

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

JORGE LUIZ ZANATTA

**UTILIZAÇÃO DE CARACTERES AGRONÔMICOS,
FISIOLÓGICOS E FITOQUÍMICOS NA SELEÇÃO E
MELHORAMENTO DE *Artemisia annua* L.**

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO

2018

JORGE LUIZ ZANATTA

**UTILIZAÇÃO DE CARACTERES AGRONÔMICOS,
FISIOLÓGICOS E FITOQUÍMICOS NA SELEÇÃO E
MELHORAMENTO DE *Artemisia annua* L.**

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

Orientador: Prof. Dr. José Abramo Marchese

Co-orientador: Prof. Dr. Ilio Montanari Jr.

Co-orientador: Prof. Dr. Adilson Sartoratto

PATO BRANCO

2018

Z27u

Zanatta, Jorge Luiz.

Utilização de caracteres agronômicos, fisiológicos e fitoquímicos na seleção e melhoramento de *Artemisia annua* L. / Jorge Luiz Zanatta. -- 2018.

67 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. José Abramo Marchese

Coorientador: Prof. Dr. Ilio Montanari Jr

Coorientador: Prof. Dr. Adilson Sartoratto

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, PR, 2018.

Bibliografia: f. 49 - 60.

1. Artemísia. 2. Plantas - Melhoramento genético. 3. Plantas - Metabolismo. I. Marchese, José Abramo, orient. II. Montanari Jr. Ilio, coorient. III. Sartoratto, Adilson, coorient. IV. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. V. Título.

CDD (22. ed.) 630

Ficha Catalográfica elaborada por
Suélem 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



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação nº 178

**UTILIZAÇÃO DE CARACTERES AGRONÔMICOS, FISIOLÓGICOS E
FITOQUÍMICOS NA SELEÇÃO E MELHORAMENTO DE *Artemisia
annua L.***

por

JORGE LUIZ ZANATTA

Dissertação apresentada às 14 horas 00 min. do dia 20 de dezembro de 2018 como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Fitotecnia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos membros abaixo designados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Giovani Benin
UFPR

Prof. Dr. Jorge F. S. Ferreira
ARS/USDA

Prof. Dr. José Abramo Marchese
UTFPR
Orientador

Prof. Dr. Moeses Andriago Danner
Coordenador do PPGA

Dedico este trabalho a todas os seres e situações que me trouxeram a este momento. Aqueles que permaneceram, aqueles que muito tempo ficaram perto, aqueles que estiveram junto apenas o necessário, Aqueles que nem foram percebidos, de tão perto que estavam, porque o olho jamais consegue enxergar a si mesmo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e todos aqueles que Ele me concedeu encontrar para que este trabalho tivesse a devida conclusão.

A minha esposa e filha, que sempre me apoiaram, e caminharam comigo em todas as idas e vindas, no colo, ao lado, no pensamento. Aos demais familiares, que sempre se postaram firmes no apoio e carinho, no momento devido.

Ao orientador Dr. José Abramo Marchese pela orientação, parceria e confiança no meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos co-orientadores Dr. Ilio Montanari Jr. e Dr. Adilson Sartoratto pela orientação, contribuição e aprendizado ao longo da realização deste trabalho.

Ao Dr. Giovani Benin, Dra. Marisa de Cacia Oliveira, Dra. Sirlei Dias Teixeira e Dr. Jorge Ferreira pela contribuição e paciência nos desafios da pesquisa.

A direção, professores e alunos do Cedup-Campo Erê pela oportunidade de trabalho e boa vontade na organização das atividades.

Aos demais amigos e colegas do CPQBA-Unicamp pelo excelente auxílio na condução do trabalho.

Aos colegas mestrandos e doutorandos, alunos de iniciação científica e aos amigos encontrados ao longo do caminho, pela parceria e suporte.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Agronomia da UTFPR pelos conhecimentos passados a mim, fundamentais para a execução deste projeto.

O aprendizado é constante a quem se considera aprendiz. A quem já se considera mestre, além de constante, é necessário!

RESUMO

ZANATTA, Jorge Luiz. Utilização de Caracteres Agronômicos, Fisiológicos e Fitoquímicos na Seleção e Melhoramento de *Artemisia annua* L. 67 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2018.

A *Artemisia annua* é uma planta que produz artemisinina e diversos outros compostos através de seu metabolismo especializado, utilizados comercialmente para o controle da malária. Diversas pesquisas têm sido desenvolvidas para aclimação e melhoramento desta espécie no CPQBA/Campinas e UTFPR/Pato Branco. O presente estudo objetivou correlacionar os caracteres fisiológicos, agronômicos e fitoquímicos com o teor e rendimento de artemisinina na seleção e melhoramento de *A. annua* L. Para a seleção das melhores plantas foi utilizada Seleção Massal Estratificada com 30 estratos e 33 plantas por estrato. A primeira seleção de plantas foi realizada utilizando critérios agronômicos com roguing subsequente das plantas não selecionadas e bordaduras. Fatores bióticos e ambientais impactaram a avaliação das plantas, restando 138 plantas com sementes viáveis, nas quais foram realizadas as avaliações fisiológicas, agronômicas e fitoquímicas (cromatografia de camada delgada) e selecionadas 50 plantas para análise de teor de artemisinina e ácido dihidroartemisínico em HPLC e perfil fitoquímico de óleo essencial por GC-MS. As análises estatísticas de média foram realizadas utilizando a plataforma R, análises de correlação com o software Genes e índices de seleção com o aplicativo GGE Biplot. Os testes e análises de artemisinina com TLC apresentaram correlação positiva fraca com as análises de HPLC. O programa IMAGEJ apresentou alta eficiência na quantificação de artemisinina por TLC. Os caracteres fisiológicos não apresentaram correlação com teor (ART) e rendimento (REND) de artemisinina. Entre os caracteres agronômicos, peso seco de folha (PSF) e Biomassa apresentaram correlação negativa fraca com ART e os caracteres PSF, Biomassa, diâmetro de caule e ART apresentaram correlação positiva com REND. Entre os caracteres fitoquímicos, ácido dihidroartemisínico apresentou correlação positiva fraca com ART, Cis-cadin-4-en-7-ol correlação com ART e REND, rendimento de óleo (OLS) correlação com REND e ART correlação com REND. A análise de média dos genótipos por caracteres morfológicos apresentou média 62% maior para o caractere 1,8 cineol nas plantas de caule roxo, comparada com as verdes. O teor e rendimento médios de artemisinina dos genótipos analisados foi de 0,73% e 26,15 kg.ha⁻¹, respectivamente. O desempenho no teor e rendimento de artemisinina dos 20 melhores genótipos, classificados em teor de artemisinina por HPLC, foram de 29% e 27% superiores, respectivamente, comparado aos 50 genótipos analisados. O teor médio de óleo essencial por planta foi de 0,72%, com rendimento médio de 26,37 kg.ha⁻¹. Os componentes principais do óleo essencial da variedade CPQBA 3 foram a cânfora, germacreno D, trans-cariofileno, trans-β-farneseno e 1,8 cineol.

Palavras-chave: Artemisia. Melhoramento genético. Metabolismo de plantas.

ABSTRACT

ZANATTA, Jorge Luiz. Use of agronomic, physiological and phytochemical characters in the Selection and breeding of *Artemisia annua* L. 67 f. Dissertation (Masters in Agronomy) - Graduate Program in Agronomy (Concentration Area: Plant Production), Federal University of Technology Paraná. Pato Branco, 2018.

Artemisia annua is a plant which produces artemisinin and various other compounds by its specialized metabolism, used commercially to malaria control. Several researches have been developed to acclimatise and improve this species in CPQBA/Campinas and UTFPR/Pato Branco. The present study aimed to correlate the physiological, agronomic and phytochemical characteristics with the content and yield of artemisinin (ART e REND) in the selection and improvement of *A. annua*. For the selection of the best plants it was used the Stratified Mass Selection with 30 strata and 33 plants per stratum. The first plants selection was performed using agronomic criteria with subsequent roguing of the unselected plants and borders. Biotic and environmental factors impacted the viability of plants evaluation, leaving 138 plants with viable seeds, in which the physiological, agronomic and phytochemical evaluations were performed (thin layer chromatography – TLC) and selected 50 plants for analysis of artemisinin and dihydroartemisinic acid content in HPLC and essential oil phytochemical profile by GC-MS. The statistical analyzes of mean were performed using the R platform, correlation analyzes with the Genes software® and selection indexes with the GGE Biplot app. Tests and analyzes of artemisinin with TLC showed a weak positive correlation with HPLC analyzes. The IMAGEJ program showed high efficiency in the quantification of artemisinin by TLC. The physiological characters showed no correlation with ART and REND. Among the agronomic characters, leaf dry weight (PSF) and Biomass presented weak negative correlation with ART, and the characters PSF, Biomass, stem diameter and ART showed a positive correlation with REND. Among the phytochemical characters, dihydroartemisinic acid presented weak positive correlation with ART, Cis-cadin-4-en-7-ol correlation with ART and REND, oil yield (OLS) correlation with REND, and ART correlation with REND. The average analysis of the genotypes by morphological characters showed a 62% higher average for the character 1.8-cineole in the plants of purple branch, compared to the green ones. The average of artemisinin content and yield of the analyzed genotypes was 0.73% and 26,15 kg.ha⁻¹ (D.B.), respectively. The artemisinin content and yield of the 20 best genotypes, classified in artemisinin content by HPLC, were 29% and 27% higher, respectively, compared to the 50 genotypes analyzed. The average oil content per plant was 0.72%, with an average yield of 26.37 kg.ha⁻¹ (D.B.). The major components of CPQBA 3 essential oil were camphor, germacrene D, trans-caryophyllene, trans- β -farnesene and 1.8-cineole.

Keywords: *Artemisia*. Breeding plants. Plant metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Países e regiões do planeta com casos de malária entre os anos de 2000 e 2017	4
Figura 2 - Rota metabólica da biossíntese de artemisinina.....	10
Figura 3 - Placa de TLC utilizando sistema de homogeneização com Ultra Turrax.	24
Figura 4 - Placa de TLC utilizando sistema de homogeneização com Ultrassom.....	24
Figura 5 - Imagem das análises realizadas pelo programa IMAGEJ.....	28
Figura 6 - Caracteres morfológicos de plantas de <i>A. annua</i> L. (1. Caule e inserção de ramos roxos; 2. Caule verde e inserção de ramos roxo; 3. Caule e inserção de ramos verdes).....	35
Figura 7 - Gráfico "Which-Won-Where" mostrando análise biplot dos genótipos relacionados por ART*Caractere.....	39
Figura 8 - Gráfico de média e estabilidade de 50 genótipos avaliados para parâmetros fisiológicos, agrônômicos e fitoquímicos de <i>A. annua</i>	40
Figura 9 - Gráfico de dispersão dos genótipos selecionados entre TLC/ART e Biomassa.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características químicas do solo na camada de 0-20 cm.....	17
Tabela 2 - Quantificação de artemisinina entre sistemas de homogeneização em TLC em <i>Artemisia annua</i>	25
Tabela 3 - Quantificação de artemisinina entre TLC e HPLC em <i>A. annua</i> L.....	25
Tabela 4 - Correlação entre sistemas de homogeneização em TLC e entre TLC e HPLC para 7 e 50 amostras para quantificação de artemisinina em <i>A. annua</i> L.....	25
Tabela 5 - Estatística Descritiva dos Caracteres fisiológicos, agronômicos e fitoquímicos de cinquenta plantas de <i>A. annua</i> L.....	29
Tabela 6 - Coeficientes de correlação e níveis de significância entre caracteres fisiológicos com teor e rendimento de Artemisinina em <i>A. annua</i> L.....	31
Tabela 7 - Coeficientes de correlação e níveis de significância entre caracteres agronômicos com teor e rendimento de Artemisinina em <i>A. annua</i> L.....	32
Tabela 8 - Coeficientes de correlação e níveis de significância entre caracteres fitoquímicos com teor e rendimento de Artemisinina em <i>A. annua</i> L.....	33
Tabela 9 - Médias entre caracteres morfológicos e caracteres fisiológicos, agronômicos e fitoquímicos em <i>A. annua</i> L.....	36
Tabela 10 - Coeficientes de correlação entre caracteres fisiológicos, agronômicos e fitoquímicos com ART (teor de artemisinina, %.planta ⁻¹) para plantas com caule roxo e verde e inserção de caule roxo e verde em <i>A. annua</i> L.....	36
Tabela 11 - Coeficientes de correlação entre caracteres fisiológicos, agronômicos e fitoquímicos com REND (rendimento de artemisinina, kg.ha ⁻¹) para plantas com caule roxo e verde e inserção de ramo roxo e verde em <i>A. annua</i> L.....	37
Tabela 12 - Médias de caracteres entre genótipos analisados e selecionados em <i>A. annua</i> L.....	42

Tabela 13 - Perfil fitoquímico de monoterpenos de 20 genótipos selecionados de <i>A. annua</i> L.....	45
Tabela 14 - Perfil fitoquímico de sesquiterpenos de 20 genótipos selecionados de <i>A. annua</i> L.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

ACT	Terapia Combinada com Artemisinina
ART	Teor de artemisinina
ASMQ	Artesunato + Mefloquina
At	Área foliar
BIO	Biomassa
Canf	Cânfora
Ccadin	Cis-cadin-4-en-7-ol
CE	Eletroforese capilar
Ci	Concentração intracelular de CO ₂
Cine	1,8 Cineol
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas
EAB	Epi alfa bisabolol
Espat	Espatulenol
DC	Diâmetro do caule
DHAA	Ácido dihidroartemisínico
Di	Diâmetro da seção inferior do dossel
Dm	Diâmetro da seção média do dossel
Ds	Diâmetro da seção superior do dossel
<i>E</i>	Taxa de transpiração
EC	Detector eletroquímico
ELSD	Detector Evaporativo com Espelhamento de Luz
GC	Cromatografia gasosa
Gs	Condutância estomática
ha	Hectare
Hd	Altura do dossel
Hi	Altura da inserção do primeiro par de ramos plagiotrópicos
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPTLC	Cromatografia de Camada Delgada de Alta Eficiência
Ht	Altura da planta
IRGA	Analisador infravermelho de gases
LC	Cromatografia líquida
NR	Número de ramos
NRM	Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear
Ocar	Óxido de cariofileno
Oleo	Teor de óleo essencial
OLS	Rendimento de óleo essencial
<i>P_N</i>	Taxa de assimilação de CO ₂
PSC	Peso seco de caule
PSF	Peso seco de folha
REND	Rendimento de artemisinina
RID	Detector com Índice de Refração
Tcar	Trans cariofileno
Tfar	Trans beta farneseno

TLC	Cromatografia de camada delgada
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UV	Ultra violeta
Vc	Volume de dossel
WUE	Eficiência do uso da água

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1	A Malária e a Terapia Combinada com Artemisinina (ACT)	3
2.2	<i>Artemisia annua</i> L.	5
2.3	Condições Agronômicas e Nutricionais	6
2.4	Fisiologia e Ambiente	7
2.5	Caracteres de Interesse	8
2.6	Compostos Bioativos – Rotas Metabólicas e Biossíntese	8
2.7	Métodos de Extração de Artemisinina	11
2.8	Compostos Aromáticos	13
2.9	Melhoramento de <i>Artemisia annua</i>	14
2.10	Seleção de Genótipos via Índices de Seleção	15
3	MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1	Local de Cultivo e Material Vegetal	16
3.2	Delineamento e Seleção de Plantas	17
3.3	Roguing.....	17
3.4	Avaliações Fisiológicas	18
3.5	Avaliações Agronômicas	18
3.6	Coleta de Sementes	19
3.7	Avaliações Fitoquímicas	19
3.7.1	Teste em Cromatografia de Camada Delgada (TLC)	20
3.7.2	Cromatografia de Camada Delgada	20
3.7.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	21
3.8	Teor e Rendimento de Óleo Essencial	21
3.9	Análises Estatísticas.....	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1	Testes de Cromatografia de Camada Delgada	24
4.2	Estatística Descritiva para Caracteres fisiológicos, agronômicos e fitoquímicos.....	28
4.3	Análises Fisiológicas	30
4.4	Análises Agronômicas	31
4.5	Análises Fitoquímicas.....	33
4.6	Correlações e Médias entre Caracteres Agronômicos, Fisiológicos e	

Fitoquímicos de <i>A. annua</i> utilizando Caracteres Morfológicos	35
4.7 Seleção de genótipos superiores via Índices de Seleção	38
4.8 Desempenho dos genótipos selecionados	41
5 CONCLUSÕES.....	47
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
REFERÊNCIAS.....	49
ÍNDICE DE APÊNDICES E ANEXOS	61
Apêndice A – Croqui do Experimento de Seleção Massal Estratificada.....	63
Anexo A – Diluições e Curvas de Calibração.....	64
Anexo B - Índice de superioridade.....	67

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Artemisia* compreende um grupo de plantas que tem sido utilizado para vários fins medicinais durante séculos (Dalrymple, 2012). A *Artemisia annua* L. é uma planta anual da família das Asteraceae, a qual produz artemisinina, que possui valor comercial e farmacêutico pelo uso no controle da malária.

A partir de sua descoberta em 1967, a atividade antimalárica da artemisinina passou de monoterapia para biterapia, para proteger contra possíveis expressões de resistência do parasita com o seu uso conjugado na forma de ACTs. Contudo, com o uso inadequado da monoterapia e venda de medicamentos alterados tem aumentado os casos de resistência (WHO, 2014).

Devido à importância e impacto desta doença em grande parte da população dos trópicos, os métodos de controle tornam-se importantes fontes de auxílio à saúde nas regiões endêmicas da doença, principalmente no continente africano. Na América Latina, o Brasil é um dos países que apresentam os maiores índices de casos de malária (WHO, 2017), com a concentração dos casos de alto risco nos estados do Pará, Acre, Roraima, Amazonas e Amapá (Ministério da Saúde, 2017).

Atualmente, toda a artemisinina utilizada na produção dos ACTs é obtida da planta *Artemisia annua* L. (Ferreira *et al*, 2018). Sendo a *A. annua* L. proveniente de Ásia, diversos pesquisadores têm desenvolvido metodologias e pesquisas para a aclimação e o melhoramento desta espécie em regiões próximas a Linha do Equador. No Brasil, as atividades de pesquisa se concentraram principalmente em Campinas (CPQBA/UNICAMP) e Pato Branco (UTFPR), onde os experimentos indicam ser locais competitivos na produção e desenvolvimento da espécie (Magalhães *et al*, 1997).

A região de Pato Branco/PR apresenta condições ideais de temperatura e fotoperíodo, similares as regiões da Ásia, centro de origem da planta, e os trabalhos de aclimação têm alcançado valores de artemisinina na planta, superiores a 1% (Marchese, 2006). Porém, as práticas de seleção e melhoramento são fundamentais para atingir níveis mais elevados de artemisinina e outros compostos de interesse.

Considerando que, o aumento da produção de artemisinina em plantas inteiras de *A. annua* L. é altamente desejável e deve ser alcançada com uma melhor

compreensão da via biossintética e sua regulação por fatores exógenos e endógenos (Weathers *et al*, 2006); que o ácido dihidroartemisinínico é um precursor direto da rota metabólica no acúmulo da artemisinina (Ferreira *et al*, 2018) que a via de biossíntese de artemisinina e óleo essencial fornece informações de relacionamento com caracteres agro morfológicos para melhoria de práticas agrônômicas e será útil para identificar genótipos superiores (Paul *et al*, 2011); o presente trabalho buscou correlacionar os caracteres agrônômicos, fisiológicos e fitoquímicos com o teor e rendimento de artemisinina, na seleção e melhoramento do cultivar CPQBA 3 por meio de Seleção Massal Estratificada, além da quantificação do teor, rendimento e composição química do óleo essencial.

O objetivo geral foi a identificação de genótipos superiores e uma população melhorada em teor e rendimento de artemisinina em plantas de *A. annua*, selecionadas dentro da variedade CPQBA 3, através da utilização de caracteres agrônômicos, fisiológicos e fitoquímicos para seleção e melhoramento da espécie, no Sudoeste do Paraná.

Os objetivos específicos foram: utilizar caracteres agrônômicos, fisiológicos e fitoquímicos para seleção de plantas com elevado teor e rendimento de artemisinina; avaliar caracteres agrônômicos, fisiológicos e fitoquímicos de plantas com características morfológicas diferentes; testar métodos e equipamentos de extração e programa para semi-quantificação de artemisinina; analisar o perfil fitoquímico do óleo essencial; quantificar o teor de artemisinina e selecionar genótipos superiores em teor e rendimento de artemisinina correlacionando com os demais caracteres analisados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Malária e a Terapia Combinada com Artemisinina (ACT)

A malária é uma das doenças mais antigas da humanidade (Cunha, 2008) e atinge principalmente crianças menores de 5 anos (WHO, 2018). A malária é causada pelos parasitas do gênero *Plasmodium* (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*) (Dalrymple, 2012), que após entrada no organismo infectam as células do fígado com período de incubação de 7 a 14 dias. A transmissão natural da malária ocorre por meio da picada de fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Anopheles*, cujos criadouros preferenciais são poças de água limpa, quente, sombreada e de baixo fluxo, muito frequentes na Amazônia brasileira (Ministério da Saúde, 2010).

O tratamento da doença é baseado em um conjunto de princípios ativos para evitar o desenvolvimento de resistência da doença. Drogas, como a quinina, tem desenvolvido um papel fundamental no controle da doença durante séculos, porém perdeu a eficiência devido à resistência adquirida pelo *Plasmodium falciparum*. Atualmente, derivados de artemisinina, quando combinados com outras drogas, fornecem tratamento mais eficaz. Eles são conhecidos como Terapia Combinada com Artemisinina ou ACTs (Dalrymple, 2012). Uma estimativa de 2,74 milhões de tratamentos de ACTs foram comercializados durante o período de 2010 a 2017, com aproximadamente 62% demandado pelo setor público (WHO, 2018).

No Brasil, a primeira linha de tratamento está baseada no medicamento ASMQ (WHO, 2018), desenvolvido pelo Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos/Fiocruz) em parceria com a organização sem fins-lucrativos Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi), combinando um derivado da artemisinina – o artesunato – com um antimalárico de efeito prolongado – a mefloquina. Outros medicamentos são utilizados de acordo com o estágio da doença e a condição do paciente, sendo que em casos confirmados de infecção do *P. falciparum* utiliza-se arteméter mais lumefantrina e primaquina, ou artesunato com mefloquina e primaquina e em casos severos, utiliza-se o artesunato mais cloroquina ou arteméter mais cloroquina. Quando a infecção se dá pelo *P. vivax* administra-se

cloroquina mais primaquina ou quinina mais clindamycin por 7 dias, ou ainda, cloroquina com primaquina por 14 dias, para controle da doença (WHO, 2018).

O mapa mundial da malária apresenta um cenário de diminuição de casos entre 2000 e 2015, porém com aumento substancial nos últimos dois anos, chegando a 219 milhões de casos confirmados, em 2017. A figura 1 apresenta o mapa mundial onde algumas regiões (azul) não apresentaram casos durante os últimos 3 anos, outras regiões (amarelo) não apresentaram casos durante o último ano, e na grande região tropical do planeta (vermelho) ocorreram um caso ou mais por ano, durante o período analisado.

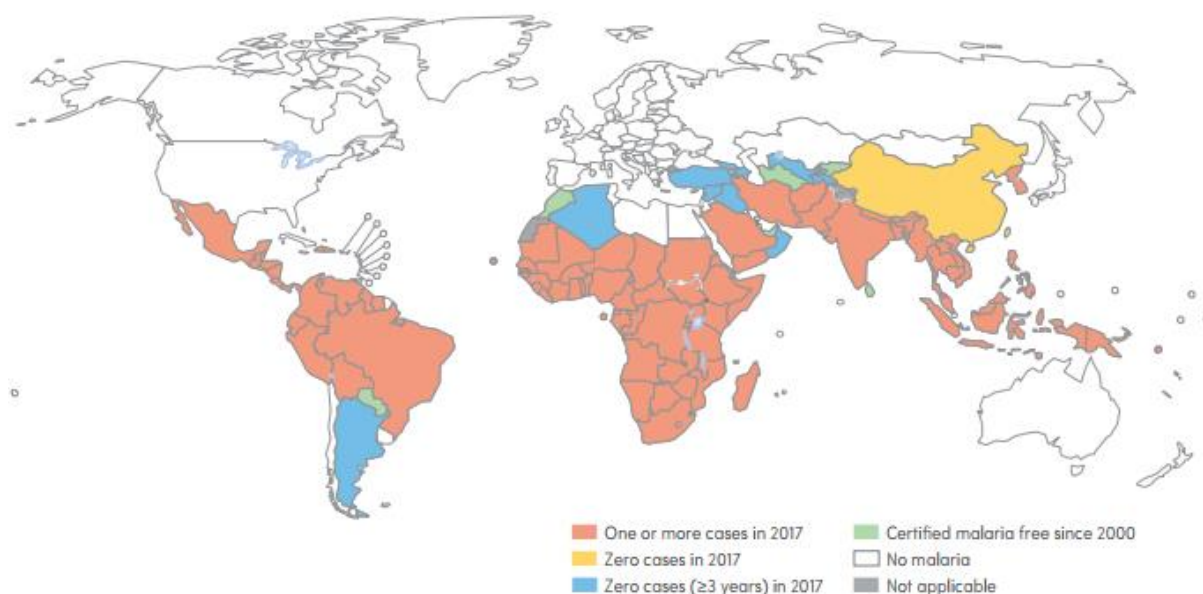


Figura 1 -- Países e regiões do planeta com casos de malária entre os anos de 2000 e 2017. UTFPR. Pato Branco - PR, 2018.

Fonte: WHO, 2018.

Segundo a OMS (WHO, 2018), 11 países concentram 70% dos casos e mortes por malária no mundo, sendo 10 na África Subsaariana e 1 na Índia. Mesmo com a redução de 607.000 mortes por malária em 2010 para 435.000 em 2017, a doença continua atingindo um número expressivo de crianças menores de cinco anos, chegando a 266.000, em 2017.

Em 2017, os governos dos países endêmicos da malária e parceiros

internacionais investiram aproximadamente US\$ 3,1 bilhões para controle da doença. Para alcançar as metas de reduzir os casos e a mortalidade da malária em 90% e eliminá-la em 35 países onde ocorreu transmissão em 2015, estima-se que o valor investido deverá aumentar pelo menos para US\$ 6,6 bilhões por ano, até 2020.

As perspectivas de controle da doença até 2030, preconizam garantir a máxima redução da morbidade e mortalidade, através do acesso universal sustentado pelas medidas de controle dos vetores, diagnósticos e medicamentos antimaláricos de qualidade garantida. A comunidade mundial de Saúde, solicita o desenvolvimento de vacinas com pelo menos 75% de capacidade protetora, e prevê um investimento de até 8,7 bilhões anuais para desenvolver as diversas estratégias e atingir 90% de controle, até 2030 (GLOBAL TECHNICAL STRATEGY FOR MALARIA 2016–2030, 2015).

O Brasil está incluso nas áreas de risco da doença e por mais que tenha reduzido de 384.000 casos no ano de 2010 para 133.000 casos confirmados em 2016, em 2017 ultrapassou 217.000 casos (WHO, 2018). A maioria dos casos se concentra na região amazônica, nos estados de Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Acre, Amapá e Amazonas, porém as demais regiões não podem ser negligenciadas devido a letalidade da doença (Ministério da Saúde, 2017).

2.2 *Artemisia annua* L.

A. Artemisia annua L. é uma planta da família Asteraceae, nativa da China, onde é conhecida como “qinghao” (Ferreira, 2004), que se desenvolve em elevadas altitudes e preferencialmente em clima temperado (Brisibe *et al*, 2012).

A. annua L. é uma planta herbácea, vigorosa, ereta, anual, aromática, alcançando de 120 cm até 300 cm de altura e 100 cm de largura. Nas folhas, caules e inflorescências possui tricomas não glandulares e glandulares, onde a artemisinina é sequestrada (Duke *et al*, 1994) e ausência em raízes e pólen (Ferreira, 2004). Ela possui geralmente caule simples com ramos alternados e folhas que variam entre 2 cm e 5 cm de comprimento (Dhingra *et al*, 2000).

As flores são minúsculas com menos de 2 mm de comprimento e se encontram dentro de pequenos capítulos em forma de disco (2–3 mm) que são

organizados em panículas soltas. As flores podem ser marginais, pistiladas ou hermafroditas no disco central. Numerosos tricomas glandulares estão presentes nas superfícies do receptáculo e da corola. As inflorescências são sustentadas por uma bráctea alongada. A flor apresenta cinco estames, ligados à porção basal da corola, que têm anteras biloculares, com apêndices lanceolados. O pólen é tricolpado e tem poros de germinação protuberantes dos sulcos. (Ferreira & Janick, 1995).

A *A. annua* L. é naturalmente uma planta alógama com dispersão do pólen realizada por insetos e segundo Delabays (1993), preferencialmente pelo vento, porém é possível a produção de sementes pelo processo de autopolinização (Alejos-Gonzalez *et al*, 2011).

2.3 Condições Agronômicas e Nutricionais

O espaçamento entre plantas tem um efeito altamente significativo no rendimento de biomassa e na arquitetura da planta (Simon *et al*, 1990). Enquanto Ram *et al* (1997) encontraram rendimento de artemisinina e produção de biomassa em densidades maiores que 200.000 plantas por hectare, Nigussie *et al* (2015) encontraram maior rendimento de óleo essencial e biomassa em população de mais de 40.000 plantas por hectare. Simonet *et al* (2008), em experimentos de melhoramento de *A. annua* L. aumentaram significativamente as concentrações de artemisinina e biomassa com densidade de 17.800 plantas por hectare, e independente da densidade, Wetzstein *et al* (2018), obtiveram 2,16% de artemisinina e produção de 3.22 toneladas por hectare de folhas secas, em cruzamentos de genótipos de origens chinesas e brasileiras. Altos níveis de rendimento de artemisinina também foram encontrados por Damtew *et al* (2011) em densidade de 10.000 plantas por hectare.

Segundo Özgüven *et al* (2008), as maiores doses de nitrogênio, elevaram significativamente os teores de artemisinina mas a produção de biomassa não foi significativamente influenciada. Dados diferentes foram encontrados por Davies *et al* (2009), em que o aumento de fornecimento nutricional de nitrogênio estimulou o crescimento da planta e diluiu a concentração de artemisinina enquanto que diferentes doses de potássio não alteraram a produção de biomassa e a

concentração de artemisinina nas plantas. Ferreira (2007), observou que a deficiência moderada de potássio aumentou a concentração de artemisinina nas folhas em 75% e que a deficiência ou excesso de nitrogênio diminuiu os teores de artemisinina.

Os diversos estratos da planta também apresentam concentrações diferentes de artemisinina nas folhas. Charles *et al* (1990) encontraram quase metade da concentração de artemisinina da planta, nos 50 cm do dossel superior.

2.4 Fisiologia e Ambiente

As condições ambientais como a temperatura, altitude, umidade e o fotoperíodo influenciam diretamente na concentração de artemisinina na planta. As baixas temperaturas têm influências significantes nos níveis de metabólitos secundários (Gobbo-neto e Lopes, 2007) e em casos específicos, as variações nos teores de artemisinina na planta são atribuídas mais fortemente a fatores ambientais que genéticos (Thu *et al*, 2011). Contudo, Ferreira e Janick (1995b) e Delabays *et al* (2002) estabeleceram independentemente que a maior parte da fisiologia de produção da artemisinina é controlada por fatores genéticos.

Além dos fatores ambientais e genéticos, plantas sensíveis à duração do fotoperíodo têm seu desenvolvimento condicionado ao fotoperíodo indutivo (Marchese e Figueira, 2005). Segundo Morales *et al* (1993) e Ferreira *et al* (2018), a concentração máxima de artemisinina na planta está mais relacionada com o acúmulo de dias de fotoperíodo indutivo, do que com o estágio de desenvolvimento da planta.

Marchese (2001), encontrou diferenças de rendimento da molécula e produção de massa seca de folha, em diferentes amplitudes térmicas, evidenciando rendimentos similares da molécula na planta. Porém, esses resultados diferiram daqueles encontrados por Magalhães (1996), em que o aumento de temperatura diminuiu a concentração de artemisinina na planta. Em relação ao fotoperíodo, a *A. annua L.* é considerada uma planta de dias curtos obrigatórios e com fotoperíodo indutivo de 4 semanas (Marchese, 2006).

Resultados obtidos com trabalhos de déficit hídrico severo, duas semanas antes da colheita, condicionaram a menor estatura de plantas e diminuição dos teores de artemisinina (Charles *et al*, 1993). Já outros, com déficit hídrico

moderado, induziram um aumento significativo da artemisinina sem prejuízo ao acúmulo de biomassa (Marchese *et al*, 2010).

2.5 Caracteres de Interesse

Os metabólitos secundários das plantas são úteis a longo prazo para fins de defesa, sinalização e regulação das vias metabólicas primárias e dão às plantas características específicas, como a cor. (Kiani *et al*, 2015). A produção destes compostos, como as lactônicas sesquiterpênicas, são influenciadas diretamente pela correlação entre caracteres fisiológicos e morfológicos regulados em sua maior parte por genes, como intensidade luminosa e número de tricomas (Spring e Bienert, 1987). As funções ecológicas têm bases fisiológicas e os padrões em diversos níveis devem ser correlacionáveis já que, a nível fisiológico a alocação implica em particionamento de recursos dentro da planta (Bazzaz *et al*, 1987).

Em plantas de trigo, o aumento na biomassa da planta está amplamente relacionado a caracteres fotossintéticos, como taxa fotossintética, condutância estomática e teor de clorofila foliar (Beche *et al*, 2014). Em plantas de *A. annua L.*, o aumento da biomassa foliar eleva consideravelmente o rendimento de artemisinina (Magalhães, 1996) e a identificação de caracteres agronômicos, como volume de dossel e número de ramos, que estão correlacionados com o teor de artemisinina, podem auxiliar no processo de seleção (Bolina *et al*, 2013).

2.6 Compostos Bioativos – Rotas Metabólicas e Biossíntese

Em 1969, os pesquisadores chineses buscaram um antimalárico em seu conjunto de plantas nativas e o extrato de éter etílico de *A. annua L.* apresentou eficácia contra *Plasmodium spp.*, e em 1972 o ingrediente ativo, artemisinina, foi isolado e identificado pelos chineses. Dentre aproximadamente 400 espécies de artemísias, a *A. annua L.* é a principal fonte de artemisinina (Ferreira, 2004).

Nas diversas regiões de cultivo, tanto a concentração de artemisinina, quanto o rendimento do óleo essencial, variam conforme o ambiente e os materiais

genéticos utilizados no cultivo (Delabays *et al*, 1993). As concentrações de artemisinina podem variar de 0,1% a 0,8% em peso seco de folha (Abdin *et al*, 2003), até 1,5 % (Ferreira *et al*, 2005) e até 2,2 % (Wetzstein *et al*, 2018) sendo que no sudoeste do Estado do Paraná, os materiais estudados apresentaram rendimento de artemisinina acima de 1% (Bolina *et al*, 2014). Entre os compostos fitoquímicos da *A. annua L.*, a artemisinina não é o único composto com atividade antimalárica, mas é o principal, sendo que ainda outros compostos presentes aumentam sinergicamente sua atividade (Ferreira *et al*, 2010). O teor de flavonóides, glicosídeos e saponinas, melhoram a solubilidade da artemisinina e auxiliam sinergicamente no controle da malária. (ATEMNKENG *et al*, 2009).

Segundo Ferreira *et al* (2018), o maior acúmulo de ácido dihidroartemisínico foi acompanhado por maior conteúdo de artemisinina, enquanto uma correlação negativa existiu entre o acúmulo de ácido artemisínico e artemisinina. Esses dados corroboram com Wallaart *et al* (2000), em que plantas com altos teores de ácido artemisínico apresentam baixos teores de ácido dihidroartemisínico e artemisinina.

Ferreira *et al*, (2018) indicam que o ácido dihidroartemisínico e o ácido artemisinínico competem para a formação de estruturas diferentes, a partir do aldeído artemisinínico e que o primeiro eleva os níveis de artemisinina e o segundo diminui, competitivamente (Figura 2). Resultados similares são apresentados por Wang *et al* (2008).

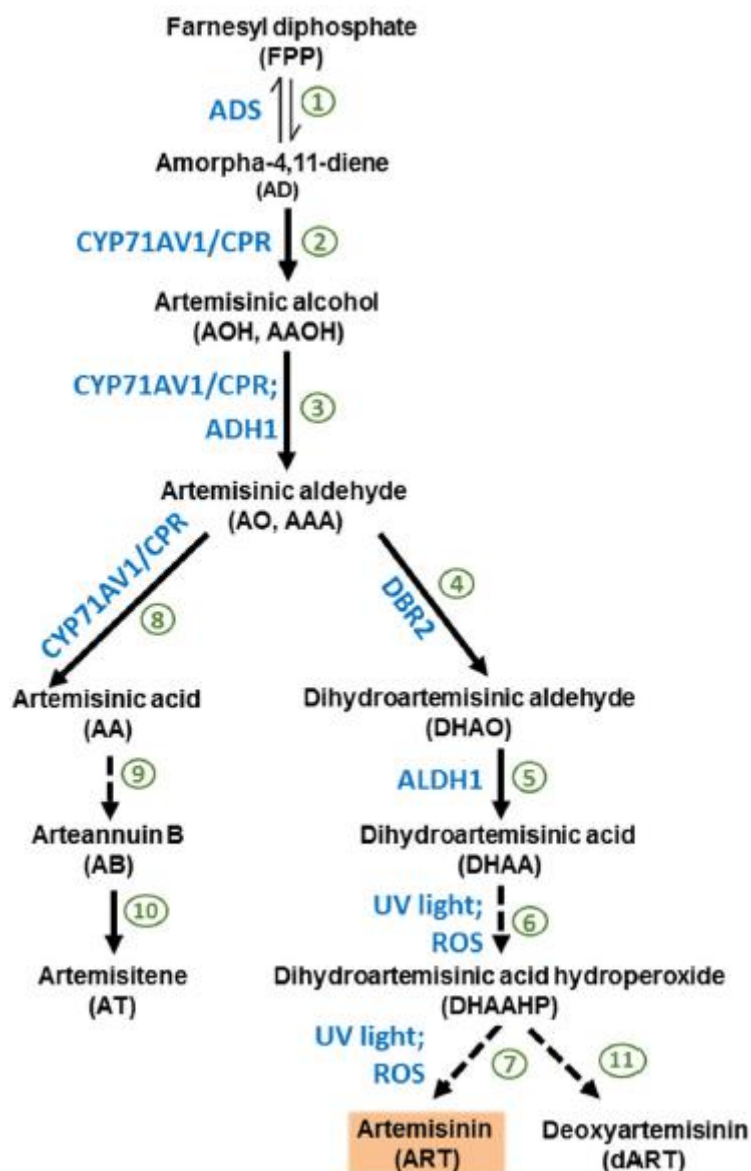


Figura 2 -- Rota metabólica da biossíntese de artemisinina. UTFPR. Pato Branco - PR, 2018. Fonte: Ferreira *et al*, 2018.

Lommen *et al* (2006) citam que dos possíveis precursores, o ácido dihidroartemisínico é o mais abundante durante todo o ciclo de vida da folha, e nas folhas jovens chega a mais de 75% de todos os sesquiterpenos analisados, seguido pelo aldeído artemisínico e ácido artemisínico. De acordo com Ferreira *et al* (2018), cultivares de diferentes origens apresentam comportamento diferentes na relação entre ácido dihidroartemisínico e artemisinina, de forma que em cultivares brasileiras o ácido dihidroartemisínico diminui enquanto a artemisinina aumenta e em cultivares suíças e chinesas, a concentração do DHAA segue a mesma tendência de concentração de ART. É possível que o variedades chinesas possuam isoformas

enzimáticas que são menos eficientes na conversão de DHAA em ART, enquanto as cultivares brasileiras apresentem isoformas que são muito eficientes na conversão de DHAA em ART.

Acredita-se que a conversão de ácido dihidroartemisínico em artemisinina ocorre através de uma reação de foto-oxidação espontânea não enzimática ou reação de auto oxidação (Ali *et al*, 2013). Porém, a alta expressão específica de peroxidases em tricomas sugere forte atividade de oxidação enzimática, permitindo potenciais reações oxidativas na fase final da biossíntese de artemisinina, que até agora se pensava ser de natureza não enzimática (Bryant *et al*, 2015).

A qualidade e a fonte das matérias-primas vegetais têm um papel central na padronização de medicamentos fitoterápicos, os quais devem possuir composição constante e propriedades terapêuticas que possam ser reprodutíveis. A domesticação e o melhoramento genético são ferramentas que auxiliam na obtenção de matérias-primas vegetais com estas características (GOBBO-NETO, 2007).

2.7 Métodos de Extração de Artemisinina

A extração da artemisinina em folhas de *A. annua L.* tem sido realizada com uso de solventes de diferentes polaridades e em diferentes equipamentos. No método clássico de extração tem se utilizado etanol ou metanol como solvente e aplicada agitação mecânica (Rodrigues *et al*, 2006). Porém, entres os métodos descritos, tem sido utilizado tolueno como solvente em equipamento de micro-ondas (Misra *et al*, 2014), hexano com uso de Soxhlet ou extração supercrítica com CO₂ (Ciftci *et al*, 2018).

A detecção da artemisinina tem sido realizada por diversos métodos, incluindo métodos semi-quantitativos, como Cromatografia de Camada Delgada, “TLC”, (Foglio, 1996), Cromatografia de Camada Delgada de Alta Eficiência, “HPTLC” (Gupta *et al*, 2006), e métodos quantitativos, “Cromatografia Líquida de Alta Eficiência” (HPLC) (Zhao e Zeng, 1986) e “Cromatografia Gasosa” (GC) (Sipahimalani *et al*, 1991).

Variações de métodos por TLC e HPTLC são descritas por diversos autores. Wildmer *et al* (2007) descrevem um método rápido e preciso para

determinação de artemisinina, através de análise por HPTLC em sílica gel, com uma mistura de ciclohexano/acetato de etila/ácido acético (20:10:1) como eluente, revelação com anisaldeído e avaliação densitométrica por fluorescência em 520/540 nm. Outro método que parece ser tão sensível e preciso quanto o método HPLC-UV, indica que as manchas correspondentes à artemisinina em uma placa de sílica gel (TLC), exposta ao vapor de amônia, com sua estrutura modificada para 10-azadesoxiartemisinina composta de cromóforo, pode ser quantificada diretamente de seu Cromatograma densitométrico a 320 nm (Koobkokkrud *et al*, 2007).

Descrito por Marchand *et al* (2008), outro método descreve que as amostras podem ser diluídas em diferentes solventes, centrifugadas e aplicadas nas placas com a solução padrão, sob fluxo de gás nitrogênio. Após serem imersas em solução eluente, aquecidas para secagem e encaminhadas a leitura dos pontos por densitometria, a leitura gera uma área de pico que pode ser calculada com software específico a partir da absorbância medida pelo modo de reflexão.

Como vantagens dos métodos de semi-quantificação por TLC temos: custo menor em relação aos métodos utilizando HPLC e várias amostras podendo ser analisadas de uma única vez. Como desvantagens temos a possibilidade de sobreposição de analitos e o número de etapas envolvidas. (Liu *et al*, 2010).

Apesar de citado como um método preciso, sensível, reprodutível e adequado para rastrear plantas produtoras de artemisinina de um grande número de amostras (Ghafoori *et al*, 2013), Ferreira e Janick (1995), enfatizam que a TLC não é suficientemente precisa para quantificar a artemisinina sem a interferência de outros compostos e pode subestimar (Delabays *et al*, 1994) ou superestimar (Marchese, 2001) a concentração de artemisinina na amostra.

As análises quantitativas por HPLC e GC são métodos mais precisos e confiáveis na quantificação de artemisinina a partir de amostras de plantas (Peng *et al*, 2006) e, normalmente, utilizados para testar a eficiência de métodos semi-quantitativos.

Além do detector Ultra violeta (HPLC-UV), que podem necessitar de derivatização das amostras, devido a carência de cromóforos (Marchese, 2001), outros métodos e equipamentos são utilizados para identificação e quantificação de artemisinina. Detecção por Índice de refração, "HPLC-IR" (Lapkin *et al*, 2009),

detecção eletroquímica, "HPLC-EC" (Ferreira *et al*, 1994), detecção por espalhamento de luz (evaporative light scattering detector), "HPLC-ELSD" (Peng *et al*, 2006), espectrometria de massas, "HPLC-MS" e "GC-MS" (Wang *et al*, 2005), eletroforese capilar, "EC" (Chen *et al*, 2002), espectroscopia por ressonância magnética nuclear, "NMR" (Rimada *et al*, 2009), entre outros. Dentre essas técnicas, GC-MS e LC-MS, são as mais frequentemente utilizadas para análise de artemisinina (Ma *et al*, 2009).

2.8 Compostos Aromáticos

O rendimento de óleo essencial de *A. annua L.* e o perfil fitoquímico variam de acordo com a idade das plantas e os fatores ambientais. O óleo obtido das folhas e inflorescência durante diferentes períodos de crescimento mostrou que, o teor de óleo diminuiu nas folhas de 0,32% a 0,14% e aumentou na inflorescência de 0,35% a 0,42%. Neste mesmo estudo, Bagchi *et al* (2003) identificaram vinte e quatro constituintes do óleo em plantas de *A. annua L.* no período mais quente do ano, sendo principalmente cânfora, canfeno, álcool de artemísia, germacreno D e 1,8-cineol. No inverno, outros componentes tomaram maior importância fitoquímica. Isso mostra que, na biossíntese dos constituintes do óleo, a temperatura desempenha um importante papel também em outras espécies aromáticas, como a *Mentha sp.*, alterando a concentração dos compostos em diferentes épocas do ano (Deschamps *et al*, 2008).

A composição do óleo essencial apresenta grandes diferenças nos principais componentes característicos, entre eles 1,8-cineol e cânfora, dependendo da origem fitogeográfica global. Dependendo dos diferentes perfis químicos, o óleo essencial de *A. annua L.* possui propriedades antimicrobianas em relação a inúmeras cepas gram-positivas e gram-negativas, e diversas cepas de fungos, incluindo muitos patógenos (Bilia *et al*, 2014).

Um fator preponderante na concentração dos diversos componentes do óleo essencial é o tempo de destilação, influenciando significativamente na proporção dos compostos (Zheljazkov *et al*, 2013). Além disso, os componentes do óleo essencial de *A. annua L.* variam de acordo com os níveis e estágios de florescimento das plantas, apresentando valores diferentes nos diferentes estágios vegetativo e de florescimento.

Em estudo fitoquímicos durante o desenvolvimento das plantas, Yang *et al*, (2012) concluíram que a concentração de monoterpenos apresentam tendência de decréscimo durante o florescimento e os sesquiterpenos apresentam elevado aumento até a fase de plena floração. Contrastando com Yang, Rana *et al* (2013), encontraram crescente aumento na concentração de monoterpenos e sesquiterpenos do período vegetativo até o florescimento e a concentração de componentes do óleo essencial anterior e durante o florescimento aparentemente não seguiram a tendência de produção de artemisinina na planta, segundo Brown, (2010).

2.9 Melhoramento de *Artemisia annua*

A *Artemisia annua* L. tem origem asiática e tem sido utilizada para o controle da malária, com a artemisinina como seu principal constituinte de interesse comercial e farmacêutico. Desde a identificação da atividade antimalárica da artemisinina, muitos esforços foram feitos para aumentar a produção comercial deste composto, incluindo síntese química, cultura de tecidos e uso de micro-organismos modificados. A semi-síntese da artemisinina pela derivatização de ácido artemisínico também não apresentou viabilidade econômica comparada a produção pela planta (Peplow, 2016) e a produção vegetal de *A. annua* L. é ainda a melhor fonte comercial de produção de artemisinina, para uso farmacêutico (Liu, 2011).

Paul *et al* (2014), atingiram progresso genético de 0,1% a 1,16%, em teor de artemisinina, utilizando quatro ciclos de seleção recorrente, com aumento simultâneo do tipo de dossel oval, altura de planta e padrão de ramificação. Eles observaram também, que o ácido artemisínico diminui ao longo de gerações, com conseqüente aumento do teor de artemisinina. Em 2012, Brisibe *et al* alcançaram produção superior a 30 toneladas.ha⁻¹ de biomassa e até 1,09 % de artemisinina, com genótipos de origem brasileira e acima de 2% quando plantas com alto teor de artemisinina e de diferentes regiões, foram cruzadas (Ferreira *et al*, 2018; Wetsztein *et al*, 2018).

2.10 Seleção de Genótipos via Índices de Seleção

A seleção de genótipos superiores em programas de melhoramento de diversas culturas é realizada mediante o uso de diversas estratégias de seleção, mas a maioria das estratégias foca na seleção de genótipos considerando caracteres individuais. No entanto, uma das estratégias que tem sido proposta para uma seleção mais eficiente, é baseada em índices de seleção.

A utilização dos índices de seleção permitem combinar vários caracteres simultaneamente no processo de seleção, e diversas metodologias baseadas nestes índices têm sido propostas. Dentre as metodologias atualmente utilizadas, destaca-se a “*Genotype by grain yield*trait (GYT)*”, proposta recentemente por Yan e Frégeau-Reid (2018). Esta análise fornece um índice de superioridade que permite avaliar os genótipos considerando várias características simultaneamente. Além disso, a análise é baseada em gráficos biplot e os caracteres são multiplicados ou divididos pelo caractere principal, que é definido com base no interesse do melhorista.

Matematicamente, um biplot pode ser considerado como uma exibição gráfica de multiplicação de matrizes. A análise biplot de um genótipo, por tabela de características, pode auxiliar o pesquisador no entendimento da cultura como um sistema integrado com componentes interligados, servindo de base para o estabelecimento de objetivos e critérios de seleção mais realistas (Yan e Tinker, 2006). Além disso, nestas análises os conjuntos de dados são resumidos nos gráficos biplot, o que facilita a visualização e interpretação dos resultados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de Cultivo e Material Vegetal

O experimento foi conduzido na área experimental do curso de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, localizada em Pato Branco-PR, latitude 26°11' S, longitude 52°36' W, altitude de 760 m, clima Cfa subtropical (KÖPPEN, 1948) e solo pertencente à unidade de mapeamento Latossolo Vermelho Distroférico Úmbrico, textura argilosa, álico, fase floresta subtropical perenifólia, relevo ondulado (BHERING *et al*, 2008).

Na primeira quinzena de junho de 2017, sementes do genótipo CPQBA 3 de *A. annua* L., originadas do Programa de Melhoramento do CPQBA/Campinas, foram semeadas em recipientes de 300 ml contendo substrato orgânico esterilizado. A germinação das sementes e desenvolvimento das mudas ocorreu em estufa plástica sob fotoperíodo de 15 horas para evitar o florescimento das plantas. No dia 27 de setembro de 2017, quando as plantas atingiram uma altura aproximada de 20 cm foram transplantadas a campo e mantidas sob irrigação até o pleno desenvolvimento.

A correção da acidez e a adubação foram realizadas com base em análise química do solo (Tabela 1), seguindo as recomendações da Comissão de Química e Fertilidade do Solo - RS/SC (2004). Os cálculos de adubação foram baseados na produção de milho, utilizando formulações de Uréia, Super Fosfato Simples e Cloreto de Potássio. Para correção da acidez foram utilizadas 1,55 toneladas.hectare⁻¹ de calcário calcítico (22/08/2017), calculada para soma de bases de 70%. O nitrogênio (N) foi aplicado antes do plantio e parcelado em duas vezes em cobertura durante o ciclo da cultura (01/11/2017 e 20/12/2017) na quantidade de 70 kg.hectare⁻¹. O potássio (K₂O) foi aplicado anterior ao plantio e em cobertura (01/11/2017) na quantidade de 30 kg.hectare⁻¹ e o fósforo (P₂O₅), apenas anterior ao plantio (27/09/2017) na quantidade de 45 kg.hectare⁻¹. A adubação baseou-se na necessidade de produção do milho pois a biomassa gerada é semelhante à de *A. annua* L. e não há uma recomendação específica para esta espécie (PALADINI, 2009). Não foi realizada análise e correção de micronutrientes.

Tabela 1 -- Características químicas do solo na camada de 0-20 cm. UTFPR. Pato Branco - PR, 2017.

PH CaCl ₂	Índice SMP	MO	P	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺ ₊	Al ³⁺	H ⁺ + Al ³⁺	V	M	CTC
	g.dm ⁻³	mg.dm ⁻³	mg.dm ⁻³	cmolc.dm ⁻³				%			
4,8	6	46,91	7,88	0,4	3,9	2,1	0,07	4,96	56,34	1,08	11,36

MO: matéria orgânica; V: saturação por bases; M: saturação por alumínio.
 Fonte: Zanatta, UTFPR. Pato Branco – PR. 2017.

3.2 Delineamento e Seleção de Plantas

O plantio foi delineado em estratos com espaçamento de 1x1 m, sendo 30 estratos e 33 plantas por estrato, além da bordadura. A área utilizada foi de 1120 m² (anexo A)

No dia 20 de janeiro de 2018 foi realizada a primeira avaliação visual das plantas, e em algumas plantas estavam ocorrendo ataques de insetos (*Trigona spinipes*) no terço superior do caule principal. As plantas apresentavam diferenças na cor dos caules e na cor da inserção dos ramos. Todas as plantas foram classificadas de acordo com os caracteres morfológicos, cor de caule roxo e verde e cor de inserção de ramos roxo e verde.

No dia 20 de fevereiro foi realizada a primeira avaliação agronômica para seleção e eliminação de plantas dentro dos estratos. Em todas as plantas foram aferidos os seguintes caracteres agronômicos: altura das plantas, diâmetro da seção média do dossel, número de ramificações e cor do caule e da inserção dos ramos.

3.3 Roguing

O processo de seleção no período anterior a polinização foi realizada

identificando 7 plantas por estrato que apresentavam menor volume de dossel e número de ramos, preferencialmente (Bolina *et al*, 2013), excluindo as plantas caídas, com galhos quebrados, doentes ou atacadas por insetos, permanecendo 210 plantas no total. As plantas não selecionadas foram eliminadas, incluindo as plantas de bordadura.

3.4 Avaliações Fisiológicas

As avaliações das trocas gasosas foram realizadas nas 210 plantas selecionadas, em ordem aleatória entre os estratos, entre os dias 6 e 9 de março de 2018, utilizando um sistema de medição de trocas gasosas, equipado com um analisador infravermelho de gases (IRGA) modelo LI-6400XT (LI-COR, Lincoln, Nebraska – USA), com injetor automático de CO₂ e fonte artificial de luz vermelho e azul.

As mensurações ocorreram aproximadamente entre 10 h e 12 h e foram realizadas nas folhas completamente desenvolvidas e sadias do terço médio das plantas, determinando as variáveis de taxa de assimilação de CO₂ (P_N , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (G_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentração intracelular de CO₂ (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$), taxa de transpiração (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e eficiência no uso de água, ($P_N \cdot E^{-1} = \text{WUE}$, %). As condições microclimáticas na câmara de medidas das amostras foram mantidas constantes nas medições, 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de PAR (photosynthetic active radiation/radiação fotossinteticamente ativa) e 400 ppm de CO₂.

3.5 Avaliações Agronômicas

No dia 20 de março de 2018 foram realizadas as avaliações agronômicas de todas as plantas dos estratos, sendo que os caracteres aferidos foram: altura da planta (A_t , m); altura de inserção do primeiro par de ramos plagiotrópicos (H_i , m); altura do dossel (H_d , m; onde $H_d = A_t - H_i$); diâmetro da seção inferior do dossel (D_i , m); diâmetro da seção média do dossel (D_m , m); diâmetro da seção superior do dossel (D_s , m); diâmetro do caule (DC , cm); número de ramificações (NR) e volume do dossel (V_c , m³). O volume do dossel foi adaptado da metodologia utilizada por Favarin *et al*,

(2002) para cálculo do dossel em cafeeiro e estimado pela equação $Vc = \pi((Di+Dm+Ds)/3)^2Hd/12$.

Quando cada planta iniciou o processo fisiológico de florescimento, aproximadamente 180 dias após o plantio, foi realizada a colheita de ramos e folhas individualmente, deixando a porção terminal do ramo principal de aproximadamente 30 cm para produção de sementes. O material foi colhido separadamente e colocado para secar até peso constante em estufa com circulação de ar e temperatura de 40°C. Após secagem, as folhas foram segregadas dos caules e ambos pesados para aferição de rendimento de peso seco de caule (PSC, kg), peso seco de folha (PSF, kg) e biomassa (Biomassa, kg ha⁻¹).

3.6 Coleta de Sementes

Desde o período vegetativo até o período reprodutivo, as práticas de seleção interferiram nas condições de desenvolvimento e interação ambiental das plantas. Diversas plantas foram atacadas por abelhas nativas (*Trigona spinipes*), outras caíram pela ação dos ventos e após a colheita dos ramos e folhas, diversas quebraram o ramo principal por ação de efeitos ambientais. Desta forma, ao proceder a coleta individual das sementes de cada planta, verificou-se que em 41 plantas ocorreu senescência antecipada por ataque de insetos, destas apenas 11 produziram sementes viáveis e outras 37 plantas caíram ou tiveram o ramo principal quebrado, durante o período. Assim, 138 plantas apresentaram sementes viáveis e puderam seguir no processo de avaliação fitoquímica para futura seleção. As sementes foram colhidas separadamente, conforme maturação fisiológica, aproximadamente 220 dias após o plantio e secas a temperatura ambiente.

3.7 Avaliações Fitoquímicas

Após avaliação das condições fisiológicas e presença de sementes viáveis, 138 (cento e trinta e oito) plantas foram submetidas as avaliações fitoquímicas para identificação das plantas com maior teor de artemisinina (g.100g PS⁻¹, ART %) e rendimento de óleo essencial (OLS, L ha⁻¹).

3.7.1 Teste em Cromatografia de Camada Delgada (TLC)

O teste para determinação da correlação entre os métodos de extração Ultra Turrax e Ultrassom foi realizado com 13 amostras utilizando 100 mg de folhas trituradas em nitrogênio líquido, adicionados 5 ml de tolueno e processadas em Ultra Turrax e Ultrassom, durante 3 minutos. A correlação entre os métodos de análise TLC/HPLC foi realizado com sete destas amostras, analisadas por HPLC.

3.7.2 Cromatografia de Camada Delgada

As análises de 138 plantas selecionadas para a quantificação do teor de artemisinina foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná através da técnica de Cromatografia em Camada Delgada (TLC), baseada no método descrito por Delabays (1997) e adaptado por Marchese *et al* (2001). Para cada amostra, 100 mg de folhas finamente trituradas foram extraídas em 5 ml de tolueno, em ultrassom (Cuba de ultrassom, frequência 42 KHz), por 3 minutos. Posteriormente, o extrato foi centrifugado durante 6 minutos a 3200g. Com uma microsseringa, 3 µl de cada extrato foram aplicados sobre uma placa de sílica-gel 60 F254 (MERCK art. 1.05554.0001). Cada placa recebeu cinco diferentes concentrações de artemisinina padrão (1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 µl de uma solução contendo 0,25 µg/µl) ao centro, mais 13 aplicações de amostras nas laterais. As placas do ensaio foram eluídas em cuba de vidro previamente saturada com uma mistura de clorofórmio:metanol (99:1). 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 °C durante cinco minutos. Após a revelação, a imagem de cada placa foi registrada através de scanner multifuncional, resolução 600 dpi e procedida a análise de densidade de cada mancha com o software IMAGEJ. As curvas de calibração e dados das curvas de calibração se encontram no Anexo A.

A escolha das amostras para análises por HPLC foi baseada na relação entre produção de biomassa de planta e o teor de artemisinina, determinadas pelo

método de Cromatografia de Camada Delgada.

3.7.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As análises fitoquímicas das 50 plantas selecionadas por cromatografia de camada delgada para quantificação de artemisinina foram realizadas na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA/UNICAMP). Os caracteres analisados foram teor de artemisinina (ART, %), teor de ácido di-hidroartemisinico (DHAA, %) e rendimento de artemisinina por hectare (REND, Kg. ha⁻¹).

Os extratos foram obtidos a partir de 0,500g de folhas secas e moídas com 2 extrações com 8 mL de metanol, em Ultra Turrax por 3 min, 16.000 g à temperatura ambiente. Cada fração de 8ml foi centrifugada por 6 minutos a 3.200 g e posteriormente juntadas e o solvente foi evaporado a secura em um evaporador rotativo. As amostras foram ressuspensas em metanol, transferidas para balão volumétrico de 5ml e completado o volume com metanol. Anterior a injeção no HPLC, as amostras foram filtradas em Millex.

A análise por HPLC foi realizada em cromatógrafo líquido Waters (Massachusetts, USA), bomba Waters 515, válvula injetora Rheodyne, com alça de amostragem de 20 µL. O sistema foi acoplado a um detector de índice de refração Waters 2414; temperatura interna do detector 35°C; temperatura da coluna 35°C. Os dados cromatográficos foram analisados usando-se software do equipamento Empower-Waters. Utilizou-se coluna com fase estacionária ciano, Luna CN-5 µm 250 x 4,6 mm (Phenomenex, Califórnia, USA); fase móvel água:metanol (65:35 v/v); modo isocrático e vazão 1,0 ml/min. As curvas de calibração e os dados da curva analítica encontram-se no Anexo A.

3.8 Teor e Rendimento de Óleo Essencial

A extração do óleo essencial foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná em aparelho graduado Clevenger. Para o processo de hidrodestilação foram utilizados 100 g de massa seca de folhas em balão volumétrico de 2 L, contendo 1 L de água destilada. Após o início da condensação ocorreu a extração durante 3 horas. Depois de aferir o peso de óleo extraído, este foi armazenado hermeticamente em vidros âmbar, em geladeira a 4°C.

A análise dos óleos essenciais foi realizada por cromatografia gasosa/espectrometria de massas em um cromatógrafo a gás Agilent, modelo HP-6890 equipado com um detector seletivo de massas Agilent, modelo HP-5975 utilizando uma coluna capilar HP-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm) nas seguintes condições: temperatura do injetor = 220°C, coluna = 60°C, taxa de aquecimento de 3°C·min⁻¹ até 240°C e detector = 250°C. Hélio foi utilizado como gás de arraste numa vazão de 1ml.min⁻¹. Detector seletivo de massas operando a 70 eV, m/z = 30 a 500 u.m.a.

O óleo foi solubilizado em metanol na concentração de 20 mg·ml⁻¹ e a identificação foi realizada através do cálculo dos índices de retenção dos compostos, utilizando-se a co-injeção de uma mistura de padrões de hidrocarbonetos (C8 a C24), comparação com compostos da biblioteca eletrônica do equipamento (NIST-11) e com dados da literatura (Adams, 2007).

3.9 Análises Estatísticas

As comparações de médias entre os parâmetros apresentados foram realizadas através da Plataforma R (R-3.4.4.tar.gz, 2018) com níveis de significância de 5% pelo teste de Tukey (<https://cran.r-project.org/src/base/R-3/>).

A correlação entre os parâmetros fisiológicos, agrônômicos, fitoquímicos e o teor de artemisinina foi estimada através do coeficiente de correlação de Pearson, e o nível de significância pelo teste t, com o auxílio do software GENES (CRUZ, 2001).

A GYT foi gerada pela combinação de cada caractere e GY (teor de artemisinina). A metodologia desenvolvida por Yan e Frégeau-Reid (2018) orienta que cada caractere deve ser multiplicado ou dividido por GY de acordo com os objetivos

do melhorista. Para o presente estudo, todos os caracteres foram multiplicados pelo teor de artemisinina (ART), como caractere principal.

A análise gráfica de média e estabilidade utilizou os seguintes parâmetros: Transformação de dados (Transform = 0), escala de dados (Scaling = 1), centralização de dados (Data centering = 2) e SVP = 1, foco no genótipo. A linha com seta única seta passa por origem do biplot e aponta para maiores valores de combinação entre teor de artemisinina e os caracteres. Os vetores de projeção de cada genótipo a partir da linha indicam se um genótipo foi mais estável ou instável em relação a todas as combinações entre os caracteres analisados. Análises Biplot foram realizadas usando o software GGEbiplot (Yan 2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Testes de Cromatografia de Camada Delgada

O teste de TLC utilizando diferentes sistemas de homogeneização foi realizado em duas etapas: a avaliação TLC ocorreu pela correlação entre os resultados das análises utilizando o Ultra Turrax e o Ultrassom (Tabela 2), com 13 amostras (Figuras 3 e 4), e a avaliação TLC/HPLC, ocorreu com a utilização dos resultados de TLC de sete destas amostras correlacionadas com os resultados por HPLC (Tabela 3).

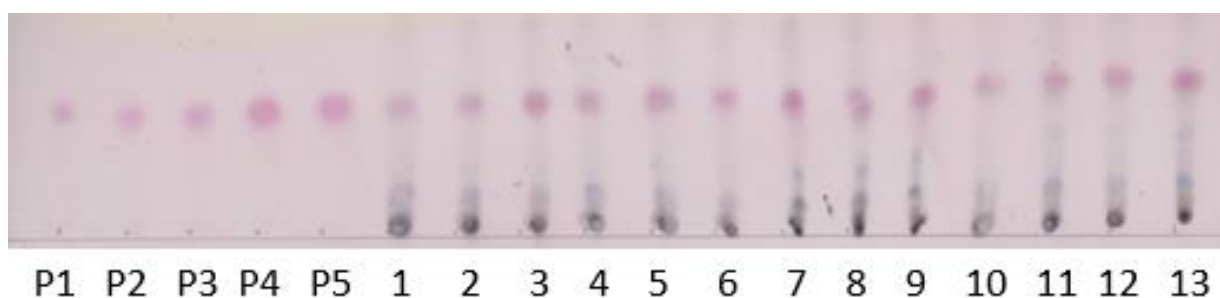


Figura 3 -- Placa de TLC utilizando sistema de homogeneização com Ultra Turrax. UTFPR. Pato Branco - PR, 2018.

Fonte: Zanatta, UTFPR. Pato Branco – PR. 2018.

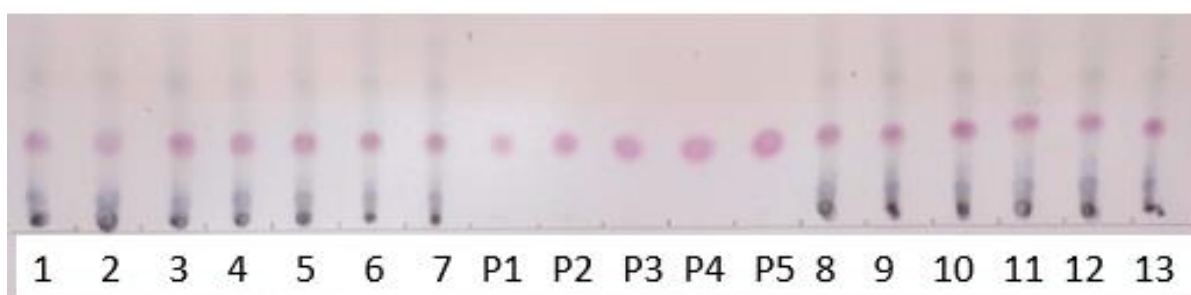


Figura 4 -- Placa de TLC utilizando sistema de homogeneização com Ultrassom. UTFPR. Pato Branco - PR, 2018.

Fonte: Zanatta, UTFPR. Pato Branco – PR. 2018.

A primeira avaliação de TLC apresentou correlação significativa ($r=0.0001$) de 0,87 entre os sistemas de homogeneização. Este resultado foi utilizado como referência para análise das demais amostras pelo sistema de homogeneização com o equipamento de Ultrassom (Tabela 4).

A segunda avaliação utilizando TLC e HPLC apresentou valores de

correlação de 0,73 ($r=0,06$) para o uso comum do Ultra Turrax e correlação de 0,7 ($r=0,07$) utilizando o Ultrassom em TLC e Ultra Turrax em HPLC (Tabela 4). Esses dados, mesmo com valores não significativos, foram superiores aos encontrados por Marchese (1999), em que a correlação entre os métodos de Cromatografia de camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência apresentou $r=0,199$, e similares aos encontrados por Quennoz *et al* (2010) em que a correlação variou de 0,7 a 0,86 entre TLC e HPLC.

Tabela 2 – Comparação entre sistemas de homogeneização em TLC em *Artemisia annua L.* UTFPR. Pato Branco - PR, 2018.

TLC					
Ultra Turrax			Ultrassom		
Padrão	Densidade óptica		Padrão	Densidade óptica	
mg.ml ⁻¹	Unidade		mg.ml ⁻¹	Unidade	
0.25	0.037		0.125	0.017	
0.375	0.054		0.25	0.039	
0.5	0.066		0.625	0.087	
0.75	0.114		0.75	0.102	
ART			ART		
Amostras		g/100g	Amostras		g/100g
1	0.707	3.536	1	0.473	2.341
2	0.637	3.184	2	0.451	2.230
3	0.816	4.080	3	0.741	3.668
4	0.688	3.440	4	0.518	2.562
5	0.829	4.144	5	0.964	4.773
6	0.618	3.088	6	0.465	2.304
7	0.976	4.879	7	1.054	5.216
8	0.944	4.720	8	0.733	3.631
9	1.008	5.039	9	0.905	4.523
10	0.643	3.216	10	0.398	1.992
11	0.938	4.688	11	0.741	3.704
12	0.848	4.240	12	0.756	3.741
13	1.187	5.935	13	0.987	4.933
Equação=0.1625x+0.0625 R ² =0.9657			Equação=7.4449x-0.0185 R ² =0.9967		

Tabela 3 – Quantificação de artemisinina em HPLC em *Artemisia annua* L. UTFPR. Pato Branco - PR, 2018.

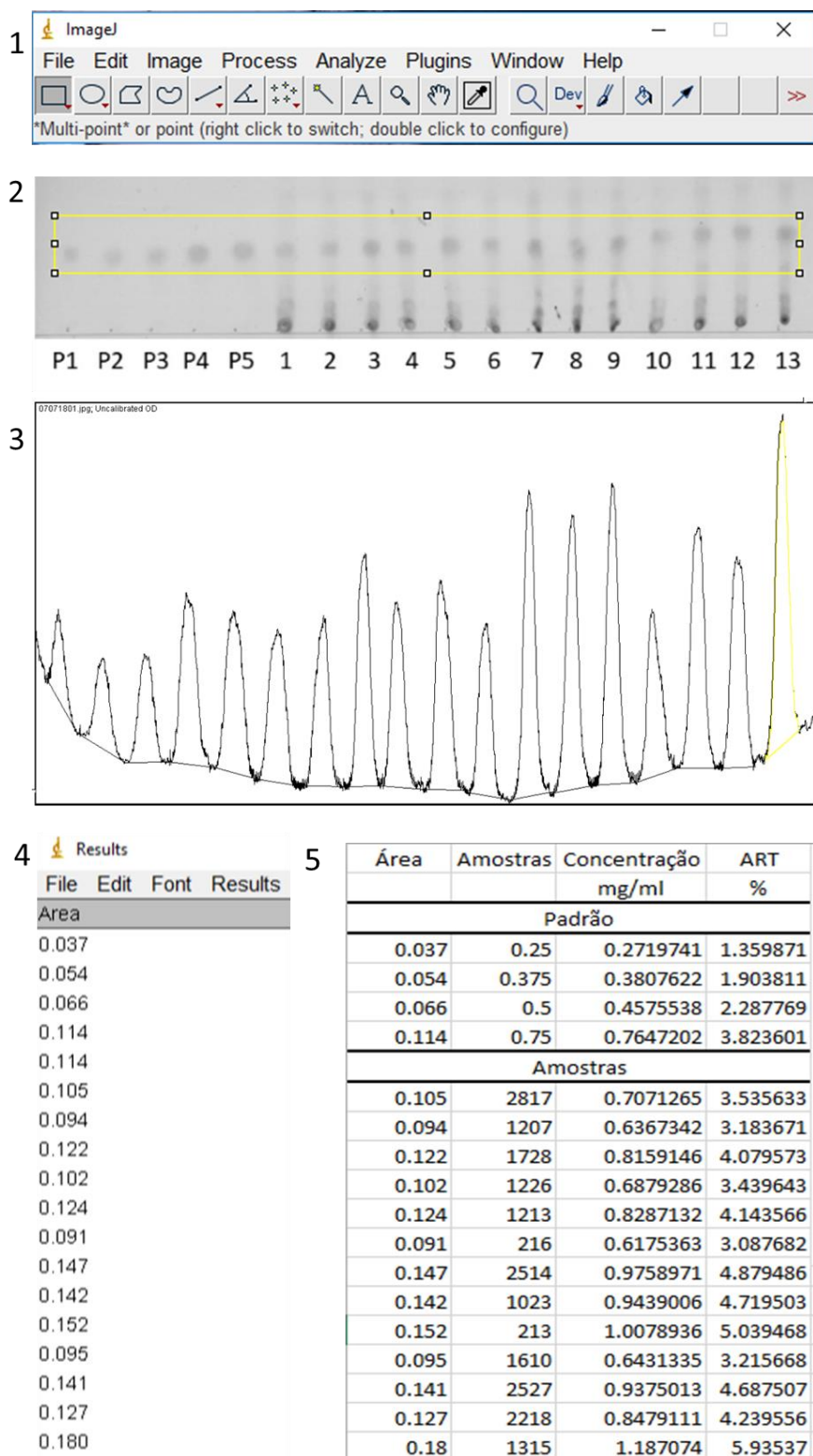
HPLC		
Concentração Padrão	Área	
$\mu\text{g ml}^{-1}$	Unidade	
129.2	97596	
258.4	232119	
387.6	376490	
646.0	685295	
904.4	985518	
1292.0	1403200	ART
Amostras		g/100g
1	476536	0.42
3	965262	0.85
5	827097	0.73
7	827097	0.73
9	1002699	0.88
12	838509	0.74
13	1026351	0.9
Equação=1135x-54286		R=0.9996

Tabela 4 -- Correlação entre sistemas de homogeneização em TLC e entre TLC e HPLC para 7 e 50 amostras para quantificação de artemisinina em *Artemisia annua* L. UTFPR. Pato Branco - PR, 2018.

Correlação TLC - 7 amostras		
	Ultrassom	p
Ultra Turrax	0.87	0.00
Correlação TLC/HPLC - 7 amostras		
	HPLC	
TLC	Ultra Turrax	p
Ultra Turrax	0.73	0.06
Ultrassom	0.7	0.07
Correlação TLC/HPLC - 50 amostras		
	HPLC	p
TLC	0.35	0.01

As amostras dos cinquenta materiais selecionados apresentaram correlação positiva $r=0,35$ entre TLC e HPLC com significância pelo “teste t de student” a 1% de probabilidade (Tabela 4) e esta condição permite inferir que o método TLC apresenta limitações na quantificação do teor de artemisinina e conseqüentemente,

na identificação dos genótipos superiores, mesmo com elevados coeficientes de correlação das curvas de calibração (Anexo A).



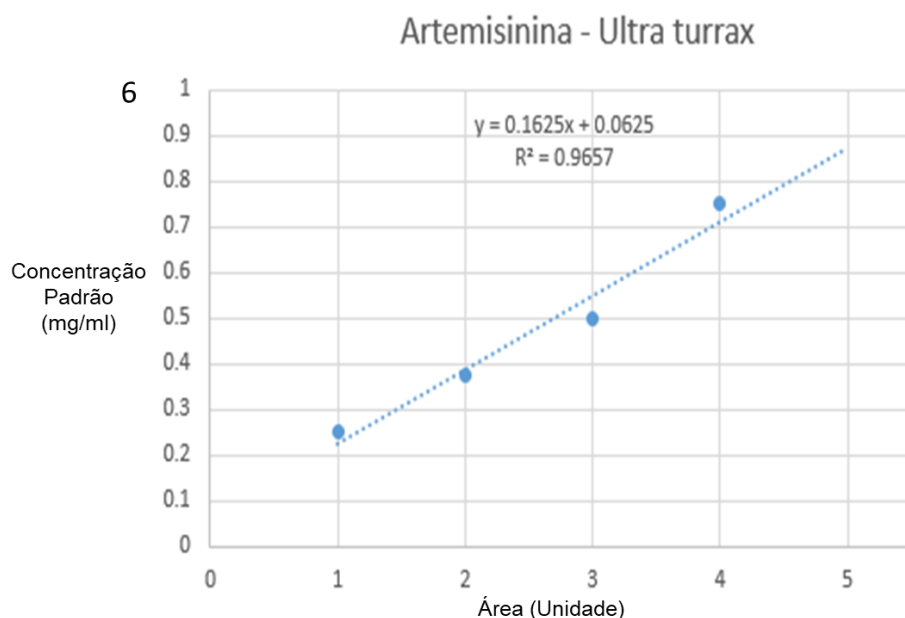


Figura 5. Imagem das análises realizadas pelo programa IMAGEJ. (1: barra de tarefas do programa; 2: imagem e seleção das bandas 3: picos gerados pela análise de cada banda 4: dados de área dos picos; 5: tabela com os dados de cada amostra e cálculo de teor de artemisinina; 6: curva padrão com equação da curva e R^2). UTFPR. Pato Branco - PR, 2018.
Fonte: Zanatta, UTFPR. Pato Branco – PR. 2018.

O programa IMAGEJ foi eficiente na leitura da densidade ótica, com coeficiente de correlação para a quantificação de artemisinina em TLC, entre $r=0,96$ e $0,99$. Esses valores são similares ao valor de $r=0,95$ encontrado por Marchese (1999), utilizando fotodensitômetro PHARMACIA BIOTHECH/IMAGE MASTER 1D, e $r=0,99$ utilizando UV-254 nm (Ghafoori *et al* 2013). Teixeira (2011), utilizando o programa IMAGEJ para determinar as concentrações de ocratoxina sob observação em luz UV encontrou valores de $r= 0,99$.

4.2 Estatística Descritiva para Caracteres fisiológicos, agrônômicos e fitoquímicos

Os resultados dos caracteres agrônômicos, fisiológicos e fitoquímicos de 50 materiais quantificados para artemisinina por HPLC são apresentados na tabela 5. Os valores de PSC, PSF, Óleo, ART, DHAA, Cine, Canf, Tcar, Tfar, Germ, Espat, Ocar, Ccadin e EAB são descritos em porcentagem da população. Os valores de BIO, OLS

e REND são descritos em Kg.hectare⁻¹.

Tabela 5 -- Estatística Descritiva dos Caracteres fisiológicos, agronômicos e fitoquímicos de cinquenta plantas de *A. annua* L. UTFPR. Pato Branco - PR, 2018.

	Caracteres	N	Média	Mínimo	Máximo	CV(%)	Variância	Desvio Padrão
Fisiológicos	P_N	50	22,75	13,48	33,25	22,6	26,4	5,14
	G_s	50	0,99	0,22	3,21	67,8	0,5	0,67
	C_i	50	298,94	231,9	343,00	10,27	943	30,7
	E	50	6,78	3,00	13,47	33,6	5,2	2,28
	WUE	50	0,37	0,16	0,64	38,6	0,0	0,14
Agronômicos	At	50	2,51	2,20	2,80	6,7	0,0	0,17
	Hi	50	6,54	0,00	18,00	60,5	15,6	3,95
	Hd	50	2,43	1,80	2,70	7,5	0,0	0,18
	Di	50	0,91	0,60	1,40	19,9	0,0	0,18
	Dm	50	1,25	0,90	1,70	14,0	0,0	0,18
	Ds	50	1,30	1,00	1,80	13,8	0,0	0,18
	Vc	50	0,86	0,46	1,77	33,8	0,1	0,29
	DC	50	5,42	4,00	8,00	18,7	1,0	1,01
	NR	50	7,72	2,00	11,00	23,1	3,2	1,78
	PSC	50	1,21	0,38	2,15	29,6	0,1	0,36
	PSF	50	0,37	0,20	0,58	24,0	0,0	0,09
	BIO	50	3668,2	1980	5750	24,0	0,0	0,09
Fitoquímicos	Óleo	50	0,72	0,13	1,25	30,3	0,0	0,22
	OLS	50	26,37	4,30	47,60	36,5	92,9	9,64
	REND	50	26,16	12,60	49,30	34,6	82,0	9,05
	ART	50	0,73	0,33	1,28	30,5	0,0	0,22
	DHAA	50	0,05	0,00	0,17	57,9	0,0	0,03
	Cine	50	6,30	0,60	13,30	46,5	8,6	2,93
	Canf	50	18,82	0,00	38,70	49,1	85,3	9,24
	Tcar	50	9,40	4,80	18,20	31,1	8,6	2,92
	Tfar	50	7,30	0,00	13,60	31,1	5,1	2,27
	Germ	50	15,01	7,80	28,50	31,7	22,7	4,76
	Espat	50	2,71	0,00	5,90	42,1	1,3	1,14
	Ocar	50	5,21	1,70	10,80	34,9	3,3	1,82
	Ccadin	50	1,43	0,60	3,40	41,0	0,3	0,58
	EAB	50	2,71	0,00	7,50	43,0	1,4	1,17

P_N: taxa de assimilação de CO₂; **G_s**: condutância estomática; **C_i**: concentração interna de CO₂; **E**: transpiração; **WUE**: eficiência do uso da água; **At**: altura da planta; **Hi**: altura da inserção do primeiro ramo plagiotrópico; **Hd**: altura do dossel; **Di**: diâmetro inferior do dossel; **Dm**: diâmetro médio do dossel; **Ds**: diâmetro superior do dossel; **Vc**: volume do dossel; **DC**: diâmetro do caule; **NR**: número de ramos; **PSC**: peso seco do caule; **PSF**: peso seco de folhas; **BIO**: biomassa; **Óleo**: teor de óleo essencial; **OLS**: rendimento de óleo essencial; **REND**: rendimento de artemisinina; **ART**: teor de artemisinina; **DHAA**: ácido dihidroartemisínico; **Cine**: 1,8 cineol; **Canf**: canfeno; **Tcar**: trans-cariofileno; **Tfar**: trans-beta-

farneseno; Germ: germacreno D; Espat: espatuleno; Ocar: óxido de cariofileno; Ccadin: cis-cadin-4-en-7-ol; EAB: epi alfa-bisabolol.

4.3 Análises Fisiológicas

Os caracteres fisiológicos analisados apresentaram correlação significativa entre si (Tabela 6), porém não apresentaram correlação significativa com o teor ou rendimento de artemisinina. O caractere taxa de assimilação de CO₂ (P_N) apresentou correlação negativa fraca com a concentração interna de CO₂ (Ci) e positiva com eficiência do uso da água (WUE).

O caractere condutância estomática (G_s) apresentou correlação significativa forte e positiva com o caractere Ci e fraca com taxa de transpiração (E), coerente com os níveis de abertura estomática em que a condutância estomática proporciona a variação dos níveis de concentração interna de CO₂, da mesma forma que, inevitavelmente, possibilita a perda de água para o ambiente (Paiva *et al*, 2005). O caractere Ci apresentou correlação positiva com E e negativa com WUE e o caractere E apresentou correlação negativa com WUE.

Os dados corroboram com os valores encontrados por Bolina *et al* (2013), em que o conjunto geral de caracteres fisiológicos estudados não apresentaram correlação significativa com o teor de artemisinina. Porém, os valores médios de P_N são similares aos encontrados por Wang *et al* (2008), correlacionando positivamente os teores de artemisinina com biomassa e massa foliar, em plantas desenvolvidas em diferentes níveis de radiação.

Com aplicação exógena de Triacontanol e Ácido Giberélico, Aftab *et al* (2010) proporcionaram um aumento tanto, da P_N , Ci e G_s , quanto do teor e rendimento de artemisinina em genótipos indianos de *A. annua L.*

Tabela 6 -- Coeficientes de correlação e níveis de significância entre caracteres fisiológicos com teor e rendimento de Artemisinina em *A. annua* L. UTFPR. Pato Branco - PR, 2018.

Caracteres	P_N	Gs	Ci	E	WUE	ART
Gs	0.23					
Ci	-0.33*	0.69**				
E	-0.13	0.32*	0.53*			
WUE	0.64**	-0.21	-0.70**	-0.77**		
ART	0.21	0.13	-0.09	-0.09	0.17	
REND	0.04	-0.18	-0.22	-0.19	0.17	0.68**

P_N : taxa de assimilação de CO_2 ; Gs: condutância estomática; Ci: concentração interna de CO_2 ; E: transpiração e WUE: eficiência do uso da água; ART: teor de artemisinina e REND: rendimento de artemisinina. ** e *, significativo ao nível de 1 e 5% de probabilidade pelo teste t.

4.4 Análises Agronômicas

A análise de correlação entre os caracteres agronômicos, biomassa e peso seco de folha (PSF) apresentou correlação negativa significativa com teor de artemisinina (Tabela 7), de modo similar ao encontrado por Graham *et al* (2010) em que os caracteres da arquitetura de *A. annua* L. e teor de artemisinina se encontram em eixos opostos no gráfico de associação dos caracteres: distribuição de tricomas, produção de folhas, arquitetura e teor de metabólitos.

A correlação negativa entre biomassa de folhas e teor de artemisinina em plantas com elevado teor de artemisinina pode ser devido à diminuição do nível de desenvolvimento das folhas que permite o uso de carboidratos disponíveis para síntese e acúmulo dos metabólitos secundários (Damtew *et al*, 2011). Contrastando com esses resultados, Brisibe *et al* (2012) encontraram correlação positiva entre biomassa de folha e teor de artemisinina avaliando seis genótipos de diferentes origens em planícies tropicais úmidas.

Os caracteres peso seco de folha, biomassa, diâmetro do caule e teor de artemisinina apresentaram correlação positiva e significativa com rendimento de artemisinina (Tabela 7). Raymond *et al* (2015) encontraram valores significativamente negativos entre diâmetro de caule, altura de planta e rendimento de artemisinina em plantas induzidas a mutação do genótipo Artemis.

A correlação positiva e significativa entre as características da folha e a parte aérea, e correlação negativa do PSF e BIO com o teor de artemisinina indicam

que apesar de plantas com baixa produção foliar apresentarem maior teor de artemisinina, altos rendimentos são obtidos quando a cultura produz elevada quantidade de biomassa (Raymond *et al*, 2015) e altos teores de artemisinina.

A correlação entre o caractere diâmetro do caule e o rendimento também foi encontrada por Fu *et al* (2016) em genótipos de origem chinesa, indicando que este caractere pode ser usado para selecionar plantas com alto rendimento, principalmente por estar relacionado com a produção de biomassa da planta.

Tabela 7 -- Coeficientes de correlação e níveis de significância entre caracteres agrônômicos com teor e rendimento de Artemisinina em *A. annua* L. UTFPR. Pato Branco - PR, 2018.

Caracteres	At	Hi	Hd	Di	Dm	Ds	Vc	DC	NR	PSC	PSF	BIO	ART
Hi	0.28												
Hd	0.78**	-0.02											
Di	0.35*	0.2	0.24										
Dm	0.26	0.05	0.21	0.74**									
Ds	0.25	0.07	0.22	0.63**	0.93**								
Vc	0.44**	-0.02	0.48**	0.69**	0.79**	0.76**							
DC	0.23	-0.01	0.39**	0.39**	0.26	0.23	0.33*						
NR	-0.30*	-0.24	0.15	-0.13	-0.15	-0.15	-0.05	0.08					
PSC	0.21	-0.18	0.50**	0.35*	0.25	0.25	0.40**	0.50**	0.43**				
PSF	0.02	-0.25	0.29*	0.26	0.24	0.20	0.30*	0.37**	0.25	0.59**			
BIO	0,02	-0.25	0,29*	0.26	0.24	0.20	0,30*	0,37**	0,25	0.59**	1.0**		
ART	-0.01	0.25	-0.17	-0.01	0.06	0.14	-0.04	0.05	-0.07	-0.03	-0.27*	-0.27*	
REND	-0.06	-0.01	0.11	0.18	0.23	0.26	0.19	0.35*	0.21	-0.22	0.49**	0.49**	0.68**

At: altura da planta; Hi: altura de inserção do primeiro par de ramos plagiotrópicos; Hd: altura do dossel; Di: diâmetro da seção inferior do dossel; Dm: diâmetro da seção média do dossel; Ds: diâmetro da seção superior do dossel; DC: diâmetro do caule; NR: número de ramificações; Vc: volume do dossel; PSC: peso seco de caule; PSF: peso seco de folha; BIO: biomassa; ART: teor de artemisinina e REND: rendimento de artemisinina. ** e *, significativo ao nível de 1 e 5% de probabilidade pelo teste t.

A análise de correlação dos caracteres agrônômicos identificou que os caracteres altura de planta e número de ramos (NR) apresentaram correlação significativa negativa entre si, e as demais correlações significativas entre os caracteres agrônômicos foram significativas e positivas.

Em acessos da variedade 2/39x1V, Bolina *et al* (2013) encontraram correlação negativa não significativa ($r=-0,53$) para esses caracteres e em acessos da variedade 2/39x5x3M encontraram correlação negativa entre o volume do dossel e o número de ramos e correlação positiva entre volume de dossel e produção de óleo essencial, contrastando com trabalhos de análise de trilha de Paul *et al* (2011), que

indicam que o rendimento de artemisinina e o óleo podem ser melhorados pelo aumento da densidade de plantas, altura da planta e número de ramificações.

4.5 Análises Fitoquímicas

Quando avaliadas as correlações entre os caracteres ácido dihidroartemisínico (DHAA) e teor de artemisinina, foi evidenciado uma correlação positiva fraca (Tabela 8), corroborando com os resultados de Suberu *et al* (2016). Os valores de DHAA são relativamente inferiores aos apresentados por Ferreira *et al* (2018), sugerindo alta conversão da molécula em teor de artemisinina, já que a mesma faz parte de sua rota metabólica e decresce de acordo com o aumento de ART na planta (Lommen *et al*, 2006). Esta conversão também ocorre no processo de secagem das plantas a pleno sol em pós colheita, evoluindo conforme o tempo de secagem até 48 horas (Charles *et al*, 1993) e atingindo valores próximos a 100% em até três semanas (Ferreira e Luthria, 2010).

Em experimento em cultivo protegido Larson *et al* (2013) encontraram as maiores médias de teor de artemisinina e ácido dihidroartemisínico de 1,5% e 0,29%, respectivamente, em linhagens de *A. annua* L. suíça e em genótipos de origem inglesas e Keniana, Suberu *et al* (2016) identificaram níveis de 0,8% a 1,3% de ART e 0,37% a 0,73% de DHAA.

Tabela 8 -- Coeficientes de correlação e níveis de significância entre caracteres fitoquímicos com teor e rendimento de Artemisinina em *A. annua* L. UTFPR. Pato Branco - PR, 2018.

Caracteres	Óleo	OLS	DHA	Cine	Canf	Tcar	Tfar	Germ	Espat	Ocar	EAB	Ccadin	ART
OLS	0.73**												
DHA	0.03	-0.10											
Cine	0.49**	0.23	-0.18										
Canf	0.12	0.07	-0.06	0.50**									
Tcar	-0.12	-0.03	-0.02	-0.35*	-0.41**								
Tfar	-0.01	0.07	-0.08	-0.28	-0.6**	0.22							
Germ	0.06	0.06	-0.01	-0.34*	-0.52**	0.80**	0.39**						
Espat	0.04	0.06	0.09	-0.42**	-0.36*	-0.19	0.09	0.01					
Ocar	-0.60**	-0.44**	0.07	-0.48**	-0.20	0.14	-0.14	-0.14	0.28				
EAB	-0.34*	-0.21	0.05	-0.4**	-0.56**	-0.13	0.12	-0.16	0.46**	0.53**			
Ccadin	-0.12	-0.04	0.04	-0.34*	-0.49**	-0.02	0.08	0.16	0.22	0.21	0.29*		
ART	0.16	-0.06	0.30*	0.04	-0.01	-0.16	-0.17	0.01	-0.02	-0.13	-0.01	0.30*	
REND	0.10	0.41**	0.17	-0.19	-0.06	-0.06	-0.07	0.03	0.05	-0.05	0.06	0.33*	0.68**

Óleo: teor de óleo por planta; OLS: produção de óleo por hectare; DHA: teor de ácido dihidroartemisinínico; Cine: cineol; Canf: cânfora; Tcar: transcariofileno; Tfar: Trans beta farneseno; Germ: germacrema; Espat: espatuleno; Ocar: oxido de cariofileno, EAB: epi alfa bisabolol; Ccadin: cis-cadin-4-en-7-ol; ART: teor de artemisinina e REND: rendimento de artemisinina. ** e *, significativo ao nível de 1 e 5% de probabilidade pelo teste t.

A correlação entre o teor de óleo e ART não apresentou significância para este estudo, corroborando com dados de Woerdenbag *et al* (1994) em que o pico de ART ocorreu em período anterior ao florescimento e o teor de óleo essencial apresentou maior concentração na fase de pré-florescimento.

Para Gupta *et al* (2002), o pico de teor de óleo essencial encontra-se no período de florescimento pleno e neste estágio a planta apresenta menor peso seco de folhas e % de artemisinina nas folhas comparado com o período vegetativo. O período de aumento do teor de óleo essencial coincide com o período de decréscimo do teor de artemisinina na planta e esta condição pode indicar algum nível de competição na formação dos compostos. Porém, em um estudo com diferentes variedades de *A. annua L.* na Índia, foi detectado na variedade com maior teor de ART, correlação com o conteúdo de sesquiterpenos do óleo essencial. Os autores sugeriram que a seleção para o aumento dos teores de ART atuou na elevação do conteúdo dos sesquiterpenos voláteis (Goel *et al*, 2018).

O rendimento de óleo essencial (OLS) apresentou correlação positiva com o rendimento de artemisinina, evidenciando a importância do caractere biomassa nesta condição, já que teor de óleo e teor de artemisinina não se correlacionaram na mesma proporção.

O perfil fitoquímico dos monoterpenos e sesquiterpenos estão descritos nas tabelas 13 e 14. O componente principal do óleo essencial da variedade CPQBA 3 foi a cânfora (18,5%), seguido do germacreno D (14,8%), trans-cariofileno (9,2%), trans- β -farneseno (7,4%), 1,8-cineol (6,1%), óxido de cariofileno (5,2%), espatulenol (2,8%), epi alfa-bisabolol (2,7%), β -chamigreno (2,4%), β -mirceno (1,6%) e cis-cadin-4-en-7-ol (1,4%). Os demais componentes não apresentaram valores acima de 1% na amostra de óleo essencial.

Bagchi *et al* (2003) encontraram resultados semelhantes com cânfora, cânfeno, álcool de artemisia, germacreno D e 1,8-cineol como componentes principais, com variação dos compostos entre os estágios de florescimento e entre as folhas e inflorescências. Cânfora e 1,8-cineol foram os componentes majoritários dos

óleos extraídos do genótipo CPQBA x POP em diferentes locais do arquipélago da Madeira/Portugal (Gouveia e Castilho, 2013).

4.6 Correlações e Médias entre Caracteres Agronômicos, Fisiológicos e Fitoquímicos de *A. annua* utilizando Caracteres Morfológicos



Figura 6 -- Caracteres morfológicos de plantas de *A. annua* L. (1. Caule e inserção de ramos roxos; 2. Caule verde e inserção de ramos roxo; 3. Caule e inserção de ramos verdes). UTFPR. Pato Branco - PR, 2018.

Fonte: Zanatta, UTFPR. Pato Branco - PR, 2018.

Os caracteres morfológicos, caule roxo e verde e inserção dos ramos roxo e verde, foram utilizados para as análises de médias, correlação com ART ($\% \cdot \text{planta}^{-1}$) e rendimento de artemisinina ($\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$).

As médias entre caules apresentaram valores para altura de planta (At), altura de dossel (Hd) e Óxido de Cariófileno (Ocar), significativamente maiores para caule verde e 1,8-Cineol, para caule roxo (Tabela 9).

O caractere 1,8-Cineol apresentou teor 62% superior nas plantas de caule roxo, que em plantas de caule verde. O componente 1,8-cineol apresenta atividade antibacteriana sinérgica com outros produtos para uso antisséptico (Simsek e Duman, 2017) e notadamente possui efeito inibitório no desenvolvimento de plantas (Muller and Muller, 1964). A cor do caule pode representar um caractere importante na escolha de genótipos de interesse para aumento deste composto nas plantas. Em *Ocimum* sp. este descritor morfológico diferencia espécies e variedades (Chowdhury et al, 2017), e pode ser correlacionado com altos teores de metil eugenol, geraniol e cânfora (Gautam et al, 2010).

Tabela 9 -- Médias entre caracteres morfológicos e caracteres fisiológicos, agronômicos e fitoquímicos em *A. annua* L. UTFPR. Pato Branco - PR, 2018.

Caracteres	Caule		Inserção dos ramos	
	Roxo	Verde	Roxo	Verde
Hd	2.29	2.46*	2.373	2.487*
At	2.38	2.55*		
Cine	9.0**	5.54		
Ocar	4.2	5.49*		
WUE			0.334	0.414*
PSF			0.339	0.396*
OLS			23.81	29.14*

Hd: altura do dossel; At: altura da planta; Cine: teor de 1,8-cineol; Ocar: óxido de cariofileno; WUE: eficiência do uso da água; PSF: peso seco de folhas; OLS: rendimento de óleo essencial. * e **: significativo a 5% e 1%, respectivamente.

Os caracteres WUE, Hd, PSF e OLS apresentaram médias superiores para inserção de ramo verde, comparado com inserção de ramo roxo.

As análises de correlação entre cor de caule com teor de artemisinina apresentaram valores negativos de altura de dossel para caule roxo (Tabela 10). Bolina *et al* (2011), encontraram o mesmo valor de correlação de altura de dossel com teor de artemisinina na variedade 2/39x5x3M indicando que menor altura de dossel pode ser usada para identificação de plantas de caule roxo e com elevado teor de artemisinina. Diferente destes resultados, Fu *et al* (2016) encontraram correlação positiva e significativa entre altura da planta e teor de artemisinina para 63 genótipos coletados em diferentes locais na China.

Tabela 10 – Coeficientes de correlação entre caracteres fisiológicos, agronômicos e fitoquímicos com ART (teor de artemisinina, %.planta⁻¹) para plantas com caule roxo e verde e inserção de caule roxo e verde em *A. annua* L. UTFPR. Pato Branco - PR, 2018.

Caracteres	Caule		Inserção dos ramos	
	Roxo	Verde	Roxo	Verde
WUE				0.35*
Hd	-0.41*			
DHA			0.65**	
Ocar		-0.53**		

WUE: eficiência do uso da água; Hd: altura de dossel; DHA: ácido dihidroartemisinínico; Ocar: oxido de cariofileno. * e ** pelo teste "t": significância a 5% e 1%, respectivamente.

O caractere DHA apresentou correlação positiva com o teor de

artemisinina para inserção de ramo roxo.

A correlação positiva entre WUE e ART para inserção de ramo verde (Tabela 10) e WUE e REND para caule verde (Tabela 11) indicam que a eficiência do uso da água impacta positivamente na produção de metabólitos secundários, seja no fato de que o crescimento diminui em déficit hídrico moderado, enquanto a fotossíntese ainda continua acontecendo (Marchese *et al*, 2010) ou que a planta apresenta resistência a seca aliviando os efeitos deletérios do estresse hídrico (Chen, Sun *et al*, 2018).

O caractere Ccadin apresentou correlação positiva com REND para caule roxo, enquanto o caractere Ocar correlacionou-se negativamente com ART, para caule verde.

Tabela 11 – Coeficientes de correlação entre caracteres fisiológicos, agrônômicos e fitoquímicos com REND (rendimento de artemisinina, kg.ha⁻¹) para plantas com caule roxo e verde e inserção de ramo roxo e verde em *A. annua* L. UTFPR. Pato Branco - PR, 2018.

Caracteres	Caule		Inserção de ramo
	Roxo	Verde	Roxo
Ci		-0.34*	
WUE		0.33*	
Ds	0.69*		
DC		0.42**	
PSC			0.37*
PSF		0.56**	
Biomassa		0.56**	
OLS		0.48**	
ART	0.8**	0.66**	0.76**
Ccadin	0.63*		

CI: concentração interna de CO₂; WUE: eficiência do uso da água; Hi: altura de inserção do primeiro ramo plagiotrópico; Ds: diâmetro superior; DC: diâmetro do caule; PSC: peso seco de caule; PSF: peso seco de folhas; Biomassa: biomassa; OLS: rendimento de óleo; ART: teor de artemisinina; Ocar: Ccadin: cis-cadin-4-en-7-ol. * e ** pelo teste “t”: significância a 5% e 1%, respectivamente.

Analisando a correlação positiva entre diâmetro superior do caule e rendimento de artemisinina, Simon *et al* (1990) encontraram valores de 41,7 % de ART no terço superior das plantas, 25% e 22% nos terços médio e inferior, respectivamente. A correlação positiva entre volume de dossel e diâmetro superior pode indicar que o volume do dossel superior interfira positivamente no rendimento

de artemisinina na planta. O teor de artemisinina na extremidade do ramo principal, ramos laterais e pequenos ramos, foi superior aos demais estratos dos ramos, indicando que os teores aumentam nas extremidades dos ramos laterais e superiores (Gupta *et al*, 2002). Segundo Paul *et al* (2014), o tipo do dossel também é indicativo morfológico de ART, onde as plantas com dossel oval apresentam maiores teores de artemisinina do que plantas em arquitetura piramidal ou disforme.

A análise de correlação entre ART e REND apresentou valores superiores para caule e inserção de ramo roxos em comparação com os verdes.

Os caracteres DC, PSF, biomassa e rendimento de óleo essencial apresentaram correlação positiva com rendimento de artemisinina, tanto para caule verde, quanto para inserção de ramos verdes. De modo geral, as plantas com caule roxo e inserção de ramo roxo, apresentam correlação positiva com os caracteres agrônômicos e não possuem correlação ou apresentam correlação negativa, com caracteres fitoquímicos.

4.7 Seleção de genótipos superiores via Índices de Seleção

A análise “*which-won-where*” (Fig. 7) permite identificar genótipos com os maiores valores para cada combinação ART * Caractere, em cada um dos setores formados no biplot. Nesta análise, os genótipos superiores estão posicionados na extremidade direita de cada setor do biplot.

O genótipo G2, apresentou os valores mais elevados para as combinações de ART com REND, Hd, DC, PSF, BIO, PSC, Vc, NR, OLS e WUE, seguido pelos genótipos G4, G13, G10, G8 e G19, que também estão posicionados no mesmo setor. Já o genótipo G1, apresentou os valores mais elevados para as combinações de ART com Dm, Ds, At, Di, Ci, P_N , Óleo, E, DHA, Hi e Gs, seguido pelos genótipos G7, G6, G5, G21, G25, G28, G20, G18 e G22, que estão posicionados no mesmo setor. Os genótipos G50, G49 e G47 apresentaram os piores desempenhos, não apresentando associação com nenhuma combinação ART*Caractere, e indicando que eles não são desejáveis.

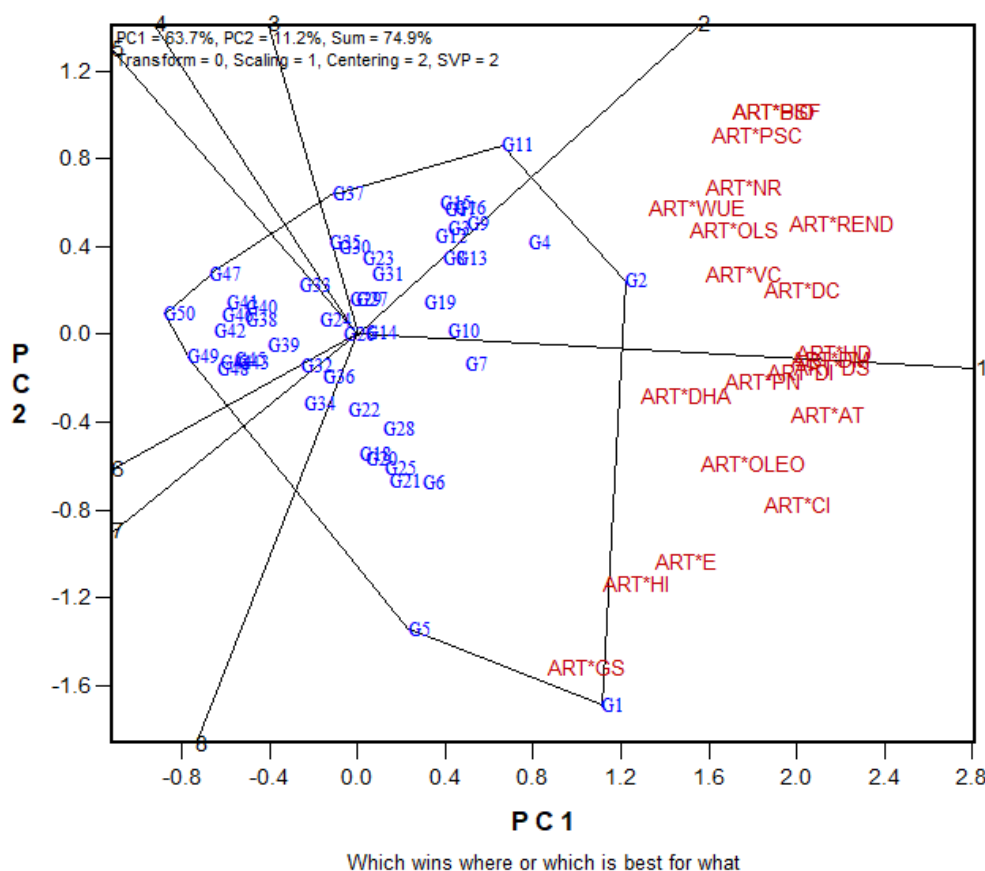


Figura 7 -- Gráfico biplot “Which-Won-Where”, mostrando os genótipos relacionados por ART*Caractere. O biplot foi baseado no “singular valor decomposition” da tabela GYT (“Scaling= 1, Centering= 2”). Foi usado o “singular value partition” (“SVP=2”) com foco no gen. Código dos Caracteres: *P_N*: taxa de assimilação de CO₂; *G_s*: condutância estomática; *C_i*: concentração interna de CO₂; *E*: transpiração; *WUE*: eficiência do uso da água; *At*: altura da planta; *Hi*: altura da inserção do primeiro ramo plagiotrópicos; *Hd*: altura do dossel; *Di*: diâmetro inferior do dossel; *Dm*: diâmetro médio do dossel; *Ds*: diâmetro superior do dossel; *Vc*: volume do dossel; *DC*: diâmetro do caule; *NR*: número de ramos; *PSC*: peso seco de caule; *PSF*: peso seco de folha; *BIO*: biomassa; *Óleo*: teor de óleo essencial; *OLS*: rendimento de óleo essencial; *REND*: rendimento de artemisinina; *ART*: teor de artemisinina; *DHA*: ácido dihidroartemisinínico. UTFPR. Pato Branco - PR, 2018.
 Fonte: Zanatta, UTFPR. Pato Branco - PR, 2018.

A análise de média e estabilidade (Fig. 8), classifica os genótipos pela média de todas as combinações ART*Caractere, e os maiores valores deste índice indicam os melhores genótipos. Nesta análise, quanto maior o deslocamento do genótipo em relação a linha de seta única, melhor o seu desempenho para os caracteres avaliados, e quanto menor o deslocamento do genótipo em relação a seta de duplo sentido, maior a sua estabilidade, ou seja, o genótipo apresenta perfis de caracteres estáveis (Yan e Frégeau-Reid, 2018). Os genótipos que apresentaram

superioridade na média das combinações ART*Caractere foram G2, G1, G4 e G11 (Fig. 8). Os piores desempenhos foram dos genótipos G50, G49 e G47, confirmando os resultados observados na Figura 7.

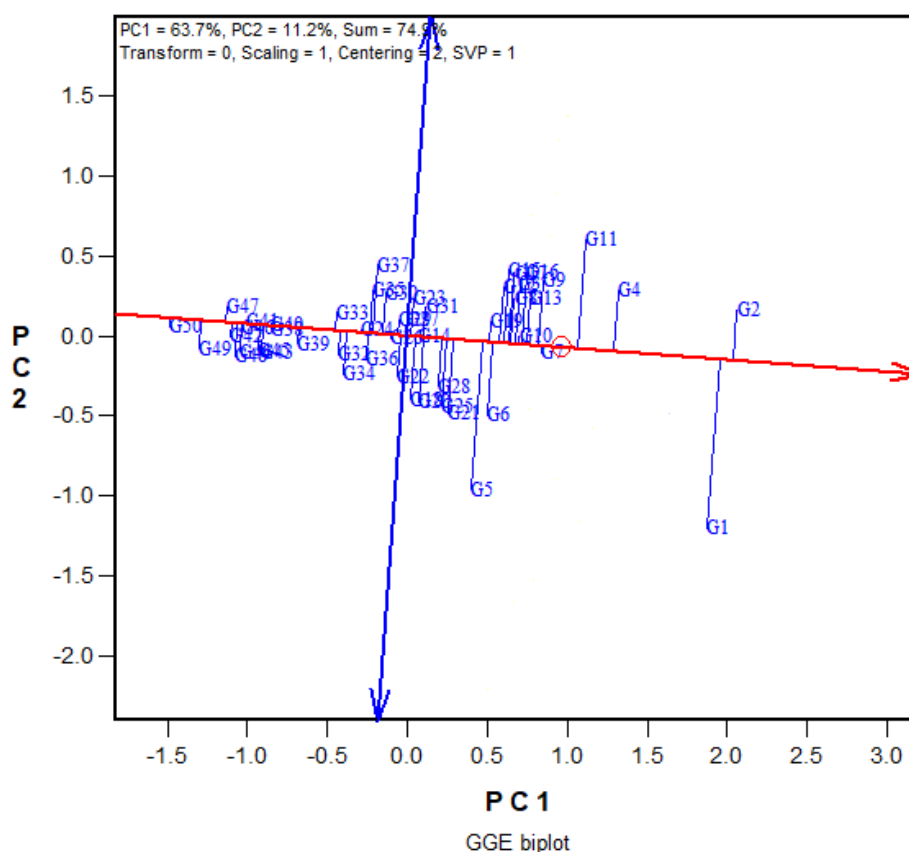


Figura 8 - Gráfico de média e estabilidade para 50 genótipos avaliados para parâmetros fisiológicos, agrônômicos e fitoquímicos de *A. annua*. As médias dos genótipos do biplot ART*Caractere classificam os mesmos com base em sua superioridade geral e estabilidade. O biplot foi baseado no “singular valor decomposition” da tabela GYT (“Scaling= 1, Centering= 2”). Foi usado o “singular value partition” (“SVP= 1”) com foco no genótipo. Código dos Caracteres: P_N: taxa de assimilação de CO₂; G_s: condutância estomática; C_i: concentração interna de CO₂; E: transpiração; WUE: eficiência do uso da água; A_t: altura da planta; H_i: altura da inserção do primeiro ramo plagiotrópico; H_d: altura do dossel; D_i: diâmetro inferior do dossel; D_m: diâmetro médio do dossel; D_s: diâmetro superior do dossel; V_c: volume do dossel; D_C: diâmetro do caule; N_R: número de ramos; P_SC: peso seco de caule; P_SF: peso seco de folha; B_IO: biomassa; Óleo: teor de óleo essencial; O_LS: rendimento de óleo essencial; R_EN_D: rendimento de artemisinina; A_RT: teor de artemisinina; D_HA: ácido dihidroartemisiníco. UTFPR. Pato Branco - PR, 2018.

Fonte: Zanatta, UTFPR. Pato Branco - PR, 2018.

O Índice de Superioridade classifica os genótipos considerando todas as

características, e altos valores deste índice indicam os melhores genótipos. Os 20 melhores genótipos classificados pelo índice de superioridade, calculado através da combinação entre (ART * Caracteres agrônômicos, fisiológicos e fitoquímicos) foram: G2, G1, G4, G11, G7, G9, G13, G16, G10, G3, G8, G17, G15, G12, G6, G19, G5, G21, G25 e G28 (Apêndice B).

4.8 Desempenho dos genótipos selecionados

As plantas selecionadas no primeiro ciclo de seleção fitoquímica utilizando rendimento de artemisinina analisada por TLC como parâmetro de seleção, são apresentadas na Figura 12. Foi observado, que um conjunto de 75% das 50 plantas selecionadas para análises fitoquímicas quantitativas, se encontram entre as plantas selecionadas pela análise. Esta análise permite realizar a seleção visual dos melhores genótipos para ART(TLC) e Biomassa, que encontram-se dispersos no quadrante superior direito do gráfico.

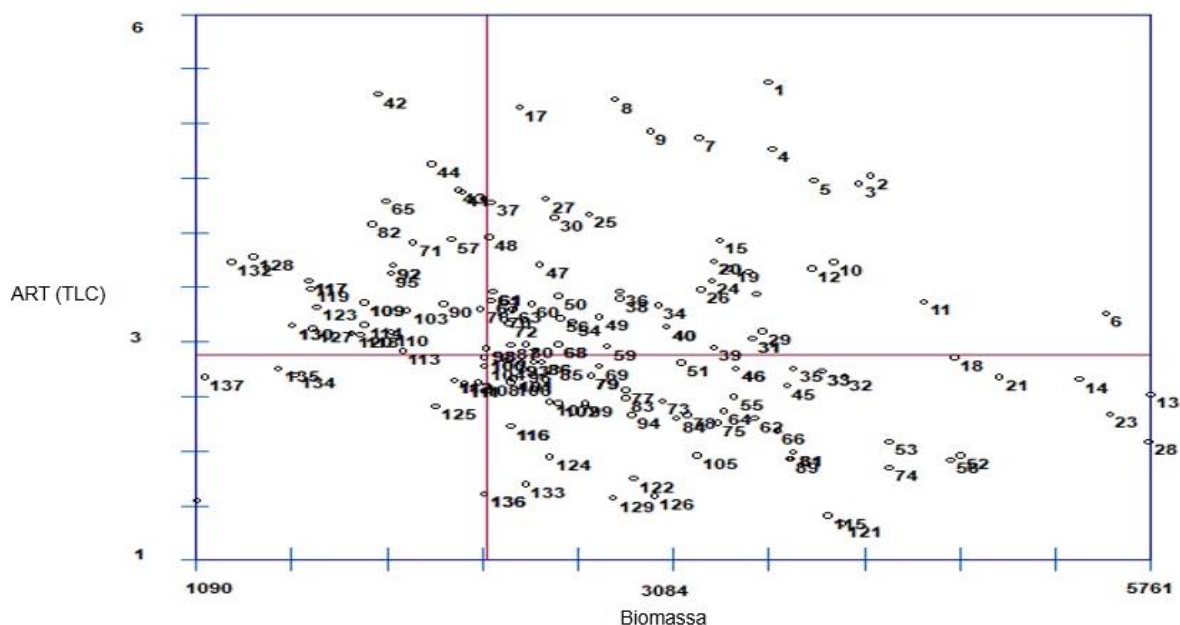


Figura 9 - Gráfico de dispersão dos genótipos selecionados entre TLC/ART e Biomassa. UTFPR. Pato Branco - PR, 2018.

Fonte: Zanatta, UTFPR. Pato Branco - PR, 2018.

O segundo ciclo de seleção foi realizado e classificado através das

análises de artemisinina por HPLC e foram selecionados os 20 genótipos superiores em teor de artemisinina que comparados com todos os genótipos analisados, resulta no desempenho descrito na tabela 12.

Tabela 12 -- Médias de caracteres entre genótipos analisados e selecionados em *A. annua* L. UTFPR. Pato Branco - PR, 2018.

Caracteres	Analisados	Selecionados
Ci	298,94	294,85
WUE	0,37	0,41
At	2,53	2,50
Hi	6,54	7,45
Hd	2,44	2,41
Ds	1,31	1,31
Vc	0,86	0,80
DC	5,42	5,60
PSC	1205,9	1219,3
PSF	0,37	0,36
Biomassa	3668,2	3581,0
OLS	26,37	28,52
DHA	0,05	0,06
REND	26,1	33,2**
ART	0,73	0,94**

Ci: concentração interna de CO₂; WUE: eficiência do uso da água; At: altura da planta; Hi: altura de inserção do primeiro ramo; Hd: altura do dossel; Ds: diâmetro superior; Vc: volume do dossel; DC: diâmetro do caule; PSC: peso seco de caule; PSF: peso seco de folha; Biomassa: biomassa de planta; OLS: rendimento de óleo; DHA: ácido dihidroartemisínico; REND: rendimento de artemisinina e ART: teor de artemisinina. **: significância a 1% pelo teste de tukey.

A média dos caracteres que expressaram correlação com ART e REND não apresentaram diferenças significativas entre os genótipos analisados e selecionados (Tabela 12). Porém, entre os genótipos selecionados, a média de teor de artemisinina foi de 0,94%, o que representa um aumento de 29% em relação à média dos materiais analisados.

Em Campinas-SP, experimentos realizados por Magalhães *et al* (1999), apresentaram resultados médios entre 0,55% e 0,91% para teor de artemisinina em materiais híbridos oriundos da MEDIPLANT (Suíça). Magalhães *et al* (2004) encontraram valores de 0,82% de ART para linhagens híbridas do CPQBA. Dados

comparativos obtidos por Marchese (2006) com variedades CPQBA apresentam valores de 1,05% de ART em Campinas, comparados com 0,99%, em Pato Branco, porém com produção de peso seco de folha de 32% a mais, no último local. Esta diferença se deve ao fato da *A. annua L.* ser uma planta C3 e com isso, perde mais carbono em climas com elevada temperatura, como Campinas-SP.

A cultivar “Artemis” (MEDIPLANT), durante o período de 1998 a 2002, apresentou valores médios de ART de 1,31%, e os subseqüentes híbridos chegaram a apresentar 1,95% em 2005 (Simonnet *et al*, 2008). Wetzstein *et al* (2018) em estudos de seleção encontraram teor de ART variando de 1,6 a 2,16%. Ferreira *et al* (2018) relataram que o cruzamento de plantas de diferentes origens, altas em ART e DHAA e baixas em ácido artemisínico, têm o potencial de gerar genótipos com maior concentração de ART comparadas a genótipos parentais.

O teor médio de artemisinina dos genótipos selecionados para este trabalho foi de 0,73 %, com variação entre 0,33% e 1,28% no teor de artemisinina. Esta variação é similar a encontrada por Ferreira *et al* (2018) em estudo com genótipos de diversas origens onde os genótipos brasileiros apresentaram uma base genética mais ampla para o teor de artemisinina (0,33 - 1,50%), comparados aos genótipos suíços (0,56 - 1,2).

Entre os genótipos selecionados, a média de rendimento de artemisinina de 33,2 toneladas.ha⁻¹, representou um aumento de 27% em relação à média dos materiais analisados. O rendimento de artemisinina em híbridos suíços e brasileiros testados por Magalhães *et al* (1999), apresentou valores entre 15,8 e 21.4 kg.ha⁻¹. Para Wetzstein *et al* (2018), o genótipo com maior conteúdo de artemisinina apresentou um rendimento primário bruto de 69,6 kg.ha⁻¹. Esta evolução de rendimento está relacionada com o aumento da biomassa, teor de artemisinina e demais caracteres que contribuam com o aumento dos mesmos.

A análise de médias dos genótipos analisados e selecionados não apresentou diferença significativa para os componentes do óleo essencial analisados. Isso demonstra que os parâmetros ART e REND aplicados a seleção de *A. annua L.* não interferem ou causam variação na qualidade do óleo essencial.

O teor de óleo essencial apresentou valor médio de 0,72%, e plantas potenciais com 1,25%. Em diferentes épocas de plantio, Haider *et al* (2004)

alcançaram valores de rendimento de óleo essencial entre 0,5% e 1,6% em base de peso fresco, e grande variação na concentração dos compostos.

O perfil fitoquímico dos óleos essenciais dos 20 genótipos selecionados é apresentado nas tabelas 13 e 14. A % relativa desses compostos varia de acordo com a evolução do florescimento das plantas, com tendência de diminuição dos sesquiterpenos do pré-florescimento ao pós-florescimento, e tendência de aumento dos monoterpenos do pré-florescimento ao florescimento pleno (Yu *et al*, 2011).

Tabela 13 -- Perfil fitoquímico de monoterpenos de 20 genótipos selecionados de *A. annua* L. UTFPR. Pato Branco - PR, 2018.

Monoterpenos	IRC	IRT	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	D P	Média
α-pineno	932	939	1	0,3	0,7	0,3	0,5	0,5	1,2	0,3	0,8	0,7	0,4	0,8	0,4	1,4	0	0,8	0,2	1,4	0,5	0,41	0,61
canfeno	946	954	1,3	0,4	1,2	0,5	1,1	0,8	1,4	0,6	1,6	1,2	1	1,1	0,5	1,9	0	1,3	0,5	1,8	1,1	0,54	0,97
sabineno	971	969	1,3	0,3	0	0	0,4	0,9	0,9	0	0,4	0,7	0	0,4	0,3	1,5	0	0,6	0,3	0,4	0,3	0,43	0,47
β-mirceno	989	990	1,7	1	0	0,8	2,1	2,6	0,5	0,7	0	1,6	0,3	1,1	1	5,9	1,1	2,7	0,9	0,6	0,9	1,34	1,28
p-cimeno	1023	1024	1,4	0,2	0	0,5	0,5	0	1,1	0	0	1	0	0	0,4	2	0	0	0	0,7	0	0,58	0,39
1,8-cineol	1029	1031	10,9	4,55	5,3	1,68	7,7	8,4	6,6	3,6	4,8	6,2	3,9	6,3	6,1	13,3	3,1	6,6	5,3	8,4	4,5	2,70	6,10
γ-terpineno	1056	1059	1,2	0,3	0	0,4	0,7	0,3	0,9	0,3	0	0,7	0	0,5	0,5	1,9	0	0	0	0,5	0	0,50	0,41
hidrato de cis-sabineno	1064	1068	0,3	0	0	0	0	0	0,3	0	0	0,3	0	0	0	0,7	0	0	0	0	0	0,18	0,08
linalol	1099	1098	0,6	0	0	0	0,5	0,4	0,4	0,4	0	0,4	0	0,4	0,6	0,4	0	0,5	0,4	0	0	0,24	0,25
cânfora	1143	1146	16,9	9,6	34,3	12,5	19,3	16	25	16,4	26,5	22,5	16	26,4	13,7	38,7	8,2	24	18,9	31,4	17,9	9,23	19,71
borneol	1163	1165	0	0	2,5	0	0	0	0	0	2,2	0	10,4	0	0	0	0	0,9	0	0	0	2,38	0,80
terpin-4-ol	1175	1177	1	0,6	1,2	0,9	1,1	0,9	1,1	0,6	0,9	0,9	0,6	1	1,1	1,3	0	0,9	0,9	0	0,7	0,39	0,79
α-terpineol	1189	1189	1,2	0,4	0,7	0	0,4	1,2	0	0,5	0,5	0,9	0	0,8	0,8	0	0	0,9	0,7	0,8	0,6	0,39	0,54
Total identificados		%	38,8	17,7	45,9	17,6	34,3	32	39,4	23,4	37,7	37,1	32,6	38,8	25,4	69	12	39,2	28,1	46	26,5	13,90	32,38
Massa Seca de Folha		Kg	0,22	0,38	0,28	0,37	0,25	0,36	0,37	0,42	0,33	0,55	0,39	0,44	0,28	0,41	0,43	0,54	0,28	0,24	0,30	0,09	0,36
Teor de óleo		%	1,25	0,67	0,45	0,56	0,54	1,10	0,86	0,55	0,80	0,86	0,75	0,96	0,67	0,97	0,87	0,83	0,47	0,40	0,68	0,23	0,74
Óleo essencial		%.planta ⁻¹	0,28	0,26	0,13	0,21	0,14	0,4	0,32	0,23	0,26	0,48	0,29	0,42	0,18	0,4	0,4	0,45	0,13	0,1	0,2	0,12	0,27

Tabela 14 -- Perfil fitoquímico de sesquiterpenos de 20 genótipos selecionados de *A. annua* L. UTFPR. Pato Branco - PR, 2018.

Sesquiterpenos	IRC	IRT	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	D P	Média
α-copaeno	1373	1376	0,5	0,9	0,5	0,8	1	0,7	0,8	0,7	0,8	0,7	1	0,5	1	0	1,1	0,5	0,8	0,8	1,2	0,27	0,75
<i>trans</i>-cariofileno	1416	1419	5,4	9,21	5,1	9,9	11,2	6,6	6,9	9,1	8	8,3	10,2	7,1	10,2	4,8	13	8,2	9,6	6,1	13,2	2,39	8,60
α-humuleno	1449	1454	0,4	0,7	0	0,7	0,8	0,5	0,5	0,7	0,5	0,6	0,7	0,5	0,7	0	0	0,6	0,7	0	0,9	0,29	0,52
<i>trans</i>-β-farneseno	1456	1456	6,4	8,3	5,4	7,6	7,6	6,2	8,8	9,7	4,3	5,7	7	5	7,5	3,6	12	7,1	9,5	5,8	7,3	2,12	7,26
β-chamigreno	1472	1477	2,5	2,6	1,7	2,3	2,9	3	2,9	2,7	2,3	2,1	2	2,4	2,2	1,1	3,4	2,2	2,1	2,7	2,2	0,53	2,43
germacreno D	1479	1479	13,2	17	8,2	18,4	16,3	14,5	14	11,8	11,7	16,1	15,1	11,9	12,3	7,8	27	12,4	13,4	8,2	20,3	5,04	14,73
β-selineno	1483	1485	1,1	0,8	0,8	1	1,1	1,1	1	1	1,3	0,8	0,8	1	1,3	0	1,5	1	0,8	1,4	0,9	0,33	1,01
biciclogermacreno	1493	1496	1,7	1,7	0,8	2,3	1,1	2	1,4	1,9	1,4	2,3	1,7	1,5	0,8	0	2,3	2,1	1	1,1	2,1	0,68	1,61
espatulenol	1574	1576	3,2	3,7	2,3	3,2	1	3,7	2,4	3,4	3,2	2,6	2	2,3	1,75	0,9	4	3,5	1,9	2,2	2,4	0,89	2,66
óxido de cariofileno	1579	1581	2,9	6,1	6	4,4	4	3,7	3,4	7,6	5,2	3,3	6,1	4,4	7	3,3	5,1	5	5,7	5,7	4,4	1,29	4,92
cis-cadin-4-en-7-ol	1630	1636	1,5	2	1	1,7	1,7	3,4	1,5	1,7	1,4	1,2	1,3	1,4	1,7	0,8	1,8	1,6	1,3	1,5	0,9	0,61	1,62
epi alfa-bisabolol	1680	1686	2,9	4,5	3,3	3	1,6	2,1	1,6	3,7	2,6	2,5	2,2	2,6	4,1	1,8	2,7	1,8	3	1,2	2,2	0,85	2,60
Total identificados		%	41,7	57,5	35,1	55,3	50,3	47,5	45,2	54	42,7	46,2	50,1	40,6	50,6	24,1	74	46	49,8	36,7	58	11,16	48,67
Massa Seca de Folha		Kg	0,22	0,38	0,28	0,37	0,25	0,36	0,37	0,42	0,33	0,55	0,39	0,44	0,28	0,41	0,43	0,54	0,28	0,24	0,30	0,09	0,36
Teor de óleo		%	1,25	0,67	0,45	0,56	0,54	1,10	0,86	0,55	0,80	0,86	0,75	0,96	0,67	0,97	0,87	0,83	0,47	0,40	0,68	0,23	0,74
Óleo essencial		% .planta ⁻¹	0,28	0,26	0,13	0,21	0,14	0,4	0,32	0,23	0,26	0,48	0,29	0,42	0,18	0,4	0,4	0,45	0,13	0,1	0,2	0,12	0,27

5 CONCLUSÕES

O sistema de homogeneização de amostras em cromatografia de camada delgada utilizando o equipamento Ultrassom apresentou menor correlação com HPLC do que o sistema Ultraturax.

A correlação fraca entre as técnicas de TLC e HPLC indica que a técnica de TLC foi limitada na quantificação do teor de artemisinina entre os genótipos analisados.

Os caracteres agronômicos, peso seco de folhas e biomassa, apresentaram correlação negativa com teor de artemisinina.

Os caracteres fitoquímicos Cis-cadin-4-en-7-ol e ácido dihidroartemisiníco apresentaram correlação positiva com teor de artemisinina.

Os caracteres rendimento de óleo essencial, peso seco de folha, peso seco de caule, biomassa, diâmetro do caule e Cis-cadin-4-en-7-ol apresentaram correlação positiva com rendimento de artemisinina.

Cânfora, germacreno D, trans-cariofileno, trans- β -farneseno e 1,8-cineol foram os cinco componentes principais do óleo essencial da variedade CPQBA 3.

Os 20 genótipos selecionados (G1-G20) pelo teor de artemisinina apresentaram teor e rendimento de artemisinina, 29% e 27% superiores, aos demais genótipos analisados, respectivamente.

Os 20 genótipos classificados pelo índice de superioridade calculado através da combinação entre (ART * Caracteres agronômicos, fisiológicos e fitoquímicos) foram G2, G4, G10, G13, G8, G19, G14, e G1, G7, G6, G5, G21, G25, G28, G20, G18, G22.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A variedade CPQBA 3 apresenta uma significativa variação no teor de artemisinina, variando de 0,33% a 1,28%. Esta condição permite explorar geneticamente o potencial produtivo nas condições locais e elevar o teor de artemisinina quantitativamente.

A correlação positiva entre ácido dihidroartemisínico e artemisinina possibilita selecionar plantas superiores em teor de artemisinina através de análises quantitativas ou semi-quantitativas de DHAA, nos primeiros ciclos de seleção, postulado por Ferreira *et al* (2018).

Apesar da significativa variação no teor de artemisinina, as análises dos caracteres agrônômicos, fisiológicos e fitoquímicos não expressaram elevada variabilidade dentro da variedade, indicando que esses caracteres são limitados para prever o teor de artemisinina em plantas.

A análise fitoquímica entre os caracteres morfológicos foi significativa para alguns compostos, incluindo 1,8-cineol. Plantas de caule roxo de *A. annua L.* apresentaram 62% a mais 1,8-cineol que plantas de caule verde. De acordo com o interesse comercial, plantas com elevado teor de 1,8-cineol podem ser facilmente identificadas para processos de seleção e melhoramento de óleos.

A metodologia de índices de seleção através do GGE biplot oferece informações importantes de relações entre os caracteres e diferenciações de locais para seleção e melhoramento da *A. annua L.*

REFERÊNCIAS

- ABDIN, M,Z, ISRAR, M., REHMAN, R.U. JAIN, S.K. Artemisinin, a novel antimalarial drug: Biochemical and molecular approaches for enhanced production. *Planta Med.*, v. 69, p. 289-299. 2003.
- ADAMS, R.P.; "Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy", Allured Publishing, 807 pag. 2007.
- AFTAB, T. KHAN, M.M.A. IDREES, M. NAEEM, M. SINGH, M. RAM, M. Stimulation of crop productivity, photosynthesis and artemisinin production in *Artemisia annua L.* by triacontanol and gibberellic acid application. *J Plant Interact* 5:273–281. 2010.
- ALEJOS-GONZALEZ, F. QU, G. LI-LI, Z. SARAVITZ, C. L SHURTLEFF, J. XIE, De-Yu. Characterization of development and artemisinin biosynthesis in self-pollinated *Artemisia annua* plants. *Planta*. 2011. Acessado em 27/07/2018 https://www.researchgate.net/publication/51167091_Characterization_of_development_and_artemisinin_biosynthesis_in_self-pollinated_Artemisia_annua_plants.
- ALI, ATHAR KHAN, MATHER. ABDIN, M. Biosynthesis and Production of Artemisinin: A Novel Class of Molecule. *Natural Products*, Edition: First, pp.3099-3121. 2013.
- ATEMNKENG, A.M. CHIMANUKA, B. DEJAEGHER, B. HEYDEN, Y.V. PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Evaluation of *Artemisia annua* infusion efficacy for the treatment of malaria in *Plasmodium chabaudi chabaudi* infected mice. *Exp Parasitol* 122: 344-348. 2009.
- 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. *J. Essent. Oil Res.* 15, 248–250. 2003.
- BAZZAZ, F. A. CHIARIELLO, N. R. COLEY. P. D. PITELKA. L. F. Allocating resources to reproduction and defense. *BioScience*. Vol. 37 N. 1: 58-67. 1987.
- BHERING, S. B. *et al*, Mapa de solos do Estado do Paraná: legenda atualizada. Rio de Janeiro: EMBRAPA/IAPAR. 2008.
- BILIA, A.R. SANTOMAURO, F. SACCO, C. BERGONZI, M.C. DONATO, R. Essential oil of *Artemisia annua L.*: an extraordinary component with numerous antimicrobial properties. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* pp. 1-7, 2014.
- BECHE, E. BENIN, G. LEMES, C. MUNARO, L. MARCHESE, J. A. Genetic gain in yield and changes associated with physiological traits in Brazilian wheat during the

20th century. *European Journal of Agronomy*. 61. 49–59. 10.1016/j.eja.2014.08.005. 2014.

BOLINA, C. O. Variabilidade genética e associação entre caracteres agrônômicos, fisiológicos e fitoquímicos em variedades de *Artemisia annua* L. Dissertação. UTFPR, 2011.

BOLINA, C.O. MARCHESI J.A. CAPELIN D. BERTONCELLI D.J. PINNOW C. BENIN G. FOGLIO, M.A. Correlation among agronomic, physiological and phytochemical traits in *Artemisia annua* L. varieties. *Rev. bras. plantas med.* vol.15 no.1 Botucatu. 2013.

BOLINA, C.O. MARCHESI, J.A. PALADINI, M.V. PINNOW, C. BENIN, G. SOUSA, I.M.O. FOGLIO, M.A. Genetic dissimilarity in varieties of *Artemisia annua* L. based on agronomic, physiological and phytochemical characters. *Rev. bras. plantas med.* vol. 16 no. 2 supl.1 Botucatu. 2014. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/12_039

BRISIBE, E.A. UDENSI, O. CHUKWURAH, P.N. MAGALHAES, P.M. DE FIGUEIRA, G.M. FERREIRA, J.F.S. Adaptation and agronomic performance of *Artemisia annua* L. under lowland humid tropical conditions *Ind. Crop Prod.*, 39 pp. 190-197. 2012.

BROWN, G. D. The biosynthesis of artemisinin (Qinghaosu) and the phytochemistry of *Artemisia annua* L. (Qinghao). *Molecules* 15, 7603–7698. 2010.

BRYANT, L. FLATLEY, B. PATOLE, C. BROWN, G. D. CRAMER, R. Proteomic analysis of *Artemisia annua* – towards elucidating the biosynthetic pathways of the antimalarial pro-drug artemisinin. *BMC Plant Biol.* 15:175. 2015.

CHARLES, Denys J. JAMES, E. Simon. Germplasm variation in artemisinin content of *Artemisia annua* using an alternative method of artemisinin analysis from crude plant extracts. *Journal of Natural Products*. Vol. 53, No. 1, pp. 157-160, 1990.

CHARLES, D.J., SIMON, J.E. SHOCK, C.C. FEIBERT, E.B.G. SMITH, R.M. Effect of water stress and post-harvest handling on artemisinin content in the leaves of *Artemisia annua* L. p. 628-631. In: J. Janick and J.E. Simon (eds.), *New crops*. Wiley, New York. 1993.

CHEN, H. L. WANG, K. T. PU, Q. S. CHEN, X. G. & HU, Z. D. On-line conversion and determination of artemisinin using a flow-injection capillary electrophoresis system. *Electrophoresis*, 23, 2865–2871. 2002.

CHEN, Y., *ET AL.* "Grafting Onto *Artemisia annua* Improves Drought Tolerance in *Chrysanthemum* by Enhancing Photosynthetic Capacity." *Horticultural Plant Journal*

4(3): 117-125. 2018.

CHOWDHURY, T.; MANDAL, A.; ROY, S.C.; DE SARKER, D. Diversity of the genus *Ocimum* (Lamiaceae) through morpho-molecular (rapd) and chemical (GC-MS) analysis. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15, 275-286. 2017.

CIFTCI, N. CAHYADI, J. GUIGARD, S.E. SALDANA, M.D.A. Optimization of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L. with supercritical carbon dioxide+ethanol using response surface methodology. *Electrophoresis*, 39, 1926-1933. 2018.

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

CUNHA, C.B, CUNHA, C.A. Brief history of the clinical diagnosis of malaria: from Hippocrates to Osler, *J. Vector Borne Diseases*, 45 (3).194-199, esp. 195. 2008.

DADDY, N.B. KALISYA, L.M. BAGIRE, P.G. WATT, R.L. TOWLER, M.J. WEATHERS, P.J. *Artemisia annua* dried leaf tablets treated malaria resistant to ACT and i.v. artesunate: Case reports. *Phytomedicine*, 32, 37-40. 2017.

DALRYMPLE, D. G., *Artemisia annua*, Artemisinin, ACTs & Malaria Control in Africa: Tradition, Science and Public Policy (Washington DC: Politics and Prose Bookstore, pp. 253. 2012. ISBN: 978-0-615-61599-8

DAMTEW Z, TESHAYE B, BISRAT D. Leaf, essential oil and artemisinin yield of *Artemisia annua* L. as influenced by harvesting age and plant population density. *World J Agri Sci* 7(4):404-412. 2011.

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. Enhancement of artemisinin concentration and yield in response to optimization of nitrogen and potassium supply to *Artemisia annua*. *Annals of Botany* 104: 315-323. 2009.

DELABAYS, N., BENAKIS, A. & COLLET, S. Selection and breeding for high artemisinin (qinghaosu) yielding strains of *Anemrsio annua* L. *Acta Horticulturae*, 300,203-207. 1993.

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

DELABAYS, N. Biologie de la reproduction chez L' *Artemisia annua* L. et genétique de la production en artemisinine. 1997. 169 f. Tese (Doutorado) -

Universite de Lausanne, França, 1997.

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

DELABAYS, N. DARBELLAY, C. GALLAND, N. Variation and heritability of artemisinin content in *Artemisia annua* L. In: Wright, CW(ed.) *Artemisia*. London: Taylor & Francis, 197–209. 2002.

DESCHAMPS, C., ZANATTA, J.L., BIZZO, H.R., OLIVEIRA, M.C. and ROSWALKA, L.C. Seasonal evaluation of essential oil yield of mint species. *Ciênc. Agrotec.* 32, 725–730. 2008.

DHINGRA, V., RAO, K.V. & NARASU, M.L. Current status of artemisinin and its derivatives as antimalarial drugs. *Life Sci.* 66, 279–300. 2000.

DUKE, M.V. PAUL, R.N. ELSOHLY, H.N. STURTZ, G. DUKE, S.O. Localization of artemisinin and artemisitene in foliar tissues of glanded and glandless biotypes of *Artemisia annua*. *Int J Plant Sci* 155:365–373. 1994.

FAVARIN, J.L. DOURADO-NETO, D. GARCIA Y GARCIA, A. VILLA NOVA, N.A. FAVARIN, M.G.G.V. Equações para a estimativa do índice de área foliar do cafeeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 37, n. 6, p. 769-773, 2002.

FERREIRA, J.F.S., CHARLES, D.J., WOOD, K., SIMSON J.E. AND JANICK, J. A comparison of gas chromatography and high performance liquid chromatography for artemisinin analysis. *Phytochemical Analysis*, 5, 116–120. 1994.

FERREIRA, J.F.S. JANICK, J. Floral Morphology of *Artemisia annua* with Special Reference to Trichomes. *International Journal of Plant Sciences*. Vol. 156, No. 6, pp. 807-815. 1995.

FERREIRA, J. F. S. JANICK, J. Production and detection of artemisinin from *Artemisia annua*. *Acta Hort.* 390:41–49. 1995b.

FERREIRA, J. F. S. JANICK, J. Distribution of artemisinin in *Artemisia annua*. In: JANICK, J. (Ed.). *Progress in new crops*. Arlington: ASHS Press. P.579-584. 1996.

FERREIRA, J. F. S. *Artemisia annua* L.: The hope against malaria and cancer. Medicinal and aromatic plant: Production, business e applications. Proceedings of the Jan 15-17/2004 meeting. Mountain State University, Beckley. 2004.

FERREIRA, J.F.S. LAUGHLIN, J.C. DELABAYS, N. DE MAGALHÃES. P.M. Cultivation and genetics of *Artemisia annua* L. for increased production of the antimalarial artemisinin. *Plant Genet Resour* 3:206–229. 2005.

FERREIRA, J.F.S. Nutrient deficiency in the production of artemisinin, dihydroartemisinic acid, and artemisinic acid in *Artemisia annua* L. *J. Agric. Food Chem.* 55, 1686-1694. 2007.

FERREIRA JFS, LUTHRIA DL. Drying affects artemisinin, dihydroartemisinic acid, artemisinic acid, and the antioxidant capacity of *Artemisia annua* L. leaves. *J Agric Food Chem* 58(3):1691–1698, 2010.

FERREIRA, J.F.S. BENEDITO, V.A. SANDHU, D. MARCHESE, J.A. LIU, S. Seasonal and Differential Sesquiterpene Accumulation in *Artemisia annua* Suggest Selection Based on Both Artemisinin and Dihydroartemisinic Acid may Increase Artemisinin in planta. *Front. Plant Sci.* 9:1096. 2018. doi: 10.3389/fpls.2018.01096

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

FU, JIN-E. FENG, LI. WEI, SHU-GEN. MAA, XIAO-JUN. HUANG, RONG-SHAO. FENG, SHI-XIN. DONG, QING-SONG. YAN, ZHI-GANG. Distinctive morphological characteristics contribute to the identification of *Artemisia annua* L. germplasms with high yield and high artemisinin content. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*; 2016. www.elsevier.com/locate/jarmap

GAUTAM, R.K. NAYAK, A.K. SHARMA, D.K. QADAR, A. DEY, P. SINGH, G. Morphological and chemical fingerprinting of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) genotypes grown in sodic soil. *Agrochimica*, Vol. LIV - N. 5. 2010. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. pp. 1-7. 2014.

GOBBO-NETO, L. LOPES, N. P. plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova*, Vol 30, 374. 2007.

GOEL, R. SINGH, V. RAJKUMARI, GUPTA, A. K. MALLAVARAPU, G. R. KUMAR, S. Constituents of the Essential Oil of *Artemisia annua* Variety Sanjeevani Compared with Those of its Parental Varieties Arogya and Jeevanraksha: Selection for High Artemisinin Content Co-selected High Sesquiterpene Content in Essential Oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. Volume 21, 2018.

GHAFOORI, H. SARIRI, R. NAGHAVI, M. R. ARYAKIA, E. DOLATYARI, A. SHAHZADEH FAZELI, S. A. RAMAZANI, H. FARAHMAND. Z. "Analysis of artemisinin isolated from *Artemisia annua* L. by TLC and HPLC", J. of Liquid Chrom. & Related Tech., Vol. 36, pp. 1198–1206, 2013.

GLOBAL TECHNICAL STRATEGY FOR MALARIA 2016–2030. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. World Health Organization. ISBN 978 92 4 156499 1 (NLM classification: WC 765), 2015.

GOUVEIA, S.C.; CASTILHO, P.C. *Artemisia annua* L.: Essential oil and acetone extract composition and antioxidant capacity. Ind. Crops Prod. 45, 170–181. 2013.

GRAHAM IA, BESSER K, BLUMER S, BRANIGAN CA, CZECHOWSKI T, ET AL. The genetic map of *Artemisia annua* L. identifies loci affecting yield of the antimalarial drug artemisinin. Science 327, 328–331. 2010.

GUIA PRÁTICO DE TRATAMENTO DA MALÁRIA NO BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010.

GUPTA SK, SINGH P, BAJPAI P, RAM G, DIGVIJAI S, GUPTA MM, JAIN DC, KHANUJA SPS, KUMAR S. Morphogenetic variation for artemisin and volatile oil in *Artemisia annua*. Ind Crop Prod 16: 2217-2224. 2002.

GUPTA, M.M. SRIVASTAVA, A. TRIPATHI, A.K. MISRA, H. VERMA, R.K. Use of HPTLC, HPLC and densitometry for qualitative separation of indole alkaloids from *Rauwolfia serpentina* roots. J. Planar Chromatogr. 19, 282-287. 2006.

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. Flav. Fragr. J. 19: 51-53. 2004.

LAPKIN, A. A. WALKER, A. SULLIVAN, N. KHAMBAY, B. MLAMBO, B. CHEMAT, S. Development of HPLC analytical protocols for quantification of artemisinin in biomass and extracts. J Pharm Biomed Anal. 2009. 49: 908-915. 10.1016/j.jpba. 2009.

LARSON T. R., BRANIGAN C., HARVEY D., PENFIELD T., BOWLES D., GRAHAM I. A. A survey of artemisinic and dihydroartemisinic acid contents in glasshouse and global field-grown populations of the artemisinin-producing plant *Artemisia annua* L. Ind. Crops Prod. 45, 1–6. 2013.

LIU, N.Q. CHOI, Y.H. VERPOORTE, R. VAN DER K.F. Comparative quantitative analysis of artemisinin by chromatography and qNMR. Phytochem Anal 21: 451–456. 2010.

LIU, B. W. HONG DU, Z. L., GUOFENG YE, H. Plant Cell Rep 30:689–694 eng Research Support, Non-U.S. Gov't Review Germany. 2011.

LOMMEN, W.J.M.; BOUWMEESTER, H.J.; VERSTAPPEN, F.W.A. Trichome dynamics and artemisinin accumulation during development and senescence of *Artemisia annua* leaves. *Planta Med.* 72, 336-345. 2006.

KIANI, B. H. ULLAH, N. HAQ, I. MIRZA, B. Transgenic *Artemisia dubia* WALL showed altered phytochemistry and pharmacology. *Arabian Journal of Chemistry.* 2015.

KOGBKOKKRAUD, 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* 18:229–234. 2007.

MA, C. WANG, H.H. LU, X. WANG, H. XU, G. LIU, B. Terpenoid metabolic profiling analysis of transgenic *Artemisia annua* L. by comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Metabolomics*, 5, 497–506. 2009.

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

MAGALHÃES, P.M. DELABAYS, N. SARTORATTO, A. New 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.* v. 49. 1997.

MAGALHÃES, P. M. DELABAYS, N. SARTORATTO A. New hybrid lines of antimalarial species *Artemisia annua* L. In: *Proceedings of the Second World Congress on Medicinal and Aromatic Plants* (Gibreti G eds). *Acta Horticult.* 502: 377-381. 1999.

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

MARCHAND, E. ATEMNKENG, M.A. VANERMEN, S. PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Development and validation of a simple thin layer chromatographic method for the analysis of artemisinin in *Artemisia annua* L. plant extracts. *Biomed Chromatography.* 22:454–459. 2008.

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

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

MARCHESE, J.A. FIGUEIRA, G.M. O uso de tecnologia pré e pós-colheita e boas práticas agrícolas na produção de plantas medicinais e aromáticas. Revista Brasileira de Plantas Medicinais 7:86-96. 2005.

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

MARCHESE, J. A. FERREIRA, J. F. REHDER, V. RODRIGUES, O. Water deficit on the accumulation of biomass and artemisinin in annual wormwood (*Artemisia annua* L., Asteraceae). Congr. Braz. Soc. Plant Pathol. 22: 1–9; 2010.

MISRA, H. MEHTA, D. MEHTA, B. K. JAIN, D. C. "Extraction of artemisinin, an active antimalarial phytopharmaceutical from dried leaves of *Artemisia annua* L., using microwaves and a validated HPTLC-visible method for its quantitative determination," Chromatography Research International, vol. 2014, Article ID 361405, 11 pages, 2014.

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

MULLER, W. H. MULLER, C. H. Volatile growth inhibitors produced by *Salvia* species. Bull. Torrey Bot. Club 91:327-330. 1964.

NIGUSSIE, A. LULE, B. GEBRE, A. Effect of plant population density on growth and yield of *Artemisia* (*Artemisia annua* L.). International journal of Advanced Biological and Biomedical Research 3(4) 384-390. 2015.

OZGÜVEN, M. SENER, B. ORHAN, I. SEKEROĞLU, N. KIRPIK, M. KARTAL, M. PESIN, I. KAYA, Z. Effects of varying nitrogen doses on yield, yield components and artemisinin content of *Artemisia annua* L. Industrial Crops and Products. 27: 60-64. 2008.

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

PAIVA, A. S. FERNANDES, E. J. RODRIGUES, T. J. D. TURCO, J. E. P. Condutância estomática em folhas de feijoeiro submetido a diferentes regimes de irrigação. Eng. Agríc. vol.25, n.1, pp.161-169. 2005.

PAUL, S. NAQVI, A.A. GUPTA, M.M. KHANUJA, S.P.S. Relationship between morphological traits and secondary metabolites in *Artemisia annua* L. by using correlation and path analysis. *Electronic Journal of Plant Breeding* 2(3): 466–472. 2011.

PAUL, S. KHANUJA, S.P.S GUPTA, M.M. Breeding strategy for genetic improvement up to four generations in relation to artemisinin with canopy and other secondary metabolites in *Artemisia annua* L. *Ind. Crop Prod.*, 56 pp. 67-73. 2014.

PENG, C. Y. A., FERREIRA, J. F. S., & WOOD, A. J. Direct analysis of artemisinin from *Artemisia annua* L. using high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector, and gas chromatography with flame ionization detector. *Journal of Chromatography. A*, 1133, 254–258. 2006.

PEPLOW, M. Synthetic malaria drug meets market resistance: first commercial deployment of synthetic biology for medicine has modest impact. *Nature* 530, 389–390. 2016.

QUENNOZ, M. BASTIAN, C. SIMONNET, X. GROGG, A. F. Quantification of the total amount of artemisinin in leaf samples by thin layer chromatography. *Chimia*, 64, pp. 755-757. 2010.

RAM, M. GUPTA, M.M. DWIVEDI, S. KUMAR, S. Effect of plant density on the yields of Artemisinin and essential oil in *A.annua* cropped under low input cost management in North Central India. *Plant Med*, v.63, p.372-374, 1997.

RANA, V. BLÁZQUEZ, M. MAITI, S. Essential oil composition of *Artemisia annua* L. at different growth stages. *Journal of Spices and Aromatic Crops*. Vol 22. Pag 181-187. 2013.

RAYMOND, M. MIRIAM, K. OLIVER, K. EDWIN, M. STEPHEN, K. Enhancement of artemisinin in *Artemisia annua* L. through induced mutation. *Open Access Libr J* 2:e2189. 2015.

RIMADA, R.S. GATTI, W.O. JEANDUPEUX, R. CAFFERATA L. Isolation, characterization and quantification of artemisinin by NMR from Argentinean *Artemisia annua* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8 (4), pp. 275-281. 2009.

RODRIGUES, R.A.F. FOGGIO, M.A. BOAVENTURA, S. SANTOS, A.D. REHDER, V.L.G. Optimization of the extraction and isolation of the antimalarial drug artemisinin from *Artemisia annua* L. *Quimica Nova*. 29(2):368–72. 2006.

SIMON, J. E. CHARLES, D. CEBERT, E. GRANT, L. JANICK, J. WHIPKEY, A. *Artemisia annua* L, a promising aromatic and medicinal. In: Janick J, Simon JE, editors Advances in New Crops. West Lafayette; Timber Press: 522-6. 1990.

SIMONNET, X. QUENNOZ, M. CARLEN, C. New *Artemisia annua* hybrids with high artemisinin content. Acta Horticult 769:371–373. 2008.

SIMSEK, M. DUMAN, R. Investigation of effect of 1,8-cineole on antimicrobial activity of chlorhexidine gluconate. Pharmacogn. Res. 234–237. 2017.

SIPAHIMALANI, A. T.; FULZELE, D. P.; HEBLE, M. R. Rapid Method for the Detection and Determination of Artemisinin by Gas Chromatography. J. Chromatogr. 538 (2), 425–455. 1991.

SPRING, O. BIENERT, U. Capitata glandular hairs from sunflower leaves: Development; distribution; and sesquiterpene lactone content. Journal of Plant Physiology, 130 (1987), pp. 441-448. 1987.

SUBERU, J. GROMSKI, P.S. NORDON, A. LAPKIN, A. Multivariate data analysis and metabolic profiling of artemisinin and related compounds in high yielding varieties of *Artemisia annua* field-grown in Madagascar. J Pharm Biomed Anal. 117:522– 31. 2016.

TEIXEIRA, T.R Determinação de Acrotoxina A em vinhos do Rio Grande do Sul através de cromatografia de camada delgada com detector de carga acoplada. Dissertação de mestrado. ICTA, Porto Alegre, 2011.

THU, B. T. T. VAN MINH, T., LIM, B. P. KENG, C. L. Effects of environmental factors on growth and artemisinin content of *Artemisia annua* L. Tropical Life Sciences Research. 22(2):37–43. 2011.

WALLAART, T.E. PRAS, N. BEEKMAN, A.C. QUAX, W.J. Seasonal variation of artemisinin and its biosynthetic precursors in plants of *Artemisia annua* of different geographical origin: proof for the existence of chemotypes. Planta Med. 66, 57–62. 2000.

WANG, M.F. PARK, C.H. WU, Q.L. SIMON, J.E. Analysis of artemisinin in *Artemisia annua* L. by LC-MS with selected ion monitoring. J. Agric Food Chem 53: 7010–7013. 2005.

WANG, M.L. JIANG, Y.S. WEI, J.Q. WEI, X. QI, X.X. JIANG, S.Y. WANG, Z. M. Effects of irradiance on growth, photosynthetic characteristics, and artemisinin content of *Artemisia annua* L. Photosynthetica 46:17–20. 2008.

WEATHERS, P. J. ELKHOLY, S. WOBBE, K. K. Invited Review: Artemisinin: The biosynthetic pathway and its regulation in *Artemisia annua*, a terpenoid-rich species. In Vitro Cell. Dev. Biol. v.42, p.309-317, jul/ago, 2006.

WETZSTEIN H. Y., PORTER J. A., JANICK J., FERREIRA J. F. S., MUTUI T. M. Selection and clonal propagation of high artemisinin genotypes of *Artemisia annua*. Front. Plant Sci. 9:358. 2018.

WHO, 2014. Emergence and spread of artemisinin resistance calls for intensified efforts to withdraw oral artemisinin-based monotherapy from the Market. <file:///D:/Meus%20Documentos/Desktop/REFERENCIAS%20DIS-SERTA%C3%87%C3%83O/WHO%202014.pdf> em 15/01/2019.

WHO, 2018. WORD MALARIA REPORT, 2018. <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/en/> em 20/11/2018.

WIDMER, V. HANDLOSER D. REICH, E. Quantitative HPTLC Analysis of Artemisinin in Dried *Artemisia annua* L.: A Practical Approach, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 30:15, 2209-2219, 2007. DOI: 10.1080/10826070701451555

WOERDENBAG, H.J. PRAS, N. CHAN, N.G. BANG, B.T. BOS, R. VAN UDEN, W. VAN BOI, N. BATTERMAN, S. LUGT, C.B. Artemisinin related sesquiterpenes, and essential oil in *Artemisia annua* during a vegetation period in Vietnam. Planta Med. 60, 272–275. 1994.

YAN, W. GGEBiplot – A windows application for graphical analysis of multienvironment trial data and other types of two-way data. Agronomy journal, v.93, n.5, p.1111-1118, 2001.

YAN, W; TINKER, A. Biplot analysis of multi environment trial data: principles and applications. Canadian Journal of Plant Science, v.86, n.3, p.623-645, 2006.

YAN, W. FRÉGEAU-REID, J. Genotype by Yield* Trait (GYT) Biplot: a Novel Approach for Genotype Selection based on Multiple Traits. Sci Rep 8:1-10. 2018. <https://doi:10.1038/s41598-018-26688-8>

YANG, Z.N. ZHU, S.Q. YU, Z.W. Comparison of terpene components in flowers of *Artemisia annua*. Bangladesh J Pharmacol 7:114–119. 2012.

YU, Z.W. WANG, B.C. YANG, F.M. SUN, Q.Y. YANG, Z.N. ZHU, L.C. Chemical composition and antiacetylcholinesterase activity of flower essential oils of *Artemisia annua* at different flowering stage Iran. J. Pharm. Res., 10 (2) pp. 265-271. 2011.

ZHAO, S. S. ZENG, M. Y. Determination of qinghaosu in *Artemisia annua L.* by high performance liquid chromatography. Chin J Pharm Anal. Vol 5. 3-5. 1986.

ZHELJAZKOV, V.D. ASTATKIE, T. HORGAN, T. SCHLEGEL, V. SIMONNET, X. Distillation time effect on essential oil yield, composition, and antioxidant capacity of sweet sagewort (*Artemisia annua L.*) oil. HortScience 48:1288–1292. 2013.

ÍNDICE DE APÊNDICES E ANEXOS

APÊNDICE A – Croqui do Experimento de Seleção Massal Estratificada	63
ANEXO A – Diluições e Curvas de Calibração	64
ANEXO B - Tabela de Índice de superioridade.....	67

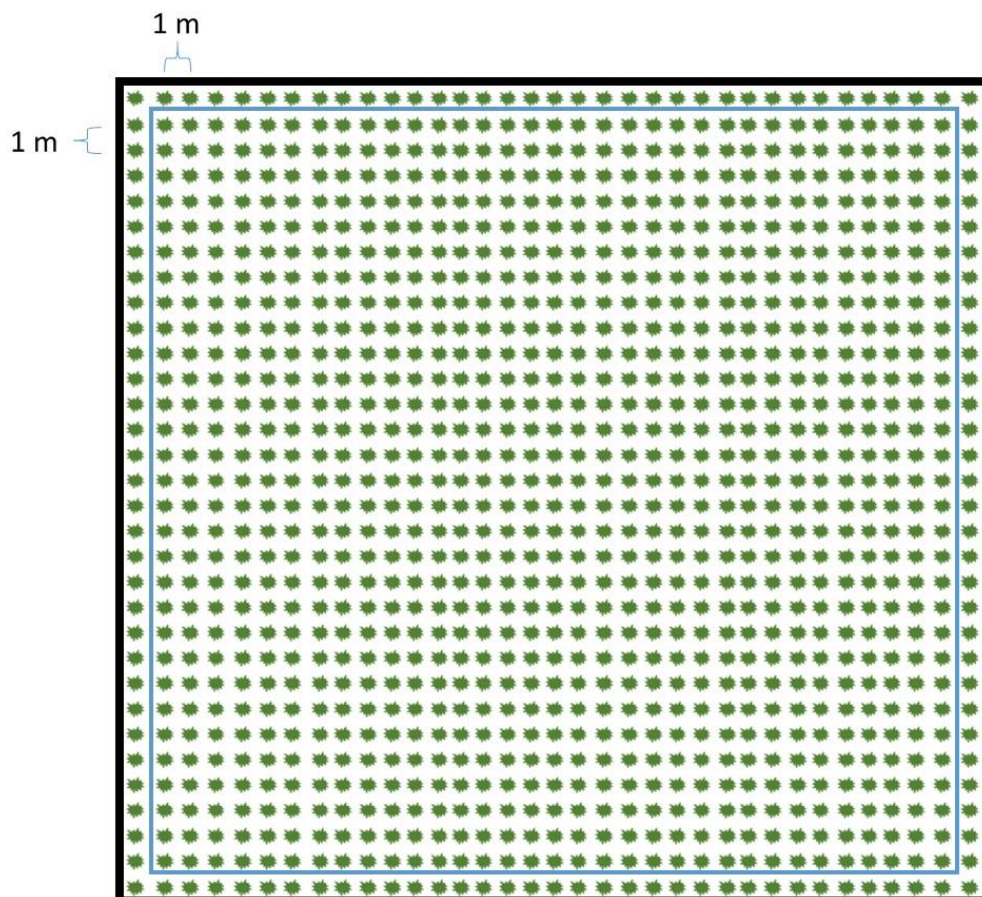
APÊNDICES

APÊNDICE A – Croqui do Experimento de Seleção Massal Estratificada
Croqui do Experimento

Orientador: José Abramo Marchese

Mestrando Responsável: Jorge Luiz Zanatta

Área experimental: 1120 m^2 – $33 \text{ Plantas.Estrato}^{-1} \times 30 \text{ Estratos} + \text{Bordadura}$



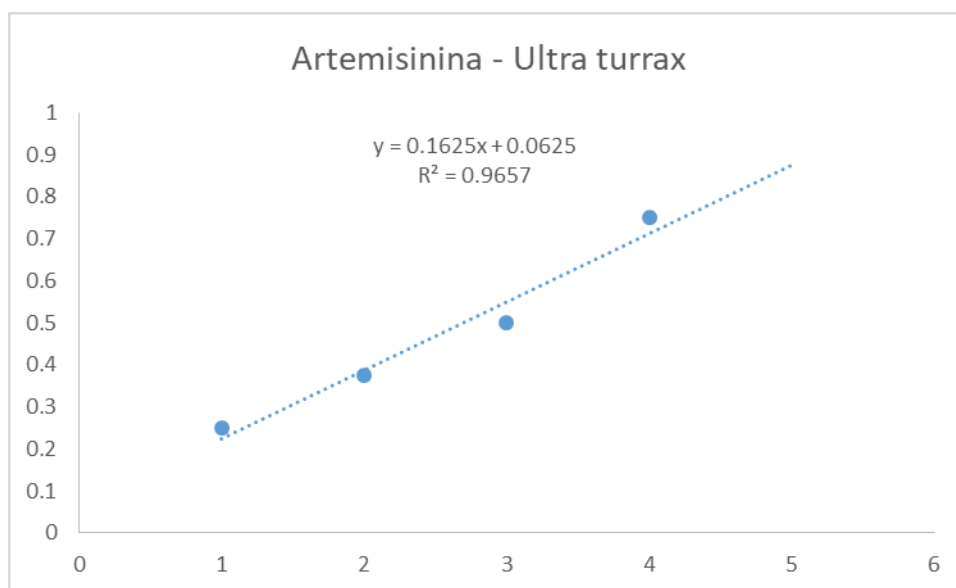
ANEXOS

Anexo A – Diluições e Curvas de Calibração

1. Diluições do padrão para confecção da curva analítica de artemisinina por cromatografia de camada delgada utilizando o Ultra turrax.

Área Unidade	Amostra Mg.ml ⁻¹	Concentração Mg.ml ⁻¹	Artemisinina %
Padrão			
0,037	0,25	0,2719741	1,35
0,054	0,375	0,3807622	1,90
0,066	0,5	0,4575538	2,28
0,114	0,75	0,7647202	3,82

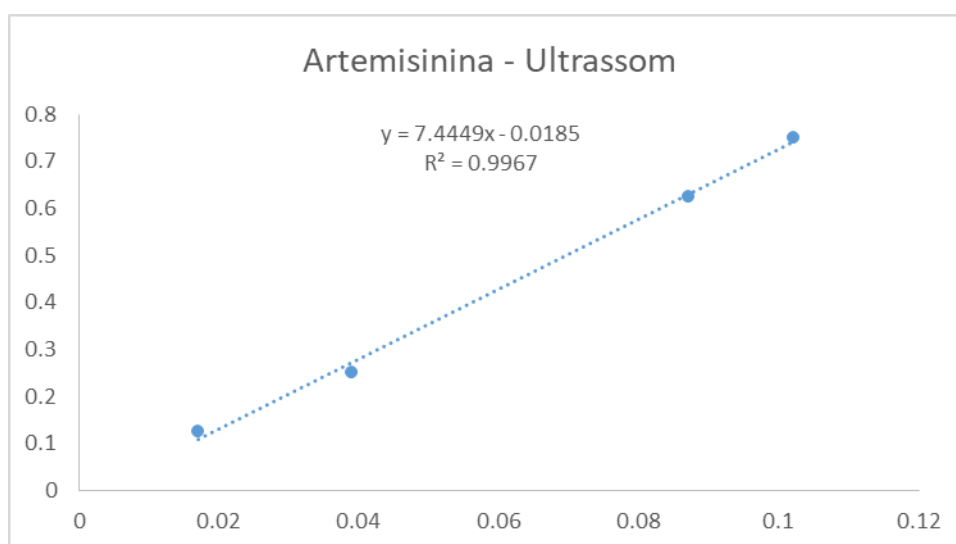
2. Curva de calibração e dados da curva analítica de artemisinina utilizando o Ultra turrax.



3. Diluições do padrão de confecção da curva analítica de artemisinina por cromatografia de camada delgada utilizando o Ultrassom.

Área Unidade	Amostra Mg.ml ⁻¹	Concentração Mg.ml ⁻¹	Artemisinina %
Padrão			
0,017	0,125	0,1080633	0,54
0,039	0,25	0,2718511	1,36
0,087	0,625	0,6292063	3,15
0,102	0,75	0,7408798	3,70

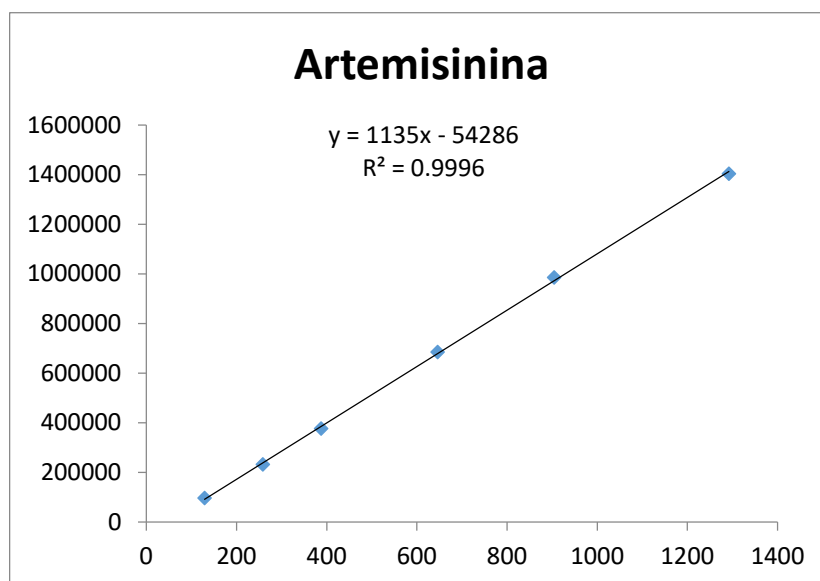
4. Curva de calibração e dados da curva analítica de artemisinina utilizando o Ultrassom.



5. Diluições do padrão para confecção da curva analítica de artemisinina por HPLC-IR

Conc. (µg/ml)	Área
129,2	97596
258,4	232119
387,6	376490
646,0	685295
904,4	985518
1292,0	1403200

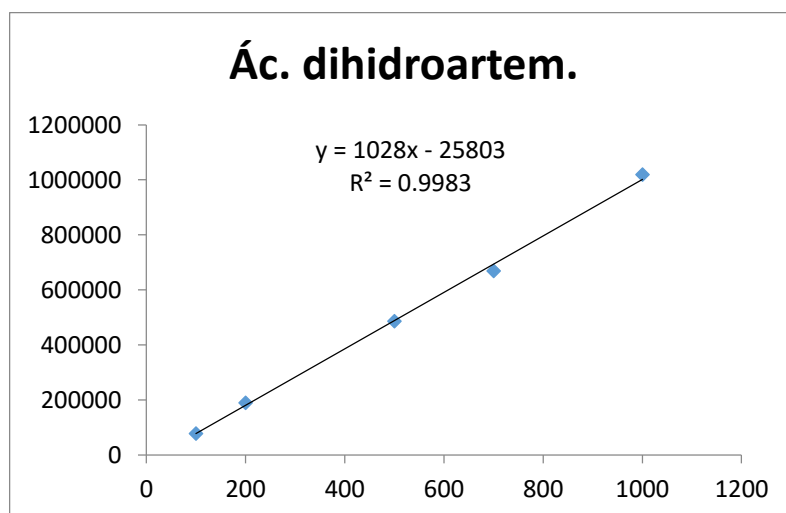
6. Curva de calibração e dados da curva analítica de artemisinina.



7. Diluições do padrão para confecção da curva analítica do ácido dihidroartemísínico por HPLC-IR.

Conc. (µg/ml)	Área
100	77880
200	189207
500	486640
700	668585
1000	1018605

8. Curva de calibração e dados da curva analítica do ácido dihidroartemísínico.



Anexo B. Índice de superioridade usando metodologia Genótipo por ART(GYT) para 50 genótipos de *A. annua* L., avaliadas por características agrônômicas, fisiológicas e fitoquímicas.

Genótipos	ART*PN	ART*CI	ART*GS	ART*E	ART*WUE	ART*AT	ART*NR	ART*PSC	ART*HI	ART*HD	ART*DI	ART*DM	ART*DS	ART*VC	ART*DC	ART*PSF	ART*BIO	ART*OLEO	ART*OLS	ART*REND	ART*DHA	Média
G2	1.22	2.21	0.68	2.02	0.60	2.19	1.85	2.32	1.08	2.28	2.43	2.44	2.42	2.35	2.23	2.66	2.66	1.91	2.42	2.67	0.98	1.98
G1	1.95	3.46	3.56	3.52	0.07	2.79	0.56	0.34	3.19	2.33	2.46	2.43	2.50	1.46	1.71	0.33	0.33	2.83	1.08	1.42	1.73	1.91
G4	2.32	0.96	0.12	-0.20	2.88	1.59	1.84	1.43	0.46	1.73	1.12	1.43	1.45	0.86	1.64	1.26	1.26	0.81	0.73	1.53	1.64	1.28
G11	0.96	0.55	-0.73	-0.02	1.42	0.99	1.62	1.83	-0.23	1.25	1.07	1.20	1.18	1.26	1.40	1.97	1.97	0.52	1.38	1.72	0.64	1.04
G7	0.67	1.07	0.65	0.98	0.28	1.00	0.63	0.71	0.72	0.97	1.00	1.01	1.02	0.84	0.87	0.79	0.79	0.90	0.80	0.94	0.55	0.82
G9	0.93	0.52	-0.30	0.03	1.22	0.85	1.18	1.22	0.01	1.00	0.81	0.92	0.92	0.84	1.05	1.27	1.27	0.47	0.88	1.20	0.64	0.80
G13	-0.07	0.70	-0.15	0.85	-0.33	0.63	0.71	1.17	0.10	0.74	0.97	0.90	0.87	1.15	0.83	1.44	1.44	0.64	1.29	1.20	-0.03	0.72
G16	0.78	0.35	-0.47	-0.12	1.15	0.69	1.13	1.19	-0.14	0.87	0.69	0.80	0.79	0.78	0.95	1.25	1.25	0.33	0.84	1.12	0.52	0.70
G10	0.25	0.84	0.34	0.90	-0.10	0.74	0.52	0.75	0.45	0.75	0.89	0.85	0.84	0.86	0.73	0.90	0.90	0.73	0.89	0.91	0.23	0.68
G3	1.53	0.25	-0.32	-0.65	2.20	0.81	1.25	0.93	-0.04	0.96	0.46	0.70	0.72	0.37	0.95	0.77	0.77	0.21	0.30	0.87	1.04	0.67
G8	0.76	0.45	-0.16	0.06	0.96	0.69	0.90	0.91	0.07	0.79	0.64	0.73	0.73	0.64	0.82	0.94	0.94	0.40	0.66	0.91	0.53	0.64
G17	-0.57	0.48	-0.55	0.81	-0.79	0.37	0.66	1.34	-0.23	0.54	0.91	0.78	0.74	1.27	0.73	1.72	1.72	0.47	1.52	1.27	-0.40	0.61
G15	0.49	0.24	-0.57	-0.09	0.81	0.52	0.98	1.14	-0.25	0.70	0.60	0.67	0.66	0.76	0.81	1.24	1.24	0.24	0.86	1.04	0.31	0.59
G12	1.05	0.23	-0.33	-0.40	1.53	0.64	1.02	0.86	-0.08	0.77	0.45	0.61	0.62	0.43	0.80	0.80	0.80	0.21	0.42	0.81	0.71	0.57
G6	1.37	0.99	1.35	0.58	1.06	0.98	0.24	-0.26	1.16	0.80	0.51	0.63	0.68	-0.02	0.49	-0.50	-0.50	0.77	-0.29	0.11	1.08	0.53
G19	0.64	0.45	0.08	0.17	0.70	0.59	0.62	0.59	0.20	0.64	0.52	0.59	0.59	0.46	0.61	0.60	0.60	0.38	0.44	0.65	0.46	0.50
G5	0.87	1.49	2.29	1.61	-0.20	1.02	-0.47	-0.86	1.83	0.63	0.65	0.63	0.68	-0.05	0.20	-1.03	-1.03	1.17	-0.37	-0.23	0.82	0.46
G21	-0.15	0.91	1.15	1.34	-1.00	0.46	-0.38	-0.26	0.93	0.26	0.54	0.42	0.43	0.31	0.09	-0.18	-0.18	0.74	0.24	0.07	0.01	0.27
G25	0.71	0.67	1.08	0.55	0.34	0.55	-0.10	-0.42	0.87	0.38	0.26	0.30	0.34	-0.12	0.15	-0.57	-0.57	0.52	-0.31	-0.13	0.59	0.24
G28	-0.05	0.63	0.77	0.89	-0.61	0.34	-0.21	-0.14	0.63	0.21	0.39	0.31	0.32	0.23	0.10	-0.09	-0.09	0.51	0.18	0.08	0.04	0.21
G20	0.32	0.52	0.94	0.58	-0.10	0.33	-0.28	-0.47	0.72	0.16	0.16	0.15	0.17	-0.14	-0.02	-0.56	-0.56	0.40	-0.28	-0.23	0.30	0.10
G31	-0.90	0.08	-0.38	0.56	-1.17	-0.13	-0.01	0.51	-0.25	-0.06	0.32	0.17	0.13	0.60	0.08	0.80	0.80	0.11	0.79	0.45	-0.64	0.09
G14	0.68	-0.01	0.07	-0.40	0.95	0.20	0.25	-0.04	0.08	0.20	-0.07	0.05	0.07	-0.20	0.14	-0.20	-0.20	-0.03	-0.29	-0.03	0.47	0.08
G18	0.51	0.42	0.89	0.34	0.23	0.31	-0.24	-0.54	0.68	0.15	0.04	0.08	0.11	-0.28	-0.05	-0.69	-0.69	0.31	-0.45	-0.32	0.43	0.06
G23	-0.18	-0.20	-0.50	-0.21	0.01	-0.11	0.21	0.36	-0.36	-0.01	0.02	0.01	0.00	0.19	0.09	0.44	0.44	-0.14	0.28	0.24	-0.16	0.02
G27	0.23	-0.16	-0.21	-0.36	0.47	-0.01	0.18	0.09	-0.16	0.04	-0.09	-0.03	-0.03	-0.08	0.06	0.03	0.03	-0.13	-0.09	0.02	0.14	0.00
G22	0.28	0.17	0.53	0.13	0.13	0.11	-0.22	-0.43	0.38	0.01	-0.07	-0.04	-0.02	-0.27	-0.11	-0.54	-0.54	0.12	-0.38	-0.30	0.23	-0.04
G29	0.11	-0.21	-0.24	-0.34	0.32	-0.09	0.10	0.04	-0.19	-0.04	-0.14	-0.10	-0.10	-0.10	-0.02	0.00	0.00	-0.17	-0.10	-0.03	0.05	-0.06
G26	0.51	-0.20	-0.01	-0.53	0.80	0.00	0.08	-0.21	-0.03	-0.01	-0.26	-0.15	-0.14	-0.36	-0.05	-0.38	-0.38	-0.18	-0.45	-0.24	0.34	-0.09
G30	-0.28	-0.45	-0.66	-0.47	0.02	-0.32	0.10	0.22	-0.53	-0.21	-0.21	-0.21	-0.22	-0.01	-0.08	0.27	0.27	-0.35	0.09	0.04	-0.26	-0.15
G37	-0.51	-0.67	-1.06	-0.66	-0.07	-0.49	0.18	0.41	-0.85	-0.32	-0.28	-0.29	-0.32	0.07	-0.10	0.52	0.52	-0.52	0.23	0.13	-0.45	-0.22
G35	-0.31	-0.55	-0.72	-0.59	0.05	-0.40	0.06	0.16	-0.60	-0.29	-0.31	-0.30	-0.32	-0.09	-0.16	0.19	0.19	-0.44	0.00	-0.05	-0.28	-0.23
G36	-0.67	-0.05	0.16	0.36	-0.99	-0.31	-0.52	-0.35	0.04	-0.37	-0.14	-0.25	-0.26	-0.10	-0.37	-0.27	-0.27	-0.04	-0.06	-0.32	-0.45	-0.25
G24	0.25	-0.45	-0.21	-0.70	0.60	-0.26	-0.07	-0.33	-0.23	-0.25	-0.46	-0.38	-0.37	-0.50	-0.25	-0.48	-0.48	-0.39	-0.56	-0.41	0.14	-0.27
G34	-0.38	-0.18	0.29	0.06	-0.58	-0.36	-0.61	-0.67	0.11	-0.46	-0.37	-0.43	-0.42	-0.44	-0.51	-0.72	-0.72	-0.17	-0.49	-0.62	-0.25	-0.38
G32	-0.73	-0.29	0.01	0.09	-0.93	-0.50	-0.61	-0.49	-0.11	-0.56	-0.36	-0.46	-0.47	-0.30	-0.54	-0.45	-0.45	-0.25	-0.26	-0.52	-0.51	-0.41
G33	-0.65	-0.63	-0.56	-0.45	-0.47	-0.63	-0.33	-0.21	-0.54	-0.58	-0.49	-0.54	-0.55	-0.29	-0.46	-0.17	-0.17	-0.51	-0.20	-0.38	-0.51	-0.44
G39	-0.61	-0.71	-0.25	-0.52	-0.49	-0.77	-0.67	-0.73	-0.38	-0.80	-0.76	-0.80	-0.80	-0.69	-0.76	-0.78	-0.78	-0.61	-0.68	-0.84	-0.47	-0.66
G38	-1.16	-0.93	-0.53	-0.51	-1.09	-1.07	-0.86	-0.71	-0.64	-1.07	-0.88	-0.98	-1.00	-0.65	-0.95	-0.67	-0.67	-0.56	-0.91	-0.87	-0.83	-0.83
G40	-1.25	-0.96	-0.62	-0.50	-1.17	-1.11	-0.85	-0.65	-0.70	-1.09	-0.87	-0.99	-1.01	-0.60	-0.95	-0.59	-0.59	-0.79	-0.49	-0.87	-0.94	-0.84
G43	-0.76	-0.91	-0.25	-0.67	-0.63	-1.00	-0.92	-1.03	-0.44	-1.05	-1.02	-1.06	-1.06	-0.95	-1.02	-1.12	-1.12	-0.78	-0.96	-1.16	-0.58	-0.88
G45	-0.91	-0.93	-0.29	-0.61	-0.82	-1.05	-0.96	-1.01	-0.48	-1.10	-1.01	-1.08	-1.08	-0.91	-1.05	-1.07	-1.07	-0.79	-0.89	-1.15	-0.68	-0.90
G41	-0.53	-1.29	-0.70	-1.33	0.02	-1.14	-0.70	-0.93	-0.80	-1.11	-1.26	-1.22	-1.22	-1.13	-1.03	-1.10	-1.10	-1.10	-1.14	-1.20	-0.47	-0.97
G46	-1.09	-1.19	-0.65	-0.88	-0.84	-1.25	-0.94	-0.92	-0.77	-1.24	-1.15	-1.22	-1.23	-0.94	-1.13	-0.96	-0.96	-1.00	-0.87	-1.17	-0.84	-1.01
G44	-1.26	-1.00	-0.33	-0.50	-1.27	-1.22	-1.15	-1.09	-0.54	-1.27	-1.07	-1.19	-1.20	-0.91	-1.20	-1.09	-1.09	-0.85	-0.86	-1.24	-0.93	-1.01
G48	-1.52	-0.97	-0.31	-0.31	-1.67	-1.28	-1.27	-1.10	-0.54	-1.35	-1.04	-1.21	-1.22	-0.84	-1.26	-1.04	-1.04	-0.82	-0.76	-1.24	-1.11	-1.04
G42	-0.50	-1.31	-0.54	-1.34	0.01	-1.18	-0.86	-1.17	-0.71	-1.20	-1.36	-1.33	-1.32	-1.30	-1.15	-1.38	-1.38	-1.12	-1.34	-1.40	-0.44	-1.06
G47	-1.27	-1.43	-0.98	-1.10	-0.88	-1.44	-0.92	-0.84	-1.05	-1.38	-1.27	-1.35	-1.37	-0.95	-1.20	-0.84	-0.84	-1.19	-0.84	-1.17	-1.00	-1.11
G49	-1.50	-1.31	-0.51	-0.75	-1.43	-1.53	-1.37	-1.31	-0.74	-1.58	-1.36	-1.50	-1.51	-1.16	-1.48	-1.33	-1.33	-1.10	-1.09	-1.54	-1.12	-1.26
G50	-1.56	-1.68	-0.90	-1.22	-1.23	-1.78	-1.36	-1.34	-1.08	-1.78	-1.64	-1.74	-1.76	-1.34	-1.62	-1.38	-1.38	-1.42	-1.25	-1.68	-1.21	-1.44