UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

CAMPUS PATO BRANCO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

MARCOS VILY PALADINI

Artemisia annua L.: PRODUÇÃO DE BIOMASSA, ARTEMISININA, RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL INFLUENCIADOS POR DIFERENTES ELICIADORES E NÍVEIS DE ADUBAÇÃO NPK

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO

2012

MARCOS VILY PALADINI

Artemisia annua L.: PRODUÇÃO DE BIOMASSA, ARTEMISININA, RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL INFLUENCIADOS POR DIFERENTES ELICIADORES E NÍVEIS DE ADUBAÇÃO NPK

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

Orientador: Dr. José Abramo Marchese
Coorientadores: Dra. Mary Ann Foglio
Dra. Marcia Ortiz Mayo Marques

PATO BRANCO
2012

P153a **Paladini, Marcos Vily**

***Artemisia annua* L.: produção de biomassa, artemisinina, rendimento e composição de óleo essencial influenciados por diferentes eliciadores e níveis de adubação NPK / Marcos Vily Paladini. -- Pato Branco: UTFPR, 2012.**

91 f. : il. ; 30 cm

Orientador: Prof. Dr. José Abramo Marchese
Coorientador: Prof. Dra. Mary Ann Foglio
Coorientador: Prof. Dra. Marcia Ortiz Mayo Marques
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, PR, 2012.
Bibliografia: f. 84 – 91

1. Eliciação. 2. Adubação química 3. Malária I. Marchese, José Abramo, orient. II. Foglio, Mary Ann, coorient. III. Marques, Marcia Ortiz Mayo, coorient. IV. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. V. Título.

CDD: 22. ed. 630

Ficha Catalográfica elaborada por
Suelem Belmudes Cardoso CRB9/1630
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco

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

PPGAG UTFPR

UTFPR UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação n° 057

Artemisia annua L. : produção de biomassa, artemisinina, rendimento e composição de óleo essencial influenciados por diferentes eliciadores e níveis de adubação NPK

por

Marcos Paladini

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

Banca examinadora:

Drª. Marcia Ortiz Mayo Marques
IAC/SP

Drª. Mary Ann Foglio
CPQBA/UNICAMP

Dr. Paulo Cesar Conceição
UTFPR/DV

Dr. José Abramo Marchese
UTFPR
Orientador

Visto da Coordenação:

Prof. Dr. André Brugnara Soares
Coordenador do PPGAG

A todas as pessoas que sofreram, sofrem e aquelas que virão a sofrer devido a malária.

A meus pais, Albina e Mario Paladini, com muito amor, carinho e admiração, por serem exemplos de vida, força e coragem.

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que tudo nos faculta.

A meus pais, Mario e Albina Paladini, minha irmã Marcia Paladini Schwantes, pelo carinho, apoio, amor e compreensão, meu agradecimento, carinho e amor.

A meu orientador, professor Dr. José Abramo Marchese pela compreensão, confiança, profissionalismo e amizade. Muito obrigado!

As coorientadoras Dra. Mary Ann Foglio e Dra. Marcia Ortiz Mayo Marques, cujo apoio e contribuição tornaram possível este trabalho.

Ao amigo Diogo Capelin, irmão científico, mas que também considero um irmão que a vida me facultou, meu sincero agradecimento.

A professora Marisa e aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal da UTFPR, tanto aos que fizeram parte do projeto, quanto aos demais colegas pelo trabalho realizado, amizade e companheirismo de sempre.

A todos os amigos de Campinas, no CPQBA/UNICAMP e IAC, pela amizade e apoio, especialmente à Ilza, à Maria e à Lenita, pela acolhida e pelo apoio na realização das análises.

Aos servidores e amigos da UTFPR, Sr. Otávio (Tratorista) e Sérgio pela dedicada contribuição durante a realização do trabalho e a todos os demais servidores da Universidade que contribuem, inúmeras vezes, de forma anônima para que tudo seja possível.

A todos, que contribuíram para realização deste trabalho e não citados aqui, com o mesmo sentimento, meu sincero agradecimento.

Agradeço a UTFPR, ao CPQBA/UNICAMP, ao IAC, ao corpo docente do PPGAG/UTFPR, a CAPES pela bolsa auxílio, ao CNPq e a Fundação Araucária pelo financiamento do projeto.

O homem é assim o árbitro constante de sua própria sorte. Ele pode aliviar o seu suplício ou prolongá-lo indefinidamente. Sua felicidade ou sua desgraça dependem da sua vontade de fazer o bem. (Allan Kardec).

RESUMO

PALADINI, Marcos Vily. *Artemisia annua* L.: produção de biomassa, artemisinina, rendimento e composição de óleo essencial influenciados por diferentes eliciadores e níveis de adubação NPK. 91 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2012.

Artemisia annua L. é uma planta herbácea, anual, originária da China e aclimatada ao Brasil, que produz artemisinina, uma lactona sesquiterpênica utilizada no tratamento da malária. A espécie é a única fonte economicamente viável dessa molécula. Também, é uma espécie altamente aromática e produz grande quantidade de óleo essencial, rico em terpenos. Este trabalho tem como objetivo determinar a influência de moléculas eliciadoras e de níveis de adubação NPK na produção de biomassa, artemisinina e composição do óleo essencial na variedade Artemis de *A. annua*, produzida em campo na cidade de Pato Branco-PR. Um experimento com adubação foi conduzido em campo durante os anos de 2008 e 2009, onde plantas de *A. annua* foram submetidas a níveis crescentes de adubação química NPK em um solo de média fertilidade. A partir da dose padrão de adubação (N: 160 kg ha^{-1}; P_2O_5: 175 Kg ha^{-1}; K_2O: 90 Kg ha^{-1}) foram definidos os tratamentos meia dose, uma dose e duas doses, além do tratamento controle, nas formulações Uréia, Super Fosfato Simples e Cloreto de Potássio. Outro experimento com eliciação foi conduzido, onde plantas de *A. annua* foram submetidas a eliciação com acibenzolar-S-metílico e dois produtos a base de proteína harpina, por meio de três pulverizações semanais, desde o início do período de indução floral até uma semana antes da colheita. Em ambos os experimentos, o material foi seco e separado, a quantificação de artemisinina foi realizada por cromatografia em camada delegada com detecção por densitometria. O perfil químico do óleo foi determinado por cromatografia a gás. No experimento com adubação as massas secas de caule, parte aérea e relação folha caule tiveram ajuste para equação linear, com os melhores resultados para o tratamento duas vezes a dose: 10,43 t ha^{-1}, 14,21 t ha^{-1}, respectivamente para massas secas de caule e parte aérea, e maior relação folha/caule (0,4) para tratamento testemunha. A variável massa seca de folhas obteve ajuste para equação de segundo grau, com máxima eficiência técnica em 1,57 doses e rendimento estimado de 3,87 t ha^{-1}. A influência das doses de adubação NPK sobre teor de artemisinina (média 5,98 kg t^{-1}) e produtividade de

artemisinina (média 19,45 kg ha^{-1}) não apresentou ajustes significativos para reta. Foram identificados 28 componentes no perfil químico óleo essencial que compreendem 94,96% do óleo essencial. As substâncias majoritárias foram cânfora (44,75%), 1,8 cineol (7,90%), γ-muuroleno (6,75%), *trans*-β-farneseno (6,51%) e mirceno (5,74%). Sete componentes do óleo essencial apresentaram variação em função dos níveis de adubação NPK: *p*-cimeno, canfeno, *trans*-β-terpineol, α-pineno, viridifloreno, acetato de mirtenila e β-pineno. O conteúdo relativo desses componentes variou de 0,53 a 2,23%, representando aproximadamente 8% do perfil do óleo essencial. A classe predominante foi monoterpenos (72%). No experimento com eliciação, os eliciadores acibenzolar-S-metílico e proteína harpina não resultaram em alterações significativas nas biomassas de folhas, caule, parte aérea e na relação folha/caule de *A. annua*; como também não apresentaram diferenças nos teores e rendimento de artemisinina e óleo essencial, No perfil químico foram identificados 31 componentes, que compreendem 91,5% do óleo essencial. Os tratamentos com os eliciadores acibenzilar-S-metílico e harpina não resultaram em diferenças significativas para nenhuma das substâncias identificadas e quantificadas. Os componentes majoritários foram cânfora (43,38%), 1,8 cineol (9,28%), mirceno (7,69%) γ-muuroleno (5,00%), canfeno (4,54%) e *trans*-β-farneseno (3,98%). Os monoterpenos foram a classe predominante no óleo essencial (79,8%).

Palavras-chave: Eliciação. Adubação química. Cânfora. 1,8 cineol. Malária. Indução de resistência.

ABSTRACT

PALADINI, Marcos Vily. *Artemia annua* L.: production of biomass, artemisinin, essential oil yeld and composition influenced by different elicitors and levels of NPK fertilizer. 91 p. Dissertation (master in Agronomy) – Post Graduation Program in Agronomy (Area of Concentration: Vegetable Production), Federal University of Technology - Paraná. Pato Branco, 2012.

Artemisia annua L. is an herbaceous annual plant, originally from China and acclimatized to Brazil, which produces artemisinin, a sesquiterpene lactone used in the treatment of malaria. The species is the only economically viable source of this molecule. Also, it is a highly aromatical species and it produces great amount of essential oil, rich in terpenes. This work has as objective to determine the influence of elicitor molecules and levels of NPK fertilizer in the biomass production, artemisinina and composition of the essential oil in the variety of Artemis *A. annua*, produced in the field in the town of Pato Branco. An experiment with fertilization was conducted in the field during the years of 2008 and 2009, where plants of *A. annua* were submitted to increasing levels of NPK chemical fertilizer in a ground of average fertility. From the standard dose of fertilizer (N: 160 kg ha-1; P_2O_5: 175 kg ha^{-1}; K_2O: 90 kg ha^{-1}) it was defined the half dose treatments, one dose and two doses, beyond the control treatment, in the formulations Urea, Super Simple Phosphate and Potassium Chloride. Another experiment with eliciation was lead, where plants of *A. annua* were submitted to the elciation with acibenzolar-S-methylic and two products harpin-protein based, by means of three weekly sprayings, since the beginning of the floral induction period up to one week before the harvest. In both experiments, the material was dried and separated, the quantification of artemisinin was carried through by thin layer chromatography with detection by densitometry. The chemical profile of the oil was determined by gas chromatography. In the fertilization experiment the dry masses of stalk, aerial part and the relation stalk-leaf had an adjustment for a linear equation, with the best results for the treatment two times the dose: 10,43 t ha^{-1}, 14.21 t ha^{-1}, respectively for dry masses of stalk and aerial part, and greater relation stalk-leaf (0,4) for test treatment. The variable leaf dry mass got an adjustment for second degree equation, with maximum efficiency technique in 1,57 doses and estimated yeld of 3,87 t ha^{-1}. The influence of NPK fertilizer doses on the artemisinin content (average 5,98 kg t^{-1}) and the artemisinin productivity (average 19,45 kg ha^{-1}) did not present significant adjustments for straight line. Twenty-eight

components were identified in the essential oil chemical profile that comprise 94.96%. The majoritarian substances were camphor (44.75%), 1,8 cineole (7.90%), γ-muurolene (6.75%), trans-β-farnesene (6.51%), mircene (5.74%). Seven components of the essential oil showed variation in function of NPK fertilizer levels: p-cymene, camphene, trans-β-terpineol, α-pinene, viridifloreno, acetate of mirtenila and β-pinene, the relative content of these components varied from 0,53 to 2.23% representing about 8% of the essential oil profile. The predominant class was of monoterpenes (72%). In the experiment with eliciation, the elicitors acibenzolar-S-methylic and harpin protein did not result in significant alterations in the leaf, stalk, aerial part biomasses and in the relation stalk-leaf of *A. annua*; as well as they did not show differences in the artemisinin and essential oil contents and yeld. In the chemical profile 31 components were identified, which comprise 91.5% of the essential oil. The treatments with the elicitors acibenzilar-S-methylic and harpin did not result in significant differences for any of the identified and quantified substances. The majoritarian components were camphor (43.38%), 1,8 cineole (9.28%), mircene (7.69%) γ-muurolene (5.00%), camphene (4.54%) trans-β-farnesene (3.98%). Monoterpenes were the predominant class in the essential oil (79.8%).

Keywords: Eliciation. Chemical fertilization. Camphor. 1,8 cineole. Malaria. Resistance induction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição da malária no mundo, países e territórios afetados, dados de 2010. Adaptado de WHO (2012b). 20
Figura 2 – Distribuição do número de casos de malária relatados e confirmados em países e territórios, dados de 2010. Adaptado de WHO (2012b). 21
Figura 3 – Distribuição do número de casos de mortes por malária relatados em países e territórios, dados de 2010. Adaptado de WHO (2012b). 21
Figura 4 – Mapa do Brasil destacando as áreas de risco para malária por distribuição de diferentes níveis de incidência parasitária anual, dados de 2010. Adaptado de WHO (2011). 23
Figura 5 – Artemisinina é a substância produzida pela planta *Artemisia annua* L. Os derivados arthemether e artesunato tem melhor biodisponibilidade do que a artemisinina e são usados clinicamente em terapia combinada com artemisinina. Artemotil (também conhecido como arteether) é pouco usado. Adaptado de DONDORP et al. (2010). 25
Figura 6 – Relação entre o preço e produção mundial de artemisinina entre os anos de 2002 e 2011. Artemisinin spot price Price ($/kg): preço à vista de artemisinina ($/Kg); Production (T): Produção (toneladas). Adaptado de A2S2 (2012). 26
Figura 7 – Vasos plásticos semeados com *Artemisia annua* L., com complementação de luz artificial para fotoperíodo de 15 horas, em 20/08/2008. UTFPR, 2011. 45
Figura 8 – Ilustração do início da diferenciação do botão floral, botão floral desenvolvido e pleno florescimento de *Artemisia annua* L. e medição da altura de plantas no experimento com doses de adubação NPK. UTFPR, 2011. 46
Figura 9 - (a) Produtividade de massa seca de folhas (MSF), (b) massa seca de caule (MSC), (c) massa seca da parte aérea (MSPA) e (d) relação folha/caule (RFC) em plantas de *Artemisia annua* L. submetidas a diferentes níveis de adubação NPK. R^2: coeficiente de determinação; C.V.: coeficiente de variação; *p*: probabilidade do erro; MS: massa seca. UTFPR, 2011.....48
Figura 10 - (a) Teor (TART) e (b) produtividade (PART) de artemisinina em plantas de *Artemisia annua* L. submetidas a diferentes níveis de adubação NPK. C.V.: coeficiente de variação; *p*: probabilidade do erro. UTFPR, 2011. 49
Figura 11 – Isolamento das parcelas (esquerda) e pulverização dos eliciadores (direita) no experimento com aplicação dos eliciadores acibenzolar-S-metílico e proteína. UTFPR, 2011. 57
Figura 12 - (a) Produtividade de massa seca de folhas (MSF), (b) massa seca de caule (MSC), (c) massa seca da parte aérea (MSPA) e (d) relação folha/caule (RFC) de *Artemisia annua* L. eliciada com acibenzolar-S-metílico e harpina. C.V.: coeficiente de variação; *p*: probabilidade do erro. UTFPR, 2011.....59
Figura 13 - (a) Teor (TART) e (b) produtividade (PART) de artemisinina em *Artemisia annua* L. eliciada com acibenzolar-S-metílico e harpina. C.V.: coeficiente de variação; *p*: probabilidade do erro. UTFPR, 2011.....60
Figura 14 - (a) Teor de óleo essencial (TOLS) e (b) produtividade de óleo essencial (POLS) em plantas de *Artemisia annua* L. submetidas a

diferentes níveis de adubação N, P e K. MSF: massa seca de folhas; R^2: coeficiente de determinação; C.V.: coeficiente de variação; *p*: probabilidade do erro. UTFPR, 2011. 67
Figura 15 – Estruturas químicas das substâncias majoritárias presentes no óleo essencial de *Artemisia annua* L. submetida a níveis de adubação NPK. UTFPR, 2011. 68
Figura 16 - (a) Teor de óleo essencial (TOLS) e (b) produtividade de óleo essencial (POLS) de *Artemisia annua* L. eliciada com acibenzolar-S-metílico e harpina. MSF: massa seca de folhas; C.V.: coeficiente de variação; *p*: probabilidade do erro. UTFPR, 2011. 79
Figura 17 – Estruturas químicas das substâncias majoritárias presentes no óleo essencial de *Artemisia annua* L. eliciada com proteína harpina e acibenzolar-S-metílico. UTFPR, 2011. 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características químicas do solo antes da implantação do experimento. UTFPR, 2011. 45
Tabela 2 - Descrição detalhada dos tratamentos com os níveis de adubação utilizados. UTFPR, 2011. 45
Tabela 3 - Descrição detalhada dos tratamentos utilizados, moléculas, doses, produto comercial e aplicações. UTFPR, 2011. 56
Tabela 4 - Características químicas do solo antes da implantação do experimento. UTFPR, 2011. 56
Tabela 5 - Características químicas do solo antes da implantação do experimento. UTFPR, 2011. 65
Tabela 6 - Descrição detalhada dos tratamentos com os níveis de adubação utilizados. UTFPR, 2011. 66
Tabela 7 - Composição química média (%) do óleo essencial de folhas de *Artemisia annua* L. submetida à níveis de adubação NPK. UTFPR, 2011. 69
Tabela 8 - Composição química média (%), equações de regressão, coeficiente de determinação (R^2) e coeficiente de variação (C.V.) para as substâncias, que obtiveram ajuste na análise de regressão, do óleo essencial de plantas de *Artemisia annua* L. submetidas a níveis de adubação NPK. UTFPR, 2011. 70
Tabela 9 - Descrição detalhada dos tratamentos utilizados, moléculas, doses, produto comercial e aplicações. UTFPR, 2011. 77
Tabela 10 - Características químicas do solo antes da implantação do experimento. UTFPR., 2011. 77
Tabela 11 - Composição química média (%) do óleo essencial de folhas de plantas de *Artemisia annua* L. eliciadas com ativadores da defesa química acibenzolar-S-metil e proteína Harpina. UTFPR, 2011. 79

LISTA DE SIGLAS

CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PR	Unidade da Federação – Paraná
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

LISTA DE ABREVIATURAS

ADS	Amorpha-4,11-dieno sintase
ASMQ	Artesunato de sódio + Mefloquina
CG	Cromatógrafo gasoso
DBR2	Aldeído artemisinínico redutase
DIC	Detector de ionização de chama
EM	Espectrômetro de massa
K	Potássio
MSC	Massa seca de caule
MSF	Massa seca de folha
MSPA	Massa seca da parte aérea
N	Nitrogênio
NPK	Nitrogênio, Fósforo e Potássio
NPKS	Nitrogênio, Fósforo, Potássio e Enxofre
P	Fósforo
PART	Produtividade de artemisinina
PIB	Produto interno bruto
POLS	Produtividade de óleo essencial
RFC	Razão folha/caule
S	Enxofre
t	Tonelada
TART	Teor de artemisinina
TCA	Terapia Combinada com Artemisinina
TOLS	Teor de óleo essencial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18

2 REVISÃO DE LITERATURA 20

2.1 MALÁRIA 20

2.2 MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE ARTEMISININA 27

2.3 A PLANTA DE *Artemisia annua* L. 28

2.4 RESPOSTAS DE *A. annua* À ADUBAÇÃO 30

2.5 RESPOSTAS DE *A. annua* À ELICIAÇÃO 33

2.6 ÓLEO ESSENCIAL de *A. annua* 35

3 CAPÍTULO I - PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ARTEMISININA NA VARIEDADE ARTEMIS DE *Artemisia annua* L. SUBMETIDA A NÍVEIS DE ADUBAÇÃO NPK 39

3.1 RESUMO 39

3.2 ABSTRACT 40

3.3 INTRODUÇÃO 40

3.4 MATERIAL E MÉTODO 44

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 47

3.6 CONCLUSÕES 51

4 CAPÍTULO II - PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ARTEMISININA NA VARIEDADE ARTEMIS DE *Artemisia annua* L. ELICIADA COM ACIBENZOLAR-S-METÍLICO E HARPINA 52

4.1 RESUMO 52

4.2 ABSTRACT 52

4.3 INTRODUÇÃO 53

4.4 MATERIAL E MÉTODO 55

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 58

4.6 CONCLUSÕES 60

5 CAPÍTULO III – PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Artemisia annua* L. VARIEDADE ARTEMIS SUBMETIDA A NÍVEIS DE ADUBAÇÃO NPK 61

5.1 RESUMO 61

5.2 ABSTRACT 62

5.3 INTRODUÇÃO 62

5.4 MATERIAL E MÉTODO 65

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 67

5.6 CONCLUSÕES 71

6 CAPÍTULO IV – PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Artemisia annua* L. VARIEDADE ARTEMIS ELICIADA COM ACIBENZOLAR-S-METÍLICO E PROTEÍNA HARPINA 72
6.1 RESUMO 72
6.2 ABSTRACT 72
6.3 INTRODUÇÃO 73
6.4 MATERIAL E MÉTODO 76
6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 78
6.6 CONCLUSÕES 82
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS 83
REFERÊNCIAS 84

1 INTRODUÇÃO

A malária é a doença parasitária humana mais grave, sendo um grande problema de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento, comoa África, onde essa situação se encontra mais generalizada. O Brasil possuí o maior número de casos nas Américas, concentrando-se as vítimas na região Amazônica. A malária é causada pelo *Plasmodium*, um parasita transmitido pela fêmea do mosquito *Anopheles*.

Os parasitas têm desenvolvido resistência às moléculas antimaláricas, especialmente o *Plasmodium falciparum*, causador da malária grave. Atualmente a artemisinina é a molécula mais eficiente no tratamento da malária e tem grande importância a nível mundial. Até o momento, a única fonte viável de obtenção desta molécula é a planta *Artemisia annua* L., através do cultivo em campo e extração da molécula, produzida e armazenada especialmente nas folhas.

A. annua é uma planta herbácea, anual, planta de dias curtos obrigatória, da família Asteraceae, e seu centro de origem é a China. Altamente aromática, também produz grande quantidade de óleo essencial que pode ser utilizado para várias finalidades. Esta espécie também apresenta outros potenciais de uso, devido a grande quantidade de moléculas que produz, sendo um dos seus usos no tratamento do câncer.

Um medicamento para malária com base em artemisinina TCA (terapia combinada com artemisinina), chamado ASMQ, foi desenvolvido no Brasil pela FIOCRUZ, criando demanda interna para produção da molécula, sem contar a grande demanda internacional existente, com tendência de aumento nos próximos anos.

Existe grande variabilidade nas respostas de *A. annua* para adubação e eliciação biótica e abiótica, quanto a produção de artemisinina e óleo essencial e sua composição, devido às respostas para cada local e condição de avaliação, mas também pelas diferenças entre variedades - melhoradas e selvagens, bem como ao local de origem dos indivíduos avaliados. Há carência de informações de como proceder o manejo desta espécie, especialmente se comparada a outras espécies de interesse econômico.

Há grande necessidade de avaliar a resposta de *A. annua* em diferentes condições de ambiente, e para isso, este trabalho tem como objetivo determinar a influência de eliciadores e de níveis de adubação NPK na produção de biomassa, artemisinina e composição do óleo essencial na variedade Artemis de *A. annua*, produzida em campo, contribuindo na geração de tecnologias de cultivo dessa espécie na região de Pato Branco-PR.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MALÁRIA

A malária é a mais grave doença parasitária humana (MUELLER et al., 2000; SILVA, 2005; WHO, 2005; 2011; 2012). É de longe a doença tropical e parasitária que mais causa problemas sociais e econômicos no mundo e só é superada em número de mortes pela AIDS (WHO, 2011). Devido aos efeitos debilitantes e ampla incidência, a malária é a doença que mais contribui para o empobrecimento do homem em regiões com grande incidência, reduzindo sua capacidade produtiva, condições de vida e prejudicando o nível de saúde e o desenvolvimento socioeconômico da população (SILVA, 2005). Os habitantes dos países mais pobres são os mais vulneráveis à doença (WHO, 2011; 2012).

Cerca de 3,3 bilhões de pessoas – aproximadamente metade da população mundial - está sob risco de contrair a doença, particularmente em países de baixa renda. A Ásia e a América Latina também são afetados em menor grau, assim como o Oriente Médio e partes da Europa (figura 1) (WHO, 2011; 2012).

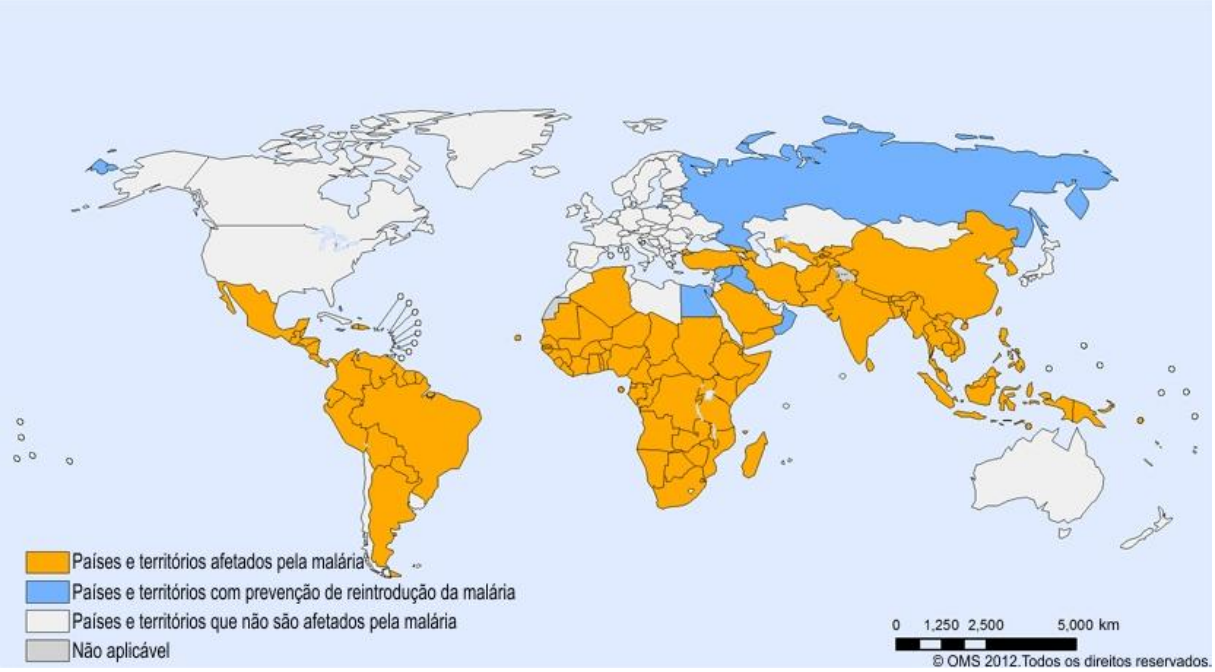

Figura 1 – Distribuição da malária no mundo, países e territórios afetados, dados de 2010. Adaptado de WHO (2012b).

No entanto, a maioria dos casos (figura 2) com mortes (figura 3) por malária ocorre na África subsaariana. Em 2010, noventa e nove países e territórios tiveram a transmissão da malária em curso (figura 2). Viajantes não imunizados provenientes de zonas livres de malária são muito vulneráveis à doença quando infectados (WHO, 2011; 2012).

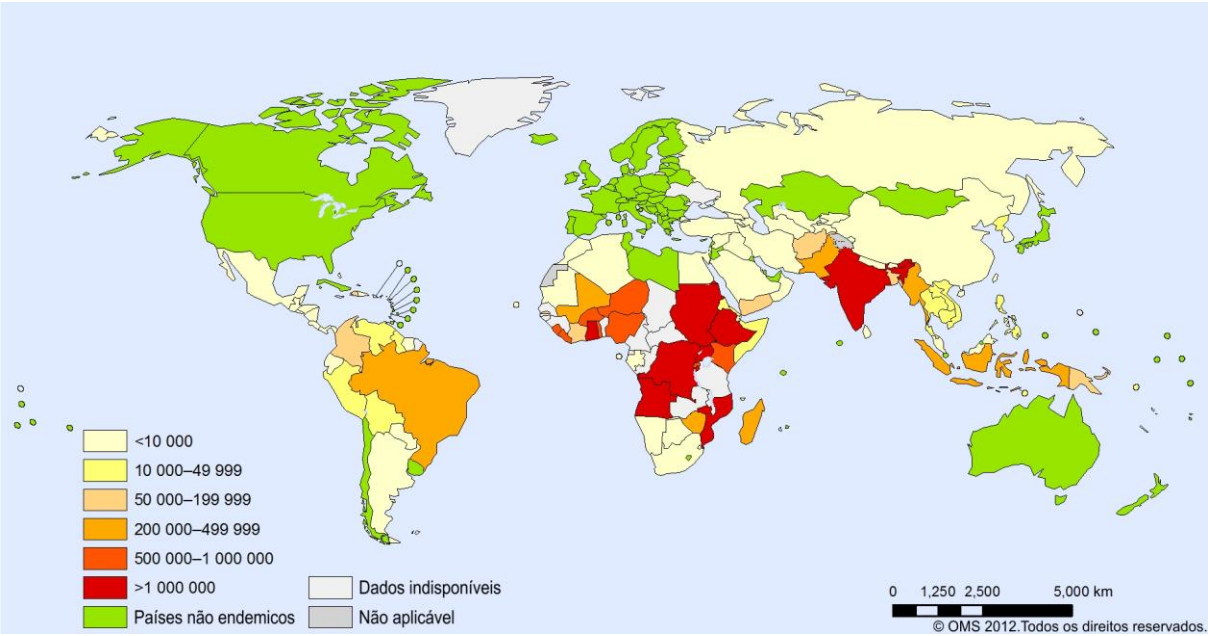

Figura 2 – Distribuição do número de casos de malária relatados e confirmados em países e territórios, dados de 2010. Adaptado de WHO (2012b).

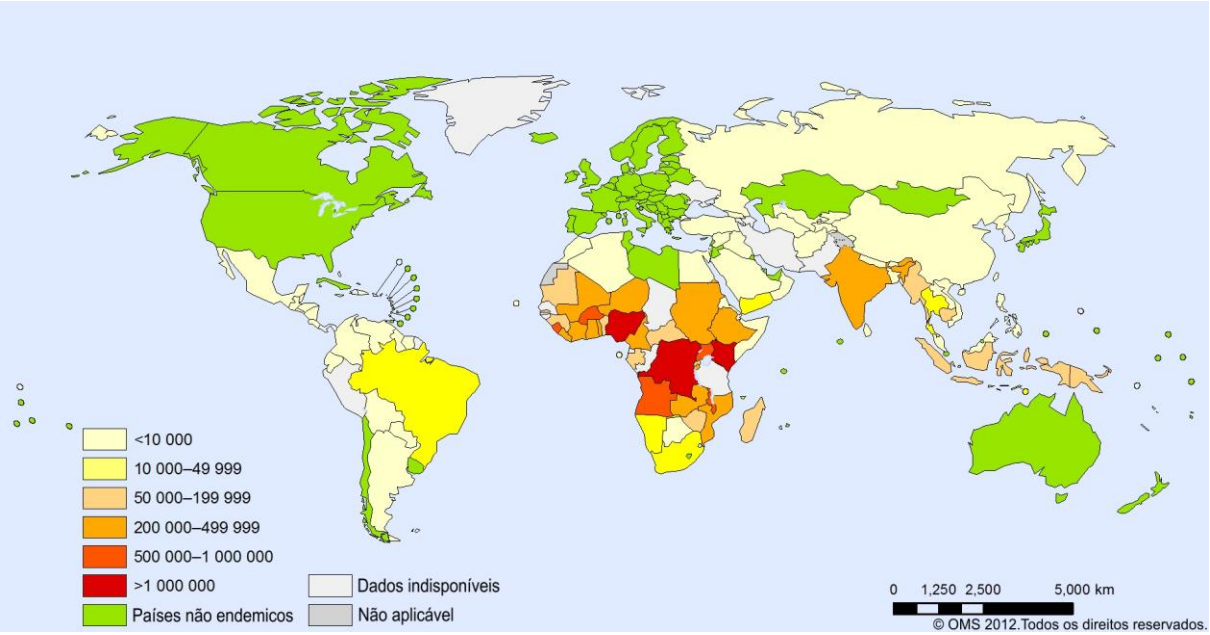

Figura 3 – Distribuição do número de casos de mortes por malária relatados em países e territórios, dados de 2010. Adaptado de WHO (2012b).

Segundo o relatório mundial sobre malária publicado em 2011 - World malaria report 2011 - houve cerca de 216 milhões de casos de malária (com um intervalo de incerteza de 149 a 274 milhões). Em 2010, a malária causou um número estimado de 655 mil mortes (com um intervalo de incerteza de 537 – 907 mil), ocorrendo essas, principalmente entre crianças africanas, onde uma criança morre de malária a cada minuto (WHO, 2011; 2012). Aproximadamente 86% das mortes por malária a nível mundial foram de crianças menores de 5 anos de idade. Em 2010, 90% das mortes por malária ocorreram na Região Africana (figura 3), principalmente entre crianças menores de cinco anos de idade.

Todavia, a malária é uma doença que tem prevenção e cura. O aumento da prevenção da malária associado a medidas de controle estão reduzindo drasticamente o ônus da doença em muitos lugares. O diagnóstico precoce e o tratamento da malária reduzem a gravidade e as complicações da doença e evitam mortes, bem como, contribuem para reduzir a transmissão da malária (WHO, 2012). Segundo a OMS o acesso a testes de diagnóstico e ao tratamento deve ser visto não apenas como um componente de controle da malária, mas como um direito fundamental de toda população em risco (WHO, 2012).

Em nível global, desde 2000, a incidência estimada da malária foi reduzida em 17% e as taxas específicas de mortalidade por malária reduziram em 26% (WHO, 2011). Em regiões da África assistidas pela OMS as taxas caíram 33% (WHO, 2011; 2012). Reduções em casos de malária de mais de 50% foram registrados entre 2000 e 2010 em 43 dos 99 países com transmissão contínua, enquanto uma tendência decrescente de 25-50% foram observadas em outros 8 países. Estas taxas de declínio são inferiores as metas propostas internacionalmente para 2010 (redução de 50%), mas mesmo assim elas representam uma grande conquista (WHO, 2011).

Na região das Américas, a principal conquista é o fato de a malária estar em declínio na maioria dos países, sendo 23 países com malária endêmica. Em 2010, ocorreu a transmissão de malária em 21 dos 23 com malária endêmica tiveram cerca de 20% da população total com algum grau de risco de contaminação. Cerca de 675.000 casos confirmados foram notificados através da vigilância de rotina em 19 países. A malária causada por *P. vivax* correspondeu a 70% dos casos notificados. Entre 2000 e 2009, o número total de casos confirmados e relatados por todos os países caíram 43%, sendo a maioria dos casos relatados pelo Brasil e pela Colômbia (geralmente 50-60%, só no Brasil).

O Brasil ocupa a incomoda posição de líder em casos de malária nas Américas (WHO, 2005; 2011). No Brasil, 49 milhões de pessoas vivem em áreas de risco (PORTAL DA SAÚDE, 2012), dos casos da doença no país 99% ocorrem na Amazônia Legal, sendo a região endêmica da malária (figura 4) (WHO, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; PORTAL DA SAÚDE, 2012). A espécie *P. vivax* é causadora de quase 90% dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). O número de casos de malária de 2000 para 2010 reduziu em quase 50%, ficando em aproximadamente 334.000 casos (WHO, 2011; PORTAL DA SAÚDE, 2012), porém, o quadro epidemiológico atual da malária no Brasil ainda é preocupante (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). No entanto, em 2011 houve redução de 21% no número total de casos de malária em relação a 2010, reduzindo para 263.323 casos, na Amazônia Legal, nesse mesmo período o número de casos de malária grave (causados por *P. falciparum*) também reduziu em 31,8%, seguindo o histórico de redução nos últimos anos (PORTAL DA SAÚDE, 2012).

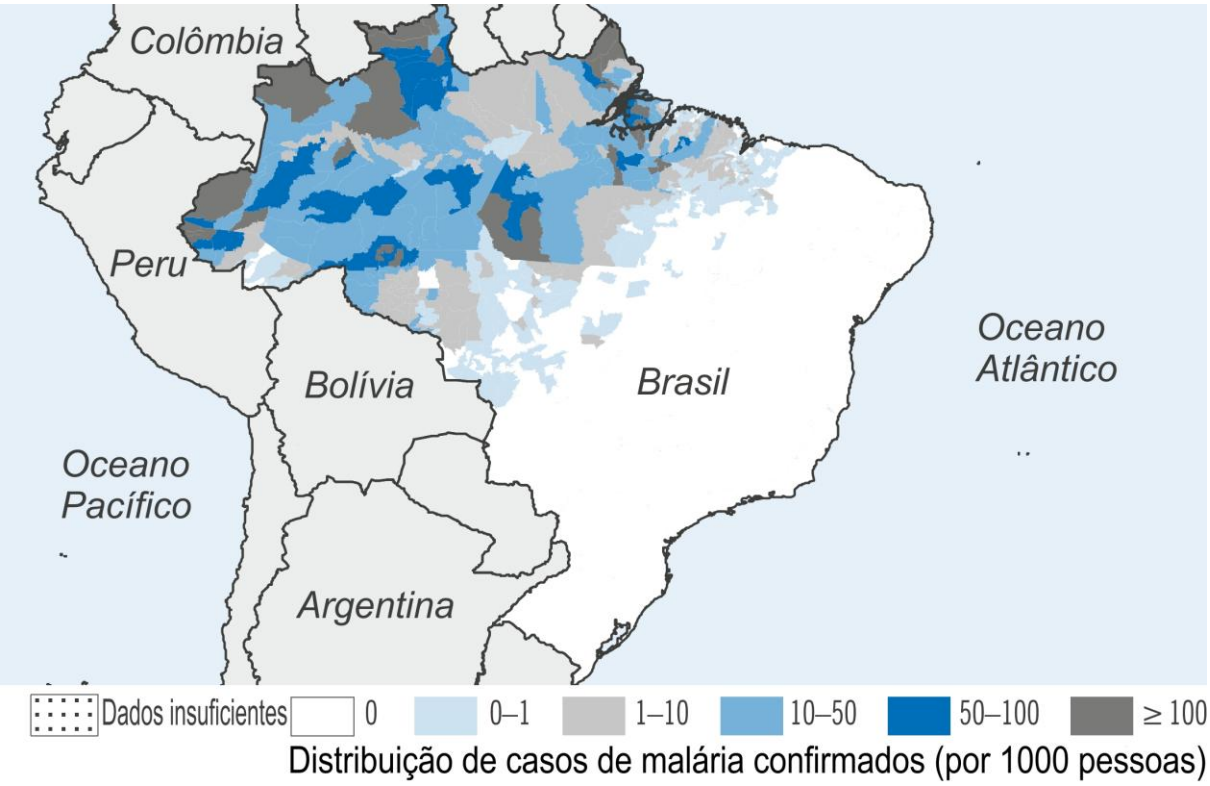

Figura 4 – Mapa do Brasil destacando as áreas de risco para malária por distribuição de diferentes níveis de incidência parasitária anual, dados de 2010. Adaptado de WHO (2011).

A malária é causada por protozoários parasitas do gênero *Plasmodium* e o vetor de transmissão são exclusivamente mosquitos infectados do gênero *Anopheles* (WHO, 2011, 2012), chamados de “vetores da malária” que picam as

pessoas principalmente entre o anoitecer e o amanhecer. Existem quatro tipos de malária humana: *P. falciparum*; *P. vivax*; *P. malariae*; *P. ovale*. As formas de malária causadas pelos protozoários *P. falciparum* e *P. vivax* são as mais comuns e *P. falciparum* é a forma mais mortal, também chamada de malária grave. Nos últimos anos, alguns dos casos de malária humana também têm ocorrido com a espécie *P. knowlesi* - espécie que causa a malária entre os macacos e ocorre em certas áreas de floresta do Sudeste da Ásia (WHO, 2011; 2012).

Com o aumento da resistência dos parasitas, há necessidade de alternativas seguras para os antimaláricos que estão perdendo eficácia (WHO, 2005; 2011; 2012). Atualmente, a melhor forma de tratamento da malária grave, causada pelo *P. falciparum*, é a utilização dos derivados da artemisinina (figura 5), uma molécula extraída da planta *Artemisia annua* L., com comprovada eficácia no controle das cepas de *P. falciparum* resistentes às múltiplas drogas, além de apresentar pouco ou nenhum efeito colateral (KLAYMAN, 1985; WHO, 2005; 2011; 2012; ENSERINK, 2005; GRAHAM et al., 2010; MILHOUS; WEINA, 2010; JHA et al., 2011; YU et al., 2011).

A Terapia Combinada em Dose Fixa à base de Artemisinina (TCA) é o tratamento mais efetivo contra a malária causada pelo *P. falciparum*, porém é de 10 a 20 vezes mais caro que a terapia com cloroquina. A demanda por TCA aumentou rapidamente a partir do apoio financeiro aos países atingidos pela enfermidade (ENSERINK, 2005; WHO, 2005; 2011). Até o final de 2010, as TCAs foram adotadas como política nacional de tratamento de primeira linha em 84 países, dente eles o Brasil (WHO, 2011). A demanda por TCA vem aumentando, sendo o aumento de 125% de 2010 para 2012, com previsão de mais aumento nos próximos anos. Os últimos dados sobre a demanda de artemisinina para 2012 estimam 185 toneladas - incluindo 30 t para estoques que foram usados em anos anteriores - a estimativa de produção mundial suprirá a demanda para 2012, no entanto, não será o suficiente para repor as reservas de artemisinina reduzidas nos anos anteriores (A2S2, 2012).

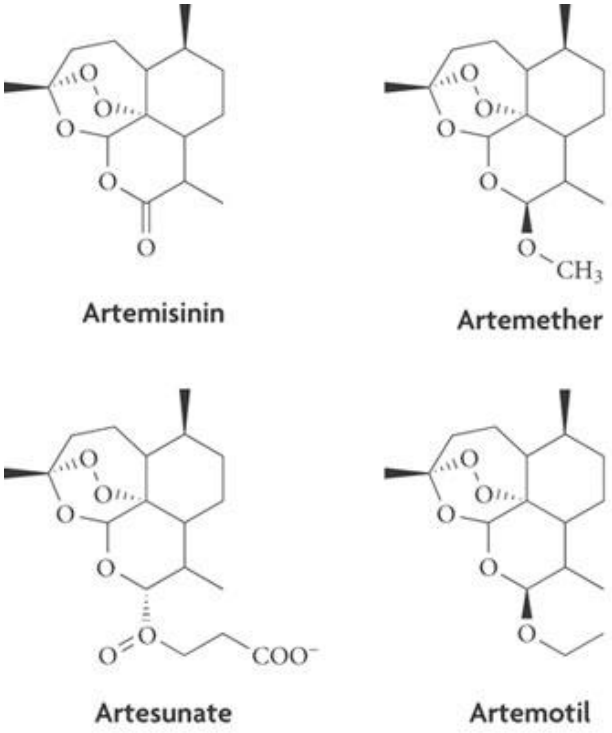

Figura 5 – Artemisinina é a substância produzida pela planta *Artemisia annua* L. Os derivados arthemether e artesunato tem melhor biodisponibilidade do que a artemisinina e são usados clinicamente em terapia combinada com artemisinina. Artemotil (também conhecido como arteether) é pouco usado. Adaptado de DONDORP et al. (2010).

Os preços de artemisinina variaram dramaticamente na última década, devido à instabilidade de produção (figura 6) (A2S2, 2012; EISENSTEIN, 2012). Segundo A2S2 (2012), em dados apresentados na conferência RBM/UNITAID/WHO Artemisinin Conference 2011: “Aligning Artemisinin and ACT Supplies” de novembro de 2011 sobre o mercado da artemisinina, os preços de artemisinina na China em 2010 estavam entre $ 307–660 por kg, em 2011: $ 557–1170 por kg. Já o preço da tonelada de folhas em 2010: $ 800-850 e em 2011: 900-1000 por tonelada, dependendo do conteúdo de artemisinina (0,45 – 0,7%). Em dólares americanos o preço atual é de cerca de US$ 450/kg e continua aumentando (EISENSTEIN, 2012).

A volatilidade da produção de artemisinina em função das variações mundiais de produção agrícola de *Artemisia annua* L., cria instabilidade no preço da artemisinina e TCAs, prejudicando em algumas situações, a disponibilidade dos medicamentos. Com o intuito de combater essa volatilidade, Ter Nguyen, vice-presidente de pesquisa e desenvolvimento pré-clínico da OneWorld Health, uma

organização sem fins lucrativos em São Francisco do Sul, Califórnia-EUA, está liderando esforços em parceria com a Amyris - uma empresa de biologia sintética em Emeryville, Califórnia-EUA - e a gigante farmacêutica francesa Sanofi, para produzir grandes quantidades de ácido artemisinínico, um precursor da artemisinina, utilizando levedura geneticamente modificada. Em 2012, Nguyen prevê a produção de 9.000 kg de artemisinina a um preço inicial de US$ 400 por kg; em 2013 pretendem quadruplicar a produção. Estabilizando a oferta de artemisinina, o que deverá ajudar a reduzir a volatilidade do custo das TCAs e suavizar a disponibilidade de medicamentos baseados em artemisinina (EISENSTEIN, 2012).

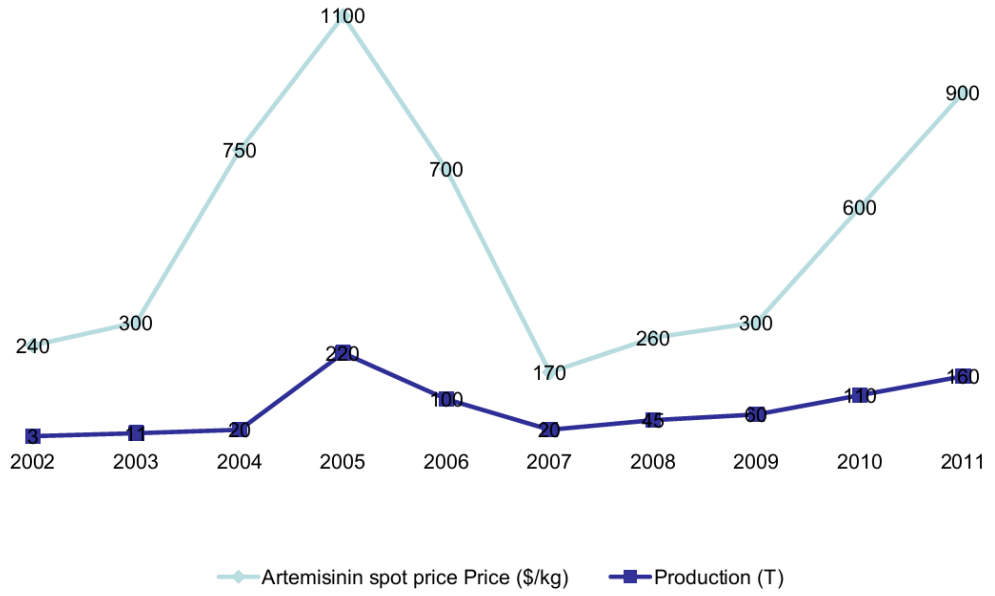

Figura 6 – Relação entre o preço e produção mundial de artemisinina entre os anos de 2002 e 2011. Artemisinin spot price Price ($/kg): preço à vista de artemisinina ($/Kg); Production (T): Produção (toneladas). Adaptado de A2S2 (2012).

A resistência dos parasitas à artemisinina havia sido confirmada na fronteira com o Camboja e Tailândia em 2008 e agora está suspeita em partes de Mianmar e do Vietnã. No entanto, as TCAs permanecem altamente eficazes em quase todas as combinações, contanto que a droga combinada na TCA seja localmente eficaz. Nesse sentido, existem inúmeros esforços das organizações mundiais e locais, em diversos países, para proteger as drogas baseadas em artemisinina do desenvolvimento de resistência por parte dos parasitas, como a abolição do uso da monoterapia com artemisinina, e adoção da TCA, e impedir que a resistência dos parasitas em alguns países se espalhe para outros (WHO, 2011).

Em 2008 o Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos/Fiocruz) e a Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi - *Drugs for Neglected Diseases initiative*) lançaram o ASMQ (17/04/2008), uma TCA em dose fixa do artesunato (AS) derivado da semi-síntese a partir da artemisinina e mefloquina (MQ), para o controle da malária, já registrado e disponível no Brasil. Anteriormente, os medicamentos para tratamento da malária eram importados da China. Este novo fármaco simplifica o tratamento de adultos e crianças com uma dose diária de um a dois comprimidos por três dias, garantindo que os dois medicamentos sejam tomados juntos e na proporção correta (PORTAL FIOCRUZ, 2009).

A fabricação do ASMQ no Brasil cria uma demanda interna, no país, para produção de artemisinina. O governo brasileiro também está estimulando a produção nacional de insumos estratégicos no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) e o artesunato - ingrediente do fármaco ASMQ - faz parte da lista de farmoquímicos estratégicos listados na portaria 978, de 16 maio de 2008, do Ministério da Saúde.

Em 2012, medicamentos, fármacos e insumos estratégicos produzidos no país serão priorizados em compras públicas e passam a poder ser adquiridos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) com preços até 25% superiores aos dos demais, variando de acordo com a complexidade tecnológica e a importância para o SUS, como parte do Plano Brasil Maior – programa que colocou a saúde como área estratégica para a produção e inovação no país. Por meio desta ação, o governo federal pretende estimular o desenvolvimento e a produção nacional de medicamentos, fármacos, insumos e, até o final do primeiro semestre de 2012, de equipamentos e dispositivos médicos (BLOG SAÚDE, 2012).

2.2 MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE ARTEMISININA

Devido a grande variedade de métodos e diferenças entre métodos de determinação de artemisinina nos tecidos vegetais, serão expostos alguns dos métodos mais usados entre os trabalhos encontrados.

Dentre os métodos, a determinação dos teores de artemisinina pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a mais adequada para quantificar artemisinina, quando comparada com a técnica de cromatografia em

camada delgada com densitometria (CCD-DT), segundo Marchese et al. (2001), que comparando os dois métodos, observaram que a técnica de CCD-DT superestima o teor de artemisinina e concluíram que este método não apresenta grau adequado de seletividade e sensibilidade para análises quantitativas de artemisinina. Todavia, das técnicas utilizadas para determinação da artemisinina, CCD-DT possui a vantagem de ser simples, rápida e barata, objetivando avaliação rápida e grandes quantidades de amostras de plantas com alto teor de artemisinina (KOOBKOKKRUAD et al., 2007), mas é considerada semiquantitativa (FOGLIO, 1996), por não possuir exatidão como outras técnicas, podendo superestimar em até 30% (MARCHESE et al., 2001) ou subestimar em até 20% (DELABAYS et al. 1994) os valores, quando comparada com técnicas de análise mais precisas e exatas como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção no Ultravioleta (CLAE-UV) (MARCHESE et al., 2001), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Eletroquímico (CLAE-EQ) (DELABAYS et al. 1994) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Índice de refração (CLAE-IR) (REHDER et al., 2002). Também é possível quantificar artemisinina por cromatografia gasosa (CG) (FOGLIO, 1996).

2.3 A PLANTA DE *Artemisia annua* L.

Artemisia annua L. é uma planta herbácea, anual, altamente aromática, pertencente à família Asteraceae, com hábito de crescimento determinado (MARCHESE, 2006a; MARCHESE et al., 2002), chegando a 3 metros de altura (MARCHESE, 2006a). O extrato aquoso da planta apresenta efeito alelopático em algumas espécies cultivadas e em plantas daninhas (MAGIERO et al., 2009; MORVILLO et al., 2011). Alguns sesquiterpenos produzidos pela planta, como a artemisinina, causam forte inibição do crescimento de várias espécies (BAGCHI et al., 1997) e tem acentuada ação inseticida (JAIN et al., 1996; BAGCHI et al., 2003). *A. annua* possui grande capacidade de produção de óleo essencial (QUITÉRIO, 2006), que apresenta forte efeito antimicrobiano, sendo seu máximo acúmulo no início da floração (GALAMBOSI, 1980; MAGALHÃES et al., 2004; CAVAR et al., 2011). O óleo essencial da espécie também é utilizado comercialmente na perfumaria, na cosmética e em produtos sanitários (GALAMBOSI, 1980; JAIN et al., 1996; MAGALHÃES et al., 2004). *A. annua* reproduz-se naturalmente por

fecundação cruzada e multiplica-se por sementes, além de propagar-se vegetativamente com facilidade (MAGALHÃES, 1996).

A *A. annua* é a principal fonte de artemisinina (JAIN et al., 1996; WHO, 2011; JAMALEDDINE et al., 2011; NGUYEN et al., 2011; JHA et al., 2011). A síntese química da artemisinina é complexa, envolvendo inúmeras etapas e apresentando baixos rendimentos (GELDRE et al., 1997). Os altos custos da síntese da molécula tornam o isolamento a partir da planta de *A. annua* a melhor forma para obtenção da droga (FERREIRA; JANICK, 1996; GELDRE et al., 1997; DELABAYS et al., 2001). Os maiores fornecedores mundiais são a China e o Vietnã (ENSERINK, 2005).

A *A. annua* ocorre naturalmente como parte da vegetação das planícies ao norte das províncias de Chadar e Suiyuan (40º N e 109º E), região de clima temperado na China, entre 1000 e 1500 metros de altitude (GALAMBOSI, 1980; GELDRE et al., 1997; BAGCHI et al., 1997; FERREIRA et al., 2005).

A distribuição da artemisinina na planta encontra-se principalmente na parte aérea, folhas e inflorescências, onde apresenta as maiores concentrações, com baixas concentrações nos caules e nenhuma artemisinina nas raízes e no pólen. O conteúdo da molécula é de 4 a 11 vezes maior nas inflorescências que nas folhas (FERREIRA; JANICK, 1996). Em pré-floração, Charles et al. (1990) encontraram 88,9% da artemisinina total da planta nas folhas, estando os 11,1% restantes presentes nas gemas florais. Há controvérsias na literatura, sobre qual o estádio fenológico da planta em que ocorre maior acúmulo de artemisinina. Alguns autores afirmam que o maior acúmulo da molécula ocorre na fase de pré-floração (ACTON et al., 1985), enquanto outros reportam que o pico ocorre durante a floração (FERREIRA, 1994; LAUGHLIN, 1995; FERREIRA; JANICK, 1996, MARCHESE, 2006a).

A. annua é uma Planta de Dias Curtos (PDC) qualitativa ou absoluta, e tem seu florescimento acelerado com baixas temperaturas (MARCHESE et al., 2002; MARCHESE, 2006a). Genótipos de *A. annua* testados no Sul do Brasil (Pato Branco-PR) apresentaram um fotoperíodo crítico de aproximadamente 13 horas (MARCHESE & FIGUEIRA, 2005; MARCHESE, 2006a; MAGIERO, 2009).

Até o presente momento, o cultivo da *A. annua* no Brasil , vem sendo realizado de forma experimental, pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná e pelas Universidades Estadual de Campinas (MARCHESE, 2006a) e está sendo

avaliada para cultivo em várzeas na Amazônia pela EMBRAPA Amazônia ocidental (FONTES et al. 2009).

Devido à importância da planta como única fonte de artemisinina economicamente viável, em muitos países com ocorrência de casos de malária, existem esforços na introdução e aclimatação de *A. annua* (MUELLER et al., 2000), para a produção de fitofármacos ou uso como fitoterápico, podendo ser usada também para produção de óleo essencial. A despeito dos estudos existentes sobre a ecofisiologia da *A. annua* no Brasil e sobre fatores do ambiente afetando a produção de biomassa e de artemisinina (MAGALHÃES et al., 1997; MARCHESE, 1999; MARCHESE; REHDER, 2001; MARCHESE et al., 2002; MARCHESE, 2006a, MARCHESE, 2006b; MARCHESE et al., 2010), pouca informação é encontrada na literatura, se compararmos com outras espécies cultivadas.

Os estudos sobre as plantas devem ser realizados localmente, testando a resposta da planta as condições intrínsecas do local (FERREIRA et al., 2005), pois as condições ambientais são muito variáveis e as plantas respondem de forma diferente (MARCHESE; FIGUEIRA, 2005). Como observado por Marchese (2006a) que comparou a produção em Pato Branco-PR e Campinas-SP, para a variedade 2/39x1V de *A. annua,* encontrando rendimentos superiores de massa de folhas secas e artemisinina em Pato Branco, com acréscimos de 48,1% e 42,1%, respectivamente, para essas variáveis, sobre os resultados obtidos em Campinas. As condições ambientais que afetam *A. annua* podem ser fatores bióticos (NGUYEN et al., 2011; MA et al., 2009; KAPOOR et al., 2007) e abióticos (MARCHESE et al. 2010). Também é diretamente influenciada pela fertilidade do solo (MAGALHÃES, 1996; FERREIRA, 2007; KAPOOR et al., 2007; OZGUVEN et al., 2008; AHMAD MALIK et al., 2009; DAVIES et al., 2009; DAVIES et al., 2011; JHA et al., 2011).

2.4 RESPOSTAS DE *A. annua* À ADUBAÇÃO

Assim como *A. annua* responde as condições climáticas, também é diretamente influenciada pela fertilidade do solo (MAGALHÃES, 1996; FERREIRA, 2007; KAPOOR et al., 2007; OZGUVEN et al., 2008; AHMAD MALIK et al., 2009; DAVIES et al., 2009; DAVIES et al., 2011; JHA et al., 2011). Portanto, os estudos sobre adubação são essenciais para otimizar os rendimentos da cultura, elevando a produtividade e o lucro. Magalhães (1996) estudou a influência de doses de

nitrogênio (N), (0, 32, 64 e 97 kg ha^{-1}), na formulação Uréia, em uma variedade (parentais de origem vietnamita e chinesa) de *A. annua,* originada por semente e cultivado à campo em Madagascar, na África. Com a maior dose de N se obtiveram os maiores resultados de biomassa e rendimento de artemisinina, com rendimento de massa seca de folhas de 4,69 ± 0,83 Mg ha^{-1}; teor de artemisinina 0,87% ± 0,03 e rendimento de artemisinina de 41,3 ± 8,4 kg ha^{-1}. No entanto, o resultado mais interessante foi obtido com o tratamento 64 kg ha^{-1} de N, onde obteve-se produção de massa seca de folhas de 3,88 ± 0,42 Mg ha^{-1}, teor de artemisinina 1,02% ± 0,11 e rendimento de artemisinina de 40,4 ± 8,1 kg ha^{-1}, com redução de apenas 0,9 kg ha^{-1} de artemisinia (-2,18%) do maior resultado, com apenas 65,9% da adubação de N deste. No tratamento sem aplicação de N, o teor de artemisinina foi o mais elevado, 1,11 ± 0,08 kg ha^{-1}, mas ainda assim, o rendimento artemisinina (26,7 ± 2,8 kg ha^{-1}) ficou abaixo da menor dose de N, 32 kg ha^{-1}, com rendimento 29,9 ± 1,8 kg ha^{-1}. O material ficou 176 dias no campo com densidade de 28.400 plantas por hectare (espaçamento de 50 x 70 cm).

Ferreira (2007) relatou que em solos ácidos a produção de biomassa de *A. annua* é mais sensível a falta de calagem, N, P e K; sendo que a falta de K resultou em aumento do teor de artemisinina (g/100 g). Comparando com o melhor tratamento (+N, +P, +K e +Calagem; pH 5,08) a supressão de K (+N, +P, -K e +Calagem; pH 5,06) resultou em decréscimo de 30,5% da produção de biomassa da parte aérea; supressão de P (+N, -P, +K e +Calagem; pH 5,06) resultou em decréscimo de 48,1%; supressão de N (-N, +P, +K e +Calagem; pH 4,91) resultou em decréscimo de 80%; supressão de Calagem (+N, +P, +K e -Calagem; pH 4,2) resultou em decréscimo de 81,5% e o solo não tratado (-N, -P, -K e -Calagem; pH 4,1) resultou em decréscimo de 91,2%. Para artemisinina, a deficiência de potássio (-K) resultou em aumento significativo de 75% (1.62 contra 0.93%) no teor (g/100 g), comparado ao tratamento completo (+N, +P, +K e +Calagem; pH 5,08). No entanto, a produção por planta (g por planta) não foi significativamente maior (+21%). Contudo, menores adubações de K demonstram um potencial para manejo de produção de *A. annua* com e incremento no teor e produção de artemisinina.

Magalhães et al. (1997; 1999), trabalhando com variedades de *A. annua* cultivadas em Campinas-SP, utilizaram adubação de cobertura de 90 kg ha^{-1} de nitrogênio na formulação de sulfato de amônio, 20 dias após o transplante das mudas ao campo. Nesses experimentos, plantas da variedade 2/39x1V de *A. annua* (de melhor desempenho nos experimentos) permaneceram no campo por 162 e 223

dias e obtiveram rendimentos médios de massa seca de folhas de 2,056 e 2,923 Mg ha^{-1} e produtividades médias de artemisinina de 21,38 e 25,43 kg ha^{-1}, respectivamente. As diferenças de rendimento de artemisinina por hectare não foram maiores porque o teor variou de 1,04% para 0,87% entre os experimentos que ficaram no campo 162 e 223 dias, respectivamente. É possível observar nestes experimentos como a diferença no número de dias de cultivo (13/mar até 06/dez e 14/jun até 07/jan) num mesmo local (Campinas-SP) e mesmo ano (1996) pode gerar grande aumento no rendimento de massa seca de folhas para *A. annua* e consequentemente aumento no rendimento de artemisinina. O teor de artemisinina (ART) nas folhas também foi analisado pelo método de CCD-DT. Marchese (2006a) estudando várias épocas de semeadura em Pato Branco-PR, obteve tempos de cultivo a campo bem variados e observou aumento do teor de artemisinina nas folhas de plantas cultivas a campo conforme o aumento do número de dias de cultivo a campo dentro de um intervalo de dias de cultivo (41 a 111 dias): 31 (0,50% ART); 28 (0,55% ART); 41 dias (0,53% ART) não diferiram entre si; < 63 dias (0,81% ART); < 111 dias (1,05% ART) que não diferiu de 165 dias (0,99% ART). As determinações de ART por Marchese (2006a) foram feitas pelo método CLAE-UV.

No trabalho de Magalhães (1996) e Davies et al. (2009) houve relação inversa não proporcional entre maiores rendimentos de massa seca de folhas e teor de artemisinina nas folhas de plantas de *A. annua,* com aumento dos níveis de N. Desta forma, essa redução no teor não impediu que os rendimentos por hectare da molécula aumentassem, de forma que, com maiores rendimentos de massa seca de folhas ocorreram acréscimos de até 54% no rendimento de artemisinina por hectare, se comparado com a testemunha que não recebeu adubação nitrogenada, mas com maior teor da molécula. Davies et al. (2009) encontraram equilíbrio no rendimento de artemisinina nas doses intermediárias.

Ozguven et al. (2008) avaliou componentes de rendimento, rendimento e conteúdo de artemisinina em uma variedade selvagem de *A. annua* cultivada na Turquia e tratada com quatro aplicações de nitrogênio (0, 40, 80 e 120 kg ha^{-1}). Contraditoriamente, não encontrou diferenças estatísticas para as características investigadas, exceto o teor de artemisinina nas folhas secas, que aumentou linearmente com a elevação das doses de N no primeiro ano de estudo (6,32 para 22,35 mg 100 g^{-1}) e resposta quadrática no segundo ano de estudo com menor teor de artemisinina para 0 kg de N ha^{-1} (7,53 mg 100 g^{-1}); maior teor com adubação 80 kg de N ha^{-1} (27,50 mg 100 g^{-1}) e 17,28 mg 100 g^{-1} de artemisinina para 120 kg de N

ha^{-1}. Kapoor et al. (2007) e Jha et al. (2011) também observaram aumento nos teores de artemisina nas plantas tratadas com adubação.

Kapoor et al. (2007) encontrou expressivo aumento de biomassa da parte aérea de plantas de *A. annua*, em relação a testemunha, adubando com P (110,5%), com inoculação das plantas com fungo *Glomus fasciculatum* (micorriza arbuscular) (189,5%) e a combinação da inoculação e adubação fosfatada (510,5%) proporcionou os maiores resultados.

Jha et al. (2011) testando o uso de adubação orgânica, adubação química com NPK e NPKS, na Índia, avaliando em diferentes estádios de desenvolvimento, encontrou aumentos significativos no rendimento de biomassa e artemisinina, obtendo os maiores resultados para estas avaliações com a adubação química NPKS e colheita na emissão dos botões florais, observando ainda expressivo ganho na adubação com S, todavia o solo onde foram cultivadas as plantas era pobre em S. Ahmad Malik et al. (2009) também observou incrementos no rendimento de biomassa e óleo essencial com adubação NPKS.

2.5 RESPOSTAS DE *A. annua* À ELICIAÇÃO

Existem muitas substâncias chamadas indutores de resistência ou eliciadores, que agem estimulando a produção de substâncias do metabolismo secundário vegetal e síntese de proteínas relacionadas à patogênese, responsáveis pela defesa dos vegetais, tanto para patógenos quanto insetos. Entre estas são relacionadas como eliciadores a proteína harpina e o acibenzolar-S-metílico (DURRANT; DONG, 2004).

Buscando alternativas para aumentar o rendimento de biomassa foliar e artemisinina em *A. annua*, MARCHESE (2006b) verificou em experimentos preliminares o aumento da taxa fotossintética em plantas de *A. annua* pulverizadas com produtos a base de acibenzolar-S-metílico e harpina, estimuladores da Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) e do crescimento vegetal (OOSTENDORP et al., 2001; WEI et al., 1992; EDEN BIOSCIENCE CORPORATION, 2002a e 2002b). A RSA é um fenômeno pelo qual a resistência a doenças infecciosas é sistematicamente induzida por uma infecção localizada ou pelo tratamento com substâncias produzidas por alguns agentes patogênicos, podendo também ser por um grupo diverso de substâncias (DURRANT; DONG, 2004). A SAR requer a

produção da molécula sinalizadora - ácido salicílico (AS) - que está associada com a atividade da enzima fenilalanina amonia-liase e com o acumulo de proteínas relativas à patogênese (DURRANT & DONG, 2004).

Existem substâncias patógeno-relacionadas que são reconhecidamente indutoras do metabolismo secundário, como quitosana (NGUYEN et al., 2011; MA et al., 2009; LEI et al., 2011), que foi constatada como um eliciador da produção de artemisinina (MA et al., 2009). O fitohormônio metil jasmonato mostrou ser um indutor do acumulo de artemisinina (YU et al., 2011; MA et al., 2009). Extrato de oligossacarídeos da parede do micélio de *Colletotrichum* sp. B501 provocou um aumento de 64,29% no teor de artemisinina (WANG et al., 2002). A adição de micorrizas para raízes de plantas envasadas também aumentou os níveis de artemisinina nas folhas (KAPOOR et al., 2007), em alguns trabalhos foi observada uma correlação do aumento do teor de artemisinina com maior número de tricomas glândulares (glândulas capitatas) (GRAHAM et al. 2010; KAPOOR et al., 2007; MARCHESE, 2006b).

WANG et al. (2002) observaram que o extrato de oligossacarídeos da parede do micélio de *Colletotrichum* sp. B501 provocou um aumento de 64,29 % no teor de artemisinina quando aplicado em *A. annua* com relação ao controle não eliciado. Esses resultados sugerem que a artemisinina possa estar envolvida com a defesa química da planta aos estresses bióticos e abióticos. Portanto, uma das possibilidades de aumentar o teor da molécula na biomassa das plantas e consequentemente, o fornecimento de artemisinina, é testar eliciadores ou ativadores da defesa química em *A. annua*.

No estudo conduzido por Lei et al. (2011), testando aplicação de quitosana em plantas de *A. annua*, encontraram aumento de 72% e 53% no conteúdo de ácido dihidroartemisininco e artemisinina, respectivamente, nas folhas tratadas em comparação com controle. Com máximo acúmulo de ácido dihidroartemisininco 24 horas após eliciação e artemisinina às 48 horas após a eliciação. Quitosana induziu a expressão de ADS e DBR2, o que poderia explicar o aumento no nível de metabolitos artemisinínicos. Após o tratamento de quitosana, as quantidades de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e aníon superóxido (O_2^-) em folhas de *A. annua* foram 1,4 e 3,0 vezes, respectivamente, superiores as do controle. O acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) provavelmente acelerou a conversão do ácido dihidroartemisininco para artemisinina. O tratamento não teve qualquer efeito prejudicial para o crescimento *A. annua*.

Kapoor et al. (2007) obtiveram sucesso com adição de micorriza arbuscular nas raízes de plantas envasadas, com aumentos nos níveis de artemisinina nas folhas de até 300% (0,1 para 0,3% da matéria seca de folhas) com o fungo *Glomus fasciculatum*.

2.6 ÓLEO ESSENCIAL DE *A. annua*

Os óleos essenciais, são também conhecidos como óleos voláteis, óleos etéreos e essências (ROBBERS et al., 1997; SIMÕES et al., 2004) e definidos pela ISO (*International Organization for Standardization*) como substâncias extraídas de partes de plantas através de hidrodestilação (SIMÕES et al., 2004).

Os óleos essenciais são compostos por substâncias voláteis, lipofílicas e com odor característico; estruturalmente detêm em sua maioria substâncias terpenóides (ROBBERS et al., 1997; SIMÕES et al., 2004; WAGNER; WISENAUER, 2006), podendo variar sua concentração de acordo com a época do ano, estádio fenológico (OLIVEIRA et al.,1998; MARCHESE; FIGUEIRA, 2005) e local de armazenamento (SIMÕES et al., 2004). As principais funções dos óleos essenciais estão relacionadas com as atividades metabólicas da planta (OLIVEIRA; AKISUE, 2005) como, por exemplo, na atração de polinizadores (morcegos, mariposas, abelhas etc); inibição de predadores (larvas e formigas); ou ainda, como composto alopático, que dentre suas características pode inibir o crescimento de outras plantas ao seu redor (SIMÕES et al., 2004).

Óleos essenciais e seus componentes voláteis são amplamente utilizados para prevenir e tratar doenças humanas. Podem ser usados na prevenção e tratamento de câncer, de doenças cardiovasculares, inclusive arteriosclerose e trombose, podem também ser usados, por sua bioatividade, como antibacteriano, antivirótico, antioxidante e agente antidiabético. Também usados em aromaterapia em massagens, possuem propriedades terapêuticas (EDRIS, 2007).

Como citado anteriormente, *A. annua* possui grande capacidade de produção de óleo essencial (QUITÉRIO, 2006), sendo seu máximo acúmulo no início da floração, podendo chegar de 0,49% (BAGCHI et al., 2003) a 0,53% da matéria fresca (GALAMBOSI, 1980). O óleo apresenta atividade antioxidante, bactericida e antifúngica (JUTEAU et al., 2002; MAGALHÃES et al., 2004; CAVAR et al., 2011). A espécie também é utilizada comercialmente na perfumaria, na cosmética e em

produtos sanitários (GALAMBOSI, 1980; JAIN et al., 1996; MAGALHÃES et al., 2004).

Segundo Biogenic Stimulants (2011), sítio web europeu de vendas on-line, em 15 de dezembro de 2011, o preço para compra do *wormwood oil* estava em US$ 750,00 por kg e US$ 27,33 por 10 ml.

Vários estudos, em diferentes países, têm sido realizados buscando identificar e quantificar os constituintes do óleo essencial de *A. annua*, com diferentes variedades ou acessos da espécie. Perazzo et al. (2003), Quispe-Condori et al., 2005, Mohammadreza (2008), Bolina (2011) e Haider et al. (2004), encontraram cânfora e 1,8 cineol dentre os constituintes majoritários do óleo essencial desta espécie. O óleo essencial de *A. annua* apresenta um potencial produtivo ainda pouco explorado (HAIDER et al., 2004). Os compostos da classe dos terpenos são os principais no óleo essencial de *A. annua* (MA et al., 2007), sendo predominante monoterpenos no óleo essencial das folhas (GOEL et al., 2007; AHMAD MALIK et al., 2009) e sesquiterpenos do caule (GOEL et al., 2007).

Cavar et al. (2011) identificaram mais de 100 compostos, porém cânfora e artemisia cetona foram as principais substâncias presentes no óleo essencial de plantas selvagens de *A. annua* cultivadas na Bósnia.

Estudando a composição química dos óleos essenciais de *A. annua* da cultivar Jwarharti, Goel et al. (2007), identificaram 86, 77 e 63 combinações de substâncias na folha, pétala e óleos de caule, respectivamente. Descobriram grandes diferenças na composição dos óleos essenciais. A cânfora, presente nas folhas, estava ausente do óleo essencial das pétalas e ácido dihidroartemisininico estava ausente no óleo essencial do caule.

Segundo Goel et al. (2007), que estudaram a composição química dos óleos essenciais das partes aéreas (flores, folhas e caules) das variedades de *A. annua,* rica em artemisinina “Jeevanraksha” e variedade pobre em artemisinina Suraksha, de tipo ornamental, noventa e sete compostos compreendendo 91,3% do total de óleo essencial de ”Jeevanraksha“ foram identificados. Quarenta e três monoterpenos (56,6%), 32 sesquiterpenos (31,1%) e 2 diterpenos (0,2%) compunham a maioria do óleo essencial (87,9%). O óleo essencial era desprovido de artemísia cetona e continha cânfora (13,5%), 1,8-cineol (9,4%), trans-sabinol (7,1%), p-menta (7%), 5 dien-2-ol (6,3%), mirceno (4,7%), germacreno D (4,4%), (*E*)-β-farneseno (3,9%), β-cariofileno (3,7%), lactona dihidroartemisinica (3,0%) e p-cimeno (2,0%) como principais constituintes. Oitenta e seis substâncias que

representam 93,3% da composição foram identificados no óleo essencial da variedade Suraksha, que continha artemísia cetona (47%), 1,8-cineol (8,4%), cânfora (5,9%) e α-pineno (5,2%) como os principais componentes. Segundo o autor, muitas substâncias foram detectadas no óleo essencial de *A. annua* pela primeira vez. Consistente com a origem híbrida da variedade ”Jeevanraksha”, seu óleo essencial apresentou características da composição química relatadas anteriormente para óleos essenciais de acessos de *A. annua* vietnamitas e norte-americanos.

Woerdenbag et al. (1993) estudando variedades de *A. annua* de origem chinesa e vietnamita oriundas de sementes, sugeriu a existência de diferentes quimiotipos quando observou que as plantas de origem chinesa continham maior conteúdo de óleo essencial 4,0% (volume/massa seca) e os principais constituintes foram artemisia cetona (63,9%), artemísia álcool (7,5%), mirceno (5,1%), α-guaieno (4,7%) e cânfora (3,3%). Nas plantas de origem vietnamita 1,2% (volume/massa seca) de óleo essencial, e os constituintes principais foram cânfora (21,8%), germacreno D (18,3%), β-cariofileno (5,6%), trans-β-farneseno (3,8%) e 1,8-cineol (3,1%). Diferenças também foram encontradas nos teores de artemisinina em extrato diclorometano do material vegetal herbáceo: 1% de artemisinina (matéria seca) na variedade vietnamita e 0,17% de artemisinina (matéria seca) na variedade chinesa. Destacaram que a via de biossíntese de terpenóides seguiu predominantemente para formação de sesquiterpenos nas plantas da variedade vietnamita e monoterpenos para a varidade chinesa.

Ahmad Malik et al. (2009) estudando a abundância relativa de isoprenóides e outros componentes voláteis das partes aéreas de *A. annua*, após diferentes tratamentos e analisado por CG e CG/MS. Observou que os monoterpenos foram predominantes no óleo essencial para testemunha com rendimento de 0,28 ± 0,04% de óleo essencial no peso fresco. O óleo essencial de plantas tratadas com *Azospirillum* foi de 0,30 ± 0,03% do peso fresco e consistia principalmente monoterpenos. O óleo essencial de plantas tratadas com adubação de base N, P, K e S (120, 50, 100 e 50 kg ha^{-1}, respectivamente) foi de 0,32 ± 0,03% de peso fresco, com elevado teor de álcool tujilico. A hidrodestilação de *A. annua* tratados com Glomus rendeu 0,50 ± 0,02% de óleo essencial no peso fresco, com predominância de sesquiterpenos neste óleo essencial, os resultados sugerem que *A. annua* tratados com Glomus carece de tricomas glandulares, que são os principais locais de síntese de monoterpenos.

Estudando a composição química dos óleos essenciais de *A. annua* da cultivar Jwarharti, Goel et al. (2007), encontram inúmeras substâncias, onde identificaram 86, 77 e 63 combinações de substâncias na folha, pétala e óleos de caule, respectivamente. Descobriram grandes diferenças na composição entre os três óleos essenciais. A pétala e óleos de folha são ricos em monoterpenos. O óleo do caule é rico em sesquiterpenos. A cânfora, presente no óleo da folha, estava ausente de óleo de pétala.

Já, Khangholil & Rezaeinodehi (2008), realizaram estudos referentes ao efeito de diferentes temperaturas no processo de secagem sobre a quantidade e qualidade de óleos essenciais de *A. annua*. Os resultados mostraram que o aumento da temperatura de secagem diminuiu o teor de óleo essencial, de 1,12% (temperatura ambiente) para 0,88% (35 °C), 0,55% (45 °C), 0,50% (55 °C) e 0,37% (65 °C). Trinta e cinco substâncias foram determinadas nos óleos essenciais, que pertenciam principalmente a classe dos monoterpenos. A temperatura de secagem teve um efeito significativo sobre a composição dos óleos essenciais e na proporção de seus vários componentes, com gradual redução no teor de monoterpenos conforme o aumento da temperatura e aumento no teor de sesquiterpenos.

3 CAPÍTULO I - PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ARTEMISININA NA VARIEDADE ARTEMIS DE *Artemisia annua* L. SUBMETIDA A NÍVEIS DE ADUBAÇÃO NPK

3.1 RESUMO

A *Artemisia annua* L. é uma planta herbácea, anual, originária da China e aclimatada ao Brasil, que produz a artemisinina - uma lactona sesquiterpênica utilizada no tratamento da malária - a espécie é a única fonte de produção economicamente viável desta molécula. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta de níveis de adubação química NPK para caracteres biométricos e de artemisinina no cultivo de *A. annua* var. Artemis, em Pato Branco - Paraná. Plantas de *A. annua*, cultivadas em campo durante os anos de 2008 e 2009, foram submetidas a níveis crescentes de adubação química NPK em um solo de média fertilidade. A dose de adubação referência foi definida com base na recomendação para cultura do milho (N: 160 kg ha^{-1}; P_2O_5: 175 kg ha^{-1}; K_2O: 90 kg ha^{-1}), nas formulações Uréia, Super Fosfato Simples e Cloreto de Potássio, sendo os tratamentos controle, meia dose, uma dose e duas doses. A quantificação de artemisinina foi realizada por cromatografia em camada delgada com detecção por densitometria. As massa seca de caule, massa seca da parte aérea e relação folha caule se ajustaram para equação linear, com os melhores resultados para duas vezes a dose: 10,43 t ha^{-1}, 14,21 t ha^{-1}, respectivamente, e a maior relação folha/caule (0,4) para tratamento testemunha. A variável massa seca de folhas obteve ajuste para equação de segundo grau, com máxima eficiência técnica em 1,57 doses e rendimento estimado de 3,87 t ha^{-1}. As doses de adubação NPK não promoveram ajustes significativos para teor de artemisinina (média 5,98 kg t^{-1}) e produtividade de artemisinina (média 19,45 kg ha^{-1}) não apresentou ajustes significativos para reta.

Palavras-chave: adubação NPK, artemisinina, adubação química.

3.2 ABSTRACT

Artemisia annua L. is an herbaceous annual plant, originally from China and acclimatized to Brazil, which produces artemisinin, a sesquiterpene lactone used in the treatment of malaria. The species is the only economically viable source of this molecule. The objective of this work was to evaluate the response of NPK chemical fertilizer levels for biometric characters and artemisinin in the culture of *A. annua* var. Artemis, in Pato Branco - Paraná. Plants of *A. annua*, grown in the field during the years of 2008 and 2009, were submitted to increasing levels of NPK chemical fertilizer in a ground of average fertility. The dose of reference fertilization was defined on the recommendation basis for corn crop (N: 160 kg ha^{-1}; P_2O_5: 175 kg ha^{-1}; K_2O: 90 kg ha^{-1}), in the formularizations Urea, Super Simple Phosphate and Potassium Chloride, being the control treatments, half dose, one dose and two doses. The quantification of artemisinin was carried through by thin layer chromatography with detection by densitometry. The dry mass of stalk, aerial part dry mass and the relation stalk-leaf had an adjustment for a linear equation, being the best results achieved with two times the dose: 10,43 t ha^{-1}, 14.21 t ha^{-1}, respectively, and greater relation stalk-leaf (0,4) for test treatment. The variable leaf dry mass got an adjustment for second degree equation, with maximum efficiency technique in 1,57 doses and estimated yeld of 3,87 t ha^{-1}. NPK fertilizer doses didn't promote significant adjustments on the artemisinin content (average 5,98 kg t^{-1}) and the artemisinin productivity (average 19,45 kg ha^{-1}) did not show significant adjustments for straight line.

Keywords: NPK fertilizer, artemisinin, chemical fertilization.

3.3 INTRODUÇÃO

Artemisia annua L. é uma planta herbácea anual altamente aromática, pertencente à família Asteraceae, com hábito de crescimento determinado (MARCHESE, 2006a; MARCHESE et al., 2002) chegando a três metros de altura (MARCHESE, 2006a) e tem origem em regiões de clima temperado da China (FERREIRA et al., 2005). O extrato aquoso da planta apresenta efeito alelopático em

algumas espécies cultivadas e em plantas daninhas (MAGIERO et al., 2009; MORVILLO et al., 2011). Alguns sesquiterpenos produzidos pela planta, como a artemisinina, causam forte inibição do crescimento de várias espécies (BAGCHI et al., 1997) bem como possuem acentuada ação inseticida (JAIN et al., 1996; BAGCHI et al., 2003). A *A. annua* possui grande capacidade de produção de óleo essencial (QUITÉRIO, 2006), que apresenta forte efeito antimicrobiano, sendo seu máximo acumulo no início da floração (GALAMBOSI, 1980; MAGALHÃES et al., 2004; CAVAR et al., 2011). A espécie também é utilizada comercialmente na perfumaria, na cosmética e em produtos sanitários (GALAMBOSI, 1980; JAIN et al., 1996; MAGALHÃES et al., 2004).

A *A. annua*, no entanto, possui maior notoriedade por ser a principal fonte de artemisinina, uma lactona sesquiterpênica utilizada como principio ativo antimalárico (JAIN et al., 1996; WHO, 2011; JAMALEDDINE et al., 2011; NGUYEN et al., 2011; JHA et al., 2011), que desde seu isolamento, em 1971, vem sendo empregada no combate a malária (ENSERINK, 2005) e atualmente a molécula mais eficaz no tratamento da doença (ENSERINK, 2005; GRAHAM et al., 2010; MILHOUS; WEINA, 2010; JHA et al., 2011; YU et al., 2011). Foi com a terapia combinada com artemisinina (TCA) que o tratamento da malária grave, causada pelo *Plasmodium falciparum* se tornou mais eficiente (WHO, 2005; ENSERINK, 2005), multirresistente a outros antimalaricos utilizados anteriormente (FERREIRA; LUTHRIA, 2010). A demanda por TCA aumentou rapidamente desde o apoio financeiro aos países atingidos pela enfermidade, apesar de ser 10 a 20 vezes mais cara que a terapia com cloroquina (WHO, 2005; ENSERINK, 2005). Além da sua atividade antimalárica, a artemisinina revelou-se eficaz contra o câncer (SINGH; LAI, 2004; EFFERTH, 2005), *Eimeria* spp, *Babesia* spp, *Leishmania* spp, *Neospora caninum*, *Trypanosoma brucei rhodesiense* (MISHINA et al., 2007), e *Schistosoma* spp. (UTZINGER et al., 2001; XIAO et al., 2004).

No Brasil, o cultivo da *A. annua*, vem sendo realizado de forma experimental, pelas Universidades Tecnológica Federal do Paraná e Estadual de Campinas (MARCHESE, 2006a) e está sendo avaliada para cultivo em várzeas na Amazônia pela EMBRAPA Amazônia ocidental (Fontes et al., 2009).

Devido à importância da planta como única fonte de artemisinina economicamente viável, em muitos países com ocorrência de casos de malária, existem esforços na introdução e aclimatação de *A. annua* (MUELLER et al., 2000),

visando seu cultivo comercial para a produção de fitofármacos ou uso como fitoterápico, podendo ser também para produção de óleo essencial. A despeito dos estudos existentes sobre a ecofisiologia da *A. annua* no Brasil e fatores do ambiente afetando a produção de biomassa e artemisinina (MAGALHÃES et al., 1997; MARCHESE, 1999; MARCHESE; REHDER, 2001; MARCHESE et al., 2002; MARCHESE, 2006a, MARCHESE, 2006b; MARCHESE et al., 2010), pouca informação é encontrada na literatura, se compararmos com outras espécies cultivadas.

A crescente demanda e a instabilidade da produção de artemisinina exigem o aperfeiçoamento da cadeia produtiva de *A. annua* (FERREIRA et al., 2005; FERREIRA; LUTHRIA, 2010). Os estudos sobre as plantas devem ser realizados localmente, testando a resposta da planta às condições intrínsecas do local (FERREIRA et al., 2005), pois as condições ambientais são muito variáveis e as plantas respondem de forma diferente (MARCHESE; FIGUEIRA, 2005). Como observado por Marchese (2006a) que comparou a produção em Pato Branco-PR e Campinas-SP, para a variedade 2/39x1V de *A. annua,* encontrando rendimentos superiores de massa de folhas secas e artemisinina em Pato Branco, com acréscimos de 48,1% e 42,1%, respectivamente, para estas variáveis, sobre os resultados obtidos em Campinas.

Assim como a planta responde as condições climáticas, também é diretamente influenciada pela fertilidade do solo (MAGALHÃES, 1996; FERREIRA, 2007; KAPOOR et al., 2007; OZGUVEN et al., 2008; AHMAD MALIK et al., 2009; DAVIES et al., 2009; DAVIES et al., 2011; JHA et al., 2011). Estes estudos agrícolas de produção devem ser ajustados para cada região geográfica (Ferreira et al., 2005). Os estudos sobre adubação são essenciais para otimizar os rendimentos da cultura, elevando a produtividade e o lucro. Magalhães (1996) estudou a influência de doses de nitrogênio (N), (0, 32, 64 e 97 kg ha^{-1}), em uma variedade (parentais de origem vietnamita e chinesa) de *A. annua,* cultivado à campo em Madagascar, na África. Com a maior dose, também obteve os maiores resultados de biomassa e rendimento de artemisinina, com rendimento de massa seca de folhas de 4,69 ± 0,83 t ha^{-1}; teor de artemisinina 0,87% ± 0,03 e rendimento de artemisinina de 41,3 ± 8,4 kg ha^{-1}. Ferreira (2007) verificou que em solos ácidos *A. annua* é mais sensível a falta de calagem e N, depois P e por ultimo o K, sendo que a falta desse ultimo nutriente resultou em aumento significativo do teor de artemisinina.

Em experimentos com variedades de *A. annua* conduzidos em Campinas-SP, Magalhães et al. (1997) e Magalhães et al. (1999), utilizaram adubação de cobertura de 90 kg ha^{-1} de nitrogênio na formulação de sulfato de amônio. Nestes experimentos, plantas da variedade 2/39x1V de *A. annua*, permaneceram no campo por 162 e 223 dias e obtiveram rendimentos médios de massa seca de folhas de 2,056 e 2,923 t ha^{-1} e rendimentos médios de artemisinina de 21,38 e 25,43 kg ha^{-1}, respectivamente. As diferenças de rendimento de artemisinina não foram maiores porque o teor de artemisinina variou de 1,04% para 0,87%, respectivamente.

Ahmad Malik et al. (2009), encontrou incrementos no rendimento de biomassa e óleo essencial com adubação NPKS, em relação a plantas controle e tratadas com fungos micorrizicos. Jha et al. (2011) testando o uso de adubação orgânica, adubação química com NPK e NPKS, na Índia, avaliando em diferentes estádios de desenvolvimento, encontrou aumentos significativos no rendimento de biomassa e artemisinina, obtendo os maiores resultados para estas avaliações com a adubação química NPKS e colheita na emissão dos botões florais, observando ainda expressivo ganho na adubação com S, sendo, o solo onde foram cultivadas as plantas, pobre em S.

Por outro lado, Ozguven et al. (2008) testou doses de N (0, 40, 80 e 120 kg ha^{-1}) por dois anos com uma variedade selvagem de *A. annua*, sem observar aumento significativo nos rendimentos de biomassa e óleo essencial. No entanto, ocorreu resposta positiva para teor de artemisinina, que aumentou com as doses. Kapoor et al. (2007) e Jha et al. (2011). Também observaram aumento nos teores de artemisina nas plantas tratadas com adubação.

No trabalho de Magalhães (1996) e Davies et al. (2009) houve relação inversa e não proporcional entre maiores rendimentos de massa seca de folhas e teor de artemisinina nas folhas de plantas de *A. annua,* com aumento dos níveis de N. Desta forma, essa redução no teor não impediu que os rendimentos por hectare da molécula aumentassem. Davies et al. (2009) encontraram equilíbrio no rendimento de artemisinina nas doses intermediárias.

Kapoor et al. (2007) encontrou expressivo aumento de biomassa da parte aérea de plantas de *A. annua*, em relação a testemunha, adubando com P (110,5%), com inoculação das plantas com fungo *Glomus fasciculatum* (micorriza

arbuscular) (189,5%) e a combinação da inoculação e adubação fosfatada (510,5%) proporcionou os maiores resultados.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta de níveis de adubação química NPK para caracteres biométricos e de artemisinina no cultivo de *Artemisia annua* L. var. Artemis, cultivadas a campo em Pato Branco - Paraná.

3.4 MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi conduzido em campo durante a safra 2008 e 2009, na estação experimental do Curso de Agronomia da UTFPR, localizado na cidade de Pato Branco-PR, em latitude 26º07' S, longitude 52º41' W, altitude de 760m, clima subtropical úmido (Cfa), segundo classificação de Köppen, num Latossolo Vermelho distrófico típico.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro repetições e quatro tratamentos: três níveis de adubação NPK e testemunha sem adubação. Cada unidade experimental foi constituída de 9,6 m², 25 plantas, cinco linhas de 2,4 m de comprimento, distância entre linhas de 1,0 m e espaçamento de 0,6 m, densidade de 16.667 plantas por hectare.

As mudas de *A. annua* var. Artemis provenientes de sementes foram produzidas em condição de fotoperíodo de 15 horas em casa de vegetação (luz natural complementada com luz artificial) (figura 7). As sementes foram semeadas em 16/08/08, em vasos plásticos de 200 ml, contendo substrato orgânico esterilizado. Com aproximadamente 50 dias e 15 cm de altura, as mudas foram transplantadas para o campo em 06/10/08.

Utilizando uma área com solo de média fertilidade, a recomendação técnica de adubação foi realizada segundo a COMISSÃO... (2004), com base em análise química do solo (tabela 1), para produção de 10 t ha^{-1} de grãos de milho (N: 160 kg ha^{-1}; P_2O_5: 175 Kg ha^{-1}; K_2O: 90 Kg ha^{-1}), nas formulações Uréia, Super Fosfato Simples e Cloreto de Potássio.

Foi escolhida a recomendação de adubação para a cultura do milho porque a produção de biomassa das espécies é semelhante e não há uma recomendação específica para *A. annua*. Definindo proporcionalmente os tratamentos: meia dose, uma dose e duas vezes a dose (tabela 2). O nitrogênio (N),

em cobertura, foi parcelado em duas aplicações (12/11/08 e 09/12/08). A adubação foi realizada em toda área da parcela. Foi previamente realizada a correção da acidez do solo em toda área do experimento para elevar a saturação de bases para 80% utilizando-se calcário filler (PRNT 91%), na dose de 2,65 t ha^{-1}, incorporado através de uma escarificação e uma gradagem.

Figura 7 – Vasos plásticos semeados com *Artemisia annua* L., com complementação de luz artificial para fotoperíodo de 15 horas, em 20/08/2008. UTFPR, 2011.

Tabela 1 - Características químicas do solo antes da implantação do experimento. UTFPR, 2011.

pH - $CaCl_2$	Índice SMP	MO	P	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Al^{3+}	H^++Al^{3+}	CTC	V	m
		g dm^{-3}	mg dm^{-3}	$cmol_c$ dm^{-3}						%	
5,22	5,98	50,26	3,19	0,306	4,51	3,51	0	5,075	13,4	62,0	0,0

MO = matéria orgânica; V = saturação por bases; m = saturação por alumínio.

Tabela 2 - Descrição detalhada dos tratamentos com os níveis de adubação utilizados. UTFPR, 2011.

Tratamentos	Adubação de plantio (kg ha^{-1})			Adubação de cobertura (kg ha^{-1})**
	N (1/4)	P_2O_5	K_2O	N (3/4)
0*	0	0	0	0
0,5	20	87,5	45	60
1,0	40	175,0	90	120
2,0	80	350,0	180	240

* Número de vezes a adubação recomendada para cultura do milho
** Adubação de cobertura foi parcelada, 37 e 64 dias após o transplante (12/11/08 e 09/12/08).

Para as avaliações foram utilizadas as nove plantas centrais, sendo descartadas as bordaduras. Foi realizada avaliação da emissão dos botões florais

após a indução floral e semanalmente medida a altura das plantas (figura 8). A colheita foi realizada cortando as plantas rente ao solo no dia 16 de março (161 dias após o transplante), quando 50 +1 % das plantas da parcela já haviam iniciado a emissão dos botões florais.

Figura 8 – Ilustração do início da diferenciação do botão floral, botão floral desenvolvido e pleno florescimento de *Artemisia annua* L. e medição da altura de plantas no experimento com doses de adubação NPK. UTFPR, 2011.

Após secagem do material em estufa com circulação de ar ± 35 ºC foram realizadas as mensurações biométricas de massa seca. Amostras de folhas foram desidratadas separadamente em estufa de secagem, até peso constante, a uma temperatura de ± 40 ºC, para determinação do teor de artemisinina (FIGUEIRA; SARTORATO, 1997).

Para a quantificação do teor de artemisinina foi utilizada técnica de Cromatografia em Camada Delgada com Detecção Densitométrica (CCD-DT), baseada no método descrito por Delabays (1997) e adaptado por Marchese et al. (2001). Para cada amostra, 100 mg de folhas finamente moídas foram extraídas em 5 ml de tolueno, em ultra-dispersor Homo Mix (D-130), por 60 segundos a 30.000 RPM. Posteriormente, o extrato foi centrifugado durante 6 minutos a 3200 ×g. Com uma microseringa, 3 µl de cada extrato foram aplicados sobre uma placa de sílica-gel 60 F_{254} (MERCK art. 1.05554.0001). Cada placa recebeu quatro diferentes concentrações de artemisinina padrão (1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 µl de uma solução contendo 0,25 µg/µl) ao centro, mais 6 aplicações laterais, em duplicata, das amostras. As placas do ensaio foram eluídas em cuba de vidro previamente saturada com uma mistura de clorofórmio:metanol (99,5:0,50). Para a revelação utilizou-se uma solução composta por 50 ml de ácido acético glacial, 0,5 ml de anisaldeído e 1,0 ml de ácido sulfúrico concentrado, que foi borrifada sobre as placas. Posteriormente, cada placa foi colocada em uma estufa a 110 ºC durante cinco minutos. Após a revelação, para quantificação da artemisinina, utilizando-se a curva padrão de cada placa e a avaliação por fotodensitometria, analisou-se a densidade de cada mancha com o software PHARMACIA BIOTHECH/IMAGE MASTER 1D.

As variáveis avaliadas foram: massa seca de folha (MSF; t ha^{-1}), massa seca de caule (MSC; t ha^{-1}), massa seca da parte aérea (MSPA; t ha^{-1}), razão folha/caule (RFC) teor de artemisinina (TART; kg t^{-1} MSF), produtividade de artemisinina (PART; kg ha^{-1}).

Os dados foram submetidos à testes de normalidade, análise de variância e análises complementares com o programa ASSISTAT (Silva et al., 2009).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a variáveis biométrica – massa seca de caule (MSC), massa seca da parte aérea (MSPA) e razão folha/caule (RFC) houve significância para o ajuste nas equações de primeiro grau, ajuste linear e segundo grau para variável massa seca de folha (MSF) (figura 9). Já para as variáveis MSC e MSPA houve crescimento linear conforme a elevação do nível de adubação, sendo a maior dose

(duas doses) onde se obteve os maiores resultados para estas variáveis: MSC (10,43 t ha^{-1}) e MSPA (14,21 t ha^{-1}). Para a variável (RFC) houve decréscimo linear com o aumento da adubação e o tratamento sem adubação apresentou a maior RFC (0,4). A variável MSF apresentou a máxima eficiência técnica no nível de adubação 1,57 vezes a dose, onde se estima a produção de 3,87 t ha^{-1} de massa seca de folhas.

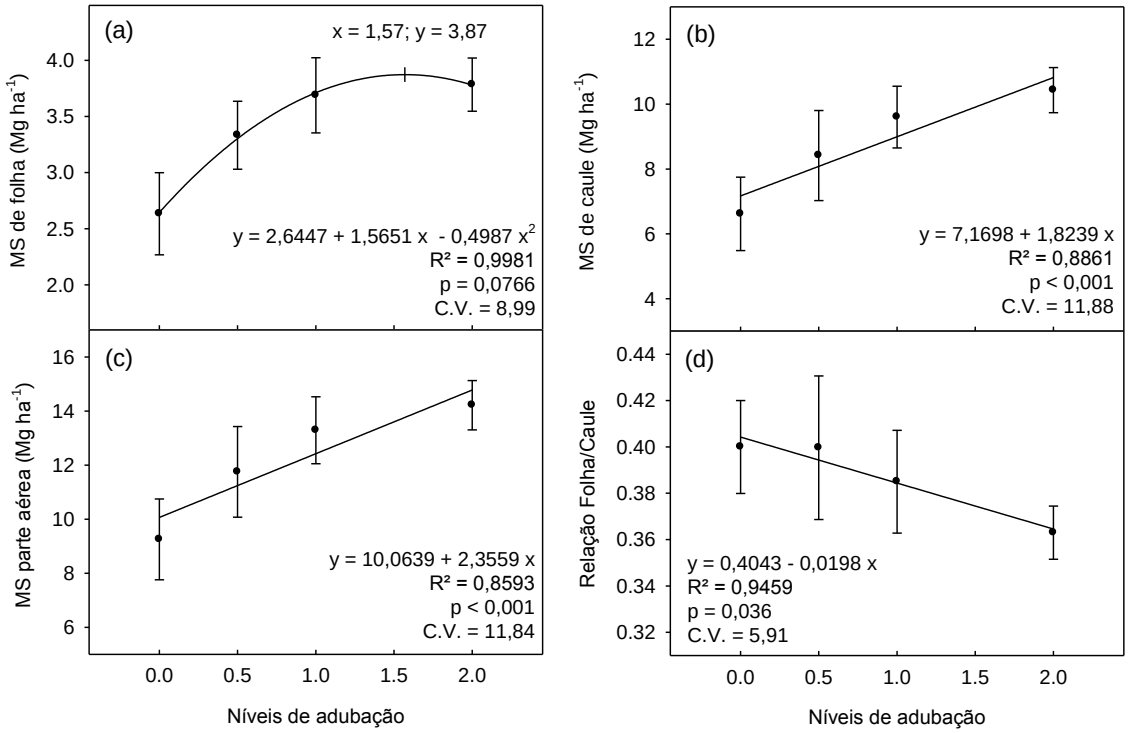

Figura 9 - (a) Produtividade de massa seca de folhas (MSF), (b) massa seca de caule (MSC), (c) massa seca da parte aérea (MSPA) e (d) relação folha/caule (RFC) em plantas de *Artemisia annua* L. submetidas a diferentes níveis de adubação NPK. R²: coeficiente de determinação; C.V.: coeficiente de variação; *p*: probabilidade do erro; MS: massa seca. UTFPR, 2011.

O ajuste linear da análise de regressão, para as variáveis MSC e MSPA, demonstra que não foi alcançada a máxima eficiência técnica com as doses de adubo testadas, portanto, poderia se obter maiores rendimentos com maiores doses. Dessa forma, não foi possível identificar o máximo rendimento de biomassa para estas variáveis. Com o ajuste quadrático para MSF foi possível estimar a máxima eficiência técnica para produção de massa seca de folhas (3,87 t ha^{-1} com 1,57 doses). Os valores obtidos são elevados se comparados com outros trabalhos realizados no Brasil. O maior rendimento estimado de MSF (3,87 t ha^{-1} para 1,57 doses) com cultivo de 161 dias, é 27% superior aos 3,045 t ha^{-1} encontrados no

trabalho de Marchese (2006a) com cultivo de 165 dias em Pato Branco-PR; 32% superior aos 2,923 t ha^{-1} com cultivo de 223 dias em Campinas-SP (Magalhães et al., 1997); 88% superior aos 2,056 t ha^{-1}, em cultivo de 162 dias em Campinas-SP (MAGALHÃES et al., 1999). No entanto, Magalhães (1996) encontrou resultados superiores em cultivo conduzido em regiões montanhosas do país africano de Madagascar, utilizando uma variedade proveniente de parentais vietnamitas e chineses, obtendo 4,69 t ha^{-1} de MSF utilizando 97 kg ha^{-1} de N. Já com uso de 64 kg ha^{-1} de N houve uma produtividade semelhante de MSF (3,88 t ha^{-1}), mas estes estudos foram realizados sob condições diferentes de clima e cultivo, por ex., a densidade de plantas era de 28.400 plantas por hectare e as plantas permaneceram 13 dias a mais sendo cultivadas no campo, totalizando 176 dias. Outros trabalhos encontraram respostas lineares de rendimentos de biomassa para adubação exclusiva com N ou K (Davies et al., 2009) e B, e resposta quadrática para P (Davies et al., 2011).

Analisando a RFC pôde-se observar que as plantas apresentaram tendência a aumentar a partição de biomassa para os ramos e caule (menor RFC) quanto melhores as condições nutricionais do solo (maior adubação NPK). A RFC é uma variável importante no processo de extração da artemisinina, pois o caule tem ceras que dificultam o processo de extração (Marchese et al., 2010). Assim, o interessante são maiores valores de RFC.

Para as variáveis TART e RART não houve ajuste significativo a 5% de probabilidade, sendo a média para TART 5,98 kg t^{-1} MSF e para RART 19,45 kg ha^{-1} (figura 10).

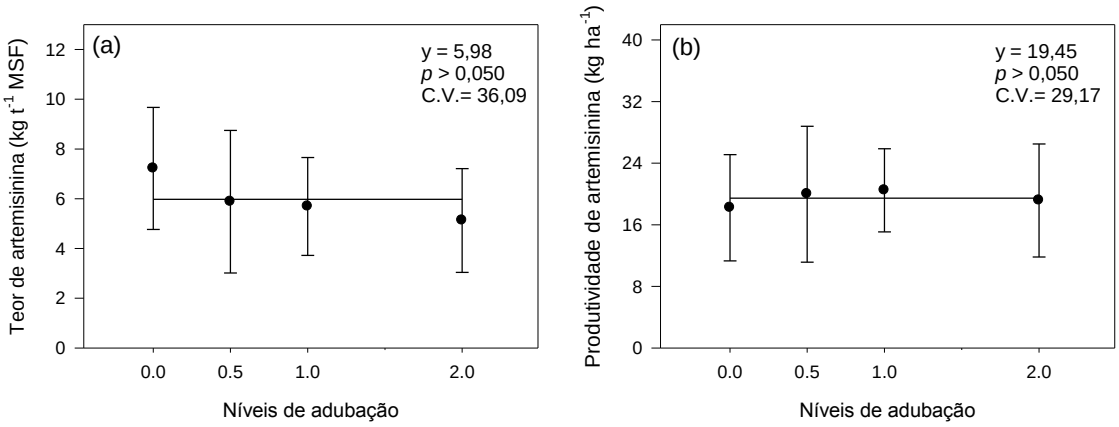

Figura 10 - (a) Teor (TART) e (b) produtividade (PART) de artemisinina em plantas de *Artemisia annua* L. submetidas a diferentes níveis de adubação NPK. C.V.: coeficiente de variação; *p*: probabilidade do erro. UTFPR, 2011.

Os resultados encontrados para TART apresentam um decréscimo com tendência linear, apesar de não haver ajuste da reta. Esse resultado era esperado, já que artemisinina é uma lactona sesquiterpênica, produto do metabolismo secundário, mostrando o investimento da espécie no metabolismo primário com a melhoria das condições necessárias para seu desenvolvimento (aumento dos níveis de adubação), isso porque quanto maior a quantidade de recursos disponíveis (adubo, p.ex.), maior o investimento das plantas em metabólitos primários, em detrimento de metabólitos secundários, como óleo essencial, (MARCHESE; FIGUEIRA, 2005; e MARCHESE et al., 2010).

Marchese et al. (2010) observaram um aumento significativo no conteúdo de artemisinina em folhas de *A. annua* tratadas com estresse por deficiência hídrica (potencial hídrico de -1,39 MPa). Esse resultado pode ser atribuído ao fato de que, sob deficiência hídrica moderada, o crescimento diminui enquanto a fotossíntese ainda está ocorrendo, assim, o excesso de fotoassimilados seria redirecionado para o metabolismo secundário, como na biossíntese de artemisinina, em detrimento do metabolismo primário. Marchese e Figueira (2005) ressaltam que, usualmente, quantidades limitadas de recursos, como nutrientes, têm efeito negativo sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas, porém, estresses moderados muitas vezes são positivos para o acúmulo de substâncias bioativas em espécies medicinais, aromáticas e condimentares.

Para a variável produtividade de artemisinina (PART) não houve ajuste da reta, mas as médias apresentam tendência quadrática, com maior média de PART no tratamento uma dose (20,47 kg ha^{-1}) mostrando que o decréscimo que ocorreu no TART, produto do metabolismo secundário, é compensado pelo aumento da MSF, produto do metabolismo primário. Magalhães (1996) e Davies et al. (2009) estudaram separadamente o uso de doses de adubação nitrogenada e encontraram aumento linear na massa seca de folhas e decréscimo linear no conteúdo de artemisinina, encontrando os maiores rendimentos de artemisinina em doses intermediarias de N. Segundo Davies et al. (2009), a maximização da PART requer otimização de biomassa vegetal através do controle da adubação nitrogenada. Davies et al. (2011), testando adubação fosfatada não observou diferenças para TART, no entanto, obteve resposta quadrática para PART, com o aumento da biomassa de MSF.

Por outro lado, Jha et al. (2011) encontrou aumento para TART com adubação NPK e NPKS. Ozguven et al. (2008) estudando doses de N (0 a 120 kg ha^{-1}) em plantas de variedade selvagem de *A. annua* encontrou aumento linear no TART. Kapoor et al. (2007), observou aumento no TART, com adubação fosfatada e adubação com inoculação de micorriza arbuscular.

Quanto a técnica utilizada para determinação da artemisinina (CCD-DT), é importante salientar que contrapondo as vantagens de ser simples, rápida e barata, objetivando avaliação rápida de plantas com alto rendimento de artemisinina (KOOBKOKKRUAD et al., 2007), é considerada semi-quantitativa (FOGLIO, 1996), por não possuir exatidão quando comparada com outras técnicas, podendo superestimar em até 30% (Marchese et al., 2001) ou subestimar os valores em até 20% (DELABAYS et al. 1994) quando comparada com outras técnicas de análise precisas e exatas como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção no Ultravioleta (CLAE-UV) (MARCHESE et al., 2001), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Eletroquímico (CLAE-EQ) (DELABAYS et al. 1994) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Índice de refração (CLAE-IR) (REHDER et al., 2002).

Devido à resposta linear de algumas variáveis biométricas para os níveis de adubação testados é importante continuar estes estudos de adubação, sendo importante também para confirmação destes resultados, pois este foi o primeiro trabalho com adubação em *A. annua* na região sudoeste do Paraná.

3.6 CONCLUSÕES

As variáveis massa seca de caule, massa seca da parte aérea e razão folha/caule se ajustaram para a equação linear, com os melhores resultados com tratamento duas doses 10,43 t ha^{-1}, 14,21 t ha^{-1}, respectivamente para as variáveis biométricas, e maior razão folha/caule (0,4) para a testemunha. A variável massa seca de folha obteve ajuste para a equação de segundo grau, com máxima eficiência técnica em 1,57 doses e rendimento estimado de 3,87 t ha^{-1}. A influência das doses de adubação NPK sobre teor de artemisinina (média 5,98 kg t^{-1}) e produtividade de artemisinina (média 19,45 kg ha^{-1}) não apresentou ajustes significativos da reta.

4 CAPÍTULO II - PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ARTEMISININA NA VARIEDADE ARTEMIS DE *Artemisia annua* L. ELICIADA COM ACIBENZOLAR-S-METÍLICO E HARPINA

4.1 RESUMO

A A. annua L. é uma planta herbácea anual, originária da China e aclimatada ao Brasil, que produz artemisinina, uma lactona sesquiterpênica utilizada no tratamento da malária. A espécie é a única fonte economicamente viável desta molécula. Os eliciadores estimulam o metabolismo secundário dos vegetais e a síntese de proteínas relacionadas a patogênese, induzindo a resistência dos vegetais aos patógenos e insetos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dessa indução em plantas de *A. annua* var. Artemis pelas substâncias acibenzolar-S-metílico (ASM) e proteína harpina sobre caracteres biométricos e produção de artemisinina. Plantas de *A. annua*, cultivadas em campo em Pato Branco – Paraná, durante os anos de 2008 e 2009, foram submetidas a eliciação com ASM e dois produtos a base de proteína harpina, por meio de três pulverizações semanais, desde o início do período de indução floral até uma semana antes da colheita. O material foi seco e separado, a quantificação de artemisinina foi realizada por cromatografia em camada delegada com detecção por densitometria. O Uso dos eliciadores ASM e proteína harpina aplicados em plantas de *A. annua* cultivadas em campo, não resultaram em diferenças significativas nas biomassas de folha, caule e parte aérea, como também não apresentaram alterações na relação folha/caule e nos teores e produtividade de artemisinina.

Palavras-chave: Eliciação, artemisinina, indução de resistência.

4.2 ABSTRACT

Artemisia annua L. is an herbaceous annual plant, originally from China and acclimatized to Brazil, which produces artemisinin, a sesquiterpene lactone used in the treatment of malaria. The species is the only economically viable source of this molecule. The eliciators stimulate the secondary metabolism of vegetables and the

protein synthesis related to the patogênese, inducing the resistance of vegetables to the pathogens and insects. The objective of this work was to evaluate the effect of this induction in plants of *A. annua* var. Artemis for substances acibenzolar-S-methylic (ASM) and harpin protein on biometric characters and production of artemisinin. Plants of *A. annua*, cultivated in field in Pato Branco- Paraná, during the years of 2008 and 2009, were submitted to the eliciation with ASM and two products harpin-protein based, by means of three weekly sprayings, since the beginning of the period of floral induction up to one week before the harvest. The material was dried and separated, the quantification of artemisinin was carried through by thin layer chromatography with detection by densitometry. The use of the elicitors ASM and harpin protein applied in plants of *A. annua* cultivated in the field, did not result in significant differences in the leaf, stalk and aerial part biomasses, as well as they did not show alterations in the relation leaf-stalk and in the content and productivity of artemisinin.

Keywords: Eliciation, artemisinin, resistance induction.

4.3 INTRODUÇÃO

Artemisia annua L. é uma planta herbácea, anual, altamente aromática, pertencente à família Asteraceae, com hábito de crescimento determinado (MARCHESE, 2006a; MARCHESE et al., 2002), chegando a 3 metros de altura (MARCHESE, 2006a). Tem origem em regiões de clima temperado da China (FERREIRA et al., 2005). O extrato aquoso da planta apresenta efeito alelopático em algumas espécies cultivadas e em plantas daninhas (MAGIERO et al., 2009; MORVILLO et al., 2011). Alguns sesquiterpenos produzidos pela planta, como a artemisinina, causam forte inibição do crescimento de várias espécies (BAGCHI et al., 1997) e tem acentuada ação inseticida (JAIN et al., 1996; BAGCHI et al., 2003). A espécie também é utilizada comercialmente na perfumaria, na cosmética e em produtos sanitários (GALAMBOSI, 1980; JAIN et al., 1996; MAGALHÃES et al., 2004).

A *A. annua*, no etanto, possui maior notoriedade por ser a principal fonte de artemisinina, uma lactona sesquiterpênica utilizada como principio ativo antimalárico (JAIN et al., 1996; WHO, 2011; JAMALEDDINE et al., 2011; NGUYEN

et al., 2011; JHA et al., 2011), que desde seu isolamento, em 1971, vem sendo empregada no combate a malária (ENSERINK, 2005). Atualmente a artemisinina é a molécula mais eficaz no tratamento da doença (ENSERINK, 2005; GRAHAM et al., 2010; MILHOUS; WEINA, 2010; JHA et al., 2011; YU et al., 2011). Foi com a terapia combinada com artemisinina (TCA) que se tornou mais eficiente o tratamento da malária grave, causada pelo *Plasmodium falciparum* (WHO, 2005; ENSERINK, 2005), multirresistente a outros antimalaricos utilizados anteriormente a artemisinina se tornou mais eficinete (FERREIRA; LUTHRIA, 2010). A demanda por TCA aumentou rapidamente desde o apoio financeiro aos países atingidos pela enfermidade, apesar de ser 10 a 20 vezes mais cara que a terapia com cloroquina (WHO, 2005; ENSERINK, 2005). Além da sua atividade antimalárica, a artemisinina revelou-se eficaz contra o câncer (SINGH; LAI, 2004; EFFERTH, 2005), *Eimeria* spp, *Babesia* spp, *Leishmania* spp, *Neospora caninum*, *Trypanosoma brucei rhodesiense* (MISHINA et al., 2007), e *Schistosoma* spp. (UTZINGER et al., 2001; XIAO et al., 2004).

As condições ambientais que afetam *A. annua* podem ser fatores bióticos (WANG et al., 2002; KAPOOR et al., 2007; MA et al., 2009; NGUYEN et al., 2011) e abióticos (Marchese et al. 2010). Dentro dos fatores abióticos que podem afetar os vegetais existem muitas substâncias denominadas indutores de resistência ou eliciadores que estimulam a produção de substâncias do metabolismo secundário vegetal e a síntese de proteínas relacionadas à patogênese, responsáveis pela defesa dos vegetais. Entre estas são relacionadas como eliciadores a proteína harpina e o acibenzolar-S-metílico (DURRANT; DONG, 2004). Existem outras substâncias, patógeno-relacionadas que são reconhecidamente indutores do metabolismo secundário, como a quitosana (NGUYEN et al., 2011; MA et al., 2009; LEI et al., 2011), que foi constatada como um eliciador da produção de artemisinina (MA et al., 2009). O fitohormônio metil jasmonato mostrou ser um indutor do acumulo de artemisinina (YU et al., 2011; MA et al., 2009), como também o extrato de oligossacarídeos da parede do micélio de *Colletotrichum* sp. (WANG et al., 2002). A adição de micorrizas em raízes de plantas envasadas também aumentou os níveis de artemisinina nas folhas de *A. annua* (KAPOOR et al., 2007). Em alguns trabalhos foi observada uma correlação do aumento do teor de artemisinina com um maior número de tricomas glândulares (glândulas capitatas) (MARCHESE, 2006b; KAPOOR et al., 2007; GRAHAM et al. 2010). Os compostos acibenzolar-S-metílico e proteína harpina também foram testados como indutores para *A. annua* em casa de

vegetação, nos EUA, com aumento nas trocas gasosas, mas sem indução efetiva nos teores de artemisinina. No entanto, esses resultados são preliminares e gerados em ambiente controlado, com necessidade de serem experimentados em campo, para obterem afirmações conclusivas (MARCHESE, 2006b).

No estudo conduzido por Lei et al. (2011), testando aplicação de quitosana (100 mg L^{-1}) em plantas de *A. annua*, encontrou-se o aumento de 72% e 53% no conteúdo de ácido dihidroartemisinico e artemisinina, respectivamente, nas folhas tratadas em comparação com controle, com máximo acumulo de ácido dihidroartemisininco 24 horas após eliciação e artemisinina às 48 horas após a eliciação. O uso de quitosana induziu a expressão dos genes de amorpha-4,11-dieno sintase (*ADS*) e aldeído artemisinínico redutase (*DBR2*), o que poderia explicar o aumento no nível de metabólitos artemisinínicos. Após o tratamento de quitosana, as quantidades de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e aníon superóxido (O_2^-) em folhas de *A. annua* foram 1,4 e 3,0 vezes, respectivamente, superiores as do controle. O acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) provavelmente acelerou a conversão do ácido dihidroartemisininco para artemisinina. O tratamento não teve qualquer efeito prejudicial para o crescimento *A. annua*.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a indução em plantas de *Artemisia annua* L. var. Artemis com acibenzolar-S-metílico e proteína harpina sobre caracteres biométricos e de produção de artemisinina.

4.4 MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi conduzido em campo durante a safra 2008 e 2009, na estação experimental do Curso de Agronomia da UTFPR, localizado na cidade de Pato Branco-PR, em latitude 26º07' S, longitude 52º41' W, altitude de 760m, clima subtropical úmido (Cfa), segundo classificação de Köppen, num Latossolo Vermelho.

O delineamento experimental usado foi em blocos casualizados, com quatro repetições e quatro tratamentos, sendo três ativadores da defesa química: ASM (acibenzolar-S-metílico, 500 mg L^{-1} - Produto comercial Bion® 500 WG); Harpina-M (750 mg L^{-1} - Produto comercial Messenger® - 3% i.a.) e Harpina-P (750 mg L^{-1} - Produto comercial Proact™ - 1% i.a.), e água destilada como controle (Tabela 3). Cada unidade experimental foi constituída de 9,6 m², 25 plantas, cinco linhas de 2,4 m de comprimento, distância entre linhas de 1,0 m e espaçamento de

0,6 m, e densidade de 16.667 plantas h^{-1}. As doses foram determinadas segundo MARCHESE (2006b).

Tabela 3 - Descrição detalhada dos tratamentos utilizados, moléculas, doses, produto comercial e aplicações. UTFPR, 2011.

Tratamentos	Princípio Ativo	Dose (mg L^{-1})	Calda (L ha^{-1})	Produto Comercial	Aplicações*
ASM	acibenzolar-S-metílico	500	200	Bion® 500 WG	3
Harpina-M	Proteína Harpina	750	200	Messenger®	3
Harpina-P	Proteína Harpina	750	200	Proact™	3
Controle	-	-	200	-	3

* Aplicações semanais, iniciando após a indução floral até uma semana antes da colheita.

Mudas de *A. annua* var. Artemis provenientes de sementes (16/08/08) foram produzidas em condição de fotoperíodo de 15 horas em casa de vegetação (luz natural complementada com luz artificial). As sementes foram semeadas em vasos plásticos de 200 ml contendo substrato orgânico esterilizado. Com aproximadamente 50 dias e 15 cm de altura, foram transplantadas para o campo em 06/10/08.

A correção da fertilidade foi realizada previamente com correção da acidez em toda área do experimento aplicando 2,7 t ha^{-1} de calcário filler (PRNT 91%), incorporando através de uma escarificação e uma gradagem, com base na análise de solo (tabela 4). A adubação de base foi realizada em toda área com N: 40 kg ha^{-1}; P_2O_5: 135 kg ha^{-1}; K_2O: 60 kg ha^{-1}, sendo as formulações: Uréia, Super Fosfato Simples e Cloreto de Potássio. O nitrogênio (N), em cobertura foi 277,5 kg ha^{-1} de N na formulação Uréia.

Tabela 4 - Características químicas do solo antes da implantação do experimento. UTFPR, 2011.

pH - $CaCl_2$	**Índice SMP**	**MO**	**P**	**K^+**	**Ca^{2+}**	**Mg^{2+}**	**Al^{3+}**	**H^++Al^{3+}**	**CTC**	**V**	**m**
		g dm^{-3}	mg dm^{-3}	$cmol_c$ dm^{-3}						%	
4,87	5,98	54,18	6,17	0,47	4,33	3,02	0,15	7,36	15,18	51,54	2,11

MO = matéria orgânica; V = saturação por bases; m = saturação por alumínio.

Os eliciadores foram aplicados usando um pulverizador costal portátil equipado com um cilindro de CO_2 conectado a uma haste de alumínio com 06 bicos, pressão constante e vazão média aproximada de 35,58 ml s^{-1}.

Quando as plantas sofreram a indução floral (aumento abrupto da altura e número de entrenós) foi iniciada a aplicação dos eliciadores (figura 11).

Foram três aplicações semanais, sendo a 1ª em 21/02/09, a 2ª em 28/02/09 e a 3ª em 07/03/09, permitindo que durante cada pulverização as plantas recebessem em média 3,33 mg planta^{-1} de acibenzolar-S-metílico (Bion® 500 WG), 5,03 mg planta^{-1} de Harpina-M (Messenger®) e 5,17 mg planta^{-1} de Harpina-P (Proact™), para o controle foi realizada aplicação apenas de água destilada (Tabela 3).

Figura 11 – Isolamento das parcelas (esquerda) e pulverização dos eliciadores (direita) no experimento com aplicação dos eliciadores acibenzolar-S-metílico e proteína. UTFPR, 2011.

Para as avaliações foram utilizadas as nove plantas centrais, sendo descartadas as bordaduras. Foi realizada avaliação da emissão dos botões florais após a indução floral e semanalmente a medida da altura das plantas. A colheita foi realizada cortando as plantas rente ao solo no dia 14/03/09 (159 dias após o transplante), quando 50 +1 % das plantas da parcela já haviam iniciado a emissão dos botões florais.

Após secagem do material em estufa com circulação de ar ± 35 ºC, foram realizadas as mensurações biométricas de massa seca. Amostras de folhas foram desidratadas separadamente em estufa de secagem, até peso constante, a uma temperatura de ± 40 ºC, para determinação do teor de artemisinina (FIGUEIRA; SARTORATO, 1997).

Para a quantificação do teor de artemisinina foi utilizada uma técnica de Cromatografia em Camada Delgada com Detecção Densitométrica (CCD-DT), baseada no método descrito por Delabays (1997) e adaptado por Marchese et al. (2001). Para cada amostra, 100 mg de folhas finamente moídas foram extraídas em 5 ml de tolueno, em ultra-dispersor Homo Mix (D-130), por 60 segundos a 30.000 RPM. Posteriormente, o extrato foi centrifugado durante 6 minutos a 3200 ×g. Com uma microseringa, 3 µl de cada extrato foram aplicados sobre uma placa de sílica-gel 60 F_{254} (MERCK art. 1.05554.0001). Cada placa recebeu quatro diferentes

concentrações de artemisinina padrão (1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 µl de uma solução contendo 0,25 µg/µl) ao centro, mais 6 aplicações laterais, em duplicata, das amostras. As placas do ensaio foram eluídas em cuba de vidro previamente saturada com uma mistura de clorofórmio:metanol (99,5:0,50). Para a revelação utilizou-se uma solução composta por 50 ml de ácido acético glacial, 0,5 ml de anisaldeído e 1,0 ml ácido sulfúrico concentrado, que foi borrifada sobre as placas. Posteriormente, cada placa foi colocada em uma estufa a 110 ºC durante cinco minutos. Após a revelação, para quantificação da artemisinina, utilizou-se a curva padrão de cada placa e a avaliação por fotodensitometria, analisando-se a densidade de cada mancha com o software PHARMACIA BIOTHECH/IMAGE MASTER 1D.

As variáveis determinadas foram: massa seca de folha (MSF; t ha^{-1}), massa seca de caule (MSC; t ha^{-1}), massa seca da parte aérea (MSPA; t ha^{-1}), razão folha/caule (RFC) teor de artemisinina (TART; kg t^{-1} MSF), produtividade de artemisinina (PART; kg ha^{-1}).

Os dados foram submetidos à testes de normalidade, análise de variância e análises complementares com o programa ASSISTAT (Silva et al., 2009).

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as variáveis biométricas – massa seca de folha (MSF), massa seca de caule (MSC), massa seca da parte aérea (MSPA), razão folha/caule (RFC) – não houve diferença significativa entre os tratamentos (figura 12). A precisão para estas variáveis ficou entre média e alta, mostrando boa confiabilidade dos dados. Desta forma, a aplicação dos eliciadores com base em acibenzolar-S-metílico e proteína harpina não resultaram em alterações na biomassa e na RFC.

Nas variáveis teor de artemisinina (TART) e produtividade de artemisinina (PART) também não houveram diferenças significativas (figura 13), mas a média do tratamento ASM foi levemente inferior, para ambas as variáveis. A precisão é média. Os eliciadores acibenzolar-S-metílico e proteína harpina não resultaram em alterações significativas na biomassa de folhas, caule, parte aérea e relação folha/caule, como também não apresentaram diferenças nos teores e produtividade de artemisinina de *A. annua*.

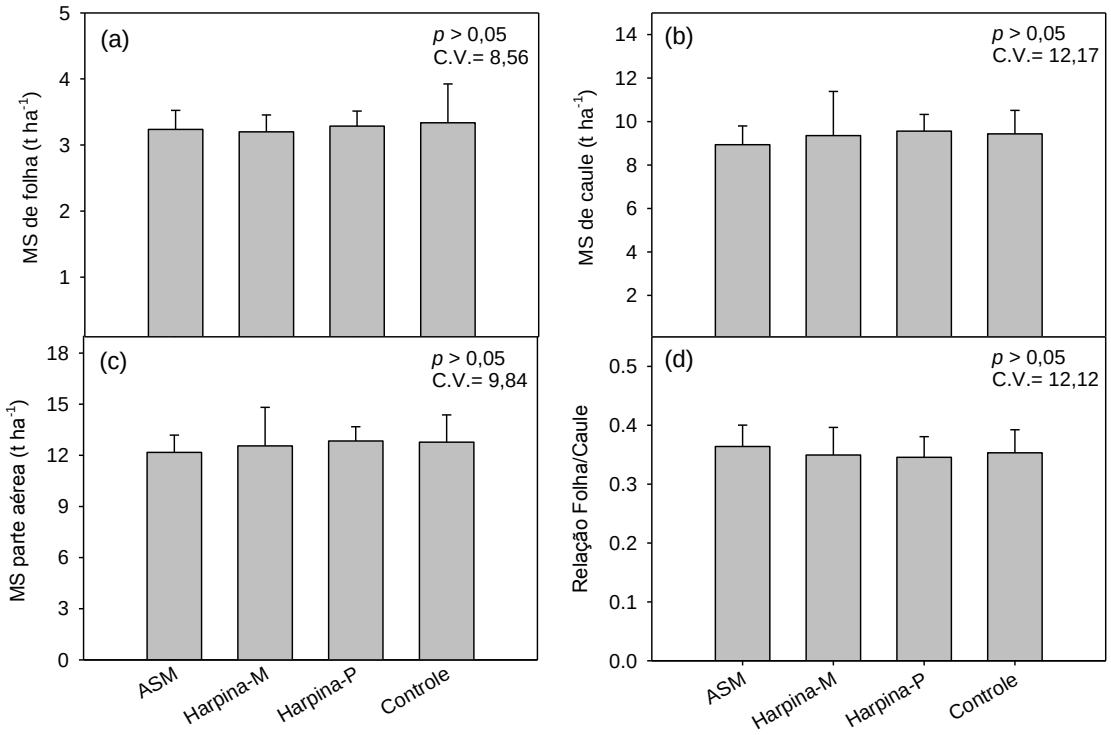

Figura 12 - (a) Produtividade de massa seca de folhas (MSF), (b) massa seca de caule (MSC), (c) massa seca da parte aérea (MSPA) e (d) relação folha/caule (RFC) de *Artemisia annua* L. eliciada com acibenzolar-S-metílico e harpina. C.V.: coeficiente de variação; *p*: probabilidade do erro. UTFPR, 2011.

Os resultados encontrados para MSF, MSC, MSPA, RFC, TART e PART confirmam os observados por Marchese (2006b), que realizou estudos em casa de vegetação e câmaras de crescimento com plantas de *A. annua* variedade 239x1V, avaliando o uso dos mesmos eliciadores em duas aplicações semanais, onde também não encontrou diferenças entre os tratamentos, nos estádios vegetativo e reprodutivo. Observou, no entanto, um aumento na taxa de assimilação de CO_2 para as plantas eliciadas nas 24, 48 e 96 horas após a primeira aplicação e 24 horas anteriores a esta aplicação, e também as 24, 48 e 96 horas posteriores a segunda aplicação, que foi a ultima avaliação realizada. Contudo, essa maior taxa de assimilação de CO_2 não resultou em melhoria nos demais caracteres avaliados.

Em trabalhos com uso de ASM e harpina em outras espécies (*Phaseolus vulgaris* L. e *Fragaria x ananassa* Duch.) também não foi encontrada influência direta dos eliciadores sobre as variáveis biométricas. Alterações significativas foram encontradas em substâncias do metabolismo secundário relacionadas com a defesa vegetal e a patogênese, como fenóis, enzimas

peroxidase (POX: E.C 1.11.1.7) e fenilalanina amônia-liase (FAL: EC 4.3.1.5) (TOMAZELI, 2010; BRESSAN, 2011).

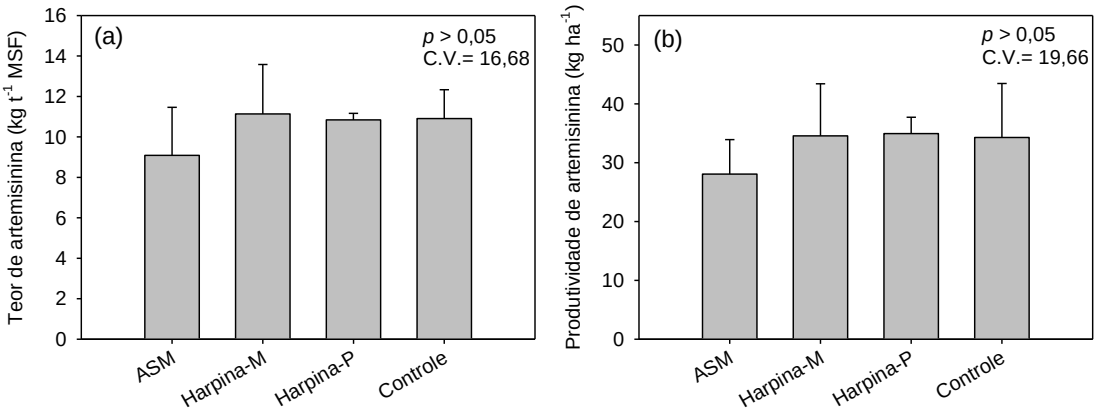

Figura 13 - (a) Teor (TART) e (b) produtividade (PART) de artemisinina em *Artemisia annua* L. eliciada com acibenzolar-S-metílico e harpina. C.V.: coeficiente de variação; *p*: probabilidade do erro. UTFPR, 2011.

Em outros trabalhos, obteve-se sucesso na indução do acumulo de artemisinina, como por exemplo, o uso de jasmonato (YU et al., 2011) e quitosana (MA et al., 2009; LEI et al., 2011), que também foi eficiente na eliciação e aumento do teor de artemisinina sem prejuízos na produção de biomassa. Kapoor et al. (2007) obtiveram sucesso com adição de micorriza arbuscular nas raízes de plantas envasadas, com aumentos nos níveis de artemisinina nas folhas de até 200% (0,1 para 0,3% da matéria seca de folhas) com o fungo *Glomus fasciculatum*.

4.6 CONCLUSÕES

O Uso dos eliciadores acibenzolar-S-metílico e proteína harpina aplicados em plantas de *A. annua* cultivadas em campo, não resultaram em difereças significativas nas biomassas de folha, caule e parte aérea, como também não apresentaram alterações na razão folha/caule, nem no teor e produtividade de artemisinina.

5 CAPÍTULO III – PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Artemisia annua* L. VARIEDADE ARTEMIS SUBMETIDA A NÍVEIS DE ADUBAÇÃO NPK

5.1 RESUMO

Artemisia annua L. é uma espécie altamente aromática e produz grande quantidade óleo essencial, rico em terpenos. O objetivo deste trabalho foi identificar alterações no perfil químico do óleo essencial de plantas de *A. annua* var. Artemis em resposta à níveis de adubação química NPK. Plantas de *A. annua* cultivadas em campo, durante os anos de 2008 e 2009, foram submetidas a níveis crescentes de adubação química NPK em um solo de média fertilidade. A dose de adubação referência foi definida com base na recomendação para cultura do milho (N: 160 kg ha^{-1}; P_2O_5: 175 Kg ha^{-1}; K_2O: 90 Kg ha^{-1}), nas formulações Uréia, Super Fosfato Simples e Cloreto de Potássio, sendo os tratamentos controle, meia dose, uma dose e duas doses. O óleo essencial foi hidrodestilado em aparato clevenger e analisado em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM) e cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (CG-DIC). O teor de óleo essencial nas folhas caiu linearmente com os níveis crescentes de adubação NPK, com maior média para o tratamento testemunha (9,46 ml kg^{-1} de massa seca de folhas). Para rendimento de óleo não houve ajuste significativo da reta (média 27,96 L ha^{-1}). Foram identificados 28 componentes no perfil químico óleo essencial que compreendem 94,96%. As substâncias majoritárias foram cânfora (44,75%), 1,8 cineol (7,90%), γ-muuroleno (6,75%), *trans*-β-farneseno (6,51%) e mirceno (5,74%). Sete componentes do óleo essencial apresentaram variação em função dos níveis de adubação NPK: *p*-cimeno, canfeno, *trans*-β-terpineol, α-pineno, viridifloreno, acetato de mirtenila e β-pineno. O conteúdo relativo desses componentes variou de 0,53 a 2,23%, representando aproximadamente 8% do perfil do óleo essencial. A classe predominante foi monoterpenos (72%).

Palavras-chave: adubação NPK, cânfora, 1,8 cineol, adubação química.

5.2 ABSTRACT

Artemisia annua L. is a highly aromatical species and it produces great amount of essential oil, rich in terpenes. The objective of this work was to identify alterations in the chemical profile of the essential oil of plants of *A. annua* var. Artemis in response to the levels of NPK chemical fertilizer. Plants of *A. annua*, grown in field during the years of 2008 and 2009, were submitted to increasing levels of NPK chemical fertilizer in a ground of average fertility. The dose of reference fertilization was defined on the recommendation basis for corn crop (N: 160 kg ha^{-1}; P_2O_5: 175 kg ha^{-1}; K_2O: 90 kg ha^{-1}), in the formularizations Urea, Super Simple Phosphate and Potassium Chloride, being the control treatments, half dose, one dose and two doses. The essential oil was hydrodistilled in Clevenger apparatus and analyzed in gas chromatograph connected to the spectrometer of masses (CG-EM) and gas chromatograph with a flame ionization detector (CG-DIC). The essential oil content in leves fell linearly with the increasing levels of NPK fertilizer, with average greater for the control treatment (9,46 ml kg^{-1} of leaf dry mass). For oil yield there was no significant adjustment of the line (average 27,96 L ha^{-1}). Twenty-eight components were identified in the essential oil chemical profile that comprise 94.96%. The majoritarian substances were camphor (44.75%), 1,8 cineole (7.90%), γ-muurolene (6.75%), *trans*-β-farnesene (6.51%), mircene (5.74%). Seven components of the essential oil showed variation in function of NPK fertilizer levels: *p*-cymene, camphene, *trans*-β-terpineol, α-pinene, viridifloreno, acetate of mirtenila and β-pinene,the relative content of these components varied from 0.53 to 2.23% representing about 8% of the essential oil profile. The predominant class was of monoterpenes (72%).

Keywords: NPK fertilizer, camphor, 1,8 cineole, chemical fertilization.

5.3 INTRODUÇÃO

Artemisia annua L. é uma planta herbácea anual altamente aromática, pertencente à família Asteraceae, com hábito de crescimento determinado (MARCHESE et al., 2002; MARCHESE, 2006a) chegando a 3 metros de altura (MARCHESE, 2006a). Tem origem em regiões de clima temperado da China

(FERREIRA et al., 2005). É conhecida por ser a principal fonte de artemisinina, uma lactona sesquiterpênica utilizada como principio ativo antimalárico (JAIN et al., 1996; WHO, 2011; JAMALEDDINE et al., 2011; NGUYEN et al., 2011; JHA et al., 2011). O extrato aquoso da planta apresenta efeito alelopático em algumas espécies cultivadas e em plantas daninhas (MAGIERO et al., 2009; MORVILLO et al., 2011). Alguns sesquiterpenos produzidos pela planta causam forte inibição do crescimento de várias espécies vegetais (BAGCHI et al., 1997), bem como, acentuada ação inseticida (JAIN et al., 1996; BAGCHI et al., 2003).

A *A. annua* possui grande capacidade de produção de óleo essencial (QUITÉRIO, 2006), sendo seu máximo acúmulo no início da floração, podendo chegar de 0,49% (BAGCHI et al., 2003) a 0,53% da matéria fresca (GALAMBOSI, 1980). O óleo apresenta atividade antioxidante, bactericida e antifúngica (JUTEAU et al., 2002; MAGALHÃES et al., 2004; CAVAR et al., 2011). O óleo da espécie também é utilizado comercialmente na perfumaria, na cosmética e em produtos sanitários (GALAMBOSI, 1980; JAIN et al., 1996; MAGALHÃES et al., 2004). Segundo Biogenic Stimulants (2011), sitio web europeu de vendas on-line, em 15 de dezembro de 2011, o preço para compra do *wormwood oil* estava em US$ 750,00 por kg, a granel, e US$ 27,33 por 10 ml fracionados, todavia, o óleo essencial de *A. annua* apresenta um potencial produtivo ainda pouco explorado (HAIDER et al., 2004).

Os compostos da classe dos terpenos são os principais no óleo essencial de *A. annua* (MA et al., 2007), sendo predominante monoterpenos no óleo essencial das folhas (GOEL et al., 2007; AHMAD MALIK et al., 2009) e sesquiterpenos do caule (GOEL et al., 2007). Vários estudos, em diferentes países, têm sido realizados buscando identificar e quantificar os constituintes do óleo essencial de *A. annua*, com diferentes variedades ou acessos da espécie. Perazzo et al. (2003), Haider et al. (2004), Quispe-Condori et al. (2005), Mohammadreza (2008) e Bolina (2011) encontram cânfora e 1,8 cineol dentre os constituintes majoritários do óleo essencial desta espécie. Cavar et al. (2011) identificaram mais de 100 compostos, porém, cânfora e artemisia cetona foram as principais substâncias presentes no óleo essencial de plantas selvagens de *A. annua* cultivadas na Bósnia. Estudando a composição química dos óleos essenciais de *A. annua* da cultivar Jwarharti, Goel et al. (2007), identificaram 86, 77 e 63 combinações de substâncias na folha, pétala e óleos de caule, respectivamente. Descobriram grandes diferenças na composição dos óleos. A cânfora, presente nas

folhas, estava ausente no óleo essencial das pétalas e o ácido dihidroartemisinico estava ausente no óleo essencial do caule.

Woerdenbag et al. (1993) estudando variedades de *A. annua* de origem chinesa e vietnamita oriundas de sementes, sugeriu a existência de diferentes quimiotipos quando observou que as plantas de origem chinesa continham maior conteúdo de óleo essencial 4,0% (volume/massa seca) e os principais constituintes foram artemisia cetona (63,9%), artemísia álcool (7,5%), mirceno (5,1%), α-guaieno (4,7%) e cânfora (3,3%), e nas plantas de origem vietnamita 1,2% (volume/massa seca) de óleo essencial, e os constituintes principais foram cânfora (21,8%), germacreno D (18,3%), β-cariofileno (5,6%), trans-β-farneseno (3,8%) e 1,8-cineol (3,1%). Diferenças também foram encontradas nos teores de artemisinina em extrato diclorometano do material vegetal herbáceo: 1% de artemisinina (matéria seca) na variedade vietnamita e 0,17% de artemisinina (matéria seca) na variedade chinesa. Destacaram que a via de biossíntese de terpenóides seguiu predominantemente para formação de sesquiterpenos nas plantas da variedade vietnamita e monoterpenos para a variedade chinesa.

Ahmad Malik et al. (2009) estudando a influência de tratamentos químicos, adubação N, P, K e S, e biológicos, inoculação com *Glomus* e *Azospirillum,* em plantas de *A. annua*, observaram que os monoterpenos foram predominantes no óleo essencial de plantas testemunha e tratadas com *Azospirillum*; verificaram quase ausência de monoterpenos e grande quantidade de sesquiterpenos no óleo essencial das plantas tratadas com *Glomus*, além de falta de tricomas nestas plantas. Vinte e sete constituintes foram identificados no óleo essencial de planta tratadas com adubação N, P, K e S (120, 50, 100 e 50 kg ha^{-1}, respectivamente), tendo álcool tujilico (33,3%), β-cariofileno (15,5%), *cis*-undec-5-eno (14,4%), artemísia cetona (6,0%) e *trans*-nerolidol (5,8%) como componentes principais.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção e as alterações no teor e no perfil químico do óleo essencial de plantas de *Artemisia annua* L. var. Artemis em resposta à níveis de adubação química NPK, cultivadas em Pato Branco – Paraná.

5.4 MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi conduzido em campo durante a safra 2008 e 2009, na estação experimental do Curso de Agronomia da UTFPR, localizado na cidade de Pato Branco-PR, em latitude 26º07' S, longitude 52º41' W, altitude de 760m, clima subtropical úmido (Cfa), segundo classificação de Köppen, num Latossolo Vermelho distrófico típico.

O delineamento experimental usado foi em blocos casualizados, com quatro repetições e quatro tratamentos: três níveis de adubação NPK e testemunha sem adubação NPK. Cada unidade experimental foi constituída de 9,6 m², 25 plantas, cinco linhas de 2,4 m de comprimento, distância entre linhas de 1,0 m e espaçamento de 0,6 m, densidade de 16.667 plantas por hectare.

Mudas de *A. annua* var. Artemis provenientes de sementes (16/08/08) foram produzidas em condição de fotoperíodo de 15 horas em casa de vegetação (luz natural complementada com luz artificial). As sementes foram semeadas em vasos plásticos de 200 ml contendo substrato orgânico esterilizado. Com aproximadamente 50 dias e 15 cm de altura, as mudas foram transplantadas para o campo em 06/10/08.

Utilizando uma área com solo de média fertilidade, a recomendação técnica de adubação foi realizada segundo a COMISSÃO... (2004), com base em análise química do solo (tabela 5), para produção de 10 t ha^{-1} de grãos de milho (N: 160 kg ha^{-1}; P_2O_5: 175 Kg ha^{-1}; K_2O: 90 Kg ha^{-1}), nas formulações Uréia, Super Fosfato Simples e Cloreto de Potássio.

Tabela 5 - Características químicas do solo antes da implantação do experimento. UTFPR, 2011.

pH - $CaCl_2$	Índice SMP	MO	P	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Al^{3+}	H^++Al^{3+}	CTC	V	m
		g dm^{-3}	mg dm^{-3}	$cmol_c$ dm^{-3}						%	
5,22	5,98	50,26	3,19	0,306	4,51	3,51	0	5,075	13,4	62,0	0,0

MO = matéria orgânica; V = saturação por bases; m = saturação por alumínio.

Foi escolhida a recomendação de adubação para a cultura do milho porque a produção de biomassa das espécies é semelhante a *A. annua* e não há uma recomendação para esta espécie. Definindo proporcionalmente os tratamentos: meia dose, uma dose e duas vezes a dose recomendada para o milho (tabela 6). O nitrogênio (N) em cobertura foi parcelado em duas aplicações, sendo elas em 12/11/08 e 09/12/08. A adubação foi realizada em toda área da parcela.

Previamente, foi realizada correção da acidez do solo em toda área do experimento para elevar a saturação de bases para 80% utilizando-se calcário filler (PRNT 91%) na quantidade de 2,75 t ha^{-1}, incorporando calcário através de uma escarificação e uma gradagem.

Tabela 6 - Descrição detalhada dos tratamentos com os níveis de adubação utilizados. UTFPR, 2011.

Tratamentos	Adubação de plantio (kg ha^{-1})			Adubação de cobertura (kg ha^{-1})**
	N	P_2O_5	K_2O	N
0*	0	0	0	0
0,5	20	87,5	45	60
1,0	40	175,0	90	120
2,0	80	350,0	180	240

* Número de vezes a adubação recomendada para cultura do milho
** Adubação de cobertura foi parcela em duas aplicações.

A colheita foi realizada cortando as nove plantas centrais rente ao solo no dia 16/03/09 (161 dias após o transplante), quando 50 +1 % das plantas da parcela já haviam iniciado a emissão dos botões florais, fase de máximo acumulo de óleo essencial pela planta (GALAMBOSI, 1980).

Após secagem do material em estufa com circulação de ar a ± 35 ºC, foi realizada a extração de óleo essencial por hidrodestilação em aparato Clevenger, por 60 min. Após aferir o teor do óleo essencial, este foi armazenado hermeticamente em vidros âmbar em geladeira a 4 ºC até avaliação da composição química.

A separação e quantificação (método de normalização de área) das substâncias presentes no óleo essencial foram conduzidas no Laboratório de Fitoquímica do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e realizadas em cromatógrafo à gás com detector de ionização de chama (CG-DIC, Shimadzu, GC-2010) dotado de coluna capilar: DB- 5(J&W Scientific; 30,0m x 0,25mm x 0,25µm) e temperatura do forno 60 ºC – 240 ºC, 3 ºC por min; split: 1/20, volume de injeção 1µl de solução (1 mg de óleo essencial/ml de acetato de etila). A identificação das substâncias foi realizada em cromatógrafo à gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000), operando por impacto de elétrons (70eV); Coluna capilar: OV-5 (Ohio Valley Specialty Chemical, Inc.; 30,0m x 0,25mm x 0,25µm), e as mesmas condições operacionais do CG-DIC. A identificação das substâncias, efetuada através da comparação dos espectros de suas massas, com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist. 62 lib.), padrão autêntico de linalol (Sigma-Aldrich; 95%) e índice de retenção (ADAMS, 1995). Os índices de retenção das

substâncias foram obtidos em comparação com uma mistura padrão de n-alcanos (C_9-C_{24}), aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (1963).

As variáveis avaliadas foram teor de óleo essencial (TOLS; ml kg^{-1} de massa seca de folhas), produtividade de óleo essencial (POLS; L ha^{-1}) e perfil químico do óleo essencial.

Os dados foram submetidos à testes de normalidade, análise de variância e análises complementares pelo programa ASSISTAT (Silva et al., 2009).

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a variável teor de óleo essencial (TOLS) o ajuste foi linear, com decréscimo das médias nas maiores doses, a maior média foi encontrada no tratamento uma dose (9,46 ml kg^{-1}). Para produtividade de óleo essencial (POLS) não houve ajuste significativo a 5% de probabilidade de erro, desta forma é apresentada a média dos quatro tratamentos (27,96 L ha^{-1}) para esta variável (figura 14).

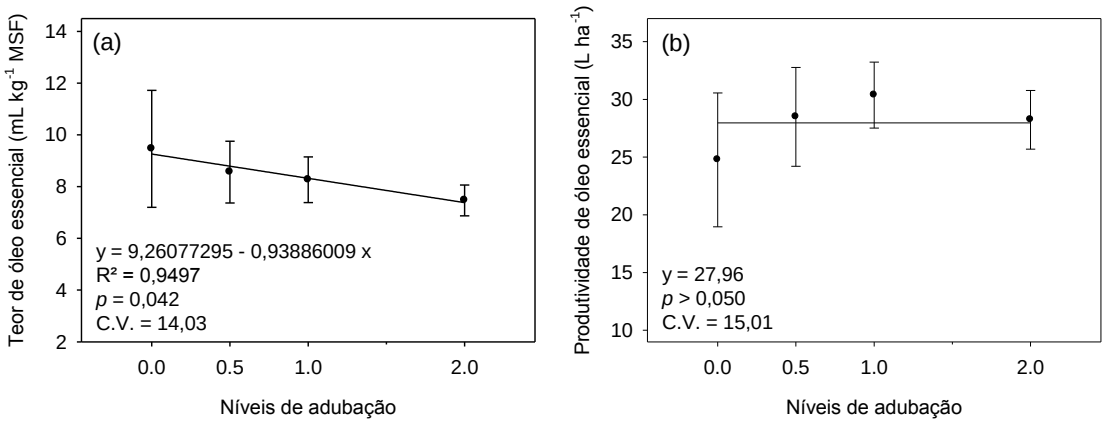

Figura 14 - (a) Teor de óleo essencial (TOLS) e (b) produtividade de óleo essencial (POLS) em plantas de *Artemisia annua* L. submetidas a diferentes níveis de adubação N, P e K. MSF: massa seca de folhas; R^2: coeficiente de determinação; C.V.: coeficiente de variação; *p*: probabilidade do erro. UTFPR, 2011.

Apesar de não haver um ajuste significativo para POLS, o maior resultado foi obtido com o tratamento uma dose (30,36 L ha^{-1}), apresentando uma tendência quadrática das médias. Ozguven et al. (2008) estudando doses de N, também não encontraram resposta significativa para POLS. O ajuste linear negativo, decrescente, para TOLS, mostra o investimento de *A. annua* no metabolismo

primário com a melhoria das condições necessárias para seu desenvolvimento, o que está de acordo com Marchese & Figueira (2005) e Marchese et al. (2010), isso porque quanto maior a quantidade de recursos disponíveis, como o adubo, por exemplo, mais as plantas investem em metabólitos primários, em detrimento de metabólitos secundários, como óleo essencial.

Por outro lado, Jha et al. (2011) encontrou aumento para teor de óleo essencial com adubação NPK e NPKS. Ozguven et al. (2008) estudando doses de N (0 a 120 kg ha^{-1}) em plantas de variedade selvagem de *A. annua* encontrou aumento linear no TART e quadrático para TOLS. Kapoor et al. (2007), observou aumento no TART, com adubação fosfatada e adubação com inoculação de micorriza arbuscular.

A análise do perfil químico do óleo essencial de *A. annua* identificou 28 substâncias, que correspondem a aproximadamente 94,96% do perfil do óleo essencial (tabela 7). Cinco substâncias perfazem cerca de 71% da composição química do óleo essencial, e são também as que mais contribuem para o perfil químico do óleo essencial de *A. annua.* Essas substâncias majoritárias não diferiram com os níveis de adubação, sendo elas: cânfora (44,75%), 1,8 cineol (7,90%), γ-muuroleno (6,75%), *trans*-β-farneseno (6,51%) e mirceno (5,74%). As demais substâncias identificadas representam aproximadamente 23% do perfil óleo essencial, com predominância de monoterpenos (72%). As estruturas químicas das substâncias majoritárias estão apresentadas na figura 15.

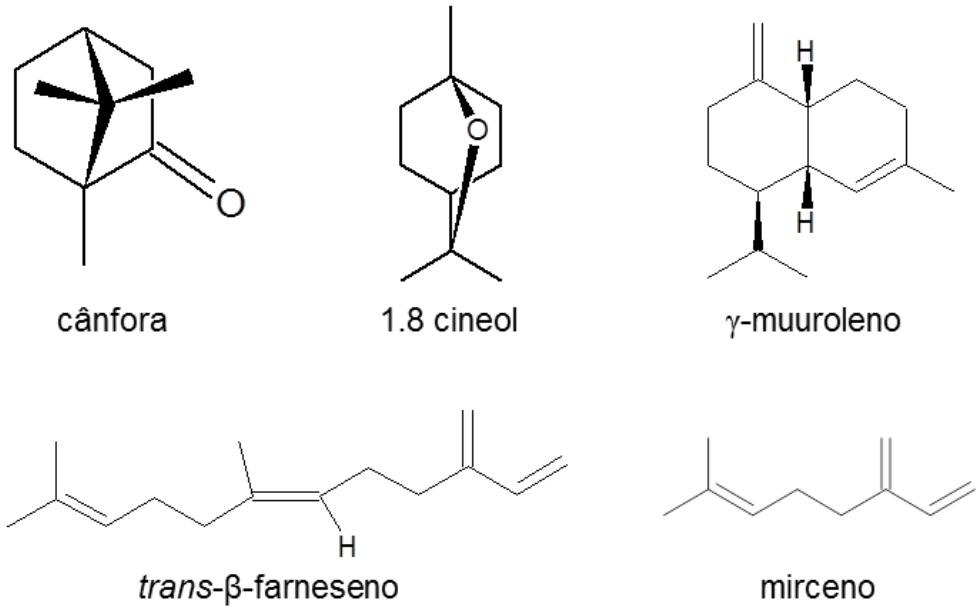

Figura 15 – Estruturas químicas das substâncias majoritárias presentes no óleo essencial de *Artemisia annua* L. submetida a níveis de adubação NPK. UTFPR, 2011.

Tabela 7 - Composição química média (%) do óleo essencial de folhas de *Artemisia annua* L. submetida à níveis de adubação NPK. UTFPR, 2011.

Substância	Tratamentos				Média geral	IR	IR Liter.
	0	0,5	1	2			
α-pineno[1]	0,68	1,26	0,77	1,05	0,94 [3]	929	939
canfeno[1]	1,51	2,66	1,71	2,25	2,03 [3]	943	954
sabineno[1]	0,62	0,95	0,70	1,07	0,83 [ns]	967	979
β-pineno[1]	0,40	0,72	0,44	0,56	0,53 [3]	971	---
Mirceno[1]	5,71	7,21	4,50	5,54	5,74 [ns]	985	990
p-cimeno[1]	1,89	2,43	2,02	2,59	2,23 [2]	1019	1024
Limoneno[1]	0,44	0,47	0,38	0,40	0,42 [ns]	1023	1029
1,8 cineol[1]	7,13	8,25	6,96	9,24	7,90 [ns]	1025	1031
γ-terpineno[1]	1,06	1,31	1,10	1,55	1,25 [ns]	1052	1059
cis-hidrato de sabineno[1]	0,32	0,31	0,34	0,38	0,34 [ns]	1060	---
terpinoleno[1]	1,24	1,29	0,82	0,84	1,05 [ns]	1093	1088
cânfora[1]	47,73	39,65	47,84	43,79	44,75 [ns]	1139	1146
borneol[1]	1,41	1,17	1,40	1,30	1,32 [ns]	1159	---
trans-β-terpineol[1]	1,20	1,09	1,13	1,33	1,19 [3]	1170	1163
α-terpineol[1]	1,21	1,15	1,12	1,27	1,18 [ns]	1184	1188
acetato de mirtenila[1]	0,63	0,48	0,69	0,47	0,56 [3]	1330	---
trans-cariofileno[2]	2,63	2,96	2,67	2,28	2,64 [ns]	1413	1419
trans-β-farneseno[2]	6,38	7,71	6,50	5,44	6,51 [ns]	1450	1456
γ-gurjuneno[2]	1,20	1,19	1,25	1,22	1,21 [ns]	1469	1477
γ-muuroleno[2]	5,98	6,93	7,14	6,94	6,75 [ns]	1474	1479
germacreno D[2]	0,52	0,49	0,53	0,56	0,52 [ns]	1479	1485
viridifloreno[2]	0,49	0,55	0,65	0,71	0,60 [2]	1490	1496
espatulenol[2]	1,53	1,64	1,46	1,27	1,47 [ns]	1569	1578
óxido de cariofileno[2]	0,99	1,10	0,82	0,91	0,96 [ns]	1575	1583
β-epoxi de cedreno[2]	0,61	0,58	0,64	0,61	0,61 [ns]	1621	1622
1-epi-cubenol[2]	0,72	0,68	0,67	0,78	0,71 [ns]	1626	1628
α-muurolol[2]	0,24	0,34	0,44	0,35	0,34 [ns]	1646	1646
α-cadinol[2]	0,43	0,41	0,35	0,36	0,39 [ns]	1649	1654
[1]monoterpenos	73,15	70,38	71,91	73,61	72,26 [ns]		
[2]sesquiterpenos	21,69	24,56	23,11	21,44	22,70 [ns]		
Total identificado	94,83	94,94	95,02	95,04	94,96		

IR Índice de retenção experimental; IR Liter. - Índice de retenção da literatura.
[2] médias dos tratamentos, na linha, se ajustam para regressão quadrática.
[3] médias dos tratamentos, na linha, se ajustam para regressão cúbica.
[ns] médias dos tratamentos, na linha, não se ajustam na análise de regressão a 5% de probabilidade.

Os diferentes níveis de adubação influenciaram quantitativamente em sete componentes, que se ajustaram significativamente as curvas de regressão, as equações, R^2 e C.V. estão apresentadas na tabela 8. Estas substâncias representam aproximadamente 8% da composição química média relativa do óleo essencial de *A. annua*, influenciando pouco no perfil químico do óleo essencial,

sendo elas: *p*-cimeno (2,23%), canfeno (2,03%), *trans*-β-terpineol (1,19%), α-pineno (0,94%), viridifloreno (0,6%), acetato de mirtenila (0,56%) e β-pineno (0,53%).

Tabela 8 - Composição química média (%), equações de regressão, coeficiente de determinação (R^2) e coeficiente de variação (C.V.) para as substâncias, que obtiveram ajuste na análise de regressão, do óleo essencial de plantas de *Artemisia annua* L. submetidas a níveis de adubação NPK. UTFPR, 2011.

Substância	Média (%)	Equação	R^2	C.V.
α-pineno	0,94	$y = 0,675 + 3,0158x - 4,4375x^2 + 1,5117x^3$	0,9999	36,34
canfeno	2,03	$y = 1,510 + 5,8571x - 8,5713x^2 + 2.9142x^3$	0,9999	29,62
β-pineno	0,53	$y = 0,395 + 1,6763x - 2,4713x^2 + 0.8375x^3$	0,9999	27,79
p-cimeno	2,23	$y = 2,000 + 0,2305x - 0,221x^2$	0,5083	45,06
trans-β-terpineol	1,19	$y = 1,200 + 0,4175x - 0,460x^2 + 0,11x^3$	0,9999	15,26
acetato de mirtenila	0,56	$y = 0,625 - 0,925x + 1,5525x^2 - 0.565x^3$	0,9999	26,52
viridifloreno	0,60	$y = 0,482 + 0,1925x - 0,038x^2$	0,9743	43,44

Ahmad Malik et al. (2009), estuando a influência de tratamentos químicos e biológicos no perfil do óleo essencial de *A. annua* cultivada na Índia, identificou 27 constituintes no óleo essencial de plantas tratadas com adubação N, P, K e S, e os componentes majoritários foram: álcool tujilico (33,3%), β -cariofileno (15,5%), *cis*-undec-5-eno (14,4%), artemísia cetona (6,0%) *trans*-nerolidol (5,8%). Nas plantas não tratadas, 20 substâncias foram identificadas, sendo os componentes majoritários: *cis*-limoneno 1,2-epóxido (22,1%), β-cariofileno (12,2%), artemísia cetona (11,5%), isopinocamphone (11,4%), álcool tujilico (9,9%) e cânfora (8,4%).

Corroborando com os resultados obtidos neste trabalho, alguns estudos com *A. annua*, também encontraram como constituintes majoritários a cânfora e 1,8 cineol (WOERDENBAG et al., 1993; FOGLIO, 1996; HAIDER et al., 2004; PERAZZO et al., 2003; QUISPE-CONDORI et al., 2005; GOEL et al., 2007; MOHAMMADREZA, 2008; BOLINA, 2011).

O óleo essencial de *A. annua* apresentou elevado conteúdo de cânfora (44,75%) e a comercialização desse constituinte pode vir a se tornar uma alternativa para o cultivo desta espécie, pois a cânfora tem uma alta demanda comercial devido aos seus diferentes usos (BAGCHI et al., 2003), podendo ser utilizada para a produção de plásticos, como base de filmes fotográficos, repelente de traças, em cosméticos e na formulação de medicamentos (ALVES; VICTOR, 2010). Óleos ricos em 1,8-cineol e cânfora são conhecidos por serem tóxicos para gorgulhos

(TRIPATHI et al., 2000) e possuem fortes efeitos inibitórios do crescimento de diversos gêneros de bactérias orais (JUTEAU et al., 2002; CHA et al., 2005). Como sugerido por Goel et al. (2007) o óleo essencial de *A. annua* tem potencial de uso e deve ser testado como protetor contra insetos em grãos armazenados e como componente de itens de produtos de beleza, perfumaria e saúde. Corroborando com Haider et al. (2004), que asseveraram que o óleo essencial de *A. annua* apresenta um potencial produtivo ainda pouco explorado.

A diversidade de resultados na literatura consultada mostra que a composição do óleo essencial de *A. annua* pode variar a proporção dos principais componentes pela adubação (AHMAD MALIK et al., 2009), como também alterar a composição do perfil, do óleo de acordo com a variedade (GOEL et al., 2007), local de cultivo, condições climáticas, partes utilizadas da planta (QUISPE-CONDORI et al., 2005; GOEL et al., 2007; AHMAD MALIK et al., 2009; POLICHUK et al., 2010) interações biológicas com espécies de fungos micorrizicos (AHMAD MALIK et al., 2009), variabilidade genética (WOERDENBAG et al., 1993; BOLINA 2010), época e horário do dia em que são coletados (FOGLIO, 1996).

5.6 CONCLUSÕES

O teor de óleo essencial nas folhas caiu linearmente com os níveis crescentes de adubação NPK, com maior média para o tratamento testemunha (9,46 ml kg^{-1} de massa seca de folhas). Para rendimento de óleo não houve ajuste significativo da reta (média 27,96 L ha^{-1}), sendo a maior média do tratamento uma dose (30,36 L ha^{-1}). Foram identificados 28 componentes no óleo essencial de *A. annua*, que compreendem 94,96% do perfil químico do óleo. As substâncias majoritárias foram cânfora (44,75%), 1,8 cineol (7,90%), γ-muuroleno (6,75%), *trans*-β-farneseno (6,51%) e mirceno (5,74%). Sete componentes do óleo essencial apresentaram variação em função dos níveis de adubação NPK: *p*-cimeno, canfeno, *trans*-β-terpineol, α-pineno, viridifloreno, acetato de mirtenila e β-pineno. O conteúdo relativo destes componentes variou de 0,53 a 2,23% representando aproximadamente 8% do perfil químico total do óleo essencial. A classe predominante no óleo essencial são monoterpenos (72%).

6 CAPÍTULO IV – PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Artemisia annua* L. VARIEDADE ARTEMIS ELICIADA COM ACIBENZOLAR-S-METÍLICO E PROTEÍNA HARPINA

6.1 RESUMO

A *A. annua* L. é uma espécie altamente aromática e produz grande quantidade óleo essencial, rico em terpenos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção e composição química do óleo essencial de plantas de *A. annua* var. Artemis eliciadas com acibenzolar-S-metílico e proteína harpina, cultivadas no campo em Pato Branco – Paraná. As plantas de *A. annua* cultivadas em campo, durante os anos de 2008 e 2009, foram submetidas a eliciação com acibenzolar-S-metílico (ASM) e dois produtos a base de proteína harpina, por meio de três pulverizações semanais, desde o início do período de indução floral até uma semana antes da colheita. O óleo essencial foi hidrodestilado em aparato clevenger e analisado em cromatógrafo à gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM) e cromatógrafo à gás com detector de ionização de chama (CG-DIC) para identificação e quantificação das substâncias do óleo essencial. A aplicação dos eliciadores não resultou em alterações significativas no teor e rendimento de óleo essencial. No perfil químico do óleo essencial de *A. annua* foram identificados 31 componentes, que compreendem 91,5% do óleo essencial. Os tratamentos com os eliciadores acibenzilar-S-metílico e harpina não resultaram em diferenças significativas para nenhum das substâncias identificadas e quantificadas no óleo essencial. Os componentes majoritários foram cânfora (43,38%), 1,8 cineol (9,28%), mirceno (7,69%) γ-muuroleno (5,00%), canfeno (4,54%) e *trans*-β-farneseno (3,98%). Os monoterpenos foram a classe predominante no óleo essencial (79,8%).

Palavras-chave: Eliciação, cânfora, 1,8 cineol.

6.2 ABSTRACT

*A. annua*L. is a highly aromatical species and it produces great amount of essential oil, rich in terpenes. The objective of this work was to evaluate the production and

chemical composition of the essential oil in plants of *A. annua* var. Artemis eliciated with acibenzolar-S-methylic and harpin protein, cultivated in the field in Pato Branco - Paraná. Plants of *A. annua*, cultivated in the field in Pato Branco- Paraná, during the years of 2008 and 2009, were submitted to the eliciation with acibenzolar-S-methylic (ASM) and two products harpin-protein based, by means of three weekly sprayings, since the beginning of the period of floral induction up to one week before the harvest. The essential oil was hydrodistilled in Clevenger apparatus and analyzed in gas chromatograph connected the spectrometer of masses (CG-EM) and gas chromatograph with flame ionization detector (CG-DIC) for identification and quantification of substances of the essential oil. The application of the elicitors did not result in significant alterations in the essential oil content and yeld. Thirty-one components were identified in the *A. annua* essential oil chemical profile that comprise 94.96%. The treatments with the elicitors acibenzilar-S-methylic and harpin did not result in significant differences for any of the identified and quantified substances in the essential oil. The majoritarian components were camphor (43.38%), 1,8 cineole (9.28%), mircene (7.69%) γ-muurolene (5.00%), camphene (4.54%) *trans*-β-farnesene (3.98%). Monoterpenes were the predominant class in the essential oil (79.8%).

Keywords: Eliciation, camphor, 1,8 cineole.

6.3 INTRODUÇÃO

A *Artemisia annua* L. é uma planta herbácea anual altamente aromática, pertencente à família Asteraceae, com hábito de crescimento determinado (MARCHESE et al., 2002; MARCHESE, 2006a) chegando a 3 metros de altura (MARCHESE, 2006a). Tem origem em regiões de clima temperado da China (FERREIRA et al., 2005). É conhecida por ser a principal fonte de artemisinina, uma lactona sesquiterpênica, utilizada como principio ativo antimalárico (JAIN et al., 1996; WHO, 2011; JAMALEDDINE et al., 2011; NGUYEN et al., 2011; JHA et al., 2011). O extrato aquoso da planta apresenta efeito alelopático em algumas espécies cultivadas e em plantas daninhas (MAGIERO et al., 2009; MORVILLO et al., 2011). Alguns sesquiterpenos produzidos pela planta, causam

forte inibição do crescimento de várias espécies vegetais (BAGCHI et al., 1997), bem como, acentuada ação inseticida (JAIN et al., 1996; BAGCHI et al., 2003).

A. annua possui grande capacidade de produção de óleo essencial (QUITÉRIO, 2006), sendo seu máximo acúmulo no início da floração, podendo chegar de 0,49% (BAGCHI et al., 2003) a 0,53% da matéria fresca (GALAMBOSI, 1980). O óleo apresenta atividade antioxidante, bactericida e antifúngica (JUTEAU et al., 2002; MAGALHÃES et al., 2004; CAVAR et al., 2011). A espécie também é utilizada comercialmente na perfumaria, na cosmética e em produtos sanitários (GALAMBOSI, 1980; JAIN et al., 1996; MAGALHÃES et al., 2004). Segundo Biogenic Stimulants (2011), sitio web europeu de vendas on-line, em 15 de dezembro de 2011, o preço para compra do *wormwood oil* estava em US$ 750,00 por kg, a granel, e US$ 27,33 por 10 ml fracionados.

O óleo essencial de *A. annua* apresenta um potencial produtivo ainda pouco explorado (HAIDER et al., 2004). Os compostos da classe dos terpenos são os principais no óleo essencial de *A. annua* (MA et al., 2007), sendo predominante monoterpenos no óleo essencial das folhas (GOEL et al., 2007; AHMAD MALIK et al., 2009) e sesquiterpenos do caule (GOEL et al., 2007). A Eliciação, como inoculação com fungos, pode alterar a composição do óleo essencial de *A. annua*, bem como aumentar a sua produção (AHMAD MALIK et al., 2009).

Inúmeros compostos tem ação eliciadora, gerando estímulo a produção de substâncias do metabolismo secundário, responsáveis pela resistência natural dos vegetais (TOMAZELI, 2010). Estes compostos podem ser bióticos ou abióticos (MARCHESE et al., 2006; DANNER et al., 2008; AHMAD MALIK et al., 2009). A harpina (eliciador biótico), e o acibenzolar-s-metílico (ASM) (produto sintético que mimetiza o ácido salicílico - AS) são produtos de ação eliciadora (DANNER et al., 2008; TOMAZELI, 2010). A proteína harpina é produzida por diversas bactérias patogênicas em plantas e foi inicialmente isolada da bactéria *Erwinia amylovora.* Esta proteína tem ação confirmada na eliciação e indução à resistência sistêmica adquirida (RSA), e pode promover aumentos na taxa fotossintética (MARCHESE, 2006b). A proteína harpina pode ser associada a diversos vegetais, e tem grande potencial na ativação de resistência sob diferentes aspectos e níveis de eficiência (TOMAZELI, 2010). Os produtos a base de ASM funcionam como eliciadores abióticos. O ASM tem apresentado resposta significativa na indução da Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) e está associado a ativação de genes de resistência e acúmulo de proteínas associadas a patogênese (DURRANT; DONG, 2004).

Vários estudos têm sido realizados, em diferentes países, buscando identificar e quantificar os constituintes do óleo essencial de *A. annua*, com diferentes variedades ou acessos da espécie. Perazzo et al. (2003), Quispe-Condori et al., 2005, Mohammadreza (2008), Bolina (2011) e Haider et al. (2004), encontraram cânfora e 1,8 cineol dentre os constituintes majoritários do óleo essencial dessa espécie. Cavar et al. (2011) identificaram mais de 100 compostos, porém cânfora e artemisia cetona foram as principais substâncias presentes no óleo essencial de plantas selvagens de *A. annua* cultivadas na Bósnia. Estudando a composição química dos óleos essenciais de *A. annua* da cultivar Jwarharti, Goel et al. (2007), identificaram 86, 77 e 63 combinações de substâncias na folha, pétala e óleos de caule, respectivamente. Descobriram grandes diferenças na composição dos óleos. A cânfora, presente nas folhas, estava ausente no óleo essencial das pétalas e o ácido dihidroartemisinico estava ausente no óleo essencial do caule.

Woerdenbag et al. (1993) estudando variedades de *A. annua* de origem chinesa e vietnamita oriundas de sementes, sugeriu a existência de diferentes quimiotipos quando observou que as plantas de origem chinesa continham maior conteúdo de óleo essencial 4,0% (volume/massa seca) e os principais constituintes foram artemisia cetona (63,9%), artemísia álcool (7,5%), mirceno (5,1%), α-guaieno (4,7%) e cânfora (3,3%) e nas plantas de origem vietnamita 1,2% (volume/massa seca) de óleo essencial, e os constituintes principais foram cânfora (21,8%), germacreno D (18,3%), β-cariofileno (5,6%), trans-β-farneseno (3,8%) e 1,8-cineol (3,1%). Diferenças também foram encontradas nos teores de artemisinina em extrato diclorometano do material vegetal herbáceo: 1% de artemisinina (matéria seca) na variedade vietnamita e 0,17% de artemisinina (matéria seca) na variedade chinesa. Destacaram que a via de biossíntese de terpenóides seguiu predominantemente para formação de sesquiterpenos nas plantas da variedade vietnamita e monoterpenos para a varidade chinesa.

Ahmad Malik et al. (2009) estudando a influência de tratamentos químicos - adubação N, P, K e S - e biológicos, inoculação com *Glomus* e *Azospirillum,* em plantas de *A. annua*, observaram que os monoterpenos foram predominantes no óleo essencial de plantas testemunha e tratadas com *Azospirillum*, quase ausência de monoterpenos e grande quantidade de sesquiterpenos no óleo essencial das plantas tratadas com *Glomus*, além de falta de tricomas nestas plantas. Vinte e duas substâncias (52,1% monoterpenos e 47,9% sesquiterpenos) foram identificados no óleo essencial de plantas tratadas com

Azospirillum. Dezessete componentes foram identificados no óleo essencial de plantas tratadas com *Glomus*.

A diversidade de resultados mostra que a composição química do óleo essencial de *A. annua* pode variar a proporção das substâncias majoritárias, como alterar a composição do perfil químico do óleo essencial de acordo com a variedade (GOEL et al., 2007), local de cultivo, condições climáticas, partes utilizadas da planta (QUISPE-CONDORI et al., 2005; GOEL et al., 2007; AHMAD MALIK et al., 2009; POLICHUK et al., 2010) eliciação pela interação biológica com espécies de fungos micorrizicos (AHMAD MALIK et al., 2009; BINET et al., 2011), adubação (AHMAD MALIK et al., 2009), variabilidade genética (WOERDENBAG et al., 1993; BOLINA, 2010), época e horário do dia em que são coletados (FOGLIO, 1996).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção e a composição química do óleo essencial de plantas de *Artemisia annua* L. var. Artemis eliciada com acibenzolar-S-metílico e proteína harpina, cultivadas a campo em Pato Branco – Paraná.

6.4 MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi conduzido em campo durante a safra 2008 e 2009, na estação experimental do Curso de Agronomia da UTFPR, localizado na cidade de Pato Branco-PR, em latitude 26º07' S, longitude 52º41' W, altitude de 760m, clima subtropical úmido (Cfa), segundo classificação de Köppen, num Latossolo Vermelho distrófico típico.

O delineamento experimental usado foi em blocos casualizados, com quatro repetições e quatro tratamentos, sendo três ativadores da defesa química: ASM (acibenzolar-S-metílico, 500 mg L^{-1} - Produto comercial Bion® 500 WG); Harpina-M (750 mg L^{-1} - Produto comercial Messenger® - 3% i.a.) e Harpina-P (750 mg L^{-1} - Produto comercial Proact™ - 1% i.a.), e água destilada como controle (Tabela 9). Cada unidade experimental foi constituída de 9,6 m², 25 plantas, cinco linhas de 2,4 m de comprimento, distância entre linhas de 1,0 m e espaçamento de 0,6 m, e densidade de 16.667 plantas por hectare. As doses foram determinadas segundo MARCHESE (2006b).

As mudas de *A. annua* var. Artemis provenientes de sementes (16/08/08) foram produzidas em condição de fotoperíodo de 15 horas em casa de

vegetação (luz natural complementada com luz artificial). As sementes foram semeadas em vasos plásticos de 200 ml contendo substrato orgânico esterilizado. Com aproximadamente 50 dias e 15 cm de altura, as mudas foram transplantadas para o campo em 06/10/08.

Tabela 9 - Descrição detalhada dos tratamentos utilizados, moléculas, doses, produto comercial e aplicações. UTFPR, 2011.

Tratamentos	Princípio Ativo	Dose (mg L^{-1})	Calda (L ha^{-1})	Produto Comercial	Aplicações*
ASM	acibenzolar-S-metílico	500	200	Bion® 500 WG	3
Harpina-M	Proteína Harpina	750	200	Messenger®	3
Harpina-P	Proteína Harpina	750	200	Proact™	3
Controle	-	-	200	-	3

* Aplicações semanais, iniciando após a indução floral até uma semana antes da colheita.

A correção da fertilidade foi realizada previamente com correção da acidez em toda área do experimento aplicando 2,7 t ha^{-1} de calcário filler (PRNT 91%), incorporando através de uma escarificação e uma gradagem, com base na análise de solo (tabela 10). Adubação de base foi realizada em toda área com N: 40 kg ha^{-1}; P_2O_5: 135 kg ha^{-1}; K_2O: 60 kg ha^{-1}, sendo as formulações: Uréia, Super Fosfato Simples e Cloreto de Potássio. O nitrogênio (N) em cobertura foi 277,5 kg ha^{-1} de N na formulação Uréia.

Tabela 10 - Características químicas do solo antes da implantação do experimento. UTFPR., 2011.

pH - $CaCl_2$	**Índice SMP**	**MO**	**P**	**K^+**	**Ca^{2+}**	**Mg^{2+}**	**Al^{3+}**	**H^++Al^{3+}**	**CTC**	**V**	**m**
		g dm^{-3}	mg dm^{-3}	$cmol_c$ dm^{-3}						%	
4,87	5,6	54,18	6,16	0,47	4,33	3,02	0,17	7,36	15,18	51,54	2,11

MO = matéria orgânica; V = saturação por bases; m = saturação por alumínio.

Os eliciadores foram aplicados usando um pulverizador costal portátil equipado com um cilindro de CO_2 conectado a uma haste de alumínio com 06 bicos, com pressão constante e vazão média aproximada de 35,58 ml s^{-1}.

Quando as plantas sofreram a indução floral (aumento abrupto da altura e número de entrenós) foi iniciada a aplicação dos eliciadores. Foram três aplicações semanais sendo a 1ª em 21/02/09 a 2ª em 28/02/09 e a 3ª em 07/03/09), permitindo que durante cada pulverização as plantas recebessem em média 3,33 mg $planta^{-1}$ de acibenzolar-S-metílico (Bion® 500 WG), 5,03 mg $planta^{-1}$ de Harpina-M

(Messenger®) e 5,17 mg planta^{-1} de Harpina-P (Proact™). Para o controle foi realizada aplicação apenas com água destilada (tabela 9).

A colheita foi realizada cortando as nove plantas centrais rente ao solo no dia 14/03/09 (159 dias após o transplante), quando 50 +1 % das plantas da parcela já haviam iniciado a emissão dos botões florais, fase de máximo acumulo de óleo essencial pela planta (GALAMBOSI, 1980).

Após secagem do material em estufa com circulação de ar a ± 35 ºC, foi realizada a extração de óleo essencial por hidrodestilação em aparato Clevenger, por 60 min. Após aferir o teor do óleo essencial, este foi armazenado hermeticamente em vidros âmbar em geladeira a 4 ºC até avaliação da composição química.

A separação e quantificação (método de normalização de área) das substâncias presentes no óleo essencial foram conduzidas no Laboratório de Fitoquímica do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e realizadas em cromatógrafoà gás com detector de ionização de chama (CG-DIC, Shimadzu, GC-2010) dotado de coluna capilar: DB- 5(J&W Scientific; 30,0m x 0,25mm x 0,25µm) e temperatura do forno 60 – 240 ºC, 3 ºC por min; split: 1/20, volume de injeção 1µl de solução (1 mg de óleo essencial/ml de acetato de etila). A identificação das substâncias foi realizada em cromatógrafo à gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000), operando por impacto de elétrons (70eV); Coluna capilar: OV-5 (Ohio Valley Specialty Chemical, Inc.; 30,0m x 0,25mm x 0,25µm), e as mesmas condições operacionais do CG-DIC. A identificação das substâncias efetuada através da comparação dos espectros de suas massas, com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist. 62 lib.), padrão autêntico de linalol (Sigma-Aldrich; 95%) e índice de retenção (ADAMS, 1995). Os índices de retenção das substâncias foram obtidos em comparação com uma mistura padrão de n-alcanos (C_9-C_{24}), aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (1963).

As variáveis avaliadas foram o teor de óleo essencial (TOLS; ml kg^{-1} de massa seca de folhas), a produtividade de óleo essencial (POLS; L ha^{-1}) e o perfil químico do óleo essencial.

Os dados foram submetidos à testes de normalidade, análise de variância e análises complementares pelo programa ASSISTAT (Silva et al., 2009).

6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as variáveis teor de óleo essencial (TOLS) e produtividade de óleo essencial (POLS) não houve diferença significativa (figura 16), no entanto a média do tratamento ASM para estas duas variáveis foi levemente inferior. A precisão para estas variáveis ficou entre média e alta, mostrando boa confiabilidade dos dados.

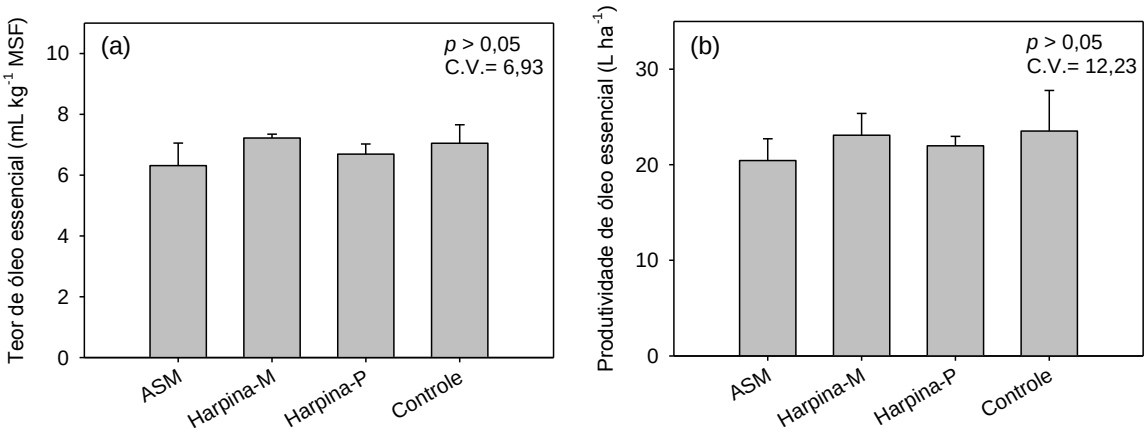

Figura 16 - (a) Teor de óleo essencial (TOLS) e (b) produtividade de óleo essencial (POLS) de *Artemisia annua* L. eliciada com acibenzolar-S-metílico e harpina. MSF: massa seca de folhas; C.V.: coeficiente de variação; *p*: probabilidade do erro. UTFPR, 2011.

A análise do perfil químico do óleo essencial de *A. annua* identificou 31 substâncias e correspondendo a aproximadamente 91,5% do perfil do óleo essencial (tabela 11).

Os tratamentos com os eliciadores ASM, harpina-M e harpina-P não resultaram em diferenças significativas para os componentes do óleo essencial de *A. annua*. As substâncias majoritários foram cânfora (43,38%), 1,8 cineol (9,28%), mirceno (7,69%) γ-muuroleno (5,00%), canfeno (4,54%) e *trans*-β-farneseno (3,98%) que juntos compõem aproximadamente 73% do perfil químico do óleo essencial (tabela 11). As demais 27 substâncias juntas representam aproximadamente 21% da composição química dos óleos essenciais. Os monoterpenos são a classe predominantes no óleo essencial (79,8%). As estruturas químicas das substâncias majoritárias estão apresentadas na figura 17.

Tabela 11 - Composição química média (%) do óleo essencial de folhas de plantas de *Artemisia annua* L. eliciadas com ativadores da defesa química acibenzolar-S-metil e proteína Harpina. UTFPR, 2011.

Substância	Tratamentos	Média	IR	IR

	ASM	Harpina-M	Harpina-P	Controle	geral		Liter.
α-pineno[1]	2,16	2,04	2,11	2,14	2,11 ns	929	939
canfeno[1]	4,86	4,31	4,53	4,48	4,54 ns	943	954
sabineno[1]	1,33	1,19	1,74	1,72	1,49 ns	967	975
β-pineno[1]	0,83	0,94	1,07	0,95	0,95 ns	971	979
mirceno[1]	6,65	7,11	7,90	9,03	7,67 ns	985	990
α-terpineno[1]	0,21	0,22	0,22	0,24	0,22 ns	1015	1017
p-cimeno[1]	3,97	2,71	3,01	3,83	3,38 ns	1019	1024
limoneno[1]	0,34	0,37	0,40	0,44	0,39 ns	1023	1029
1,8 cineol[1]	8,52	7,87	10,80	9,92	9,28 ns	1025	1031
γ-terpineno[1]	1,51	1,22	1,43	1,78	1,48 ns	1052	1059
cis-hidrato de sabineno[1]	0,27	0,34	0,30	0,29	0,30 ns	1060	---
terpinoleno[1]	0,66	1,11	0,66	0,86	0,82 ns	1093	1088
cânfora[1]	42,75	46,70	43,29	40,80	43,38 ns	1139	1146
pinocarvona[1]	tr	0,21	0,30	tr	---	1159	1164
borneol[1]	1,42	1,49	1,11	1,28	1,32 ns	1159	---
terpinen-4-ol[1]	0,99	0,99	1,02	1,04	1,01 ns	1170	1163
α-terpineol[1]	0,72	0,88	0,93	0,94	0,87 ns	1184	1188
acetato de mirtenila[1]	0,50	0,60	0,58	0,55	0,56 ns	1330	---
trans-cariofileno[2]	1,96	1,67	1,37	1,56	1,64 ns	1413	1419
trans-β-farneseno[2]	4,38	3,87	3,54	4,15	3,98 ns	1450	1456
γ-gurjuneno[2]	1,25	0,92	1,17	0,89	1,06 ns	1469	1477
γ-muuroleno[2]	5,76	4,35	4,84	5,04	5,00 ns	1474	1479
β-selineno[2]	0,52	0,38	0,42	0,40	0,43 ns	1479	1485
biciclogermacreno[2]	0,55	0,44	0,47	0,51	0,49 ns	1490	1496
espatulenol[2]	1,20	1,32	0,95	1,17	1,16 ns	1569	1578
oxido de cariofileno[2]	1,04	1,14	0,89	0,78	0,96 ns	1575	1583
β-epoxi de cedreno[2]	0,62	0,68	0,50	0,53	0,58 ns	1621	1622
cis-cadin-4-en-7-ol[2]	0,78	0,66	0,64	0,63	0,68 ns	1632	1636
α-muurolol[2]	tr	0,48	0,38	0,25	---	1646	1646
α-cadinol[2]	0,33	0,41	0,34	tr	---	1649	1654
γ-bisabolol[2]	tr	tr	tr	tr	---	1681	1685
[1]monoterpenos	77,5	80,0	81,3	80,3	79,8 ns		
[2]sesquiterpenos	18,6	16,2	15,4	16,0	16,6 ns		
Total identificado	90,9	90,8	92,2	92,0	91,5		

IR Índice de retenção experimental; IR Liter. - Índice de retenção da literatura; tr - traço da substância (tr ≤ 0,05%).

ns médias dos tratamentos, na linha, não diferem pelo teste F a 5% de probabilidade.

Contrariamente, Ahmad Malik et al. (2009) encontraram alterações no óleo essencial de plantas de *A. annua*, através da eliciação biótica, pela inoculação com *Glomus* e *Azospirillum*. Observaram que os monoterpenos foram predominantes no óleo essencial de plantas testemunha e tratadas com *Azospirillum* e grande quantidade de sesquiterpenos no óleo essencial das plantas tratadas com *Glomus*, além de falta de tricomas nestas plantas. Vinte e dois componentes (52,1%

monoterpenos e 47,9% sesquiterpenos) foram identificados no óleo essencial de plantas tratadas com *Azospirillum*, neral (31,1%), β-cariofileno (25,1%), artemísia cetona (10,0%), álcool thujyl (9,4%), *trans*-bergamoteno (8,5%) e espatulenol (4,8%) foram os componentes principais. Dezessete substâncias foram identificadas no óleo essencial de plantas tratadas com *Glomus*. Os principais constituintes foram β-cariofileno (51,2%), *trans*-bergamoteno (15,4%), α-gurjuneno-(14,3%), germacreno D (5,1%) e ledol (4,5%). Binnet et al. (2011) também encontraram alterações no óleo essencial da espécie *A. umbelliformis* Lam., com eliciação por micorriza arbuscular (*Trifolium pratense*), alterando quantitativamente três componentes do óleo essencial: (*E*)-β-ocimeno, (*E*)-2-Decenal e (*E,E*)-2,4-Decadienal.

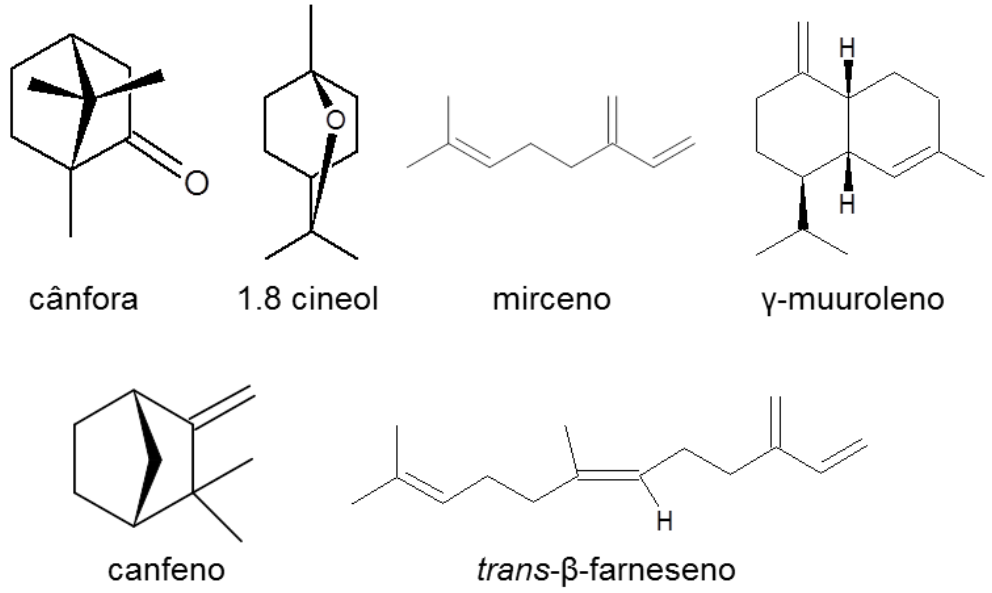

Figura 17 – Estruturas químicas das substâncias majoritárias presentes no óleo essencial de *Artemisia annua* L. eliciada com proteína harpina e acibenzolar-S-metílico. UTFPR, 2011.

Corroborando com os resultados obtidos neste trabalho, alguns estudos com *A. annua*, também encontraram como constituintes majoritários a cânfora e 1,8 cineol (WOERDENBAG et al., 1993; HAIDER et al., 2004; PERAZZO et al., 2003; QUISPE-CONDORI et al., 2005; GOEL et al., 2007; MOHAMMADREZA, 2008; BOLINA, 2011).

O óleo essencial de *A. annua* apresentou elevado conteúdo de cânfora (43,38%). A comercialização deste constituinte pode vir a se tornar uma alternativa para o cultivo desta espécie, pois a cânfora tem uma alta demanda comercial devido aos seus diferentes usos (BAGCHI et al., 2003), podendo ser utilizada para a produção de plásticos, como base de filmes fotográficos, repelente de traças, em

cosméticos e na formulação de medicamentos (ALVES; VICTOR, 2010). Óleos ricos em 1,8-cineol e cânfora são conhecidos por serem tóxicos para gorgulhos (TRIPATHI et al., 2000) e possuem fortes efeitos inibitórios de crescimento de diversos gêneros de bactérias orais (JUTEAU et al., 2002; CHA et al., 2005). Como sugerido por Goel et al. (2007) o óleo essencial de *A. annua* tem potencial de uso e deve ser testado como protetor contra insetos em grãos armazenados e como componente de itens de produtos de beleza, perfumaria e saúde. Corroborando com Haider et al. (2004), que asseveraram que o óleo essencial de *A. annua* apresenta um potencial produtivo ainda pouco explorado.

6.6 CONCLUSÕES

A aplicação dos eliciadores não resultou em alterações significativas no teor e rendimento de óleo essencial. No perfil químico do óleo essencial de *A. annua* foram identificados 31 componentes, que compreendem 91,5% do óleo essencial. Os tratamentos com os eliciadores acibenzilar-S-metílico e harpina não resultaram em diferenças significativas para nenhum das substâncias identificadas e quantificadas no óleo essencial. Os componentes majoritários foram cânfora (43,38%), 1,8 cineol (9,28%), mirceno (7,69%) γ-muuroleno (5,00%), canfeno (4,54%) *trans*-β-farneseno (3,98%). Os monoterpenos foram a classe predominante no óleo essencial (79,8%).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No experimento com adubação NPK foram obtidos ótimos rendimentos de biomassa, com resposta quadrática para massa seca de folhas, mas é importante continuar os estudos com adubação de *A. annua* e realizar novos experimentos, em especial experimentos com arranjo fatorial, testando diferentes doses para cada um dos elementos NPK, a fim de aumentar a compreensão das necessidades nutricionais da espécie e potencial produtivo a campo.

Em face da falta de mais estudos locais com adubação de *A. annua* este trabalho é referência para estabelecer parâmetros iniciais de adubação desta espécie, contribuindo para o conhecimento sobre adubação de cultivos em campo, nas condições avaliadas, já que os resultados de rendimento de biomassa, especialmente massa seca de folhas, encontram-se entre os mais elevados dentre os estudos realizados em Pato Branco e no Brasil.

O experimento com os eliciadores acibenzilar-S-metílico e harpinas não demonstrou influenciar os caracteres de interesse no cultivo de *A. annua*, como teor de artemisinina e de biomassa. O que confirma resultados de trabalhos preliminares que também não apresentaram diferenças nesses caracteres para as substâncias eliciadoras avaliadas.

A caracterização do perfil químico do óleo essencial de *A. annua* nos experimentos não revelou grandes diferenças, apenas no experimento com adubação foi possível detectar variações com os níveis de adubação, mas somente para componentes minoritários do óleo essencial. No entanto a caracterização química do óleo essencial mostrou um óleo essencial com predominância de monoterpenos e rico em cânfora e 1,8 cineol, o que indica um mercado adicional para a espécie, pois a cânfora tem uma alta demanda comercial, devido a sua utilização para várias finalidades e comprovadamente, óleos ricos nestes dois compostos, apresentam ação bactericida e inseticida.

REFERÊNCIAS

A2S2 - ASSURED ARTEMISININ SUPPLY SYSTEM. News. 2012. Disponível em: <http://www.a2s2.org/>. Acesso em: 27 de abr. 2012.

ACTON, N; KLAYMAN, D. L; ROLLMAN, I. J. Reductive electrochemical HPLC assay for artemisinin (qinghaosu). **Planta Med**, v.5, p.445-446 , 1985.

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured, Carol Stream, Illinois, 1995. 469 p.

AHAMAD MALIK, A; AHMAD, J; MIR, S. R; ALI, M; ABDIN, M. Z. Influence of chemical and biological treatments on volatile oil composition of *Artemisia annua* Linn. **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 380–383, 2009.

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

BAGCHI, G. D; HAIDER, F; DWIVEDI, P. D; SINGH, A; NAQVI, A. A. Essential oil constituents of *Artemisia annua* during different growth periods at monsoon conditions of subtropical north indian plains. **Journal of Essential Oil Research***,* v.15, p. 248-250, 2003.

BAGCHI, G.D; RAM, M; SHARMA, S; KUMAR, S. Effect of the date on growth and development of *Artemisia annua* under subtropical climatic conditions. **Planta Med.**, v.5, p.445-446, 1997.

BINET, M. N; DIEDERIK, V. T; DEPRETRE, N; KOSZELA, N; CHAMBOM, C; GIANINAZZI, S. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with Artemisia umbelliformis Lam, an endangered aromatic species in Southern French Alps, influence plant P and essential oil contents**. Mycorrhiza**, v. 21, p. 523–535, 2011.

BIOGENIC STIMULANTS. The worm wood oil. 2011. Disponível em: <http://www.bpg.bg/bulgarianrose/essentialoils/oils/wormwood.phtml>. Acesso em: 15 dez. 2011.

BLOG SAÚDE. Saúde dá preferência a produtos nacionais. Disponível em: <http://www.blog.saude.gov.br/saude-da-preferencia-a-produtos-nacionais/>. Acesso em: 23 de abr. 2012.

BOLINA, C. de. O. **Variabilidade genética e associação entre caracteres agronômicos, fisiológicos e fitoquímicos em variedades de *Artemisia annua* L.** 2011. 91 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2011.

BRESSAN, D. F. **Uso dos eliciadores acibenzolar-s-metílico e harpina na indução de resistência em plantas de feijoeiro comum ao crestamento bacteriano**. 2011. 64 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco. 2011.

CAVAR, S. C´; MAKSIMOVI, M; VIDIC, D, PARIC, A. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. **Industrial Crops and Products**, p. 1–7, 2011.

CHA, J-D; JEONG, M-R; CHOI, H-J; JEONG, S-IL; MOON, S-E; YUN, S-IL; KIM, Y-H; KIL, B-S; SONG, Y-H. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Artemisia lavandulaefolia*, **Planta Med**, v. 71(6), p. 575-577, 2005.

CHARLES, D.J; SIMON, J.E; WOOD, K.V; HEINSTEIN, P. Germplasm variation in artemisinin content of *Artemisia annua* using an alternative method of artemisinin analysis from crude plant extracts. **J. Nat. Prod.**, v.53, p.157-160, 1990.

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

DANNER, M. A. et al . Indução de resistência à podridão-parda em pêssegos pelo uso de eliciadores em pós-colheita. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 43, n. 7, July 2008 .

DAVIES, M.J; ATKINSON, C. J; BURNS, C; WOOLLEY, J. G; HIPPS, N. A; ARROO, R. R. J; DUNGEY, N; ROBINSON, T; BROWN, P; FLOCKART, I; HILL, C; SMITH, L; BENTLEY, S. Enhancement of artemisinin concentration and yield in response to optimization of nitrogen and potassium supply to *Artemisia annua*, **Annals of Botany**, v. 104, p. 315-323, 2009.

DAVIES, M.J; ATKINSON, C.J; BURNS, C; ARROO, R; WOOLLEY, J. Increases in leaf artemisinin concentration in *Artemisia annua* in response to the application of phosphorus and boron. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 1465– 1473, 2011.

DELABAYS, N. **Biologie de la reproduction chez L'*Artemisia annua* L. et genetique de la production en artemisinine**. 1997. 169p. Tese (Doutorado) - Universite de Lausanne, France.

DELABAYS, N; JENELTEN, U; PARIS, M; PIVOT, D; GALLAND, N. Aspects agronomiques et génétiques de la production dártémisinine à partir d´*Artemisia annua* L. Revue Suisse de Viticulture Arboriculture Horticulture, v.26, p. 291-296, 1994.

DELABAYS, N; SIMONNET, X; GAUDIN, M. The genetics of artemisinina content in *Artemisia annua* L. and the breeding of high yielding cultivars. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 15, p. 1795-1801, 2001.

DONDORP, Arjen M.; YEUNG, Shunmay; WHITE, Lisa; NGUON, Chea; DAY, Nicholas P.J.; SOCHEAT, Duong; SEIDLEIN, Lorenz von. Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. 2010. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p.272-280, 2010.

DURRANT, W.E.; DONG, X. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 185-209, 2004.

EDEN BIOSCIENCE CORPORATION. **Harpin activates multiple plant defense response pathways**. USA, 5p. 2002a.

EDEN BIOSCIENCE CORPORATION. **Messenger treatment increases net photosynthetic rates in multiples plant species**. USA, 3p. 2002b.

EDRIS, A.E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review, **Phytotherapy Research**, 21 (4), pp. 308-323. 2007.

EFFERTH, T. Mechanistic perspectives for 1,2,4-trioxanes in anti-cancer therapy. **Drug Resistance Updates**, v.8, n.1-2, p.85-97, 2005.

EISENSTEIN, Michael. Development: Holding out for reinforcements. **Nature**, v.484, p.16, 2012.

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

FERREIRA, J. F. da. S. **Production and detection of artemisinin in *Artemisia annua* L**. 1994. 125 f. Tese (Doutorado) - Purdue University, EUA, Purdue,1994.

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

_____; LAUGHLIN, J. C; DELABAYS, N; MAGALHÃES, P. M. Cultivation and genetics of *Artemisia annua* L. for increased production of the antimalarial artemisinin. **Plant Genetic Resources**, v.3, n.2, p.206–229, 2005.

_____. Nutrient deficiency in the production of artemisinin, dihydroartemisinic acid, and artemisinic acid in *artemisia annua* L. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v.55, p. 1686-1694, 2007.

_____; LUTHRIA, D. L. Drying affects artemisinin, dihydroartemisinic acid, artemisinic acid, and the antioxidant capacity of *Artemisia annua* L. leaves. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v.58, p. 1691–1698, 2010.

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

FOGLIO, M. A. **Um estudo químico da *Artemisia annua* L. aclimatada no Brasil**. 1996. 164f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

FONTES, J. R. A; MAGALHÃES, P. M; CHAVES, F. C. M; MORAIS, R; GONÇALVES, J. R; HIDALGO, A. F; POHLIT, M. A. Períodos de interferência de plantas daninhas na cultura da *Artemisia annua* L. Cultivada em Várzea do rio Solimões. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, 2009.

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

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

GOEL, D; GOEL, R; SINGH, V; ALI, M. E; MALLAVARAPU, G, R. KUMAR, S.Composition of the essential oil from the root of *Artemisia annua*. **Journal of Natural Medicines**, v. 61, p. 458-461, 2007.

GRAHAM, I. A. The genetic map of *Artemisia annua* L. identifies loci affecting yield of the antimalarial drug artemisinin. **SCIENCE**, v. 327, p. 328-331, 2010.

HAIDER, F; DWIVEDI, P; SINGH, S; NAQVI, A. A; BAGCHI, G. Influence of transplanting time on essential oil yield and composition in Artemisia annua plants grown under the climatic conditions of sub-tropical north india. **Flavour and Fragrance Journal**, v, 19, p. 51-53, 2004.

JAIN, D. C; MATHUR, A. K; GUPTA, M. M; SINGH, A. K; VERMA, R. K; GUPTA, A. P; KUMART, S. Isolation of high artemisinin-yielding clones of *Artemisia annua*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 5, p. 993-1001, 1996.

JAMALEDDINE, Z. O; LYAM, P; FAJIMI, O; GIWA, A; AINA, A; LAWYER, E. F; OKERE, A. U; ODOFIN, W. T. In *vitro* growth response of *Artemisia annua* seeds to different concentrations of plant growth regulators. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.77, p.17841-17844, 2011.

JHA, P; RAM, M; KHAN, M. A; KIRAN, U; MAHMOODUZZAFAR, ABDIN, M. Z. Impact of organic manure and chemical fertilizers on artemisinin content and yield in *Artemisia annua* L. **Industrial Crops and Products**, v.33 p. 296–301, 2011.

JUTEAU, F; MASOTTI, V; BESSIERE J. M. Michel Dherbomez , Josette Viano Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil, **Fitoterapia**, v. 73, p. 532-535, 2002.

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

KHANGHOLIL, S; REZAEINODEHI A. Effect of drying temperature on essential oil content and composition of sweet wormwood (*Artemisia annua*) growing wild in Iran. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 11 (6), pp. 934-937. 2008.

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

KOOBKOKKRUAD, T; CHOCHAI, A; KERDMANEE, C; DE-EKNAMKUL, W. TLC-Densitometric Analysis of Artemisinin for the Rapid Screening of High-producing Plantlets of Artemisia annua L. **Phytochem Anal**, v. 18, p. 229-234, 2007.

LAUGHLIN, J.C. The influence of distribution of antimalarial constituents in *Artemisia annua* L. on time and method of harvest. **Acta Horticulturae**, v.390, p.67-73, 1995.

LEI, C; MA, D; PU, G; QIU, X; DU, Z; WANG, H; LI, G; YE, H; LIU, B. Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L., Industrial **Crops and Products**, v. 33, p. 176–182, 2011.

MA, C; PU, G; LEI, C; MA L; WANG H; GUO Y; CHEN, J; DU, Z; WANG, H; LI, G; YE, H; LIU, B. Isolation and Characterization of AaWRKY1, an Artemisia annua Transcription Factor that Regulates the Amorpha-4,11-diene Synthase Gene, a Key

Gene of Artemisinin Biosynthesis. **Plant Cell Physiol**, v. 50(12), p. 2146–2161, 2009.

MA, C; WANG, H; LU, X; LIU, B. L; XU, G. Analysis of *Artemisia annua* L. volatile oil by comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 1150, p. 50-53, 2007.

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

_____; DELABAYS, N; SARTORATTO, A. New hybrid lines of the antimalarial species *Artemisia annua* L. guarantee its growth in Brazil. Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science, **Natural Products Research in Brazil**, v. 49, p. 5-6, 1997.

_____; PEREIRA, B; SARTORATTO, A; OLIVEIRA, J; DEBRUNNER, N. New hibrid lines of the antimalarial species *Artemisia annua* L. **Acta Horticulturae**, v. 502, p. 377-381, 1999.

_____; PEREIRA, B; SARTORATTO, A. Yields of Antimalarial *Artemisia annua* L. Species. **Acta Horticulturae**, v. 629, p. 421-424, 2004.

MAGIERO, E. C; ASSMANN, J. M; MARCHESE, J. A; CAPELIN, D; PALADINI, M. V; TREZZI, M. M. Efeito alelopático de *Artemisia annua* L. na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, n. 3, p. 317-324, 2009.

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

_____; REHDER, V. L. G; SARTORATTO, A. Quantificação de artemisinina em *Artemisa annua* L. – Uma comparação entre as técnicas de cromatografia em camada delgada com detecção densitométrica e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 4, n.1, p. 81-87, 2001.

_____; REHDER, V. L. G; CASIRAGHI, V; TEDESCO, A. C; LIRA, R. Flowering in plants of *Artemisia annua* L. standed to diferent conditions of photoperiod and temperature. **Acta Horticulturae**, v. 569, p. 275-280, 2002.

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

_____. **Caracterização do mecanismo fotossintético e aspectos relacionados à floração de *Artemisia annua* L.**. 2006. 68 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquista Filho”, Botucatu, 2006a.

_____. Conteúdo de artemisinina e produção de biomassa em plantas de *Artemisia annua* L. pulverizadas com os ativadores da defesa química Acibenzolar-S-metil e proteína Harpina. 2006b. 24p. Relatório técnico final (bolsa CNPq/SWE -

processo nº 20.0364/2004-9) - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasília.

_____; FERREIRA, J. F. S; REHDER, V. L. G; RODRIGUES, O. Water deficit effect on the accumulation of biomass and artemisinin in annual wormwood (*Artemisia annua* L., Asteraceae). **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2010.

MILHOUS, W. K; WEINA, P. J. The botanical solution for malaria. ***Science***, *v.* 327, p. 279-280, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; Secretaria de Vigilância em Saúde; Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil.** Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

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

MOHAMMADREZA, V. Variation in the essential oil composition of *Artemisia annua* L. of different growth stages cultivated in Iran. **African Journal of Plant Science**, vol. 2, n.2, p. 016-018, 2008.

MORVILLO, C. M; FUENTEA, E. B; GILA, A; MARTÍNEZ-GHERSAB, M. A; GONZÁLEZ-ANDÚJAR, J. L; Competitive and allelopathic interference between soybean crop and annual wormwood (Artemisia annua L.) under field conditions. **European Journal of Agronomy**, v.34, p. 211–221, 2011.

MUELLER, M. S; KARHAGOMBA, I. B; HIRT, H. M; WEMAKOR, E. The potential of *Artemisia annua* as a locally produced remedy for malaria in the tropics, agricultural, chemical and clinical aspects. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, p.487-493, 2000.

NGUYEN, K. T; ARSENAULT, P. R; WEATHERS, P. J. Trichomes + roots + ROS = artemisinin: regulating artemisinina biosynthesis in *Artemisia annua* L. **Plant**, v.47, p. 329-338, 2011.

OLIVEIRA, F. et.al., **Farmacognosia**, Editora Atheneu, São Paulo – SP, 1998.

_____; AKISUE G., **Fundamentos de Farmacobotânica**, 2ª Edição, Editora Atheneu, São Paulo – SP, 2005.

OOSTENDORP, M; KUNZ, W; DIETRICH, B; STAUB, T. Induced disease resistance in plants by chemicals. **European Journal of Plant Pathology**,v.107, n.19–28, 2001.

OZGUVEN, M. et al. Effects of varying nitrogen doses on yield, yield components and artemisinin content of Artemisia annua L. **Industrial Crops and Products**, v.27, n.1, p.60-64, 2008.

PERAZZO, F. F; CARVALHO, J. C.T; CARVALHO, J. E; REHDER, V. L. G. Central properties of the essential oil and the crude ethanol extract from aerial parts of *Artemisia annua* L. **Pharmacological Research**, v. 48, p. 497–502, 2003.

POLICHUK, D. R; ZHANG, Y; REED, D. W; SCHIMIDT, J, F; COVELLO, P. S. A glandular trichome-specific monoterpene alcohol dehydrogenase from *Artemisia annua*. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1264–1269, 2010.

PORTAL DA SAÚDE. MALÁRIA. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1526>. Acesso em: 23 de abr. 2012.

PORTAL FIOCRUZ. **Parceria internacional lança medicamento contra a malária.** 2009. Disponível em: http://www.fiocruz.br/. Acessado em: 06/12/2009

QUISPE-CONDORI, S; SÁNCHEZ, D; FOGLIO, M. A; ROSA, P. T.V; ZETZL, C; BRUNNER, G; MEIRELES, M. A. A. Global yield isotherms and kinetic of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L leaves using supercritical carbon dioxide, **J. of Supercritical Fluids**, v. 36, p. 40-48, 2005.

QUITÉRIO, G. C. M. **Produção de artemisinina por *Artemisia annua* L. Sob influência de Micorriza arbuscular**. 2006. 38 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

REHDER, V. L. G. et al. Dosagem de artemisinina em *Artemísia annua* L. por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por índice de refração. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 12, p. 116-118, 2002.

ROBBERS J.E. et.al., **Farmacognosia e Biotecnologia**, Editorial Premier, São Paulo – SP, 1997.

SILVA Jarbas Barbosa Júnior. Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde; Departamento de Vigilância Epidemiológica. **A malária no Brasil.** Brasília: Ministério da Saúde, 2005. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/be_malaria_01_2005.pdf>. Acessado em 03 mar. 2012.

SILVA, F.de A. S; AZEVEDO, C. A. V, de. Principal components analysis in the software assistat-statistical attendance. in: Worldcongress on computers in Agriculture 7, Reno-NV-USA. **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2009.

SIMÕES C.M.O et.al., **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5ª Edição, Editora UFRGS/Editora UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2004.

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

TOMAZELI, V. N. **Indução de resistência a doenças em morangueiro com o uso de acibenzolar-S-metil e Harpina em pré e pós-colheita**. 2010. 86 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco. 2010.

TRIPATHI, A. K; PRAJAPATI, V; AGGARWAL, K. K; KHANUJA, S. P S; KUMAR S. Repellency and Toxicity of Oil from *Artemisia annua* to Certain Stored-Product Beetles, **Journal of Economic Entomology**, v. 93(1), p. 43-47 ,2000.

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

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

WAGNER H., WISENAUER M., **Fitoterapia: Fitofármacos, Farmacologia e Aplicações Clínicas**; 2ª Edição, Pharmabooks Editora, São Paulo – SP, 2006.

WANG, J.D.; XIA, Z.H.; TAN, R.X. Elicitation on artemisinin biosynthesis in Artemisia annua hairy roots by the oligosaccharide extract from the endophytic Colletotrichum sp. B501. **Acta Botanica Sinica**, v.44, p.1233-1238, 2002.

WEI, Z-M; LABY, R.J; ZUMOFF, C. H; BAUER, D.W; HE, S.Y; COLLMER, A; BEER, S.V. Harpin Elicitor of the Hypersensitive Response Produced by the Plant Pathogen *Erwinia Amylovora*. **Science**. v.257, p.85-88, 1992.

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

_____. World malaria report: 2010. Genebra: WHO, 2010. 238p. Disponível em: <htt_p://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/en/index.html>. Acesso em: 11 dez. 2010.

_____. World Malaria Report 2011. Genebra: WHO, 2011. 278p. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/index.html>. Acesso em: 10 dez. 2011.

_____. Malaria: Fact sheet N°94 - April 2012. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>. Acesso em: 16 abr. 2012.

_____. Global Health Observatory Map Gallery. Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>. Acesso em: 10 abr. 2012b.

WOERDENBAG, H. J; BOS, R; SALOMONS, M. C; HENDRIKS, H; PRAS, N; MALINGRÉ T. M. Volatile constituents of *Artemisia annua* L. (Asteraceae). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 8: 3, p. 131-137, 1993.

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

YU, Z; LI J; YANG C; HU, W; WANG, L; CHEN, X. The Jasmonate-Responsive AP2/ERF Transcription Factors AaERF1 and AaERF2 Positively Regulate Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia annua* L., **Molecular Plant**, p. 1–13, 2011.