHI et al., 2003). Woerdenbag et al. (1993) verificaram que o teor do óleo essencial de *A. annua* de variedade proveniente da China foi de aproximadamente 4,0% na massa seca e é constituído principalmente por artemísia cetona (63,9%), álcool artemísia (7,5%), mirceno (5,1%), α -guaíeno (4,7%) e cânfora (3,3%). Já outra variedade de origem vietnamita apresentou um teor de aproximadamente 1,4% na massa seca e seus componentes principais foram

cânfora (21,8%), germacreno-D (18,3%), α -cariofileno (5,6%), trans- α -farneseno (3,8%) e 1,8 cineol (3,1%). Segundo Holm et al. (1997) foram identificados cerca de 60 componentes no óleo de *A. annua*, sendo a artemísia cetona, cânfora, germacreno-D e 1,8 cineol os componentes majoritários.

Com a tendência crescente do uso de óleos voláteis em indústrias alimentícias, de bebidas, farmacêuticas e cosméticas, o conhecimento dos constituintes do óleo de *A. annua* de diferentes variedades são muito importantes. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o teor, o rendimento e a composição do óleo essencial de duas variedades de *A. annua*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na área experimental do curso de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 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 Distroférrico Úmbrico, textura argilosa, álico, fase floresta subtropical perenifólia, relevo ondulado (BHERING et al., 2008).

Em 13 de julho de 2009 as variedades 2/39x5x3M e 2/39x1V de *A. annua* foram semeadas em grades com 96 tubetes contendo 130 g de substrato orgânico Tecnomax® esterilizado. Utilizou-se 192 tubetes por variedade e estes foram mantidos em estufa plástica sob fotoperíodo de 15 horas para evitar o florescimento das plantas. Nos dias 21 e 24 de setembro de 2009 as mudas receberam aplicação de 1 L de solução nutritiva borrifada nas folhas, cuja as soluções estoques foram preparadas segundo Hoagland e Arnon (1950).

Em 08 de outubro de 2009, quando as plantas atingiram uma altura aproximada de 20 cm, foram transplantadas a campo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo os tratamentos as duas variedades representadas por 15 plantas/acessos para cada. O espaçamento utilizado foi de 1x1 m entre as plantas e de 3 m entre as variedades.

A correção da acidez e a adubação foram realizadas com base em análise química do solo (Apêndice B), seguindo as recomendações da Comissão de Química e Fertilidade do Solo - RS/SC (COMISSÃO..., 2004), para produção de 10 toneladas de grãos de milho por hectare (N: 160 kg ha⁻¹; P: 175 kg ha⁻¹; K: 90 kg ha⁻¹), nas formulações Uréia, Super Fosfato Simples e Cloreto de Potássio. A adubação baseou-se no milho porque a sua produção de massa é semelhante à de *A. annua* e não há uma recomendação específica para esta espécie (PALADINI, 2009). O nitrogênio (N) em cobertura foi parcelado em duas vezes de 28 kg ha⁻¹

durante o ciclo da cultura (16/11/2009 e 16/12/2009) e a adubação realizada em toda área do experimento.

Inicialmente foram selecionadas 50 plantas e identificadas com etiquetas de acrílico amarradas ao ápice, sendo as plantas da variedade 2/39x5x3M identificadas de B1 a B50 e as plantas da variedade 2/39x1V de C1 a C50. Destas, foram selecionadas as 15 plantas de cada variedade, que visualmente, apresentavam maior altura e maior quantidade de folhas para serem submetidas às avaliações.

No dia 20 de março de 2010, quando mais de 50% das plantas iniciaram o florescimento, foi realizada a colheita. As plantas foram cortadas rente ao solo e colocadas para secar até peso constante em estufa com circulação de ar e temperatura de $\pm 35^{\circ}\text{C}$. Após secagem, as folhas foram segregadas dos caules e pesadas para aferir a massa seca de folhas, que em seguida foi convertida em kg ha^{-1} .

A extração do óleo essencial foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Primeiramente, 150 g de massa seca de folhas de cada acesso das variedades 2/39x5x3M e 2/39x1V de *A. annua* foram transferidas para um balão de 2 L contendo 1,5 L de água destilada, acoplado a um sistema Clevenger (Apêndice D-1), onde procedeu-se a hidrodestilação durante 1 h e 30 min após o início da condensação. Depois de aferir o volume de óleo extraído (Apêndice D-2), este foi armazenado hermeticamente em vidros âmbar em geladeira a 4°C . O volume aferido foi convertido em L ha^{-1} com base na massa seca obtida em cada planta, e em teor (%) com base na densidade média do óleo de *A. annua* (0,89 g).

Análises posteriores foram conduzidas no Laboratório de Fitoquímica do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). A separação e quantificação (método de normalização de área) das substâncias presentes no óleo essencial foram realizadas em cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (CG-DIC, Shimadzu, GC-2010). Coluna capilar: DB-5 (J&W Scientific; 30,0m x 0,25mm x 0,25 μm). A identificação das substâncias foi realizada em cromatógrafo à gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000), operando por impacto de elétrons (70eV); Coluna capilar: OV-5 (Ohio Valley Specialty Chemical, Inc.; 30,0m x 0,25mm x 0,25 μm), e foi efetuada através da comparação dos seus espectros de massas com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist. 62 lib.) e padrão autêntico de linalol (Sigma-Aldrich; 95%) e índice de retenção de Kovats (ADAMS, 1995). Os índices de retenção das substâncias foram obtidos em comparação com uma mistura padrão de hidrocarbonetos ($\text{C}_9\text{-C}_{24}$), aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (1963).

Na análise dos resultados, os teores dos constituintes químicos do óleo essencial, a massa seca de folhas (MSF), o teor e o rendimento do óleo (OLS) de *A. annua* de todos os acessos, foram classificados como superiores ou inferiores, sendo superiores aqueles acessos que apresentaram média superior à média geral mais o desvio padrão e inferiores aqueles que apresentaram média inferior a média geral menos o desvio padrão.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na variedade 2/39x5x3M (Tabela 8) os acessos B14, B15, B23, B33 e B43 se mostraram superiores à média mais um desvio padrão para a maioria dos constituintes químicos encontrados, além destes, o acesso B24 apresentou médias superiores para os parâmetros massa secas de folhas (MSF), teor e rendimento de óleo essencial (OLS). Na Tabela 9, observou-se que na variedade 2/39x1V os acessos que se mostraram superiores a média mais um desvio padrão para a maioria dos componentes foram C1, C4, C5, C13, C14 e C23. Quanto aos parâmetros MSF, Teor e OLS constatou-se que os acessos C31 e C45 se mostraram inferiores a média menos um desvio padrão.

Além disso, pode-se observar que o rendimento de óleo essencial, calculado com base na MSF, variou de 7,64 L ha⁻¹ (B35) a 71,85 L ha⁻¹ (B24) dentro da variedade 2/39x5x3M, enquanto que o teor de óleo variou de 1,59% (B35) a 7,8% (B23). Na variedade 2/39x1V (Tabela 9) o rendimento variou de 16,79 L ha⁻¹ (C45) a 71,23 (C32) L ha⁻¹ e o teor de 3,66% (C45) a 7% (C23). Os teores de óleo essencial de *A. annua* registrados neste trabalho foram superiores aos reportados por Woerdenbag et al. (1993), no máximo 4,0%.

A densidade de plantio utilizada neste trabalho foi de 10.000 plantas ha⁻¹ e, de acordo com Simon et al. (1990), se o interesse for o rendimento de óleo, o aumento da densidade tende a aumentar sua produção, pois o maior rendimento observado foi de 85 kg ha⁻¹, obtido pela densidade intermediária de 55.555 plantas ha⁻¹. Entretanto, é importante ressaltar que um aumento na concentração ou teor de compostos secundários sob condições de estresse, p. ex. deficiência nutricional, não significa necessariamente um aumento no rendimento destes compostos por área cultivada, pois geralmente ocorre uma redução da fitomassa em face da concorrência por assimilados entre o metabolismo secundário e o metabolismo primário, podendo afetar o rendimento da substância de interesse (MARCHESE, 1999; MARCHESE; FIGUEIRA, 2005). O que está de acordo com os resultados encontrados neste trabalho, observando-se que em ambas as variedades o maior rendimento de óleo

essencial não foi condicionado às plantas com maior teor, mas sim, as que apresentaram maior massa seca de folhas (Tabelas 8 e 9).

A composição do óleo essencial obtido na variedade 2/39x5x3M de *A. annua* está apresentada na Tabela 8. Foram identificados 14 componentes que representaram, em média, 83,11% da composição total do óleo. Os principais componentes encontrados nesta população foram cânfora (42,01%), γ -muuroleno (9,59%), 1,8 cineol (9,19%) e trans-cariofileno (5,38%). Na variedade 2/39x1V (Tabela 9) foram identificados 20 componentes representando, em média, 88,01% da composição total do óleo. Os componentes majoritários foram os mesmos que na variedade 2/39x5x3M, porém em quantidades diferentes. A cânfora esteve presente em 45,8%, γ -muuroleno em 8,30%, 1,8 cineol em 8,16% e trans-cariofileno em 5,10% da composição total do óleo. Mesmo não havendo variação qualitativa entre os componentes principais nas duas variedades, nota-se uma variação quantitativa dos mesmos entre os acessos de cada variedade, sendo esta uma informação importante na seleção de plantas para a obtenção do maior rendimento de determinada substância.

Corroborando com os resultados encontrados, Perazzo et al. (2003) e Mohammadreza (2008) também encontraram cânfora e 1,8 cineol como constituintes majoritários do óleo essencial de *A. annua*. Já Ahmad-Malik (2009) encontraram vinte componentes no óleo desta espécie e os principais foram cis-limoneno 1,2-epóxido (22,1%), β -cariofileno (12,2%), artemísia cetona (11,5%), isopinocanfona (11,4%) e cânfora (8,4%). De acordo com Charles, Cebert e Simon (1991) plantas de *A. annua* colhidas em plena floração continham cânfora em abundância (20,5%), contudo este monoterpeno não foi identificado nos estádios iniciais de floração. Comparando a composição química do óleo essencial de *A. annua* em três estádios de desenvolvimento, Mohammadreza (2008) encontrou poucas diferenças em sua composição e nos compostos majoritários (cânfora, 1,8 cineol, canfeno, espatulenol, α -pineno e artemísia cetona), concluindo que o tempo de colheita desta espécie não tem um grande efeito sobre a composição química do óleo essencial, mas sim sobre o teor de óleo na planta, que é maior no estágio de florescimento.

Bagchi et al. (2003) destacam que a cânfora tem uma alta demanda comercial devido aos seus diferentes usos, e segundo Alves e Victor (2010) esta substância é utilizada para obtenção de plásticos, como base de filmes fotográficos, repelente de traças, em cosméticos e na formulação de medicamentos. Contudo, devido as altas concentrações de cânfora obtidas nos óleos das variedades 2/39x5x3M e 2/39x1V de *A. annua*, sugere-se que ele possa ser utilizado como uma fonte alternativa deste composto.

Tabela 8 - Componentes do óleo essencial de 15 acessos da variedade 2/39x5x3M de *Artemisia annua* L. UTFPR, Pato Branco – PR, 2010.

Compostos	B6	B7	B10	B13	B14	B15	B19	B20	B23	B24	B26	B28	B33	B35	B43	Média	Desvio	Ik*	Ik**
α-pineno	1,00	0,41 ^l	0,28 ^l	1,04	1,32	tr	0,63	1,33	2,46 ^s	1,23	0,92	1,70	1,68	2,74 ^s	1,21	1,28	0,70	930	939
Canfeno	0,99 ^l	0,73 ^l	0,73 ^l	1,67	1,96	tr	1,66	1,84	2,95 ^s	2,01	1,89	3,07 ^s	2,08	3,29 ^s	2,06	1,92	0,79	945	954
β-pineno	0,92	tr	0,41 ^l	1,01	0,80	0,92	1,92	0,54	2,73 ^s	1,14	2,43 ^s	0,66	1,27	0,19 ^l	1,71	1,19	0,75	970	979
Mirceno	0,95	tr	0,40	1,85	4,13	3,84	4,21	1,71	0,68	8,89 ^s	11,72 ^s	0,73	2,49	0,46	7,34 ^s	3,53	3,51	987	990
p-cimeno	0,80	tr	0,64	0,89	tr	8,13 ^s	tr	1,11	tr	tr	1,88	Tr	2,26	1,59	3,33	2,29	2,35	1021	1024
Limoneno	0,32	tr	tr	0,33	0,22	tr	0,21	1,05 ^s	0,48	0,29	1,10 ^s	0,27	0,21	tr	0,26	0,43	0,33	1025	1029
1,8 cineol	5,89	1,83 ^l	3,98 ^l	8,32	7,14	12,41	16,46 ^s	5,35	15,52 ^s	12,03	12,97	6,76	11,71	3,88 ^l	13,66 ^s	9,19	4,61	1028	1031
γ-terpineno	0,79	tr	0,40	0,94	0,25	2,87 ^s	0,46	0,76	0,30	tr	2,77 ^s	0,23	1,10	0,52	2,10 ^s	1,04	0,93	1055	1059
Cânfora	49,49	47,38	37,12	42,29	52,62	2,81 ^l	31,13	52,60	51,76	50,88	26,10 ^l	56,43	39,35	60,53 ^s	29,63	42,01	14,94	1141	1146
trans-cariofileno	5,52	7,40	7,62	6,13	3,55	10,79 ^s	5,31	6,66	2,90 ^l	1,90 ^l	3,21	5,30	5,31	3,31	5,75	5,38	2,26	1416	1419
trans-β-farneseno	4,49	4,78	4,21	5,41	3,50	9,05 ^s	3,68	4,38	2,30 ^l	2,38	3,76	1,77 ^l	5,62	2,46	4,58	4,16	1,78	1454	1456
γ-gurjuneno	1,56	1,59	2,23	1,15	1,14	4,34 ^s	1,81	1,62	1,30	1,81	1,63	0,72 ^l	1,46	0,60 ^l	1,55	1,63	0,86	1472	1477
γ-muuroloeno	10,94	9,38	16,54 ^s	11,54	8,93	13,52 ^s	12,15	9,71	5,17 ^l	4,40	5,08 ^l	7,46	10,56	6,78	11,73	9,59	3,39	1478	1479
viridifloreno	2,06 ^s	1,11	2,37 ^s	0,94	1,59	0,56	2,16 ^s	1,24	0,49 ^l	0,71	0,46 ^l	0,34 ^l	1,36	0,81	1,28	1,16	0,65	1493	1496
Total identificado	85,71	74,61^l	76,91^l	83,52	87,14	69,22^l	81,76	89,89^s	89,05	87,67	75,93^l	85,45	86,45	87,16	86,18	83,11	6,12		
¹ MSF	4813,7	3220,2	4557,7	3858,4	6385,2 ^s	3770,2	3563,0	5303,2	3179,4	6273,7 ^s	3203,9	3569,5	5666,8 ^s	2846,0 ^l	4078,4	4285,95	1158,33		
² TEOR	5,55	4,04	4,06	4,11	5,12	3,22 ^l	5,50	5,08	7,80 ^s	6,79 ^s	5,52	4,49	5,09	1,59 ^l	4,09	4,80	1,46		
³ OLS	44,99	22,02	31,28	26,72	55,26 ^s	20,48	33,19	45,41	41,80	71,85 ^s	29,84	26,00	48,61	7,64 ^l	28,19	35,55	15,97		

IK* - Índice de Kovatos Calculado; IK** - Índice de Kovats Literatura; ni – substância não identificada; tr - traço da substância. ¹MSF: Massa seca de folhas (kg ha⁻¹). ²Teor de óleo essencial na massa seca de folha (%). ³OLS: Rendimento de óleo essencial (L ha⁻¹). (^s) e (^l) valores superiores e inferiores a média mais ou menos um desvio padrão, respectivamente.

Tabela 9 - Componentes do óleo essencial de 15 acessos da variedade 2/39x1V de *Artemisia annua* L. UTFPR, Pato Branco – PR, 2010.

Compostos	C1	C4	C5	C10	C13	C14	C16	C17	C23	C24	C26	C31	C32	C38	C45	Média	Desvio	Ik*	Ik**
1-octen-3-ol	0,40	1,21	0,24 ¹	0,40	0,37	0,68	0,50	1,00	0,75	1,41	3,18 ^S	2,99 ^S	2,44 ^S	1,45	2,18	1,28	0,98	975	979
Mirceno	3,12	1,53	2,08	0,80 ¹	1,38	1,25	1,89	2,69	5,17 ^S	6,01 ^S	5,73 ^S	Tr	4,09	3,08	tr	2,99	1,76	987	990
Limoneno	0,21 ¹	0,27 ¹	0,32	0,33	0,44	0,35	0,37	0,43	0,46	0,52	0,66 ^S	0,44	0,75 ^S	0,78 ^S	0,58	0,46	0,17	1025	1029
1,8 cineol	4,44 ¹	10,79	5,80	8,04	7,74	5,24	5,99	8,03	11,09	12,34 ^S	9,24	4,67 ¹	14,74 ^S	8,90	5,42	8,16	3,05	1028	1031
γ-terpineol	1,13 ^S	0,82	0,95	0,98	1,26 ^S	0,94	0,80	0,88	1,00	1,08	0,66	0,55	0,93	0,61 ¹	0,37 ¹	0,86	0,24	1065	1059
Linalol	3,35 ^S	1,87	0,85	2,63	3,59 ^S	1,10	0,70 ¹	1,65	2,24	2,43	0,89	0,72 ¹	1,89	1,59	0,80	1,75	0,95	1098	1096
Cânfora	50,17	35,67 ¹	47,33	45,1	44,30	54,27 ^S	55,53 ^S	58,52 ^S	46,63	37,72 ¹	47,02	45,93	38,75 ¹	37,01 ¹	43,06	45,80	6,85	1141	1146
Citronelal	0,54	tr	tr	0,34	tr	tr	0,32	0,60 ^S	0,57	tr	tr	Tr	0,27 ¹	tr	tr	0,44	0,15	1150	1153
Borneol	1,59 ^S	1,21	1,52	1,65 ^S	1,38	0,69	0,70	0,40 ¹	0,50 ¹	0,69	0,66	1,09	0,93	0,49 ¹	2,02 ^S	1,03	0,50	1163	1169
terpinen-4-ol	0,76 ¹	1,56 ^S	1,37	1,24	1,32	1,05	1,03	1,30	1,28	1,20	0,84 ¹	0,85 ¹	0,94	1,10	1,23	1,14	0,23	1175	1177
α-terpineol	1,63	2,05	1,69	tr	3,38 ^S	1,28	1,67	2,24	2,38	2,12	0,86	0,33 ¹	1,68	1,03	0,48 ¹	1,63	0,81	1188	1188
α-copaeno	0,32	0,41	tr	0,31	0,48 ^S	0,38	0,30	tr	tr	0,36	0,24 ¹	0,40	0,24 ¹	0,44	0,43	0,36	0,08	1375	1376
trans-cariofileno	5,01	6,02 ^S	5,28	5,00	5,35	5,17	4,58	3,45 ¹	4,29	5,05	4,60	5,10	4,05 ¹	7,05 ^S	6,45	5,10	0,91	1418	1419
α-humuleno	5,12 ^S	3,95	3,36	2,75	4,03	4,05	3,82	3,86	4,21	3,66	2,33 ¹	1,62 ¹	3,13	4,42	2,91	3,55	0,88	1452	1454
trans-β-farneseno	2,21 ^S	2,19 ^S	1,26	1,76	2,36 ^S	1,48	1,73	1,54	1,90	1,68	0,98 ¹	1,46	1,47	1,38	1,13 ¹	1,64	0,40	1455	1456
γ-muuroloeno	9,00	10,03 ^S	8,24	6,92	7,41	7,99	8,70	5,94 ¹	7,29	9,40	7,42	8,01	6,86	12,47 ^S	8,80	8,30	1,58	1479	1479
germacreno D	0,86	0,61	1,05 ^S	0,92	0,76	0,69	0,79	0,51 ¹	0,59	0,64	0,66	1,29 ^S	0,57	0,59	1,26 ^S	0,79	0,25	1484	1485
biciclogermagreno	1,60 ^S	1,87 ^S	1,17	1,38	1,44	1,31	1,42	0,49 ¹	0,68 ¹	1,05	1,12	1,57	0,80 ¹	1,17	0,92	1,20	0,37	1495	1500
Espatuleno	0,58	0,95 ^S	1,05 ^S	0,93 ^S	0,77	0,71	0,58	0,58	0,55	0,53	0,57	0,84	0,37 ¹	0,70	0,76	0,70	0,19	1575	1578
óxido de cariofileno	1,67	1,58	2,43 ^S	2,54 ^S	2,39 ^S	2,07	1,07 ¹	1,17	1,29	1,11 ¹	1,24	1,87	0,92 ¹	1,75	2,19	1,69	0,54	1581	1583
Total identificado	93,69^S	84,60	85,99	84,03	90,14	90,69	92,47	95,27^S	92,87^S	89,01	88,91	79,68¹	85,82	86,03	81,01¹	88,01	4,63		
¹ MSF	4963,6	5045,6	3808,0	3562,9	6053,6 ^S	4817,7	4419,5	4297,5	3979,4	3517,5	4068,9	3072,4 ¹	6969,8 ^S	5227,1	2717,9 ¹	4434,76	1122,26		
² TEOR	5,59	3,68 ¹	5,15	3,77 ¹	5,07	5,10	5,68	6,81 ^S	7,00 ^S	5,66	6,02	3,76 ¹	6,06	4,64	3,66 ¹	5,18	1,10		
³ OLS	46,80	31,29	33,08	22,63 ¹	51,78	41,60	42,40	49,41	47,06	33,61	41,31	19,51 ¹	71,23 ^S	40,91	16,79 ¹	39,29	13,96		

Ik* - Índice de Kovatos Calculado; Ik** - Índice de Kovats Literatura; ni – substância não identificada; tr - traço da substância. ¹MSF: Massa seca de folhas (kg ha⁻¹). ²Teor de óleo essencial na massa seca de folha (%). ³OLS: Rendimento de óleo essencial (L ha⁻¹). (^S) e (¹) valores superiores e inferiores a média mais ou menos um desvio padrão, respectivamente.

5.4 CONCLUSÕES

A variedade 2/39x1V se mostrou superior a variedade 2/39x5x3M na produção de massa seca de folhas, no teor e no rendimento de óleo essencial.

Cânfora, γ -muuroleno e 1,8 cineol foram os constituintes químicos encontrados em maiores teores no óleo essencial das variedades 2/39x5x3M e 2/39x1V de *A. annua*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A dissimilaridade genética encontrada nas variedades 2/39x5x3M e 2/39x1V de *A. annua*, cultivadas experimentalmente em Pato Branco, evidenciam a possibilidade de obtenção de ganhos genéticos em programas de melhoramento desta espécie, tendo em vista a identificação dos acessos B24, C5 e C32 como sendo os mais promissores dentro das populações, pois além de serem dissimilares apresentaram médias elevadas para os caracteres de interesse, que no estudo em questão, foram teor de artemisinina e rendimento de óleo essencial. Deste modo, estes acessos devem ser conservados para futuras hibridações, sendo os cruzamentos B24 x C5, B24 x C32 e C5 x C32 os mais promissores na obtenção de variedades segregantes desejadas.

As correlações entre os caracteres evidenciaram correlação negativa entre o teor de artemisinina e o número de ramificações, mostrando que se o interesse do melhoramento for teor de artemisinina, deve-se evitar a seleção de plantas com grande número de ramificações. Além disso, a alta correlação encontrada entre o rendimento de óleo essencial e o volume de dossel evidencia que o caráter volume de dossel pode ser utilizado para seleção indireta de plantas com maior rendimento de óleo essencial, auxiliando na seleção a partir da utilização deste caráter que é de fácil mensuração.

A caracterização fitoquímica do óleo essencial das variedades 2/39x5x3M e 2/39x1V de *A. annua* mostrou um óleo rico em cânfora, o que indica um mercado adicional para a espécie, pois a cânfora tem uma alta demanda comercial devido sua utilização para os mais diferentes fins.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDIN, M.Z. et al. Artemisinin, a novel antimalarial drug: Biochemical and molecular approaches for enhanced production. **Planta Med.**, v. 69, p. 289-299. 2003.

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Allured, Carol Stream, Illinois, 4 ed, 2007.

AHMAD-MALIK, Afaq et al. Influence of chemical and biological treatments on volatile oil composition of *Artemisia annua* Linn. **Industrial Crops and Products**, p. 380–383, 2009.

ALMEIDA, Ricardo D.; PELUZIO, Joênes M.; AFFERRI, Flávio S. Correlações fenotípicas, genotípicas e ambientais em soja cultivada sob condições várzea irrigada, sul do Tocantins. **Biosci. J.**, v. 26, n. 1, p. 95-99, 2010.

ALVES, P.B; VICTOR, M.M. Reação da cânfora com boroidreto de sódio: uma estratégia para o estudo da estereoquímica da reação de redução. **Quim. Nova**, v. 33, n. 10, p. 2274-2278, 2010.

ARAÚJO, Jocley Q. **Interação entre o grupo heme e a artemisinina**. 2006. 106 p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2006. Disponível em: <http://www.bdt.ndc.uff.br/tde_arquivos/13/TDE-2007-03-08T153806Z-664/Retido/copia%20jockey.pdf>. Acesso em: 02 jan. 2011, 18:28.

ARSENAULT, Patrick R.; WOBBE, Kristin K.; WEATHERS, Pamela J. Recent Advances in Artemisinin Production Through Heterologous Expression. **Curr Med Chem.**, v. 15, n. 27, p. 2886, 2008.

ARTEPAL. March 2009: Artemisinin Market. Artemisinin market situation and the need of a financial support mechanism. 2009. Disponível em: <http://www.artepal.org/index.php?option=com_content&task=view&id=105&Itemid=93>. Acesso em: 15 jan. 2011.

BAGCHI, G.D.; JAIN, D.C.; KUMAR, S. Arteether: a potent plant growth inhibitor from *Artemisia annua*. **Phytochemistry.**, v. 45, n. 6, p. 1131-1133, 1997.

BAGCHI, G.D. et al. Essential oil constituents of *Artemisia annua* during different growth periods at monsoon conditions of subtropical North Indian plains. **J. Essent. Oil Res.** p. 248-250. 2003.

BALINT, Gabor A. Artemisinin and its derivatives. An important new class of antimalarial agents. **Pharmacol. Therapeut.**, v. 90, n. 2-3, p. 261-265, 2001.

BERTAN, Ivandro et al. Dissimilaridade genética entre genótipos de trigo avaliados em cultivo hidropônico sob estresse por alumínio. **Bragantia**, v.65, n.1, p. 55-63, 2006.

BERTONI, Bianca Waléria et al. Genetic variability natural populations of *Zeyheria Montana* Mart. from the Brazilian Cerrado. **Sci. Agric.**, v. 64, n. 4, p. 409-415, 2007.

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

BILIA, Anna Rita et al. Simple and rapid physico-chemical methods to examine action of antimalarial drugs with hemin Its application to *Artemisia annua* constituents. **Life Sciences**. p. 769–778, 2002.

BIOGENIC STIMULANTS. The wormwood oil. Disponível em: <http://www.bpg.bg/bulgarianrose/essentialoils/oils/wormwood.phtml>. Acesso em: 20 jan. 2011.

BORÉM, Aluízio. **Melhoramento de plantas**. 2. ed. Viçosa: UFV-Universidade Federal de Viçosa, 1998. 453 p.

BRASIL. **Febre: cuidado, pode ser malária**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral do Programa Nacional de Controle da Malária. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2003. 24 p.

_____. **Manual de diagnóstico laboratorial da malária**. Ministério da Saúde e Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2005. 112 p.

_____. **Dengue, Esquistossomose, Hanseníase, Malária, Tracoma e Tuberculose**. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção a Saúde, Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. rev. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 197 p.

BRISIBE, Ebiamadon A. et al. Nutritional characterisation and antioxidant capacity of different tissues of *Artemisia annua* L. **Food Chemistry**., p.1240–1246, 2009.

CARVALHO, Fernando Irajá Félix de et al. **Estimativas e implicações da herdabilidade como estratégia de seleção**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2001. 99 p.

_____; LORENCETTI, Claudir; BENIN, Giovani. **Estimativas e implicações da correlação no melhoramento vegetal**. Pelotas: Ed. Universitária da UFPel, 2004. 142 p.

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.

CHARLES, D.J.; SIMON, J.E. Germoplasm variation in artemisinin content of *Artemisia annua* using an alternative method of artemisinin analysis from crude plant extracts. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 1, p.157-160, 1990.

_____; CEBERT, E.; SIMON, J.E. Characterization of the essential oil of *Artemisia annua*. **J. Essential Oil Res.**, p. 33-39. 1991.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO. CQFS - RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo/Comissão de Química e Fertilidade do Solo: 10 ed., 2004. 400 p.

CRUZ, C.D. **Programa Genes**: Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, Editora UFV, 2001. 648p.

_____; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Editora UFV, 2001. 390 p.

_____; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2. ed. rev. Viçosa: Ed. UFV, 2006.

CUNHA, Simone. 2010. Artesunato+Mefloquina (ASMQ). Disponível: <file:///F:/Disserta%C3%A7%C3%A3o/Disserta%C3%A7%C3%A3o_final/USEI/Cunha,%202010.htm>. Acesso em: 15 jan. 2011.

DAROS, Maskio et al. Correlações entre caracteres agronômicos em dois ciclos de seleção recorrente em milho-pipoca. **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, 2004.

DELABAYS, Nicolas; SIMONNET, Xavier; GAUDIN, Myriam. 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.

EFFERTH, T. Willmar Schwabe Award 2006: Antiplasmodial and Antitumor Activity of Artemisinin – From Bench to Beside. **Planta Med.**, p. 299-309, 2007.

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

ERDEMOĞLU, Nurgun et al. Determination of Artemisinin in Selected *Artemisia* L. Species of Turkey by Reversed Phase HPLC. **Rec. Nat. Prod.**, v. 1, n. 2-3. p. 36-43, 2007.

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, Jorge F. da Silva. **Production and detection of artemisinin in *Artemisia annua* L.** 1994. 125 p. Tese (Doutorado). Purdue University, Purdue, EUA, 1994.

_____; SIMON, J.E.; JANICK J. Developmental studies of *Artemisia annua*: flowering and artemisinin production under greenhouse and field conditions. **Planta Med. New York**, p. 167- 170, 1995.

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

_____. *Artemisia annua* L.: **The hope against malaria and câncer**. Medicinal and aromatic plant: Production, business e applications. 2004. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/person/34667/Ferreira-ArtemisiavsMalariaandCancer.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2010.

_____ et al. Cultivation and genetics of *Artemisia annua* L. for increased production of the antimalarial artemisinin. **Plant Genetic Resources**, v. 3, n. 2 , p. 206–229, 2005.

_____ et al. Agrotechnological aspects of the anti-malarial plant *Artemisia annua* and its potential use in animal health in Appalachia. Revue des Régions Arides - Numéro spécial - Actes du séminaire international: les Plantes à Parfum, Aromatiques et Médicinales. **SIPAM**. 2006.

_____; LUTHRIA, D. L. Drying Affects Artemisinin, Dihydroartemisinic Acid, Artemisinic Acid, and the Antioxidant Capacity of *Artemisia annua* L. Leaves. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, n. 3, p. 1691-1708, 2010.

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.igmp.unicamp.br/arquivos/teses/vtIs000107936.pdf>>. Acesso em: 26 ago. 2010.

_____ et al. Antiulcerogenic activity of some sesquiterpene lactones enriched fraction isolated from *Artemisia annua*. **Planta Med**, p. 515-518, 2002.

GELDRE, E.V.; VERGAUWE, A.; EEKHOUT, E.V. State of the art of the production of the antimalarial compound artemisinin in plant. **Plant Mol. Biol.**, v.33, p.199-209, 1997.

GRAHAM, Ian A. et al. The Genetic Map of *Artemisia annua* L. Identifies Loci Affecting Yield of the Antimalarial Drug Artemisinin. **Science**. p. 327-331. 2010.

HARTWIG, Irineu et al. Correlações fenotípicas entre caracteres agronômicos de interesse em cruzamentos dialélicos de aveia branca. **R. Bras. Agrociência**, v. 12, n. 3, p. 273-278, 2006.

HASAN, S.M.Z., SHAFIE, M.S.B.; SHAH, R.M. Analysis of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) of *Artemisia capillaris* (Wormwood capillary) in East Coast of Peninsular Malaysia. **World Applied Sciences Journal**, v. 6, n. 7, p. 976-986, 2009.

HEEMSKERK, Willem; SCHALLIG, Henk; PITERS, Bart de S. **The world of Artemisia in 44 questions.** 2006. 81p.

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

HOLM, Y. et al. Variation in the Essential Oil Composition of *Artemisia annua* L. of Different Origin Cultivated in Finland. **Flavour and fragrance journal**, v. 12, p. 241-246, 1997.

HUANG, Linfang et al. Mapping the potential distribution of high artemisinin-yielding *Artemisia annua* L. (Qinghao) in China with a geographic information system. **Chinese Medicine**, p. 5-18, 2010.

HUCHE, Marcella. Alterações no ciclo da malária. Aquecimento global antecipou o desenvolvimento das larvas do mosquito vetor da doença. Revista Ciência Hoje on line. Rio

de Janeiro, Edição CH 260. Junho 2009. Disponível em: <<http://cienciahoje.uol.com.br/147339>>. Acesso em: 26 jun. 2009.

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

JANICK, Jules. Annual Wormwood. 1995. Disponível em: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/cropfactsheets/artemisia.html>. Acesso em: 26 jun 2010.

JUTEAU, Fabien et al. Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. **Fitoterapia**, p. 532–535. 2002.

KHANUJA, Suman P.S. et al. 2008. High artemisinin yielding *Artemisia annua* plant named CIM-Arogya. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/7375260.pdf>>. Acesso em: 18 jan 2011.

KLAYMAN D. Qinghaosu (Artemisinin): An antimalarial drug from China. **Science**, p. 1049–1055. 1985.

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

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

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

LEWISON, Grant; SRIVASTAVA, Divya. Malaria research, 1980–2004, and the burden of disease. **Acta Tropica**, p. 96–103, 2008.

LIAO, K. et al. Correlation analysis on main agronomic characters, yield per plant, artemisinin percentage contents and total artemisinin content per plant of *Artemisia annua*. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.**, v. 34, n. 18, p. 2299-2304, 2009.

LINHARES, C.A.; PONZONI, F.J.; SHIMABUKURO, Y.E. Relação ente volume de madeira e índice de área foliar em um povoamento de *Pinus* spp.: estudo de caso. **Revista Árvore**, v. 24, p. 47-54, 2000.

LORENCETTI, Claudir et al. Distância genética e sua associação com heterose e desempenho de híbridos em aveia. **Pesq. agropec. bras.**, v. 41, n. 4, p. 591-598, 2006.

MA, Chenfei et al. Analysis of *Artemisia annua* L. volatile oil by comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, p. 50–53, 2007.

MAGALHÃES, Pedro Melillo 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.

_____; DELABAYS Nicolas; SARTORATTO Adilson. New hibrid lines of the antimalarial species *Artemisia annua* L. guarantee its growth in Brazil. **Ciência e Cultura: Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science.** v. 49. 1997.

_____ et al. New hybrid lines of the antimalarial species *Artemisia annua* L. **Acta Hort.** 502, 1999.

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

_____ et al. Agronomic and chemical evaluation of a hybrid of the antimalarial species *Artemisia annua* L. for São Paulo state regions. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.8, n.esp., p.199-200, 2006.

MAGIERO, Emanuelle C. et al. Efeito alelopático de *Artemisia annua* L. na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.). **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 11, n. 3, p. 317-324, 2009.

MARCHESE, José Abramo. **Produção e detecção de artemisinina em plantas de *Artemisia annua* L. submetidas a estresses abióticos.** 1999. 97 fl. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

_____; REHDER, V.L.G. Influência da temperatura na produção de artemisinina em *Artemisia annua* L. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 4, n. 1, p. 89-93, 2001.

_____ et al. Flowering of *Artemisia annua* L. Plants Submitted to Different Photoperiod and Temperature Conditions. **Acta Hort.** 569, ISHS 2002.

_____ et al. Carbon isotope composition and leaf anatomy as a tool to characterize the photosynthetic mechanism of *Artemisia annua* L. **Braz. J. Plant. Physiol.**, v. 17, n. 1, p. 187-190, 2005.

_____; FIGUEIRA, G.M. O uso de tecnologias pré e pós-colheita e boas práticas agrícolas na produção de plantas medicinais e aromáticas. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 7, n. 3, p. 86-96, 2005.

_____. **Caracterização do mecanismo fotossintético e aspectos relacionados à floração de *Artemisia annua* L.** 2006. 68p. Tese (Doutorado). Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2006.

_____ et al. Water deficit effect on the accumulation of biomass and artemisinin in annual wormwood (*Artemisia annua* L., Asteraceae). **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2010.

MARCHIORO, Volmir Sérgio et al. Dissimilaridade genética entre genótipos de aveia. **Ciênc. agrotec.**, v. 27, n. 2, p. 285-294, 2003.

MATTANA, Raquel Souza et al. Shade level effects on yield and chemical composition of leaf essential oil of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miquel. **Sci. Agric.**, v. 67, n. 4, p. 414-418. 2010.

MATOS, Alexandre. 2010. Farmanguinhos participa do Prêmio Péter Murányi 2011. Disponível em: <
http://www2.far.fiocruz.br/farmanguinhos/index.php?option=com_content&view=article&id=210:farmanguinhos-participa-do-premio-peter-muranyi-2011&catid=1:destaques&Itemid=94>. Acesso em: 15 jan. 2011.

MERCKE, Per et al. Molecular Cloning, Expression, and Characterization of Amorpho-4,11-diene Synthase, a Key Enzyme of Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia annua* L. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 381, n. 2, p. 173–180, 2000.

MILLER, Louis H. et al. The pathogenic basis of malaria. **Nature**. v. 415, p. 673-679. 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Casos confirmados de Malária. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. (1990 a 2009). Atualizado em 27/01/2010. Disponível em: <
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_conf_malaria.pdf>. Acesso em: 28 nov. 2010.

MOHAMMADREZA, Verdian-rizi. Variation in the essential oil composition of *Artemisia annua* L. of different growth stages cultivated in Iran. **African Journal of Plant Science**, v. 2, n. 2, p. 16-18, 2008.

MUELLER, Markus S. et al. The potential of *Artemisia annua* L. as a locally produced remedy for malaria in the tropics: agricultural, chemical and clinical aspects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 487–493, 2000.

_____ et al. Randomized controlled trial of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (Annual Wormwood) in the treatment of malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, p. 318-321, 2004.

NALEPA, Thiago; CARVALHO, Ruy Inacio Neiva de. Produção de biomassa e rendimento de óleo essencial em camomila cultivada com diferentes doses de cama-de-aviário. **Scientia Agraria**, v. 8, n. 2, p.161-167, 2007.

NUNES, Glauber H. de Souza et al. Correlações entre características de meloeiro. **Caatinga**, v. 21, n. 1, p. 107-112, 2008.

OH, Steve et al. Synthesis and anti-cancer activity of covalent conjugates of artemisinin and a transferrin-receptor targeting peptide. **Cancer Letters**, v. 274. p. 33–39, 2009.

OLSSON, M.E., et al. Localization of enzymes of artemisinin biosynthesis to the apical cells of glandular secretory trichomes of *Artemisia annua* L. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1123–1128, 2009.

PALADINI, M. V. **Produção de biomassa e de óleo essencial na variedade Artemis de *Artemisia annua* L. submetida a níveis de adubação.** 2009. 36 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2009.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Malaria and the internationally agreed-upon development goals, including those contained in the millennium declaration.** Washington: World Health Organization, 2005. 20 p.

PAUL, S. et al. Enhancement of artemisinin content through four cycles of recurrent selection with relation to heritability, correlation and molecular marker in *Artemisia annua* L. **Planta Med.**, v. 76, n. 13, p. 1468-1472, 2010.

PERAZZO F.F. et al. Central properties of the essential oil and the crude ethanol extract from aerial parts of *Artemisia annua* L. **Pharmacological Research**, v. 48, p. 497–502, 2003.

POLICHUK, D.R. et al. A glandular trichome-specific monoterpene alcohol dehydrogenase from *Artemisia annua*. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1264–1269, 2010.

QUISPE-CONDORI, S. et al. Global yield isotherms and kinetic of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L leaves using supercritical carbon dioxide. **J. of Supercritical Fluids**, v. 36, p. 40–48, 2005.

QUITÉRIO, Giuliana C.M. **Produção de artemisinina por *Artemisia annua* L. sob influência de micorriza arbuscular**. 2006. 48 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical). Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2006.

ROOL BACK MALARIA. RBM/IOWH/MMV. The Artemisinin Enterprise: Exploring New Sources of Artemisinin. University of York: York, 2008; p 49. Disponível em: <http://www.york.ac.uk/org/cnap/artemisiaproject/pdfs/AEconference-report-web.pdf>. Acesso em: 03 dez. 2010.

ROOL BACK MALARIA. **2001-2010 United Nations Decade to Roll Back Malaria**. Switzerland: World Health Organization, 2010, 22 p.

RIDDER, Sanne de, KOOY, Frank van der, VERPORT, Rober. *Artemisia annua* as a self-reliant treatment for malaria in developing countries. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 302–314, 2008.

RODRIGUES, R. A. F. et al. Otimização do processo de extração e isolamento do antimalárico artemisinina a partir de *Artemisia annua* L. **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p. 368-372, 2006.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software, New York, 2000. 83p.

SANGWAN, R.S. et al. RAPD profile based genetic characterization of chemotypic variants of *Artemisia annua* L. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 47, n. 6, 1999.

SCHRAMEK, Nicholas et al. Artemisinin biosynthesis in growing plants of *Artemisia annua*. A $^{13}\text{CO}_2$ study. **Phytochemistry**, v. 71, p. 179–187. 2010.

SHUKLA, A. et al. Effect of triacontanol and chlormequat on growth, plant hormones and artemisinin yield in *Artemisia annua* L. **Plunk Growth Regulation**, v. 11, p.165-171, 1992.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.

SIMON, James E., et al. *Artemisia annua* L.: A promising aromatic and medicinal. Advances in New Crops, Timber Press, Portland, OR. p. 522-526. 1990.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetic and Plant Breeding**, v. 41, p. 237-245, 1981.

SLADE, Desmond et al. Antiprotozoal, anticancer and antimicrobial activities of dihydroartemisinin acetal dimers and monomers. **Bioorganic & Medicinal**, p. 7949–7957, 2009.

TELLEZ, M.R., et al. Differential accumulation of isoprenoids in glanded and glandless *Artemisia annua* L. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1035–1040. 1999.

VAN AGTAMAEL, Michiel A.; EGGELTE, Teunis A.; VAN BOXTEL, Chris J. Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication. **TiPS**, v. 20. 1999

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, D. J. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, **Journal of Chromatography**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VAN NIEUWERBURGH, Filip C.W. et al., Quantitation of artemisinin and its biosynthetic precursors in *Artemisia annua* L. by high performance liquid chromatography–electrospray quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 1118, p. 180–187, 2006.

VAZ, Ana Paula Artimonte et al. Biomassa e composição química de genótipos melhorados de espécies medicinais cultivadas em quatro municípios paulistas. **Pesq. agropec. bras.**, v. 41, n. 5, p. 869-872, 2006.

WALLART, T. Eelco; PRAS, Niesko; QUAX, Win J. Seasonal variations of artemisinin and its biosynthetic precursors in tetraploid *Artemisia annua* plants compared with the diploid wild-type. **Planta Med.**, p. 723-728, 1999.

WOERDENBAG, Herman J. et al. Volatile constituents of *Artemisia annua* L. (Asteraceae). **Flavour Fragrance and Journal.**, v. 8, n. 3, p. 131-137, 1993.

_____ et al. Progress in the research of artemisinin-related antimalarials: an update. **Pharm World Sci.**, v.16, p. 169-180, 1994.

WORLD MALARIA REPORT, Fact Sheet, 2005. Disponível em: <<http://www.unicef.org/media/files/MalariaFactSheet.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International travel and health. Switzerland. 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/ith/ITH2010.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2010.

YANG, Shi-Lin et al. Flavonoids and chromenes from *Artemisia annua*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 1, p. 255-257, 1995.

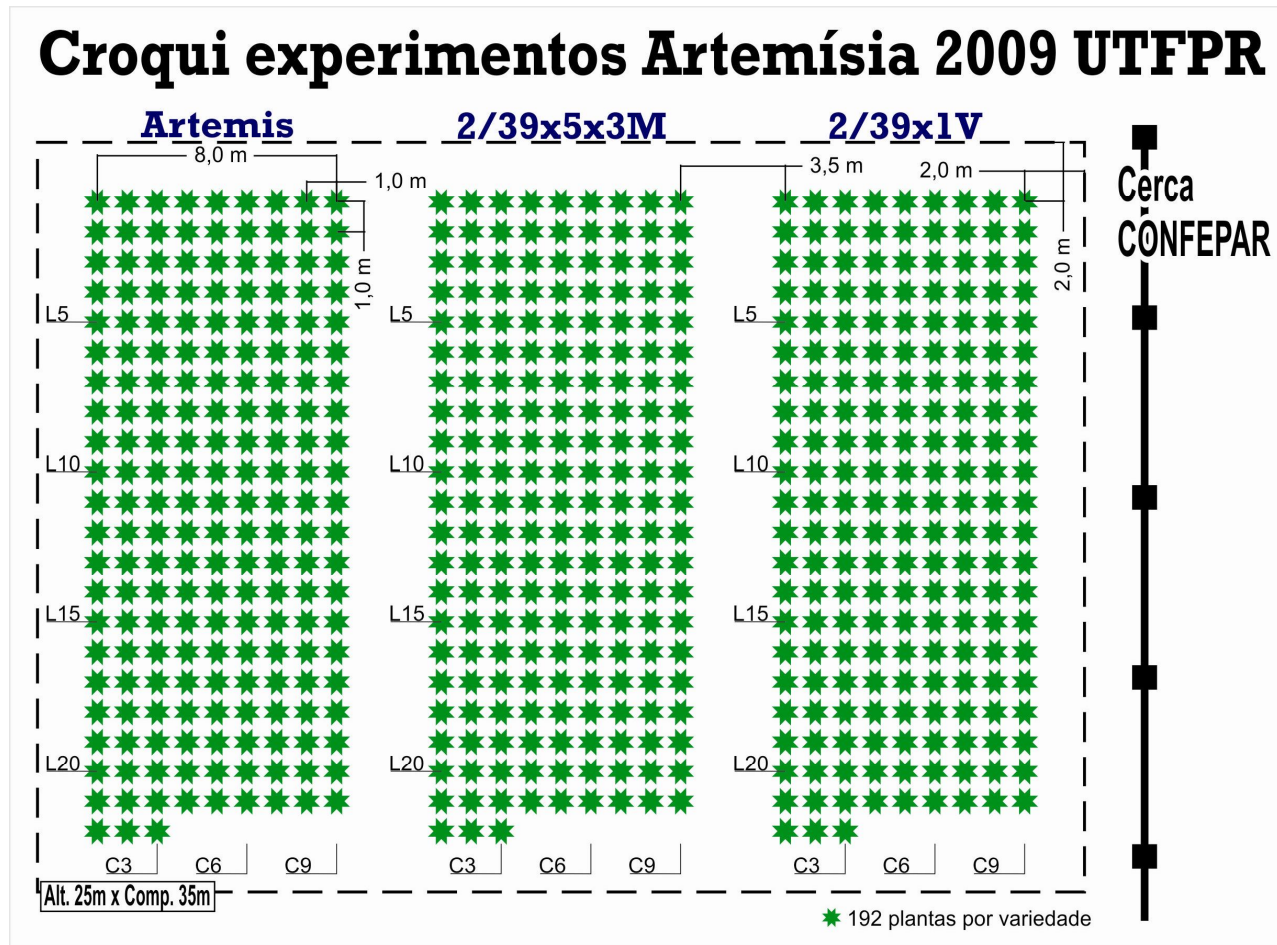
ZHANG, Long; YE, He-Chun; LI, Guo-Feng; Effect of development stage on the artemisinin content and the sequence characterized amplified region (SCAR) marker of high-artemisinin yielding strains of *Artemisia annua* L. **Journal of Integrative Plant Biology.**, v. 48, n. 9, p. 1054–1062, 2006.

ÍNDICE DE APÊNDICES E ANEXOS

APÊNDICE A – Croqui experimental	86
APÊNDICE B - Características químicas do solo antes da implantação do experimento, na camada 0-20 cm. UTFPR, Pato Branco- PR, 2010	87
APÊNDICE C – Avaliação das trocas gasosas das plantas de <i>Artemisia annua</i> L. através do analisador portátil de CO ₂ (1). Fotografia das folhas de <i>Artemisia annua</i> L. para cálculo de área foliar (2). UTFPR, Pato Branco- PR, 2010	87
APÊNDICE D - Extração do óleo essencial de <i>Artemisia annua</i> L. utilizando-se um balão de 2 L acoplado a um sistema clewenger (1) e o volume de óleo extraído (2). UTFPR, Pato Branco- PR, 2010	87
APÊNDICE E - Processos de extração de artemisinina e análogos (1), rotaevaporação do extrato obtido (2) e purificação do extrato em cartuchos florasil conectados ao manifold (3). UTFPR, Pato Branco- PR, 2010	88
ANEXO A - Variáveis de arquitetura de parte aérea da planta de café: ht: altura (m) da planta, Hd: altura (m) do dossel, hi: altura (m) de inserção do primeiro par de ramos plagiotrópicos, Di: diâmetro (m) da seção inferior do dossel, Dm: diâmetro (m) da seção média do dossel, e Ds: diâmetro (m) da seção superior do dossel	89
ANEXO B – Curvas de calibração	90

APÊNDICES

APÊNDICE A – Croqui experimental



APÊNDICE B - Características químicas do solo antes da implantação do experimento, na camada 0-20 cm. UTFPR, Pato Branco- PR, 2010.

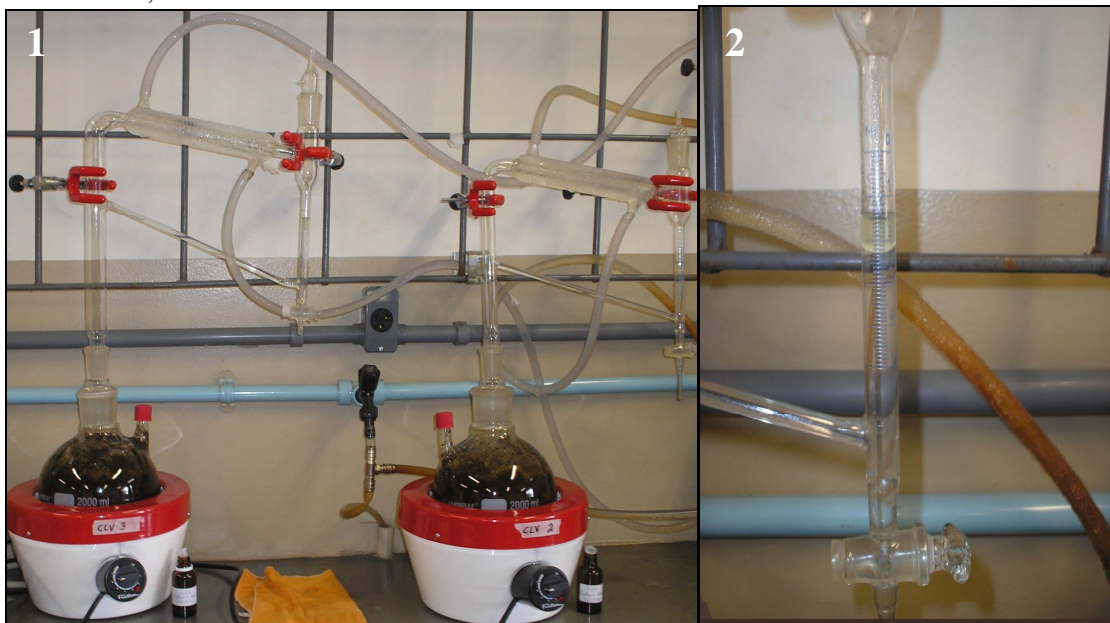
pH- CaCl ₂	P	K	MO	Ca	Mg	Al	H + Al	V	m
	-----mg dm ⁻³ -----		g dm ⁻³			----- cmol _c dm ⁻³ -----		----- % -----	
4,70	10,15	0,50	53,61	5,37	2,66	0,14	7,79	52,27	1,61

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.

APÊNDICE C - Avaliação das trocas gasosas das plantas de *Artemisia annua* L. através do analisador portátil de CO₂ (1). Fotografia das folhas de *Artemisia annua* L. para cálculo de área foliar (2). UTFPR, Pato Branco- PR, 2010.



APÊNDICE D - Extração do óleo essencial de *Artemisia annua* L. utilizando-se um balão de 2 L acoplado a um sistema clewenger (1) e o volume de óleo extraído (2). UTFPR, Pato Branco- PR, 2010.

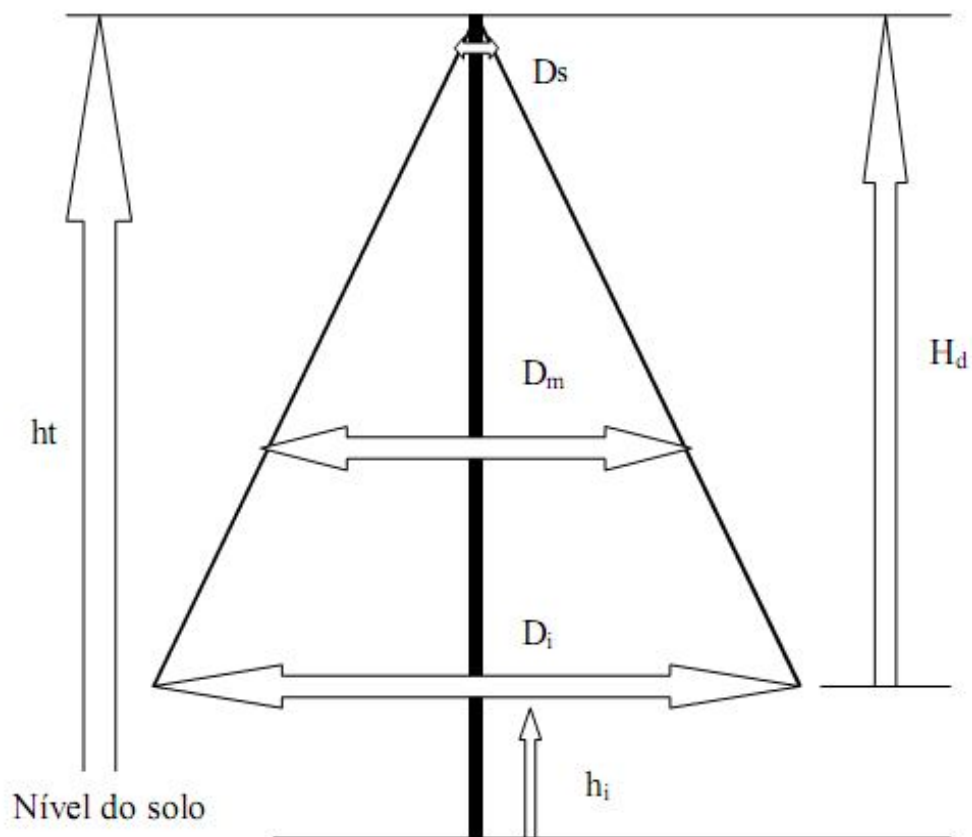


APÊNDICE E - Processos de extração de artemisinina e análogos (1), rotaevaporação do extrato obtido (2) e purificação do extrato em cartuchos florissil conectados ao manifold (3). UTFPR, Pato Branco- PR, 2010.



ANEXOS

ANEXO A - Variáveis de arquitetura de parte aérea da planta de café: ht: altura (m) da planta, Hd: altura (m) do dossel, hi: altura (m) de inserção do primeiro par de ramos plagiotrópicos, Di: diâmetro (m) da seção inferior do dossel, Dm: diâmetro (m) da seção média do dossel, e Ds: diâmetro (m) da seção superior do dossel.



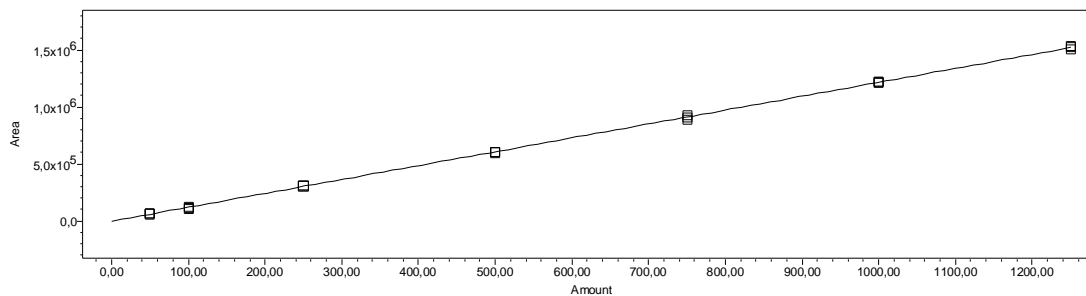
Fonte: Favarin et al., 2002.

ANEXO B – Curvas de calibração

1. Diluições do padrão de confecção da curva analítica de artemisinina e deoxiartemisinina.

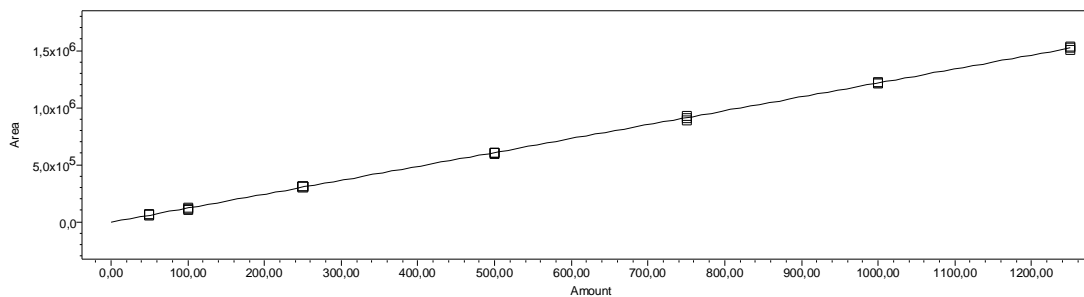
Ponto	Conc. µg/mL Artemisinina	Conc. µg/mL Deoxiartemisinina
1	50	27
2	100	54
3	250	136
4	500	273
5	750	409
6	1000	546
7	1250	682

2. Curva de calibração e dados da curva analítica de artemisinina.



	Processing Method	R	R^2	Standard Error	Residual Sum of Squares	Equation	Name	Units	Time
1	ago2010	0,999812	0,999624	1,060320e+04	2,136130e+009	Y = 1,22e+003 X - 1,35e+003	artemisinina	µg/mL	6,678

3. Curva de calibração e dados da curva analítica de deoxiartemisinina.



	Processing Method	R	R^2	Standard Error	Residual Sum of Squares	Equation	Name	Units	Time
1	ago2010	0,999705	0,999410	7,010126e+003	9,336954e+008	Y = 1,17e+003 X + 4,39e+003	deoxiartemisinina	µg/mL	6,073

Fonte: Celeghini, et al., 2009.