JOSÉ ABRAMO MARCHESE

SECRETARIA DE PÓS-GRADUAÇÃO I. B.

PRODUÇÃO E DETECÇÃO DE ARTEMISININA EM PLANTAS DE *Artemisia annua* L. SUBMETIDAS A ESTRESSES ABIÓTICOS

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato a) José Abramo Marchese
e aprovada pela Comissão Julgadora.
31/5/99 Vera Lúcia Garcia Rehder.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Biologia Vegetal.

Orientador: Profª. Drª. Vera Lúcia Garcia Rehder.

Co-orientador: Profª. Drª. Ana Maria M. A. Lagôa.

991545

Campinas - SP

1999

BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE BC
N.º CHAMADA
38253
229/99
R$11,00
10/08/99
N.º

CM-00125687-2

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

MARCHESE, José Abramo

M332p Produção e detecção de artemisinina em plantas de *Artemisia annua* L. submetidas a estresses abióticos/José Abramo Marchese.-- Campinas, SP:[s.n.], 1999.
97f:ilus.

Orientadora: Vera Lúcia Garcia Rehder
Co-orientadora: Ana Maria M.A. Lagôa
Dissertação (mestrado)- Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1.*Artemisia annua*. 2. Malária. 3. Metabolismo secundário. I. Rehder, Vera Lúcia Garcia. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 31/05/1999.

Banca Examinadora

Titulares:

Profª Drª Vera Lúcia Garcia Rehder **(Orientadora)**

Prof. Dr. Ladaslav Sodek

Prof. Dr. Eduardo Caruso Machado

Suplentes:

Profª Drª Cláudia Regina Baptista Haddad

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe Leda, que propiciou todas às condições para minha formação científica, com seu amor e apoio. Agradeço a minha esposa Cristine e minha filha Cibele, pela compreensão, apoio e amor dedicados durante a realização deste trabalho.

À Profª Drª Vera Lúcia Garcia Rehder agradeço sinceramente pela orientação e amizade durante a realização deste trabalho. À Direção do CPQBA/UNICAMP, pela oportunidade de realizar parte dos meus experimentos nas Divisões de Síntese Química e Fitoquímica. Aos amigos Adilson Sartoratto e Sinésio Boaventura Jr. pelas dicas e auxílio nas análises cromatográficas. Aos pesquisadores da Divisão de Agrotecnologia pelo fornecimento das sementes de artemisia e sugestões de cultivo. Aos Professores Ladaslav Sodek, Eduardo Caruso Machado e Cláudia Regina Baptista Haddad pelas prestimosas sugestões feitas no período da pré-banca e qualificação. Ao Professor Arício X. Linhares, Paulo R. Rehder e ao amigo José Roberto Trigo pelo auxílio na análise estatística.

À Direção do CNPT/EMBRAPA pela oportunidade de realizar parte de meus experimentos da tese naquele local e, principalmente, aos pesquisadores Osmar Rodrigues e Agostinho Didonet, responsáveis pela minha inserção no meio acadêmico e científico, agradeço pela grande amizade e pelas valiosas sugestões no meu trabalho de tese.

ÍNDICE

Abreviaturas..... i

Resumo..... ii

Summary..... iv

1. Introdução Geral 1

1.1. A Malária..... 1

1.2. A Planta *Artemisia annua* L..... 6

1.3. Biossíntese de Artemisinina..... 9

1.4. Objetivo Geral..... 11

Capítulo I - Dosagem de artemisinina em *Artemisia annua* L. - Comparação da técnica Cromatografia em Camada Delgada com Detecção Fotodensitométrica *versus* Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção no Ultravioleta 13

1. Introdução..... 13

2. Objetivos..... 23

3. Material e Métodos..... 24

3.1. Material Vegetal e Reagentes Utilizados..... 24

3.2. Análise por Cromatografia em Camada Delgada.... 26

3.3. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência..... 29

4. Resultados e Discussão..... 32

5. Conclusões..... 38

Capítulo II - Fatores abióticos associados à produção de artemisinina em *Artemisia annua* L..... 39

1. Introdução..... 39

2. Objetivos..... 47

3. Material e Métodos..... 48
3.1. Influência da deficiência hídrica no acúmulo de artemisinina em *A.annua*..... 48
3.1.1. Experimento 01: plantas de 84 dias de *A.annua* submetidas a diferentes níveis de deficiência hídrica..... 48
3.1.2. Experimento 02: plantas de 147 dias de *A.annua* submetidas a diferentes níveis de deficiência hídrica..... 53
3.2. Influência da temperatura no acúmulo de artemisinina em *A.annua*..... 58
4. Resultados e Discussão..... 60
4.1. Influência da deficiência hídrica no acúmulo de artemisinina em *A.annua*..... 60
4.2. Influência da temperatura no acúmulo de artemisinina em *a.annua*..... 73
5. Conclusões..... 76
5.1. Deficiência Hídrica..... 76
5.2. Temperatura..... 77

Literatura Citada..... 79

ABREVIATURAS

Ψ_w	Potencial de água
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCD/DT	Cromatografia em Camada Delgada com Detecção Fotodensitométrica
CG	Cromatografia Gasosa
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE/EQ	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Eletroquímico
CLAE/UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Ultravioleta
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DH	Deficiência Hídrica
EDTA	Etileno Diamina Tetra Acético
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MPa	Mega Pascal
PAR	Radiação Fotossintéticamente Ativa
TLC	Thin Layer Chromatography
UV	Ultravioleta

a CLAE/UV. Os teores de artemisinina obtidos com CCD/DT apresentaram-se superestimados em relação aos obtidos com CLAE/UV.

SUMMARY

Artemisia annua L., native of China and adapted to the Brazilian climate, is a rich source of artemisinin, a sesquiterpene lactone proven to be effective against the malaria agent *Plasmodium*. The scope of this work was to study the influence of water deficiency and temperature on the plants artemisinin content. Moderate water deficiency (ΨW -1,39 MPa) and drastic water deficiency (ΨW -3,44 MPa) followed by rehydration induced a significant accumulation of artemisinin of the dehydrated plants when compared to these with controlled irrigation. Although the accumulation of artemisinin did not result in a greater yield of artemisinin content by the plant. When temperature was taken into account, more artemisinin accumulated at the 18/28 °C temperature range when compared to the 11/20 °C temperature range. Another goal of this work was to compare the methods thin layer chromatography (TLC) using photodensitometric detection with high performance liquid chromatography (HPLC) using ultraviolet detection for the analytical quantification of artemisinin contents. The results show that the TLC method does not have the same selectivity and sensibility necessary to be a useful alternative method to HPLC. Under the experimental conditions the TLC method over-estimated the artemisinin contents compared to those determined by HPLC.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. A MALÁRIA

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a malária é a mais importante doença parasitária tropical e mata mais pessoas que todas as outras doenças registradas, excetuando-se a tuberculose. A estimativa mundial de ocorrência da doença é da ordem de 300 a 500 milhões de casos clínicos por ano e a mortalidade causada pela malária é superior a 1 milhão de mortes/ano (WHO, 1998a). De cada 10 casos de malária, 9 ocorrem na África Tropical (fig. 1). Do número total de casos reportados anualmente pela Organização Mundial de Saúde (excluindo a região africana), mais de 2/3 concentram-se unicamente em três países, listados a seguir em ordem decrescente: Índia, Brasil e Sri Lanka, seguidos de Afeganistão, Vietnã e Colômbia (BUTLER *et al.*, 1997; WHO, 1998a). No Brasil, em 1996, foram reportados aproximadamente 450 mil casos clínicos da doença (80% na região amazônica), 100 mil a menos que nos anos anteriores. Destes, 13.500 óbitos foram registrados (YNTERIAM, 1996; LUCÍRIO, 1997; WHO, 1998a).

A malária humana é causada por protozoários parasitas do gênero *Plasmodium* spp. Quatro espécies de *Plasmodium* podem produzir a doença em várias formas - *Plasmodium falciparum,*

Plasmodium vivax, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium malariae*. O *P.falciparum* é a causa da maioria das infecções e também é o mais letal (causa a malária cerebral), predominando na África Tropical, Amazônia, sudeste da Ásia e Oceania. O vetor que transmite os parasitas de uma pessoa para a outra, é a fêmea do mosquito *Anopheles* (WHO, 1998b).

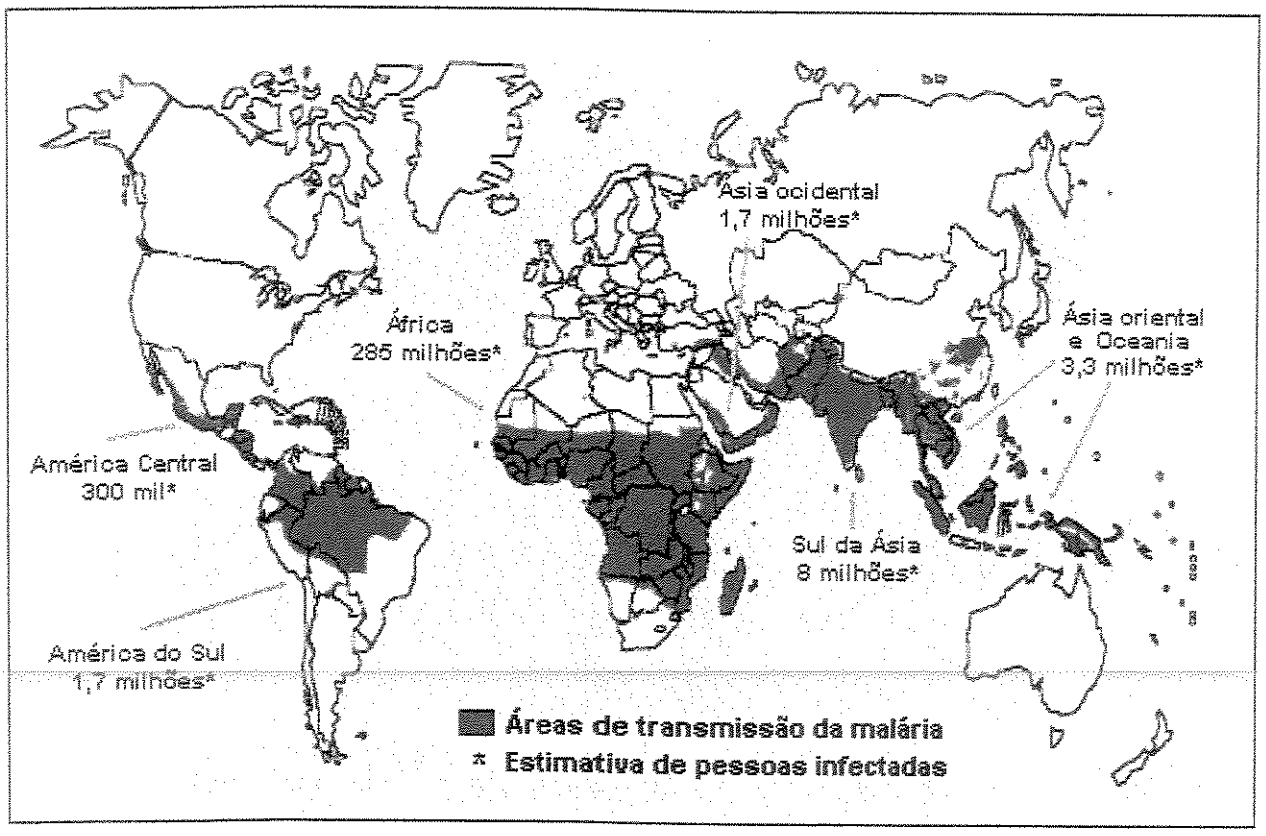

FIGURA 1. Áreas de transmissão da malária e estimativa do número de pessoas infectadas anualmente no mundo (adaptado de LUCÍRIO, 1997 e WHO, 1998b).

Muitos são os fatores que contribuem para o aumento alarmante dos casos de malária no mundo, dentre eles, podem ser citados as mudanças climáticas e a deterioração dos serviços de saúde. Todavia, a resistência do mosquito *Anopheles* aos inseticidas e o aparecimento de cepas do *Plasmodium* spp, principalmente do *P.falciparum*, resistentes às drogas para o combate da malária, particularmente a cloroquina, são os fatores que mais colaboram para o crescimento dos casos clínicos e mortes causadas pela doença. Além da cloroquina, outros medicamentos como a sulfadoxina/pirimetamina e a mefloquina, estão perdendo sua eficácia no combate à malária (KLAYMAN, 1985; BUTLER *et al.*, 1997; WHO, 1998a). Com o aumento da resistência do parasita, há uma necessidade urgente de alternativas seguras para as drogas que estão perdendo eficácia.

Nos últimos 50 anos, as principais estratégias para o controle da malária foram a utilização de inseticidas contra o vetor *Anopheles* e o uso de drogas antimaláricas para a profilaxia e tratamento (WHO, 1998a). Na última década, considerável progresso foi alcançado na busca de uma vacina contra a malária, todavia, estima-se que uma vacina efetiva no controle da doença, somente esteja disponível nos próximos 7 a 15 anos (LUCÍRIO, 1997; WHO, 1998a).

Até o momento, a melhor alternativa para o tratamento da malária, causada pelo *P.falciparum*, é a utilização dos derivados

semi-sintéticos da artemisinina (arteméter e artesunato de sódio - fig. 2), um produto natural extraído da planta *Artemisia annua* L., que demonstra comprovada eficácia no controle das cepas de *P.falciparum* resistentes às múltiplas drogas, além de apresentar pouco ou nenhum efeito colateral (KLAYMAN, 1985; WHO, 1998a).

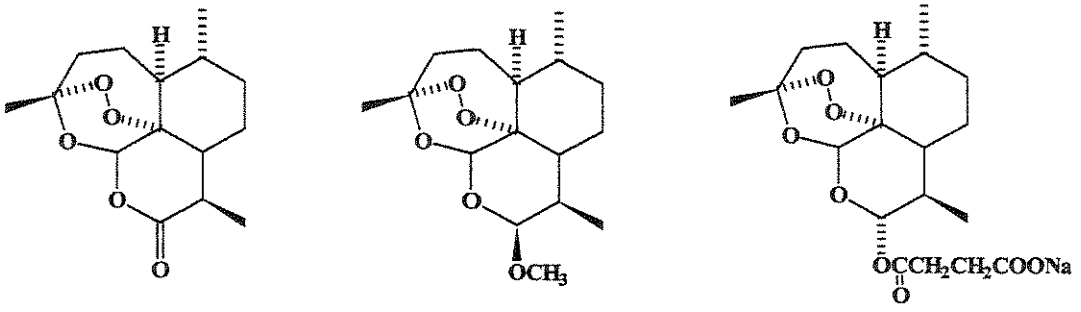

FIGURA 2. Artemisinina e alguns de seus derivados semi-sintéticos antimaláricos.

A *A.annua* é utilizada há séculos na medicina tradicional chinesa, para o tratamento de febre e malária (KLAYMAN, 1985; SIMON *et al.*, 1990). Em 1971, químicos chineses isolaram das folhas das plantas, a substância reputada pela ação medicinal. Este composto do metabolismo secundário vegetal, chamado artemisinina ou qinghaosu (em chinês: *su* = de extrato e *qing hau* = erva verde), é uma lactona sesquiterpênica que possui um grupo endoperóxido-1,2,4-trioxano e, diferentemente de outros

antimaláricos, não possui nitrogênio na sua estrutura. O composto tem sido usado com sucesso em milhares de pacientes na China, incluindo aqueles acometidos com ambas as cepas do *P.falciparum*, a resistente e a sensível à cloroquina (KLAYMAN, 1985).

Embora a artemisinina apresente rápido efeito na supressão da parasitemia, ela é de difícil administração, devido a sua baixa solubilidade em veículos aquosos ou à base de óleo. Já, os derivados da artemisinina, como arteméter e artesunato de sódio, apresentam maior solubilidade em tais veículos, podendo ser administrados na forma injetável. Os derivados artesunato de sódio e arteméter, aparentemente, são mais potentes que a artemisinina natural. O artesunato de sódio atua rapidamente na restauração da consciência de pacientes em coma, com malária cerebral (KLAYMAN, 1985).

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

1.2. A PLANTA *Artemisia annua* L.

A.annua (fig. 3) é uma planta herbácea altamente aromática, pertencente à família *Asteraceae*, com hábito de crescimento determinado e altura variando entre 0,8 e 2,0 metros (FERREIRA & JANICK, 1996a). A planta reproduz-se naturalmente por fecundação cruzada e multiplica-se por sementes, além de propagar-se vegetativamente (MAGALHÃES, 1996).

FIGURA 3. Ao fundo, híbrido 2/39x1V de *Artemisia annua* L. cultivado no CPQBA/UNICAMP.

A.annua demonstra sensibilidade ao comprimento do dia e floresce aproximadamente duas semanas após ser submetida ao fotoperíodo indutivo (crítico). A literatura apresenta diferentes fotoperíodos críticos para induzir a floração: 11 horas (MAGALHÃES, 1996); 11.5 horas (FERREIRA *et al.*, 1995) e 12 a 14 horas (GELDRE *et al.*, 1997).

A.annua ocorre naturalmente como parte da vegetação das planícies ao norte das províncias de Chadar e Suiyuan (40^0 N e 109^0 E), na China, entre 1000 e 1500 metros de altitude. Além da Ásia, atualmente a planta é cultivada em muitos outros países (Iugoslávia, Hungria, Bulgária, Romênia, Turquia, Rússia, Argentina, Itália, França, Espanha e Brasil), não só como fonte de artemisinina, mas também como fonte de óleo essencial (MAGALHÃES, 1996; GELDRE *et al.*, 1997). DUKE *et al.* (1987), CHEN & LEATHER (1990) e BAGCHI *et al.* (1998), relatam haver encontrado atividade herbicida para a molécula de artemisinina. No Brasil, a introdução da *A.annua* ocorreu em 1987, por pesquisadores do CPQBA/UNICAMP (FIGUEIRA, 1995). Atualmente, através de seleção para aumentar a fitomassa e o teor de artemisinina, o programa de melhoramento de *A.annua* do CPQBA/UNICAMP conta com genótipos selecionados (híbridos) que chegam a produzir 25 kg/ha da molécula, enquanto que nas populações base, o rendimento é apenas de 5 kg/ha (MAGALHÃES *et al.*, 1997).

Há controvérsias na literatura sobre qual a fase fenológica da planta em que ocorre maior acúmulo de artemisinina. Alguns autores afirmam que o maior acúmulo da molécula ocorre na fase de pré-floração (ACTON *et al.*, 1985; LIERSCH *et al.*, 1986; WOERDENBAG *et al.*, 1991), enquanto outros reportam que o pico ocorre durante a floração (PRAS *et al.*, 1991; MORALES *et al.*, 1993; FERREIRA, 1994; LAUGHLIN, 1995; FERREIRA & JANICK, 1996a). Segundo MORALES *et al.* (1993) a concentração máxima de artemisinina aparenta estar mais diretamente relacionada com o fotoperíodo específico, do que com o estádio específico de desenvolvimento da planta.

Com relação à distribuição da artemisinina na planta, a parte aérea, principalmente folhas e inflorescências, apresenta as maiores concentrações de artemisinina, com baixas concentrações nos talos e nenhuma artemisinina na raiz e pólen. O conteúdo da molécula é de 4 a 11 vezes maior nas inflorescências que nas folhas (FERREIRA & JANICK, 1996a). Em pré-floração, CHARLES *et al.* (1990) encontraram 88,9% da artemisinina total da planta nas folhas, estando os 11,1% restantes presentes nas gemas florais.

Segundo FERREIRA (1994), os tricomas glandulares que ocorrem nas folhas, colmos e flores são os prováveis sítios de acumulação de artemisinina em *A.annua*.

1.3. BIOSSÍNTESE DE ARTEMISININA.

Embora a via de biossíntese da artemisinina e de alguns de seus precursores não tenha sido completamente estabelecida, alguns passos de sua bio-transformação têm sido elucidados. Os sesquiterpenos são formados pela condensação do isopentenil-pirofosfato (IPP) com o geranil-pirofosfato (GPP), originando o farnesil-pirofosfato (FPP) (MANN, 1987; MCGARVEY & CROTEAU, 1995; DEY & HARBORNE, 1997), que é um dos precursores iniciais na via de biossíntese da artemisinina (AKHILA *et al.*, 1987). Estes autores, usando ácido mevalônico marcado ($^{3}H/^{14}C$) em seu experimento, consideraram artenuina B como o precursor imediato da artemisinina e propuseram a seguinte seqüência biossintética: farnesil-pirofosfato → germacrano → diidrocostunolideo → cadinanolideo → artenuina B → artemisinina. AKHILA *et al.*(1990), usando ácido mevalônico marcado ($^{3}H/^{14}C$), propuseram que o ácido artemisinínico é sintetizado a partir da ciclização do IPP , mas não o reconhecem como precursor da artemisinina. Todavia, outros autores consideram o ácido artemisinínico como um possível precursor biogenético para ambas, artenuina B (EL-FERALY *et al.*, 1986; SANGWAN *et al.*, 1993) e artemisinina (EL-FERALY *et al.*, 1986), seqüencialmente ou independentemente. Um resumo das distintas vias de biossíntese propostas para artemisinina é mostrado na fig. 5.

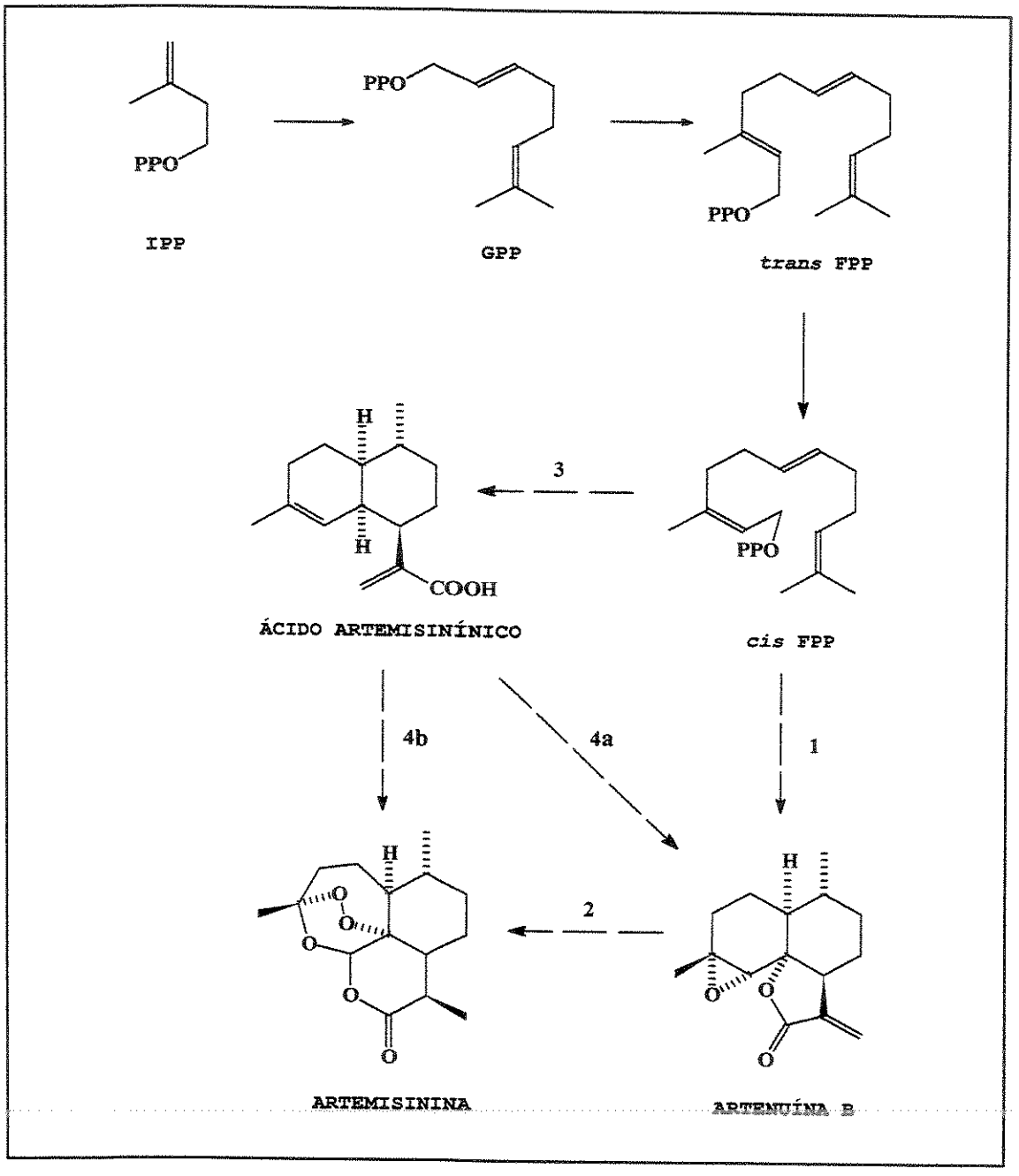

FIGURA 5. Vias de biossíntese propostas para artemisinina. **1** (AKHILA *et al.*, 1987); **2** (AKHILA *et al.*, 1987; SANGWAN *et al.*, 1993); **3** (AKHILA *et al.*, 1990); **4a** (EL-FERALY *et al.*, 1986; JUNG *et al.*, 1990); **4b** (EL-FERALY *et al.*, 1986; JUNG *et al.*, 1990; SANGWAN *et al.*, 1993).

1.4. OBJETIVO GERAL

Considerando que a artemisinina e seus derivados, até o momento, são a melhor alternativa para o tratamento da malária, e que a síntese química da artemisinina é complexa, apresentando baixos rendimentos e altos custos, o que justifica seu isolamento a partir da planta *A.annua*, entende-se como necessário, observar o comportamento fisiológico desta espécie perante distintas condições ambientais, inclusive sob estresses, para gerar informações que possam otimizar a produção de fitomassa e dos teores de artemisinina em *A.annua*.

Portanto, o objetivo principal deste trabalho foi verificar a influência de fatores abióticos - deficiência hídrica e temperatura - no acúmulo de artemisinina e na produção de fitomassa em *A.annua*.

Também, foram comparadas as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta *versus* a técnica cromatografia em camada delgada com detecção fotodensitométrica, para verificar as vantagens e inconvenientes de cada técnica na quantificação de artemisinina.

CAPÍTULO I – DOSAGEM DE ARTEMISININA EM *Artemisia annua* L. – COMPARAÇÃO DA TÉCNICA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COM DETECÇÃO FOTODENSITOMÉTRICA *versus* CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO NO ULTRAVIOLETA

1. INTRODUÇÃO

Análises de rotina, ou experimentos que necessitem estimar o teor de artemisinina (fig. 1) em grandes quantidades de amostras provenientes de *A.annua*, exigem um método analítico que alie precisão suficiente à rapidez na sua execução (DELABAYS, 1997). Outro fator a considerar, é que o método deve oferecer a possibilidade da detecção simultânea de outros sesquiterpenos, como o ácido artemisinínico (fig. 1)(WOERDENBAG *et al.*, 1991; DELABAYS, 1997), que é o mais abundante bioprecursor da artemisinina e tem sido usado na síntese química parcial da mesma (ROTH & ACTON, 1989, citados por GELDRE *et al.*, 1997; WOERDENBAG *et al.*, 1991).

Vários autores afirmam que a análise de artemisinina é dificultada devido à inexistência de cromóforos (ZHAO & ZENG, 1986; ELSOHLY *et al.*, 1987; WOERDENBAG *et al.*, 1991; JAZIRI *et al.*, 1993; DELABAYS, 1997) e de grupos funcionais na molécula (JAZIRI *et al.*, 1993; GELDRE *et al.*, 1997). Outra desvantagem, é

que vários compostos do extrato bruto de *A.annua* interferem na sua detecção (ELSOHLY *et al.*, 1987; CHARLES *et al.*, 1990; GELDRE *et al.*, 1997). Estudos sobre a estabilidade térmica da molécula demonstram que ela apresenta alta estabilidade quando aquecida em solventes neutros até 150 °C, ou aquecida até 50 °C acima de seu ponto de fusão (156-157 °C), pelo tempo de 2,5 minutos. Entretanto, outros compostos originários da degradação da molécula são detectados quando este aquecimento se estende além de 3,5 minutos (LIN *et al.*, 1985). A artemisinina tem sido descrita como sendo sensível a tratamento ácido ou básico (ZENG *et al.*, 1983), degradando-se rapidamente.

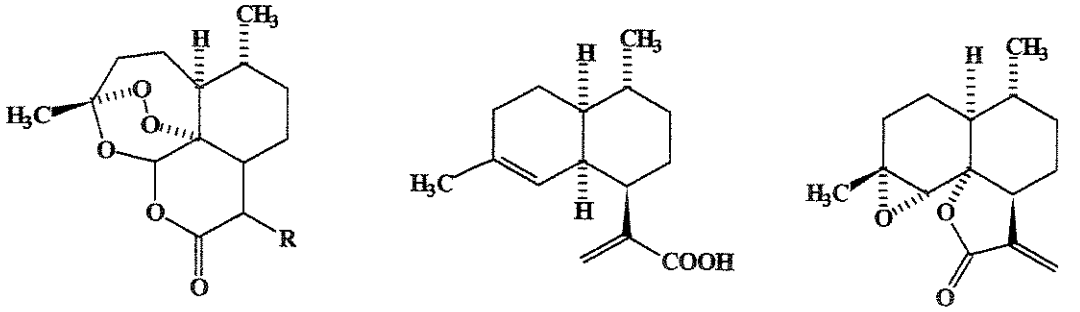

FIGURA 1. Artemisinina e alguns de seu bioprecursores.

Diversos métodos analíticos têm sido descritos na literatura para a determinação do teor de artemisinina e outras lactonas sesquiterpênicas em *A.annua*. Métodos considerados

semiquantitativos, como a cromatografia em camada delgada, com quantificação por fotodensitometria - CCD/DT (BRYSON & CROOM, 1991; DELABAYS *et al.*, 1994; GUPTA *et al.*, 1996; MAGALHÃES, 1996; DELABAYS, 1997; SARTORATTO *et al.*, 1997; FIGUEIRA & SARTORATTO, 1997; MAGALHÃES *et al.*, 1997; MARCHESE *et al.*, 1998) e CCD com leitura visual (PRAS *et al.*, 1991; FOGLIO, 1996; MAGALHÃES, 1996), são utilizados. Outros métodos mais sensíveis e específicos envolvem a cromatografia líquida de alta eficiência com detector eletroquímico - CLAE/EQ (ACTON *et al.*, 1985; CHARLES *et al.*, 1990; DELABAYS *et al.*, 1994; FERREIRA, 1994; FERREIRA *et al.*, 1994; FERREIRA & JANICK, 1996b; DELABAYS, 1997); a cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta - CLAE/UV sem derivatização da artemisinina (ELHAG *et al.*, 1992); a CLAE/UV com derivatização pré-coluna (ZHAO & ZENG, 1986; LIERSCH *et al.*, 1986; PRAS *et al.*, 1991; DELABAYS, 1997; MARCHESE *et al.*, 1998); a CLAE/UV com derivatização pós-coluna (ELSOHLY *et al.*, 1987); a cromatografia gasosa - CG (SIPAHIMALANI *et al.*, 1991) e a cromatografia gasosa combinada com espectrômetro de massa - CG/EM (WOERDENBAG *et al.*, 1991; FERREIRA *et al.*, 1994). Algumas técnicas imunológicas também são descritas (JAZIRI *et al.*, 1993; FERREIRA & JANICK, 1996b).

A CG é pouco utilizada para quantificar artemisinina, devido a instabilidade térmica da molécula (SIPAHIMALANI *et al.*, 1991; FOGLIO, 1996; DELABAYS, 1997), causada, provavelmente, pela

natureza instável do seu grupo endoperóxido (WOERDENBAG *et al.*, 1991; GELDRE *et al.*, 1997). Entretanto, SIPAHIMALANI *et al.* (1991) descrevem o uso de CG como um método simples e rápido, com sensibilidade de até 100 ng, onde a detecção e a determinação de artemisinina é indireta e está baseada na relação linear obtida entre a concentração de artemisinina e as respectivas áreas dos picos de cada um dos seus dois produtos degradados termicamente (A e B). A artenuína-B (fig. 1), porém, apresenta o mesmo tempo de retenção que A nas condições do método, o que determina o uso da relação linear do composto B, somente, para quantificar indiretamente a artemisinina. WOERDENBAG *et al.* (1991) descrevem a utilização da CG, agregada ao uso combinado da CG/EM, que permite a determinação simultânea de artemisinina e alguns de seus precursores. Entretanto, o método não permite a dosagem simultânea do ácido artemisinínico.

Devido à ausência de cromóforos na molécula de artemisinina, CLAE/EQ é a técnica mais adequada. A sensibilidade do método é alta, permitindo detectar a artemisinina diretamente, até valores de 3 ng (ACTON *et al.*, 1985; CHARLES *et al.*, 1990). Segundo ACTON *et al.* (1985), no método CLAE/EQ, o grupo endoperóxido da molécula sofre redução eletroquímica. O método usa EDTA na fase móvel e um eletrodo de ouro/mercúrio altamente seletivo para artemisinina. CHARLES *et al.* (1990) propuseram um método alternativo ao de ACTON *et al.* (1985), usando um eletrodo de

carbono cristalino, sem EDTA na fase móvel, tornando o método mais rápido e conferindo um tempo maior de estabilização que o do eletrodo de ouro/mercúrio. Posteriormente, FERREIRA *et al.* (1994) promoveram alterações no método proposto por CHARLES *et al.* (1990), deixando-o mais rápido e eficiente. CLAE/EQ, porém, é considerado um método demorado quando há necessidade de se realizar um grande número de análises em curto espaço de tempo (WOERDENBAG *et al.*, 1991; ELHAG *et al.*, 1992; DELABAYS, 1997). Outro fator a considerar é que o detector eletroquímico exige um sistema totalmente isento de oxigênio, pois o oxigênio molecular é reduzido no mesmo potencial catódico da artemisinina (-0,8 a -0,9 V), conferindo um grau de dificuldade para estabilizar o detector (FOGLIO, 1996; DELABAYS, 1997; GELDRE *et al.*, 1997). Outros compostos análogos à artemisinina, produzidos naturalmente por *A.annua*, podem interferir na sua detecção, como é o caso do artemisiteno (fig. 1) (FERREIRA *et al.*, 1994).

Análises imunoquantitativas também são descritas na literatura, com resultados demonstrando alta sensibilidade, de 0,4 ng/ml (JAZIRI *et al.*, 1993) e 1,5 ng/ml (FERREIRA & JANICK, 1996b). As vantagens dos imunoensaios são a rapidez e a sensibilidade, permitindo realizar um grande número de análises e detectar artemisinina e compostos relativos em tecidos que apresentem baixas concentrações destes. A grande desvantagem da imunoquantificação é a falta de seletividade, uma vez que além da

artemisinina, o artemisiteno também apresenta o grupo endoperóxido, que reage com anticorpo, superestimando o teor de artemisinina (JAZIRI *et al.*, 1993; FERREIRA & JANICK, 1996b).

A CLAE/UV está entre as técnicas mais comumente usadas para análises fitoquímicas (DELABAYS, 1997). ELHAG *et al.* (1992), descrevem técnica usando CLAE/UV com detecção em λ = 216 nm, método que consideram simples, rápido, sensível e seletivo para determinar artemisinina e compostos relativos. No entanto, a artemisinina apresenta pouca absorbância na região ultravioleta do espectro eletromagnético, devido à carência de cromóforos na molécula que permitam uma detecção adequada (ZHAO & ZENG, 1986; ELSOHLY *et al.*, 1987; WOERDENBAG *et al.*, 1991; JAZIRI *et al.*, 1993; DELABAYS, 1997), além da ausência de grupos funcionais para uma derivatização direta (JAZIRI *et al.*, 1993; GELDRE *et al.*, 1997). Outra desvantagem, é que muitos compostos presentes em extratos de *A.annua* também absorvem entre 210 e 220 nm, obliterando completamente o pico da artemisinina (ELSOHLY *et al.*, 1987; CHARLES *et al.*, 1990; FERREIRA *et al.*, 1994). Uma reação química da molécula de artemisinina, visando a sua modificação estrutural para um composto espectrometricamente ativo se faz necessária. Para tal, ZHAO & ZENG (1986), usando CLAE/UV, descrevem um tratamento pré-coluna para artemisinina com solução alcalina, transformando-a em um composto denominado Q292, que é instável e este, por sua vez, através de tratamento ácido, é

rearranjado para um produto estável, que absorve muito bem em 260 nm, o qual foi denominado de Q260 (fig. 2). Segundo DELABAYS (1997), citando ZHAO (1987), este método apresenta uma sensibilidade elevada, próxima a 2,5 ng/ml. Paralelamente, a dosagem simultânea do ácido artemisinínico é possível, bem como, a automatização do método (DELABAYS, 1997). Todavia, CHARLES *et al.* (1990) consideram que o rearranjo da artemisinina para um produto que absorve em 260 nm também não é satisfatório, porque outros compostos presentes no extrato da planta também podem absorver neste comprimento de onda. ELSOHLY *et al.* (1987) descrevem um método CLAE/UV, com transformação pós-coluna da artemisinina para Q292, que é detectado diretamente, apresentando uma sensibilidade de até 25 ng.

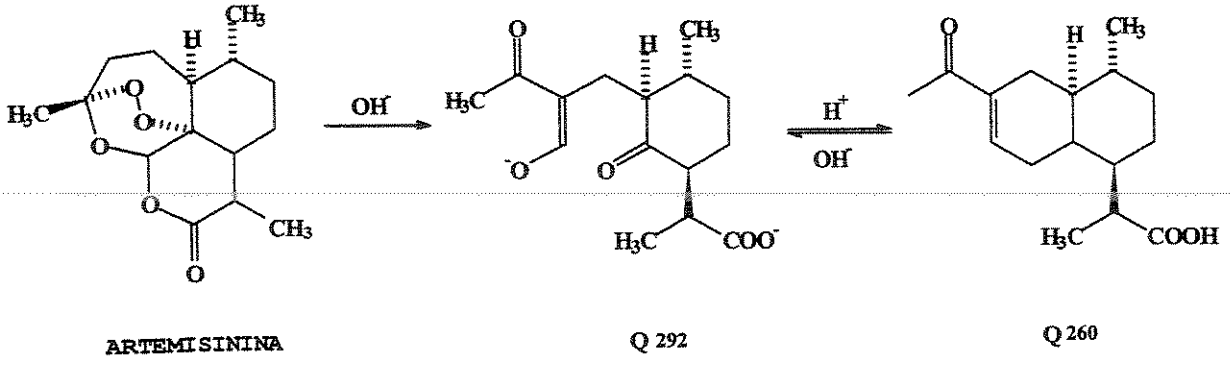

FIGURA 2. Conversão de artemisinina em Q260, segundo ZHAO & ZENG (1986).

A técnica CCD é considerada, por muitos autores, reprodutível, rápida e barata (FOGLIO, 1996; GUPTA *et al.*, 1996; DELABAYS, 1997; SARTORATTO *et al.*, 1997), onde é permitido dosar várias amostras em uma mesma corrida, além de possibilitar a análise simultânea de artemisinina e ácido artemisinínico (WOERDENBAG *et al.*, 1991; FOGLIO, 1996). PRAS *et al.* (1991) comparando CLAE-UV e CCD com leitura visual, encontraram uma boa correlação entre as duas técnicas, justificando que a CCD pode ser utilizada em trabalhos de seleção de plantas ricas em artemisinina, com grande quantidade de amostras, possibilitando obter uma idéia global da percentagem de artemisinina naquelas. GUPTA *et al.* (1996), comparando CCD/DT com CLAE/UV e DELABAYS (1997), comparando CCD/DT com CLAE/UV e CLAE/EQ, encontraram boas correlações entre CCD/DT e os métodos CLAE, utilizando CCD/DT com sucesso na análise de grande número de amostras de plantas, em experimentos de melhoramento de *A.annua*.

Entretanto, DELABAYS *et al.* (1994), comparando CCD/DT com CLAE/EQ, encontraram diferença nos resultados de ambas as técnicas, com CCD/DT apresentando teores em média 20% (mínimo de 16% e máximo de 28%) inferiores a CLAE/EQ. Segundo os autores, a explicação para tais desvios deve-se aos diferentes modos de extração das técnicas. CHARLES *et al.* (1990); FERREIRA (1994); GELDRE *et al.* (1997) não consideram o método CCD suficientemente sensível e preciso para quantificar artemisinina, devido à pouca

quantidade da molécula ser encontrada na forma intacta nos extratos da planta de *A.annua*, além de não ser possível evitar a interferência de outros compostos constituintes, presentes nos mesmos extratos. Outra desvantagem, que a análise quantitativa de substâncias através da CCD/DT demonstra, é o fato de compostos incolores, ao serem revelados, apresentarem distribuição desigual da mancha ou má resolução (WOERDENBAG *et al.*, 1991; LOPES, 1995), em função da quantidade do revelador utilizado, aquecimento ou volatilização da amostra (LOPES, 1995). Por outro lado, DELABAYS (1997), afirma que os autores que consideram a técnica CCD pouco adaptada para análises quantitativas de artemisinina, obtiveram suas conclusões a partir de resultados de análises de plantas pobres em artemisinina, aproximadamente 0,1% nas folhas, quando a precisão suficiente somente é encontrada com teores de no mínimo de 0,25%, sendo o teor ótimo o que vem próximo ou superior a 0,5%.

Em CCD/DT, os cromatogramas são escaneados mancha por mancha densitometricamente e avaliados por comparação da altura dos picos ou área dos picos dos padrões com os das amostras. As medidas são feitas na região da luz visível ou do UV - dependendo das propriedades das substâncias - geralmente em um comprimento de onda no qual as substâncias a serem determinadas apresentem o máximo de absorção ou fluorescência. A absorção é medida normalmente no modo reflectância. Substâncias coloridas ou

fluorescentes também podem ser medidas no modo transmitância, embora isto normalmente não apresente nenhuma vantagem sobre o modo reflectância (BAUER *et al.*, 1991).

2. OBJETIVOS

Verificar as vantagens e inconvenientes da técnica cromatografia em camada delgada com detecção fotodensitométrica, comparando-a com a técnica cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta, usadas em análises quantitativas de artemisinina em *Artemisia annua* L..

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL E REAGENTES UTILIZADOS

Como material vegetal, foi utilizado o híbrido de *A.annua* CPQBA 2/39x1V, que apresenta altos teores de artemisinina (MAGALHÃES *et al.*, 1997), o que é recomendado para análises em CCD/DT (DELABAYS, 1997). Folhas de nove repetições de cada tratamento (11/20 °C e 18/28 ° C), provenientes do experimento que comparou o efeito de duas amplitudes térmicas na produção de artemisinina em *A.annua* (capítulo II, ítem 3.2.), foram utilizadas nas análises para comparar o método CCD/DT com CLAE/UV. As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento CONVIRON CMP 4030, colhidas no ESTÁDIO B (DELABAYS, 1997) e secas em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 34 °C ± 1 °C durante 48 horas. Posteriormente, as folhas foram separadas dos talos e finamente moídas, em moinho de facas com malha 40. Durante a moagem, juntamente às folhas, foi adicionado gelo seco.

Os cristais de artemisinina utilizados nas análises foram purificados no Laboratório de Síntese Química do CPQBA (ponto de fusão obtido = 154-155 °C). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Em CLAE/UV, foram utilizadas acetofenona e acetonitrila grau CLAE.

Para comparar CCD/DT com CLAE/UV foram calculadas as correlações entre as duplicatas das repetições dentro de cada método e entre os métodos, além do teste *t de Student* comparando as repetições de cada método. Também, foram determinados os coeficientes de correlação dos padrões dos métodos.

3.2. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Esta análise baseou-se no método descrito por DELABAYS (1997). Para cada amostra, 100 mg de folhas finamente moídas foram extraídas em 5 ml de tolueno, em ultra-dispersor POLYTRON/PT2000, por 30 segundos a 20.000 RPM. Posteriormente, o extrato foi centrifugado durante 6 minutos a 3200 g.

Com uma microseringa, 3 µL de cada extrato foram aplicados sobre uma placa de sílica-gel 60 F_{254} (MERCK art. 1.05554). Cada placa recebeu 4 diferentes concentrações de artemisinina pura ou padrão (1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 µL de uma solução contendo 0,25 µg/µL) ao centro, mais 4 aplicações laterais, em duplicata, das amostras (fig. 3). As placas do ensaio foram eluídas em cuba de vidro previamente saturada com uma mistura de clorofórmio:metanol (98:2). Para a revelação, uma solução contendo 50 ml de ácido acético glacial, 0,5 ml de anisaldeído e 1,0 ml ácido sulfúrico concentrado, foi borrifada sobre as placas. Posteriormente, cada placa foi colocada em uma estufa a 110 °C durante 5 minutos.

Em seguida, para quantificar a artemisinina, usou-se um fotodensitômetro PHARMACIA BIOTHECH/IMAGE MASTER 1D, onde as placas ou cromatogramas foram escaneados fotodensitometricamente mancha por mancha e avaliados por comparação da área dos picos dos padrões com os das amostras (fig. 4). As medições foram

feitas na região da luz visível e a absorção foi medida no modo reflectância.

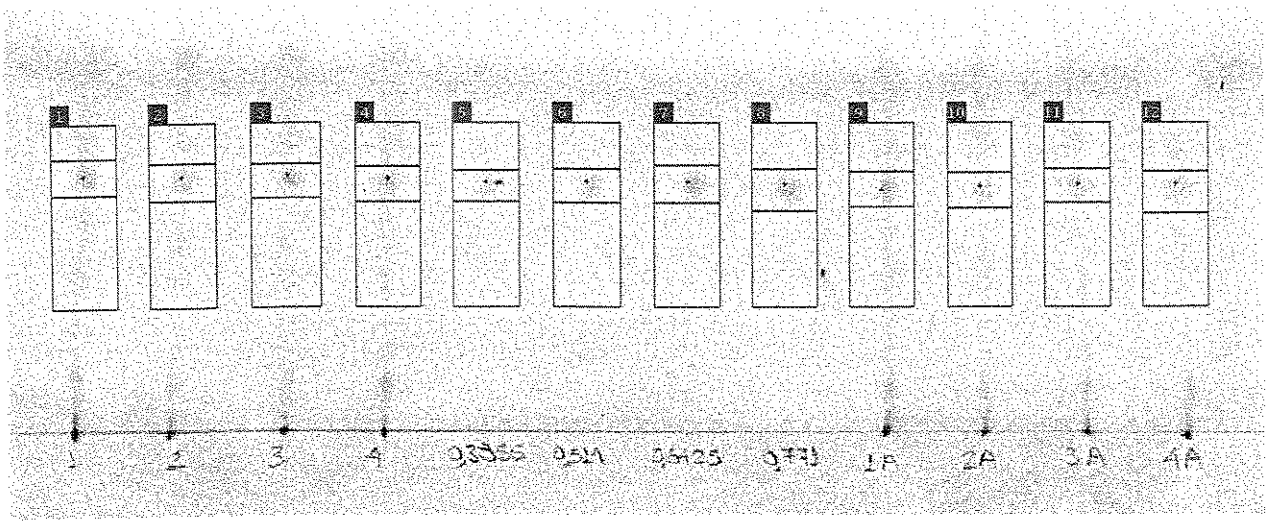

FIGURA 3. Imagem de uma cromatoplaca analisada fotodensitométricamente pelo programa IMAGE MASTER 1D da PHARMACIA BIOTHECH, detectando entre as linhas vermelhas manchas referentes à artemisinina. Ao centro, 4 manchas relativas aos padrões de artemisinina, e nas laterais, 4 manchas em duplicata relativas às amostras.

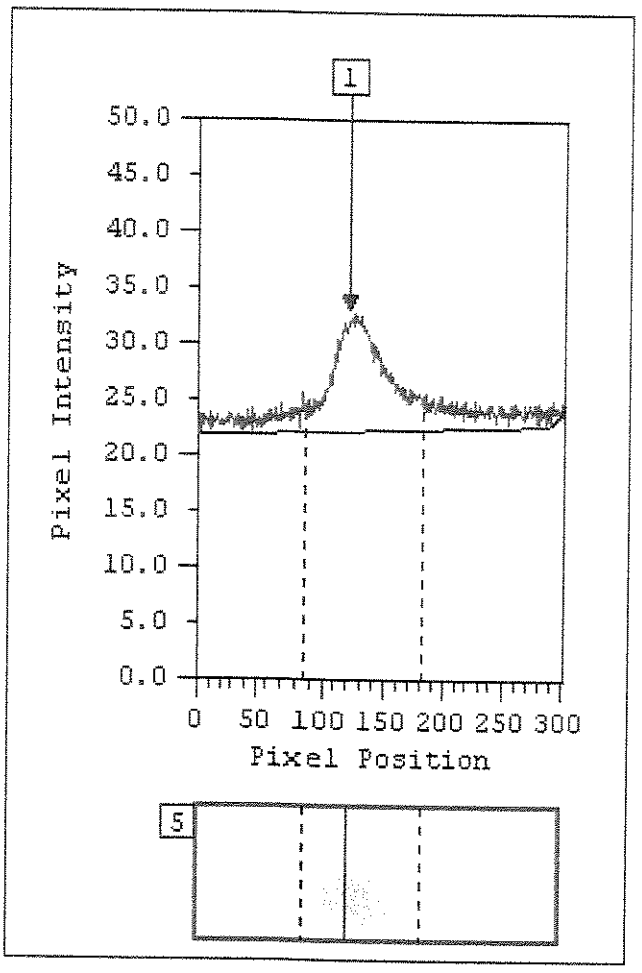

FIGURA 4. Cromatograma de uma mancha de artemisinina, quantificada fotodensitometricamente em placa de CCD pelo programa IMAGE MASTER 1D da PHARMACIA BIOTHECH. O pico 1 em azul é referente a mancha de artemisinina 5 da cromatoplaca mostrada na na fig. 3. A intensidade em pixel é referente a quantidade de luz refletida pela mancha.

3.3. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A quantificação de artemisinina por CLAE/UV foi conduzida de acordo com o método proposto por ZHAO & ZHENG (1986), com algumas adaptações. Este método utiliza inicialmente um tratamento pré-coluna da artemisinina, com solução alcalina, para a produção do composto Q292, que é transformado em meio ácido para Q260, este último perfeitamente detectável em UV (fig. 2).

Aproximadamente 100 mg de folhas finamente moídas foram extraídas com 5 ml de solução de extração contendo acetonitrila, mais 0,5 mg/ml de acetofenona, usada como padrão interno. A extração foi feita em um ultra-dispersor marca POLYTRON/PT2000 por 30 segundos a 20.000 RPM, seguida de uma centrifugação a 3200 g por 6 minutos. Para a derivatização da artemisinina (fig. 2), foram adicionadas em um tubo de reação, alíquotas (em duplicata) de 1,0 ml de cada extrato, 1,0 ml de EtOH 95% e 4,0 ml de solução aquosa de NaOH 0,2%. Os tubos foram fechados com tampas de borracha e a mistura foi aquecida a 40 °C durante exatos 15 minutos (com agitação magnética), para depois ser rapidamente resfriada em banho de gelo e neutralizada com a adição de 4 ml de ácido acético 0,1 M. Para a derivatização dos padrões de artemisinina, substituiu-se 1,0 ml de EtOH 95% por 1 ml da solução de extração. Três diferentes concentrações de artemisinina foram utilizadas como padrão, respectivamente, 0,04;

0,2 e 1,0 mg de artemisinina por ml de EtOH 95%. O teor de artemisinina foi avaliado por comparação da área dos picos dos padrões com os das amostras. Anteriormente à injeção, a mistura foi filtrada em filtro WATERS GVWP 0,2 µm.

O equipamento utilizado para dosar o Q260 por CLAE/UV, constituiu-se de um cromatógrafo WATERS modelo M-45 de pistão simples, com injeção manual e um compartimento de aquecimento para a coluna, onde a temperatura foi mantida a 47 °C. A separação foi efetuada em uma coluna WATERS/NOVA-PAK® C18/4µm/3,9 x 150 mm. Como fase móvel, foi utilizada uma solução de tampão fosfato 10 mM mais acetonitrila, numa proporção de 80:20, com uma vazão de 1,0 ml/minuto. Nestas condições, o tempo de retenção para Q260 foi de aproximadamente 3 minutos e para o padrão interno acetofenona de aproximadamente 8,5 minutos (fig. 5). O tempo necessário para a análise de cada amostra, foi de aproximadamente 50 minutos, já que após a detecção de Q260 e acetofenona, o fluxo da fase móvel era mantido por mais 40 min, limpando a coluna para a análise subsequente. A detecção foi feita no modo absorbância, em um comprimento de onda de 260nm, através de um detector WATERS/LANBDA MAX - 481. O volume de amostra injetado foi de 10µl.

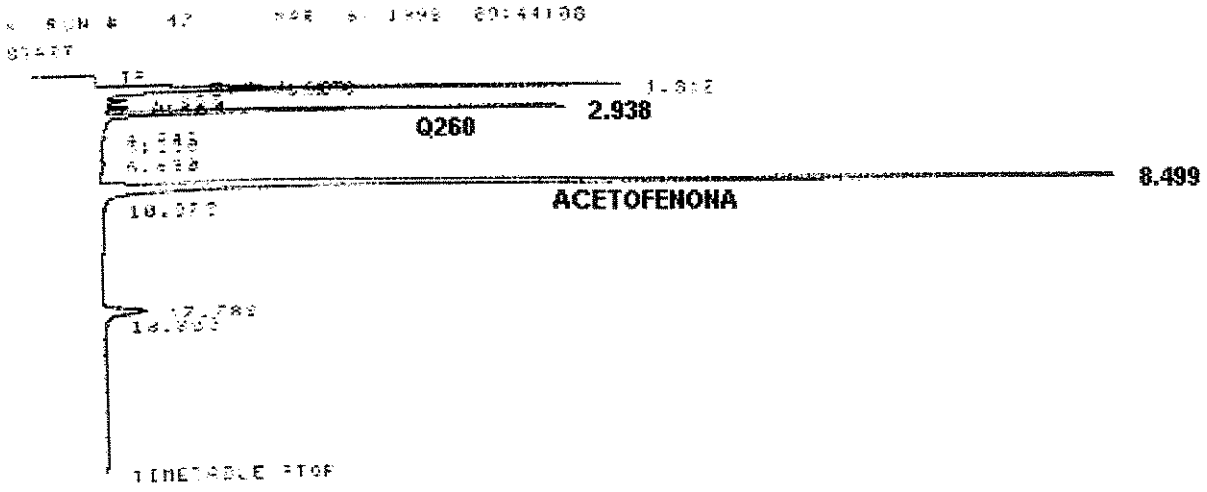

FIGURA 5. Cromatograma CLAE/UV, referente a análise quantitativa do Q260 e, indiretamente, de artemisinina.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os coeficientes de correlação (R^2) encontrados para os padrões de artemisinina em CCD/DT variaram entre 0,900 (fig. 6) e 0,988, sendo em média superiores a 0,950. Todavia, os coeficientes de correlação para CCD/DT, quando comparados aos encontrados para CLAE/UV, R^2 = 0,999 (fig. 7), foram menores e apresentaram maior variação. Durante a execução do método CCD/DT, foi comum encontrar pontos localizados fora da reta, obrigando a reconfecção da cromatoplaca. Isto, provavelmente, é decorrente do fato de compostos incolores como artemisinina, ao serem revelados, apresentarem distribuição desigual da mancha ou má resolução, ou ainda, em função da quantidade do revelador utilizado, aquecimento ou volatilização da amostra durante a aplicação (WOERDENBAG *et al.*, 1991; LOPES, 1995).

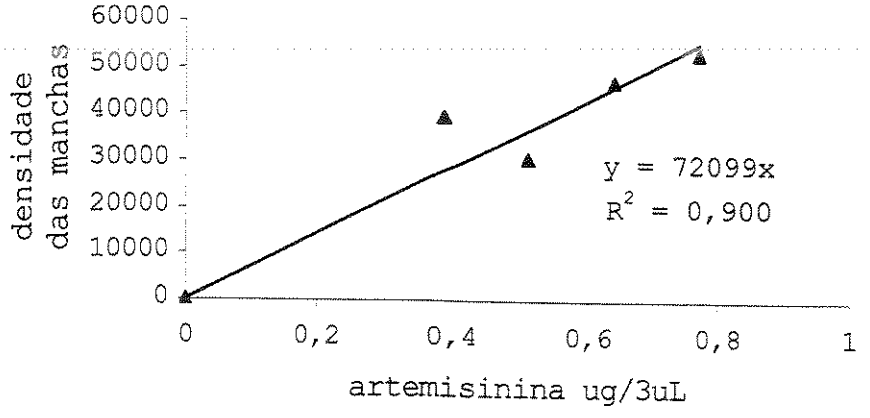

FIGURA 6. Curva padrão para análise de artemisinina por CCD/DT.

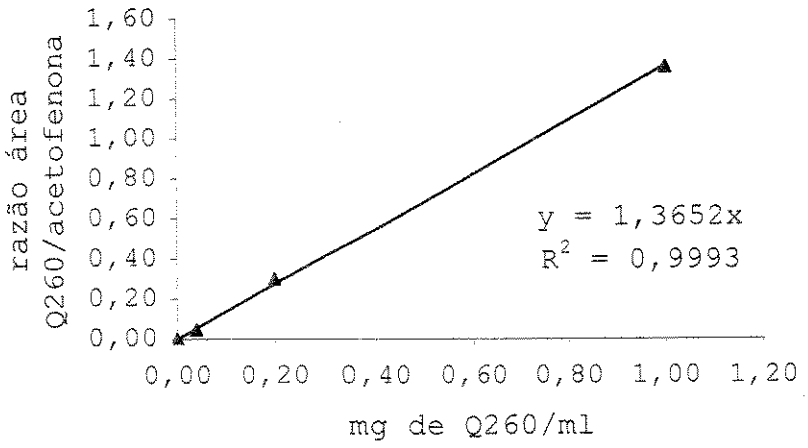

FIGURA 7. Curva padrão para análise do derivado da artemisinina - Q620 por CLAE/UV.

Além de curvas padrão, a precisão da técnica CCD/DT foi verificada efetuando-se aplicações em duplicatas de um mesmo extrato/amostra de *A.annua*, em uma única cromatoplaca (fig. 3). Após a quantificação fotodensitométrica, os resultados das duplicatas foram comparados, determinando-se o coeficiente de correlação (R^2) existente entre os mesmos. A mesma operação também foi feita para CLAE/UV. Para ambos os métodos foram encontradas correlações próximas, $R^2 = 0,748$ para CCD/DT e $R^2 = 0,622$ para CLAE/UV, como podemos verificar nas figuras 8 e 9. A correlação similar observada entre os métodos CCD/DT e CLAE/UV, possivelmente, deve-se ao fato de que as duplicatas de cada amostra em CCD/DT foram sempre aplicadas em uma mesma placa, diminuindo possíveis erros.

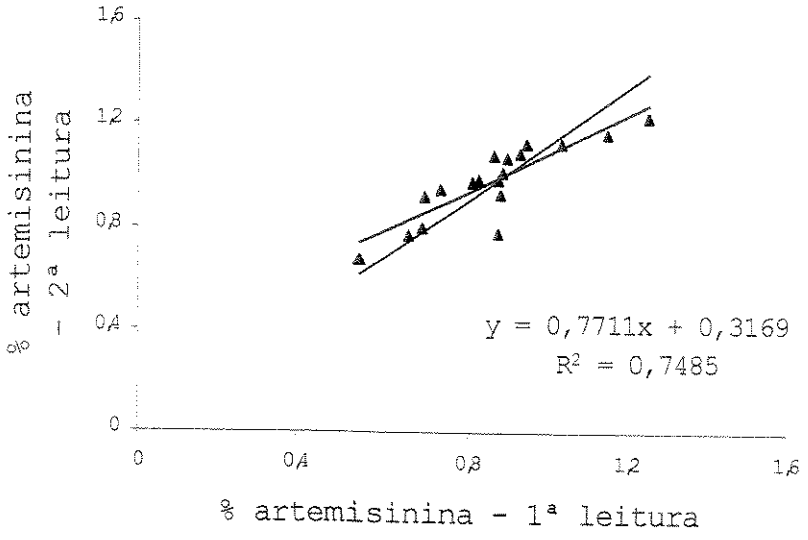

FIGURA 8. Correlação entre leituras em duplicata utilizando CCD/DT (——— curva esperada; ——— curva obtida).

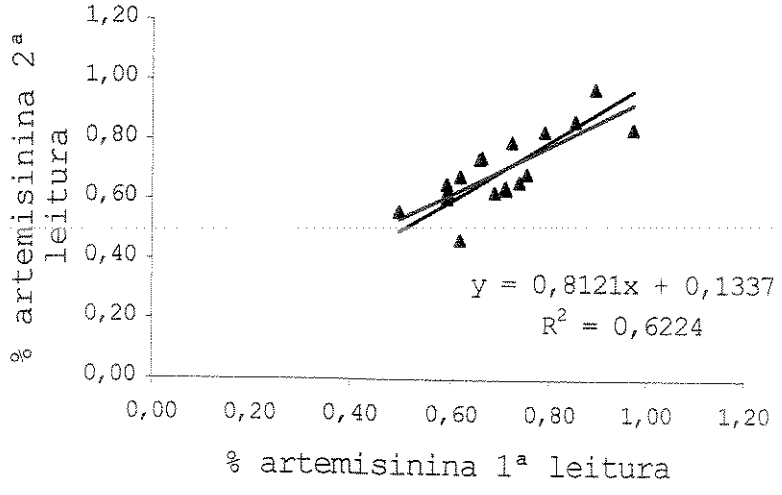

FIGURA 9. Correlação entre leituras em duplicata, utilizando CLAE/UV (——— curva esperada; ——— curva obtida).

Quando os dois métodos foram comparados, observou-se um R^2 = 0,199, evidenciando uma baixa correlação entre eles (fig. 10).

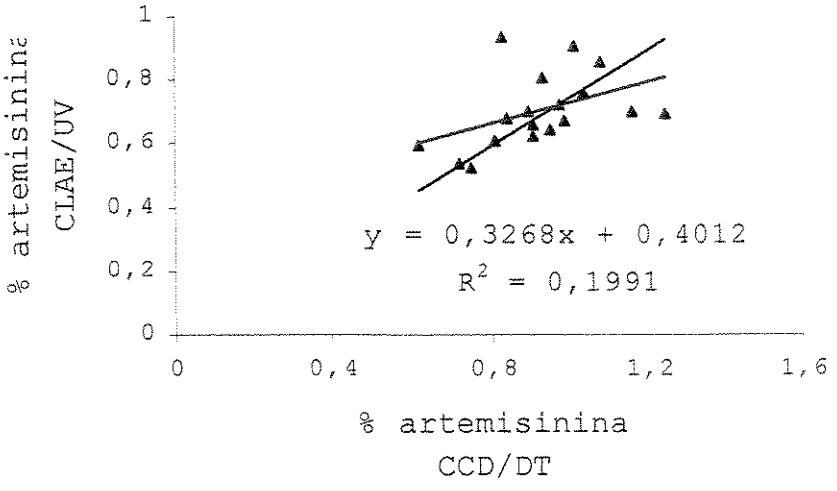

FIGURA 10. Comparação entre os métodos CLAE/UV e CCD/DT (—— curva esperada; —— curva obtida).

Conforme pode-se observar na tabela 1, a CCD/DT apresentou nas amostras analisadas, maior variação nos teores de artemisinina que a CLAE/UV, registrando um coeficiente de variação (C.V.) de 19% para o tratamento 11/20 ^{0}C. O coeficiente de variação da uma idéia da precisão do método, e, provavelmente, face à variação encontrada para CCD/DT, não foram detectadas diferenças significativas para o teor de artemisinina entre os tratamentos (11/20 ^{0}C e 18/28 ^{0}C). Já para CLAE/UV os tratamentos diferiram significativamente.

TABELA 1. Teores de artemisinina, expressos em percentagem da massa seca de folhas de plantas de *A.annua*, submetidas a duas amplitudes térmicas de cultivo e analisadas por CLAE/UV e CCD/DT.

amplitudes térmicas	CLAE/UV Q260[1] (mg.g^{-1})	C.V.[2] %	CCD/DT artemisinina[1] (mg.g^{-1})	C.V.[2] %	variação % em relação a CLAE/UV
11/20 °C	6,3	11	8,5	19	+ 34,9
18/28 °C	7,8***	13	9,9	12	+ 26,9

1 Média de 09 repetições.

2 C.V.: coeficiente de variação.

*** Significativo ($p \leq 0,003$) pelo teste *t de Student*.

Ainda na tabela 1, verificamos que o método CCD/DT apresentou teores de artemisinina superiores àqueles encontrados para CLAE/UV, aumentando em 34,9% para 11/20 °C e 26,9% para 18/28 °C. Isso deve-se, provavelmente, à interferência de outros compostos presentes no extrato de *A.annua* (CHARLES *et al.*, 1990; FERREIRA, 1994; GELDRE *et al.*, 1997), levando a uma superestimação dos teores de artemisinina. Esses resultados contrariam os encontrados por DELABAYS *et al.* (1994), que sugerem uma produção de artemisina 20% menor por CCD/DT, quando comparada com CLAE/EQ.

Essas diferenças podem ser atribuídas às diversas operações manuais exigidas pelo método CCD/DT durante sua realização, as quais podem gerar diferenças nas leituras, principalmente quando todas as repetições não cabem em uma mesma cromatoplaca. Face a isto, algumas considerações devem ser feitas: 1 - para este experimento, as aplicações das amostras e padrões nas cromatoplacas foram feitas manualmente com uma microseringa. Dependendo do tempo levado na aplicação, o solvente da extração pode evaporar e parte da amostra secar na ponta da agulha da microseringa. 2 - durante a revelação, o revelador é borrifado manualmente na cromatoplaca e a quantidade distribuída pode ser desigual entre placas diferentes ou até mesmo em uma única placa, interferindo na quantidade de artemisinina detectada na fotodensitometria.

Face às considerações acima, é provável que as operações manuais exigidas para o método CCD/DT, contribuíram para diminuir a precisão do mesmo.

5. CONCLUSÕES

A técnica de cromatografia em camada delgada com detecção fotodensitométrica, não apresentou o grau de seletividade e sensibilidade necessários para considerá-la um método de análise quantitativo. Já, a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta foi o método mais seletivo e sensível para análises quantitativas de artemisinina.

CAPÍTULO II - FATORES ABIÓTICOS ASSOCIADOS À PRODUÇÃO DE ARTEMISININA EM *Artemisia annua* L.

1. INTRODUÇÃO

A história da evolução das plantas superiores é de constante adaptação aos estresses do ambiente e à pressão de herbívoros. Contudo, a despeito destas adversidades, raramente encontra-se um habitat no mundo onde nenhuma planta possa ser encontrada. Estas plantas têm sobrevivido graças a sua enorme flexibilidade para adaptar-se a condições distintas de crescimento oferecidas pela diversidade de ambientes existentes no planeta. As plantas podem adaptar-se através de alterações morfológicas, alterações fisiológicas ou mudanças bioquímicas. Nos últimos anos, tem-se observado um aumento no interesse em compreender o modo pelo qual as plantas se adaptam bioquimicamente aos ambientes adversos. Adaptações bioquímicas podem envolver tanto o metabolismo primário, quanto o metabolismo secundário das plantas (DEY & HARBORNE, 1997). Portanto, a concentração de metabólitos secundários pode aumentar como resultado de estresses ambientais (HARBORNE, 1993; DEY & HARBORNE, 1997).

Dentre os estresses estudados, causados por ambientes adversos, que interferem na produção de metabólitos secundários,

podemos citar o estresse hídrico, a radiação ultravioleta, a deficiência nutricional, a salinidade, os metais pesados, os extremos de temperatura, ataques de insetos e patógenos, e danos mecânicos (GERSHENZON, 1984; MANN, 1987; HARBORNE, 1993; DIXON & PAIVA, 1995; DEY & HARBORNE, 1997).

Segundo HERMS & MATTSON (1992) as plantas superiores podem ser consideradas como uma cadeia integrada de sistemas celulares organizados em subunidades morfologicamente especializadas (módulos), entre os quais a distribuição dos recursos é regulada através de uma complexa relação fonte/dreno. Estes módulos são repetidas unidades multicelulares originárias de simples meristemas, que combinados, formam níveis superiores de organização como raízes, ramos e folhas, até formarem uma planta inteira. Os módulos dentro de uma planta são semi-autônomos, sendo que a translocação de recursos dentro deles pode ser restrita.

As plantas exportam carbono de fontes (folhas e órgãos de armazenamento) para drenos (meristemas ativos e sítios de acumulação de reservas). Um dreno forte é produto do seu tamanho e atividade metabólica, e meristemas que crescem ativamente são fortes drenos de fotoassimilados. Grande atividade meristemática requer extenso suprimento de água e nutrientes direcionados à expansão e divisão celular. Por isso, drenos fortes são função da disponibilidade de recursos. A força da fonte é função da disponibilidade de carbono para exportação. Quando a

disponibilidade de recursos (luz, água e nutrientes) é muito limitada, ocorre uma redução na fotossíntese e no crescimento. Quando os recursos disponíveis para as plantas são muito escassos, a respiração de manutenção e processos do metabolismo primário recebem prioridade no uso do carbono disponível (HERMS & MATTSON, 1992).

A forma exata da alocação de recursos entre crescimento e metabolismo secundário, todavia, ainda não foi estabelecida para nenhuma espécie vegetal. Entretanto, a teoria fonte/dreno, sugere uma relação não linear entre taxa de crescimento e metabolismo secundário, conforme podemos visualizar na fig. 1 (HERMS & MATTSON, 1992).

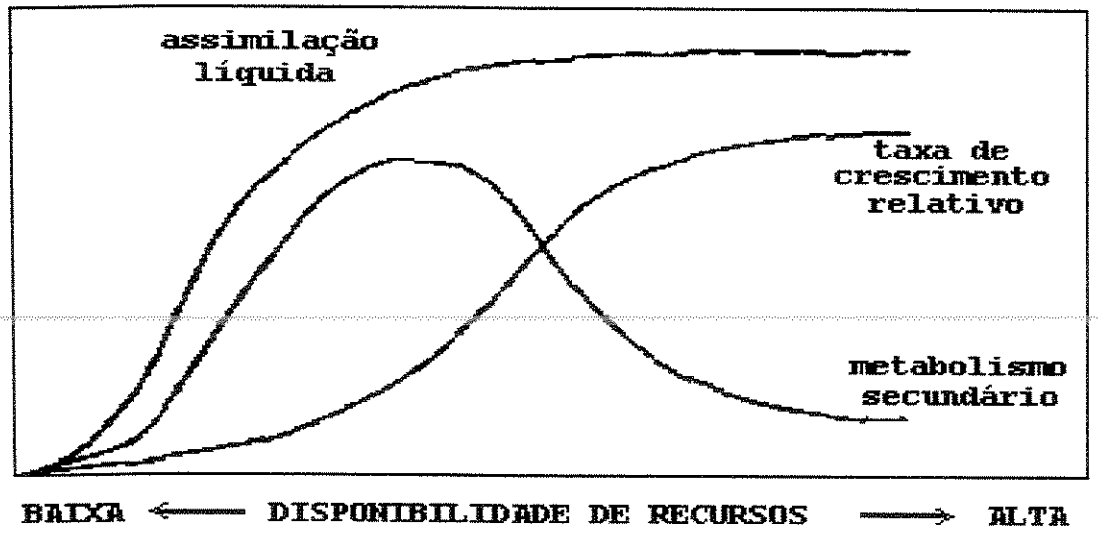

FIGURA 1. Taxa de assimilação líquida, taxa de crescimento relativo e metabolismo secundário, em resposta a mudanças na disponibilidade de recursos (HERMS & MATTSON, 1992).

Quando as condições ambientais são favoráveis, o crescimento vegetativo geralmente recebe recursos prioritariamente, em detrimento do metabolismo secundário e do armazenamento. Consequentemente, variações quantitativas no metabolismo secundário de plantas, são função da variação da taxa de crescimento dos módulos individuais, bem como, da proporção de módulos que crescem ao mesmo tempo. Se uma grande quantidade de módulos crescem simultaneamente, a produção de metabólitos secundários pode ser limitada por falta de substrato.

Sob condições de estresse, fotossíntese e crescimento não respondem igualmente a gradientes de água e nutrientes. Os processos de crescimento são rapidamente afetados, ainda que sob moderados estresses de água e nutrientes, principalmente a deficiência hídrica, onde o decréscimo no turgor causa o cessamento do alongamento celular com conseqüente diminuição no crescimento. Todavia, a fotossíntese líquida não é sensível a limitações moderadas destes recursos (HERMS & MATTSON, 1992; KRAMER & BOYER, 1995; LARCHER, 1995), como podemos verificar na fig. 2. Consequentemente, quando ocorrem estresses moderados, impõe-se uma limitação nos drenos relativos ao crescimento, acumulando-se o excedente em carboidrato. Portanto, fatores que limitam o crescimento mais que a fotossíntese, como deficiências hídricas moderadas, baixas temperaturas e limitação relativa de nutrientes, podem aumentar o "pool" de carbono disponível para alocação no metabolismo secundário (fig. 1), com pouca ou nenhuma

competição com o crescimento (HERMS & MATTSON, 1992; HARBORNE, 1993).

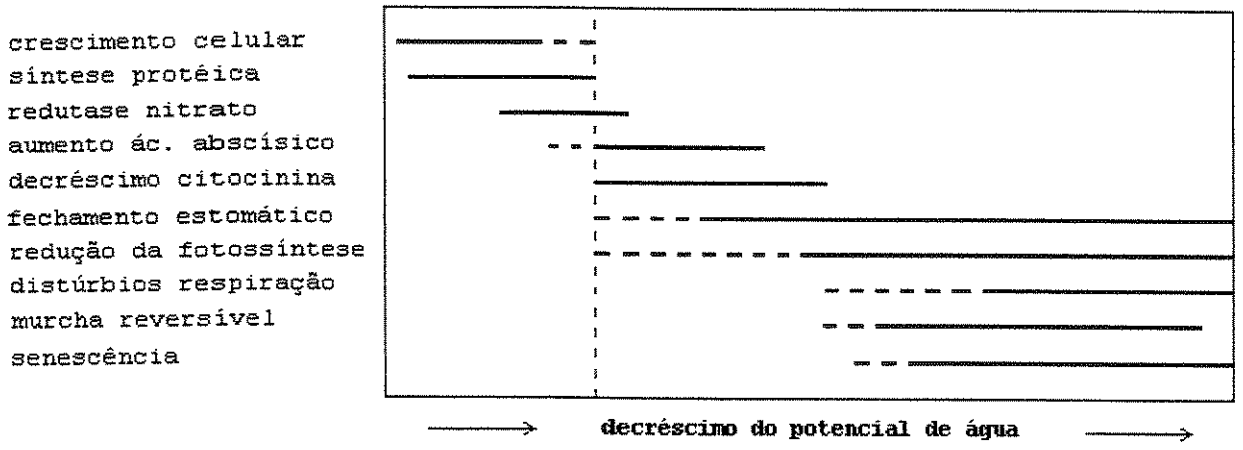

FIGURA 2. Funções e processos celulares dos vegetais afetados pela deficiência hídrica. As linhas horizontais mostram as faixas de DH em que ocorrem reações na maioria das espécies de plantas. A linha vertical indica o fechamento estomático (adaptado de LARCHER, 1995).

Em ambientes com abundância de recursos, processos de crescimento recebem alocação prioritária de recursos, decrescendo a disponibilidade relativa de carbono para suportar o metabolismo secundário. Já em outro extremo, nas situações onde o nível de recursos é muito baixo, a fotossíntese e o crescimento são afetados e processos vitais do metabolismo primário podem receber prioridade no uso de carbono em baixa disponibilidade (HERMS & MATTSON, 1992; KRAMER & BOYER, 1995; LARCHER, 1995), ocorrendo

uma redução na síntese de metabólitos secundários (HERMS & MATTSON, 1992), como podemos verificar na fig. 1.

Informações sobre o efeito de condições de estresse no metabolismo secundário de plantas, são derivadas principalmente de esforços da pesquisa para maximizar a produção de constituintes ativos de espécies medicinais, aromáticas e condimentares. Como aplicação prática, avanços no sentido de compreender a influência de fatores ambientais na regulação da síntese de metabólitos secundários podem contribuir para a maximização da produção de compostos de interesse nestas espécies (GERSHENZON, 1984).

A produção de artemisinina em *A.annua* é afetada pela variação das condições de ambiente em que a espécie é cultivada (SINGH *et al.*, 1986; CHEN & ZHANG, 1987; FERREIRA *et al.*, 1995; GELDRE *et al.*, 1997).

Segundo GERSHENZON (1984), no geral, em plantas herbáceas e arbustos, os compostos terpênicos, como a artemisinina, tendem a aumentar sob condições de estresse, principalmente em deficiência hídrica moderada.

CHARLES *et al.* (1993), em experimento conduzido em campo, avaliaram o efeito de diferentes níveis de potencial de água (Ψw) no solo sobre a produção de artemisinina em *A.annua*. Plantas de aproximadamente 60 dias foram submetidas a quatro tratamentos de deficiência hídrica (DH) no solo, assim denominados pelos autores: estresse leve (Ψw – 0,05 MPa); estresse intermediário

(Ψw - 0,1 MPa); estresse moderado (Ψw - 1,5 MPa), todos os três impostos às plantas por um período de aproximadamente 77 dias. O quarto tratamento foi uma combinação de estresse leve (37 dias) e de estresse moderado (27 dias). Segundo os autores, a DH por longos períodos (01 julho - 17 setembro) não estava relacionada com o conteúdo de artemisinina e produção de plantas e folhas. A DH durante as duas semanas anteriores à colheita estava associada com a redução na altura das plantas ($p \leq 0,014$). A análise de regressão revelou que o aumento da DH (diminuição do Ψw) durante as duas semanas anteriores (20 agosto - 05 setembro) à colheita (17 setembro), induziram uma redução do teor de artemisinina nas plantas. Todavia, é importante destacar que no trabalho acima, a medida de Ψw não foi determinada nas plantas, e sim no solo. Segundo BOYER (1995) em experimentos com DH, é recomendável utilizar medidas do Ψw das plantas, em detrimento de medidas de Ψw do solo. Dessa forma, quando as medidas de Ψw são feitas na planta, possíveis variações do ambiente que não seriam mensuráveis medindo-se o Ψw no solo e que poderiam afetar o Ψw da planta, são eliminadas.

Outro fator ambiental que pode afetar o teor de artemisinina em *A.annua* é a temperatura. FERREIRA (1994) conduzindo experimentos em casa de vegetação, encontrou diferenças no teor de artemisinina de plantas cultivadas em épocas distintas, atribuindo a variação ao efeito da temperatura e sugeriu que

altas temperaturas reduzem o teor de artemisinina em *A.annua*. MAGALHÃES (1996) em experimento comparando diferentes genótipos, realizado em câmara de crescimento, observou que temperaturas entre 22 e 26 ^{0}C induziram um teor de artemisinina maior que temperaturas entre 25 e 31 ^{0}C. Todavia, este comportamento não foi padrão para todos os genótipos testados. Além do mais, o decréscimo nos teores de artemisinina, em conseqüência da maior temperatura ambiente foi compensado por um aumento da fitomassa foliar, resultando em rendimentos de artemisinina por planta, semelhante nas duas faixas de temperatura.

Por outro lado, CHEN & ZHANG (1987) comparando o efeito de três diferentes temperaturas no crescimento de *A.annua*, verificaram que o conteúdo de artemisinina analisado aos 35 e 70 dias de crescimento, foi significativamente maior em plantas submetidas à temperatura de 30 ± 0,5 ^{0}C, comparativamente às plantas submetidas às temperaturas de 25 ± 1 ^{0}C ou 28 ± 0,5 ^{0}C. Porém, também neste caso, o comportamento não foi padrão para todos os genótipos testados.

2. OBJETIVOS

Verificar a influência da deficiência hídrica e da temperatura no acúmulo de artemisinina e na produção de fitomassa em plantas de *Artemisia annua* L..

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. INFLUÊNCIA DA DEFICIÊNCIA HÍDRICA NO ACÚMULO DE ARTEMISININA EM *A.annua*.

3.1.1. EXPERIMENTO 01: Plantas de *A.annua* de 84 dias submetidas a diferentes níveis de deficiência hídrica.

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento CONVIRON modelo CMP 4030, no Centro Nacional de Pesquisa de Trigo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - CNPT/EMBRAPA, localizado na cidade de Passo Fundo - RS (28°15' S, 52°24' W e 689 m de altitude).

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, recomendado para ensaios em câmaras de crescimento e casas de vegetação, onde as condições experimentais são perfeitamente controladas (BANZATTO & KRONKA, 1989; LITTLE & HILLS, 1990). Foram utilizadas sementes do híbrido 2/39x1V, desenvolvido pelo programa de melhoramento de *A.annua* do CPQBA - UNICAMP. Cada repetição foi constituída de uma única planta. Foram utilizadas 06 repetições para cada tratamento. Os tratamentos constaram de 04 níveis de DH (04 grupos de seis plantas submetidas a 14, 38, 62 e 86 horas de supressão de irrigação) e seus respectivos controles irrigados. As médias dos

tratamentos submetidos à DH foram comparadas com as de seus controles pelo teste *t de Student* no programa SYSTAT 5.0.

O substrato utilizado para o crescimento das plantas foi uma mistura de terra vegetal e solo de banhado, com textura uniforme (peneirado), cuja análise de fertilidade consta a seguir: pH 6,8; Al^{3+} 0,0 cmol(+)/dm^3; Ca^{2+} 7,4 cmol(+)/dm^3; Mg^{2+} 5,99 cmol(+)/dm^3; P 65,9 mg/dm^3; K^+ 0,47 cmol(+)/dm^3; S 13,86 cmol(+)/dm^3; Cu 4,8 mg/kg; Zn 5,2 mg/kg; Fe 140 mg/kg e M.O. 25,5 g/dm^3.

A semeadura foi realizada em 14/05/97, em casa de vegetação, com temperatura de ± 25 °C, diretamente em vasos plásticos de 700 ml, contendo 630g de substrato. Cada vaso recebeu aproximadamente 10 sementes. Os vasos foram dispostos sobre bandejas de alumínio, nas quais foi mantida uma lâmina de água de aproximadamente 2 cm. Desta forma a água ascendia no substrato dos vasos plásticos via capilaridade, ocupando apenas os microporos do substrato.

O translado das plantas para a câmara de crescimento foi feito no dia 18/06/97, cujas condições de cultivo foram temperaturas entre 21 e 24 ^{0}C, umidade relativa de aproximadamente 70% e uma PAR de 220 µmol.m^{-2}.s^{-1} mantida durante o período de 18/06/97 a 21/07/97. Buscando evitar o florescimento das plantas, o número de horas de luz fornecido às plantas foi de 10 horas e 30 minutos, abaixo do fotoperíodo crítico determinado para a indução floral de 13 horas e 31 minutos (FERREIRA *et al.*, 1995; JANIK, 1996) ou entre 12 e 14 horas (GELDRE *et al.*, 1997),

e 11 horas (MAGALHÃES, 1996). A PAR foi medida com um quantômetro marca LI-COR INC./modelo LI-185B.

A germinação das sementes foi desuniforme, o que tornou necessário vários transplantes antes do desbaste final, em 09/07/97, quando foi mantida apenas uma planta por vaso.

Em 21/07/97 as plantas foram aleatóriamente divididas em duas câmaras de crescimento, uma contendo às plantas controle, constantemente irrigadas e na outra às plantas que foram submetidas à DH. Foram mantidas 104 plantas uniformes por câmara. As regulagens das câmaras de crescimento foram mantidas, aumentando-se apenas a PAR para 350 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$.

No dia 05/08/97, às 16 horas, quando as plantas de todos os tratamentos encontravam-se no estádio B (alongamento) da escala fenológica descrita por DELABAYS (1997), com 84 dias após a semeadura e com altura média de 37,3 cm, foi suspensa a irrigação das plantas selecionadas para os tratamentos com DH. Devido a problemas de manutenção da umidade relativa na câmara de crescimento das plantas submetidas ao estresse, a DH evoluiu rapidamente, permitindo acompanhar apenas 4 níveis de DH nas plantas. As variações na umidade relativa da câmara nos dias 7, 8, e 9, foram, respectivamente, 55%, 43% e 39,7%. As regulagens previstas para temperatura não sofreram variações.

Nos dias 06, 07, 08 e 09/08/97, respectivamente, após 14, 38, 62 e 86 horas da supressão da irrigação, avaliou-se o

potencial de água (Ψw) no xilema das plantas. Também, neste mesmo período, foi determinado o Ψw das plantas do tratamento irrigado. Em 09/08/97 as plantas que restaram do tratamento com 86 horas sem irrigação, foram reidratadas e transferidas para casa de vegetação (temperatura máxima de 31°C e mínima de 11°C) e foi determinado o Ψw das mesmas nos dias 12/08/97 e 25/08/97.

As determinações de Ψw no xilema das plantas foram feitas às 06 horas da manhã, nas folhas da parte mediana das plantas, usando-se uma câmara de pressão da SOILMOISTURE EQUIPAMENT CORPORATION/ STA BARBARA-CA-USA, de acordo com técnica descrita por TURNER (1981) e BOYER (1995).

Além do Ψw, foram medidas a massa seca de folhas e de talos, e a relação folha/talo. Imediatamente após a leitura do Ψw, as plantas foram cortadas rente ao vaso e colocadas para secar em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 34 °C ± 1 °C por 96 horas, de acordo com FIGUEIRA & SARTORATO (1997), que sugerem temperaturas de no máximo 40 °C para a secagem de *A.annua*.

As análises para determinar o teor de artemisinina nas folhas dos tratamentos foram realizadas em março de 1998. Segundo FIGUEIRA & SARTORATO (1997) amostras secas de folhas de *A.annua* podem ser armazenadas em condições ambientes até 7 meses, sem ocasionar alterações significativas no conteúdo de

artemisinina. A determinação dos teores de artemisinina foi feita em cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta, conforme técnica descrita no item 3.3. do capítulo I, desenvolvida por ZHAO & ZHENG (1986).

3.1.2. EXPERIMENTO 02: Plantas de *A.annua* de 147 dias submetidas a diferentes níveis de deficiência hídrica.

Para confirmar os resultados do experimento 01 de DH, outro experimento foi conduzido em casa de vegetação, no Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná - CEFET-PR, localizado na cidade de Pato Branco - Pr (26°11' S, 52°36' W e 760 m de altitude).

Foram utilizadas sementes do híbrido 2/39x1V. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado. Cada repetição foi constituída de uma única planta. Foram utilizadas 08 repetições para cada tratamento. Os tratamentos constaram de 5 grupos de 8 plantas submetidas a 18,5; 42,5; 66,5; 90,5 e 114,5 horas de supressão de irrigação, mais 2 grupos de 8 plantas submetidas a 114,5 horas de supressão e posteriormente irrigados por 72 e 144 horas, além dos seus respectivos controles irrigados. As médias dos tratamentos submetidos a DH foram comparadas com as de seus controles pelo teste *t de Student* no programa SYSTAT 5.0.

A semeadura foi realizada em 01/07/97, em casa de vegetação, em bandejas de isopor contendo uma mistura de terra vegetal mais vermiculite. Em 30/09/97, as plantas foram transplantadas para vasos plásticos contendo 2 kg de substrato, que ficaram dispostos

sobre bandejas de alumínio, nas quais era mantida uma lâmina de água com aproximadamente 2 cm.

O substrato utilizado para o crescimento das plantas foi uma mistura de terra vegetal e composto orgânico, com textura uniforme (peneirado), cuja análise de fertilidade consta a seguir: pH 5,9; Al^{3+} 0,0 cmol(+)/dm^3; Ca^{2+} 11,9 cmol(+)/dm^3; Mg^{2+} 6,35 cmol(+)/dm^3; P 137,5 mg/dm^3; K^+ 2,65 cmol(+)/dm^3; S 20,9 cmol(+)/dm^3 e M.O. 87,1 g/dm^3.

O número de horas de luz fornecido às plantas foi de 16 horas, acima do fotoperíodo crítico determinado para a indução floral de 13 horas e 31 minutos (FERREIRA *et al.*, 1995; JANIK, 1996) ou entre 12 e 14 horas (GELDRE *et al.*, 1997), e 11 horas (MAGALHÃES, 1996). A complementação de luz para atingir as 16 horas de fotoperíodo e evitar o florescimento, foi feita com luz artificial (fluorescente e incandescente), uma vez que o fotoperíodo natural em Pato Branco - PR, durante o período da realização do experimento, encontrava-se na faixa indutiva para *A.annua* (fig. 3). Em 20/11/97, as plantas dos tratamentos que sofreram a DH, foram separadas do grupo de plantas controle. No dia 24/11/97, às 11 horas e 30 minutos, quando as plantas de todos os tratamentos encontravam-se no estádio B (alongamento) da escala fenológica descrita por DELABAYS (1997), com 147 dias e altura média de 85 cm, foi suspensa a irrigação das plantas selecionadas para os tratamentos com DH.

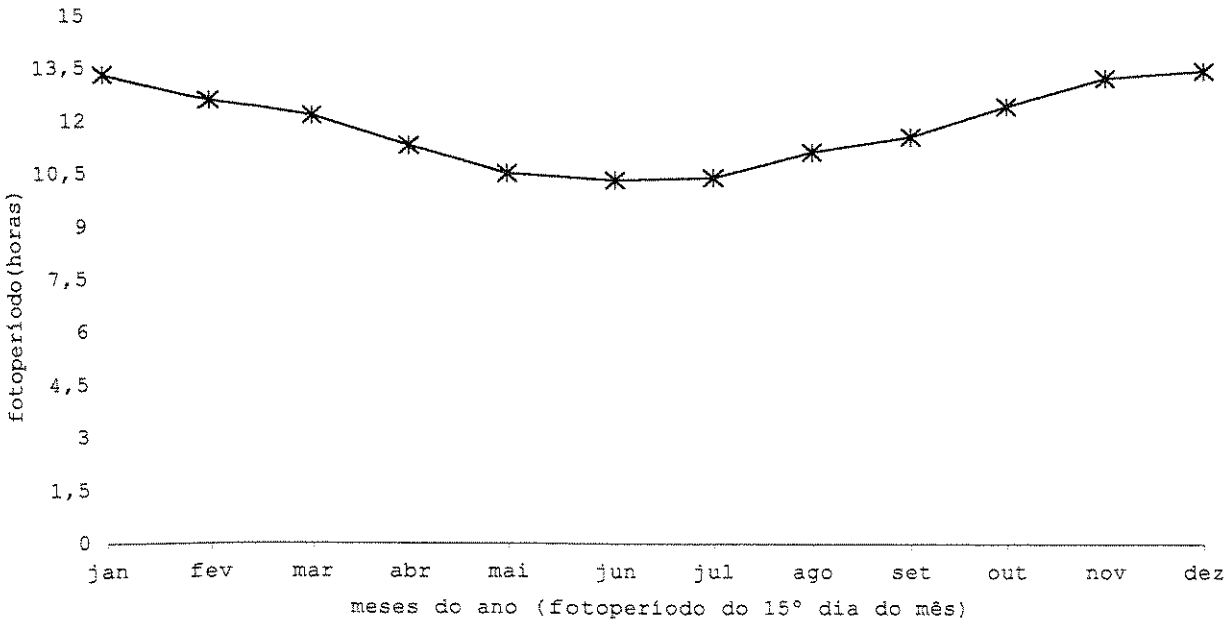

FIGURA 3. Fotoperíodo anual em Pato Branco - PR (26°11' S, 52°36' W e 760 m de altitude). Fonte: CNPT-EMBRAPA.

O potencial de água (Ψw) no xilema das plantas foi determinado nos dias 25, 26, 27, 28 e 29/11/97 após 18,5; 42,5; 66,5; 90,5 e 114,5 horas da supressão de irrigação, respectivamente, e nos dias 02 e 05/12/97 após 72 e 144 horas da reidratação das plantas submetidas a 114,5 horas de supressão da irrigação, respectivamente. Também, neste mesmo período, foi determinado o Ψw das plantas do tratamento irrigado.

As determinações do Ψw no xilema das plantas foram feitas às 06 horas da manhã, nas folhas da parte mediana das plantas,

usando-se uma câmara de pressão da SOILMOISTURE EQUIPAMENT CORPORATION/ STA BARBARA-CA-USA, em acordo com técnica descrita por TURNER (1981) e BOYER (1995).

Além do Ψw, foram medidas a massa seca de folhas e de talos, e a relação folha/talo. Imediatamente após a leitura do Ψw, as plantas foram cortadas rente ao vaso e colocadas para secar em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 37°C ± 3°C por 32 horas.

Também foi analisado o teor de artemisinina nas folhas dos tratamentos, análises estas realizadas em fevereiro de 1998. A determinação dos teores de artemisinina foi feita em cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta, conforme técnica descrita no item 3.3. do capítulo I, desenvolvida por ZHAO & ZHENG (1986).

Na tabela 1 podemos verificar as condições ambientais dentro da casa de vegetação e os horários das determinações do Ψw, durante o período em que as plantas foram estressadas.

TABELA 1. Condições ambientais e horários das determinações do potencial hídrico (Ψw) em plantas de *A.annua* submetidas à deficiência hídrica.

tratamentos	**hora início/final da medição do Ψw**	**temperatura máxima (°C)**	**temperatura mínima (°C)**	**U.R. (%)**
controle		33,5	18	
18,5 horas[1]	05:55/06:30	35,5	18,5	90
controle		32,5	18,5	
42,5 horas[1]	06:00/06:35	34,5	18,5	100
controle		27,5	18,5	
66,5 horas[1]	05:50/06:25	28	19	98
controle		36	15	
90,5 horas[1]	05:55/06:30	40	15	95
controle		34,5	13	
114,5 horas[1]	05:55/06:25	37	14	98
controle		33	15	
72 horas[2]	06:00/06:30	33	16	100
controle		38	12	
144 horas[2]	06:00/06:35	38	12	70

1 Horas de supressão da irrigação, efetuada 147 dias após a semeadura, quando as plantas encontravam-se no estádio B (alongamento) da escala fenológica proposta por DELABAYS(1997).

2 Horas de reidratação, após 114,5 horas de supressão da irrigação.

3.2. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO ACÚMULO DE ARTEMISININA EM *A. annua*.

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento CONVIRON, modelo CMP 4030, no CNPT-EMBRAPA, localizado na cidade de Passo Fundo - RS (28°15' S, 52°24' W e 689 m de altitude).

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com 9 repetições para cada tratamento, onde cada repetição foi constituída de uma única planta. Os tratamentos consistiram em submeter plantas do híbrido de *A.annua* CPQBA 2/39x1V com 88 dias a duas diferentes amplitudes de temperatura (noite/dia), 11/20 °C e 18/28 °C, durante 16 dias. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste *t de Student* no programa SYSTAT 5.0.

As condições de cultivo foram as mesmas do experimento com DH em plantas de 84 dias (item 3.1.1. deste capítulo), uma vez que as plantas utilizadas neste experimento foram remanescentes daquelas mantidas constantemente sob irrigação (controle). Buscando evitar o florescimento, no período de 18/06/97 a 08/08/97, o número de horas de luz fornecido as plantas foi de 10 horas e 30 minutos, abaixo do fotoperíodo crítico determinado para a indução floral. Em 08/08/97, o fotoperíodo foi aumentado para 11 horas, quando buscou-se induzir um aumento do teor de artemisinina nas plantas, usando o fotoperíodo crítico determinado por MAGALHÃES (1996).

Em 09/08/97 as plantas (com 88 dias da semeadura) foram divididas em duas câmaras de crescimento com diferentes amplitudes de temperatura (noite/dia), 11/20 °C e 18/28 °C. A escolha das amplitudes baseou-se nas normais climatológicas das temperaturas máximas e mínimas que ocorrem nos meses mais quentes e frios em Passo Fundo - RS (CUNHA, 1997). Para ambos os tratamentos, a umidade relativa e a PAR foram de aproximadamente 70% e de 320 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, respectivamente.

Em 24/08/97 às 15 horas, quando as plantas de ambos os tratamentos encontravam-se no estádio B (alongamento) da escala fenológica descrita por DELABAYS (1997), foram cortadas rente ao vaso e colocadas para secar em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 34 $^{0}C \pm 1\ ^{0}C$, pelo período de 48 horas. A altura média das plantas do tratamento 11/20 °C foi de 70,7 cm e do 18/28 °C foi de 69,6 cm. Foram medidas a massa seca de folhas e talos, e a relação folha/talo.

O teor de artemisinina nas folhas dos tratamentos foi determinado em dezembro de 1997. A determinação dos teores de artemisinina foi feita em cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta, conforme técnica descrita no item 3.3. do capítulo I, desenvolvida por ZHAO & ZHENG (1986).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. INFLUÊNCIA DA DEFICIÊNCIA HÍDRICA NO ACÚMULO DE ARTEMISININA EM *A.annua*.

Com relação ao teor de artemisinina obtido no experimento com plantas de 84 dias submetidas à DH, o tratamento 38 horas de desidratação (Ψw -1,39 MPa), considerado uma DH moderada, esteve associado a um aumento significativo no teor de artemisinina (tabela 2), acumulando 29% a mais da molécula que o tratamento controle (fig. 4) mantido sob irrigação. Para o tratamento que sofreu 14 horas de supressão de irrigação (Ψw -0,54 MPa) e não apresentou deficiência, bem como, para os tratamentos que sofreram uma DH mais intensa, 62 e 86 horas de supressão de irrigação (Ψw -2,51 MPa e Ψw -3,97 MPa), não foram observadas diferenças para o teor de artemisinina em relação aos tratamentos controle. Estes resultados estão de acordo com o que reportam GERSHENZON (1984) e HERMS & MATTSON (1992) (fig. 1), sugerindo que compostos terpênicos tendem a aumentar sob DH moderada. Este fato é explicado devido aos processos de crescimento serem rapidamente paralisados, ainda que sob moderadas deficiências de água, enquanto a fotossíntese líquida não é sensível a limitações moderadas de água (fig. 2), ocorrendo um desvio do excedente de

carboidratos requeridos no crescimento para o metabolismo secundário.

TABELA 2. Efeito de diferentes níveis de deficiência hídrica no teor de artemisinina em plantas de *A.annua* de 84 dias cultivadas em câmara de crescimento.

nível de deficiência hídrica[2] (MPa)	**horas após a supressão da irrigação[1]**	**teor de artemisinina nas folhas[2] ($mg.g^{-1}$)**
-0,59[3]	--	5,0
-0,54	14	4,7
-0,62[3]	--	4,2
-1,39	38	5,4*
-0,57[3]	--	5,2
-2,51	62	6,0
-0,61[3]	--	6,0
-3,97	86	5,3

1 A supressão da irrigação foi efetuada 84 dias após a semeadura.

2 Média de 06 repetições.

3 Tratamento controle, onde a irrigação não foi suspensa.

* Significativo ($p \leq 0,084$) pelo teste *t de Student*.

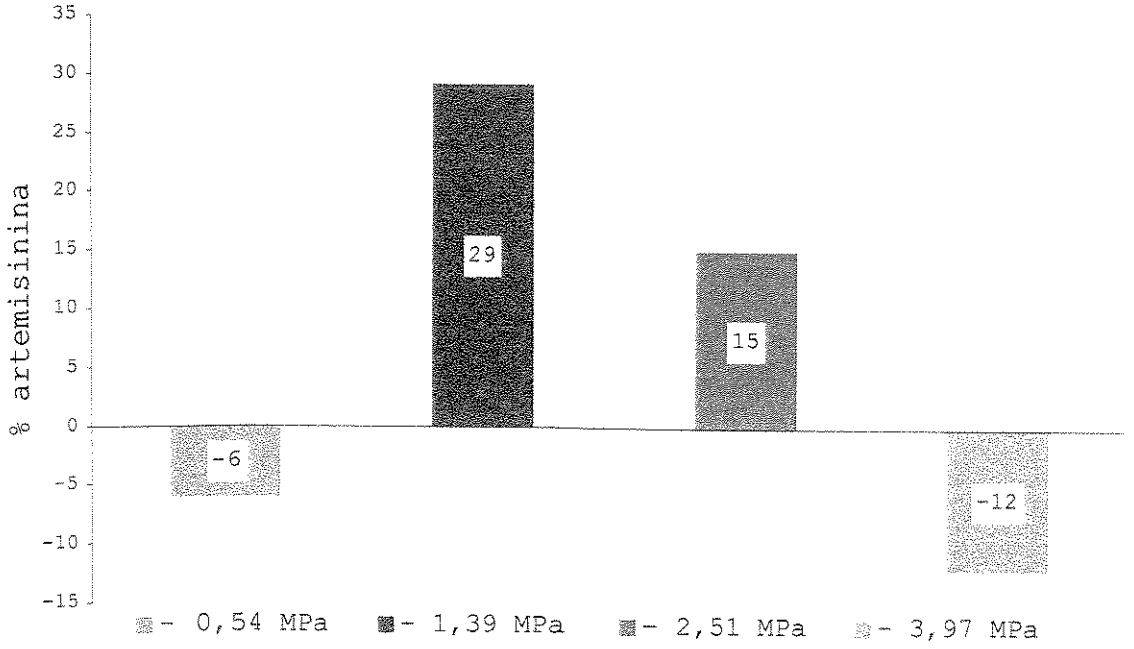

FIGURA 4. Variação percentual de artemisinina nos tratamentos com deficiência hídrica em relação ao controle irrigado, em plantas de *A.annua* com 84 dias.

Com relação ao teor de artemisinina no experimento com plantas de 147 dias submetidas à DH (tabela 3), os tratamentos submetidos à desidratação não apresentaram diferenças significativas em relação a seus controles. Nos tratamentos 72 horas de reidratação (Ψ_w -0,23 MPa) e 144 horas de reidratação (Ψ_w -0,64 MPa), cujas plantas sofreram anteriormente supressão da irrigação por 114,5 horas (Ψ_w -3,44 MPa), verificou-se um

acúmulo significativo de artemisinina em relação aos controles, respectivamente, 16% e 17% (fig. 5).

TABELA 3. Efeito de diferentes níveis de deficiência hídrica no teor de artemisinina em plantas de *A.annua* de 147 dias cultivadas em casa de vegetação.

nível de deficiência hídrica[3] (MPa)	horas após a supressão da irrigação[1] ou reidratação[2]	teor de artemisinina nas folhas[3] ($mg.g^{-1}$)
-0,60[4]	-	8,1
-0,56	18,5[1]	8,9
-0,54[4]	-	9,1
-1,05	42,5[1]	9,5
-0,44[4]	-	10,3
-1,49	66,5[1]	10,2
-0,55[4]	-	9,1
-1,99	90,5[1]	10,0
-0,55[4]	-	10,3
-3,44	114,5[1]	10,0
-0,19[4]	-	9,9
-0,23	72[2]	11,6*
-0,66[4]	-	9,0
-0,64	144[2]	10,6*

1 A supressão da irrigação foi efetuada 147 dias após a semeadura.

2 Plantas reidratadas após 114,5 horas de desidratação.

3 Média de 08 repetições.

4 Tratamento controle, onde a irrigação não foi suspensa.

* Significativo ($p \leq 0,069$) pelo teste *t de Student*.

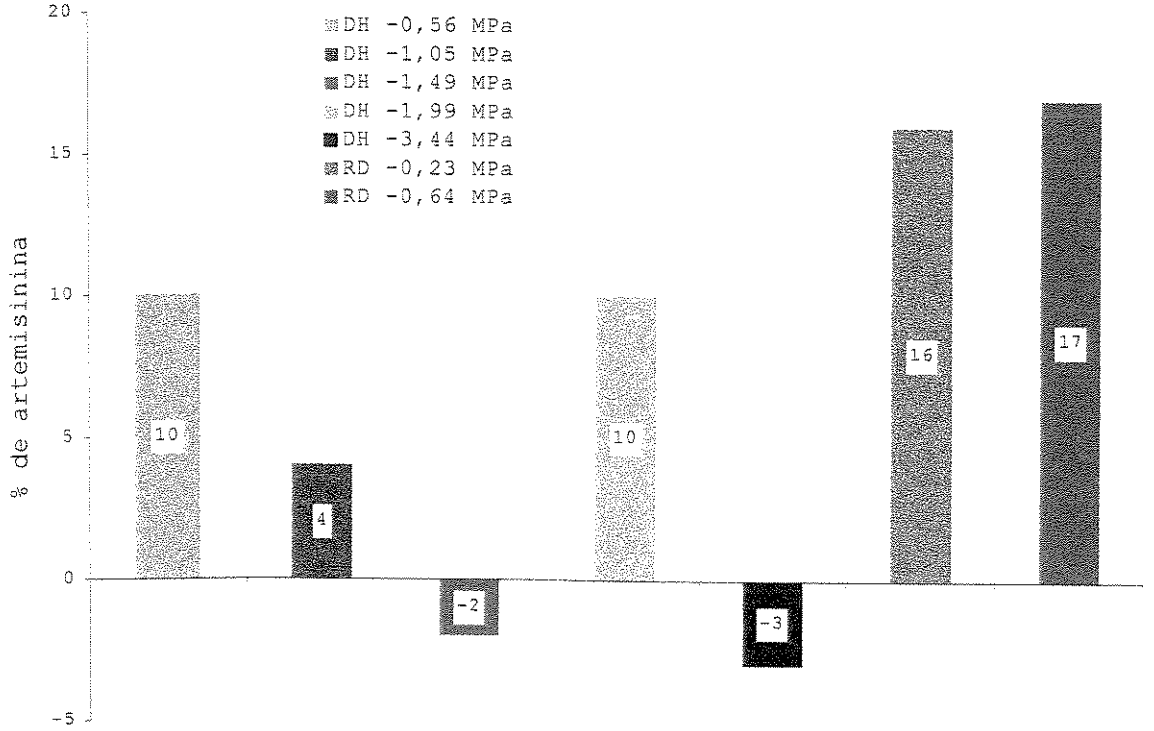

FIGURA 5. Variação percentual de artemisinina nos tratamentos com deficiência hídrica em relação ao controle irrigado, em plantas de *A.annua* de 147 dias. DH - plantas desidratadas; RD - plantas reidratadas.

Considerando os resultados encontrados em ambos experimentos, podemos afirmar que plantas de *A.annua* com 84 dias submetidas a DH moderada apresentaram um aumento nos teores de artemisinina em relação aos seus controles, enquanto que as plantas de 147 dias submetidas a DH não apresentaram diferenças nos teores da molécula. Estas diferenças, provavelmente, ocorreram devido aos distintos estádios ontogenéticos ou idade em

que as plantas encontravam-se (84 e 147 dias), uma vez que o efeito da DH varia entre espécies e dentro da espécie, além de depender da ontogenia e da velocidade e intensidade com que à DH é imposta (BOYER, 1971; KRAMER & BOYER, 1995; LARCHER, 1995).

CHARLES *et al.* (1993) não verificaram relação entre teor de artemisinina e DH prolongada. Contudo, há que se considerar o fato de que normalmente, sob estresse, plantas acumulam metabólitos secundários rapidamente (KUC, 1995) e não seria uma estratégia interessante longos períodos de estresse, que levariam a uma redução no rendimento de artemisinina e no crescimento da planta de *A.annua*.

Para as medidas de massa seca foliar e rendimento de artemisinina, na maioria dos tratamentos submetidos à DH em ambos os experimentos, não foram encontradas diferenças significativas para com seus controles (tabelas 4 e 5). Somente o tratamento 38 horas de supressão da irrigação (Ψw -1,39 MPa) em plantas com 84 dias foi significativamente superior ao controle, tanto para massa seca foliar, quanto para rendimento de artemisinina (tabela 4). Este resultado para massa seca foliar não era esperado e deve-se provavelmente há existência de variações genotípicas do híbrido utilizado, uma vez que à DH diminui a taxa de crescimento relativo das plantas (fig. 1). Já, no experimento com plantas de 147 dias, para os tratamentos em que foram reidratadas as plantas submetidas anteriormente a 114,5 horas de desidratação (tabela

5), verificou-se uma redução significativa na massa seca foliar das mesmas, comparativamente às plantas controle. Estes resultados eram esperados, uma vez que os processos de crescimento são rapidamente afetados, ainda que sob moderadas deficiências de água (fig. 1). Todavia, a redução da massa seca foliar não resultou em diminuição no rendimento de artemisinina nas plantas reidratadas (tabela 5).

TABELA 4. Efeito de diferentes níveis de deficiência hídrica na produção de massa seca foliar e rendimento de artemisinina em plantas de *A.annua* de84 dias cultivadas em câmara de crescimento.

nível de deficiência hídrica[3] (MPa)	**Horas após a supressão da irrigação[1]**	**massa seca foliar (g/planta)[3]**	**rendimento de artemisinina (mg/planta)[3]**
-0,59[2]	-	1,96	10,10
-0,54	14	1,88	9,08
-0,62[2]	-	1,92	8,23
-1,39	38	2,70***	14,88**
-0,57[2]	-	2,29	12,14
-2,51	62	1,97	12,42
-0,61[2]	-	2,95	18,33
-3,97	86	2,35	12,62

1 A supressão da irrigação foi efetuada 84 dias após a semeadura.

2 Tratamento controle, onde a irrigação não foi suspensa.

3 média de 06 repetições.

*** ($p \leq 0,007$) e ** ($p \leq 0,023$) são significativos pelo teste *t de Student*.

TABELA 5. Efeito de diferentes níveis de deficiência hídrica na produção de massa seca foliar e no rendimento de artemisinina em plantas de *A.annua* de 147 dias cultivadas em casa de vegetação.

nível de deficiência hídrica[4] (MPa)	Horas após a supressão da irrigação[1] ou reidratação[2]	massa seca foliar (g/planta)[4]	rendimento de artemisinina (mg/planta)[4]
-0,60[3]	-	10,63	86,84
-0,56	18,5[1]	11,89	103,58
-0,54[3]	-	11,52	103,95
-1,05	42,5[1]	11,47	107,72
-0,44[3]	-	10,93	113,78
-1,49	66,5[1]	10,06	102,95
-0,55[3]	-	11,04	98,82
-1,99	90,5[1]	10,21	99,64
-0,55[3]	-	12,54	128,35
-3,44	114,5[1]	11,28	112,93
-0,19[3]	-	11,88**	116,11
-0,23	72[2]	10,14	116,08
-0,66[3]	-	13,03**	117,85
-0,64	144[2]	11,23	119,31

1 A supressão da irrigação foi efetuada 147 dias após a semeadura.

2 Plantas reidratadas após 114.5 horas de desidratação.

3 Tratamento controle, onde a irrigação não foi suspensa.

4 média de 08 repetições.

** Significativo ($p \leq 0,048$) pelo teste *t de Student*.

Também foram efetuadas medições da massa seca de talos e da relação folha/talo (tabelas 6 e 7), parâmetros importantes no processamento industrial de *A.annua*, uma vez que o talo contém ceras que dificultam o isolamento e a purificação da artemisinina. Para ambos os experimentos, na maioria dos tratamentos, não foram encontradas diferenças para massa seca de talos e relação folha/talo. Entretanto, o tratamento 38 horas de desidratação (Ψw -1,39 MPa) em plantas de 84 dias, apresentou uma massa seca de talos significativamente maior que o controle (tabela 6). Por outro lado, o tratamento 66,5 horas de desidratação (Ψw -1,49 MPa) em plantas de 147 dias, apresentou uma redução na massa seca de talos em relação ao controle (tabela 7).

Uma possível explicação para estas variações não esperadas na fitomassa, é que os genitores usados na obtenção do híbrido 2/39x1V não são linhagens puras obtidas por endogamia, mas sim genótipos superiores clonados (MAGALHÃES, 1996). Todavia, as progênies F_1 (híbridos) de *A.annua* apresentaram alta herdabilidade para os caracteres morfologia, fitomassa e conteúdo de artemisinina (PETER-BLANC, 1992, citado por MAGALHÃES, 1996). Para a característica teor de artemisinina, comparando genótipos distintos, DELABAYS (1997) encontrou uma herdabilidade bastante elevada, superior a 0,95.

TABELA 6. Efeito de diferentes níveis de deficiência hídrica na produção de massa seca de talos e na relação folha/talo em plantas de *A.annua* de 84 dias, cultivadas em câmara de crescimento.

nível de deficiência hídrica (MPa)	**Horas após a supressão da irrigação**[1]	**massa seca de talos (g/planta)**[3]	**relação folha/talo**[3]
-0,59[2]	-	1,37	1,69
-0,54	14	1,27	1,68
-0,62[2]	-	1,07	1,93
-1,39	38	1,83**	1,54
-0,57[2]	-	1,50	1,66
-2,51	62	1,34	1,64
-0,61[2]	-	2,02	1,62
-3,97	86	1,37	1,74

1 A supressão da irrigação foi efetuada 84 dias após a semeadura.

2 Tratamento controle, onde a irrigação não foi suspensa.

3 média de 06 repetições.

** Significativo ($p \leq 0,022$) pelo teste *t de Student*.

TABELA 7. Efeito de diferentes níveis de deficiência hídrica na produção de massa seca de talos e na relação folha/talo em plantas de *A.annua* de 147 dias, cultivadas em casa de vegetação.

nível de deficiência hídrica[4] (MPa)	Horas após a supressão da irrigação[1] ou reidratação[2]	massa seca de talos (g/planta)[4]	relação folha/talo[4]
-0,60[3]	-	19,92	0,54
-0,56	18,5[1]	22,34	0,53
-0,54[3]	-	22,82	0,51
-1,05	42,5[1]	22,92	0,50
-0,44[3]	-	24,43**	0,45
-1,49	66,5[1]	20,89	0,49
-0,55[3]	-	21,23	0,52
-1,99	90,5[1]	20,21	0,50
-0,55[3]	-	24,97	0,51
-3,44	114,5[1]	22,19	0,51
-0,19[3]	-	23,63	0,52
-0,23	72[2]	20,79	0,49
-0,66[3]	-	25,73	0,51
-0,64	144[2]	22,20	0,52

1 A supressão da irrigação foi efetuada 174 dias após a semeadura.

2 Plantas reidratadas após 114.5 horas de desidratação.

3 Tratamento controle, onde a irrigação não foi suspensa.

4 média de 08 repetições.

** Significativo ($p \leq 0,024$) pelo teste *t de Student*.

As plantas de 84 dias submetidas à supressão de água durante 86 horas (Ψw -3,97 MPa) apresentaram uma lenta recuperação de seu turgor (Ψw -1,8 MPa), 64 horas após a sua reidratação. No entanto, plantas de 147 dias com supressão de água por 114,5 horas (Ψw -3,44 MPa) recuperaram mais rapidamente sua turgidez (Ψw -0,23 MPa), 72 horas após a reidratação.

Não foi observada a morte das plantas submetidas às deficiências drásticas em ambos os experimentos (Ψw -3.44 MPa e Ψw -3,97 MPa) após a reidratação das mesmas, o que demonstra uma boa tolerância da *A.annua* a limitações de água nas condições deste experimento, independentemente da velocidade com que foram impostos os níveis de DH. Nas plantas de 84 dias que apresentaram uma deficiência de -3,97 MPa e foram reidratadas, observou-se a morte do meristema apical do ramo principal e um no crescimento maior dos ramos laterais (quebra da dominância apical), como podemos observar na fig. 6.

FIGURA 6. Planta de *A.annua* reidratada após 86 horas de supressão da irrigação (Ψw -3,97 MPa), apresentando morte do meristema apical do ramo principal.

4.2. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO ACÚMULO DE ARTEMISININA EM *A.annua*.

Foi observada diferença significativa entre os tratamentos de amplitudes térmicas a que foram submetidas as plantas de *A.annua*, cultivadas em câmara de crescimento (fig. 7), evidenciando que o tratamento com 18/28 ^{0}C apresentou maior teor de artemisinina nas folhas do que o tratamento 11/20 ^{0}C. Isto indica que nas condições deste experimento, as temperaturas maiores induziram um aumento no teor de artemisinina nas plantas testadas. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por CHEN & ZHANG (1987), onde plantas de *A.annua* submetidas à temperatura de 30 ± 0,5 ^{0}C, apresentaram um aumento significativo no teor de artemisinina em relação às temperaturas de 25 ± 1 ^{0}C ou 28 ± 0,5 ^{0}C. Contrariamente, FERREIRA (1994) e MAGALHÃES (1996), sugeriram que altas temperaturas reduzem o teor de artemisinina em *A.annua*.

Tais divergências levam a concluir que o comportamento desta espécie em relação à influência da temperatura na produção de artemisinina não é padrão, sendo variável para diferentes genótipos. Resultados demonstrando respostas diferentes entre genótipos distintos numa mesma temperatura, foram encontrados por CHEN & ZHANG (1987) e MAGALHÃES (1996).

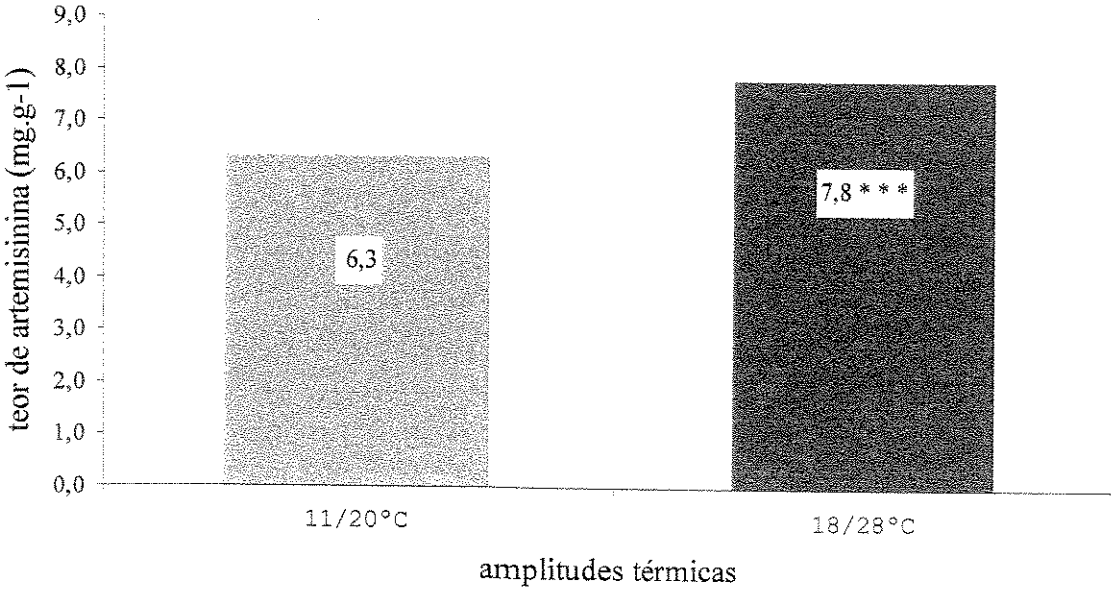

FIGURA 7. Variação no teor de artemisinina em plantas de *A.annua* com 88 dias, submetidas às amplitudes térmicas 11/20 ^{0}C e 18/28 ^{0}C, durante 16 dias. *** Significativo ($p \leq 0,003$) pelo teste *t de Student*.

Para rendimento de artemisinina e massa seca foliar (tabela 8), independentemente do resultado obtido para o teor de artemisinina, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos 18/28 ^{0}C e 11/20 ^{0}C. Contrariamente, MAGALHÃES (1996) verificou um aumento da fitomassa foliar em temperaturas mais elevadas.

Os outros parâmetros analisados foram a massa seca de talos e a relação folha/talo (tabela 8). Para as plantas submetidas à

amplitude 18/28 ^{0}C, verificou-se uma redução significativa na massa seca de talos, e, por conseqüência, um aumento significativo na relação folha/talo, quando comparadas as plantas do tratamento 11/20 ^{0}C. Resultado semelhante para a relação folha/talo foi encontrado por MAGALHÃES (1996), onde temperaturas mais elevadas aumentaram significativamente este parâmetro.

TABELA 8. Variação no rendimento de artemisinina, massa seca foliar, massa seca de talo e na relação folha/talo em plantas de *A.annua* com 88 dias submetidas às amplitudes térmicas 11/20 ^{0}C e 18/28 ^{0}C, durante 16 dias.

parâmetro analisado	**amplitudes térmicas (noite/dia)**	
	11/20 ^{0}C	**18/28 ^{0}C**
Artemisinina[1] (mg/planta)	36,43	41,33
massa seca foliar[1](g/planta)	5,80	5,30
massa seca de talos[1] (g/planta)	9,79**	7,57
relação folha/talo[1]	0,60	0,72***

1 Média de 09 repetições.

** ($p \leq 0,024$) e *** ($p \leq 0,008$) são significativos pelo teste *t de Student*.

5. CONCLUSÕES

5.1. DEFICIÊNCIA HÍDRICA

Com relação ao teor de artemisinina, às plantas do híbrido CPQBA 2/39x1V de *A.annua* não apresentaram os mesmos resultados quando foram submetidas à DH em diferentes estádios ontogenéticos, demonstrando que o efeito da DH pode variar em função da idade da planta.

Em Plantas de 84 dias, verificou-se que o tratamento DH moderada (Ψw -1,39 MPa) provocou um aumento significativo no teor de artemisinina em relação ao controle, porém, o mesmo resultado não foi observado em plantas de 147 dias submetidas à DH. Plantas de 147 dias que sofreram DH drástica (Ψw -3,44 MPa) e posteriormente foram reidratadas, também apresentaram um aumento no teor de artemisinina comparativamente ao controle irrigado. Todavia, para ambos os experimentos, os aumentos dos teores de artemisinina nos tratamentos com DH foram anulados por uma redução na massa seca foliar, não resultando em maiores rendimentos de artemisinina por planta.

O híbrido 2/39x1V de *A.annua* apresentou boa tolerância à desidratação nas condições deste experimento, independentemente da velocidade e intensidade com que foi imposta à DH.

5.2. TEMPERATURA

Quando submetidas à amplitude térmica de 18/28 ^{0}C, as plantas do híbrido 2/39x1V acumularam significativamente mais artemisinina que na amplitude de 11/20 ^{0}C. Porém, o maior teor de artemisinina não resultou em um aumento significativo do rendimento da molécula por planta, na amplitude 18/28 ^{0}C.

A relação folha/talo também foi significativamente maior na amplitude 18/28 ^{0}C, uma vez que observou-se uma redução significativa para massa seca de talos nesta amplitude, em comparação com 11/20 ^{0}C.

LITERATURA CITADA

ACTON, N., KLAYMAN, D.L. & ROLLMAN, I.J., 1985. Reductive eletrochemical HPLC assay for artemisinin (qinghaosu). Planta Med. 5:445-446.

AKHILA, A., THAKUR, R.S. & POPLI, S.P., 1987. Biosyntesis of artemisinin in *Artemisia annua*. Phytochemistry. 26:1927-1930.

AKHILA, A., RANI, K. & THAKUR, R.S., 1990. Biosyntesis of artemisinic acid in *Artemisia annua*. Phytochemistry. 29: 2129-2132.

BAGCHI, G.D., JAIN, D.C. & SUCHIL, K., 1998. The phytotoxic effects of the artemisinin related compounds of *Artemisia annua*. J. Med. Aromatics Plant Sci. 20:5-11.

BANZATTO, D.A. & KRONKA, S.N., 1989. Experimentação Agrícola. FUNEP, Jaboticabal, 247p.

BAUER, K., GROS, L. & SAUER, W., 1991. Thin layer chromatography - An introduction. Hüthig Buch Verlag GmbH, Heidelberg, Germany, 80p.

BOYER, J.S., 1971. Recovery of photosynthesis in sunflower after a period of low leaf water potential. Plant Physiol. 47:816-820.

BOYER, J.S., 1995. Measuring the water status of plant and soils. Academic Press, San Diego, 178p.

BRYSON, C.T. & CROOM JUNIOR, E.M., 1991. Herbicide imputs for a new agronomic crop, annual wormwood (*Artemisia annua*). Weed Technol. 5:117-124.

BUTLER, D., MAURICE, J. & O'BRIEN, C., 1997. Time to put malaria control on the global agenda. Nature. 386:535-541.

CHAN, K.L., TEO, C.K.H., JINADASA, S. & YUEN, K.H., 1995. Selection of high artemisinin yielding *Artemisia annua*. Planta Med. 61:285-287.

CHARLES, D.J., SIMON, J.E., WOOD, K.V. & HEINSTEIN, P., 1990. Germplasm variation in artemisinin content of *Artemisia annua* using na alternative method of artemisinin analysis fron crude plant extracts. J. Nat. Prod. 53:157-160.

CHARLES, D.J., SIMON, J.E., SHOCK, C.C., FEIBERT, E.B.G. e SMITH, R.M., 1993. Effect of water stress and post-harvest handling on artemisinin content in the leaves of *Artemisia annua* L. IN: Proceedings of the Second National Symposium: New crops, exploration, research and commercialization. Indiana, USA, pp.640-643.

CHEN, P.K. & LEATHER, G.R., 1990. Plant growth regulatory activities of artemisinin and its related compounds. J. Chem. Ecol. 16:1867-1876.

CHEN, F.T. & ZHANG, G.H., 1987. Studies on several physiological factors in artemisinin synthesis in *Artemisia annua*. Plant Physiol. Commun. 5:26-30.

CUNHA, G.R., 1997. Meteorologia: fatos & mitos. EMBRAPA-CNPT, Passo Fundo, 286p.

DELABAYS, N., 1997. Biologie de la reproduction chez L'*Artemisia annua* L. et genetique de la production en artemisinine. Universite de Lausanne, France, Thèse de Doctorat.

DELABAYS, N., JENELTEN, U., PARIS, M., PIVOT, D. & GALLAND, N., 1994. Aspects agronomiques et génétiques de la production d'artémisinine à partir d'*Artemisia annua* L. Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic. 26:291-296.

DEY, P.M. & HARBORNE, J.B., 1997. Plant Biochemistry. Academic Press, London, 554p.

DIXON, R.A. & PAIVA, N.L., 1995. Stress-Induced phenylpropanoids metabolism. The Plant Cell. 7:1085-1097.

DUKE, S.O., VAUGHN, K.C., CROOM, E.M. & ELSOHLY, H.N., 1987. Artemisinin, a constituent of annual wormwood (*Artemisia annua*), is a selective phytotoxin. Weed Sci. 35:499-505.

EL-FERALY, F.S., AL-MESHAL, I.A. A., AL-YAHYA, M.A. & HIFNAWY, M.S., 1986. On the possible role of qinghao acid in the biosynthesis of artemisinin. Phytochemistry 25:2777-2778.

ELHAG, H.M., EL-DOMIATY, M.M., EL-FERALY, F.S., MOSSA, J.S. & EL-OLEMY, M.M., 1992. Selection and micropropagation of high artemisinin producing clones of *Artemisia annua* L. Phytothe. Res. 6:20-24.

ELSOHLY, H.N., CROOM, E.M. & ELSOHLY, M.A., 1987. Analysis of the antimalarial sesquiterpene artemisinin in *Artemisia annua* by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) with postcolumn derivatization and ultraviolet detection. Pharm. Res. 4:258-260.

FERREIRA, J.F.S., 1994. Production and detection of Artemisinin in *Artemisia annua* L. Purdue University, Purdue, EUA, Ph.D. thesis.

FERREIRA, J.F.S. & JANICK, J., 1996a. Distribuition of artemisinin in *Artemisia annua*. IN: Progress in new crops (J.Janick ed.). ASHS Press, Arlington, pp. 579-584.

FERREIRA, J.F.S. & JANICK, J., 1996b. Immunoquantitative analysis of artemisinin fron *Artemisia annua* using polyclonal antibodies. Phytochemistry. 41:97-104.

FERREIRA, J.F.S., CHARLES, D.J., WOOD, K., JANICK, J. & SIMON, J.E., 1994. A comparison of gas chromatography and high performance liquid chromatography for artemisinin analyses. Phytochem. Analysis. 5:116-120.

FERREIRA, J.F.S., SIMON, J.E. & JANICK, J., 1995. Developmental Studies of *Artemisia annua*: Flowering and Artemisinin Production Under Greenhouse and Field Conditions. Planta Med. 61:167-170.

FIGUEIRA, G.M., 1995. Nutrição mineral, produção e concentração de artemisinina em *Artemisia annua* L. Universidade de São Paulo/ESALQ , Piracicaba, Brasil, tese de Mestrado.

FIGUEIRA, G.M. & SARTORATTO, A., 1997. Avaliação dos teores de artemisinina em *Artemisia annua* L. após secagem e durante o armazenamento das folhas. IN: III Jornada Paulista de Plantas Medicinais, Campinas, Brasil, resumos, pp.69-70.

FOGLIO, M.A., 1996. Estudo químico da *Artemisia annua* L. aclimatada no Brasil. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Doutorado.

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

GHERSHENZON, J., 1984. Changes in levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. In: Recent advances in phytochemistry - phytochemical adaptations to stress. (B.N. Timmermann, C. Steelin & F.A. Loewus eds) Vol. 18, Plenum Press, New York, 273-320.

GUPTA, M.M., JAIN, D.C., VEMIA, R.K. & GUPTA, A.P., 1996. A rapid analytical method for the estimation of artemisinin in *Artemisia annua*. J. Med. Aromatics Plant Sci. 18:5-6.

HARBORNE, J.B., 1993. Introduction to Ecological Biochemistry. 4rd Edition, Academic Press, London, 316p.

HERMS, D.A. & MATTSON, W.J., 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. The Q. Rev. biol. 67:283-335.

JANICK, J. "Annual Wormwood." *New crop factsheet*, julho 1996, <http:/www.hort.purdue.edu/newcrop/Crops.html>(06/12/1997).

JAZIRI, M., DIALLO, B., VANHAELEN, M., HOMÈS, J., YOSHIMATSU, K. & SHIMOMURA, K., 1993. immunodetection of ARTEMISININ IN *Artemisia annua* cultivated in hydroponic conditions. Phytochemistry. 33:821-826.

JUNG, M., ELSOHLI, H.N. & MCCHESNEY, 1990. Artemisinic acis: a versatile chiral synthon and bioprecursor to natural products. Planta Med. 56:624.

KLAYMAN, D.L., 1985. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. Science. 228: 1049-1055.

KRAMER, P.J. & BOYER, J.S., 1995. Water relations of plants and soils. Academic Press, San Diego, 495p.

KUC, J., 1995. Phytoalexins, stress metabolism and disease resistance in plants. Annu. Rev. Phytopatol. 33:275-297.

LARCHER, W., 1995. Physiological Plant Ecology. 3rd Edition, Springer, Heidelberg, 506p.

LAUGHLIN, J.C., 1995. The influence of distribuition of antimalarial constituents in *Artemisia annua* L. on time and method of harvest. Acta Hortic. 390:67-73.

LIERSCH, R., SOICKE, H., STEHR, C. & TÜLLNER, H.U., 1986. Formation of artemisinin in *Artemisia annua* during one vegetation period. Planta Med. 52:387-390.

LIN, A.J., KLAYMAN, D.L., HOCH, J.M., SILVERTON, J.V. & GEORGE, C.F., 1985. Thermal rearrangement and decomposition products of artemisinin (qinghaosu). J. Org. Chem. 50:4504-4508.

LITTLE, T.M. & HILLS, F.J., 1990. Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. Trillas, México, 270p.

LOPES, J.L.C., 1995. Cromatografia em camada delgada. IN: Introdução a métodos cromatográficos (C.H. Collins, G.L. Braga e P.S. Bonato, coord.), 6ª ed., Editora da UNICAMP, Campinas, pp.45-56.

LUCÍRIO, I.D., 1997. À sombra do mosquito. Revista Super Interessante, Editora Abril, 118:42-48.

MAGALHÃES, P.M., 1996. Seleção, melhoramento e nutrição da *Artemisia annua* L., para cultivo em região intertropical. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Doutorado.

MAGALHÃES, P.M., DELABAYS, N. & SARTORATTO, A., 1997. New hybrid lines of the antimalarial species *Artemisia annua* L. guarantee its growth in Brazil. Ciência e Cultura, 49:413-415.

MANN, J., 1987. Secondary metabolism. 2nd. edition, Clarendon Press, Oxford, 374p.

MARCHESE, J.A., REHDER, V.L.G. & SARTORATTO, A., 1998. Dosagem de artemisinina em *Artemisia annua* L. - Comparação entre as técnicas CLAE-UV e CCD-densitometria. IN: Sétimo Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Afins, Águas de São Pedro, Brasil, p372.

MCGARVEY, D.J. & COTREAU R., 1995. Terpenoid metabolism. The Plant Cell. 7:1015-1026.

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

PRAS, N., VISSER, J.F., BATTERMAN, S., WOERDENBAG, H.J. & MALINGRÉ, T.M., 1991. Laboratory selection of *Artemisia annua* L. for high artemisinin yelding types. Phytochem. Anal. 2:80-83.

SANGWAN, R.S., AGARWAL, K., LUTHRA, R., THAKUR, R.S. & SANGWAN, N.S., 1993. Biotransformation of arteannuic into arteannuin-B and artemisinin in *Artemisia annua*. Phytochemistry. 34:1301-1302.

SARTORATTO, A., REHDER, V.L.G., BOAVENTURA, S. & OLIVEIRA, J.G., 1997. Método de quantificação de artemisinina em *Artemisia annua* por fotodensitometria. IN: III Jornada Paulista de Plantas Medicinais, Campinas, Brasil, resumos, p.206-207.

SIMON, J.E., DENYS, C., CEBERT, E., GRANT, L., JANICK, J. & WHIPKEY, A., 1990. *Artemisia annua* L. A promising aromatic

and medicinal. Advances in new Crops: proceedings of the First National Simposiun New Crops, resherch, develop economics, p.522-526.

SINGH, A., KAUL, U.K., MAHAJAN, V.P., SINGH, A., MISRA, L.N., THAKUR, R.S. e HUSAIN,A., 1986. Introduction of *Artemisia annua* in India and isolation of artemisinin, a promising antimalarial drug. Indian J. Pharm. Sci. 48:137-138.

SIPAHIMALANI, A.T., FULZELE, D.P. & HEBLE,M.R., 1991. Rapid method for the detection and determination of artemisinin by gas chromatography. J. Chromatogr. 538:452-455.

TURNER, N.C., 1981. Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. Plant Soil 58:339-366.

WHO (World Health Organization), 1998a. "Malaria." *Fact Sheet nº 94*. 10/1998, http://www.who.int/inffs/en/fact094.html (31/01/1999).

WHO (World Health Organization), 1998b. "Malaria Prevention and Control." *Division of control of tropical diseases*. 1998, http://www.who.int/ctd/html/malaria.html (31/01/1999)

WOERDENBAG, J.H., PRAS, N., BOS, R., VISSER, J.F., HENDRIKS, H. & MALINGRÉ, T.M., 1991. Analysis of artemisinin and related sesquiterpenoids from *Artemisia annua* L. by combined gas chromatography/mass spectrometry. Phytochem. Anal. 2:215-219.

YNTERIAN, C.G., 1996. Malária, o terror dos trópicos. Inter-news. 90:01.

ZENG, M.Y, LI, L.N., CHEN, S.F., LI, G.V., LIANG, X.J., CHEN, M. & CLARDY, J., 1983. Chemical transformations of qinghaosu, a peroxidic antimalarial. Tetrahedron Lett. 39:2941-2946.

ZHAO, S. & ZENG, M.Y., 1986. Aplication of precolumm reaction to high-performance liquid chromatography of qinghaosu in animal plasma. Anal. Chem. 58:289-292.