

Bio-249

8/6/99

Universidade Eduardo Mondlane
Faculdade de Ciências
Departamento de Ciências Biológicas

TRABALHO DE LICENCIATURA

Estudo de *Artemisia annua* L. em Moçambique e conteúdo de artemisinina nas culturas em campo e *in vitro*

Autora: Mariamo Ibraimo Assane

Universidade Eduardo Mondlane
Faculdade de Ciências
Departamento de Ciências Biológicas

TRABALHO DE LICENCIATURA

Estudo de *Artemisia annua* L. em Moçambique e conteúdo de artemisinina nas culturas em campo e *in vitro*

142
143

Autora: Mariamo Ibraimo Assane

Supervisor: Dr. Henk Doddema

Maputo, Junho de 1999

Agradecimentos

- Ao projecto DEIB (Desenvolvimento de Ensino e Investigação no Departamento de Biologia) pelo financiamento do trabalho;
- Ao meu supervisor, Dr Henk pelo apoio disponibilizando-se a me tirar as dúvidas que iam surgindo ao longo do trabalho;
- Ao Dr Richard Haynes, da Universidade de Ciências e Tecnologia de Hong Kong e ao Dr C. B. Gasston, director da Damascena Essential Oils Limited em Tanzania pelo fornecimento de sementes F2 de *Artemisia annua*.
- À Dra. Marina E. Perotti de Lampanona da Universidade Nacional de Tucumán (Argentina), pelo fornecimento das flores de *Artemisia annua*.
- À Dra. Nancy Acton pelo fornecimento de sementes de sementes de *A. annua*, da Jugoslavia
- Aos Drs. Jim Simon, do Departamento de Horticultura e Arquitetura da paisagem, (West lafayette) e J. Janick pelo fornecimento de sementes de *A. annua* e artigo.
- Ao Dr. Niesko Pras (Professor e membro do Departamento Biologia Farmacêutica, The Netherlands), pelo fornecimento das variedades Halle, Shanghai e Yougoslavia.
- Ao Dr. Hamid Elhag (Riyad, Arábia Saudita) pelo fornecimento de sementes e artigo.
- Ao Dr.Devanand P. Fulzele (Divisão de Biotecnologia do Cientista, B. A. R. C., Mumbai- 400085, India), pelo artigo e sementes.
- Ao Dr. Miodrag Dermanovic da Faculdade de Química da Universidade de Bélgica).
- Ao Professor Kit-Lam Chan (Universiti Sains Malaysia).
- À Dra. Adelaide Bela Agostinho, MISAU, pelo fornecimento de todos os endereços que tornaram possível contactar as personalidades acima citadas.
- Ao dr. Quilambo pelo apoio moral e material pretado.
- Ao dr. Almeida Guissamulo pelo apoio na análise estatística dos dados.
- Ao Feliciano pela compreensão nos momentos mais difíceis do trabalho.
- À Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal, pelo uso da câmara de fluxo laminar e "Area Measurement Meter System".
- Aos senhores Sitói e Helena, pela ajuda prestada na parte laboratorial;
- Aos senhores Manhiça, Lucrecia e Graça da F. de Agronomia.
- À dra. Filomena pelo espaço cedido nas estufas onde foi feito o cultivo de *A. annua*.
- -Às minhas colegas, Eunice, Dirce, Célia, Alice e em especial à Annae por toda a ajuda prestada desde a preparação dos canteiros até à fase de colheita das plantas.
- Ao Dr. Samuel e ao sr. Baptista, do MISAU pela oferta do livro sobre as formas de tratamento da malária em Moçambique.
- A todos que aqui não foram mencionados mas que, directa ou indirectamente contribuíram para a realização do presente trabalho.

Dedicatória

Dedico o presente trabalho à memória do meu pai, à minha mãe e ao Dino.

Índice

Conteúdo	Página
1.0- Introdução-----	1
2.0- Objectivo geral-----	5
2.1- Objectivos específicos-----	5
3.0- Hipóteses-----	5
4.0- Material e métodos-----	6
4.1- Material-----	6
4.2- Métodos-----	7
4.2.1- Desenho experimental-----	7
4.2.2- Crescimento de <i>Artemisia annua</i> no campo-----	7
4.2.3- Crescimento de <i>Artemisia annua</i> na estufa-----	7
4.3- Condições de crescimento-----	8
4.3.1- Solo-----	8
4.3.2- Condições ambientais-----	9
4.3.3- Medição dos parâmetros de crescimento-----	9
5.0- Crescimento de <i>A. annua</i> nas culturas <i>in vitro</i> -----	10
5.1- Iniciação dos calos-----	10
5.2- Estabelecimento de calos no meio MS com diferentes concentrações de 2,4-D---	11
6.0- Extração da artemisinina-----	11
6.1- Artemisinina extraída das plantas-----	11
6.2- Artemisinina extraída dos calos-----	12
6.3- Separação cromatográfica-----	12
7.0- Análise do crescimento-----	12
7.1- Taxa de Crescimento Absoluto-----	12
7.2- Taxa de Crescimento Relativo-----	13
7.3- Razão da Área Foliar -----	13
7.4- Taxa de Assimilação Aparente-----	13
7.5- Área Foliar Específica-----	13
7.6- Razão do Peso da Folha-----	14

7.7- Peso Específico da Folha-----	14
7.8- Razão do Peso Fresco para o Peso Seco da Folha-----	14
8.0- Análise de dados-----	14
8.1- Resultados-----	15
8.1.1- Campo-----	15
8.1.2- Culturas <i>in vitro</i> -----	33
8.2- Conteúdo da artemisinina-----	37
8.2.1- Campo-----	37
8.2.2- Culturas <i>in vitro</i> -----	39
9.0- Discussão dos resultados-----	39
9.1- Campo-----	39
9.2- Culturas <i>in vitro</i> -----	43
9.3- Extração da artemisinina-----	44
9.3.a)- No Campo-----	44
9.3.b)- Nas Culturas <i>in vitro</i> -----	45
10.0- Conclusões-----	46
11.0- Recomendações-----	47
12- Bibliografia-----	49

Resumo

Com o objectivo de determinar a taxa de crescimento de *Artemisia annua* e conteúdo de artemisinina nas culturas em campo e *in vitro*, procedeu-se da seguinte forma:

Uma parte de sementes de *A. annua* foram lançadas no campo e na estufa. Dezasseis semanas após a sementeira as plantas foram colhidas e divididas em folhas, caules, raízes e flores que, foram por sua vez foram divididas em duas metades; uma foi seca na estufa e outra à temperatura da sala, desta última parte foi extraída artemisinina em éter de petróleo.

Outra parte de sementes de *A. annua*, foi cultivada em condições *in vitro*. Das plântulas obtidas foi feita a iniciação de calos a partir de explantes de caules e de folhas. Estes calos depois foram transferidos para meios de estabelecimento onde foi variada a concentração de 2,4-D. Os calos depois foram pesados frescos e secos e depois extraída artemisinina em n-hexano.

Artemisia annua desenvolveu-se bem nas condições e época em que foi cultivada e possui boas características para a sua exploração comercial.

As plantas do campo cresceram mais que as plantas da estufa.

A folha produziu mais artemisinina em relação às restantes partes da planta, durante a fase vegetativa, seguida por flores.

Os caules produziram mais artemisinina na fase vegetativa.

Artemisinina não foi detectada nas raízes.

Os calos obtidos a partir de explantes de folhas no escuro tiveram pesos relativamente elevados que os que cresceram em condições de luz.

Nos calos tanto os obtidos a partir de explantes de caules como os de explantes de folhas, artemisinina não foi detectada.

1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença causada por um protozoário trazido pelo mosquito, afecta centenas de milhões de pessoas vivendo nos trópicos. A malária no Homem é causada por quatro membros do género *Plasmodium* : *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. Estima-se que *P. falciparum* causa entre 1.5 a 2.7 milhões de mortes por ano em todo o mundo, das quais uma vasta maioria ocorre na África Sub-Sahariana, em crianças abaixo dos 5 anos de idade (Hogh, 1996). Estima-se que aproximadamente 80% dos casos de malária e 90 a 95% de mortes relacionadas com a malária no mundo, ocorrem em África (Anónimo, 1991).

Em Moçambique, embora nos últimos tempos seja reportada uma diminuição significativa dos casos de malária, esta doença continua a ser uma das maiores causas da mortalidade infantil. Só para citar um exemplo, no ano de 1996, foram registados 18.945 casos de malária, dos quais 13.580 ocorreram em crianças. O número de óbitos foi de 883, sendo 652 em crianças (Anónimo, 1996).

As drogas comumente usadas no tratamento da malária estão divididas em quatro grupos segundo Knell (1991). No primeiro, encontra-se de entre outras drogas a cloroquina cujo mecanismo de acção consiste na sua junção com a hematina do pigmento parasitado, formando complexos que se agregam formando grânulos grossos. No segundo, encontram-se os antifolatos, os quais incluem proguanil, pirimetamina e drogas relacionadas, que actuam por inibir o metabolismo do ácido fólico mais fortemente no parasita do que no hospedeiro. Estas drogas, inibem também o desenvolvimento dos parasitas os quais perdem a sua maturação, resultando em organismos grandes e inviáveis. No terceiro, a quinina e seus derivados, causam a agregação do pigmento e ainda a degeneração do núcleo e do citoplasma do parasita. No quarto grupo encontram-se os sesquiterpenos, representados pela artemisinina a qual está detalhada mais abaixo.

Segundo Barreto (1995), em Moçambique, o tratamento da malária é feito de acordo com as seguintes divisões: Malária não complicada- o tratamento é feito com cloroquina via oral. A cloroquina intramuscular é aplicada nos casos em que o doente tenha muitos

vômitos. **Malária grave**- o tratamento é feito com sulfato de quinino, durante pelo menos 24 a 48 horas, tempo considerado suficiente para baixar a parasitemia e melhorar o estado geral do paciente. Após a administração deste, o tratamento é complementado com sulfadoxina/ pirimetamina (do grupo dos antifolatos), vulgarmente conhecida por fansidar. **Malária complicada**: este é o caso de malária causada por *Plasmodium falciparum* que é acompanhada por uma afecção aguda de qualquer um dos órgãos provocando nomeadamente: malária cerebral, choque circulatório, anemia grave, hepatite, coagulação intravascular disseminada ou ainda febre hemoglobinúrica. A forma mais comum da malária complicada é a malária cerebral. O tratamento é feito com sulfato/cloridrato de quinina, por via parenteral. Na falta deste pode ser aplicada a quinina , através de um tubo nasogástrico. **Malária resistente aos anti-maláricos**: neste caso existem três alternativas. A primeira é sulfadoxina/ pirimetamina, considerada a mais eficiente no tratamento de malária resistente à cloroquina no País. A segunda é a halofantrine e a última alternativa é o sulfato de quinina.

Com a possível excepção dos derivados da artemisinina, a resistência tem aparecido para todos os medicamentos antimaláricos. A resistência a antifolatos desenvolveu-se rapidamente logo após a introdução da pirimetamina em muitas partes dos trópicos, tanto para *P. falciparum* como para *P. vivax*. A resistência à mefloquina (do grupo da quinina) foi relatada antes mesmo do seu uso rotineiro. ^{antes que a} A resistência à halofantrine apareceu simultaneamente. Quando atovaquone foi usado em testes clínicos pré-eliminares, 28% dos pacientes tiveram infecções recrudescentes, associadas ao desenvolvimento da resistência. Quinina e cloroquina têm tido longos períodos de uso efectivo, porém em muitas partes do mundo, a cloroquina não é eficaz no tratamento da malária causada por *Plasmodium falciparum* e, *P. vivax* ^{tem} desenvolvido resistência em algumas partes da Oceania. Quinina está ^{em todo o mundo} ameaçada em algumas partes do mundo (White and Olliaro, 1996), já que metade da produção mundial é usada para dar sabor amargo à água tônica, hábito que expõe os parasitas de malária à baixas concentrações do valor da droga. Esta condição é essencial para o desenvolvimento da resistência, embora nenhum atributo para a água tônica tenha sido já provado (Knell, 1991).

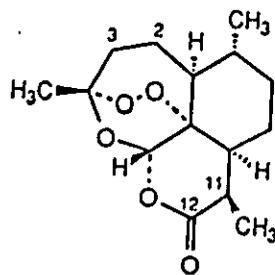
Reconhece-se que novas drogas são urgentemente necessárias devido à resistência das espécies de *Plasmodium* à quimioterapia corrente. Por isso, pesquisas para novos

compostos antimaláricos de plantas têm aumentado nos últimos tempos. É neste contexto que *Artemisia annua* L. passou a merecer uma atenção especial devido à actividade antimalarial da artemisinina.

A. annua é uma erva anual aromática que ocorre naturalmente como parte da vegetação da Estepe nas partes nordeste das províncias de Chahar e Suiyuan (40° N, 109° E) na China, 1000 a 1500 m acima do nível do mar. Esta planta pode ser classificada como uma planta de dia curto com fotoperíodo crítico entre 12 e 16 horas (Geldre *et al.*, 1997).

O género *Artemisia* pertence à tribo Anthemideae, das Asteroideae, uma subfamília da família Asteraceae. Vários tratamentos taxonómicos subdividem o género *Artemisia* em várias secções subgenéricas. *A. annua* tem sido considerada na subsecção Absinthium ou numa secção combinada Artemisia (Absinthium + Abrotanum) (Janick, 1995).

Artemisinina (fig.1) é um lactone sesquiterpeno com uma função endoperóxido e é correntemente recomendada para o tratamento de malária causada por *P. falciparum* resistente às drogas antimaláricas, especialmente malária cerebral (Chan *et al.*, 1997). As propriedades antimaláricas deste composto estão ligadas à sua função peróxido, sendo único composto de entre os antimalariais, desprovido do anel heterocíclico contendo nitrogénio (Geldre, *et al.*, 1997).



Neste

figura1. Artemisinina, um sesquiterpeno lactone anti-malárico

Ge Hong no ano 340, recomendou que para reduzir febres, deve ser posta de molho uma mão cheia de *Artemisia annua* num litro de água, filtrar o licor e tomar. Mais tarde, Li Shizhen, em 1596 reportou que as preparações de *Artemisia annua* podem combater as febres e calafrios da malária. Porém, experiências para confirmar as actividades antipiréticas e antimalariais nos extractos de *A. annua* em água quente foram desencorajadores, (Klayman, 1985). Já a partir de 1971, muitas experiências têm sido feitas, confirmando a extracção de artemisinina em solventes orgânicos e sua actividade antimalarial. O modo de acção da artemisinina envolve dois passos: primeiro ocorre a clivagem da ponte endoperóxido que é catalizada pelo ferro intraparasítico e grupo heme para dar origem a radicais intermediários livres instáveis. A toxicidade selectiva do medicamento contra o parasita da malária é devida provavelmente a este passo, já que o parasita intra-eritrocítico é rico em ferro e grupo heme. No segundo passo, o radical livre resultante ou um novo radical ou ainda um electrófilo reorganizado, alcaliza proteínas específicas da malária (Meshnick, et al., 1996).

O baixo conteúdo de artemisinina tem sido um dos factores limitantes para a sua utilidade clínica, a síntese da molécula não é economicamente prática (Tawfiq et al., 1989). O rendimento reportado da artemisinina extraída da folha, varia entre 0.01% nos tipos Europeu, Indiano e Americano, para 0.5-0.7% no tipo Chinês (Jaziri et al., 1996). Portanto, de modo a obter quantidades suficientes de artemisinina, de forma a permitir a realização de experiências adicionais e alterações químicas da molécula para o melhoramento da sua efectividade, grande número de plantas tem de ser cultivado. Para manter preços baixos da futura medicina com base na artemisinina, essas plantas devem ser cultivadas em locais onde elas são necessárias, como é o caso de África. Nenhuma experiência envolvendo crescimento, e conteúdo de artemisinina foi realizada sob condições locais Moçambicanas.

Experiências biotecnológicas tem sido consideradas como fonte alternativa para a produção de artemisinina (Woerdenbag et al., 1993). Contudo, baixos rendimentos de artemisinina são obtidos das raízes e plântulas derivadas da cultura de calos a partir de explantes da folha (Tawfiq et al., 1989). Portanto, muita pesquisa deverá ainda ser feita

7 para o estabelecimento de condições nas quais ^{at} culturas de tecido poderão produzir níveis altos de artemisinina.

2. objectivo geral

O objectivo geral desta pesquisa é:

Contribuir para o estabelecimento duma empresa Moçambicana dedicada ao crescimento de *A. annua*, produção de artemisinina e processamento de medicamentos baseados em artemisinina para combater a malária nos países africanos.

2.1. Objectivos específicos

Na linha do objectivo geral acima indicado, foram definidos os seguintes objectivos específicos:

2.1.1. Determinar a taxa de crescimento e produção de biomassa de *Artemisia annua* cultivada em condições Moçambicanas, no campo e na estufa.

2.1.2. Determinar o composto activo (artemisinina) em várias partes da planta crescendo em Moçambique.

2.1.3. Determinar a concentração de auxina na qual há maior produção de artemisinina nas culturas *in vitro*.

3. Hipóteses:

1. As plantas do campo produzirão menos biomassa que as plantas da estufa.
2. O conteúdo de artemisinina será mais elevado nas plantas da estufa, já que as condições são óptimas.
3. O conteúdo de artemisinina será maior na folha, (Lampasona *et al.* 1990).
4. Os pesos dos calos aumentarão com o aumento da concentração da auxina.

4. Material e Métodos

4.1. Material

- ◆ Enxadas
- ◆ Pás
- ◆ Balde
- ◆ Facas
- ◆ Mangueiras de rega
- ◆ Vasos
- ◆ Sacos plásticos
- ◆ Sistema de Medição da área (Delta-T Area System, ΔT -devices Ltd, Burwell, Cambridge, England)
- ◆ Câmara de fluxo Laminar
- ◆ Autoclave
- ◆ Provetas graduadas
- ◆ Balanças analíticas
- 1 ◆ Tigelas de cultura
- ◆ Garrafas graduadas
- ◆ Pipetas graduadas
- ◆ Pipetas automáticas
- ◆ Placas de Petri Estéreis
- ◆ Papel de alumínio
- ◆ Papel de filtro
- ◆ Parafilme M
- ◆ Pinças
- ◆ Bisturis
- ◆ Autoclave
- ◆ Lamparina
- ◆ PH-metro
- ◆ Termómetro

- ◆ Estufa
- ◆ Tigelas de cultura

4.2. Métodos

4.2.1. Desenho Experimental

O trabalho era composto por duas partes; sendo uma de experiências de crescimento de *A. annua* no campo e na estufa, e a outra, culturas *in vitro*.

4.2.2. Crescimento de *A. annua* no campo

Uma parte de sementes F2 de *Artemisia annua* provenientes de Tanzania (Damascena Essential Oils Limited, USA River, Tanzania), foi distribuída no solo, (ver componentes do solo na tab.1) num pequeno viveiro a 18 de Maio de 1998. O viveiro foi regado com água da torneira diariamente durante 4 semanas. Após este período, 50 plantas foram transplantadas para canteiros maiores de modo a permitir um espaçamento entre si de cerca de 30 cm (Fulzele, 1995; Annexure-I). A rega foi contínua após o transplante dado que a experiência teve lugar na estação seca. Ocasionalmente, os canteiros foram sachados. Dezasseis semanas após a sementeira, altura que segundo a literatura começa a produção de artemisinina, foi iniciada a colheita em cada fase de 3-4 plantas por semana para medir os pesos fresco e seco das partes da planta, área da folha e volume da raiz, parâmetros usados nos cálculos relacionados com este estudo.

4.2.3. Crescimento de *A. annua* na estufa

Simultaneamente, outra parte das mesmas sementes, foi distribuída num vaso de cerâmica de cerca de 12L e sujeita ao mesmo tipo de tratamento do ponto anterior mas, só nas primeiras 4 semanas. Após este período, 30 plantas foram transplantadas para

vasos individuais, os quais foram sendo regadas diariamente com uma solução de nutrientes KNOP (ver glossário) durante outras quatro semanas. A solução de KNOP foi obtida por dissolver 10g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2.5g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.5g de KH_2PO_4 , 2.5g de KNO_3 e 0.05g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Antes de cada rega a solução foi diluída na ordem de 1:10. Ao longo da experiência as plantas foram recebendo quantidades diferentes da solução. Nas primeiras duas semanas 100 ml e nas outras duas seguintes 200 ml. Esta rega era alternada com volume semelhante de água da torneira para evitar que o solo secasse. Nas 4 semanas seguintes, foram aplicados 500 ml de água da torneira, em cada 1 ou 2 dias. Após este período o volume de água foi aumentado para 1000 ml, aplicado da mesma forma. Igualmente, depois de 12 semanas de idade foram sendo tomadas amostras de 2 plantas por semana no mesmo período para analisar os mesmos parâmetros do ponto (4.2.2.). Estas plantas serviram como controle. De referir que após os 6 meses de idade estas plantas passaram a receber de novo 500ml de água do mesmo modo, devido à diminuição de absorção. *de pve*

4.3. Condições de crescimento

4.3.1. Solo

O solo usado nos vasos foi colectado no recinto da estufa do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Eduardo Mondlane (UEM), onde também foram feitos canteiros. Uma parte da sua análise foi feita no laboratório de solos do Instituto Nacional de Investigação Agronómica (INIA) e outra, no Departamento de Engenharia Rural, da Faculdade de Agronomia (UEM). Os seus componentes estão indicados na (tab.1).

O solo era arenoso, consistindo por 87.7% de areia, 10% de argila e 2,3% de limo (Landeweert, 1997). O conteúdo de matéria orgânica foi de 1.3% para os canteiros 1 e 4, 1.4% para 2 e 3 e por último 2.6% para os vasos.

Tabela1: Componentes do solo

P-Olsen (ppm)	27.1
Ca ²⁺ (meq/100g solo)	25
Mg ²⁺ (meq/100g solo)	1.7
K ⁺ (meq/100g solo)	0.07
Na ⁺ (meq/100g solo)	0.01
N total	0.1
CE	0.1
PH em água	6.5
PH em KCl	5.6

CE- condutividade Eléctrica

4.3.2. Condições ambientais

Algumas condições ambientais nas quais as plantas cresceram foram medidas mas, contrariamente ao que estava previsto em relação à água, as plantas foram regadas com água da torneira já que a experiência teve lugar no tempo seco. A temperatura média de dia foi de 26.9°C para os vasos, 26.3°C para os canteiros C1 e C2, 26.7°C para o C3 e 26.5°C para o canteiro 4. A humidade relativa do ar foi de 36,9% para os vasos, 52.6% para C3, 53.4% para C2 e C4 e 56.6% para C1. A densidade média do fluxo luminoso foi de 8418 mol.m⁻²s⁻¹ para os vasos, 6800mol. m⁻² s⁻¹ para os canteiros 1, 2 e 4, e 7570mol.m⁻² s⁻¹. para o canteiro 3. De referir que em ambos os casos os parâmetros não estiveram distribuídos uniformemente. Estes parâmetros foram medidos às 12 horas. Os vasos contendo o solo local foram forradas com sacos plásticos para evitar a perda de humidade através das suas paredes. Os sacos não continham furos no início da experiência mas estes já existiam no final devido provavelmente ao poder das raízes desta planta.

o que é

4.3.3. Medição dos parâmetros de crescimento

Em cada colheita, foram tomadas por semana 3 ou 4 plantas do campo e 2 da estufa. As raízes da planta colhida foram lavadas com água da torneira para retirar a areia e outras

partículas. A planta foi depois levada para o laboratório num pequeno balde contendo água para evitar que ela murchasse antes das pesagens para obtenção do peso fresco e área foliar. Os pesos fresco e seco foram medidos através de uma balança analítica e a área foliar através de um ΔT -área-metro cm^2 (Burwell, Cambridge, England). O volume da raiz foi obtido através de uma proveta graduada, onde era introduzido um certo volume de água, depois as raízes. A diferença entre o volume final e o inicial dava-nos o volume das raízes para cada planta. As partes frescas da planta foram depois divididas em duas metades sendo uma levada à estufa para secar a 80°C durante 24 horas, e a outra posta a secar na sala à temperatura de 24°C a 26°C aproximadamente, para dela extrair a artemisinina. As partes da planta secas na estufa foram depois multiplicadas por 2 para ajustar os pesos secos.

5. Crescimento de *A. annua* nas culturas *in vitro*

5.1. Iniciação dos Calos

Sementes de *Artemisia annua* obtidas da Holanda (variedades Halle, Yougoslavia e Shanghai), de Washington, Arabia Saudita, Jugoslávia e Tanzania, foram esterilizadas superficialmente com uma solução de hipoclorito de sódio a 3% (p/v) durante 30 minutos, depois filtradas através de um papel de filtro esterilizado e depois lavadas 3 vezes com água destilada esterilizada. Antes da distribuição no meio de cultura esterilizado, as sementes foram passadas em papel de filtro também esterilizado para diminuir o excesso de água que as acompanhava e tornar possível a sua separação. O meio de cultura era composto por $\frac{1}{2}$ de sais MS (Murashige and Skoog, 1962), sacarose a 2% e de agar a 0.8%. O pH foi ajustado para 5.9 antes da esterilização do meio de cultura (Woerdenbag *et al.*, 1993). Entre 1-2 semanas as plântulas foram divididas sob condições de asséptica em explantes de caule e folha os quais foram colocados em placas estéreis contendo o meio MS (Murashige e Skoog 1962; Tawfiq *et al.*, 1989), 5% de sacarose, 1.5% de agar, 1.0 mg/l de ácido (2,4- dicloro-fenoxi)-acético (2.4-D) e 0.1 mg/l de cinetina. O pH foi ajustado entre 5.8-5.9 antes da esterilização por autoclave durante 20 minutos a 120°C e 1 Bar. Ao fim de cada operação, as placas de Petri contendo os meios foram selados com

parafilm M. As culturas foram mantidas neste meio durante 4 semanas à temperatura de aproximadamente 24°C a 26°C. Este meio foi denominado (A).

5.2. Estabelecimento de calos em meio MS com diferentes concentrações de 2,4-D

Pequenos pedaços de calos friáveis foram transferidos assepticamente do meio A para um meio MS fresco, o qual continha a mesma composição, mas uma concentração de 0.1(B), 1.0(C), 3.5(D) e 5.0(E) mg/l de 2,4-D. A concentração de cinetina foi de 0.1 mg/l, portanto mantida constante. As culturas foram mantidas em condições idênticas, por 4, semanas após as quais foram pesadas e secas à temperatura de aproximadamente 24°C-26°C e finalmente extraídas (ver o ponto 6.2). Uma parte das culturas foi conservada no escuro para comparações com as culturas conservadas à luz.

6. Extração de artemisinina

6.1. Artemisinina extraída das plantas

De cada planta, cerca de 5g ou equivalente do material da planta, foi extraído em banho-maria a 55°C com 200 ml de éter de petróleo 40-60°C num vaporizador rotativo por 48h. Após este período o material foi filtrado e depois seco *in vacuo* (Woerdenbag *et al.*, 1990). Ao extracto remanescente foram depois adicionados cerca 2-3ml de éter de petróleo e depois foi detectada a presença/ ausência da artemisinina através da cromatografia de camada fina em sílica gel.

6.2. Artemisinina extraída dos calos

A artemisinina dos calos foi extraída em n-Hexano durante 9-12 horas. Os calos foram depois filtrados, secos a vapor num vaporizado rotativo e depois dissolvidos em clorofórmio. A identificação da artemisinina foi feita do mesmo modo anteriormente

referido, excepto a substituição do sistema eluente que neste caso foi usado 5% de etil acetato em clorofórmio (Elhag *et al.*, 1991).

6.3. Separação cromatográfica

A separação cromatográfica foi feita usando uma placa de sílica gel e tendo como eluente o sistema etil acetato + clorofórmio numa proporção de (7.5 + 92.5). Depois de aproximadamente 60 minutos a placa foi retirada e seca ao ar por cerca de 5 minutos, após o qual era borrifada com uma solução fresca de ácido fosfórico a 2% para detectar a presença de artemisinina (Woerdenbag *et al.*, 1990). Artemisinina aparece como cristais vermelho-púrpuro à luz do dia e cor de laranja sob uv a 366nm (Pras *et al.*, 1990). Para comparações foi usada artemisinina pura (1mg/ml em etanol), obtida da Companhia Química SIGMA.

or laranja?

7. Análise do crescimento

Para analisar o crescimento , foram usados os pesos fresco e seco, e a área foliar de cada planta. A determinação da área foliar é importante já que as folhas são as principais responsáveis pela captação de energia solar e pela produção de matéria orgânica através da fotossíntese. Deste modo, foram calculados os seguintes parâmetros:

7.1. Taxa de crescimento Absoluto

(TCA)

É o aumento no peso da planta devido aos produtos da assimilação (Larcher, 1995).

$$TCA = dp/dt$$

P-peso seco em g

t-tempo em semanas

7.2. Taxa de Crescimento Relativo (TCR)

É também conhecido por índice de eficiência e expressa a habilidade da planta para produzir novo material (Noggle e Fritz, 1983). A TCR pode ser calculada segundo (Fitter e Hay, 1981).

$$TCR = dP/dt.1/P$$

Onde:

P-peso seco em g

t-tempo em semanas.

7.3. Razão da Área Foliar

$$RAF = A/P$$

A-área das folhas em cm^2 ;

P-peso seco da planta em g

7.4. Taxa de Assimilação Aparente (TAA)

A taxa de assimilação aparente reflecte a dimensão do sistema assimilador que está envolvido na produção de matéria seca, é uma estimativa da fotossíntese líquida (Magalhães, 1983). Da equação clássica do crescimento relativo (Fitter e Hay, 1981) abaixo indicada pode ser isolado o termo TAA, assim:

$$TCR = TAA.RAF, \text{ donde } TAA = TCR/RAF$$

RAF- é a razão da área foliar em $cm^2.g^{-1}$

TCR- é a taxa de crescimento relativo em $g.g^{-1}.semana^{-1}$

7.5. Área Foliar Específica

$$AFE = A/pfs$$

A-área foliar em cm^2

pfs-peso seco das folhas

7.6. Razão do Peso das Folhas

$$RPF = pfs/P$$

pfs-peso seco das folhas em g;

P-peso seco da planta em g.

7.7. Peso Específico da Folha

Do mesmo modo foram calculadas as razões dos pesos do caule (pc) , da raiz (pr) e das flores (pfl).

7.8 Razão do peso fresco para o peso seco da folha

$$RPFS = pff/pfs$$

pff-peso fresco da folha em g;

pfs-peso seco da folha em g.

8. Análise de dados

No presente trabalho, estavam previstas amostras de 16 plantas em cada colheita, o que não foi possível devido ao tamanho das plantas e à quantidade enorme de folhas que elas possuíam. Por isso também só era possível ter dados referentes a uma planta por dia, dando sub-grupos de 3 ou 4 plantas por semana para campo e 2 plantas para estufa. Porque durante a experiência as plantas foram colhidas de modo a formar grupos de 16, onde 10 seriam do campo e 6 da estufa, foi necessário fazer um teste para ver se as plantas desse modo colhidas poderiam ser consideradas dum mesmo grupo ou considerá-las em subgrupos. Dessa forma, foi feita a análise de variância dos sub-grupos por semana no pacote estatístico SPSS/PT+. Para o caso do peso seco das folhas, as

diferenças significativas verificaram-se entre os sub-grupos 1 e 3, 2 e 3. Apenas no grupo dois, composto pelos sub-grupos 4, 5 e 6 não houve diferenças significativas. No grupo três, as diferenças significativas foram verificadas entre os sub-grupos 7 e 9. No quarto, houve diferenças significativas entre os grupos 10 e 12. No último, foram entre todos os subgrupo, isto é, 13 e 14, 14 e 15, 13 e 15.

As diferenças entre os parâmetros de crescimento do campo e da estufa, foram analisadas no pacote estatístico, Statistix, versão 3.11, pelo teste T-Paired, (Wonnacott e Wonnacott, 1990), (ao nível de significância de 5%.)

Foram ainda feitas algumas correlações simples entre alguns parâmetros de crescimento, essencialmente ligados a folha, no pacote estatístico Statistica, usando a correlação simples, (Wonnacott e Wonnacott, 1990), no nível de significância de 5%.

Para analisar as variâncias dos pesos fresco e seco dos calos foram usados o teste de Kruskal-Wallis, (Siegel e Castellan, 1988), no pacote estatístico Statistix, versão 3.1, no nível da significância de 5%.

8.1. Resultados

8.1.1. Campo

Os gráficos mostram apenas uma parte de crescimento, devido a iniciação tardia da amostragem, o que deveu-se ao facto de muitos autores considerarem que artemisinina só está presente em quantidades apreciáveis três meses após a sementeira, e o objectivo principal desta pesquisa ser a produção do composto activo nas condições locais.

As fases de crescimento incluem segundo Noggle e Fritz (1983), uma fase inicial em que a planta depende das reservas da semente para a produção dos órgãos que compõem a plântula e que após o desenvolvimento do sistema radicular e a emergência das folhas os processos anabólicos dependentes da fotossíntese traduzem-se por um rápido

crescimento atingindo o tamanho definitivo. Daí a planta inicia uma fase de senescência a qual reflecte-se inicialmente pela paralização da produção de matéria orgânica.

Os dados das (tabs 2 e 3-anexo A) mostram que os pesos secos totais máximos das plantas, foram alcançados na semana 27 e 33 para estufa e campo respectivamente. Não houve diferenças significativas entre os pesos secos totais das plantas ($T=3.27$, $P=0.056$).

As alturas das plantas no campo e na estufa foram máximas na semana 28 e 29 para estufa e campo respectivamente, embora seu padrão não tenha sido regular, houve em ambos os casos aumento durante o tempo. Os valores baixos das plantas não significam que o comprimento das plantas tenham reduzido mas que haviam divergências notáveis em relação às alturas das plantas. Tais divergências existiram também em relação aos pesos, tipo de folhas, caule principal, ramificações dos caules, flores, ou seja em todas as partes aéreas da planta (tabs. 2 e 3). Houve diferenças significativas entre as alturas no campo e na estufa ($T=-6.92$, $P=0.000$).

Os gráficos relativos aos aumentos de peso em função do tempo (taxa de crescimento absoluto) e taxas de crescimento relativo, foram feitos num programa instalado no computador o qual usa a seguinte equação para fazer os pontos relativos ao gráfico:

$$Y = \text{Start} * \exp(k * x)$$

Onde:

Y=ponto inicial que aumenta exponencialmente com a taxa constante K

Start= ponto inicial

X= tempo duplo=0.69/k

As figura 2 e 3 mostra a variação dos pesos frescos e seco da folha do campo e da estufa, em função do tempo. Nota-se que o máximo foi alcançado mais ou menos a mesma altura, para os dois locais, e que existiram diferenças significativas entre os pesos da folha nos dois locais ($T=4.41$, $P=0.0006$). Após a semana 16 as plantas foram perdendo suas folhas à medida em que preparavam-se para a fase da floração. Esta fase

é acompanhado por abscisão das folhas da base, muito notável nas plantas da estufa. Pode notar-se na mesma figura que o peso fresco reduz-se duma forma mais acentuada nas planta da estufa.

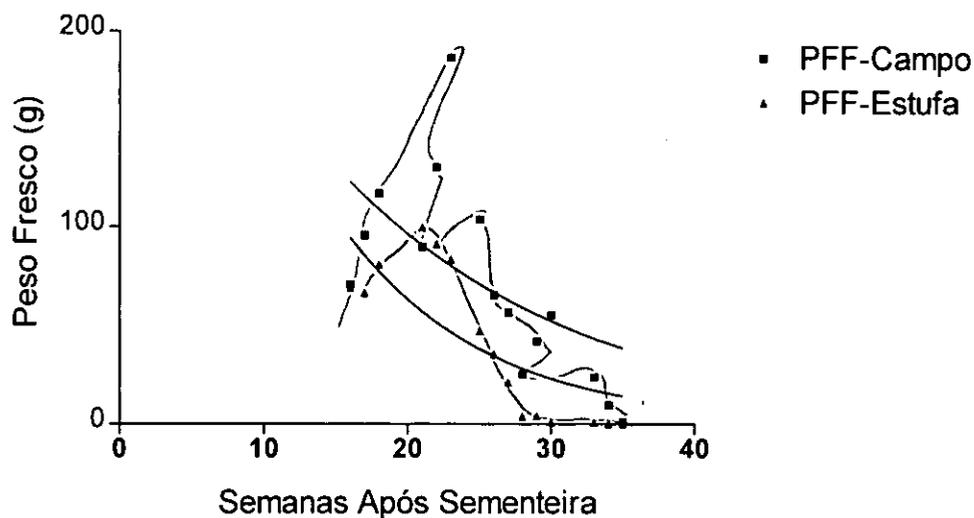


Figura 2. Peso Fresco da Folha de *Artemisia annua* no Campo e na Estufa.

Nos pesos secos (fig. 3), a redução é menos pronunciada, e as diferenças nos pesos secos foram significativas entre os dois locais ($T=4.01$, $P=0.0013$). É de referir que as folhas secas não foram incluídas neste trabalho, por encontrarem-se no chão e por vezes degradadas e misturadas entre as plantas no campo, dificultando a separação entre folhas de uma e de outra planta. Contudo isto pode ter influenciado negativamente nos pesos tanto fresco como seco, dando uma ideia de redução acentuada dos pesos.

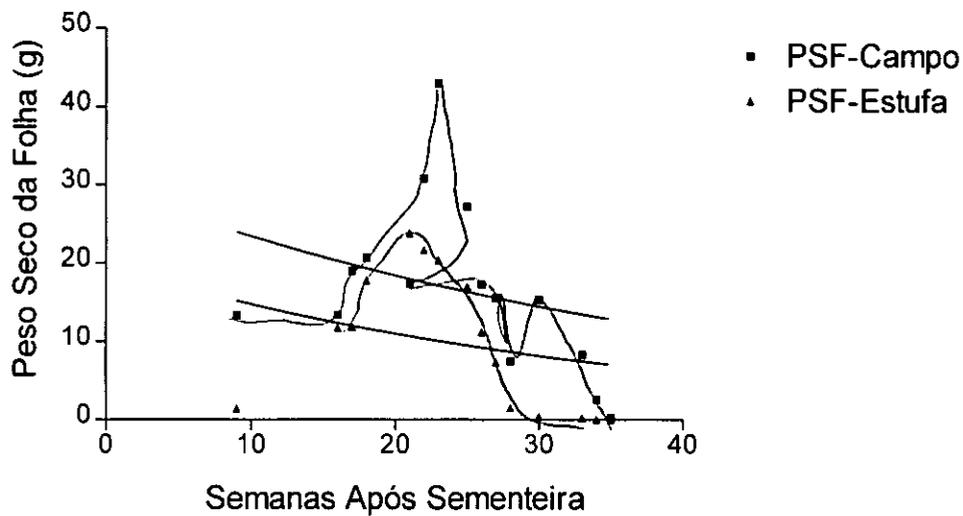


Figura 3. . Peso Seco da Folha de *Artemisia annua* no Campo e na Estufa.

Os pesos fresco e seco do caule do campo mostram um aumento exponencial em função do tempo, ao contrário dos do caule da estufa que se apresentaram relativamente constantes (fig.4 e 5). Houve uma coincidência nos pesos secos do campo e da estufa na semana 17. As plantas da estufa na fase preparatória para a floração e mesmo durante a floração, ao mesmo tempo que criavam as ramificações que suportariam as flores, o caule principal ia enfraquecendo.

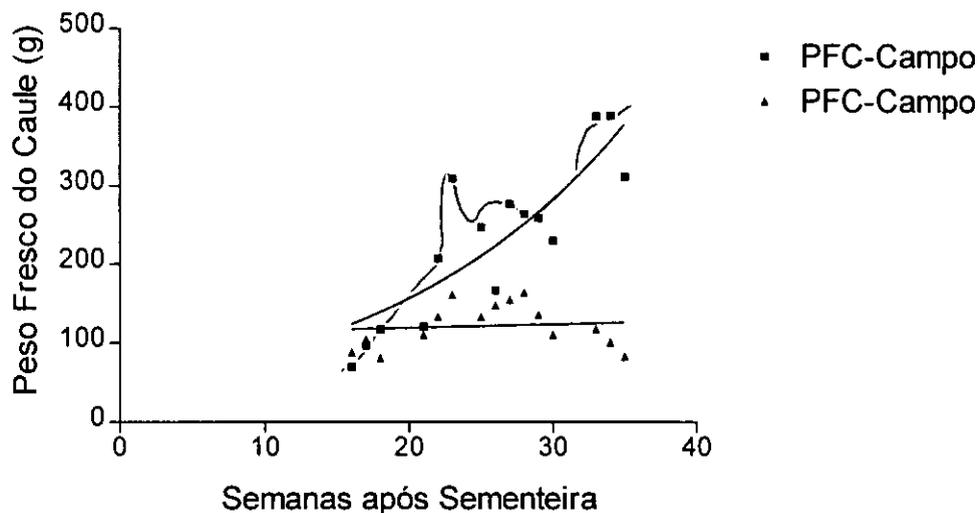


Figura 4. Peso Fresco da Caule de *Artemisia annua* no Campo e na Estufa.

No campo, o caule encontrava-se mais ramificado e mais lenhoso. Houve diferenças significativas nos pesos frescos dos caules entre os dois locais ($T=4.39$, 0.0006) e também nos pesos secos dos caules ($T=3.40$, $P=0.0043$).

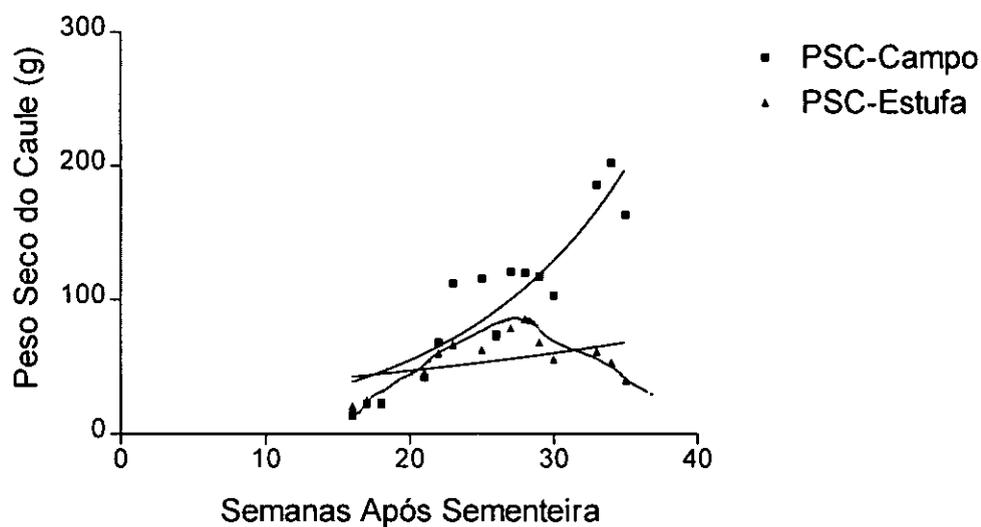


Figura 5. Peso Seco do Caule de *Artemisia annua* no campo e na Estufa.

Os pesos frescos das raízes (fig 6) do campo e da estufa, foram significativamente diferentes ($T=0.81$, $P=0.4336$), e os gráficos mostram uma contrariedade. Enquanto que as raízes da estufa tendiam a reduzir os pesos, as do campo continuavam a crescer. Contudo, houve uma coincidência dos pesos frescos na semana 23. Os pesos secos da raiz (fig.7), mantiveram-se constantes nas plantas da estufa, enquanto que as do campo mostraram um aumento acentuado. De novo nota-se uma coincidência dos pesos mas, desta vez na semana 21.

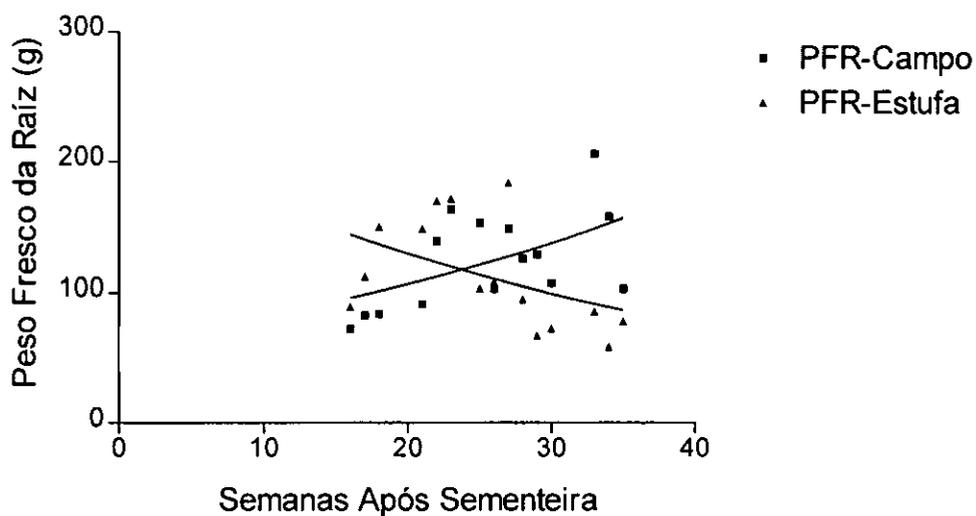


Figura 6. Peso Fresco da Raiz de *Artemisia annua* no Campo e na Estufa.

Isto pode ser devido ao facto de as raízes da estufa nas últimas colheitas terem-se encontrado muito fracas e em alguns casos até degradadas. As raízes do campo, embora tenham crescido mais, não foram totalmente resolvidas já que o espaçamento de 30 cm não foi suficiente.

↓
o que é isto?

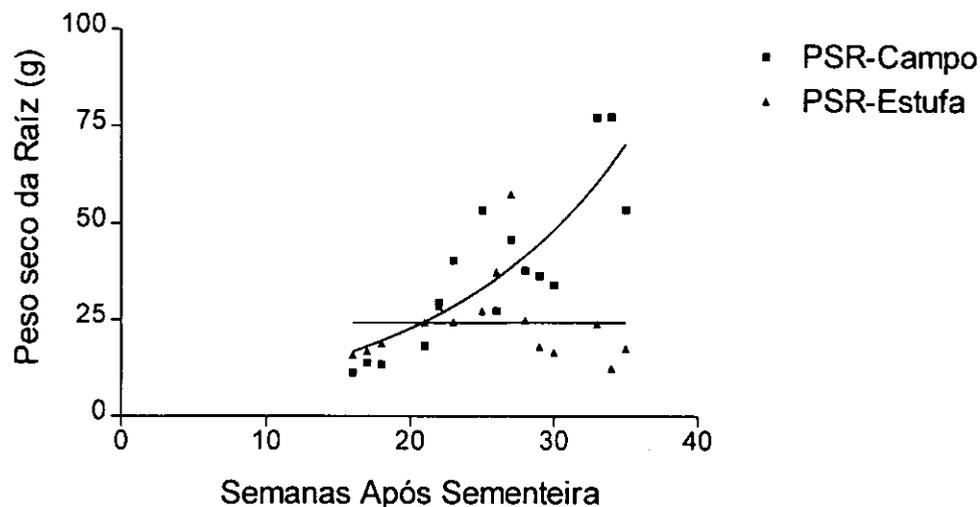


Figura 7. Peso Seco da Raiz de *Artemisia annua* no Campo e na estufa.

As raízes cresceram atingindo mais de 50 cm em comprimento, o que significa que em muitos casos não foi possível retirá-las completamente porque poderia correr-se o risco de misturá-las com as das plantas mais próximas. Nos pesos secos das raízes houve diferenças significativas ($T=2.27$, $P=0.0394$).

Nas figs 8 e 9 é mais notável o aumento no peso fresco e seco das flores no campo do que na estufa, e as diferenças foram significativas (pesos $T=3.15$, $P=0.0135$). As flores do campo foram mais ramificadas que as da estufa cujo crescimento foi mais dirigido para cima e com menos ramificações.

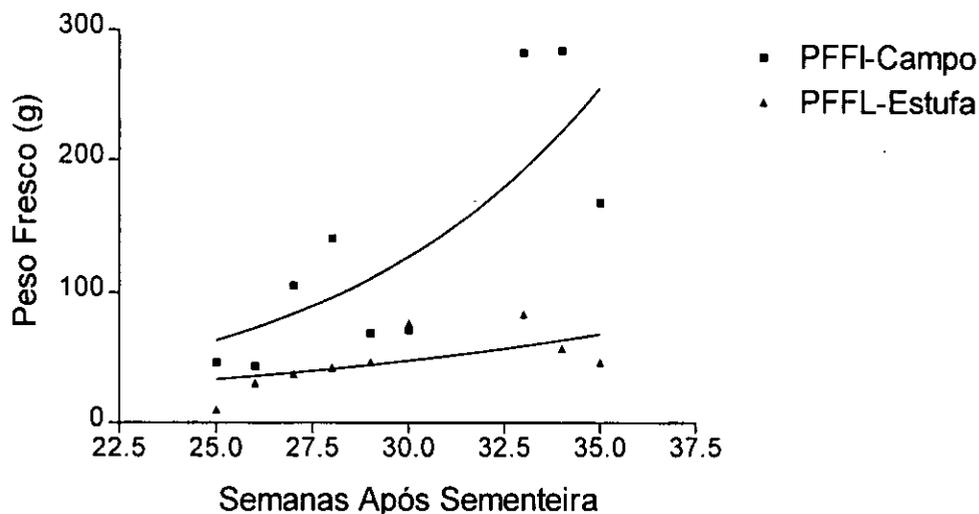


Figura 8. Peso Fresco das Flores de *Artemisia annua* no Campo e na Estufa.

que
 Nos secos das flores as diferenças também foram significativas ($T=2.73$, $P=0.0258$).

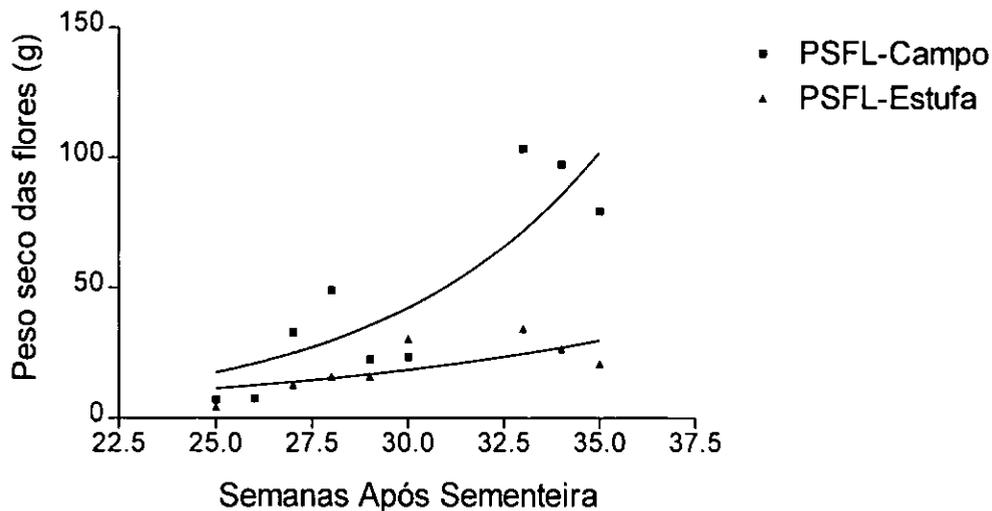


Figura 9. Peso Seco das Flores de *Artemisia annua* na estufa e no campo.

As fig10 e 11 mostram os pesos fresco e seco das plantas totais do campo e da estufa. Nota-se que de novo as plantas do campo mostraram um aumento mais acentuado do que as da estufa e as diferenças foram significativas apenas no peso fresco total ($T=3.78$,

P=0.0020). Os pesos elevados no campo são em grande parte influenciados pelo peso do caule principal que contribui muito para o peso total da parte aérea da planta.

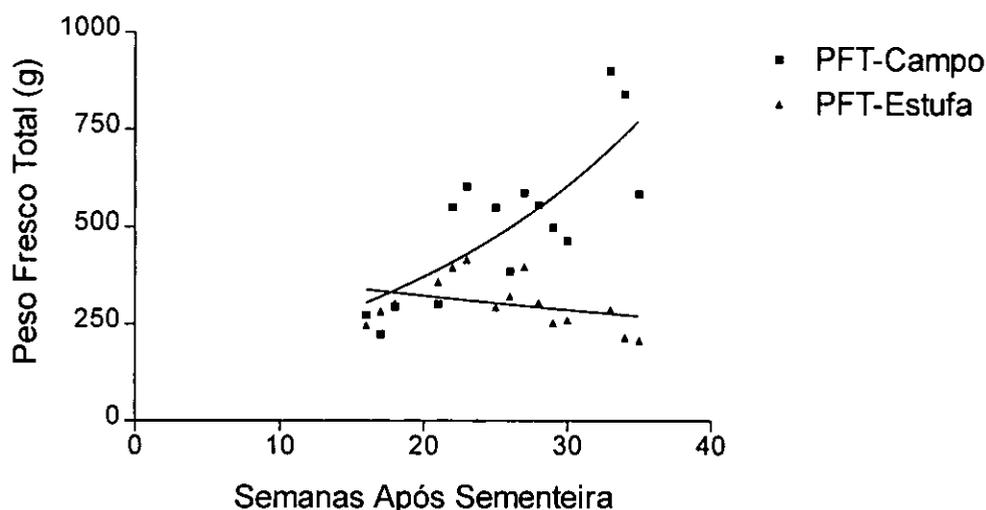


Figura 10. Peso Fresco Total de *Artemisia annua* no Campo e na Estufa.

As plantas tiveram muitas variações fenotípicas; desde folhas densas a muito esparsas, passando por caules que se apresentavam com diferentes colorações na fase da floração; Haviam caules verdes simples, verdes com riscos verticais cor de vinho claro, cor de vinho escuro e verde amarelado, estes últimos ^{cuja} as folhas possuíam na fase de pré-floração a mesma cor. Houve ainda plantas que possuíam caule principal relativamente grosso, outras tinham caules secundários muito abertos e longos o que resultava em pesos elevados do caule (tab.2 e 3). Plantas com caule múltiplo, ao contrário do normal (simples) não foram usadas na experiência para evitar maiores divergências nos seus pesos. Tais caules foram mais notáveis na estufa.

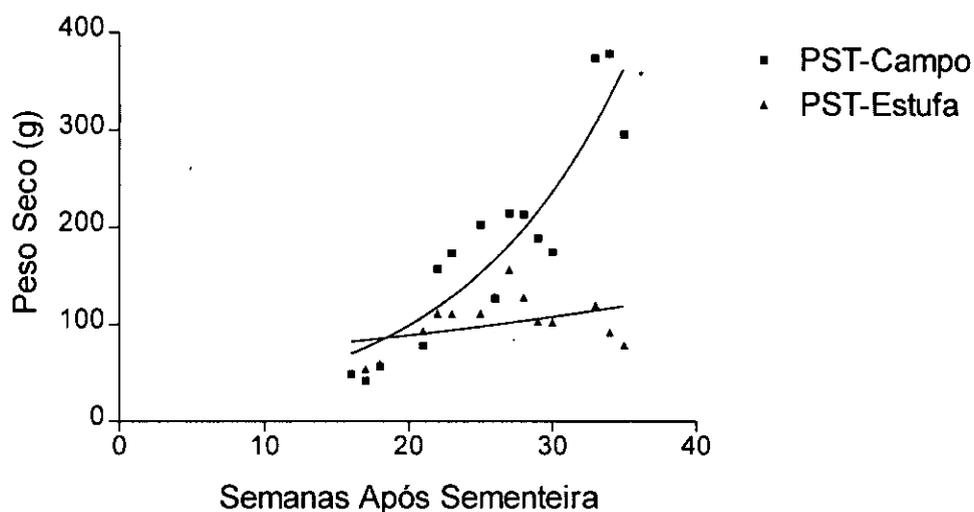


Figura 11. Peso Seco Total de *Artemisia annua* no Campo e na Estufa.

Este tipo de variação pode implicar a necessidade de selecção de estirpes cujas características impliquem maiores quantidades de folhas e consequentemente elevado conteúdo de artemisinina.

A área da folha (fig. 12) mostra um certo aumento em ambos os locais, embora mais pronunciado nas plantas do campo cerca de semana 22, enquanto que a das folhas da estufa atinge o máximo um pouco antes, aproximadamente na semana 21. As folhas da estufa chegaram mais cedo à fase da senescência e também possuíam relativamente menos ramificações. As diferenças foram significativas nas áreas dos dois locais ($T=5.31$, $P=0.0001$).

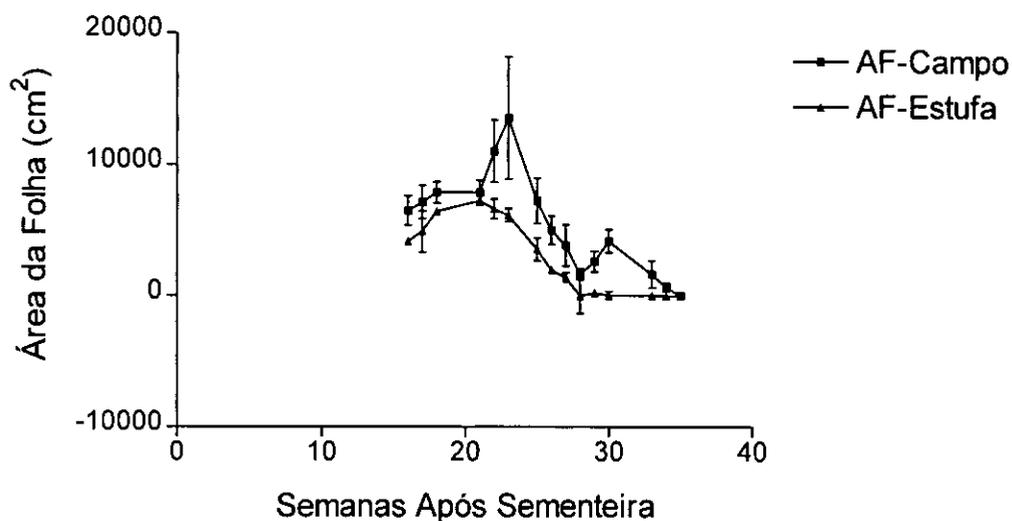


Figura 12. Área da Folha de *Artemisia annua* no campo e na Estufa.

De referir que a não inclusão das folhas secas na área foliar não teve nenhum efeito na área foliar pois esta era medida apenas para folhas frescas. As barras verticais no gráfico denotam os desvios padrão à média.

A razão do peso da folha (fig 13) foi calculada na base do peso seco das folhas e peso seco total. Nota-se que a razão é máxima cerca de semana 17 e 18 para campo e estufa respectivamente, e depois tende a diminuir em ambos os locais embora com alguns aumentos em ambos os casos. Houve uma certa coincidência entre as semanas 21-22. A razão do peso da folha reflecte a percentagem de folhas secas em relação ao peso total. As diferenças entre razões foram significativas ($T=2.73$, $P=0.0164$).

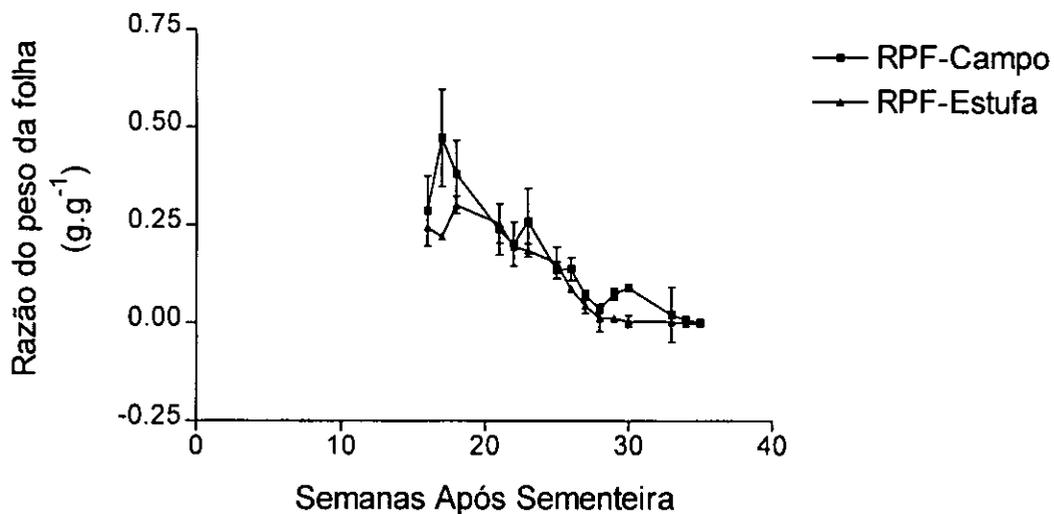


Figura 13. Razão do Peso da folha de *Artemisia annua* no campo e na estufa, calculada a base de pesos secos.

A razão do peso do caule (fig.14) mostra mais ou menos o mesmo padrão nos dois locais, embora as plantas do campo apresentassem valores ligeiramente altos.

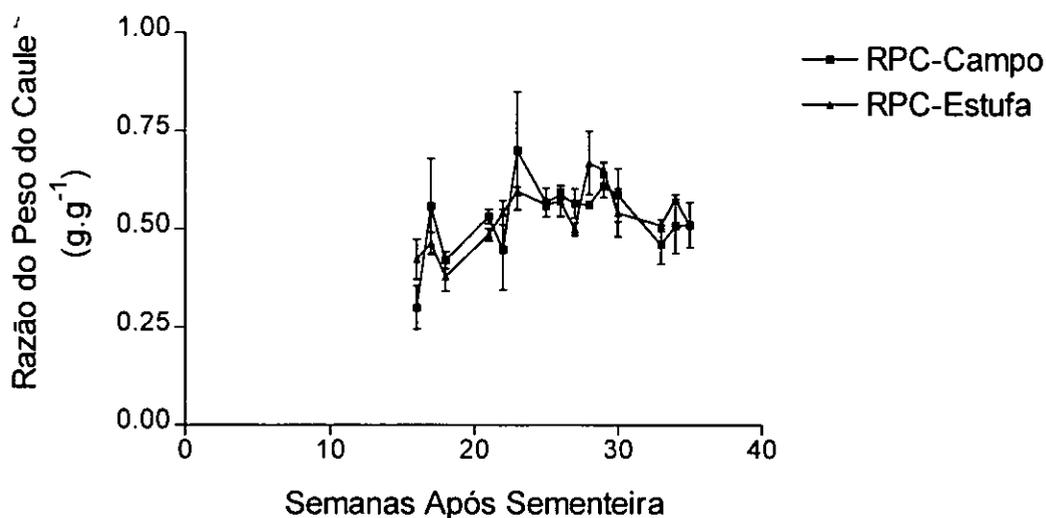


Figura 14. Razão do Peso do Caule de *Artemisia annua* no campo e na estufa, calculada na base dos pesos secos.

Os valores relativos à semana 23 mostram um aumento acentuado nos dois locais. As razões não foram significativamente diferentes entre os dois locais ($T=-0.23$, $P=0.8178$). As razões do peso da raiz (fig. 15) mostram um padrão mais ou menos semelhante, excepto que os valores relativos às plantas da estufa subiram cerca da semana 26. Nas razões dos pesos das raízes não houve diferenças significativas ($T=-1.34$, $P=0.2025$).

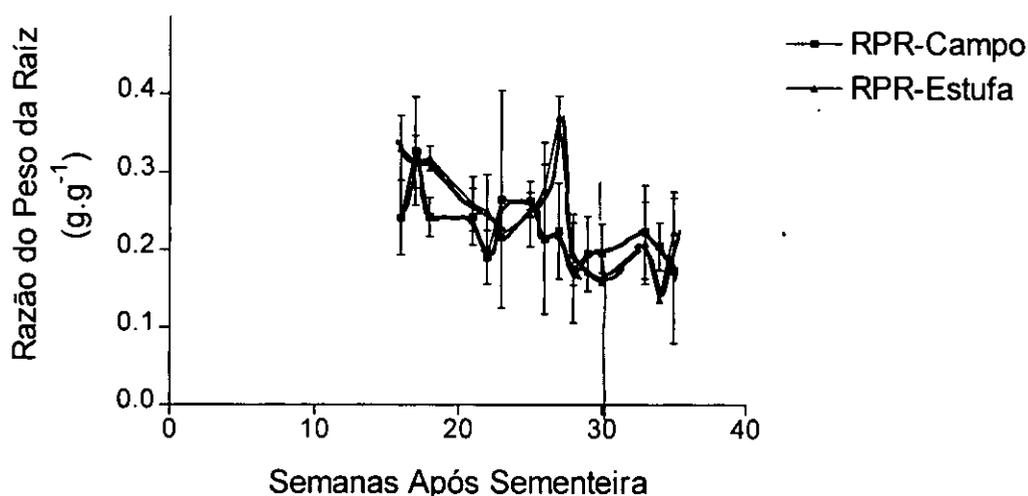


Figura 15. Razão do Peso da Raiz de *Artemisia annua* no campo e na estufa, calculada na base dos pesos secos.

Na figura 16, podem ser vistas as razões dos pesos das flores calculadas na base dos pesos secos. Os valores relativos à estufa são muito elevados em relação aos do campo já que a diferença entre o peso seco total e o peso seco das flores é elevada. As diferenças foram significativas entre os dois locais ($T=-3.64$, $P=0.0066$).

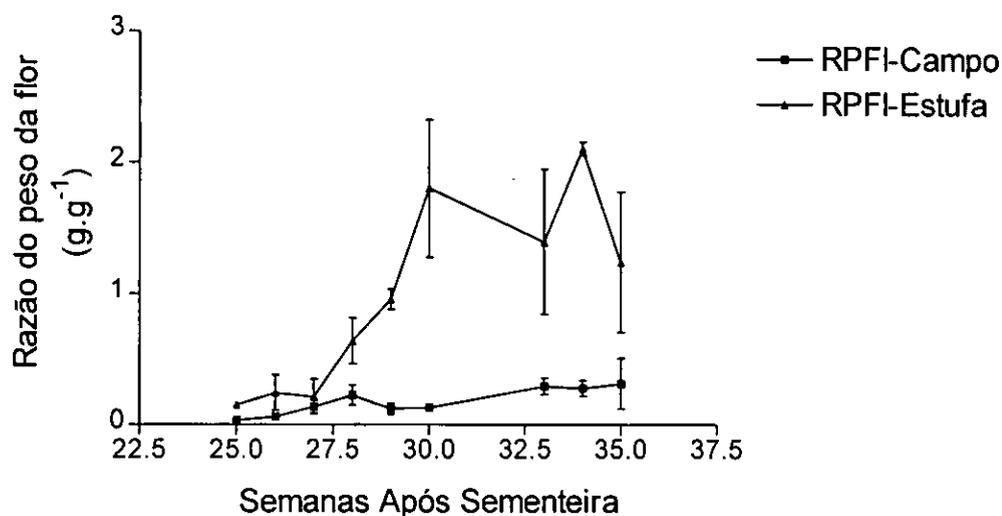


Figura 16. Razão do Peso da Flor de *Artemisia annua* no campo e na estufa, calculados na base dos pesos secos.

A razão do peso fresco para o peso seco das folhas (fig.17) tenderam a decrescer em ambos os casos entre cerca da semana 15 à semana 22, depois decresceram de 22 à 30, para voltar a subir em ambos os locais. A linha relativa à estufa ~~mo~~ termina na semana 33, quando as plantas da estufa já não possuíam folhas.

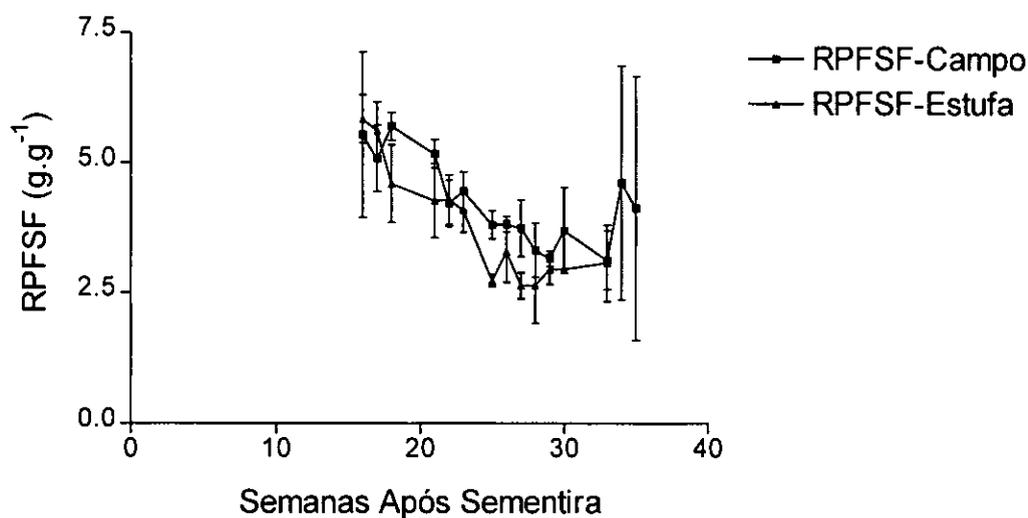


Figura 17. Razão do Peso Fresco em relação ao Peso Seco da Folha de *Artemisia annua* no campo e na estufa.

As plantas do campo mostram nessa altura um aumento já que as plantas do campo também iam perdendo mais folhas.

As taxas de crescimento relativo (TCR) das partes da planta e planta total estão indicadas na (tab.4). Os valores relativos à TCR das folhas foram negativas para ambos os locais mas, os dados referentes à TCR da estufa não convergentes para a equação acima referida, por isso não foram apresentadas curvas relativas às TCR das folhas. Contudo, foram encontradas diferenças significativas entre elas ($T=2.37$, $P=0.0355$).

Tabela 4: TCR das folhas, caules, raízes, flores, Planta total de *Artemisia annua*. Valores referentes a média \pm desvio padrão

		Taxa de Crescimento Relativo	Taxa de Crescimento relativo
	Semanas	Campo	Estufa
Folhas	16-35	-0.024 \pm 0.022	-0.029 \pm 0.030
Caules	16-35	0.085 \pm 0.013	0.025 \pm 0.012
Raízes	16-35	0.076 \pm 0.015	0.0002 \pm 0.021
Flores	16-35	0.176 \pm 0.045	0.095 \pm 0.040
Planta Total	16-35	0.087 \pm 0.013	0.012 \pm 0.013
Área da Folha	16-35	-0.066 \pm 0.026	-0.100 \pm 0.033

As TCR das folhas e da área foliar foram negativas em ambos os locais (tab.4). A mais alta TCR foi verificada nas flores seguida por caules.

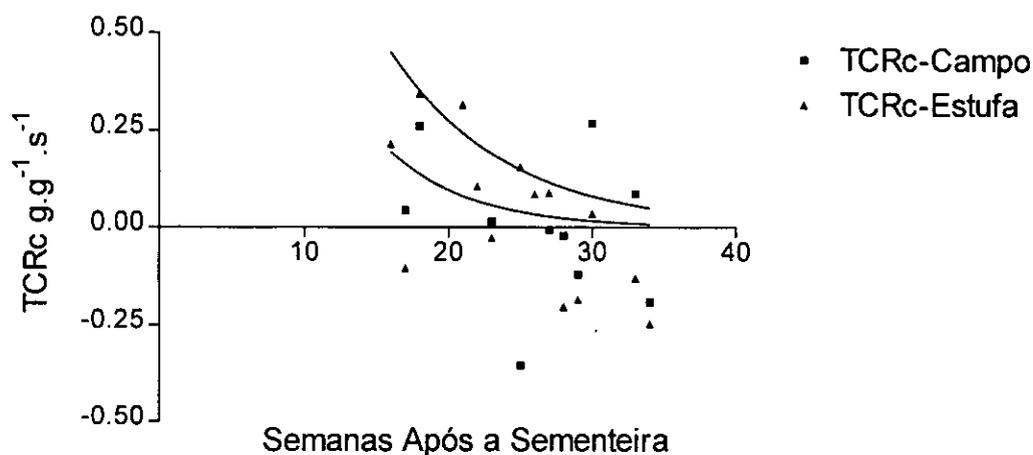


Figura 18. Taxa de Crescimento Relativo do Caule de *Artemisia annua* no campo e na estufa calculada na base do peso seco.

As figuras 18-21, mostram as TCR das partes da planta e plantas totais. Pode ver-se nestas figuras que a tendência foi de decrescimento, embora a tabela 4 mostre valores relativamente elevados para caules e flores. Nestas partes da planta o crescimento torna-se positivo à medida em que as plantas aproximam-se da fase de crescimento máximo.

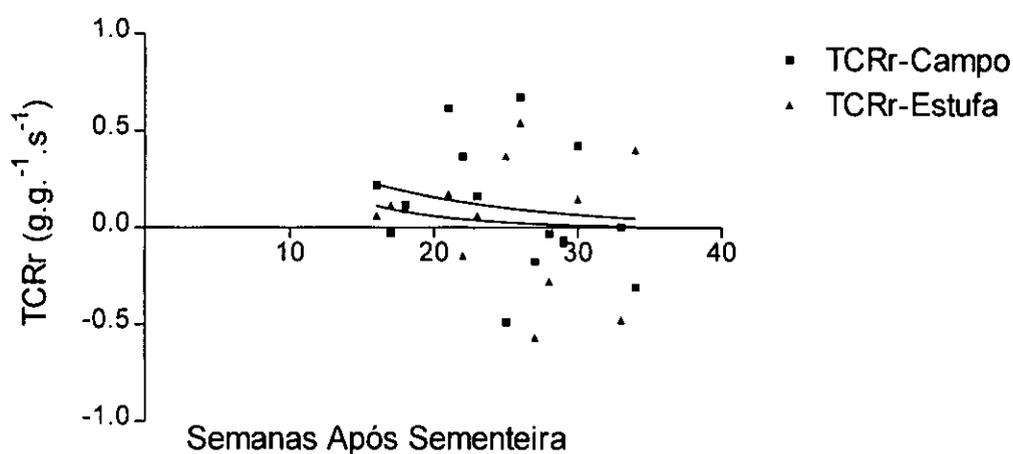


Figura 19. Taxa de Crescimento Relativo da Raiz de *Artemisia annua* no campo e estufa calculada na base do peso seco.

Estas taxas podem de certo modo terem contribuído para a TCR das plantas totais que é notavelmente mais elevada nas plantas do campo em relação às da estufa, embora

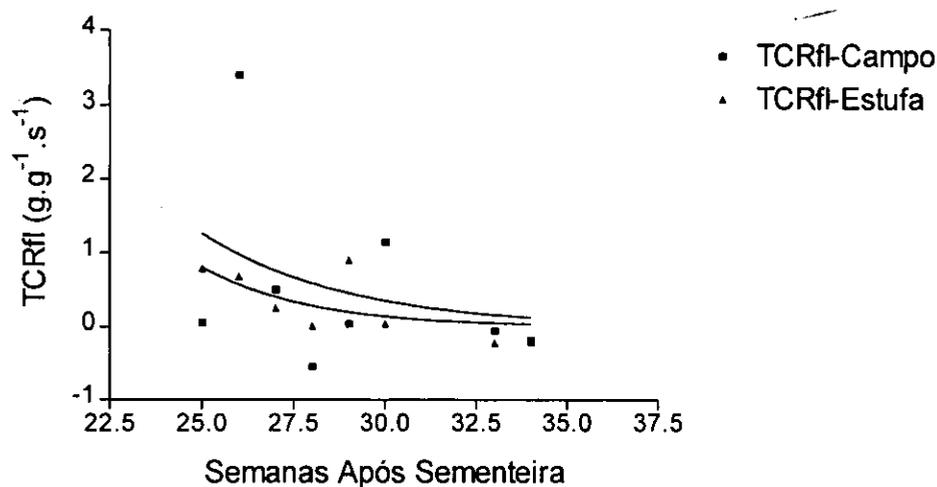


Figura 20. Taxa de Crescimento Relativo das Flores de *Artemisia annua* no campo e na estufa calculada na base do peso seco.

tenham todos uma tendência de diminuição. As diferenças entre as TCR dos caules entre estufa e campo não foram significativas ($T=1.98$, $P=0.0689$). Entre as TCR das raízes, as diferenças não foram significativas ($T=-0.24$, $P=0.8131$). Nas TCR das flores não foram significativamente diferentes ($T=0.64$, $P=0.5429$), nas plantas totais, também não houve diferenças significativas entre TCR ($T=1.30$, $P=0.240$).

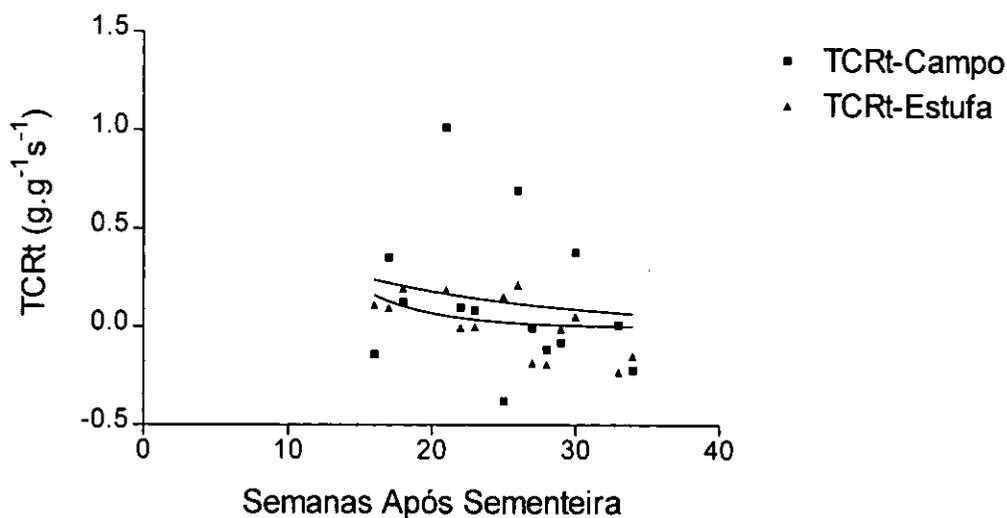


Figura 21. Taxa de Crescimento Relativo Total de *Artemisia annua* no campo e na estufa calculada na base do peso seco.

A taxa de assimilação aparente (fig.22) é mais ou menos contante para as plantas do campo mas, na estufa a taxa de assimilação aparente decresce. Não houve diferenças significativas entre as taxas de assimilação aparente ($T=1.24$, $P=0.24$).

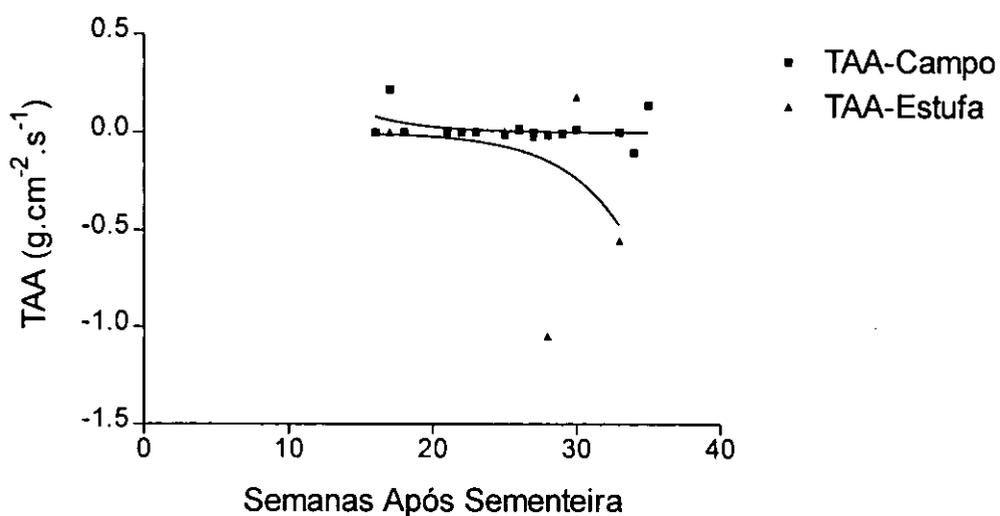


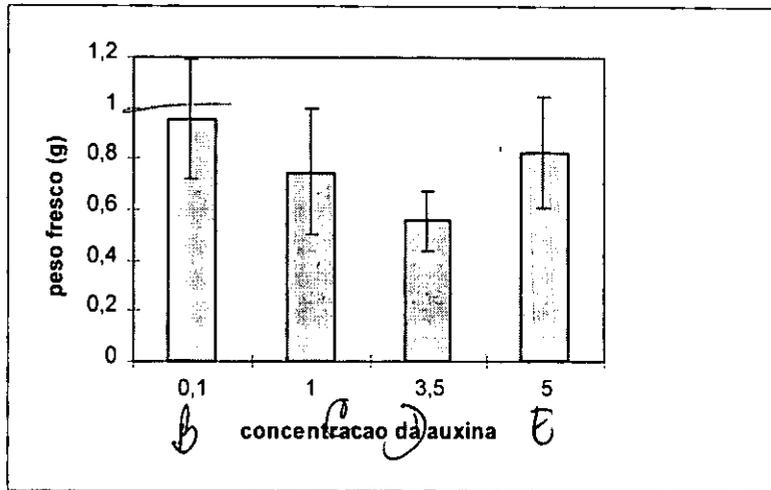
Figura 22. Taxa de Assimilação Aparente de *Artemisia annua* no campo e na estufa, calculada na base do peso seco.

Foram feitas algumas correlações simples, baseadas em Simane *et al.*, (1993) entre alguns parâmetros de crescimento no campo na estufa (tab.5 e 6-anexo A). As correlações entre a razão da área foliar (RAF) e seus componentes foram fracas (r=0.18415, P<0.05) para plantas do campo e (r=0.38692, P<0.05) para plantas da estufa, embora a correlação entre RAF e a área foliar específica (AFE) seja boa nas plantas do campo (r=0.56284, P<0.05). As correlações entre a área da folhas e a área foliar específica foi significativa apenas nas plantas do campo (r=0.83072, P<0.05). Pode ver-se ainda na mesma tabela que as correlações entre a TCR e suas componentes (RAF e TAA) é muito forte em ambos os locais. A correlação entre a TCR e a TCA da folha foram significativas nas plantas da estufa, ao contrário das plantas do campo.

Foi notável o aparecimento do vírus do mosaico nas plantas durante a fase vegetativa, num total de 8 plantas no campo e uma na estufa, não obstante nenhuma literatura referir tal acontecimento.

8.1.2. Culturas *in vitro*

Nos meios B(0.1), C(1.0), D(3.5) e E(5.0) de calos obtidos de explantes de folhas, foi notável a presença de raízes as quais se apresentavam relativamente compridas no meio C e muito curtas no meio E. Os meio B e C tiveram raízes compridas mas as do meio B eram relativamente curtas. Da mesma forma, os meios D e E tiveram raízes curtas mas, as do meio D eram menos curtas (fig. 23 e 24).



No

Figura 23: peso ^{fresco} seco médio dos calos obtidos a partir de explantes de caules, após 60 dias. *No data treatment!*

As (figs.23 e 24), mostram os pesos fresco e seco médios dos calos obtidos a partir de explantes de caule, onde pode ver-se que o meio B teve relativamente os maiores pesos médios, seguido pelos meios C e E. O meio com o mais baixo peso médio foi o meio D,

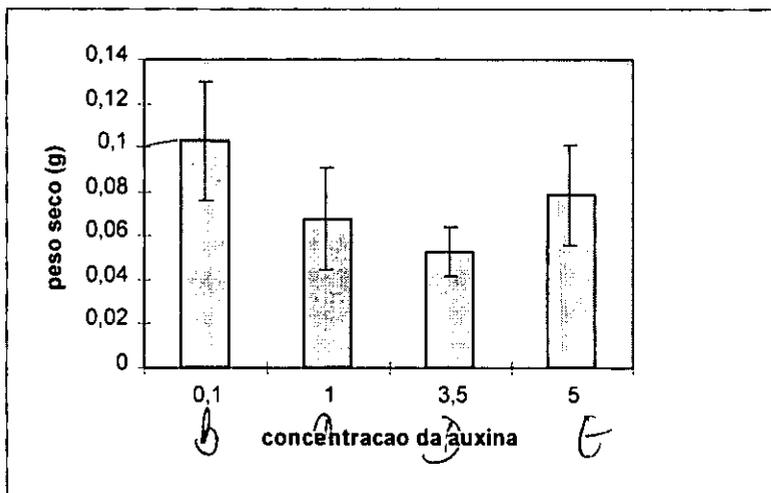


Figura 24: Peso seco médio dos calos obtidos a partir de explantes de caules, após 60 dias.

tanto em pesos frescos como em pesos secos. Os calos obtidos a partir de explantes de caules eram mais fráveis e o seu aparecimento era observado entre 4-6 dias. Nos pesos frescos dos calos houve diferenças significativas (Kruskal-Wallis, $F=33.04$, $P=0.000$). Igualmente foram significativas as diferenças encontradas nos pesos secos dos calos ($F=44.16$, $P=0.000$).

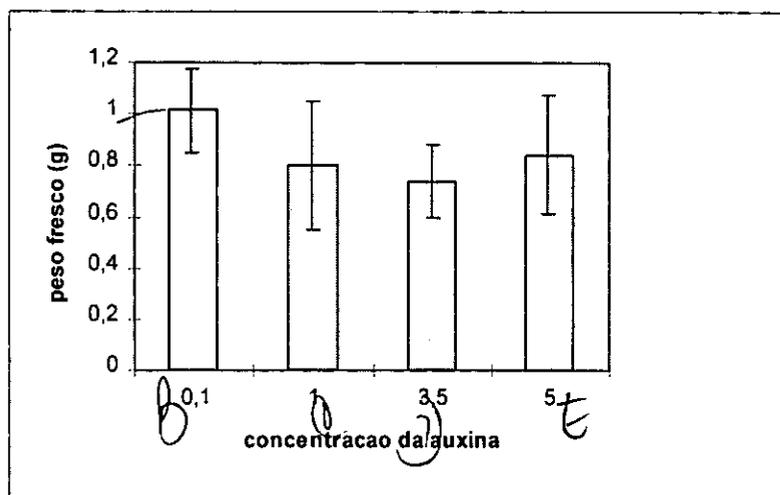


Figura 25: Peso fresco médio dos calos obtidos a partir de explantes de folhas, após 60 dias em condições de escuro.

Nos pesos fresco e seco do calos obtidos a partir de explantes de folhas no escuro, (figs.8.1.2.c, d), pode ver-se que os pesos dos meios B e E não diferem muito, e entre os meios C e D também não mostraram diferenças, embora o teste feito para os calos indique diferenças significativas entre os pesos frescos no escuro ($F=17.35$, $P=0.000$).

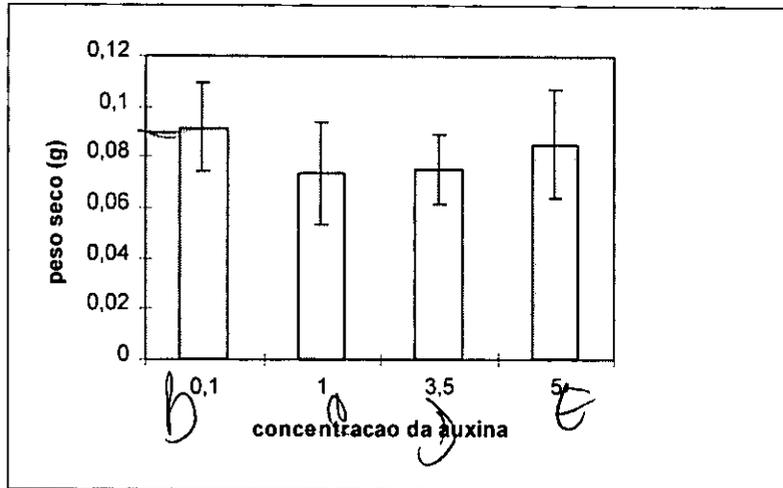


Figura 26: Pesos secos médios de calos obtidos a partir de explantes de folhas, após 60 dias em condições de escuro

Nos pesos secos dos calos no escuro existiram também diferenças significativas ($F=9.52$, $P=0.000$).

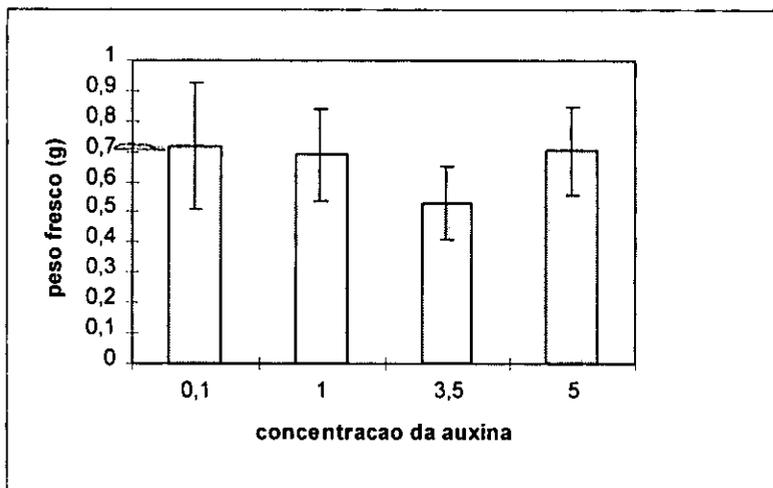


Figura 27: pesos frescos médios de calos obtidos a partir de explantes de folhas, após 60 dias em condições de luz

As figuras 27 e 28, mostram os pesos fresco e seco dos calos obtidos a partir de explantes de folhas em condições de luz. Embora ligeiramente baixos os pesos fresco e seco destes calos quando comparados com os que cresceram no escuro, a tendência nos pesos médios é mais ou menos a mesma, onde os meios B e E voltaram a ter os pesos mais elevados.

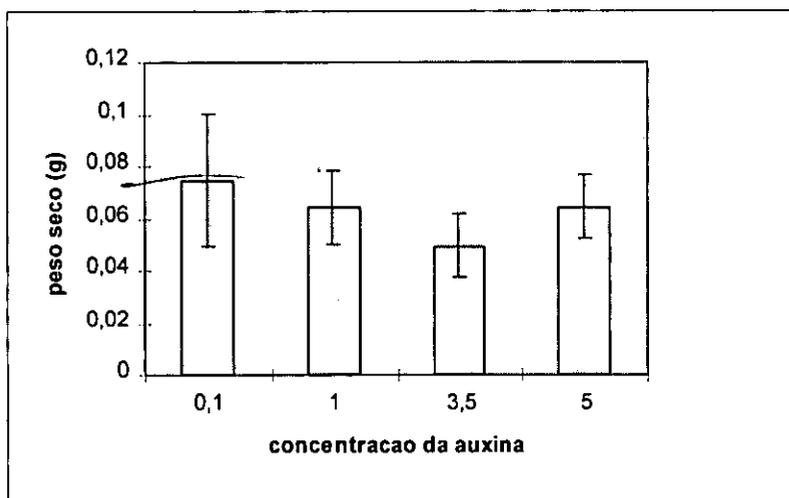


Figura 28: pesos secos médios obtidos a partir de explantes de folhas, após 60 dias em condições de luz.

✗ Tal como nos calos crescendo ~~no~~ no escuro as diferenças foram significativas tanto entre os pesos frescos ($F=15.08$, $P=0.000$), como nos pesos secos dos calos ($F=16.69$, $P=0.000$). Os calos obtidos a partir de explantes de folhas, eram pouco friáveis, e apareciam mais tarde, entre os 6-8 dias.

8.2. Conteúdo de artemisinina

8.2.1. Campo

Não foi possível quantificar o conteúdo de artemisinina relativa à experiência do campo, mas o composto caracterizado por (Pras *et al.*, 1990) como sendo vermelho púrpuro a luz

do dia e laranja fluorescente a luz uv a 366nm foi observado com maior incidência nas folhas, ausente nas raízes, pouco presente no caule e nas flores (tabs. 7e 8). Pode ser visto na mesma tabela que o conteúdo de artemisinina foi diminuindo com a passagem da fase vegetativa para a fase da floração e que cessa mais cedo nas plantas da estufa. O conteúdo de artemisinina tem sido estimado com base em cálculos envolvendo o peso seco, porém isto também não foi possível já que os cristais obtidos eram bastante pequenos e poucos. As balanças disponíveis não eram sensíveis para tais quantidades.

Tabela 7: Conteúdo de artemisinina no campo

Semanas	Fase	Conteúdo de artemisinina			
		Folhas	Caules	Raízes	Flores
16	Vegetativa	++++	++	-	
17	Vegetativa	+++	+	-	
18	Floração	++	-	-	++
21	Floração	+	-	-	+++
30	Floração	-			-

++++ presença muito notável de artemisinina

-denota ausência de artemisinina

Tabela 8: Conteúdo de artemisinina na estufa

Semana	Fase	Conteúdo de artemisinina			
		Folhas	Caules	Raízes	Flores
16	Vegetativa	+++ ⊖	++ =	-	
17	Vegetativa	++ ⊖	+ =	-	
18	Floração	- ⊖	-	-	++ ⊖
21	Floração	- ⊖	-	-	+ ⊖
25	Floração				-

++- presença notável de artemisinina

- denota ausência de artemisinina

8.2.2. Culturas *in vitro*

Nos calos tanto os obtidos a partir de explantes de folhas como os dos caules, não foi detectada nenhuma artemisinina, embora calos crescendo sob condições de luz tenham e obtidos a partir de explantes da folha tenham tido uma coloração esverdeada, ao contrário dos calos obtidos de caule que eram esbranquiçados.

9. Discussão dos resultados

9.1. Campo

De acordo com os pesos frescos e secos das partes da planta (fig.2-9) e das plantas totais (fig.10 e 11) os pesos absolutos foram mais elevados no campo do que na estufa o que pode ser devido ao crescimento em altura que foi mais predominante nas plantas da estufa. Estas plantas tiveram menos ramificações e um caule que foi enfraquecendo com a chegada da fase da floração, factores que terão contribuído provavelmente para os baixos pesos relativos desse caule e consequentemente do peso total, já que este influencia muito o peso da parte aérea da planta (Woerdenbag, *et al.*, 1991). As raízes não tiveram espaço suficiente para o seu crescimento na estufa. Elas cresciam em forma de rede e cobriam quase toda a superfície interna dos vasos após furarem os sacos plásticos que serviam para manter a humidade dentro dos vasos. Nas plantas do campo as raízes também não foram totalmente resolvidas em termos de colheita já que o espaçamento de 30 cm não foi suficiente para separar as raízes de uma planta em relação às das outras mais próximas. Maior espaçamento teria provavelmente resultado em pesos ligeiramente aumentados e possivelmente maior crescimento nas plantas da estufa.

Os pesos secos totais médios máximos obtidos foram de 156g e 374g nas semanas 27 e 39 respectivamente para estufa e campo (ver tabs.2 e 3). Woerdenbag *et al.* (1993) estudando artemisinina e outros sesquiterpenos no Vietnã conseguiram um máximo de 21.1g de peso seco total médio que coincidiu com o quinto mês após a sementeira. Pras *et al.* (1990) obtiveram pesos frescos diferentes em plantas cultivadas na mesma época e em dois locais diferentes, (Groningen e Wageningen, na Holanda), e obtidas a partir das

mesmas sementes. Esses pesos foram de 100-200g para as plantas de Groningen e 1000-2000g para as plantas de Wageningen. Segundo estes autores embora as razões não fossem claras, provávelmente as diferenças encontradas se devessem à diferenças no solo e condições ambientais. No presente estudo os pesos frescos de plantas individuais das plantas variaram entre 250-470g na estufa e, no campo a maioria das plantas variou entre 250-900g, tendo havido três plantas nas quais os pesos frescos oscilaram entre 1195-1285g. Isto mostra a necessidade de selecção de plantas cujas características impliquem maior rendimento da folha e consequentemente maior conteúdo de artemisinina. Tais plantas, posteriormente seriam cultivadas em condições *in vitro*, de modo a proceder-se à sua multiplicação após o que seriam colocadas em condições próprias de estufa para a sua aclima^{ta}ção e finalmente distribuídas no campo com espaçamentos adequados.

As alturas das plantas do campo/ e da estufa (tabs.2 e 3) ultrapassaram o intervalo referido por Gulati *et al.*(1996),), segundo o qual, a altura de *A. annua* varia entre 50-150 cm e que pode atingir os 2 metros. As plantas obtidas neste estudo tiveram alturas que, podem ser enquadradas neste intervalo, mas também ultrapassaram-no. Elas podem ser comparadas às das plantas obtidas por Woerdenbag *et al.* (1991), embora não tenham sido aumentos graduais como acontece naquele estudo. Porém Fulzele *et al.* (1995) constataram num estudo com plantas obtidas de 5 origens diferentes que haviam variações na altura das plantas. As plantas de origem Europeia possuíam 30cm de altura, aos 20 dias as de Hoechst (India), 60 cm aos 25 dias e as restantes três (Mexicana, Washington e Lucknow) tinham alturas que variaram de 60-90 cm após 45 dias. Estas diferenças nas alturas mostram que a origem das plantas pode ser um factor importante a ter em conta na selecção de plantas cuja origem seja reconhecida como produtora de relativamente maiores quantidades de artemisinina como é o caso de plantas de origem Chinesa.

Os pesos aumentados das flores no campo podem ser explicados pelo facto de as plantas destas plantas terem tido mais ramificações do que as da estufa as quais tiveram um crescimento mais dirigido para a altura e com menos ramificações.

A heterogeneidade acima referida em relação aos pesos e alturas das plantas (tabs. 2 e 3-anexo), poderá possivelmente estar ligada ao facto de as sementes usadas serem uma segunda geração filial (F2), ou ainda pelo facto de as plantas terem sido obtidas de sementes, já que Elhag *et al.* (1991), após estudos feitos com esta planta concluíram que populações obtidas a partir de sementes, são caracterizadas por variações morfológicas na altura das plantas, biomassa da folha e datas da floração o que resulta segundo os mesmos autores em quantidades baixas e variáveis dos constituintes activos.

As percentagens de folhas aqui obtidas foram mais elevadas em relação àquelas alcançadas por Woerdenbag *et al.* (1993). Estes autores conseguiram, muito antes da floração um máximo de 26.9% no quinto mês. No início da amostragem as plantas já tinham iniciado o processo da abscisão das folhas mais notável nas plantas da estufa como já foi referido, o que significa que estes valores poderiam provavelmente aumentar ligeiramente caso a amostragem tivesse começado mais cedo. A razão do peso da folha exprime a porção do peso da planta dedicada ao material da folha e é uma reflexão da habilidade da planta para manter o seu padrão normal de desenvolvimento (Fitter e Hay, 1981).

Neste estudo, as flores começaram a aparecer a partir do terceiro mês, tendo havido plantas cuja floração só teve início no quinto mês. Dados neste aspecto são muito contraditórios. Fulzele, *et al.* (1995) usaram sementes de várias origens (Europeia, Hoechst, Lucknow, Mexicana e Washington) e constataram que a floração varia muito dependendo da origem das sementes. As plantas de origem Europeia foram as primeira a florir, com 20 dias após a sementeira, as de Hoechst (Índia), floriram aos 25 dias e nas restantes as flores só apareceram após os 45 dias. Porém Woerdenbag *et al.* (1993), no Vietnam, conseguiram flores só a partir do nono mês. Estas variações na floração de *A. annua* podem ser devidas provavelmente à diferenças nas condições climáticas (Sing *et al.* 1988), já que segundo Noggle e Fritz, (1983). a floração está relacionada com o comprimento do dia. Além disso, Elhag *et al.* (1991) já haviam constatado que existiam diferenças nas datas de floração, para plantas obtidas através de sementes.

A diminuição verificada nas taxas de crescimento relativo das partes da planta e plantas podem ser devidas à iniciação tardia da amostragem, embora no que respeita à folha, Larcher, (1995) considere que a taxa de crescimento da folha seja reduzida em grande parte pelo aumento do défice da água e particularmente pela deficiência em nutrientes. O mesmo autor considera ainda que a diminuição na produção da planta é devida em grande parte ao crescimento inadequado da folha.

→ leva à redução de nutrientes e água

As taxas de crescimento relativo foram diferentes para as várias partes da planta, o que pode ser justificado pelo facto de as partes da planta não estarem envolvidas de forma igual na síntese de novas substâncias já que alguns materiais são catabolizados ou armazenados (Noggle e Fritz, 1983).

As taxas de assimilação aparente mostraram -se constantes no campo e decrescentes na estufa, provavelmente devido à amostragem tardia, já que Larcher, (1995) considera que a taxa de assimilação aparente é especialmente elevada durante a fase de crescimento intensivo. A taxa de assimilação líquida é uma medida do produto da fotossíntese tomado na planta, isto é, estima a fotossíntese líquida, carbono assimilado menos carbono perdido pela respiração (Noggle e Fritz, 1983).

A planta quando colhida fresca e posta a secar na sala à uma temperatura de aproximadamente 24-26 °C, pareceu possuir propriedades insecticidas e provocava a morte em massa de formigas que pareciam eram atraídas pelo aroma das folhas e flores. Neste contexto também não foi encontrada nenhuma literatura que tratasse do assunto. Foi notável o aparecimento do vírus do mosaico nas plantas durante a fase vegetativa, num total de 8 plantas no campo e uma na estufa, não obstante nenhuma literatura referir tal acontecimento.

A planta parece ser muito susceptível à seca e à temperaturas elevadas durante a fase vegetativa. Nas plantas tanto da estufa como do campo, as plantas murchavam intensamente nos dias de muito calor embora recuperassem após uma rega com quantidade suficiente de água.

Nas folhas têm influência a seca e temperatura?

Não foi possível fazer comparações entre as sementes provenientes dos diferentes países porque as quantidades obtidas eram muito baixas e na fase inicial ter havido muita contaminação (culturas *in vitro*) e pelo facto de não terem germinado no campo provavelmente devido à dormência, embora tratamentos tenham sido feitas para quebrá-la. Nesta experiência apenas sementes obtidas da Tanzania foram usadas tanto para as experiências de campo como as de *in vitro*.

9.2. Culturas *in vitro*

Os pesos fresco e seco dos calos obtidos a partir de explantes de caules apresentados nas figura 23-28, mostram que o meio B foi o que teve relativamente maiores pesos médios. O aumento de pesos frescos nos meios de estabelecimento em relação ao meio A foi de 2.3, 1.8, 1.3 e 2.0 vezes respectivamente para os meios B, C, D e E de calos obtidos a partir de explantes de caules. Para calos em condições de luz os pesos frescos aumentaram 2.6, 2.6, 2.0 e 2.7 vezes. Os que cresceram em condições de escuro tiveram um aumento de 3.9, 3.1, 2.9 e 3.2, Tawfiq *et al.* (1989) obtiveram um aumento de 1.2 e 1.13 do meio idêntico ao meio A, mas em termos de pesos secos. Neste estudo a comparação foi feita em relação aos pesos frescos porque os calos do meio A foram todos tranferidos frescos para os meios de estabelecimento. Como pode ser visto nas figuras relativas aos pesos médios dos calos, a concentração da 2.4-D parece ter pouco efeito nos peso dos calos. Outros factores poderão ter afectado os resultados. Tais factores podem ser o ambiente de cultura, luz, concentração de dióxido de carbono no meio de cultura temperatura (Debergh e Read, 1991), já que um dos requisitos para uma sala de cultura é o controlo do clima.

Segundo Mantell, *et al.*, (1985), uma taxa elevada da auxina para a citocinina, favorece a formação de raízes. Este resultado foi constatado neste trabalho mas, a formação das raízes não foi proporcional à concentração da auxina. As raízes mais compridas foram verificadas nos meios B e C, as mais curtas nos meios D e E, em meios crescendo sob condições de luz. Os calos crescendo no escuro tiveram valores relativamente elevados em relação aos que cresceram em condições de luz, embora Dodds e Roberts, (1995)

tenham sugerido que para calos crescendo no escuro, seja benéfico introduzir um pouco de luz.

O ambiente de cultura tem influência na micropropagação (Debergh e Read, 1991). Os vasos em foram cultivados os calos, eram do tipo plástico e fechados com as respectivas tampas, depois com parafilm. Estes vasos transpiravam e por vezes deixavam cair algumas gotas de água o que possivelmente diminuía o contacto entre os calos e o meio de cultura, e provavelmente aumentava a susceptibilidade do para a contaminação, como considerado por Bhojwani e Razdan, (1983). Além disso em vasos hermeticamente fechados De Proft *et al.* (1985) citado por Debergh e Read, (1991) constatou a existência de concentrações supra-óptimas de etileno no meio contendo sacarose que tem efeitos adversos na micropropagação

9.3. Extracção de artemisinina

9.3. a) no campo

As tabelas 7 e 8 mostram que a mais elevada quantidade de artemisinina foi obtida no campo e com maior incidência nas folhas, resultado que concorda com Lampasona *et al.* (1990); Woerdenbag *et al.* (1991); Bharel *et al.* (1996); Gulati, *et al.*, (1996), seguidas por flores. Duke *et al.* (1987) citado por Gedre *et al.* (1997) concluiu que artemisinina é sequestrada nos tricomas glandulares de folhas e flores de *A. annua*, que são ricas em artemisinina e óleos valiosos, já estas partes da planta, são ricas em tricomas glandulares.

Os caules possuíam quantidades bastante reduzidas de artemisinina, o que está de acordo com Woerdenbag *et al.* (1991), embora, contrariamente a este estudo, percentagens mais elevadas nesta parte da planta tenham sido encontradas na fase da floração. Segundo estes autores o peso do caule influencia negativamente no conteúdo de artemisinina já que este é estimado na base de peso seco total da planta. Os mesmos autores encontraram mais artemisinina em pequenos ramos verdes, folhas e botões mas

neste caso este composto foi observado com maior incidência apenas nas folhas, antes da floração (tabelas 7 e 8).

O facto de não ter sido obtida nenhuma artemisinina nas raízes, concorda com Charles e Simon, (1990); Lampasona *et al.* (1990) e Gulati *et al.* (1996). Segundo Martinez *et al.* (1988); Fulzele *et al.* (1991), citados por Jaziri *et al.* (1996) a ausência de artemisinina nas raízes pode indicar provávelmente que este composto esteja restrito a apenas partes verdes da planta. os resultados de

As tabelas 7 e 8 mostram que na fase da floração as flores produziram mais artemisinina em relação às folhas, (campo), mas na estufa já não era detectada artemisinina nas folhas na fase de floração completa (semana 21). Estes dados estão de acordo com Ferreira *et al.* (1995) citado por Geldre *et al.* (1997) que considerou que artemisinina é mais elevada nas flores que nas folhas durante a fase de floração completa.

O método usado para a extracção (Cromatografia de Camada Fina), é considerado por Denys e Simon, (1990) como fraco para detectar moléculas intactas devido a interferência de outros constituintes da planta e portanto, não prático. Contudo, Pras *et al.* (1990), compararam este método com a Cromatografia Líquida de Elevada Definição conhecido por (HPLC) e concluíram que com este método é possível obter percentagens de artemisinina relativas à planta. Neste estudo houve falta de alguns compostos químicos relacionados com o processo de purificação do extracto, uma fase que precede a separação cromatográfica, e que é importante porque diminui a interferência dos outros compostos da planta. Tal falta pode ter interferido nos resultados da detecção da artemisinina. Com todo o material completo provávelmente teria sido detectado mais artemisinina.

9.3. b) nas culturas *in vitro*

Nos calos tanto os obtidos a partir de explantes de folhas como os de caules não foi obtida artemisinina. Isto pode ser devido ao facto da biossíntese de artemisinina estar correlacionada com a diferenciação e/ou a organização intracelular (Jaziri *et al.*, 1996).

mas, Woerdenbag *et al.* (1992), observaram traços de artemisinina na cultura de suspensão de células, o que explica segundo eles que as células indiferenciadas são em princípio capazes de produzir este composto. Contudo, devido a alta actividade peroxidase intracelular, artemisinina é provávelmente atacada pelas peroxidases logo que é sintetizada.

Para a obtenção de artemisinina nas culturas *in vitro* de *Artemisia annua* Jaziri *et al.* (1996) sugere a necessidade de diferenciação em brotos ou preferivelmente em brotos com raízes.

Pode-se considerar que este estudo, apesar de incompleto, servirá de algum modo para mostrar que a planta embora nativa da Eurasia, desenvolve-se bem nos trópicos, onde a malária é um problema sério. A diferença de comprimento do dia entre esta região e as regiões da estepe não implicou menos biomassa antes da floração como previsto por (Janick, 1995; Anderson, 1996), mas provávelmente haverá alterações nas fases em que a planta produz o conteúdo máximo de artemisinina.

10. Conclusões:

- As condições climáticas durante o período de estudo em Moçambique, são condutivas para o cultivo de *Artemisia annua*, que mostrou possuir boas características para a sua exploração comercial. *favoráveis*
- As plantas no campo produziram maior biomassa que as plantas da estufa, contrariamente à hipótese 1.
- Diferenças climáticas entre Moçambique e as zonas onde *A. annua* é nativa, implicam mudanças nas fases em que o conteúdo de artemisinina é máximo nas plantas. *podem implicar*
- O conteúdo de artemisinina foi maior no campo em relação à estufa, o que concorda com a hipótese 2 *mas é verdade, contrário*

- As folhas acumularam a maior parte da artemisinina obtida na planta, o que concorda com a hipótese 3.
- Maiores pesos de calos obtidos tanto a partir de explantes de folhas como os obtidos a partir de explantes de caules, foram obtidos à concentração de 0.1mg/ml de 2,4-D (meio B).
- Para efeitos de produção de calos com raízes, o meio mais indicado é o meio C.
- Os calos desta forma obtidos não produzem artemisinina.

11. Recomendações:

O estudo começou tarde e alguns aspectos relevantes como o máximo real possível de folhas que seria alcançado não ficaram claramente elucidados, pelo que recomenda-se a realização de um estudo que inicie pelo menos na segunda semana após a sementeira.

Recomenda-se a selecção de plantas com mesmas características, especialmente as conhecidas como de alto conteúdo de artemisina. Após a selecção produzir-se-iam por cultivo *in vitro* plantas que seriam mais tarde cultivadas no campo, de modo a ultrapassar as divergências obtidas em muitos aspectos ligados à esta planta.

As raízes desta planta são nas suas terminações, uma rede muito fina que retém pequenos pedaços de folhas e caules bem como outras partículas existentes no solo, o que dificulta a sua separação, recomenda-se solo limpo para estudos que envolvam a raiz.

A criação de condições adequadas e próprias para as culturas *in vitro* de modo a obter resultados que possam ser comparáveis com outros estudos feitos em condições semelhantes.

Esta planta parece possuir propriedades insectecidas quando seca em condições de laboratório, pelo que recomenda-se a realização de estudos com vista a apurar tais propriedades.

Bibliografia:

Anderson, A. (1996). The wrong resistance. New Scientist. 3 p.

Anónimo, (1991). Background: Malaria in Sub-Saharan Africa. In: American association for the Advancement of Science. Malaria and Development in Africa: a cross-sectoral approach 5-7p.

Anónimo, (1996). 'Resumo Anual de Internamento dos Hospitais Rurais. Departamento de Epidemiologia. Ministério da Saúde. Maputo. Moçambique. 2 pp

Barreto, A.(1995). Guia para o tratamento da malária nas unidades sanitárias.21 pp. Direção Nacional da Saúde. Maputo. Moçambique.

Bharel, S., Gulati, A., Abdin, M. Z., Srivastava, P. S. e Jain, S. K. (1996). Fitoterapia Vol.LXVII. 5: p 387-401.

Bhojwani, S. S. e Razdan, M. K. (1983). Plant Tissue Culture, Theory and practice. 502 pp. Elsevier science publishers. ISBN 0-444-42164-5.

Charles, D. J. e Simon, J. E. (1990). Germoplasm Variation in Artemisinin Content of *Artemisia annua* using An Alternative Method of Artemisinin Analysis from Crude Plant Extracts. Journal of Natural products. 53 (1):p 157-160.

Debergh, P.C. e Read, P.E. (1991). Micropropagation in: Debergh e Zimmerman (eds). Micropropagation. p1-13. Academic Publishers. INBN 0-7923-0818-2.

Dodds, J. H. e Roberts, L. W. (1995). Experiments in plant Tissue in Culture. terceira edição. 256 pp Cambridge University press. ISBN 0-521-47313-6.

Elhag, H., El-Ferally, F., Mossa, J. S. e Hafez, M. (1991). In vitro propagation of *Artemisia annua*. In: Agric. Sci. (2). 3: p 175-354.Riyadh, Arabia Saudita.

Elhag, H., Abdel-Satar E., El-Domiaty, M M., El-Olemy, M. M. e Mossa, J. S. (1997). Selection and Micropropagation of High Artemisinin Producing Clones of *Artemisia annua* L. Part II. Follow the Performance of the Micropropagated Clones. Arab. Gulf J. Scient Res. 15 (3): p 683-693 .

Fitter, A. H. e Hay, R. K. (1981). Environmental Physiology of Plants. Academic Press. p 30-67 . ISBN 0-12-257760-4.

Fulzele, D. P., Heble, M. R. e Rao, P. S. (1995). Production of terpenoid from *Artemisia annua* L. plantlet cultures in bioreactor. Journal of Biotechnology. 40: p 139-143.

Geldre, E. V., Vergauwe, A. e Eeckhout, E. V. (1997). State of the art of the production of the antimalarial compound artemisinin in plants. Plant Molecular Biology. 33:p 199-209.

Gulati, A., Baharel, S., Srivastava, P. S. Abdin, M. Z. e Jain, S.K. (1996). Experimental Studies on Artemisia, a Herbal Remedy to Malaria. Fitoterapia. LXVII (5): p 403-410.

Hogh, B. (1996). Clinical and Parasitology Studies on Immuty to *Plasmodium falciparum* malaria in Children. Scand. Journal. Stockolm. p 9-13

Janick, J. (1995). Annual Woormwood. New Crop FactSheet. 4 pp.

Klayman, D. L. (1985). Qinhaosu (Artemisinin): An Antimalarial Drug from China. Science. 228: p 1049-1055.

Knell, A.J. (1991). Malaria: A publication of the tropical programme of the wellcome trust. 94 pp. Oxford University press. Oxford. U. K.

Lampasona, M. E. P., Delfini, M. L., T., Riscala, E. C. e Catalan, C. A. N. (1990). Artemisinina en poblaciones silvestres de *Artemisia annua* en Argentina. All. Asoc. Quim. Argent. 78 (6). p 333-340.

Landeweert, R. (1997). Effects of drought-stress on the development of VA mycorrhizas and growth of groundnut (*Arachis hipopaea* L.). Tese de Mestrado. 33 pp Universidade de Groningen, Holanda..

Larcher, W. (1995). Physiological Plant Ecology. terceira edição. p 134-134. New York, Springer-Verlag.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Physiol. Plant 15, p 473-497.

Magalhães, A. C. N. (1985). Análise quantitativa do crescimento. In: Ferri, M. G. (ed). Fisiologia Vegetal 1. segunda edição. Câmara Brasileira do Livro. p 333-350.

⁽¹⁹⁸⁵⁾
Mantell, S. H., Matthews, J. A. e Mckee, R. A. Principles of Plant Biotechnology. 269 pp. Blackwell Scientific Publication. ISBN 0-632-01215-3.

Menshnick, S. R., Jefford, C. W., Posner, G. H., Avery, M. A. e Peters, W. (1996). Second-generation Antimalarial Endoperoxides. In: Saktavala, T. (ed). Parasitology Today. Elsevier science Ltd. ISBN 0-169-4707.

Noggle, G. R. e Fritz, G. J. (1983). Introductory Plant Physiology. segunda edição . Prentice-Hall, p 377-416. ISBN0-13-502096-4.

Pras, N. , Visser, J. F., Batterman, S., Woerdenbag, H. J. e Malingré, T. M. (1991). Laboratory Selection of *Artemisia annua* L. for High Artemisinin Yielding Types. Phytochemical analysis. 2. p 80-83.

Simane, B. Peacock, J. M. e Struik, P.C. (1993). Differences in developmental plasticity and growth rate among drought-resistant and susceptible cultivars of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum). Plant and soil. 157: p 155-166.

Siegel, S. e Castellan, N. J. Jr. (1988). Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences. 2ª edição. 399 pp. International editors. ISBN 0-07-057357-3.

Singh, A., Vishwakarma, R. A e Husain, A. (1988). Evaluation of *Artemisia annua* Strains for Higher Artemisinin Production. Planta medica. 728. p 475-476.

Tawfiq, N. K., Anderson, L.A., Roberts, M. F., Philipson, J. D., Bray, D. H. and Warhurst, D. C. (1989). Antiplasmodial activity of *Artemisia annua* plant cell cultures. Plant Cell Rep. 8: p 425-428.

White, N. J. and Olliaro, P. L. (1996). Strategies for the prevention of antimalarial drug resistance: Rationale for combination chemotherapy for malaria. In: Saktavala, T. (ed.). Parasitology Today. Vol. 12, 399-401 pp. Elsevier Science Ltd.

Woerdenbag, H. J., Lugt, C. B. e Pras, N. (1990). *Artemisia annua* L. : A Source of Novel Antimalarial Drugs. Pharmaceutisch Weekblad Scientific edition. 12 (5):p 169-181.

Woerdenbag, H. J., Pras, N., Uden, W. V. , De Boer, A., Batterman, S. Visser, J. F. e Malingré, T. M. (1992). High Peroxidase Activity in Cell Cultures of *Artemisia annua* with Minute Artemisinin Contents. Natural Product Letter. (1): p 121-128.

Woerdenbag, H. J. Luens, F. J., Uden, W. V. , Pras, N. Malingré, T. M. e Alfermann, A. W. (1993). Production of the new antimalarial drug artemisinin in shoot cultures of *Artemisia annua* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 32: p 247-257 .

Woerdenbag, H. J., Pras, N., Bos, R., Visser, J.F., Hendriks, H. e Malingré, T.M.(1991). Analysis of Artemisinin and Related Sesquiterpenoids from *Artemisia annua* L. by Combined Gas Chromatography/ Mass Spectrometry. Phytochemical analysis. 2.p 215-219.

Wonnacott, T. H. W. e Wonnacott, R. J. W., (1990). Introductory Statistics. 50ª edição. 711 pp.

ANEXO A: Tabelas

Tabela 2: Altura, área da folha, pesos frescos e secos das partes da planta e planta total da *Artemisia annua* no campo

sas	pff	psf	af	pfc	psc	pfr		pffl	psfl	Pft	pst	alt
16	70.7	13.4	6472.4	70.31	13.9	72.5	11.4			273.7	48.5	80.9
17	96	19	7130.1	97.37	22.6	82.7	13.9			224.5	41.7	88.5
18	117	20.7	7876.5	116.8	23.6	83.8	13.5			295.3	56.5	89
21	90.1	17.4	7878.2	120.8	42	91.4	18.2			302.3	78	118
22	131	30.8	11047	207.5	67.7	139	29.5			551.4	157	135
23	187	43.1	13597	310.1	112	164	40.4			604.7	173	161
25	104	27.2	7252.1	247	115	153	53.5	46.2	7.01	550.4	203	176
26	65.9	17.3	4995.3	166.9	74.2	103	27.4	43.3	7.43	385.8	126	181
27	56.8	15.6	3845.2	277.1	120	149	45.9	105	32.7	588.4	214	168
28	25.5	7.53	1659.2	264	119	126	37.8	141	48.9	557	214	171
29	42.2	13.4	2624.1	259	117	129	36.5	68.7	22.4	499.2	189	214
30	55.6	15.4	4173.7	229.7	103	107	34.1	71.1	23.3	463.8	174	205
33	24	8.34	1651	389.5	185	206	77.4	282	103	902.1	374	169
34	9.54	2.66	657.55	390.3	202	158	77.5	284	97.2	842.3	379	160
35	0.87	0.21	47.633	312.4	163	103	53.7	169	79.1	585	296	193

Tabela 3: Altura, área da folha, pesos frescos e secos das partes da planta e planta total da *Artemisia annua* na estufa

sas	pffE	psfE	afE	pfcE	pscE	pfrE	psrE	pfflE	psflE	pftE	pstE	altE
16	69.1	11.8	4110.6	88.5	20.6	89.4	15.9			247.1	48.4	126
17	66.5	11.9	4877.1	104	25	112	16.9			282.7	53.8	128
18	81	17.8	6447.8	81.3	22.4	150	18.8			302.8	59	117
21	99.9	23.8	7254.6	110	45.4	149	24.3			358.9	93.5	146
22	91.6	21.7	6631.8	133	59.8	170	28.5			394.8	111	165
23	83.6	20.4	6147.1	161	66.2	172	24.4			416.3	111	194
25	47.4	17.1	3527.4	133	62.5	104	27.3	9.87	4.22	293.8	111	227
26	35.6	11.2	1979.4	148	72.2	108	37.4	30.5	7.53	322.2	128	242
27	21.5	7.38	1420.7	155	78.4	184	57.7	37.1	12.6	397.5	156	259
28	4	1.5	23.085	164	85.4	95.2	25	42.4	15.8	305.5	128	298
29	4.15	1.42	231.45	135	68	67.4	18	46.4	16	253.3	103	256
30	1.14	0.39	36.545	110	55.5	72.9	16.6	76.1	30.4	260.2	103	244
33	0.67	0.25	41.05	118	61.2	85.6	23.9	83	34.1	286.7	120	214
34	0	0	0	101	53.1	58.7	12.6	56.9	26.4	216.5	92.1	212
35	0	0	0	83.7	40	78.4	17.6	46.4	20.7	208.5	78.5	217

pff e psf- pesos frescos e secos das folhas, respectivamente
 pfc e psc- pesos frescos e secos dos caules, respectivamente
 pfr e psr- pesos frescos e secos das raízes, respectivamente
 pffl e psfl- pesos frescos e secos das flores, respectivamente
 pft e pst- pesos frescos e secos das plantas totais, respectivamente
 alt- altura das plantas
 af- área das folhas
 sas- semanas após a sementeira

Tabela 5: Correlação entre alguns parâmetros de crescimento de *Artemisia annua* no campo

	PSF	AF	AFE	RAF	PEF	RPF	TCAF	TAA
AF	-0.215							
AFE	0.66661	0.24924						
RAF	0.35278	0.54451	0.56284					
PEF	0.89141	-0.3336	0.58585	0.17881				
RPF	0.89275	0.3299	0.58806	0.18415	0.99998			
TCAF	0.90003	-0.3147	-0.5072	0.19183	0.9998	0.99986		
TAA	0.89133	-0.4283	0.99979	1.0000	-0.5113	0.89752	-0.1946	
TCR	0.89198	-0.4317	0.99974	0.9999	-0.5159	0.9000	-0.2007	0.99991

PC

Tabela 6: Correlação entre alguns alguns parâmetros de crescimento de *Artemisia annua* na estufa

	PSF	AF	AFE	RAF	PEF	RPF	TCAF	TAA
AF	0.10352							
AFE	-0.1044	0.83072						
RAF	0.61331	0.7118	-0.3283					
PEF	0.94506	-0.3013	-0.332	0.37516				
RPF	0.9366	-0.2385	0.38692	0.38692	0.99999			
TCAF	0.9409	-0.2265	-0.3203	0.39668	0.99988	0.99992		
TAA	0.99908	0.37275	-0.4309	0.99992	-0.725	0.47467	0.99994	
TCR	0.99885	0.37581	-0.4354	0.99998	-0.6315	0.47003	0.99998	0.99996

PC

Legenda:

- AF- área da folha
- AFE- área foliar específica
- PEF- peso específico da folha
- PSF- peso seco da folha
- RAF- razão da área da folha
- RPF- razão do peso da folha
- TCAf- taxa de crescimento absoluto da folha
- TAA- taxa de assimilação aparente
- TCR- taxa de crescimento relativo

ANEXO B: Glossário

ABREVIATURAS e GLOSSÁRIO

Ágar- um polissacárideo gelatinoso obtido de algas vermelhas, que funciona como um agente solidificante quando misturado com o meio nutriente.

Asséptico- livre de células vivas.

Auxinas-uma das grandes classes de hormonas vegetais (fitohormonas), que induzem por exemplo à iniciação de raízes e raízes adventícias, alongamento celular, promoção de novas divisões celulares.

Calo-refere-se a uma massa de células desorganizada em proliferação dividindo-se activamente.

Citocininas-hormonas vegetais que induzem por exemplo à divisão celular, ao alongamento de células e ao desenvolvimento de brotos laterais.

2,4-D- ácido (2,4-di-cloro-fenoxi)-acético, é uma auxina.

Explante- fragmento retirado de tecidos vegetais e utilizado nas culturas *in vitro*.

Friável-que se esmagama com facilidade.

in vitro- crescimento sob condições artificiais como em cultura de tecidos.

KNOP- uma solução de macroelementos desenvolvida por Knop, J.(1817-1891), baseada na análise de solos que é frequentemente usada em sistemas de culturas de solo e também como fertilizante.

MS-abreviatura do meio Murashige, T. e Skoog, F (1962)- é um meio definido e formulado paracultura de calos do tabaco e agora usado em muitas outras culturas de tecidos de plantas. É caracterizado por altos níveis de nitrogênio, potássio e cálcio em relação à outros meios de cultura de tecidos de plantas.

ANEXO C

Composição do meio de cultura Murashige & Skoog (1962).

Constituintes	Molaridade no meio	Concentração das soluções "stock" (mg/l)
<i>Macromitrientes</i>		
NH ₄ NO ₃	20,6x10 ⁻²	33000
KNO ₃	18,8 x10 ⁻²	38000
CaCl ₂ .2H ₂ O	3,00x10 ⁻³	8800
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,50x10 ⁻³	7400
KH ₂ PO ₄	1,25 x10 ⁻³	3400
<i>Micromitrientes</i>		
KI	5,00x10 ⁻⁴	166
H ₃ BO ₃	1,00 x10 ⁻⁴	1240
MnSO ₄ .4H ₂ O	9,99 x10 ⁻⁵	4460
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,99 x10 ⁻⁵	1720
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1,00 x10 ⁻⁴	50
CuSO ₄ .5H ₂ O	1,00 x10 ⁻⁷	5
CoCl ₂ .6H ₂ O	1,00 x10 ⁻⁷	5
<i>Fontes de Ferro</i>		
Na ₂ EDTA . 2H ₂ O	1,00 x10 ⁻⁴	7460
FeSO ₄ .7H ₂ O	1,00x10 ⁻⁴	5560
<i>Compostos Orgânicos</i>		
Myo inositol	4,90x10 ⁻⁴	100
<i>Vitaminas</i>		
Ácido nicotínico	4,66x10 ⁻⁶	0,5
Piridoxina-HCl	2,40x10 ⁻⁶	0,5
Tiamina -HCl	3,00x10 ⁻⁷	0,5
<i>Aminoácidos</i>		
Glicina	3,00x10 ⁻⁵	2,0
<i>Fontes de Carbono</i>		
Sacarose	8,80x10 ⁻²	30g/l