

Aut. J.

9616084

SELEÇÃO, MELHORAMENTO E NUTRIÇÃO DA
Artemisia annua L., PARA CULTIVO EM
REGIÃO INTERTROPICAL

Este exemplar encaminhado à redação final
da tese () candidato a
Pedro Melillo de Magalhães
e aprovada pela Comissão Julgadora.
20/8/96 x Rolf Dieter J

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Rolf Dieter Illg

Co-orientador: Prof. Dr. Nicolas Delabays

Campinas - SP

1996

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

M27s Magalhães, Pedro Melillo de
Seleção, melhoramento e nutrição da *Artemisia annua*
L., para cultivo em região intertropical / Pedro Melillo de
Magalhães. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientadores : Rolf Dieter Illg, Nicolas Delabays.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia.

1. Artemisia. 2. Malária. 3. Melhoramento genético.
4. Artemisia-Cultivo. 5. *Artemisinina. I. Illg, Rolf Dieter.
II. Delabays, Nicolas. III. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 20 de Agosto de 1996

BANCA EXAMINADORA:

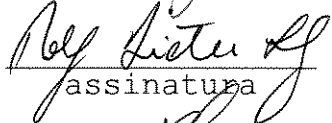
TITULARES:

Profa. Dra: Vera Lúcia Garcia Rehder



assinatura

Prof. Dr. Rolf Dieter Illg (ORIENTADOR)



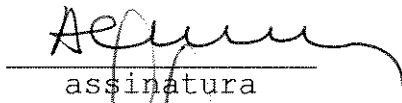
assinatura

Prof. Dr. Ladaslav T. Sodek



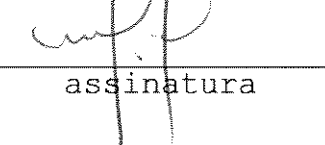
assinatura

Prof. Dr. Antônio Celso Novaes de Magalhães



assinatura

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri



assinatura

SUPLENTE:

Prof. Dr. Sylvio Luiz Honório

assinatura

AGRADECIMENTOS

- À UNICAMP, pelo apoio e viabilização dos estudos no exterior.
- Ao programa RHAÉ do CNPq, pela bolsa e demais providências.
- Ao CPQBA-UNICAMP, Instituição e Colegas, pelo incentivo, providências e parceria nas pesquisas, especialmente: Kátia Calágo, Ílio Montanari Jr. e Glyn Mara Figueira.
- À MEDIPLANT, Instituição e Colegas, pelo desenvolvimento experimental e todo apoio técnico e de infraestrutura, especialmente: Cristian Vegères, Huggette, Nicole Debrunner e ao Silvio Borella.
- Aos orientadores das pesquisas realizadas no Brasil e na Suíça, Prof. Dr. Rolf Dieter Illg e M. Nicolas Delabays, especiais agradecimentos.
- Ao Diretor do Centre des Fougères, M. Charly Darbellay, pelo incentivo e providências para viabilizar as pesquisas.
- À minha irmã Maria Marta e também a Joaquina, pelos cuidados com meus filhos.

A Deus por estes novos caminhos!

Dedico este trabalho,

a meus Pais, Cícero e Pérola,

as minhas crianças: Thomás, Stella, e Arthur
e também à Ana Juli,

à Eloísa,

e às vítimas da Malária no Brasil e no Mundo.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	i
Resumo.....	ii
Summary.....	v
1.Introdução.....	1
1.1 A Malária.....	1
1.2 A Doença.....	4
1.3 Os Medicamentos.....	6
1.4 O modo de ação e dose da artemisinina.....	10
1.5 Origem e Evolução Micromolecular.....	11
1.6 A Biossíntese da Artemisinina.....	15
1.7 A Planta: fonte dos princípios ativos antimaláricos	17
1.8 Descrição botânica e distribuição.....	20
2.Objetivos.....	25
Capítulo I - “Estudos do Sistema Reprodutivo da <i>Artemisia</i> <i>annua</i> , L.”.....	27
Introdução.....	27
Material e Métodos.....	28
Resultados e Discussão.....	35
Conclusões.....	38

Capítulo II - " <i>Artemisia annua</i> , L.: Seleção e Melhoramento de Genótipos de Florescimento Tardio".....	39
Introdução.....	39
Material e Métodos.....	42
Resultados e Discussão.....	51
Conclusões.....	57
Capítulo III - "Obtenção de híbridos".....	58
Introdução.....	58
Material e Métodos.....	59
Resultados e Discussão.....	62
Conclusões.....	65
Capítulo IV - "Cultivo do Híbrido Ch x Viet 55, no CPQBA"..	66
Introdução.....	66
Material e Métodos.....	67
Resultados e Discussão.....	69
Conclusões.....	74

CAPÍTULO V - “A influência da fertilização nitrogenada, sobre os rendimentos da <i>A. annua</i> , L.”.....	75
Introdução.....	75
Material e Métodos.....	77
Resultados e Discussão.....	83
Conclusões.....	90
 CAPÍTULO VI - “Os extratos aquosos da <i>A. annua</i> , L.”.....	 93
Introdução.....	92
Material e Métodos (Ensaio 1).....	94
(Ensaio 2).....	98
Resultados e Discussão (Ensaio 1).....	96
(Ensaio 2).....	99
Conclusões.....	100
 3. Discussão Geral.....	 101
Estimativa de custo da produção da matéria prima.....	108
 4. Literatura Citada.....	 109

ABREVIATURAS :

ART.	Artemisinina
C.C.R.G.Q.	China Cooperative Research Groupe on Qinghaosu and its derivatives as anti-malarials
CCD	Cromatografia de camada delgada
CENEPI	Centro Epidemiológico do Ministério da Saúde
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
Etp	Evapo-transpiração
EUA	Estados Unidos da América
FAA	Formol: Ácido acético e Álcool
Floresc.	Florescimento
FPP	Farnesil pirofosfato
Hibr.	Híbridos
IM	Intra-muscular
IPP	isopentil pirofosfato
MEDIPLANT	Centre de Recherches sur les Plantes Médicinales et Aromatiques
mn	minutos
OMS	Organização Mundial da Saúde
Parc.	Parcela
pl.	planta
Pl.	Planta
Pop.	População
Precip.	Precipitação
Rdt.	Rendimentos
Rep.	Repetição
Sec.	Secas
T	Temperatura
Temp.	Temperatura
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UR	Umidade relativa
UV	Ultra-violeta
Var.	Variância
Wh	Watts/hora

RESUMO

A malária é ainda uma das grandes causas de mortalidade e morbidade no mundo. No Brasil, chegam a ocorrer 500 mil casos de malária por ano. A doença, causada pelo protozoário *Plasmodium*, tem sido agravada desde que espécies de *Plasmodium* passaram a adquirir resistência às drogas tradicionais, cloroquina e mefloquina. O estudo de novos medicamentos resultou no descobrimento das propriedades antimaláricas de uma lactona sesquiterpênica, chamada Qinghaosu ou Artemisinina, extraída das folhas da *Artemisia annua* L., da família Asteraceae. Compostos derivados da artemisinina são ainda de maior eficácia e vem sendo comercializados na China. Assim, a tecnologia de produção e a validação destes medicamentos no ocidente, são de grande interesse.

O objetivo principal das pesquisas que compuseram esta Tese foi de contribuir para a produção dos princípios ativos da espécie *Artemisia annua* L., favorecendo a obtenção dos medicamentos antimaláricos. As pesquisas realizadas na MEDIPLANT (Suíça) e no CPQBA-UNICAMP (Brasil) envolveram: aspectos da biologia da reprodução; seleção e obtenção de híbridos para cultivo no Brasil; fertilização nitrogenada e ensaios de extração aquosa da artemisinina. Os resultados indicaram que a espécie, embora

possua flores completas, apresenta taxa de alogamia superior a 80%. Assim, através de cruzamentos controlados entre genótipos selecionados nas populações de base, originais da China e do Vietnam, obteve-se a homogeneidade das populações e significativo ganho genético. A exploração da variabilidade em biomassa e em teores de artemisinina, esta última conhecida por monitoramento analítico, possibilitou passar de 5Kg de artemisinina/ha nas populações de base, para aproximadamente 30Kg de artemisinina/ha nas populações melhoradas. A propagação vegetativa, por cultura de tecidos ou por estacas, foi também utilizada no programa de melhoramento genético, principalmente para a manutenção dos progenitores e a fixação de caracteres desejáveis. Dois genótipos, PI.39 e PI.V, foram selecionados para cultivo em fotoperíodo curto, (11-12 horas de luz) conforme as condições do Brasil. Os teores de artemisinina e as produções de raízes e de folhas, em estirpes cultivadas em fitotrons, foram maiores na faixas de temperatura ambiente de 22 a 26°C, em comparação com os rendimentos obtidos na faixa entre 25 a 31°C. A produção de raízes foi diretamente relacionada com os teores de artemisinina nas folhas de *A. annua* L.. Os primeiros trabalhos de seleção, conduzidos em local onde as condições de fotoperíodo não induziam o florescimento da espécie, permitiu a seleção de

genótipos mais produtivos em biomassa por expressarem todo seu potencial vegetativo.

A avaliação, no Brasil, do híbrido Ch. x Viet 55, atingiu rendimentos de aproximadamente 30Kg de artemisinina/ha/corte, sendo possível a realização de 2 cultivos por ano, na mesma área. O cultivo deste híbrido foi tecnicamente viável e altamente competitivo, devido aos rendimentos alcançados. A aplicação de fertilizantes nitrogenados na dose de 90Kg de nitrogênio/ha proporcionou um aumento dos rendimentos de artemisinina que variou entre 28 e 40%, em função de maior biomassa. A forma nitrato foi a mais favorável. Um possível deslocamento do estágio de maior concentração de artemisinina é sugerido. Extrações aquosas, a partir de folhas ricas em artemisinina, apresentaram fração contendo 50% do princípio ativo. Sugere-se que tal procedimento possa servir de base para novas pesquisas farmacológicas e toxicológicas sobre a atividade anti-malária de infusões.

Os estudos com a *A. annua* L. resultaram no estabelecimento de um programa de melhoramento genético no CPQBA.

SUMMARY

Malaria is still one of the greatest causes of mortality in the world; in Brazil there are over 500.000 reported cases per year. Malaria, caused by the protozoa *Plasmodium*, has been aggravated by the increasing resistance of *Plasmodium* to the traditional drugs cloroquine and mefloquine. The study of new drugs resulted in the identification of antimalarial activities of an endoperoxide sesquiterpene lactone, called Qinghaosu or Artemisinin, extracted from the leaves of *A. annua* L., from the Asteraceae family. Compounds derived from artemisinin are highly efficient and are being commercialized in China. The production technology and validation of these drugs in the occidental world are of great interest. The main objective of this thesis was to contribute to the production of the chemical compounds of the species *A. annua* L., in order to allow the production of anti-malarial drugs. The research work developed at MEDIPLANT (Switzerland) and CPQBA-UNICAMP (Brazil) involved: biological aspects of reproduction; selection of hybrids for production in Brazil; nitrogen fertilization and assays of extraction in water of artemisinin. The results indicated that the species, although having complete flowers, presents an alogamy rate superior to 80%. Through controlled hybridization between selected genotypes from China and Vietnam, population uniformity and genetic gain

was obtained. Through the analysis of biomass and artemisinin contents (estimated by analytical monitoring), it was possible to increase the artemisinin production of 5Kg/ha for the base population to approximately 30Kg/ha for the genetically bred population. Vegetative propagation, through tissue culture or stakes, was also utilized in the genetic breeding program, mainly for maintenance of progenitors and fixation of desirable qualities. Two genotypes, P1.39 and P1.V were selected for cultivation under short day photoperiod (11-12 hours of light), according to Brazilian conditions. The artemisinin content and the production of roots and leaves in strains cultivated in fitotrons were higher under temperatures ranging from 22 to 26°C, when compared to those cultivated between 25 and 31°C. The root production was directly related to the contents of artemisinin in the leaves of *A. annua* L.. The first breeding trial, conducted where local photoperiodic conditions did not induce flowering, also allowed the selection of more productive genotype in biomass. In the evaluation for Brazil, the hybrid Ch. x Viet 55 produced approximately 30Kg of artemisinin/ha/cut, with 2 cuts possible per year. The cultivation of this hybrid was technically viable and highly competitive, due to the production obtained. The application of Nitrogen fertilizers (90Kg/ha) increased the artemisinin

contents in the range of 28 to 40% due to increase in biomass. The nitrate form was the most favorable. It is possible that the period of highest concentration of artemisinin had been delayed. The water extraction of leaves rich in artemisinin produced a fraction containing 50% of active compound. It is suggested that this procedure can be utilized as a base for new pharmacology and toxicology investigations on the antimalarial activity of infusions.

The studies with *A. annua* L. resulted in the establishment of a genetic breeding program at CPQBA.

RESUME

Le paludisme est aujourd'hui encore l'une des grandes causes de mortalité et de maladie dans le monde. Au Brésil, il peut y avoir jusqu'à 500 mille cas de paludisme par an. La maladie, provoquée par le protozoaire *Plasmodium*, s'est aggravée depuis que les espèces de *Plasmodium* ont acquis une résistance aux remèdes traditionnels, chloroquine et mefloquine. L'étude de nouveaux produits a abouti à la découverte des propriétés anti-paludéennes d'une lactone sesquiterpénique, appelée Qinghaosu ou Artemisinine, extraite des feuilles de l'*Artemisia annua* L., de la famille des Asteraceae. Des composés dérivés de l'artémisinine sont encore plus efficaces et sont commercialisés en Chine. Ainsi, la technologie de production et la validation de ces médicaments en Occident sont d'un grand intérêt.

L'objectif principal des recherches qui ont composé cette thèse a été de contribuer à la production des principes actifs de l'espèce *A. annua* L., favorisant ainsi l'obtention des médicaments anti-paludéens. Les recherches réalisées à MEDIPLANT (Suisse) et au CPQBA-UNICAMP (Brésil) ont inclus: des aspects de biologie de la reproduction, la sélection et l'obtention d'hybrides pour la culture au Brésil, la fertilisation azotée et des tentatives d'extraction aqueuse de

l'artémisinine. Les résultats ont indiqués que l'espèce, bien que possédant des fleurs complètes, présente un taux d'alogamie supérieur à 80%. Ainsi, à travers des croisements contrôlés entre des génotypes sélectionnés dans les populations de base originaires de Chine et du Vietnam, a-t-on obtenu l'homogénéité des populations et un gain génétique significatif. L'exploitation de la variabilité en biomasse et en teneur d'artémisinine, cette dernière étant connue par contrôle analytique, a permis de passer de 5Kg d'artémisinine /ha pour les populations de base, à 30Kg d'artémisinine /ha pour les populations améliorées. La propagation végétative, par culture de tissus ou par boutures, a également été utilisée pour le programme d'amélioration génétique, essentiellement pour l'entretien des progéniteurs et la fixation des caractères souhaitables. Deux génotypes, Pl.39 et Pl.V, ont été sélectionnés pour la culture en photopériode courte (11 à 12 heures de lumière), conformément aux conditions du Brésil. Les teneurs en artémisinine et les productions de racines et de feuilles, dans les lignées cultivées en phytotron, ont été plus grandes pour des températures variant entre 22°C et 26°C, par rapport aux rendements obtenus pour des températures variant entre 25°C et 31°C. Le développement des racines a été directement proportionnel aux teneurs d'artémisinine dans les

feuilles d '*A. annua* L.. Les premiers travaux de sélection, menés en des endroits où les conditions de photopériode n'induisaient pas la floraison de l'espèce, a permis la sélection de génotypes plus productifs en biomasse du fait qu'ils expriment tout leur potentiel végétatif.

Au Brésil, l'évaluation de l'hybride Ch. x Viet 55 a atteint des rendements approximatifs de 30 kg d'artémisinine/ha et par récoltes, deux récoltes par an étant possibles sur une même aire. La culture de cet hybride a été techniquement viable et hautement compétitif grâce aux rendements obtenus.

L'application de fertilisants azotés à une dose de 90Kg d'azote/ha a augmenté de 28 à 40% les rendements d'artémisinine en fonction de l'augmentation de la biomasse. La forme nitrate s'est révélée la plus favorable. Un possible déplacement de l'état de plus forte concentration de l'artémisinine est suggéré. Des extractions aqueuses à partir de feuilles riches en artémisinine présentent une fraction contenant 50% du principe actif. On suggère que ce procédé puisse être employé comme pré-processus pour des extractions industrielles, ou même servir de base à de nouvelles recherches sur l'activité anti-paludéenne d'infusions. Les études de l'*Artemisia annua* ont eu pour conséquence l'établissement d'un programme d'amélioration génétique au CPQBA.

1. INTRODUÇÃO

1.1 - A MALÁRIA:

A malária é ainda uma das grandes causas de mortalidade e morbidade no mundo. O último levantamento da OMS, realizado em 1992, mostrava que 2,2 bilhões de pessoas, ou seja, metade da população mundial, estavam expostas ao mosquito transmissor. A cada ano, 1,5 milhão de pessoas morrem de malária e são registrados cerca de 300 milhões de casos de infecção (PINDER & ROELANTS, 1993). Em nosso país, principalmente nos estados do norte, noroeste e centro-oeste, são enormes as áreas de risco de se contrair a malária, o que contribui para o precário desenvolvimento de tais regiões, dificultando ainda mais as ações de combate à doença. Trata-se assim, de um ciclo vicioso difícil de ser rompido satisfatoriamente. O CENEPI registrou 577.100 casos de malária em 1992.

Os casos de morbidade, também, além de reduzirem o poder produtivo pessoal das vítimas, demandam cuidados de parentes, amigos e instituições de forma que o prejuízo da malária é grandemente ampliado.

As regiões de risco são marginalizadas e acabam sendo excluídas dos interesses que poderiam trazer o desenvolvimento, no sentido positivo dessa ação. De fato, além do sofrimento humano, o custo da doença é substancial; na África por exemplo, foi ele estimado em US\$ 1,8 milhões no ano de 1995.

De tempos em tempos, aparecem estudos que apontam soluções diversas mas o fato é que, até hoje, o problema persiste e se avoluma, em função dos seguintes fatores:

- a) Resistência dos parasitos às drogas tradicionais,
- b) Tolerância dos vetores aos inseticidas,
- c) Aumento de áreas desmatadas e desflorestadas, e
- d) Populações não adaptadas, que imigram para tais áreas de risco (motivos econômicos e outros).

Quanto a este último fator, é sabido que alguns habitantes oriundos dessas regiões desenvolvem uma resistência parcial à doença.

Distribuição de medicamentos, (drogas, vacinas), Saneamento Básico e Controle do Vetor (biológico, químico), serão medidas altamente necessárias e devem ser bem eficazes nessa luta que

pode ser vencida transformando totalmente o desenvolvimento dessas regiões. Deixemos que somente a História registre tal período que já se faz longo demais. De fato, em outras regiões do mundo a erradicação total da malária já aconteceu, o que comprova e estimula nossos objetivos.

Os fatores acima indicados porém devem estar associados: há a necessidade do medicamento e de sua distribuição eficiente, mas, o saneamento deve vir garantir menores riscos, gradativamente, de tal modo que futuramente nem haja mais a necessidade do medicamento pois a existência desse não é, em absoluto, suficiente para garantir o desenvolvimento real das regiões e melhora da qualidade de vida. De fato, ninguém se aventura a correr o risco de contrair doenças graves, pela simples existência de um medicamento, por mais eficaz que ele seja. Por outro lado, estratégias isoladas de combate à malária, como por exemplo, apenas o saneamento básico, mostraram-se caríssimas, além de ineficientes.

1.2 - A DOENÇA:

A malária, em seres humanos pode ser causada por uma das quatro espécies do protozoário (organismos unicelulares) do genero *Plasmodium*: *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. falciparum*. Outras centenas de *Plasmodium* podem causar a malária, mas não na humanidade. As quatro espécies de *Plasmodium* que infectam o homem, apresentam algumas diferenças no seu ciclo de vida, causando sintomas característicos. *P. falciparum* é a mais grave, pois causa fortes dores de cabeça e derrame cerebral, sendo responsável por 80% das mortes por malária (KLAYMAN, 1989).

No ciclo básico da doença tem-se como vetor e hospedeiro intermediário, o mosquito *Anopheles darlingi* o qual, portador do *Plasmodium*, infecta o homem no momento em que este é picado. Poucas espécies do gênero *Anopheles* (existem cerca de 150 espécies) transmitem a malária nos seres humanos e somente a fêmea - que necessita alimentar-se de sangue - é capaz de penetrar a pele com sua picada. Assim, ela injeta na corrente sanguínea o *Plasmodium* na forma de esporozoítos que atingem o fígado e se transformam em merozoítos. Os merozoítos retornam à corrente sanguínea invadindo os glóbulos vermelhos onde se reproduzem na forma de equizonte e, se não houver tratamento,

podem destruir as células, causando febres, anemias e complicações em órgãos vitais como fígado, pulmões e cérebro (Fig.1). Formas gaméticas do parasita, também se diferenciam e se multiplicam, e quando o indivíduo é picado, os esporozoítos migram para as glândulas salivares do mosquito, havendo portanto como que um refluxo, que causará novas infecções nas pessoas subsequentemente atingidas.

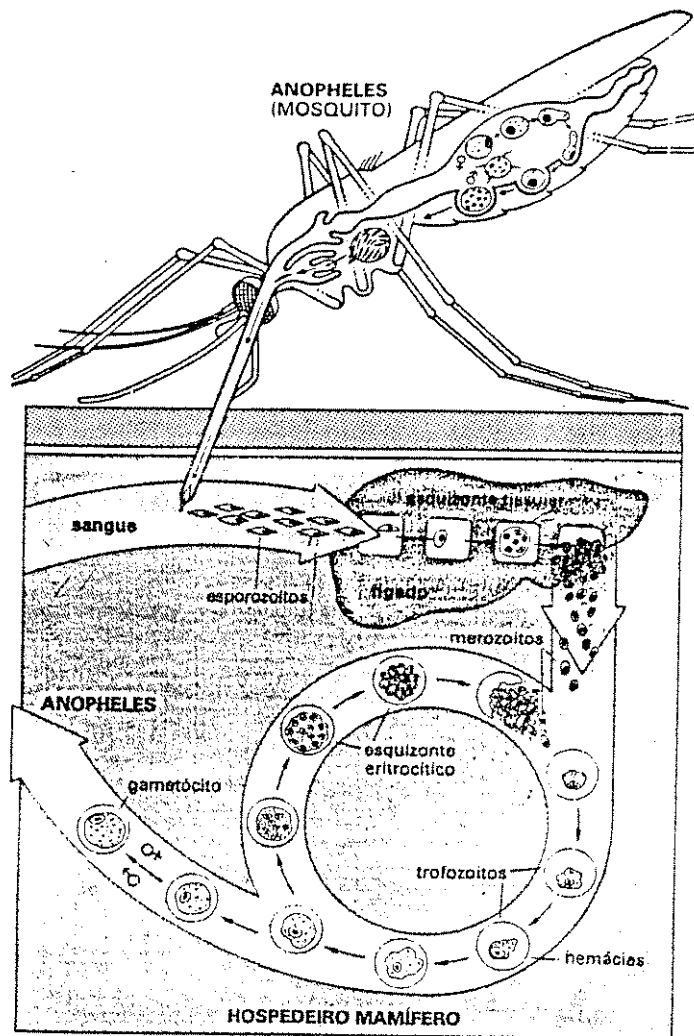


Figura 1. Ciclo biológico da malária.

1.3 - OS MEDICAMENTOS:

As drogas visam destruir o parasito na forma de merozoítos, antes que este destrua os glóbulos vermelhos. Até 1630, não se tinha um tratamento seguro para a doença. Foi através dos jesuítas que se teve o conhecimento da utilização da casca da árvore *Chincona*, então utilizada pelos Incas, no Perú. Em 1742, pesquisadores franceses isolaram o princípio ativo, um alcalóide que chamaram de quinina. A droga, de origem natural ou sintética, bem como as moléculas derivadas, passaram a ser amplamente utilizadas até os dias de hoje. A quinina porém, e seus derivados, como a mefloquina e a cloroquina, podem causar efeitos colaterais prejudiciais à audição e ao fígado, além de provocarem alucinações, e, o mais grave, é que o parasita vem adquirindo resistência à quinina e a seus derivados. O *Plasmodium falciparum*, por exemplo, já não pode ser controlado por medicamentos unicamente à base de quinina. São necessárias associações de medicamentos, como recentemente foi testado no Brasil: as drogas mefloquina e artesunato de sódio (derivado da artemisinina), aplicadas em garimpeiros com a doença, apresentaram cura de 100% (GONDIN, dados não publicados).

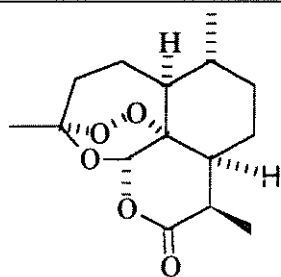
Na Colombia e nos EUA vêm sendo desenvolvidas pesquisas sobre uma vacina, motivadas pelo fato de habitantes de regiões de

malária terem desenvolvido resistência parcial à doença. Os experimentos já ofereceram 60% de controle do *Plasmodium*, utilizando-se proteínas que inibem o desenvolvimento das formas esporozoítas e merozoítas (FERREIRA, 1993; NUSSENZWEIG & LONG, 1994).

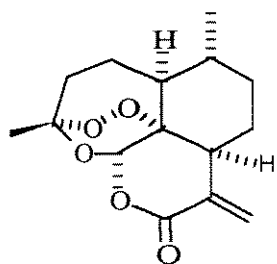
De fato, a busca por novas drogas antimaláricas reiniciou-se mais fortemente, há pouco mais de 20 anos justamente motivada pelo aparecimento das formas de *P. falciparum*, resistentes à cloroquina, o medicamento mais eficaz até então. Pesquisadores chineses iniciaram testes com uma espécie da sua flora e de sua medicina tradicional, com registro de que, há mais de 2000 anos, era utilizada para curar febres renitentes; a espécie era a *Artemisia annua* L..

Coincidentemente, na mesma época em 1972, pesquisadores chineses e yougoslavos isolaram da *A. annua* L., uma lactona sesquiterpênica que passou a ser intensamente pesquisada no mundo todo, oferecendo controle eficaz para todos os tipos de malária, inclusive àqueles que apresentavam resistência à cloroquina. Os chineses chamaram à mesma molécula ativa contra o *Plasmodium*, de Qinghaosu, erva verde, e os yougoslavos, de artemisinina (KLAYMAN, 1989).

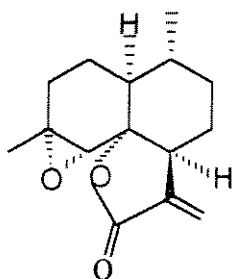
A partir da artemisinina, biossintetizada pela *A. annua*, foram obtidos outros compostos por semi-síntese, tais como: artesunato de sódio, arteméter e arteéter. Esses compostos, apresentando diferentes solubilidades, permitiram novas formas de se administrar os medicamentos tornando-os mais eficazes no combate à malária (Fig. 2).



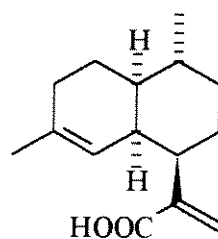
**Artemisinina
(Qinghaosu)**



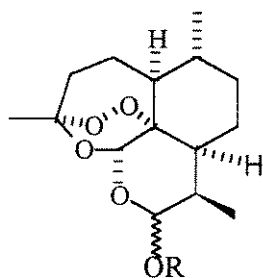
Artemisiteno



Artenuina B



Ácido artemisinínico



**Arteméter R = CH₃
Arteéter R = CH₂CH₃
Artesunato de sódio R = COCH₂CH₂COONa**

Figura 2. Estrutura dos principais compostos isolados de *A. annua* L., e derivados semi-sintéticos artemisinina.

1.4 - MODO DE AÇÃO E DOSE DA ARTEMISININA:

A artemisinina, podendo ser administrada pela via retal, (através de supositório) promove a rápida absorção do medicamento atingindo diretamente a rede sanguínea local, penetrando nas hemáceas e destruindo a membrana do *Plasmodium*. BRUNETON (1993) relata que a dose eficaz para o controle do *Plasmodium* foi de 0.9 a 1.2 g de artemisinina (suspensão-IM), por indivíduo, em 3 dias. No entanto, devido a artemisinina ser pouco solúvel em água e em fase lipídica, uma solução injetável de arteméter, via IM, foi mais eficaz nos casos de malária cerebral na dose de 0.6 g de arteméter, em 3 a 4 dias. De fato, por via oral, a artemisinina ou seus derivados, são rapidamente absorvidos, transformados e excretados, enquanto que, por via IM, produzem efeitos mais prolongados (C.C.R.G.Q., 1982A,B). Daí, a vantagem de se ministrarem os derivados semi-sintéticos que permitam a utilização por outras vias.

1.5 - ORIGEM E EVOLUÇÃO MICROMOLECULAR:

A família *Asteraceae* é um bom exemplo de sucesso químico. Sua sobrevivência e predominância nos dias de hoje, se deve a sua maquinaria química. Realmente, compostos como lactonas sesquiterpênicas tornaram-se não voláteis por processos oxidativos, tendo atividades herbicida, inseticida e redutoras da digestibilidade, para muitas espécies (SABATINI, comunicação pessoal).

A forma dos organismos (morfologia) é resultado da organização espacial das macromoléculas, como polissacarídeos e proteínas, os quais são formados por caminhos metabólicos denominados de “metabolismo primário”. O excesso desses precursores (overflow) que não é utilizado na construção dessas macromoléculas é usado no metabolismo especial para a produção de micromoléculas, tais como alcalóides, terpenóides e policetídeos. A distribuição esporádica e heterogênea desses metabólitos especiais em plantas, aliada a sua toxidez para herbívoros, foi responsável pela atribuição de uma função de defesa, como única justificativa para a produção desses compostos que não pertencem ao metabolismo primário (FUTUYMA & SLATKIN, 1983; SPENCER, 1988; HARBONE, 1988 e 1989; e HASLAM 1989).

O avanço evolutivo de linhagens procarióticas primitivas foi acompanhado pelo desenvolvimento dos caminhos do metabolismo especial, secundário, baseado no acetato (ácidos graxos saturados), mevalonato (esqualeno, hopanóides e carotenóides) e chiquimato (até fenilalanina e tirosina). Mecanicamente, todas essas reações podem ser explicadas apenas por reduções e desidratações (condensações) envolvendo, muito raramente, oxidações. A expansão oxidativa desses caminhos ocorreu por volta de 2000 milhões de anos atrás, devido ao aumento da concentração do oxigênio atmosférico, antigo produto de excreção das atividades fotossintéticas das cianobactérias. Dessa maneira, ácidos graxos insaturados, esteróides e outros terpenóides puderam ser formados. Algas são constituídas predominantemente por derivados das vias do acetato e do mevalonato, como policetídeos e terpenóides, estando o caminho do ácido chiquímico restrito até a fenilalanina e à tirosina (BORIN, 1993).

A expansão da via do chiquimato pós-fenilalanina, levou ao desenvolvimento de uma verdadeira máquina vegetal, adaptada às condições do ambiente terrestre. Essa "inovação" metabólica, foi a mais importante novidade evolutiva que permitiu o aparecimento e a manutenção das plantas neste novo ambiente (GOTTLIEB, 1989). Desse modo, a desaminação e a oxidação da fenilalanina

produziram ácidos cinâmicos que são precursores de flavonóides e ligninas, substâncias responsáveis pela proteção contra os raios UV e pela dureza dos tecidos vegetais, respectivamente. Essa rigidez permitiu o aparecimento de um sistema vascular, responsável pela condução da água e nutrientes captados pelas raízes e também das substâncias fabricadas nas extremidades achatadas dos ramos, (folhas primitivas) por todo vegetal. Secundariamente, a toxidez dessas micromoléculas, devido a presença de hidroxilas fenólicas, conferiu uma proteção química às plantas, contra outros organismos, como fungos e animais herbívoros.

Um esquema biossintético da formação das classes de metabólitos especiais é mostrado na Fig. 3.

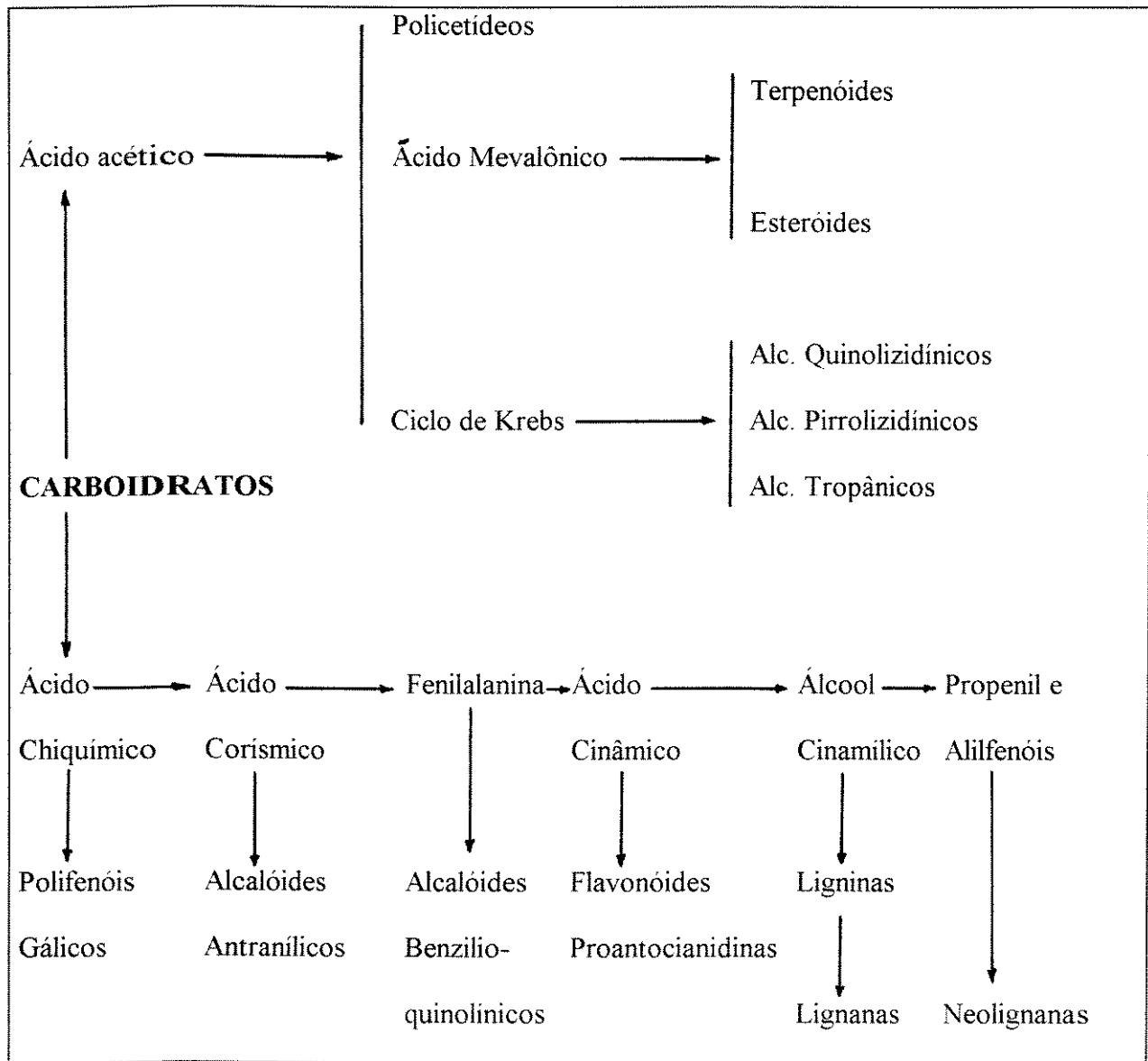


Figura 3. Esquema biossintético geral da formação das classes de metabólitos especiais (GOTTLIEB,1992).

1.6 - A BIOSSÍNTESE DA ARTEMISININA:

Embora a via biossintética para a artemisinina e alguns de seus precursores não tenha sido estabelecida, alguns passos de biotransformação têm sido elucidados *in vitro* e *in vivo*.

FPP é considerado o precursor para os sesquiterpenos, AKHILA *et al.*, (1987). Esses autores propuseram uma via biossintética completa para a artemisinina, iniciando-a a partir do IPP (Fig.4). A via para o ácido artemisinínico proposta por AKHILA *et al.* (1990) é baseada no seguimento do ácido mevalônico marcado ($^{14}\text{C}/^3\text{H}$), partindo-se da ciclização do cis-FPP. Os estudos desses pesquisadores, não reconhecem o ácido artemisinínico como precursor da artemisinina, mas outros autores (EL-FERALY *et al.*, 1986; ROTH & ACTON, 1987; ROTH & ACTON, 1989; JUNG *et al.*, 1990; KIM & KIM, 1992; SANGWAN *et al.* 1993 e FERREIRA, 1994) consideram o ácido artemisinínico como precursor para ambos, artenuina B e artemisinina.

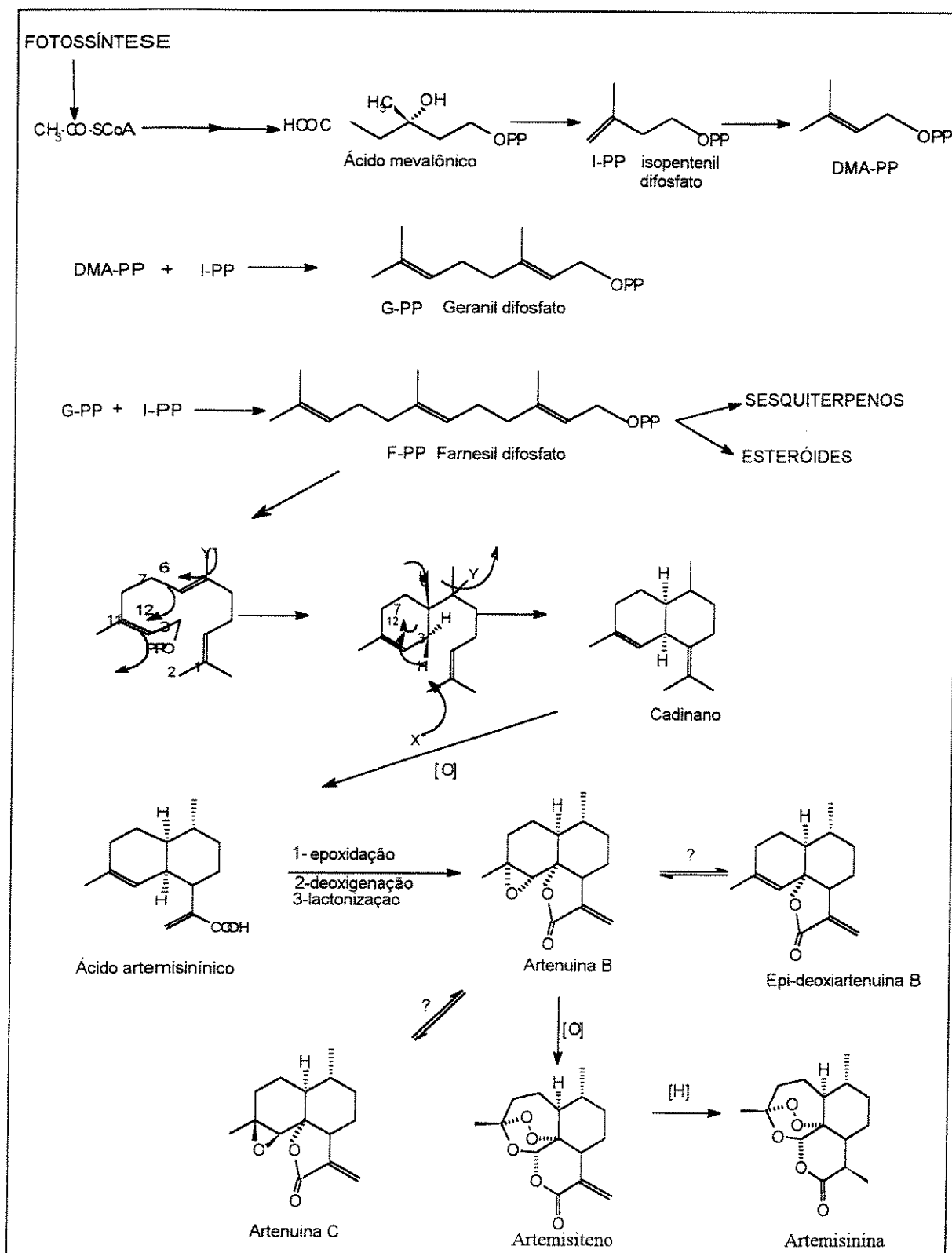


Figura 4. Via biossintética da artemisina, a partir do FPP (Woerdenbag *et al.*, 1990)

1.7 - A PLANTA: FONTE DOS PRINCÍPIOS ATIVOS ANTIMALÁRICOS:

A *A. annua* L., tem sido uma espécie bastante estudada em muitos centros de pesquisa no mundo, na década atual, e diversas são as atividades biológicas citadas. A principal indicação, é sobre a grande eficácia no controle do *Plasmodium* da malária, atividade devida a seu constituinte, "artemisinina", mais eficaz que a mefloquina, como já foi mencionado. Sendo um medicamento já em uso na China, o ocidente se esforça por obter a tecnologia de produção da espécie e dos medicamentos. Por outro lado, para efeito de registro dos medicamentos no ocidente, são exigidos procedimentos de validação específicos, que diferem daqueles aceitos no oriente. Um ponto que causou polêmica entre os presentes, por ocasião do Congresso Internacional de Plantas Medicinais de Maastrich - Holanda/92 - foi o da obtenção da matéria prima na China: foi declarado naquele evento, por participantes da República Popular da China que naquele país a *A. annua*, L. não é cultivada racionalmente - pois é até considerada "espécie invasora"- e toda a matéria prima provém de áreas infestadas. Segundo tal relato, não haveria como equacionar-se a produção do medicamento. Para viabilizar a produção, dentro da economia ocidental, prevê-se como indispensável, o cultivo da matéria prima. Assim, deverão ser

garantidas a qualidade e as quantidades, através do cultivo e melhoramento genético para se obter, do ponto de vista agrônomico e industrial, maiores teores de princípios ativos e outras características fundamentais. Estudos mostraram também que a obtenção da artemisinina por síntese total seria inviável economicamente, embora possível, devido ao grande número de etapas e baixo rendimento. O cultivo de células em suspensão é outra técnica que vem sendo pesquisada, assim como o uso de elicitores enzimáticos, precursores e técnicas de raízes transformadas, todas visando aumentar os teores de princípios ativos (WOERDENBAG *et al.*, 1991, 1993; BROWN, 1994; PELLEGRINO *et al.*, 1995). Isto, para competir com os rendimentos possíveis via “cultivo da espécie”, hoje o caminho mais aceito para maior produção dos medicamentos (WOERDENBAG *et al.*, 1990).



Figura 5. Planta de *A. annua* L.,(híbrida “Ch.x Viet.55”, em estadio de corte), cultivada no CPQBA.

1. 8 - DESCRIÇÃO BOTÂNICA E DISTRIBUIÇÃO:

Família: ASTERACEAE Tribo: ANTHEMIDEAE Nome científico: <i>Artemisia annua</i> L. Nome vulgar: Artemisia

Espécie anual, herbácea, ereta, de altura que varia entre 0.80 à 1.50m, ramos sulcados; folhas simples, alternas, pinatisséctas, membranáceas, com pontuações glandulosas, pêlos esparsos em ambas as faces, pecíolo em torno de 2.0cm de comprimento, limbo com cerca de 5.0 a 9.0cm de comprimento e 3.0 a 5.0cm de largura; flores ordenadas em inflorescências axilares e terminais constituídas em racemo composto, de capítulos multifloros, cada capítulo pedicelado, com cerca de 2.5 mm de comprimento e 3.25mm de largura, campanulado, constituídos de 8 à 10 flores femininas radiais e de 13 à 23 flores hermafroditas no disco; brácteas involucrais, escariosas, ovais, dispostas em duas séries, com pontuações glandulosas no dorso, borda larga, hialina, obtusa, com 1.7mm de comprimento por 1.2mm de largura; receptáculo convexo; flores femininas esverdeadas, com corola filiforme, coberta por glândulas hialinas esparsas, com cerca de 1.2mm de comprimento, estilete com ramos longos, ápice agudo; flores hermafroditas amarelo-esverdeadas, corola tubulosa, 5-denteada, com 1.7mm de comprimento, anteras de base obtusa e

apêndice apical acuminado, estilete de ramos curtos truncados no ápice, com pêlos coletores nos bordos; aquênio castanho-claro, estriado, com cerca de 1.0mm de comprimento, papus ausentes. *A. annua* L. possui aroma balsâmico e produz grande quantidade de pólen. A sua antese inicia-se pela manhã, em torno das 8:30 horas e se estende ao longo do dia. A família *Asteraceae* Dum. engloba cerca de 1100 gêneros com aproximadamente 25.000 espécies, distribuídas em regiões tropicais, sub-tropicais e temperadas. O gênero *Artemisia*, descrito por Lineu em seu *Genera Plantarum*, em 1753, possui em torno de 400 espécies e é encontrado basicamente na Europa e América do Norte (HEYWOOD & HUMPHRIES, 1978). A espécie *A. annua*, nativa da Ásia, provavelmente da China, é uma planta anual embora exista descrição de *A. biennis* Will. (USTERI, 1795)*. Sua propagação é por sementes, aceitando, dentro de técnicas específicas, a reprodução vegetativa por estacas e por cultura de tecidos. A análise citogenética da *A. annua* L., indica que a espécie possui cromossomos pequenos, onde $2n=18$, sendo a maioria metacêntricos e, um par deles, portado de satélite (PINTO-MAGLIO *et al.*, 1995). A morfologia da *A. annua* L. é mostrada em detalhes nas figuras 6, 7 e 8.

* Esta obra não pode ser consultada, fazendo parte do acervo de obras raras da "The Bristish Library", sendo permitida apenas sua microfilmagem.

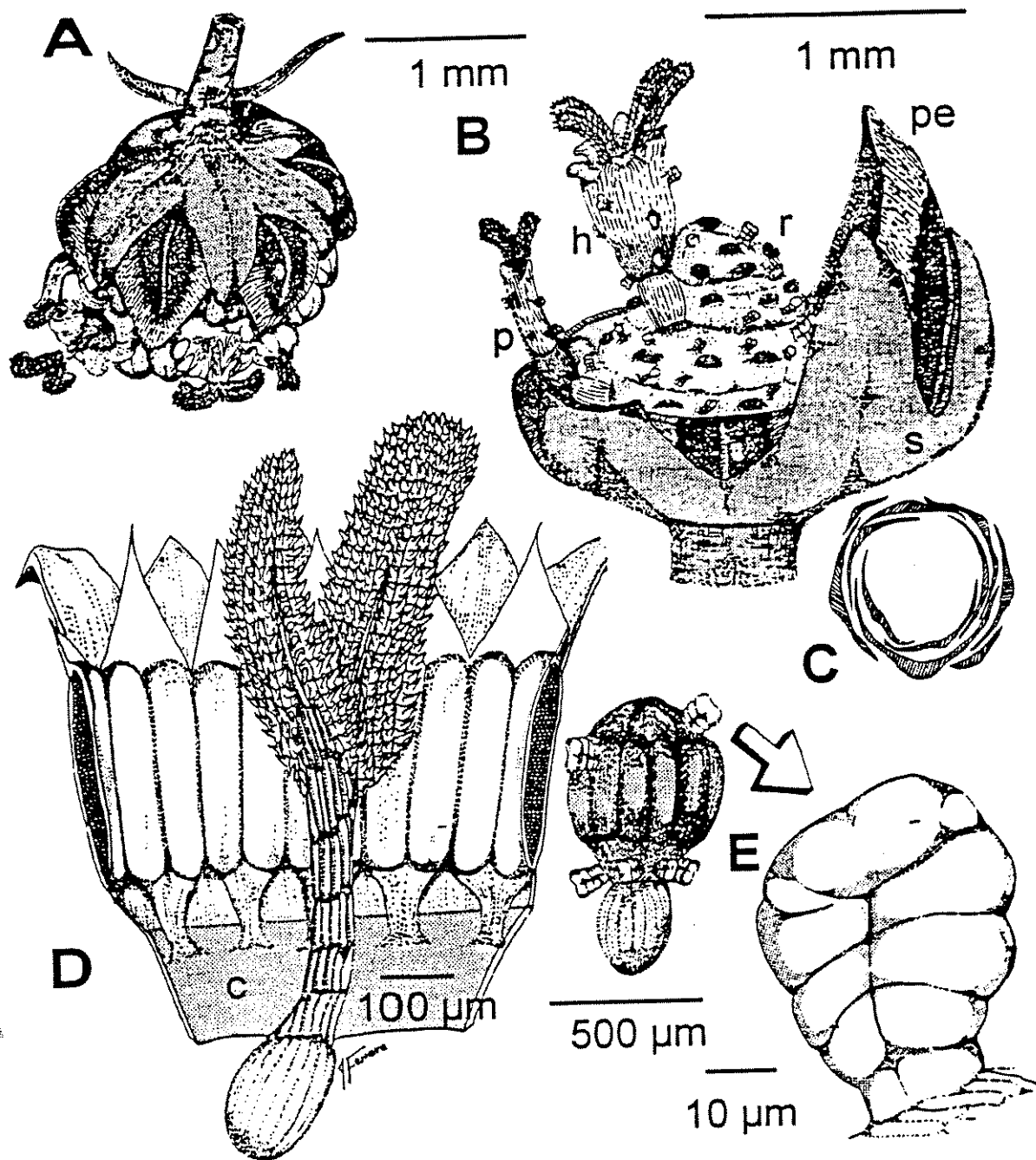


Figura 6. Morfologia floral de *A. annua*: A. Capítulo. B. Capítulo expandido mostrando cálice com sépalas (s) e pétalas (pe), receptáculo (r), pistilo marginal (p) e flores hermafroditas internas (h). Numerosos tricomas glandulares são encontrados no receptáculo e flores do capítulo. C. Corte transversal do involucre. D. Detalhes das flores hermafroditas. E. Trichoma (FERREIRA, 1994).

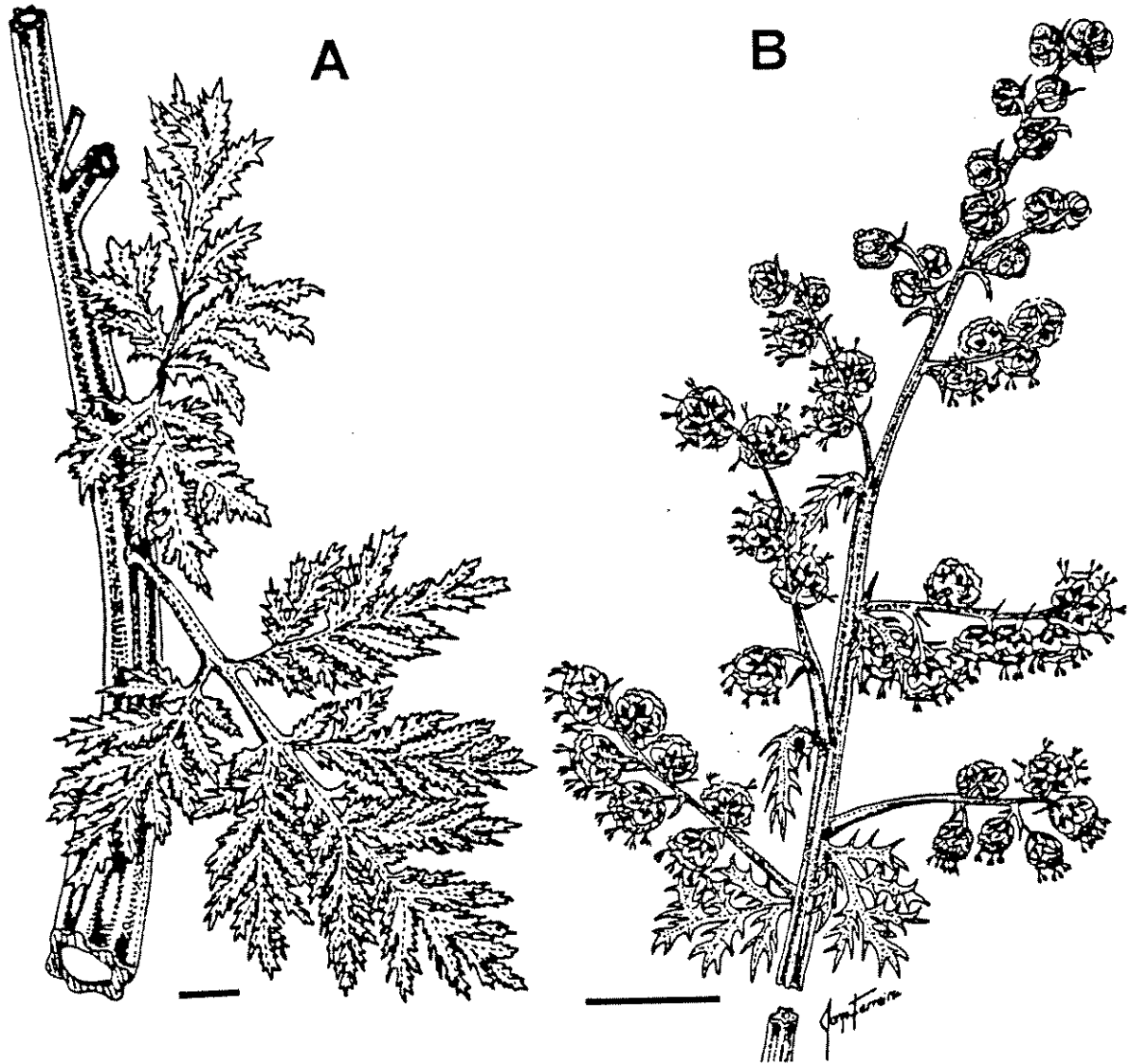


Figura 7. Ramos de *A. annua* L.: ramo vegetativo (A) e ramo em florescimento (B). O tamanho da barra é de 1.0cm. (FERREIRA, 1994).

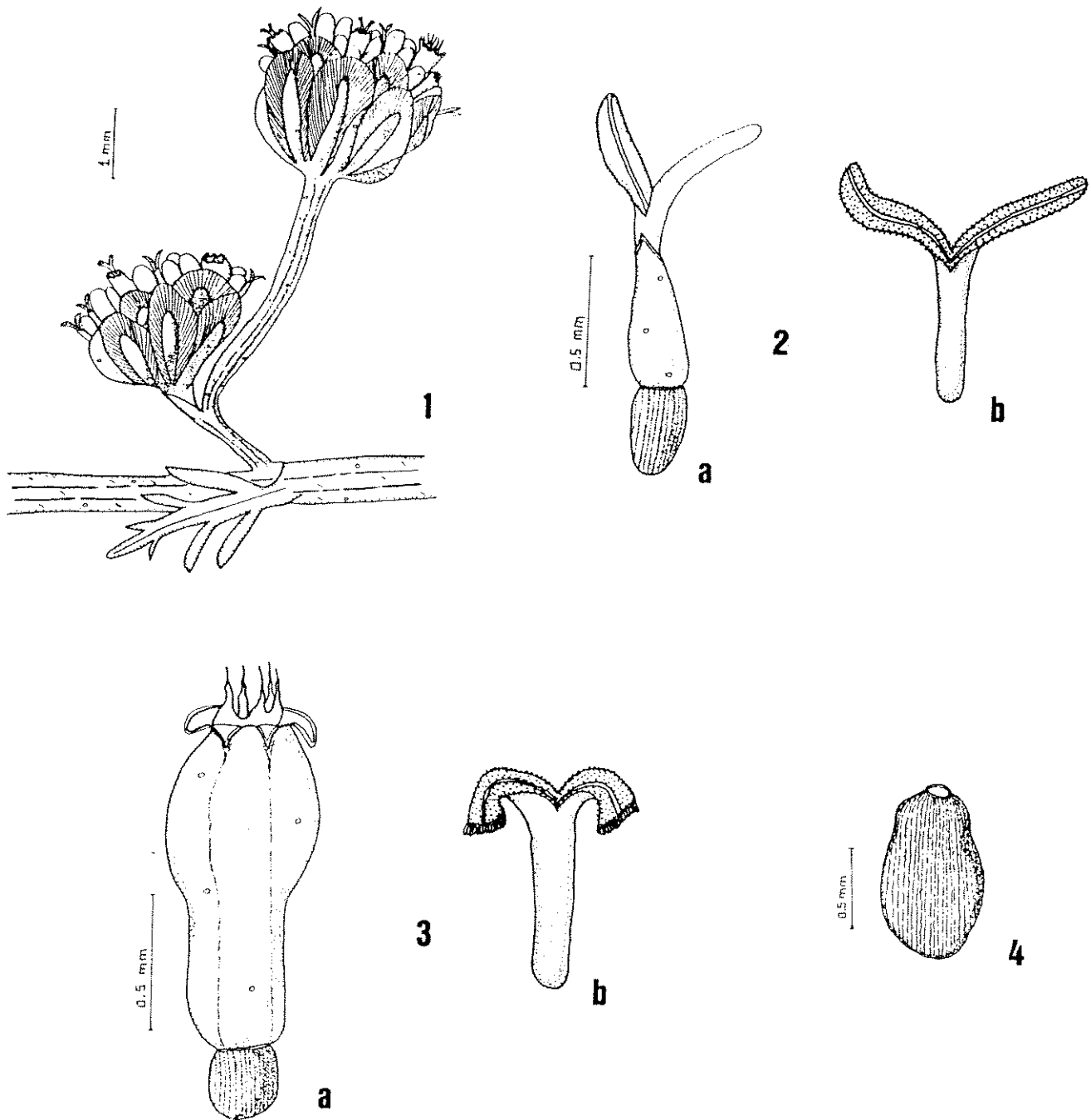


Figura 8. *A. annua* L.: 1. Detalhe do capítulo; 2. Flor feminina. a) corola filiforme; b) detalhe do estigma; 3. Flor hermafrodita. a) corola tubulosa. b) detalhe do estigma; 4. Aquênio.

2. OBJETIVOS

Considerando por um lado, o agravamento da malária devido às formas resistentes de *Plasmodium* aos medicamentos convencionais, e por outro a eficácia dos antimaláricos provenientes da *A. annua* L., já comercializados na China, vimos prosseguir estudos para viabilizar o seu cultivo no Brasil.

Estudos anteriores realizados pela equipe do CPQBA já definiam procedimentos básicos de propagação e de cultivo indicando pontos críticos quanto ao cultivo em região intertropical como: o florescimento precoce, a elevada heterogeneidade das populações, em biomassa e em teores de princípios ativos, e a influência da nutrição (MAGALHÃES, 1993; ALVES *et al.*, 1993; FIGUEIRA, 1995).

Outros trabalhos conduzidos na Suíça pela equipe da MEDIPLANT desenvolviam, através de seleção e cruzamentos, híbridos ricos em biomassa e em princípios ativos (DELABAYS *et al.*, 1992; DELABAYS *et al.*, 1994).

A partir destas pesquisas pudemos definir trabalhos subsequentes, com o objetivo principal de adquirir a tecnologia para a produção, em quantidade e qualidade, dos princípios ativos da espécie *A. annua* L., favorecendo à industrialização eminente dos medicamentos antimaláricos.

Para prosseguirmos neste objetivo, elegemos como metas:

- O estudo da biologia da reprodução,
- A seleção e o melhoramento genético para cultivo em região intertropical, e
- A influência da nutrição nitrogenada.

A composição da tese foi estruturada em Capítulos, abrangendo 6 principais pesquisas realizadas no Brasil e na Suíça nos últimos dois anos.

Os capítulos de I à VI, seguem a ordem cronológica das investigações, as quais foram desenvolvidas em consequência do inter-relacionamento entre elas.

CAPÍTULO I - ESTUDOS DO SISTEMA REPRODUTIVO DA *A. annua* L.

INTRODUÇÃO:

O estudo do Sistema Reprodutivo de uma espécie é um dos primeiros passos para a realização de programas de Seleção e Melhoramento Genético. Através desses conhecimentos é que se pode estabelecer uma estratégia para os ganhos genéticos desejados. Embora cada espécie tenha seu sistema reprodutivo básico, as espécies não domesticadas ou em fase de domesticação, podem apresentar certa variação nos diversos aspectos que compõem o sistema reprodutivo (Taxa de cruzamento, viabilidade de pólen, etc..). Assim, PETER BLANC (1992) verificou tais variações, dentro de limites estreitos, para os genótipos de *A. annua*, melhorados na MEDIPLANT. Portanto, as técnicas que investigam: o sistema reprodutivo definindo taxas de alogamia, o aceite à propagação vegetativa, a produção de pólen e outras, devem seguir cada genótipo de interesse durante o desenvolvimento do programa de seleção e melhoramento genético. Neste trabalho, tivemos como objetivo definir as características básicas de reprodução de alguns genótipos que vêm sendo cultivados no CPQBA.

MATERIAL E MÉTODOS:

A. annua L. foi introduzida no campo experimental do CPQBA/UNICAMP, em 1987, partindo-se de sementes procedentes da Europa, provavelmente Espanha. Em 1988, recebemos sementes de procedência chinesa, através do Banco de germoplasma da Força Militar Americana.

Diversas variações morfológicas e fisiológicas foram observadas nessas populações quanto à idade de florescimento. Assim, uma população não selecionada de origem chinesa apresentava três idades de florescimento: aos 2, 3 e 4 meses. Também ocorreram plantas de crescimento em roseta, sem o desenvolvimento da haste principal.

Posteriormente, em 1992/93, recebemos sementes híbridas da MEDIPLANT, Suíça, que foram denominadas de: Híbrida Suíça I e Híbrida Suíça II.

Destes materiais, três foram eleitos para o estudo: uma população selecionada de plantas chinesas que floresciam aos 4 meses, e os Híbridos Suíços I e II. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação, com cinco plantas de cada material, e em campo, com maior número de plantas. O período de cultivo foi de julho de 1994 a janeiro de 1995, nas condições meteorológicas apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições metereológicas no CPQBA, durante o ensaio.

	Casa de vegetação			Campo		
	T°C max.	T°C min.	UR %	T°C max.	T°C min	Chuva (mm)
Jan./94	34.0	21.1	22.8	31.0	17.1	105.6
Fev.	37.7	21.9	24.4	33.7	19.6	222.2
Mar.	35.2	20.9	24.6	30.1	18.6	152.4
Abr.	32.75	19.1	23.3	29.7	15.7	53.2
Mai.	30.29	18.4	21.2	28.0	12.5	59.2
Jun.	29.20	14.0	21.3	25.4	8.8	33.2
Jul.	27.33	14.0	18.5	28.0	9.1	36.2
Ago.	29.74	15.6	19.7	28.8	10.7	-
Set.	32.66	18.4	21.8	32.3	13.8	-
Out.	35.58	21.2	23.7	33.9	16.3	90.2
Nov.	35.84	19.7	22.3	30.4	14.9	169.0
Dez.	37.84	22.5	26.6	32.3	19.6	223.2
Jan./95	38.36	22.4	24.8	32.2	17.9	186.1
Fev.	33.0	22.0	23.4	29.3	20.1	422.3

As mudas foram obtidas por sementes em sistema de tubetes, com terra e húmus de minhoca como substrato, dentro de viveiro sob tela sombrite de 50% e em condições de temperatura ambiente. As plântulas foram repicadas, de forma a se ter uma planta de 10cm de altura por tubete. A seguir, algumas mudas foram transplantadas para vasos em casa de vegetação e as demais o foram para o campo experimental.

As plantas primeiras, isto é, as da casa de vegetação, foram mantidas sob condições ambientais de temperatura e irrigadas por aspersores-pulverizadores.

No campo, as plantas de cada lote, população e híbridos, foram cultivadas no espaçamento de 0,50 x 0,30m, e irrigadas por aspersão.

Quando as plantas atingiram o estágio de florescimento, as inflorescências frescas, dos três lotes, foram analisadas em laboratório para a verificação de variações morfológicas, tais como: porte, disposição dos elementos florais e N° de flores pistiladas e monóclinas.

A receptividade do estigma foi verificada, utilizando-se Sudam III glicerinado (JOHANSEN, 1940).

A viabilidade dos grãos de pólen foi avaliada através da técnica de coloração com Carmim acético (RADFORD *et al.*, 1974) e com Verde malaquita/fucsina ácida (ALEXANDER, 1980). Utilizou-se

pólen de anteras de várias flores. Esta verificação se baseia na coloração do citoplasma do grão de pólen pelo corante: grãos de pólen viáveis apresentam coloração purpúrea, enquanto os inviáveis apresentam-se incolores ou purpúrea muito clara, como consequência da ausência ou da pequena quantidade de citoplasma. Para o estudo do desenvolvimento da flor e da técnica de emasculação, 10 capítulos por ramo de inflorescência foram tomados aleatoriamente, nas plantas em vasos, ensacando-se três ramos.

Devido ao tamanho diminuto dos capítulos, em torno de 3,25mm de largura por 2,5mm de comprimento e, conseqüentemente, das flores monóclinas, completas, com cerca de 1,7mm e as pistiladas com cerca de 1,2mm, decidiu-se utilizar somente as flores do raio (pistiladas), para o acompanhamento dos testes de polinização controlada. Esta foi facilitada pela maturação centripeta das flores do capítulo, as quais ficam receptivas primeiro (pistiladas). De fato, as flores monóclinas apresentam protandria (oferecem o pólen primeiramente) sendo este um mecanismo característico para a família (SMALL, 1915).

Para a emasculação ou retirada das flores monóclinas do disco, o ramo de capítulos selecionados foi ensacado e o seu desenvolvimento foi acompanhado até as flores do raio tornarem-se receptivas (abertura das papilas estigmáticas, com sua

superfície brilhante). Assim, considerou-se como estágio ideal, aquele onde todas as flores estavam bem desenvolvidas, principalmente as pistiladas, estando os ramos do seu estilete bem abertos e acima da corola. Neste estágio, as flores monóclinas mais próximas do raio, deveriam apresentar a superfície da corola amarelada, demonstrando a grande quantidade de pólen produzida e a eminência da abertura das flores (pré-antese).

Após três a quatro dias da retirada das flores monóclinas, quando as flores pistiladas tornaram-se receptivas, alongando e abrindo os ramos do estigma, realizamos os testes de polinização controlada.

As plantas dos três lotes (4 meses, Híbrida Suíça I e II), foram utilizadas para os testes de polinização controlada (manual), tendo-se cinco plantas por lote, e nestas, dez capítulos por ramo, para cada um dos seguintes tratamentos:

1. **Controle:** Dez capítulos em estágio de botão, foram cobertos por saquinhos de papel manteiga para determinação da ocorrência de autopolinização e avaliação da influência do vetor da polinização.

2. **Agamospermia:** Dez capítulos foram ensacados em botão com posterior remoção das flores monóclinas (emasculadas) e novamente ensacadas sem polinização manual para a determinação da ocorrência de apomixia.

3. **Geitonogamia:** Dez capítulos foram escolhidos, emasculados e quando as flores pistiladas apresentaram-se receptivas, efetuou-se a polinização manualmente, utilizando-se pólen da mesma planta (autopolinização forçada), para determinação de compatibilidade genética. Após a polinização, os ramos foram novamente ensacados.

4. **Xenogamia:** Dez capítulos passaram pelo mesmo processo de emasculação e foram polinizados manualmente com grãos de pólen provenientes de flores de outro lote, para a determinação da polinização cruzada.

O pólen utilizado para as polinizações foi coletado de flores monóclinas em fase de apresentação do pólen.

Ocorreu também o acompanhamento de plantas em condições de campo, marcando-se alguns ramos ao acaso que apresentavam capítulos em botão. Procedeu-se também ao isolamento de alguns ramos para avaliação de polinizadores a nível de campo.

Os resultados obtidos nos tratamentos foram avaliados pela produção dos frutos.

Os capítulos dos tratamentos de autopolinização e polinização cruzada, foram fixados em FAA-Álcool 70, em intervalos de 24 h após a polinização, até 15 dias. Flores destes capítulos foram preparados de acordo com técnica de MARTIN (1959), modificada devido ao tamanho diminuto das flores. Assim, não se levou o material à estufa, deixando-o em NaOH 9N, por 50min., em temperatura ambiente e passando-o, a seguir, pelo processo de lavagem com água destilada. Então, as flores foram separadas dos capítulos, depositadas em lâminas, adicionando-se o corante azul de anilina. O material foi observado para a averiguação da formação do tubo polínico em microscópio de fluorescência.

O estudo de possíveis polinizadores foi feito através de observações visuais diretas no campo, em época de florescimento. Os insetos que visitaram as plantas foram coletados em sacos plásticos, congelados e conservados para a avaliação comparativa entre os grãos de pólen depositados sobre o seu abdômen e o pólen da planta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Tabela 2. Número médio de flores, frutos e percentual de sucesso dos tratamentos (em função da produção de frutos/flores) de *A. annua*, L., “4 meses”.

Tratamentos	Flores	Frutos	Sucesso %
Controle - Ensacado	300	90	28,57
Controle - Não ensacado	300	160	53,33
Agamospermia	59	0	0
Geitonogamia (auto-polinização forçada)	65	16	24,67
Xenogamia (polinização com pólen de H II)	67	47	70,12

Tabela 3. Número médio de flores, frutos e percentual de sucesso dos tratamentos (em função da produção de frutos/flores) de *A. annua*, L., “H II”.

Tratamentos	Flores	Frutos	Sucesso %
Controle - Ensacado	240	50	28,83
Controle - Não ensacado	240	120	50,00
Agamospermia	60	0	0
Geitonogamia (auto-polinização forçada)	64	14	21,87
Xenogamia (polinização, com pólen de “4 meses”)	65	42	64,61

Tabela 4. Número médio de flores, frutos e percentual de sucesso dos tratamentos (em função da produção de frutos/flores) de *A. annua*, L., "H I".

Tratamentos	Flores	Frutos	Sucesso %
Controle - Ensacado	230	60	26.08
Controle - Não ensacado	230	100	43.48
Agamospermia	51	0	0
Geitonogamia (auto-polinização forçada)	57	15	26.31
Xenogamia (polinização, com pólen de "H II")	55	36	65.45

Dos três tipos de plantas analisadas, a "4 meses" é a que apresenta maior nº. de flores por capítulo, tendo-se a impressão de que o capítulo é maior, com cerca de 30 flores, das quais aproximadamente 9 são pistiladas e 21 são completas. A "H II", apresenta, em média, 24 flores, das quais, aproximadamente, 9 são pistiladas e 15 são completas. A "Híbrida I" apresenta, em média, 23 flores, sendo 7 pistiladas e 16 completas.

A receptividade do estigma das flores pode também ser feita visualmente, pois nesta fase, os ramos do estigma tornavam-se brilhantes e bem abertos.

As flores dos tratamentos de autopolinização, preparadas e analisadas em microscópio de fluorescência, com 3 repetições, evidenciaram que não havia formação do tubo polínico, na maioria

dos casos, levando a concluir-se que se tratava de autoincompatibilidade esporofítica, ficando a inibição a nível do estigma. Mesmo em alguns casos, onde o pólen iniciava a germinação, o crescimento do tubo era inibido ao entrar no estigma.

Em condição de campo, foram observados insetos polinizadores, sendo os mais frequentes e abundantes: *Apis melifera* e *Tetragonisca* sp (abelha Jataí).

Estes, sobrevoam os capítulos pousando neles e coletando pólen. Ao comparar o pólen retirado da escopa e abdómen dos insetos, com o pólen da *A. annua*, constatou-se tratar-se do mesmo tipo, embora pólenes de outras espécies também estivessem presentes. De fato, as abelhas como polinizadoras oportunistas, não têm uma única preferência na coleta de pólenes.

É indicado também para a espécie *A. annua* L., a polinização anemófila, devido à grande quantidade de pólen produzido e por este apresentar-se quase sem ornamentação (liso).

CONCLUSÕES:

- Os dados obtidos indicam a ocorrência tanto de polinização cruzada, como, em menor grau, de autopolinização. A primeira, portanto, formando maior número de frutos, enquanto poucos são formados por autopolinização.
- A espécie não produz frutos por apomixia.
- No caso do controle, ocorreu maior produção de frutos nos ramos não ensacados e, nas condições de campo, a produção foi bem maior devido à presença dos vetores de polinização: vento e insetos.
- A taxa de alogamia dos genótipos estudados foi elevada, de 72 à 80%, indicando a possibilidade de obtenção de híbridos e de ganhos genéticos rápidos, já que a espécie aceita também a propagação vegetativa e existe variabilidade a ser explorada.
- Sendo baixa a taxa de autogamia, aproximadamente 20%, os cruzamentos visando a obtenção de híbridos, dispensam a emasculação. De fato, os trabalhos de PETER BLANC (1992) sugerem a não separação entre as sementes híbridas e aquelas provenientes de autofecundação, considerando que as últimas representam taxa de autogamia entre 10 e 20%, com pequena participação nas populações.

CAPÍTULO II - *A. annua*, L.: SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE FLORESCIMENTO TARDIO.

INTRODUÇÃO:

Nos estudos da *A. annua* no CPQBA utilizou-se, inicialmente, a seleção massal simples colhendo-se sementes de plantas de florescimento tardio e de maior biomassa, dentre populações de grande variabilidade. Tinha-se assim, apenas o controle do progenitor feminino e o processo era repetido em gerações subsequentes, cultivadas isoladamente. Estaríamos caminhando para uma população endogâmica superior, se não fosse a característica de forte alogamia da espécie, mencionada no Capítulo I e também por PETER BLANC, (1992). De fato, logo se evidenciou que os progressos esperados eram apenas parcialmente observados. Havia incompatibilidade, justamente com genótipos próximos, e as sementes colhidas numa população eram, na sua maioria, provenientes de cruzamentos entre genótipos distintos, acarretando progênies segregantes.

Já a seleção massal realizada pela MEDIPLANT, centralizava o seu programa de melhoramento, na escolha de indivíduos superiores em biomassa e em teores de artemisinina. Como, por questões de

fotoperíodo e de temperatura, não se tinha a formação completa das sementes a nível de campo, nem a ação de polinizadores, naquela região da Suíça, o processo de melhoramento passou pela clonagem dos indivíduos superiores e cruzamentos, em condições controladas, onde se conheciam os dois progenitores. Assim, de forma imediata, obteve-se populações uniformes, pois, com a baixa taxa de autofecundação, as sementes produzidas eram quase que exclusivamente dos progenitores eleitos, ou de um deles por autofecundação. Trabalhando então, com populações provenientes da China e do Vietnã, encontrou-se indivíduos ricos em Artemisinina, >1% sobre o peso de folhas secas, enquanto tínhamos 0.2 à 0.4% nas nossas populações. Por outro lado, a ausência de fotoperíodo favorável ao florescimento, na Suíça, permitindo o desenvolvimento pleno da biomassa na população, possibilitava a seleção de indivíduos de maior biomassa. Determinados híbridos, assim chamados, embora os progenitores não fossem linhagens puras obtidas por endogamia e sim genótipos superiores clonados, promoveram ganho genético enorme, em relação aos rendimentos citados na literatura (LIERSCH *et al.*, 1986; SING *et al.*, 1988; WOERDENBERG *et al.*, 1990, 1994; CHARLES *et al.*, 1990; SHARMA *et al.*, 1991; LAUGHLIN, 1994; CHAN *et al.*, 1995).

De fato, a grande dificuldade para o cultivo da *A. annua* em uma região intertropical, onde a malária está normalmente presente, é o fenômeno do florescimento precoce e irregular. Plantas quando florescem cedo, paralizam seu crescimento, ocasionando baixos rendimentos de artemisinina. Outro problema é que, com o florescimento precoce ou irregular numa população, as operações mecanizadas necessárias a um cultivo em larga escala, seriam dificultadas.

Aproveitando o programa de melhoramento da *A. annua* desenvolvido pela MEDIPLANT (DELABAYS, 1994), o qual já vinha selecionando estirpes ricas em artemisinina e de boas qualidades agronômicas, como já foi mencionado, dirigimos então a seleção e o melhoramento, para obter genótipos de florescimento tardio ou uniforme que pudessem ser cultivados no Brasil.

Tabela 6. Composição do substrato organo-mineral.

pH (H ₂ O)	N	P	K	Ca	Mg	Salinidade
	micro-mole/L					u-S
6.0	8435	1180	2237	5020	954	1353

Valor médio: 23.75°C Variância: 5.67 Ecart-Tipo: 2.38
 Min./Max.: 20.7/27.1°C

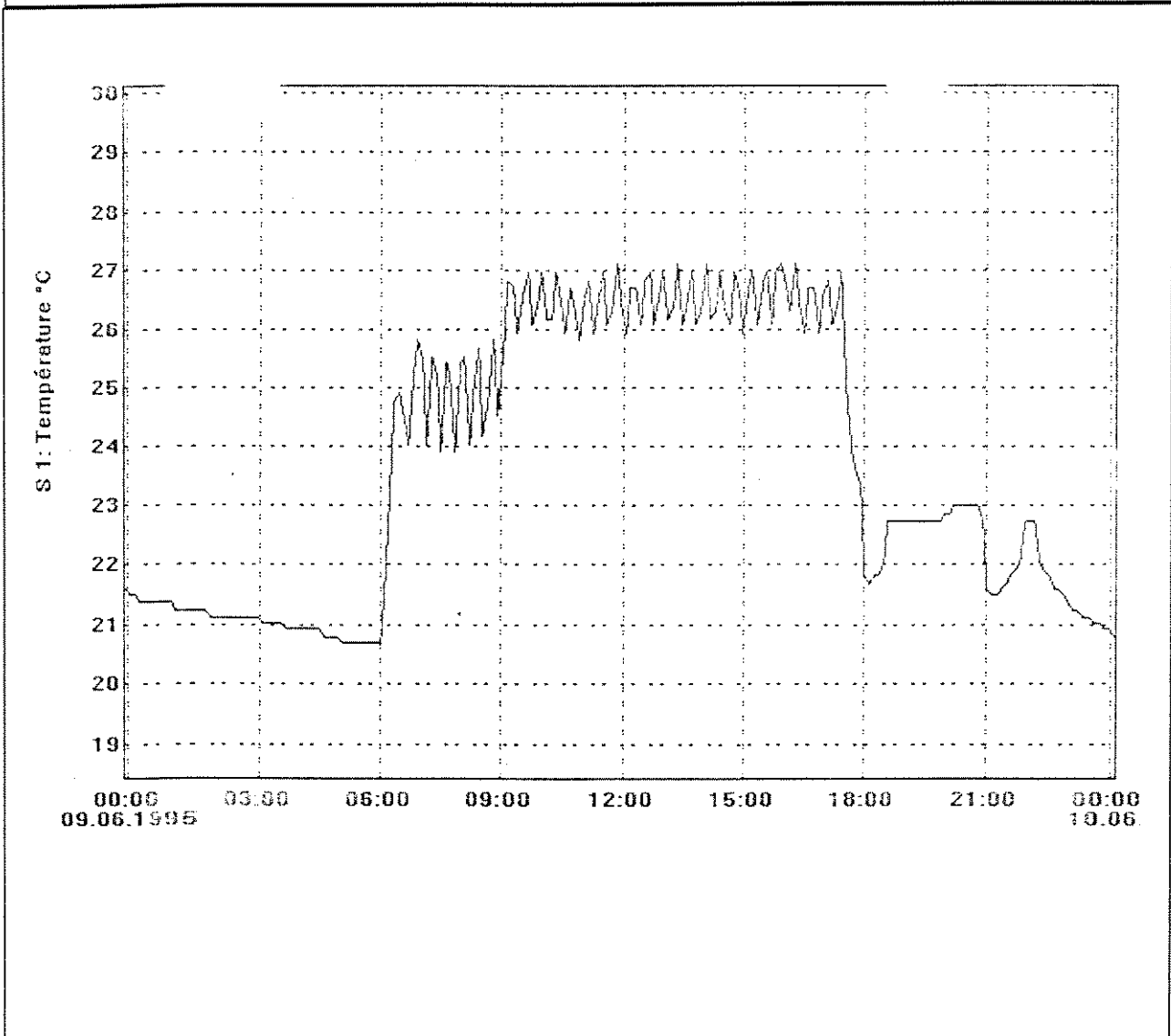


Figura 9. Temperatura diária no interior do Fitotron.

As amostragens de folhas para as determinações de artemisinina eram realizadas no momento do corte das plantas e este, definido no estágio de início de florescimento. Aproximadamente 10 folhas eram colhidas de cada planta, no terço médio superior. As amostras eram deixadas em pequenos sacos de papel, e secas em estufa com circulação forçada de ar, a 35-40°C, por 24 horas. O material seco era moído manualmente ou em moinho e, após homogeneização, tomava-se 100mg, pesadas em balança analítica de 4 casas decimais. As amostras pesadas eram transferidas para tubos de ensaio apropriados para o misturador “Politron” e recebiam 5mL de tolueno, aplicados com pipeta automática. Esta operação era realizada em capela, e as amostras passavam pelo “Politron” por 30 segundos. A cada amostra, lavava-se a haste do aparelho com tolueno, sendo o mesmo tubo de lavagem utilizado para duas amostras. Quando 8 amostras eram preparadas dessa forma, seguiam para uma centrífuga com capacidade para 8 tubos, regulada para 3770rpm, por 5mn. A seguir, aplicava-se 1µL do sobrenadante de cada amostra, em cromatoplaça de sílica - Merk, modelo 60F254.

A aplicação na placa era realizada com capilares de 1 µL, acoplados à mesa de aplicação da CAMAG, modelo Nanomat III. As aplicações na placa eram realizadas conforme a Fig.10.

Todos os procedimentos, desde a aplicação do tolueno até a deposição das amostras na placa, eram realizados rapidamente para evitar perda de tolueno. Mesmo assim, essa perda foi quantificada conforme a tabela 7.

A solução de migração era constituída de: 35mL de éter de petróleo, extra puro, 10mL de dietil éter, anidro, e 0.5mL de ácido glacial 100%. Utilizava-se um papel de filtro, dentro da cuba, para manter seu interior uniformemente saturado.

A solução de revelação era preparada tomando-se primeiro, 500mg de Vanilina e 4mL de ácido sulfúrico (1). A seguir, misturava-se 200mL de ácido acético com 4mL de ácido sulfúrico (2). Juntando-se (1) e (2), e mais 2mL de anisaldeído, vertia-se a solução final numa pequena cuba e após aguardar uns 15 segundos, a placa era mergulhada, verticalmente, com precisão (DELABAYS, 1992).

A placa seguia para aquecimento em chapa aquecida (superfície aquecida em contato com a parte inferior da placa, com as aplicações voltadas para cima e não em contato direto com a chapa). A placa era colocada na chapa em aquecimento, a partir de 50°C e, quando atingia 110°C (aproximadamente 4 minutos), as manchas eram bem visíveis e as placas eram retiradas do aquecedor. Eventualmente, procedia-se a limpeza das placas antes das aplicações fazendo-as migrar em metanol por 25 minutos. Este

procedimento era realizado quando utilizávamos placas que haviam sido mal acondicionadas (caixas abertas, etc..).

Para a conservação das placas após a revelação, eram elas mergulhadas em cuba com uma solução de n-hexano e parafina, na proporção de 5:1 e, após secagem em temperatura ambiente de 22-25°C, eram cobertas com folhas de alumínio. As estimativas visuais eram realizadas por 4 pessoas e, o valor considerado era a média dessas estimativas. A seguir, para comprovação, as placas eram passadas por densitômetro CAMAG-CCD, modelo Scanner II e os resultados eram bem próximos às médias das estimativas visuais, conforme exemplo da tabela 8.

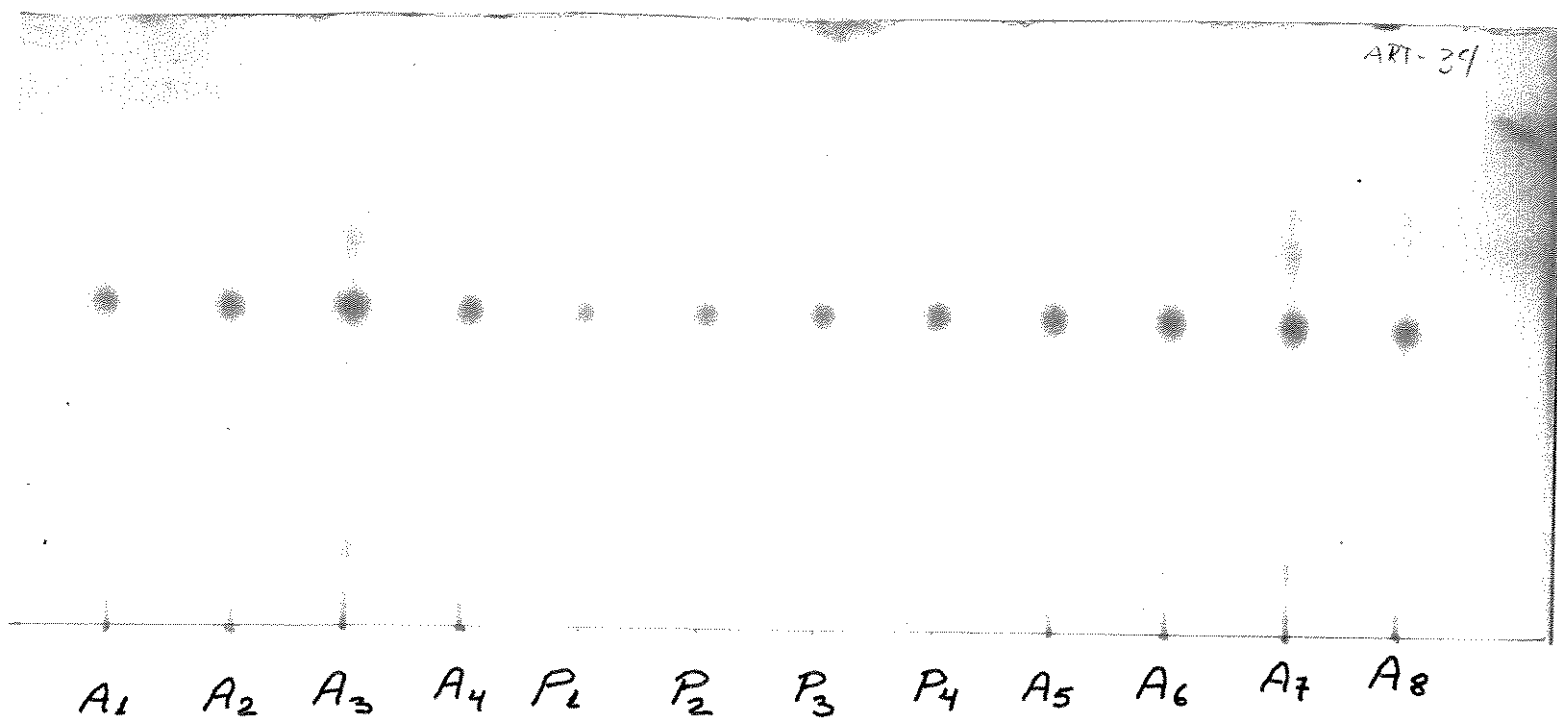


Figura 10. Determinação de artemisinina por CCD: Amostras (A1 à A8, e Padrões (P1 à P4).

Tabela 7. Perda de tolueno, em porcentagem (sobre o peso inicial de 5ml de tolueno + 100mg da amostra) durante o procedimento analítico, em ambiente à 28-30°C.

Amostras	Após o Politron (%)	Antes da aplicação (%)
1	3.49	4.58
2	3.09	5.19
3	3.64	4.46
4	2.46	4.08
5	2.74	3.86
Média	3.09	4.43

Devido aos baixos valores de perda de tolueno, optou-se por não se avolumar as amostras antes da deposição, admitindo-se haver a mesma perda para todas as amostras de cada seqüência de determinações.

Tabela 8. Exemplo de resultados de artemisinina de diversas amostras, por estimativa visual e por leitura em densitômetro.

Amostras	Estimativa visual	Densitômetro
1.1	0.98	0.91
1.2	1.13	1.20
1.3	1.25	1.25
2.1	1.05	0.97
2.2	1.18	1.23
2.3	1.10	1.13
3.1	1.05	0.95
3.2	1.15	1.01
3.3	1.28	1.16
4.1	1.05	1.20
4.2	1.00	1.04
4.3	1.15	1.09
5.1	0.95	0.94
5.2	1.25	1.16
5.3	1.03	1.00
6.1	1.13	1.10
6.2	1.08	1.06
6.3	1.08	1.10
7.1	0.63	0.65
7.2	0.70	0.74
7.3	0.78	0.84

Observa-se que os valores da estimativa visual, média de valores estimados por 4 pessoas, são bem próximos aos da leitura em densitômetro ($r^2=0.82$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Tabela 9. Número de plantas em começo de florescimento, dentre 12 plantas de cada estirpe, durante desenvolvimento em fitotron.

Dias após o transfer transplante (DAT) > no Fitotron	35	42	49	56	63	70	77	Média de DAT	Var.
V.clone27 (Clone)				***	***	***	***	67	67
Viet. I (Pop.)		*				*****	*****	71	93
Viet. II (Pop.)	*		***	****	*	***		57	111
Madagascar (Pop.)	*	****		***	**		**	54	197
Ch.Benakis (Pop.)	****		*	***	***	*		51	172
6 x Vii 46 (Hibr.)			***	*****	***			56	27
Vi26xVi55 (Hibr.)			***	*****	**	**		58	55
6 x Vi 27 (Hibr.)			***	*****	***	*		57	43
6 x Vi 26 (Hibr.)			*****	**	*	****		58	92
6 x Vii 47 (Hibr.)		*	*	*****	**	***		59	75
6 x Vi 55 (Hibr.)		***	****	***	*	*		52	75
6 x Vii 117 (Hibr.)	*	**	****	***	*	*		52	75

Observa-se que a estirpe mais tardia foi a “Viet. I”, cujo florescimento foi iniciado somente aos 70 dias após o transplante. As outras estirpes floresceram bem mais cedo, entre 51 e 59 DAT, sendo o clone “Vi27”, de florescimento intermediário, 67 DAT. A variancia observada neste clone pode ser considerada como uma estimativa da variação ambiental neste experimento. Comparando-a com as variações encontradas nas demais estirpes, teremos uma indicação da componente genética da variancia. A esse respeito, as populações mostram claramente a presença de variação genética quanto a data de florescimento,

especialmente: “Viet.II”, “Madagascar” e “China Benakis”. Por outro lado, os híbridos revelam nenhuma ou pouca variação genotípica. Assim, considerando as médias e variâncias observadas sobre a data de florescimento, a seleção para este parâmetro se faz mais interessante nas populações “Viet.II”, “Madagascar” e “China Benakis”, onde temos maior variabilidade a ser explorada. Os híbridos “6 x Vii 46”, “6 x Vii 47” e “6 x Vi 55”, embora de florescimento relativamente precoce, também se mostraram interessantes, devido ao florescimento da maioria das repetições ser concentrado em poucas semanas, sugerindo uniformidade de florescimento.

Tabela 10. Rendimentos de folhas, talos e raízes, proporção folha/talo, teores e rendimentos em artemisinina de 12 estirpes de *A. annua*, L., cultivadas em vasos em fitotrons (média de 12 repetições).

	Folhas (g/pl)	Talos (g/pl)	Folhas/Talos	Raízes (g/pl)	Artemisinina (%)	Rdt. Artem. (mg/pl)
V.clone27 (Clone)	1.08c	1.38c	0.78b	2.50c	1.10a	11.9c
Viet. I (Pop.)	3.13ab	4.89ab	0.68b	5.10bc	0.97a	30.4ab ✓
Viet. II (Pop.)	2.00bc	2.42bc	0.83b	4.97bc	1.13a	22.6bc
Madagascar (Pop.)	3.55a	5.03a	0.71b	10.53a	0.92a	31.6ab ✓
Ch.Benakis (Pop.)	3.14ab	4.33ab	0.73b	7.12ab	0.98a	30.8ab ✓
6 x Vii 46 (Hybr.)	2.85ab	3.40b	0.84b	7.97ab	0.98a	27.9ab ✓
Vi26xVi55 (Hybr.)	1.95bc	2.15bc	0.91ab	4.56bc	1.11a	21.7bc
6 x Vi 27 (Hybr.)	3.61a	4.10ab	0.88ab	8.63ab	0.97a	35.2ab ✓✓
6 x Vi 26 (Hybr.)	3.50a	4.03ab	0.87ab	6.79b	1.05a	36.8a ✓✓
6 x Vii 47 (Hybr.)	2.25b	2.14bc	1.05a	4.99bc	0.92a	20.7bc
6 x Vi 55 (Hybr.)	3.21ab	3.57ab	0.90ab	7.30ab	0.94a	30.2ab ✓✓
6 x Vii 117 (Hybr.)	2.79ab	2.66bc	1.05ab	5.19bc	0.89a	24.8b

As médias seguidas de mesma letra, não são diferentes ao nível de 5% (Teste de Tukey).

Sobre os teores de artemisinina as 12 estirpes não apresentaram diferenças significativas, porém, sobre a produção de folhas houveram sensíveis diferenças, resultando em rendimentos de artemisinina também significativamente diferentes. As melhores estirpes e iguais entre si, estatisticamente, em rendimento de folhas secas, foram: Viet I, Madagascar, Ch.Benakis, 6xVii46, 6xVi27, 6xVi26, e 6xVi55 (V).

Um outro parâmetro de seleção foi a relação Folha/Talo, importante para o processamento industrial, pois o talo contém cêras que dificultam o isolamento e a purificação da artemisinina. Observa-se que esta relação é maior nos híbridos, já como resultado dos critérios de seleção. Assim, os híbridos: "6xVi 27", "6 x Vi26", e "6xVi55", tiveram as melhores relações de Folha/Talo (V) Destes, o híbrido "6 x Vi26" apresentou o mais alto teor de artemisinina e, portanto, foi a estirpe de maior rendimento, 36.8mg/pl. Nenhum teor de ácido artemisinínico foi encontrado nas estirpes estudadas.

Foi totalmente por acaso porém, (como sói acontecer em muitos tipos de experiências) que as repetições foram submetidas a diferentes condições de temperatura, devido a uma limitação de área dos fitotrons. Com este fato, porém, pudemos perceber influências interessantes da temperatura ambiente (tabela 11).

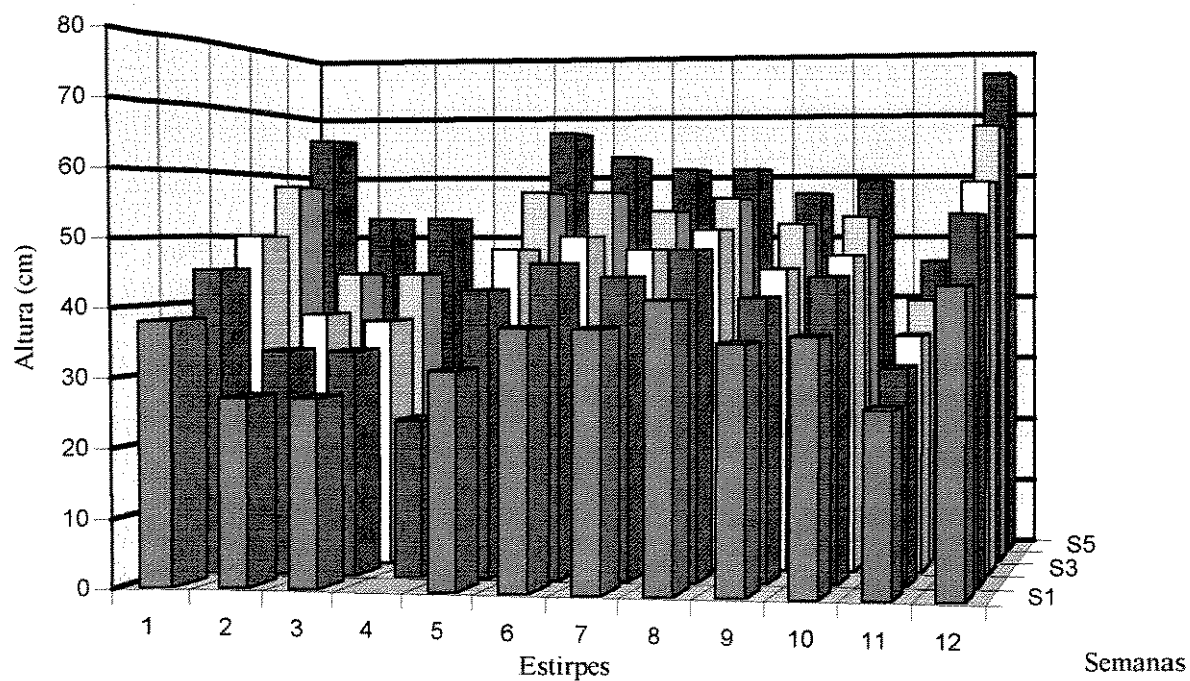


Figura 11. Determinações semanais de altura durante o ensaio de seleção de estirpes de *A. annua* L. para florescimento tardio.

Observa-se na Fig.11, que o crescimento das estirpes (altura), manteve a mesma relação entre elas durante o desenvolvimento semanal, indicando que a taxa de crescimento é característica bem definida para cada genótipo.

Tabela 11. Rendimentos de folhas, talos e raízes, proporção Folha/Talo, teor e rendimentos de artemisinina de 12 estirpes de *A. annua* L., em duas condições de temperaturas*, cultivadas em vasos, em fitotrons (médias de 6 repetições).

	*	Folhas (g/pl)	Talos (g/pl)	Folha./Talo	Raízes (g/pl)	Artemisina (%)	Rdt. Artem. (mg/pl)
V.clone 27	B	1.05	1.35	0.78	3.05	1.24	13
	A	1.11	1.41	0.79	1.95	0.97	11
Viet. I	B	2.00	3.05	0.66	5.39	1.00	20
	A	4.63	6.73	0.69	4.86	0.95	44
Viet. II	B	1.96	2.71	0.72	6.66	1.20	24
	A	2.05	2.13	0.96	3.27	1.05	22
Madagascar	B	2.85	4.79	0.60	14.57	1.07	30
	A	4.24	5.27	0.81	6.64	0.77	33
Ch.Benakis	B	3.18	5.12	0.62	9.19	1.05	33
	A	3.10	3.53	1.14	5.04	0.77	24
6 x Vii 46	B	2.75	3.52	0.78	10.78	1.17	32
	A	2.95	3.29	0.90	5.17	0.80	24
Vi26xVi55	B	1.84	2.28	0.81	5.85	1.24	23
	A	2.07	2.02	1.03	3.26	0.98	20
6 x Vi 27	B	3.50	4.14	0.85	11.33	1.04	36
	A	3.73	4.07	0.92	5.92	0.90	34
6 x Vi 26	B	3.42	4.62	0.74	8.59	1.17	40
	A	3.59	3.43	1.05	5.00	0.93	33
6 x Vii 47	B	2.38	2.60	0.92	6.65	1.03	24
	A	2.13	1.68	1.26	3.32	0.82	17
6 x Vi 55	B	3.05	3.70	0.82	8.78	1.04	32
	A	3.38	3.44	0.98	5.81	0.85	29
6 x Vii 117	B	2.88	2.87	1.00	6.12	0.99	28
	A	2.70	2.46	1.10	4.26	0.79	21
Médias (72 rep.)							
B=22 to 26° C		2.57a	3.40a	0.71a	8.08a	1.10a	28a
A=25 to 31° C		2.97b	3.29a	0.97b	4.54b	0.88b	26a

Médias seguidas de mesma letra, não são diferentes ao nível de 5% (Teste de Student).

* B = Temperatura entre 22 e 26° C

A = Temperatura entre 25 e 31° C

Observa-se na tabela 11, que existe uma nítida correlação positiva entre a produção de raízes e os teores de artemisinina, em função da temperatura. Isto pode explicar a questão de ter-se teores de artemisinina mais baixos em cultivos em região tropical, como mencionado por FERREIRA (1994) e SING *et al.* (1988). Acreditamos que tal diferença possa estar relacionada à temperatura mais amena, inclusive do solo e ao maior comprimento do dia (horas de luz). Assim, sob temperaturas mais baixas, como de habitude em região de clima temperado, o desenvolvimento de raízes seria favorecido, bem como os teores de artemisinina. NAIR *et al.* (1986) reportaram que em cultura *in vitro* de *A. annua*, nenhuma artemisinina foi produzida antes de as raízes se formarem, colaborando com a hipótese sugerida. Por outro lado, obtivemos melhor relação folha/talo, na condição de temperatura mais elevada. Observamos ainda que a influência da temperatura não foi de mesma intensidade para todas as estirpes. Na população "Viet. I", houve grande aumento da produção de folhas sob temperatura mais elevada, resultando em melhor rendimento em artemisinina.

CONCLUSÕES:

Dentre os materiais avaliados, o Híbrido 6xVi26, foi o mais vantajoso em rendimentos de artemisinina.

Para cultivo em região intertropical de fotoperíodo curto, 11 à 12 horas de luz, e temperaturas elevadas, $>25^{\circ}\text{C}$, a população Viet I, resultante de uma primeira seleção de genótipos superiores, mostrou ser a mais promissora devido ao florescimento tardio e maior produção de biomassa, assegurando rendimento elevado em artemisinina.

A seleção a nível de indivíduos (dentre a população Viet I), de genótipos ricos em rendimento de artemisinina e de florescimento tardio nas condições de fotoperíodo curto, promoveu eleger progenitores para a obtenção de novos híbridos para cultivo no Brasil.

O decréscimo nos teores de artemisinina em consequência da maior temperatura ambiente foi compensado por um aumento da biomassa de folhas resultando em rendimentos de artemisinina por planta, semelhantes para as duas faixas de temperaturas submetidas.

CAPÍTULO III - PROCESSO DE OBTENÇÃO DE HÍBRIDOS DE *A. annua* L

INTRODUÇÃO:

O processo de obtenção de híbridos em plantas alógamas, é uma atividade contínua. De fato, mesmo após a seleção de genótipos superiores (ricos, tardios etc..) há a necessidade de se manter os progenitores para a realização dos cruzamentos visando a produção de sementes. Paralelamente, também a seleção deve ser mantida para explorar a variabilidade em função de novos interesses (FALCONER, 1972; PATERNIANI & MIRANDA FILHO, 1987).

Os trabalhos desta pesquisa visaram a produção de sementes híbridas provenientes do cruzamento entre um genótipo de florescimento tardio e outro, de alto teor em artemisinina, selecionados nas condições de fotoperíodo curto.

Também a seleção e a avaliação dos híbridos da MEDIPLANT foram seguidos.

MATERIAL E MÉTODOS:

Dentre a população melhorada Viet.I, - a mais tardia e de maior rendimento, - selecionamos uma planta de excelente produção de folhas (Pl.V) e outra de elevado teor de Artemisinina (Pl.39). Esta última foi selecionada por conter 1.3% de artemisinina. Ambas foram clonadas por sistema de estaca a partir de segmentos de ramos terminais. Pequenos segmentos, de aproximadamente 2cm de comprimento foram cortados com lâmina de precisão, logo abaixo da inserção da folha mais próxima daquele comprimento. As folhas foram cuidadosamente cortadas, deixando-se apenas as sumidades foliares da extremidade. A estaca assim preparada foi fincada em pequenos recipientes, contendo perlita. A umidade foi mantida elevada, tanto a do substrato como a do ar (umidade relativa), durante as duas primeiras semanas quando as raízes se tornaram funcionais. Não houve necessidade de se utilizar hormônios para o enraizamento. Também, a micropropagação vegetativa pode ser utilizada segundo o protocolo descrito por LÊ & COLLET (1991).

Esses clones foram mantidos em vasos de 1L com substrato organo-mineral. Cerca de 5 vasos de cada clone foram mantidos em fotoperíodo de 14 horas de luz para manutenção dos genótipos (progenitores) através de sucessivas clonagens. Outros 5 vasos

de cada clone foram submetidos ao fotoperíodo de 11 horas, para indução do florescimento. Para a sincronização do estágio de florescimento entre os clones, foram utilizados recursos de fotoperíodo e de temperatura. Assim, para se retardar o florescimento do clone P1.39, induzido primeiramente, estas plantas foram mantidas em câmara fria, 4 a 6°C, até o momento em que o clone P1.V atingiu o mesmo estágio. A seguir, pares formados pelos dois clones (P1.V x P1.39) foram dispostos isoladamente, em fotoperíodo de 11 horas de luz. Neste período, a frequência de rega dos vasos foi reduzida em função do menor consumo de água e para evitar a ocorrência de doenças fúngicas nas raízes. As sementes produzidas eram colhidas separadamente de cada progenitor e, por convenção, eram designadas com o nome do progenitor feminino em primeiro lugar. As sementes eram separadas das impurezas, passando-se os capítulos por uma sequência de peneiras com malhas de 2mm, 1mm e de 0.5mm. Nesta fase, é possível fazer-se a separação das sementes provenientes de autofecundação, pois elas são visivelmente maiores.

Os procedimentos relatados a seguir se referem às técnicas desenvolvidas na MEDIPLANT para a seleção dos progenitores. O critério, considerou a morfologia, a produção de biomassa e o teor de artemisinina. Por cruzamentos dialélicos entre os progenitores selecionados e avaliação das progenies (F_1),

usando-se inclusive marcadores enzimáticos (peroxidases), verificou-se que tais caracteres são de alta herdabilidade e justificam os critérios de seleção adotados (PETER BLANC, 1992). O método de seleção propriamente dito, iniciou-se com o plantio em campo, na Suíça, de populações de diversas origens, principalmente provenientes da China, do Vietnã e de Madagascar. As mudas foram formadas em casa de vegetação, a partir de sementes, e transferidas para o campo em maio/95 no espaçamento de 0.60 x 0.60m. Em meados de julho, as populações foram avaliadas para uma pré-seleção, dentro dos seguintes critérios: O melhorista definia junto com sua equipe os parâmetros morfológicos a serem considerados (porte, tipo de folhas, relação folha/talo...). Após haver o consenso da equipe, esta percorria a área do ensaio marcando as plantas superiores em função dos parâmetros definidos. Normalmente eram marcadas de 40 a 60 plantas por população. Essas plantas, "indivíduos", eram analisadas quanto ao teor de artemisinina por CCD e, aquelas de maior interesse, eram então clonadas para eventuais cruzamentos. Os mesmos indivíduos eram analisados novamente no momento da colheita e, de posse dos dados de biomassa e de teores do princípio ativo, far-se-ia o descarte ou não dos clones. Aqueles superiores, seguiam para nova clonagem afim de garantirem os cruzamentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A produção de sementes híbridas foi abundante nos dois parentais, apresentando 100% de poder germinativo. As sementes postas a germinar, mostravam baixo percentual de plântulas cloróticas (5 a 7%), sintoma atribuído às sementes provenientes de autofecundação (DELABAYS *et al.*, 1992). De fato, a taxa de autofecundação é normalmente baixa, podendo ser desprezada a nível de um plantio em larga escala.

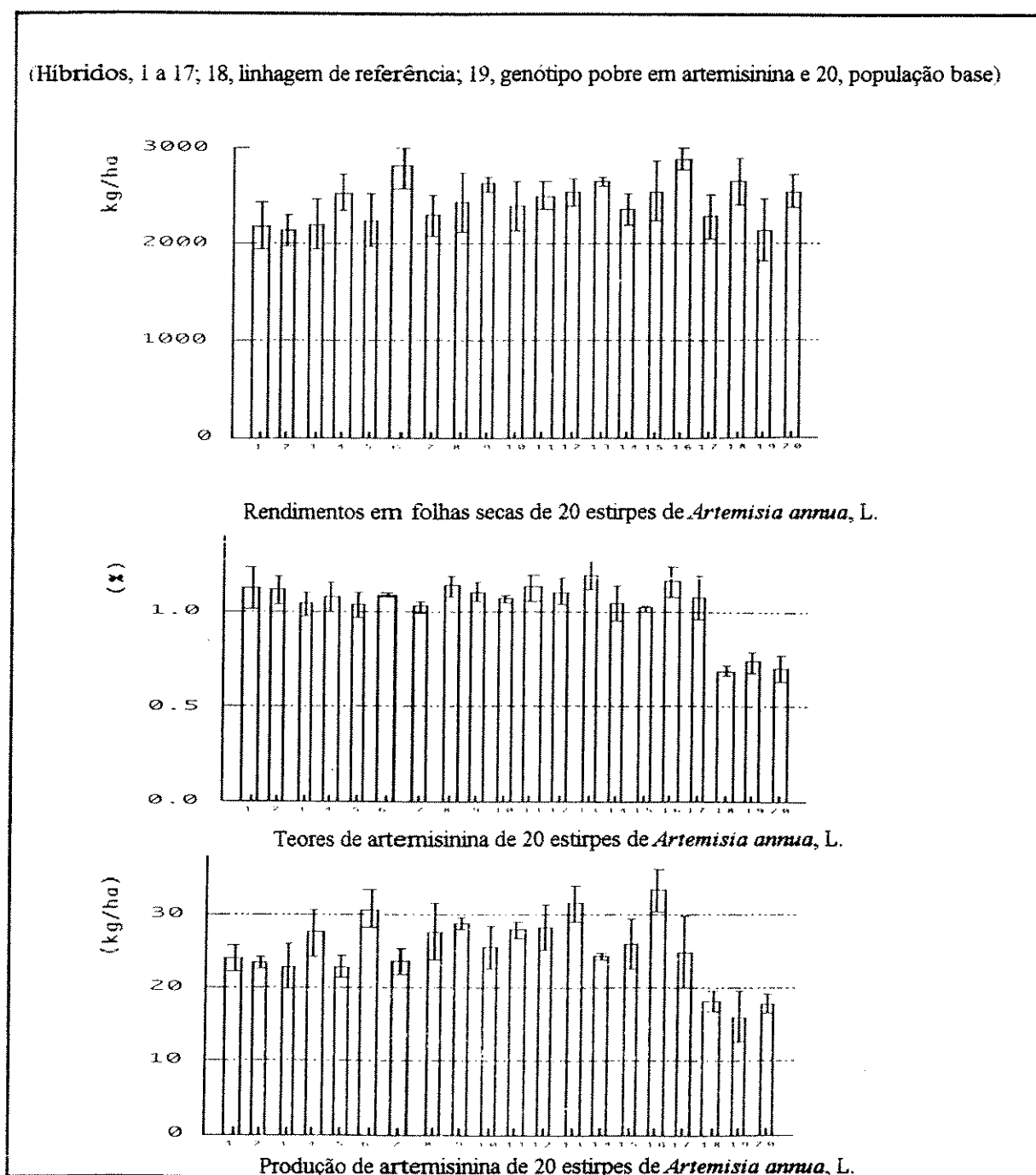
O fato do clone P1.39 ter atingido o florescimento antes que o clone P1.V era esperado em função deste último ser bastante tardio; porém, o método de sincronização aplicado foi bem sucedido. Em outros casos acompanhados na MEDIPLANT, o progenitor masculino não produzia pólen no mesmo tempo em que as flores femininas estavam receptivas, ou ocorria o inverso. Nestes casos, havia também a necessidade de se adiantar o estágio de um ou de se retardar o do outro.

O mesmo clone P1.V foi cruzado com o clone Vii 47, prevendo-se também progênes ricas e tardias. Deste último cruzamento, obteve-se também grande quantidade de sementes híbridas: P1.V x Vii 47 e inversamente, Vii 47 x P1.V. Segundo DELABAYS (comunicação pessoal) em muitos híbridos tem-se observado certo efeito materno sobre a idade de florescimento, justificando a

avaliação individual das progênies obtidas respectivamente de sementes colhidas de cada um dos parentais. Coletou-se também sementes provenientes de autofecundação do clone P1.V, obtidas de ramo ensacado.

Os resultados da tabela 12 se referem às avaliações dos híbridos na MEDIPLANT.

Tabela 12. Avaliação dos novos híbridos na MEDIPLANT, em 1995.



1- Vi 26 x Vi 27	*6- Ch x Vi 55	11- Vii 47 x Vi 26	16- Vii 47 x Vii 51
2- Vi 27 x Vi 55	7- Ch x Vii 46	12- Vii 47 x Vi 27	**17- Vi 55 x Ch
3- Vi 26 x Vi 55	8- Ch x Vii 47	13- Vii 47 x Vi 55	18- Vi 62 x Ch
4- Ch x Vi 27	9- Ch x Vii 51	14- Vii 47 x Vii 46	19- Ch x Vi 16
5- Ch x Vi 26	10- Ch x Vii 117	15- Vii 47 x Vii 47	***20- Viet II

*(Avaliada também no Brasil - Ensaio de épocas -)

** (inverso de 6)

*** (População de Base de origem do Vietnam)

CONCLUSÕES:

O processo de obtenção de híbridos de *A. annua* L., pode ser considerado simples e de fácil manejo. Contribuem para a simplicidade do processo, o fato da baixa taxa de autofecundação, dispensando a emasculação, da possibilidade de conduzir o desenvolvimento dos parentais em vasos (permitindo o isolamento e a locomoção para condições específicas visando a sincronização do florescimento), a abundância de sementes produzidas e ao rápido desenvolvimento. Também a propagação vegetativa, por estacas ou por cultura de tecidos facilita a multiplicação e manutenção dos progenitores.

Assim, o sucesso do programa de melhoramento genético da *A. annua* L. se deposita sobretudo na seleção criteriosa dos progenitores e na avaliação dos híbridos.

A avaliação destes híbridos sendo realizada no Brasil (CPQBA), é de fundamental importância para eleger os genótipos melhor adaptados às condições intertropicais, conforme descrito no Capítulo seguinte.

CAPÍTULO IV - AVALIAÇÃO DE HÍBRIDOS DE *A. annua* L., NO CPQBA.

INTRODUÇÃO:

Estes ensaios visaram avaliar, no Brasil, o comportamento de dois híbridos obtidos na MEDIPLANT e identificar a melhor época para o cultivo da *A. annua* L., ou seja, o período onde se obtenha maior produção de artemisinina por área plantada. No Brasil, embora a *Artemisia* possa ser cultivada o ano todo devido a nossa faixa de temperatura, sabe-se que esta espécie recebe grande influência do fotoperíodo, (horas de luz) e que na nossa latitude de 22° 48', ocorrem fotoperíodos muito favoráveis à indução do florescimento. Assim, se a indução do florescimento se der quando a cultura estiver ainda pouco desenvolvida vegetativamente, as produções serão baixas devido aos rendimentos de biomassa que são paralizados naquele estágio. Por outro lado, já vimos no Capítulo II que esta influência é variável com relação a certos genótipos e que foi possível conduzir a seleção para obtermos plantas com florescimento tardio. Porém mesmo estas, terão uma época de florescimento que se faz necessário conhecer para definição do melhor período de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS:

Trabalhamos com dois híbridos MEDIPLANT: o 92/82, considerado de florescimento precoce e o Ch. x Viet 55, tardio e mais rico em artemisinina. O Híbrido 92/82, já vinha sendo cultivado no CPQBA havia alguns anos. O Ch. x Viet 55, foi obtido segundo os procedimentos de cruzamento descritos anteriormente, entre um clone chinês selecionado na MEDIPLANT e uma planta rica em artemisinina de procedência do Vietnam. O protocolo experimental do ensaio de épocas de cultivo constou de se plantar lotes desses dois híbridos, mensalmente, durante um ano. A cada mês, desde fevereiro/95, iniciou-se a semeadura para a produção de mudas, por sementes, no sistema de tubetes. O substrato constou de uma mistura de esterco bovino, restos de culturas e terra, os quais foram compostados e submetidos à ação de minhocas, transformando-se em húmus. O desenvolvimento das mudas foi realizado em viveiro coberto por tela sombrite de 50%. As mudas seguiram para o campo em parcelas úteis de 30 plantas, no espaçamento de 50 x 30 cm e com 4 repetições em blocos ao acaso. As determinações de biomassa foram realizadas, por parcelas, após a secagem natural das plantas (ao sol e em galpão) e a separação dos talos e folhas. As plantas colhidas de cada parcela foram deixadas inteiras para a secagem a pleno sol,

sobre encerado, revolvendo-se o material periódicamente e recolhendo-lo nos horários mais úmidos do dia. Os resultados de biomassa referem-se ao peso de folhas secas de 30 plantas (média de 4 repetições). Avaliou-se também nas parcelas: o percentual de florescimento precoce (no momento do transplante para o campo), o percentual de florescimento na colheita, o peso seco de folhas por planta, o teor de artemisinina por CCD, e o rendimento de artemisinina em mg/planta.

O critério inicialmente estabelecido para a colheita, (quando 70% da população estivesse no início de florescimento) não pode ser sempre seguido, pois houve ensaios que não atingiram tais percentuais. Principalmente quando se estava fora do período indutivo de florescimento, optou-se por esperar o início do florescimento geral do ensaio. Este percentual não considerou as plantas com florescimento extremamente precoce, ou seja, aquelas mudas que já apresentavam florescimento, no momento do transplante para o campo, foram contabilizadas e descartadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Tabela 13. Épocas de cultivo do híbrido "92/82" no CPQBA (média de 4 repetições). 1995-1996

Fev. Mar. Abr. Mai. Jun. Jul. Ago. Set. Out. Nov. Dez. Jan./96		%Floresc		g folha		Art.	
		Precoce	floresc	seca	g/pl	(%)	(mg/pl)
s	p	15.0	71.1	149	5.9	0.24	14.2
s	p	28.3	47.0	1140	53.0	0.48	254.4
s	p	21.7	100.0	1037	44.3	0.28	124.0
s	p	19.2	100.0	1300	54.0	0.37	199.8
s	p	21.7	100.0	1525	64.9	0.27	175.2
s	p	45.8	100.0	1100	67.5	0.33	222.8
s	p	29.2	100.0	525	24.1	0.32	77.1
s	p	26.7	100.0	163	7.4	0.43	31.9
s	f	100.0					
s	f	100.0					

Tabela 14. Épocas de cultivo do híbrido "ChxViet55" no CPQBA (média de 4 repetições) 1995-1996.

Fev. Mar. Abr. Mai. Jun. Jul. Ago. Set. Out. Nov. Dez. Jan. Fev. Mar.		% floresc.		g folha		Art.	
		Precoce	% floresc.	seca/parc.	g/pl	(%)	(mg/pl)
s	p	29.2	45.1	1500	71.2	0.88	626.6
s	p	13.3	40.8	1443	55.3	0.76	420.3
s	p	16.7	0.0	1150	45.9	1.10	504.9
s	p	14.2	0.0	1063	41.6	>1.00	>416.0
s	p	6.7	58.4	1408	50.4	1.06	534.0
s	p	1.7	98.3	1563	56.0	1.19	666.4
s	p	0.0	100.0				
s	p	0.0	96.7	813	27.3	0.94	256.6
s	p	7.0	73.3	855	30.5	0.63	192.2
s	p	7.5	83.3	885	31.8	0.63	200.3
s	p	15.0	21.7	129	5.1	<0.50	<25.5

s = semeadura, p = plantio, c = colheita, f = florescida.

Com os resultados das tabelas 13 e 14, verificamos que o Híbrido 92/82 é de florescimento precoce enquanto o Ch. x Viet. 55 pode ser considerado tardio. Em outras palavras, o 92/82 é um genótipo mais sensível ao fotoperíodo característico da região e a maioria dos comprimentos do dia (horas de luz) durante o ano, são favoráveis à indução do florescimento. Semeado a partir de agosto até fevereiro, inclusive, o 92/82 teve seu rendimento afetado pelo florescimento precoce. Poder-se-ia semear este híbrido, desde março a julho, procedendo-se à colheita 5 à 6 meses após, ou seja, entre setembro e janeiro. Desta forma, mesmo ocorrendo florescimento, a cultura teria tempo de desenvolver razoável biomassa. Observe-se que tal híbrido só permite um cultivo por ano numa mesma área, sendo que o melhor período indicado, em função do rendimento em artemisinina, é de março a setembro, quando obtivemos 254.4mg de artemisinina por planta (Esses valores são bem superiores aos descritos no Capítulo II, tabela 10, porque aqueles são provenientes de plantas conduzidas em vasos).

Já o híbrido Ch. x Viet.55, bem mais rico em artemisinina, teve um período mais amplo para seu cultivo, uma vez que o florescimento só ocorreu entre fevereiro e março. Diríamos então que somente nesta época do ano o fotoperíodo induziu o

florescimento do Ch. x Viet.55, conferindo ao genótipo a característica de tardio. Excluindo-se o período de agosto até fevereiro, em todos os demais meses poderia haver semeadura sem limitação de biomassa.

Note-se no entanto que, se procedermos à semeadura em início de março, poderemos instalar um cultivo, no campo, de maio a agosto e outro de setembro a janeiro, na mesma área. Para isto, a semeadura do segundo cultivo deveria ser realizada em julho.

Observamos ainda que os melhores teores de artemisinina ocorreram em dezembro.

Sobre o maior rendimento observado na tabela 14, no cultivo entre fevereiro e agosto, informamos que neste ensaio houve um elevado percentual de plantas com florescimento precoce (29.2%). Assim, por descarte dessas plantas, as restantes tiveram um espaçamento maior, o que permitiu maior peso unitário, dificultando a avaliação comparativa com os rendimentos dos demais ensaios. Reconhecemos que o espaçamento para este híbrido foi inadequado, pois as plantas atingiram grande porte (aproximadamente 3m de altura) e notava-se certo estiolamento e perda das folhas inferiores. Portanto, optou-se por não alterar o espaçamento nos ensaios seguintes para manter os dados comparáveis.

Consideramos que o espaçamento indicado para o Ch. x Viet.55 deva ser aproximadamente de 100 x 50cm.

Observa-se na Fig.12, que o florescimento em *A. annua* L., é induzido numa faixa de horas de luz (de 12 a 13 horas, aproximadamente). Fora desta faixa, acima ou abaixo, não ocorre a indução do florescimento

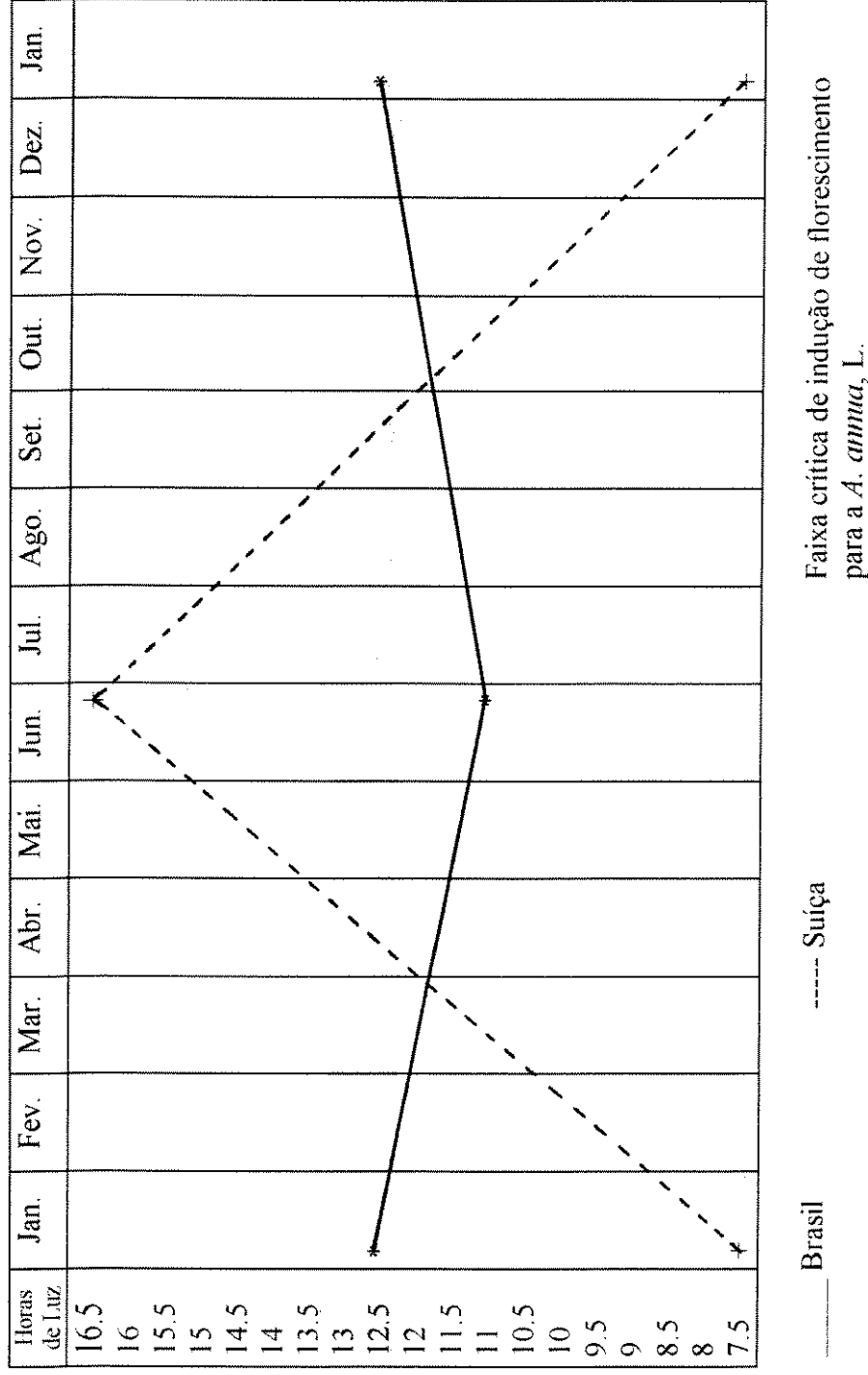


Figura 12. Variação anual do fotoperíodo no CPQBA, Brasil (lat. 22° 48' S) e na MEDIPLANT, Suíça (lat. 46° 13' N).

CONCLUSÕES:

O conhecimento do período de indução floral mostra a vantagem do cultivo no Brasil, onde se tem a possibilidade de fazer 2 plantios por ano, com linhagens tardias, uma vez que não há limitação de temperatura. De fato, temos 8 meses no ano em fotoperíodo favorável ao desenvolvimento vegetativo, sem florescimento (de meados de março a meados de novembro), enquanto que na Suíça, apenas 4 meses do ano permitem o cultivo, devido ao fotoperíodo e à temperatura (de meados de maio a meados de setembro).

A avaliação destes híbridos definiu o melhor período de cultivo no CPQBA, tendo-se o híbrido Ch. x Viet.55 como um genótipo competitivo em função dos rendimentos.

CAPÍTULO V - A INFLUÊNCIA DA FERTILIZAÇÃO NITROGENADA, SOBRE OS RENDIMENTOS DA *A. annua* L.

INTRODUÇÃO:

A prática da adubação é normalmente um fator decisivo para o aumento dos rendimentos e da manutenção da fertilidade do solo. No entanto, os benefícios da adubação só poderão ser bem avaliados quando aplicados em população padronizada geneticamente, pois do contrário, as variações observadas poderiam ser devidas a genótipos diferentes e não por efeito da fertilização.

Assim, contando hoje com as populações melhoradas e padronizadas pelo programa da MEDIPLANT, (DELABAYS *et al.*, 1994) pode-se verificar o potencial de ganho como resultado da fertilização nitrogenada.

Por outro lado, o trabalho recente conduzido no CPQBA por FIGUEIRA (1995), que estudando a nutrição mineral da *A. annua*, em hidroponia, mostrou que o nitrogênio teve uma influência notória sobre o aumento de biomassa naquela espécie. O mesmo trabalho sugeria estudos subsequentes sobre as formas amoniacal e nitrato. Também ADLER *et al.* (1989), mostraram haver

influência da fertilização de diversas formas nitrogenadas sobre o rendimento de óleos essenciais de algumas espécies aromáticas. Com os resultados das Pesquisas anteriores, possibilitando cultivos com genótipo padronizado e superior, podíamos então quantificar a influência da fertilização da espécie sobre os rendimentos em biomassa e em artemisinina.

Assim, os objetivos dessas pesquisas foram:

- a) Verificar a influência do tipo de nitrogênio comercialmente utilizados na agricultura (Ensaio 1);
- b) Conhecer a dose ideal de nitrogênio (Ensaio 2); e
- c) Verificar a influência das proporções, amoniacal:nítrica, sobre os teores de artemisinina (Ensaio 3).

MATERIAL E MÉTODOS:

Ensaio 1. Influência de fertilizantes nitrogenados comerciais na cultura da *A. annua* L., em campo.

Foram utilizados dois fertilizantes nitrogenados comerciais: Sulfato de amônia e Nitrato de amônia, em dose intermediária àquelas testadas por LAUGHLIN (1994).

As sementes utilizadas neste ensaio foram colhidas no CPQBA de plantas selecionadas dentre uma população segregante do híbrido MEDIPLANT, 92/82, em F_2 . De fato, inicialmente fizemos um cultivo do híbrido MEDIPLANT, 92/82, ou seja a geração F_1 . Deste cultivo, coletamos sementes de várias plantas e realizamos um novo cultivo, F_2 . Deste último, selecionamos duas plantas tardias de boas características em biomassa, as quais foram isoladas para posterior colheita das sementes as quais vieram a ser utilizadas no presente ensaio. Assim, não houve controle rígido dos parentais, considerando-se a polinização aberta e a característica alógama da espécie, num isolamento não rigoroso a nível de campo. No entanto, a segregação verificada neste ensaio conduzido na Suíça, foi baixa e o stand se mostrou bastante uniforme, evidenciando que houve predominância do cruzamento

entre aqueles dois indivíduos selecionados. Também o critério de seleção dos parentais não pode considerar os teores individuais de artemisinina ou de ácido artemisinínico, por dificuldades analíticas, mas o valor médio de artemisinina naquele lote era de aproximadamente 0.30%. As sementes foram semeadas em 10.5.95, em substrato organo-mineral em pequenas bandejas, dentro de casa de vegetação com temperatura ambiente entre 25 e 30°C e umidade relativa do ar entre 70 e 100%. Após 1 semana, fez-se o descarte das plântulas cloróticas, provenientes de autofecundação, conforme DELABAYS (1992). Em 30.5.95, transplantamos as mudas para "Tubetes" e em 30.6.95 para o campo. O espaçamento foi de 0.60 x 0.60m, em parcelas de 25 plantas (5 linhas de 5 plantas), com 3 repetições em blocos ao acaso, para os seguintes tratamentos:

- a) Testemunha (sem qualquer fertilização);
- b) Sulfato de amônia e
- c) Nitrato de amônia.

Os fertilizantes amoniacais foram aplicados manualmente ao longo das linhas, em três partes iguais durante o cultivo, nas datas: 18/7, 8/8 e 30/8/95. A dose total de cada fertilizante foi de 90Kg de nitrogênio/ha. A estimativa do teor de artemisinina e de

ácido artemininínico foi realizada no momento da colheita por CCD + fotodensitômetro com 3 repetições analíticas. Outras estimativas dos teores desses constituintes foram determinadas 10 dias antes da colheita e um mês após a colheita, nas linhas de bordadura. As avaliações na colheita foram realizadas com 9 plantas das linhas centrais de cada parcela. Os dados meteorológicos referentes ao período de cultivo, na Suíça, são mostrados na tabela 15.

Tabela 15. Dados meteorológicos registrados em Sion (Suíça).

Mês/ano	T.média (°C)	T.mín. (°C)	T.máx. (°C)	UR (%)	Precip. (mm)	Etp (mm)	Radiação (Wh/m ²)
Junho/95	16.7	10.7	22.8	65	36.6	125.5	6371
Julho/95	21.7	15.7	27.9	66	38.6	144.3	6420
Agosto/95	20.9	14.8	28.0	67	22.4	45.8	6255
Setembro/95	13.1	8.5	18.9	75	72.7	71.1	3874

Ensaio 2. Estudo da influência de diferentes doses de Uréia sobre a produção de uma cultura de *A. annua*, L.

O ensaio de campo, conduzido em Madagascar, comparou o efeito da aplicação de quatro doses de Uréia, equivalendo a: 0, 32, 64 e 97Kg de Nitrogênio por hectare. As sementes utilizadas foram provenientes da hibridação entre um clone de origem chinesa e um genótipo selecionado dentre uma população do Vietnam. Elas foram semeadas em pequenos recipientes em 17.2.94 e as plantas foram transplantadas em campo em 12.3.94, no delineamento de blocos ao acaso com 4 repetições. Cada parcela foi composta de 21 plantas, no espaçamento de 50 x 70cm. O ensaio foi colhido manualmente aos 4.9.94, sendo o material seco em hangar aéreo, e desfolhado em seguida. As amostras foram finalmente moídas e analisadas segundo um método de cromatografia de camada delgada, inspirado por PRAS *et al.* (1991), com a quantificação por densitômetro, segundo DELABAYS *et al.* (1994).

Ensaio 3. A influência das proporções Nitrato/Amônia, sobre os rendimentos de *A. annua*, em cultivo hidropônico.

Elegemos dentre um ensaio conduzido paralelamente pela MEDIPLANT, duas plantas de *A. annua*, de procedência do Vietnam: uma, rica em artemisinina, 1.25%, e outra pobre, 0.5%. Em seguida, essas plantas foram clonadas por estaquia e as mudas foram formadas em casa de vegetação, em substrato vegetal, conforme protocolo descrito por DELABAYS *et al.* (1992). Após aproximadamente 30 dias, essas estacas foram transferidas para potes de um litro, com quartzo pré-lavado de cerca de 3mm de diâmetro. Todo o ensaio foi conduzido em casa de vegetação em blocos ao acaso com 3 repetições para os 2 clones. Cada parcela constituía-se de 4 potes (4 plantas). Durante os primeiros 15 dias, todas as plantas foram tratadas por solução nutritiva conforme SARRUGE (1970). Em seguida os tratamentos foram instalados segundo a tabela 16. Todas as noites os potes eram drenados por um pequeno tubo localizado na base de cada pote, para favorecer a aeração das raízes. As respectivas soluções eram recebidas em garrafas de vidro ambar e as soluções revertidas cada manhã. A cada semana as soluções foram renovadas. O ensaio foi colhido aos 60 dias a partir do transplante para os potes e naquele momento foram feitas as

seguintes avaliações: talos, folhas, raízes, teores de artemisinina e de ácido artemisinínico para os dois clones, conforme resultados mostrados nas tabelas 20 e 21. As plantas não floresceram, mas o crescimento foi paralizado por volta do 60° dia.

Tabela 16. Soluções nutritivas dos tratamentos de formas de nitrogênio em cultura sem solo (hidrodropônia) de *A. annua* L.

Soluções Molares (g/L)	100 % NO ₃ (Sarruge) mL/L	66% NO ₃ :33% NH ₄ mL/L	50%NO ₃ : 50%NH ₄ mL/L
KH ₂ PO ₄	1	1	-
KNO ₃	5	5	-
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	5	-	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	2	2	-
KCl	-	-	6
CaCl ₂	-	5	5
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	-	1
NH ₄ NO ₃	-	5	3
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	2
Mg(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	-	-	2
Micro ¹	1	1	1
Fe-EDTA ²	1	1	1

¹ A solução de microelementos foi preparada, adicionando-se em um litro de água destilada: 2.86g de H₃BO₃; 1.81g de MnCl₂.4H₂O; 100mg de ZnCl₂; 50mg de CuCl₂.2H₂O e 15mg de MoO₃

² Solução preparada com 4g de Fe-EDTA (à 11%) em 200mL de água.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Ensaio 1 - Influência de fertilizantes nitrogenados comerciais na cultura da *A. annua* L., em campo.

Tabela 17. Rendimentos em folhas secas, teores em artemisinina e em ácido artemisinínico e rendimentos em artemisinina.

Tratam.	Rdt talo sec. (Ton/ha)	Rdt folhas sec. (Ton/ha)	Folhas/ Talos	ácido artemisinínico %	artemisinina %	Rdt artemis. (Kg/ha)
Testem.	1.71a	1.25a	0.73	0.34a	1.07a	13.4a
NH ₄ SO ₄	2.49a	1.89b	0.76	0.31a	1.03ab	19.5b
NH ₄ NO ₃	2.40a	2.08b	0.87	0.23a	0.90b	18.7ab

Médias seguidas de mesma letra, não são diferentes ao nível de 5% (Teste de Fischer).

Verifica-se, pela tabela 17, que os rendimentos de artemisinina, em Kg/ha, aumentaram até 43% nos tratamentos com fertilização nitrogenada em relação à testemunha. Este efeito foi causado por um aumento da biomassa e vigor das plantas tratadas com nitrogênio. Não existiu diferença significativa entre as duas formas de nitrogênio mas, a nível de campo, era visível o maior vigor das parcelas tratadas com nitrato de amônia, bem como vantagens destes, sobre a relação folha/talo, em comparação com as parcelas adubadas com sulfato de amônia. Observou-se também que os talos eram mais rígidos e os ramos quebravam com

facilidade nos tratamentos adubados em relação à testemunha. Verifica-se ainda, pela tabela 17, ter havido a mesma correlação “inversa, não proporcional” entre os teores de artemisinina e os valores de biomassa, citado no “Ensaio 1”.

Tabela 18. Teores de artemisinina e de ácido artemisinínico durante o período de cultivo.

		8/9/95	18/9/95 *	23/9/95
Testemunha	artemisinina	0.83	1.07	0.98
	ácido	0.27	0.34	0.33
NH ₄ SO ₄	artemisinina	0.65	1.03	0.92
	ácido	0.14	0.31	0.21
NH ₄ NO ₃	artemisinina	0.68	0.90	0.78
	ácido	0.11	0.23	0.31

* No momento da colheita

Verifica-se na tabela 18, a evolução dos teores de artemisinina e de ácido artemisinínico durante o desenvolvimento da cultura. Aos 18/9/95, obtiveram-se os maiores teores em artemisinina. Esses resultados estão inteiramente de acordo com as observações de DELABAYS *et al.*(1994), que acompanharam os teores de artemisinina, semanalmente, durante alguns cultivos e obtiveram sempre a mesma época, meados de setembro, como aquela em que se tem os melhores rendimentos em artemisinina. Embora as médias

não mostrem qualquer correlação entre os teores de ácido e o de artemisinina, nós encontramos em resultados parciais, (nas repetições) os maiores teores de artemisinina justamente nas parcelas onde tivemos baixos teores de ácido artemisinínico. Mesmo admitindo que possa ter existido alguma influência em função da variabilidade do solo entre as repetições, os resultados contribuem com a hipótese do ácido artemisinínico ser precursor da artemisinina. Outra informação interessante é que o mesmo material genético, que vinha sendo cultivado no Brasil, atingindo no máximo 0.30% de artemisinina, produziu teores até 1.07% de artemisinina neste ensaio cultivado na Suíça, provavelmente por influência do fotoperíodo e da temperatura. De fato, SING *et al.* (1988) e FERREIRA (1995) também encontraram teores mais elevados de artemisinina quando determinado cultivo fora realizado em região de clima temperado em comparação àqueles obtidos com o cultivo em zona de clima subtropical.

Ensaio 2 - Estudo da influência de diferentes doses de Uréia sobre a produção de uma cultura de *A. annua*, L.:

Tabela 19. Produtividade de folhas secas, teores e rendimentos de Artemisinina, em função de doses de uréia em cultivo de *A. annua* L. (média de 4 repetições).

Nitrogênio (Kg/ha)	Rdts em Folhas secas (Kg/ha)	Teor de Artemisinina (%)	Rendimento de Artemisinina (Kg/ha)
0	2420 ± 200	1.11 ± 0.08	26.7 ± 2.8
32	3020 ± 300	1.01 ± 0.06	29.9 ± 1.8
64	3880 ± 420	1.02 ± 0.11	40.4 ± 8.1
97	4690 ± 830	0.87 ± 0.03	41.3 ± 8.4

Observe-se que a aplicação de 97Kg de Nitrogênio/ha, na forma de uréia, promoveu um aumento da biomassa em praticamente o dobro, em relação à testemunha sem adubo. Paralelamente, note-se que os teores de artemisinina são decrescentes, com aumento da produtividade de folhas. Supondo-se porém, que o aumento da biomassa causasse a redução percentual de artemisinina, (por efeito de aumentar uma biomassa sem artemisinina, como um fator diluidor) a correlação inversa deveria ser proporcional. Como isto não aconteceu, ou seja, a aumento da biomassa foi superior ao decréscimo verificado nos teores de artemisinina, considera-se que a biomassa desenvolvida por efeito da fertilização, também realizou a biossíntese da artemisinina. É provável,

contudo, que a adubação nitrogenada prolongue o período vegetativo, atrasando/deslocando o estágio de maior conteúdo de artemisinina. Assim, como todos os tratamentos foram colhidos ao mesmo tempo, o teor de artemisinina estava em concentrações diferentes em função do estágio vegetativo.

Ensaio 3 - A influência das proporções Nitrato/Amônia, sobre os rendimentos de *A. annua* L., em cultivo hidropônico.

Tablela 20. Rendimentos em raízes e folhas secas, proporção folha/talo, teores de ácido artemisinínico e artemisinina e rendimentos de artemisinina, em cultivo hidropônico de *A. annua* L. (Clone pobre em artemisinina).

Testem. NO ₃ /NH ₄ (%)	Raízes sec. (g/pl)	Rdt folhas sec. (g/pl)	Folha/Talo	ácido art. %	artemisinina %	Rdt artemisinina (mg/pl)
100:0	2.39a	5.16a	0.75	0-0.25	0.54a	28a
66:33	1.74a	4.99a	0.75	0-0.25	0.54a	27a
50:50	0.76b	2.94b	0.76	0-0.30	0.68b	20a

Médias seguidas de mesma letra, não são diferentes ao nível de 5% (Teste de Fischer).

Observa-se na tabela 20 que os parâmetros de biomassa, ou seja, raízes folhas e talos, foram bem favorecidos pela proporção de nitrogênio que continha 66 e 100% de nitrato.

Por outro lado, o teor de artemisinina foi um pouco menor, provavelmente em função do aumento da biomassa, mas não na mesma grandeza, como já foi comentado. Mesmo sem diferenças

estatísticas entre os dois tratamentos, observações visuais mostraram melhor vigor das plantas tratadas com 100% de nitrato (tabela 22).

Já a proporção de 50% nitrato e 50% amônia, foi prejudicial ao desenvolvimento da *A. annua* L. em hidroponia. De fato, o radical amonia contribuía grandemente para o aumento potencial osmótico da solução o que foi verificado pela condutividade elétrica no decorrer do ensaio. As plantas tinham assim, no final do ciclo, dificuldade em absorver a solução, pois a diferença de potencial osmótico entre a raiz e a solução era insuficiente para manter o fluxo para dentro da planta.

Observa-se ainda, que a característica de baixo teor de artemisinina foi bem fixada pela clonagem.

Sobre o ácido artemisinínico, apenas traços foram encontrados neste clone.

Tabela 21. Rendimentos em raízes e folhas secas, proporção folha/talo, teores de ácido artemisinínico e de artemisinina e rendimentos em artemisinina, em cultivo hidropônico de *A. annua* L. (Clone rico em artemisinina).

Tratam. NO ₃ /NH ₄ (%)	Raízes sec. (g/pl)	Rdt folhas sec. (g/pl)	Folha/ Talo	ácido artemis. %	artemisinina %	Rdt artemisinina (mg/pl)
100:0	2.4a	3.3a	0.8	0	1.19a	39a
66:33	1.3b	2.8a	0.7	0	1.26ab	36a
50:50	0.8b	2.4b	0.9	0	1.29b	30a

Médias seguidas de mesma letra, não são diferentes ao nível de 5% (Teste de Fischer).

Os mesmos tratamentos com clone rico em artemisinina, mostraram que os ganhos no rendimento de artemisinina (mg/planta), foram também crescentes em função dos níveis de nitrato das proporções utilizadas, por influência maior do aumento da biomassa.

Por outro lado, a relação folha/talo, foi um pouco desvantajosa com o ganho de biomassa. De fato, deseja-se a maior relação folha/talo, ou seja, maior quantidade de folhas e menor de talos, pois nas folhas é onde se encontram os maiores teores de artemisinina, enquanto que os talos dificultam a extração e o isolamento da artemisinina por conterem ceras ligadas à lactona sesquiterpênica.

Neste clone não foi encontrado ácido artemisinínico.

CONCLUSÕES:

- A aplicação de 64Kg de nitrogênio/ha, na forma de uréia, promoveu um aumento de 50% nos rendimentos de artemisinina de um híbrido de *A. annua* L., atingindo valores de 40Kg de artemisinina/ha.
- O decréscimo dos teores de artemisinina foi menor, percentualmente, que o aumento da biomassa, sugerindo ter havido deslocamento do estágio de maior concentração da artemisinina devido ao desenvolvimento vegetativo promovido pela fertilização nitrogenada. Neste caso, a colheita mais tardia pode trazer rendimentos maiores.
- A aplicação de 90kg de nitrogênio/ha, na forma de Nitrato de Amônia, promoveu um aumento de 28 à 40% sobre os rendimentos de artemisinina no cultivo em campo de *A. annua* L., em função do aumento de biomassa.
- A relação folha/talo, de importância para os processos industriais, foi favorecida pelo Nitrato de Amônia, em relação ao Sulfato de Amônia.
- A proporção de 50:50% de nitrogênio, nas formas Nitrato/Amoniaca, foi prejudicial ao desenvolvimento da *A. annua*, L. em cultivo hidropônico, quando as melhores proporções foram: 100%:0 e 66:33 % de nitrato/amônia, respectivamente.

Tabela 22. Influência de formas de nitrogênio (nitrato/amônia) sobre os rendimentos de *A.annua* L.

NO3:NH4-Rep-Pl.	CLONE POBRE EM ARTEMISININA					CLONE RICO EM ARTEMISININA			
	Talo g/pl	Raiz g/pl	Folh.sec g/pl	Artem. %	Ac.Art. %	Talo g/pl	Raiz g/pl	Folh.sec g/pl	Artem. %
100:0-1-1	7,45	2,85	5,95	0,60		5,60	3,10	4,25	1,25
100:0-1-2	8,45	2,45	6,70	0,48		3,15	1,65	2,85	1,15
100:0-1-3	7,60	2,95	5,90	0,58		4,80	1,65	3,75	1,28
100:0-1-4	10,55	3,70	6,95	0,63	0,25	3,65	2,65	2,70	1,18
Média - 1	8,51	2,99	6,38	0,57		4,30	2,26	3,39	1,22
100:0-2-1	5,75	2,25	4,65	0,58		5,35	2,80	3,60	1,15
100:0-2-2	7,25	1,90	5,15	0,70		3,90	2,20	2,75	1,28
100:0-2-3	7,65	2,45	5,25	0,45		4,40	2,35	3,15	1,10
100:0-2-4	6,65	2,80	4,55	0,40		3,40	2,25	2,60	1,10
Média - 2	6,83	2,35	4,90	0,53		4,26	2,40	3,03	1,16
100:0-3-1	5,80	2,30	4,70	0,53		3,00	1,45	2,45	1,08
100:0-3-2	5,65	1,90	4,25	0,53		4,55	3,00	3,30	1,23
100:0-3-3	6,40	2,80	4,85	0,58		6,85	3,30	5,00	1,23
100:0-3-4	3,30	0,35	2,95	0,40		4,65	2,60	2,85	1,25
Média - 3	5,29	1,84	4,19	0,51		4,76	2,59	3,40	1,20
MÉDIA 100:0	6,88	2,39	5,16	0,54		4,44	2,42	3,27	1,19
66:33 - 1-1	7,95	2,65	5,60	0,60		5,70	1,60	3,15	1,30
66:33 - 1-2	6,80	1,25	5,15	0,63		6,40	2,35	4,15	1,15
66:33 - 1-3	5,10	1,40	4,55	0,50		3,60	1,55	2,75	1,30
66:33 - 1-4	5,40	1,90	4,25	0,45	0,10	5,90	1,30	2,95	1,38
Média - 1	6,31	1,80	4,89	0,55		5,40	1,70	3,25	1,28
66:33 - 2-1	5,75	1,55	4,70	0,45		2,05	1,15	1,95	1,15
66:33 - 2-2	6,30	1,70	4,75	0,53		2,65	0,70	2,10	1,25
66:33 - 2-3	6,50	1,10	4,70	0,55		3,10	1,15	2,40	1,35
66:33 - 2-4	6,70	1,95	5,45	0,45		3,70	0,65	3,15	1,05
Média - 2	6,31	1,58	4,90	0,50		2,88	0,91	2,40	1,20
66:33 - 3-1	6,35	1,60	4,90	0,60		3,90	1,00	2,90	1,18
66:33 - 3-2	10,05	2,45	6,70	0,63		5,20	1,15	3,20	1,25
66:33 - 3-3	5,95	1,15	4,40	0,55	0,25	3,85	1,55	2,85	1,40
66:33 - 3-4	6,85	2,20	4,75	0,53		3,70	1,15	2,45	1,35
Média - 3	7,30	1,85	5,19	0,58		4,16	1,21	2,85	1,30
MÉDIA - 66:33	6,64	1,74	4,99	0,54		4,15	1,27	2,83	1,26
50:50 - 1-1	3,30	0,35	2,40	0,73		2,00	0,30	1,95	1,28
50:50 - 1-2	3,55	1,10	2,85	0,50		3,35	0,60	2,60	1,28
50:50 - 1-3	4,40	1,00	3,30	0,55		2,85	0,40	2,35	1,30
50:50 - 1-4	3,50	0,85	3,30	0,73		3,05	1,20	2,90	1,08
Média - 1	3,69	0,83	2,96	0,63		2,81	0,63	2,45	1,24
50:50 - 2-1	3,35	0,70	2,55	0,63		2,10	0,60	2,10	1,23
50:50 - 2-2	4,40	0,90	3,00	0,60		2,60	1,10	2,20	1,38
50:50 - 2-3	3,80	0,75	2,65	0,70		2,80	0,80	3,30	1,30
50:50 - 2-4	3,05	0,80	2,85	0,70	0,28	2,35	1,20	2,70	1,33
Média - 2	3,65	0,79	2,76	0,66		2,46	0,93	2,58	1,31
50:50 - 3-1	4,95	0,65	3,50	0,83		2,85	0,70	2,45	1,25
50:50 - 3-2	4,50	0,60	3,45	0,70		2,10	0,80	1,90	1,28
50:50 - 3-3	3,90	1,00	3,20	0,75	0,30	2,50	0,50	1,90	1,33
50:50 - 3-4	2,75	0,40	2,25	0,70	0,30	2,45	0,85	2,00	1,40
Média - 3	4,03	0,66	3,10	0,75		2,48	0,71	2,06	1,32
MÉDIA - 50:50	3,79	0,76	2,94	0,68		2,58	0,76	2,36	1,29

CAPÍTULO VI - OS EXTRATOS AQUOSOS DE *A. annua*, L.

INTRODUÇÃO:

Ainda que muitos autores tenham afirmado que a molécula artemisinina seja insolúvel em água, (C.C.R.G.Q., 1982; PETERS *et al.*, 1986), decidimos testar, diante do fato de se ter genótipos ricos em artemisinina, alguns procedimentos de extração aquosa, não para obtermos artemisinina pura, mas sim uma fração que a contivesse.

Esta proposição baseou-se na observação preliminar de um cultivo de *A. annua* L., onde os teores de artemisinina analisados após a ocorrência de chuvas sobre a cultura, eram menores que aqueles observados antes delas (DELABAYS, comunicação pessoal).

É também citado o fato de que, desde tempos imemoriais, o povo chinês utilizava uma bebida preparada com folhas da *A. annua* L. para tratamento de febres e malária (KAYMAN, 1985; WOENDENBAG, 1990). Embora não se tenha registro científico dos detalhes sobre o preparo de tal bebida, inferimos que era (e talvez ainda o seja) obtida de forma simples, - já que popular - onde as

formas alcóolicas e/ou aquosas seriam usadas. Em qualquer dos casos, supõe-se a bebida contivesse o princípio ativo.

WOENDENBAG (1990) ainda menciona que algumas substâncias contidas também no extrato bruto da *A. annua*, como as flavonas casticina e artemitina, potencializam a atividade antimalárica da artemisinina. Contudo, estas flavonas, isoladamente, não possuem atividade antimalárica.

Assim, desejou-se testar alguns preparados aquosos e alcóolicos, quantificando-se os teores de artemisinina em suas frações.

Foram realizados dois ensaios em laboratório utilizando-se folhas de um clone de *A. annua* L., rico em artemisinina, ou seja, mais que 1% nas folhas secas.

Ensaio 1 - Quantificação da perda de artemisinina nas folhas de *A. annua* L., submetidas aos processos: lavagem; ebulição; e extração alcóolica.

O objetivo do primeiro ensaio foi o de saber se a artemisinina poderia estar sendo perdida por lavagem (como em situações de chuva), bem como se o preparo de chás, com água fervente, ou a fabricação de bebidas alcóolicas, reduziriam o teor de artemisinina nas folhas (extração ou degradação).

MATERIAL E MÉTODOS:

As folhas de um clone chinês de *A. annua* L. foram colhidas no momento imediatamente anterior a seu florescimento, quando o teor de artemisinina era superior a 1%. Tomou-se 15 amostras de 600mg de folhas frescas, reservando-se 3 repetições para cada tratamento. O tratamento 1, serviu de testemunha sendo diretamente analisado quanto ao teor de artemisinina nas folhas. Todas as determinações foram também realizadas com 3 repetições, pelo método de CCD (visual).

Nos tratamentos 2 e 3, as folhas frescas foram deixadas dentro de frascos, mergulhadas em água destilada por 24 horas. Destas, uma parte ficou exposta à luz (tratamento 2) e outra foi coberta com papel alumínio (tratamento 3). Em seguida as folhas foram lavadas e analisadas. Esses tratamentos de exposição ou não à luz, foram realizados com base nos trabalhos de DEBRUNNER, (1995), a qual verificou, em outra espécie, que a perda de elementos por lavagem foi influenciada pela atividade fotossintética.

Ainda neste ensaio foi verificado o teor de artemisinina nas folhas de *A. annua*, após uma extração alcóolica na proporção de 600mg de folhas frescas em 50mL de etanol por 24 horas (tratamento 5). O tratamento 4, constou de avaliar-se o teor de

artemisinina em folhas que tinham sido fervidas na proporção de 600mg de folhas frescas em 50mL de água.

Após os tratamentos, as folhas eram lavadas e os teores de artemisinina estimados por CCD, seguindo a metodologia descrita por DELABAYS *et al.*, (1994).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Tabela 23. Teores de artemisinina nas folhas de *A. annua* L. após os tratamentos:

Tratamentos	Teor de artemisinina (%)		
	Rep. I	Rep. II	Rep. III
1) Testemunha.	>1.00	>1.00	>1.00
2) Em água a temperatura ambiente, exposto à luz.	0.95	≥1.00	≥1.00
3) Em água a temp. ambiente, não exposto à luz.	0.98	≥1.00	>1.00
4) Após* fervura em água.	0.08	0.00	0.05
5) Após álcool a temp. ambiente.	0.00	0.00	0.00

* depois de resfriado a temperatura ambiente.

Com os resultados deste primeiro ensaio (tabela 23), pudemos verificar que a influência da água em contato com a superfície da folha, não foi significativa quanto a redução do teor de artemisinina. Não existiu também diferença significativa entre as folhas que foram expostas à luz e aquelas que permaneceram no escuro. Pode ser que as diferenças sejam mesmo muito pequenas e não visíveis pela estimativa do teor de artemisinina por CCD. Acredita-se ainda que, a nível de campo, a redução no teor de artemisinina verificada após as chuvas seja consequência da absorção de água e não da lavagem superficial.

Por outro lado, teve-se folhas totalmente isentas de artemisinina após os tratamentos de fervura e também naqueles

onde as folhas foram extraídas com etanol a temperatura ambiente. Esse último tratamento poderia explicar as utilizações antigas na China.

Mesmo com os resultados particularmente interessantes do tratamento onde as folhas foram fervidas, restava-nos ainda saber se a artemisinina havia sido perdida durante a fervura, ou se ainda se mantinha no extrato.

Ensaio 2 - Sistemas de extrações aquosas:

Com o objetivo de quantificar os teores de artemisinina nas frações obtidas por diferentes sistemas de extrações aquosas em folhas de *A. annua*, foram realizados ensaios com alguns processos de extração, analisando o teor de artemisinina total nas folhas, antes e após as extrações, e nos respectivos extratos.

MATERIAL E MÉTODOS:

Folhas de um clone chinês de *A. annua*, ricas em artemisinina, (1.30%), foram colhidas e secas a 40°C, por 48 horas. A testemunha foi obtida por uma amostra composta, bem representativa do lote. O tratamento 2, constou de folhas secas deixadas por 3 minutos em contato com água quente, logo após fervura desta, na proporção de 1g de folhas secas para 50mL de água. No tratamento 3, as folhas foram deixadas em contato com a água, nas mesmas condições do tratamento anterior, porém por 15 minutos seguidos. No tratamento 4, as folhas foram fervidas juntamente com a água, durante 10 minutos. As determinações de artemisinina foram realizadas por CCD, adaptando-se o método descrito por DELABAYS *et al.* (1994). As principais modificações no método foram quanto a quantidade da amostra, 1g de folhas secas para 50mL de água (mesma proporção do método com tolueno, ou seja, 100mg de folhas secas:5mL de tolueno) e o procedimento de se fazer aplicação direta do extrato aquoso sobre a placa, a qual era realizada de forma lenta e gradativa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Tabela 24. Teores de artemisinina (%) nas folhas e na água dos tratamentos de extrações aquosas (média de 3 repetições).

	Art. nas folhas antes da extração	Art. nas folhas após a extração	Artemisinina no Extrato	Artemisinina recuperada	Perdas de artemisinina
1) Testemunha	1.30				
2) Água quente 3'	1.30	0.55	0.70	54%	4%
3) Água quente 15'	1.30	0.50	0.75	57%	4%
4) Fervura 10'	1.30	0.30	0.40	31%	46%

Pudemos constatar com os resultados do segundo ensaio, (tabela 24), que 46% da artemisinina é perdida quando as folhas são fervidas juntamente com a água. O principal resultado no entanto, foi obtido pelo tratamento de folhas secas com água quente, logo após a ebulição. Deste modo, pode-se recuperar, no extrato, cerca de 55% da artemisinina total, enquanto que aproximadamente 40% dela foi detectada nas folhas. Após a extração, portanto, tem-se uma perda de apenas 4% de artemisinina.

Não existiu diferença entre as extrações obtidas em função do tempo de contato de 3 ou de 15 minutos.

CONCLUSÕES:

- O efeito da água sobre a superfície das folhas de *A. annua* L. não reduziu, de forma significativa, os teores de artemisinina. Portanto, as reduções que foram observadas no campo, após as chuvas, provavelmente são devidas a outras causas, que não a lavagem dos trichomas, como havia sido anteriormente suposto (DELABAYS, comunicação pessoal).
- Houve grandes diferenças na recuperação de artemisinina conforme os processos de extração aquosa. Quando ela se realizou em água fervente, (com as folhas sendo fervidas junto) a perda foi severa, mais precisamente, ao redor de 46% da artemisinina total.
- Por outro lado, quando a extração foi realizada com água quente logo após esta ter sido fervida (vertendo-se a água sobre as folhas secas) cerca de 55% da artemisinina foi encontrada no extrato. O restante estava presente ainda nas folhas, tendo havido apenas uma perda de 4%, segundo a estimativa.
- Acreditamos que este último sistema de extração, realizado com folhas ricas em artemisinina, deverá promover novos estudos sobre a eficácia farmacológica de infusões.

3. DISCUSSÃO GERAL

Sendo a *A. annua* L. uma espécie alógama de ampla distribuição, encontramos grande variabilidade genética o que explica os diferentes rendimentos de artemisinina citados na literatura, além das diferenças provenientes dos métodos particulares de amostragem e análise. As populações de base expressam esta variabilidade no desenvolvimento vegetativo e nos teores de artemisinina. Os nossos primeiros trabalhos identificaram a ocorrência de florescimento irregular e conseqüente falta de uniformidade dos cultivos. Desejou-se selecionar indivíduos de florescimento tardio para se ter maior biomassa; porém, esta seleção foi de grande intensidade pois a maioria dos genótipos apresentava florescimento precoce nas condições fotoperiódicas do Brasil. Nas nossas condições, restavam poucos indivíduos selecionados e os teores de artemisinina eram ainda baixos. Com a seleção desenvolvida na Suíça, onde as plantas não florescem, tanto a biomassa como os teores de artemisinina puderam ser avaliados, encontrando-se indivíduos superiores nestes caracteres. Outra diferença entre os trabalhos desenvolvidos nos dois países foi quanto ao teor de ácido artemisinínico: nas populações melhoradas no Brasil, encontramos teores de até 0.5%

de ácido artemisinínico, enquanto que nas populações, clones e híbridos seleccionados na Suíça, mediante monitoramento do teor de artemisinina, o ácido artemisinínico era ausente. Vindo portanto, a colaborar com a hipótese do ácido artemisinínico ser precursor biossintético da artemisinina; assim, a seleção estaria a nível de plantas que possuíssem regulação enzimática favorável a esta transformação.

O sensível aumento nos teores de artemisinina, passando de 0.2% à, até, 1.3% de artemisinina nas folhas (secas) de *A. annua* L., se atribui ao fato dos trabalhos terem sido monitorados pela análise química. O método por CCD+Densitômetro, otimizado para o número de determinações necessárias, foi o grande responsável por tais incrementos. Sabemos que outros métodos poderiam ser mais precisos para a determinação da artemisinina, como por exemplo, por CLAE+detector eletroquímico, ou CLAE+UV. Porém, para o propósito dos trabalhos de seleção, fez-se necessário um método rápido para ser aplicado a um grande número de amostras. Um estudo comparativo sobre os teores de artemisinina detectados por CCD+Densitômetro e aqueles considerados mais precisos, mostraram valores de correlação linear (r^2) de 0.90 a 0.93 (DELABAYS, dados não publicados).

Outra razão para o incremento em artemisinina foi o conhecimento do alto grau de herdabilidade deste carácter, promovendo o

melhoramento propriamente dito, através de híbridos obtidos a partir de clones selecionados. Marcadores enzimáticos, peroxidases e esterases, foram utilizados a título de sondagem metodológica sobre o polimorfismo enzimático entre os híbridos e seus progenitores. Os proteínasogramas peroxidásicos dos híbridos testados, possuíam a soma das bandas dos seus respectivos progenitores. A nível das populações, foram encontradas diferentes atividades peroxidásicas. Já a atividade esterásica foi bastante fraca nas populações avaliadas (PETER BLANC, 1992). Assim, a segunda seleção, agora sobre tais genótipos melhorados em artemisinina e em biomassa, foi dirigida para florescimento tardio sob condições controladas de fotoperíodo curto, resultando na seleção de progenitores (clones) para novos híbridos (P1.5, P1.39 e P1.47) além do híbrido "Ch. x Viet.55". Considerando que a avaliação dos genótipos selecionados e melhorados através de cruzamentos deva ser realizada no local onde tal material será cultivado, os híbridos "Ch. x Viet. 55" e "92/82", cumpriram os ensaios de avaliação no Brasil. Outros híbridos estão sendo avaliados em função do programa de melhoramento genético que se instalou no CPQBA ("P1.5 x P1.39", "P1.5 x P1.47"), além de novos híbridos obtidos na MEDIPLANT. As avaliações conduzidas a nível de campo, em larga escala, promoveram o estudo comparativo entre os rendimentos dos

diferentes genótipos. Tornou-se fundamental, no entanto, a manutenção dos progenitores para se poder recorrer a eles visando a produção de sementes híbridas. Tal manutenção vem sendo realizada vegetativamente por estacas ou por cultura de tecidos, sem passar pela fase de calos, para se evitar a variabilidade soma clonal.

A metodologia utilizada nestes trabalhos, de se explorar a variabilidade genética natural da espécie, através de seleção e cruzamentos, bem como de se utilizar a fertilização nitrogenada aplicada aos genótipos obtidos, promoveram aumentos significativos dos rendimentos de artemisinina, além de resultar na padronização da cultura. Esses aumentos, verificados em cultivo no Brasil, passando de 5 para 30Kg de artemisinina/ha/corte, aproximadamente, colaboram para a produção economicamente viável deste medicamento no país. De fato, a garantia de produção da matéria prima e a otimização de seus rendimentos são condições básicas para promover os investimentos agro-industriais necessários para a produção dos medicamentos.

Enquanto este processo porém, ainda se põe a caminho, os nossos resultados de extratos aquosos a partir da obtenção dos genótipos ricos em artemisinina, retornam à cogitação

possibilidades anteriormente descartadas sobre o uso de infusões.

Mesmo sabendo-se que a via oral é menos eficiente no controle do *Plasmodium*, como vimos na introdução, esta poderia agora ser interessante para a população que sofre nas áreas de malária e que vivem na condição de miséria total. Consideramos que tais extratos mereçam novos estudos farmacológicos e toxicológicos, inclusive para se definir parâmetros sobre a posologia.

Os diversos estudos conduzidos nesta década com a espécie de origem chinesa, *A. annua* L., tornam eminente a produção dos seus medicamentos antimaláricos em outras partes do mundo. Atualmente, existem cultivos sendo ampliados na Birmânia, Tanzânia e em Madagascar, para fornecimento de matéria prima para empresas farmacêuticas da Europa as quais ensaiam processos em larga escala (DELABAYS, comunicação pessoal). Contudo, essas empresas, que acompanham também as pesquisas do CPQBA e da MEDIPLANT, veem com grande possibilidade a instalação de unidades de produção no Brasil, desde a matéria prima até o medicamento, considerando os estudos aqui realizados, nosso grande interesse no controle da malária, a situação econômica e, inclusive, as boas relações diplomáticas.

A título de estimar o custo de produção da matéria prima, já que agora conhecemos os rendimentos, elaborou-se uma planilha de

custo (tabela 25), mesmo considerando que muitas operações poderão ser otimizadas. De fato, como todo desenvolvimento agrotecnológico aplicado, existe o caráter dinâmico das diversas etapas do processo de obtenção dos princípios ativos, podendo-se prever o desenvolvimento de algumas técnicas favoráveis ao cultivo da *A. annua* L., como a mecanização das operações de plantio, colheita e processamento pós-colheita. Neste sentido, poderíamos mencionar o uso de sementes peletizadas, dispensando a fase formação de mudas em viveiros, devido a possibilidade de plantio direto e mecanizado. Esse sistema traria vantagens de ordem de custo e algumas pesquisas preliminares foram conduzidas na França e na Austrália. Por outro lado, haveria a necessidade de se controlar as ervas invasoras, provavelmente através de herbicidas.

Investigações subsequentes, agora do ponto de vista biológico/genético, seria sobre o processo de obtenção dos híbridos o qual se beneficiaria de técnicas que venham a permitir maior tempo de conservação de pólen, facilitando a sincronização do estágio de florescimento entre os parentais. Estudos preliminares de OBRIST (1994) mostraram algumas técnicas de conservação de pólen de *A. annua* L. a baixa temperatura, porém, os resultados ainda não foram satisfatórios.

Outra grande vantagem do cultivo em região intertropical, como o Brasil, é sobre a questão da secagem. Os cultivos de *A. annua* L. necessitam passar por operações de separação das folhas e de secagem após a colheita. Nos países da Europa, o período de colheita coincide com o fim do outono ou início do inverno, exigindo o uso de secadores. Já nas condições do Brasil, grande parte da secagem pode ser realizada a pleno sol, de forma bem mais econômica e segura, pois sendo a artemisinina uma molécula termolábil, a temperatura de secagem é um fator crítico.

Com esses estudos, estabeleceu-se um programa dinâmico de melhoramento genético da *A. annua* L. no CPQBA, o qual já atende os objetivos propostos, revelando genótipos altamente competitivos para o cultivo em região intertropical. Considerando que o custo de obtenção do medicamento no ocidente deverá ser ainda definido, estimamos o custo das etapas básicas da produção da matéria prima, chegando-se a valores da ordem de R\$3.20/Kg de folhas secas.

O programa continuará a servir os interesses da *A. annua*, L. na luta contra a malária; porém, outras espécies poderão ser exploradas com a metodologia adquirida.

Tabela 25. Custo da produção da folhas de *A. annua* L. híbrido Ch.x Viet.55: (Estimativa realizada em abril/96, para o cultivo de 1 hectare)

Produção de Mudanças: 28.000 mudas/ha (espaçamento de 0.6 x 0.6m)

	Reais
Aluguel de Casa de Vegetação: (R\$ 500 x 2 meses)....	1.000,00
Substrato vegetal.....	300,00
Mão de obra para: enchimento dos tubetes, semeadura, repicagem, irrigação complementar: (36 homens/dia). 1 funcionário nível básico: (R\$ 350 x 2 meses).....	1.080,00
	700,00
Sub-Total (mudas):	3.080,00
Preço da muda.....	0,11

Cultivo:

Aluguel da terra: (R\$ 150/ha/mês x 6 meses)	900,00
Mão de obra:(Transplante, capina, colheita:40h/dia)	1.200,00
Preparo do solo e operações mecanizadas:	2.000,00
Adução:.....	600,00
Mão de obra:(Secagem, separação, embalagem:40 h/dia)	1.200,00
Sub-total (cultivo).....	5.900,00
Total (mudas + cultivo).....	8.980,00

Rendimentos:

Híbrido "Ch x Viet. 55" = 2.800Kg de folhas secas/ha/corte:
Estimativa do Custo de produção = R\$ 3,20/Kg de folhas secas de *A. annua* L.

4. LITERATURA CITADA:

- ADLER, P.R., SIMON, J.E., WILCOX, G.E., 1989. Nitrogen form alters sweet basil growth and essential oil content and composition. *HortScience* 24(5):789-790.
- AKHILA, A., THAKUR, R.S., POPLI, S.P., 1987. Biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua*. *Phytochemistry* 26:1927-1930.
- AKHILA, A., RANI, K., THAKUR, R.S., 1990. Biosynthesis of artemisinic acid in *Artemisia annua*. *Phytochemistry* 29:2129-2132.
- ALEXANDER, M.P., 1980. A Versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. *Stain Technol.*, 33:13-18.
- ALVES, M.N., CHANG, C.I.P.H., MONTANARI JR., I., MAGALHÃES, P.M., 1993. Micropropagação vegetativa de *Artemisia annua* visando obter clones de plantas com florescimento tardio. IN: IV Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. Fortaleza, Brasil, resumos, *R. Bras. Fisiol. Veg.* 5(1):p76.
- BORIN, M.R., 1993. Polifenóis: Indicadores da evolução de plantas floríferas. Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, Brasil, tese de Doutorado.
- BROWN, G., 1994. Secondary Metabolism in Tissue Culture of *Artemisia annua*. *Journal of Natural Products*. 57(7)975-977.

- BRUNETON, J., 1993. Pharmacognosie, Phytochimie des Plantes Médicinales. Technique et Documentation Lavoisier, Paris, 915p.
- C.C.R.G.Q., 1982a. Antimalarial efficacy and mode of action of Qinghaosu and its derivatives in experimental models. *J. Trad. Chin. Med.* 2(1):17-24.
- C.C.R.G.Q., 1982b. Metabolism and pharmacokinetics of Qinghaosu and its derivatives. *J. Trad. Chin. Med.* 2(1):25-30.
- 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. Germoplasm variation in Artemisinin content of *Artemisia annua* using an alternative method of artemisinin analysis from crude plant extracts. *J. Nat. Prod.* 53(1):157-160.
- DEBRUNNER, N. 1995. Solute leakage from detached plant parts of winter wheat: Influence of maturation stage and incubation temperature. *J. Plant Physiol.* 145(3):257-260.
- DELABAYS, N., BLANC C., COLLET G., 1992. La culture et sélection d'*A. annua* L. en vue de la production d'artémisinine. *Revue suisse Vitic., Arboric., Hortic.* 24 (4), 245-251.

- DELABAYS, N., JENELTEN, U., PARIS, M., PIVOT, D., GALLAND, N., 1994. Aspects agronomiques et génétiques de la production d'artémisinine à partir d'*A. annua* L. *Revue suisse Vitic.Arboric.Hortic.* 26(5):291-296.
- EL-FERALY, F.S., AL-MESHAL, I.A., AL-YAHYA, M.A., HIFNAWY, M.S., 1986. On the possible role of Qinghao acid in biosynthesis of artemisinin. *Phytochemistry* 25:277-2778.
- FALCONER, D.S., 1972. Introduction to quantitative genetics. Oliver & Boyd Eds.365p.
- FERREIRA, J., 1994. Production and detection of artemisinin in *A. annua* L.. Purdue University, Purdue, EUA, Ph.D. thesis.
- FIGUEIRA, G.M., 1995. Nutrição mineral, produção e concentração de artemisinina em *A. annua*, L. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, tese de Mestrado.
- FUTUYAMA, D.J., SLATKIN, M., 1983. Coevolution. (Eds), Sinauer Associates, Sunderland, 555p.
- GOTTLIEB, O.R., 1989. Evolution of natural products. IN: Natural products of wood plants (Rowe, J.W., eds), 1, Chapter 3, Springer, New York, pp.125-153.
- GOTTLIEB, O.R., 1992. Plant phenolics as expression of biological diversity. IN: Plant polyphenols - Synthesis, chemical properties, significance Hemingway (R.W., eds.), Plenum Press, New York, pp.523-538.

- HARBONE, J.B., 1988. Introduction to ecological biochemistry. 3rd ed., Academic Press, London, 245p.
- HARBONE, J.B., 1989. Recent advances in chemical ecology. *Natural Product Reports*. 6:85-109.
- HASLAN, E., 1989. Plant polyphenols: vegetable tannins revisited. Cambridge University Press, Cambridge, 316p.
- HEYWOOD, V.H., HARBONE, J.B., TURNER, B.L., 1977. Anthemidae. IN: The biology and chemistry of Compositae. Vol. II. Academic Press, London, pp.851-898.
- JOAHANSEN, D.A., 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill, Book Company, New York.
- JUNG, M., ELSOHLY, H.N., MCCHESENEY, J.D., 1990. Artemisinic acid: a versality chiral synthon and bioprecursor to natural products. *Panta Med*. 56:624.
- KIM, N-C., KIM, S-U., 1992. Biosynthesis of artemisinin from 11,12-dihydroarteannuic acid. *J. Korean Agr. Chem. Soc.* 35:106-109.
- KLAYMAN, D.L., 1985. Qinghaosu (Artemisinin): An Antimalarial Drug from China. *Science*. 228:1049-1054.
- KLAYMAN, D.L., 1989. Weeding Out Malaria. *Natural History*. 10:18-26.

- LAUGHLIN J. C., 1994. Agricultural production of artemisinin review. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 88:(Supplement 1)21-22.
- LÊ, C.L., COLLET, G.F., 1991. The *in vitro* Culture of *A. annua* L. *Recherche agronom en Suisse*. 31(3):111-116.
- LIERSCH, R., SOICKE, H., STEHR, C., TULLNER, U., 1986. Formation of Artemisinin in *Artemisia annua* during one vegetation period. *Planta Med*. 52:387-390.
- MAGALHÃES, P.M., 1993. A experimentação agrícola com plantas medicinais e aromáticas. *Atualidades Científicas*.3:31-56.
- MARTIN, F.W., 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of inflorescence. *Stain Technol*. 37:125-127.
- NAIR, M.S.R., ACTON N., KLAYMAN D.L., KENDRICK K., BASILE D.V., AND MANT S., 1986. Production of artemisinin in tissue culture of *A. annua*. *J.Nat.Prod*. 49:504-507.
- NUSSENZWEIG, R.S., LONG, C.A., 1994. Malaria Vaccines: Multiple Targets. *Science*. 265:1381-1382.
- OBRIST, F., 1994. Etude du pollen d'*Artemisia annua* L., de sa viabilité et des possibilités de le conserver. Ecole polytechnique fédérale de Zurich, Zurich, Suisse, travail de diplôme.

- PATERNIANI, E., MIRANDA F^o, J.B., 1987. Melhoramento de populações. IN: Melhoramento e produção do milho. Fundação Cargill, Campinas, Vol.I, pp.217-274.
- PELLEGRINO, A.P., REHDER, V.L.G., SHEPHERD, S.L.K., 1995. Análise semi-quantitativa por CCD dos terpenos anti-maláricos encontrados em raízes de *Artemisia annua* L. transformadas por *Agrobacterium rhizogenes*. IN: II Jornada Paulista de Plantas Medicinais. Araraquara, Brasil, resumos, p28.
- PETER BLANC, C., 1992. Développement et biologie de la reproduction de l'*Artemisia annua* L. Université de Lausanne, Lausanne, Suisse, travail de diplôme.
- PETERS W., ROBINSON BL., WARHURST DC., 1986. The chemotherapy of rodent malaria, XL. The action of artemisinin and related sesquiterpenes. *Ann Trop Med Parasitol* 1986; 80:483-489.
- PINDER, M., ROELANTS, G.E., 1993. Malaria: Biotechnology spearheads vaccine research. *Biotechnology and Development Monitor*. 17:3-5.
- PINTO-MAGLIO, C.A.F., CABRAL, D.F. E SHEPHERD, S.L.K. Análise citogenética de *A. annua* L. (Asteracea). Suplemento do 41^o Congresso Nacional de Genética, vol.16(3) p.410, 03-09 de setembro de 1995.

- PRAS, N., VISSER, J.F., BATTERMAN, S., WOERDENBAG, H.J., MALINGRÉ, T.M. 1991. Laboratory selection of *A. annua* L. for high artemisinin yielding types. *Phytochem. Anal.* 2:80-83.
- RADFORD, A.E., DICKISON, W.C., MASSEY, J.R., BELL, C.R., 1974. Vascular plant systematics. Harper and Row Publishers, New York, 891p.
- ROTH, R.J., ACTON, N., 1987. Isolation of artemisinic acid from *A. annua*. *Planta Med.* 53:501-502.
- ROTH, R.J., ACTON, N., 1989. A simple conversion of artemisinic acid into artemisinin. *J. Nat. Prod.* 52:1183-1185.
- SANGWAN, R.S., AGARWAL, K., LUTHRA, R., THAKUR, R.S., SING-SANGWAN, N., 1993. Biotransformation of artemisinic acid into artemisinin B and artemisinin in *A. annua*. *Phytochemistry* 34:1301-1302.
- SARRUGE, J.R., 1970. Soluções nutritivas. *Summa Phytopathologica* 1: 223-233.
- SHARMA, A., BINDRA, R.L., TEWARI, R., 1991. *Artemisia annua*: Cultivation, Utilization & Chemical Studies. CIMAP Publication, 46/91:46-60.
- SING A., VISHWAKARMA R. A., HUSAIN A., 1988. Evaluation of *A. annua* - Strains for higher Artemisinin Production. *Planta Med.* 54, 475-476.

- SPENCER, K.C., 1988. Chemical mediation of coevolution. Ed., Academic Press, London.
- SMALL, J., 1915. The pollen presentation mechanism in the Compositae. *Ann. Bot.* 115:457-470.
- WOERDENBERG H.J., LUGT C., PRAS N., 1990. *A. annua* L.: a source of novel antimalarial drugs. *Pharmaceutish Weekblad Scientific Edition* 12(5):169-181.
- WOERDENBERG, H.J., PRAS, N., ALFERMANN, A.W., 1991. Production of artemisinin in Shoot Culture of *Artemisia annua*. *Planta Med.* 57(Suppl.2):A91-A92.
- WOERDENBERG, H.J., LUERS, J.F.J., UDEN, W., PRAS, N., MALINGRÉ, T.M., ALFERMANN, A.W., 1993. Production of the new antimalarial drug artemisinin in shoot culture of *Artemisia annua* L. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 32:247-257.
- WOERDENBERG, H.J., PRAS, N., CHAN, N.G., BANG, B.T., BOS, R., UDEN, W., VAN Y, P., BOI, N., BATTERMAN, S., LUGT, C.B., 1994. Artemisinin, related sesquiterpenes, and essential oil in *Artemisia annua* during a vegetation periode in Vietnam. *Planta Med.* 60:272-275.