DISSERTAÇÃO

PRODUÇÃO DE ARTEMISININA POR *ARTEMISIA ANNUA* L. SOB INFLUÊNCIA DE MICORRIZA ARBUSCULAR

GIULIANA CLARICE MERCURI QUITÉRIO

Campinas, SP
2006

INSTITUTO AGRONÔMICO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL

PRODUÇÃO DE ARTEMISINI NA POR *ARTEMISIA ANNUA* L. SOB INFLUÊNCIA DE MICORRIZA ARBUSCULAR

GIULIANA CLARICE MERCURI QUITÉRIO

Orientadora: Dra. Adriana Parada Dias da Silveira

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Agricultura Tropical e Subtropical Área de Concentração em Gestão de Recursos Agroambientais.

Campinas, SP
Fevereiro 2006

Ficha elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação do Instituto Agronômico

Q8p Quitério, Giuliana Clarice Mercuri.
Produção de *artemisinina annua* L. sob influência de micorriza arbuscular ./ Giuliana Clarice Mercuri Quitério. Campinas, 2006.
38f.

Orientadora: Dra. Adriana Parada Dias da Silveira
Dissertação (Mestrado) – Concentração em Gestão de Recursos Agroambientais – Instituto Agronômico

1. Artemísia 2. Micorriza arbuscular 3. Planta medicinal
I. Silveira, Adriana Parada Dias da II.Título

CDD 583.3357

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA
DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO AGRONÔMICO
Pós-Graduação
Av. Barão de Itapura 1481 Caixa Postal 28
13001-970 Campinas, SP - Brasil
(019) 3231-5422 ramal 194
pgiac@iac.sp.gov.br

IAC
INSTITUTO AGRONÔMICO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: **Produção de artemisinina por *Artemisia annua* L. sob influência de micorriza arbuscular**

Aluno(a): **Giuliana Clarice Mercuri Quiterio**
Processo SAA nº **18024/04**

Orientador(a): **Dr(a). Adriana Parada Dias da Silveira**

Aprovado pela Banca Examinadora:

Dr(a). Sara Adrián López de Andrade
UNICAMP

Dr(a) Milene Moreira da Silva
IAC

Dr(a). Adriana Parada Dias da Silveira
IAC

Data de Realização: 18/04/2006

Sueli dos Santos Freitas
Vice - Coordenadora
Pós - Graduação IAC

Agradecimentos

- À Dra. Adriana Parada Dias da Silveira, pela orientação, pelas oportunidades, pela dedicação, pela compreensão e pela paciência muito acima da média.

- Á PG-IAC, na forma de seu Comitê e Conselho de área, em particular à Dra. Ana Maria Magalhães de Andrade Lagôa, que me concedeu terminar este trabalho mesmo em condições que não me permitiriam fazê-lo.

- Às funcionárias da PG-IAC, em particular à secretária Adilza Costa, que realizou a formatação final deste texto, em ajuda muito além de sua função e do que nosso relacionamento poderia supor.

- Ao Instituto Agronômico, que me acolheu e me deu condições de finalizar o trabalho, na forma de seus professores e funcionários.

- À FAPESP, que financiou o projeto.

- Ao Dr. Edilberto Princi Portugal pela orientação, apoio, disposição, confiança e oportunidade de trabalhar ao seu lado. Obrigada por se transformar num grande amigo. À você, Edil, toda minha gratidão e admiração.

- Aos meus "irmãos Jatobás" – Paula e Marcos – a quem devo grande parte do meu equilíbrio e conquista. Obrigada pelo inesquecível apoio durante as dificuldades e pelo companheirismo durante as boas horas!

- Ao Átila e Rhuanito pelas horas em frente ao computador, pela ajuda, atenção e carinho durante a redação desta dissertação!

- Ao Chico pela força, apoio e amizade!

- Aos meus pais por sempre acreditarem em mim.

- Aos amigos e colegas do CPQBA/Unicamp, principalmente das áreas de Microbiologia e Agrotecnologia pela constante prontidão nas necessidades, apoio e carinho. Em especial agradeço à Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte, Dr. Alexandre Nunes Ponezi, Dr. Pedro Melillo de Magralhães, Dra. Mary Ann Foglio e à super companheira de trabalho Ilza Souza.

- Enfim, a Deus e Nossa Senhora....

Às vítimas de malária.

Dedico

QUITÉRIO, Giuliana Clarice Mercuri. **Produção de artemisinina por *Artemisia annua* L. sob influência de micorriza arbuscular.** 2006. Dissertação (Mestrado em Gestão de recursos agroambientais) – Pós-Graduação – IAC.

RESUMO

O efeito da micorrização de *Artemisia annua* L. por diferentes fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) foi avaliado. *Glomus intraradices*, *Scutellospora gregaria*, *Acaulospora scrobiculata*, *Glomus clarum*, *Entrophospora* sp, *Glomus etunicatum* e *Glomus macrocarpum* foram inoculados em solo esterilizado e o experimento desenvolvido em câmara de crescimento, com delineamento inteiramente casualizado. A massa da matéria seca da parte aérea não diferiu entre os tratamentos, porém, os teores de artemisinina variaram dependendo do FMA inoculado, quando comparado ao controle. Nessa etapa, foram selecionados dois FMAs, *Glomus macrocarpum* e *Scutellospora gregaria*, que promoveram um aumento de 39 e 7%, respectivamente, na produção de artemisinina. A partir dessa seleção, realizou-se um segundo experimento, em esquema fatorial 4x2, em casa de vegetação, empregando-se ambos os FMAs selecionados e dois controles, com e sem adubação fosfatada (90 kg ha^{-1}), em solo esterilizado e não esterilizado. As variáveis analisadas foram: massa da matéria seca da parte aérea total, massa da matéria seca de folhas, teor e acúmulo de macro e micronutrientes nas folhas, colonização micorrízica e teor de artemisinina. A introdução de FMAs não aumentou o crescimento das plantas, mas protegeu contra o excesso de Mn no solo. As plantas colonizadas por fungos nativos apresentaram maiores teor e acúmulo de artemisinina nas folhas, entretanto, não foram eficientes em promover o aumento na produção do princípio ativo nas plantas.

Palavras-chaves: malária, fungos micorrízicos arbusculares, planta medicinal, princípio ativo.

QUITÉRIO, Giuliana Clarice Mercuri. **Production of artemisinin by *Artemisia annua* L. under influence of arbuscular mycorrhiza.** 2006. Dissertação (Mestrado em Gestão de recursos agroambientais) – Pós-Graduação – IAC.

ABSTRACT

The effect of *Artemisia annua* L. mycorrhization by different arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) was evaluated. *Glomus intraradices*, *Scutellospora gregaria*, *Acaulospora scrobiculata*, *Glomus clarum*, *Entrophospora* sp, *Glomus etunicatum* e *Glomus macrocarpum* were inoculated in sterilized soil and the experiment was conducted under growth chamber conditions. Plant shoot dry weight did not differ among the treatments, but artemisinin concentrations varied according to the AMF as compared to the control. Two AMF were selected, *Glomus macrocarpum* and *Scutellospora gregaria*, which increased the artemisinin production in 39 and 7% respectively. A factorial 4x2 experiment was conducted, under greenhouse conditions, with both selected AMF and two controls, non-fertilized and fertilized with 90 kg ha^{-1} of P, in sterilized and non-sterilized soil. The analyzed variables were: total shoot dry weight, leaves dry weight, foliar macro and micronutrients concentration, mycorrhizal colonization and artemisinin concentration. The AMF inoculation did not increase plant growth, but protected the plant against excessive Mn in soil. Plants colonized by native fungi showed high artemisinin concentration and content, but these native AMF were not efficient to increase the active principle production in plants.

Key-words: malaria, arbuscular mycorrhizal fungus, medicinal plant, active principle.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3
2.1 Malária 3
2.2 *Artemisia annua* L. 4
2.3 Artemisinina 8
2.4 Micorriza arbuscular em plantas medicinais 9
3. MATERIAL E MÉTODOS 14
3.1 Experimento 1 14
3.2 Experimento 2 16
3.3 Variáveis Analisadas 17
3.3.1 Massa da matéria seca da parte aérea total e de folhas 17
3.3.2 Teor e acúmulo de macro e micronutrientes 17
3.3.3 Porcentagem de colonização micorrízica 17
3.3.4 Teor de artemisinina 18
3.4 Análise Estatística 19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 19
4.1 Experimento 1 19
4.1.1 Massa da matéria seca da parte aérea e folhas 17
4.1.2 Acúmulo de macro e micronutrientes 19
4.1.3 Teor de macro e micronutrientes 19
4.1.4 Porcentagem de colonização micorrízica 20
4.1.5 Teor e acúmulo de artemisinina 23
4.2 Experimento 2 27
4.2.1 Massa da matéria seca da parte aérea e folhas 27
4.2.2 Acúmulo de macro e micronutrientes 26
4.2.3 Teor e acúmulo de artemisinina 29
4.2.3 Teor e acúmulo de macro e micronutrientes 30
5. CONCLUSÕES 35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 36

1 INTRODUÇÃO

Originária da Ásia, a *Artemisia annua* L. é atualmente produzida em muitos países, aonde se desenvolvem projetos de adaptação da planta, visando o aumento de produção da artemisinina, uma lactona sesquiterpênica oriunda do metabólito secundário da planta, e que é empregada na cura da malária, doença que representa um problema de saúde de ordem mundial, pois atinge cerca de 2,7 milhões de pessoas por ano e atualmente 40% da população situa-se em área de risco de contração da doença.

Tentativas de diminuir o efeito devastador da malária têm se deparado com muitos obstáculos, principalmente com a resistência dos parasitas às drogas tradicionais, assim como com a falta de um adequado e efetivo antimalárico que seja de fácil acesso, seguro e economicamente viável.

O tratamento da malária com *Artemisia annua*, além de apresentar vantagens econômicas, demonstra ter baixa toxicidade e não causar efeitos colaterais, ao contrário do que acontece com medicamentos sintéticos e tradicionais.

A artemisinina, responsável pelo combate ao plasmódio causador da malária, foi identificada em 1979. A Organização Mundial da Saúde está consciente do potencial desta planta e passou a recomendar sua utilização juntamente com outros medicamentos que tenham princípios ativos e modos de ação diferentes, a fim de se evitar que os plasmódios causadores da malária desenvolvam resistência à artemisinina também.

Essa recomendação desencadeou pesquisas que buscam formas de manter-se uma produção em larga escala de *Artemisia annua*, já que a síntese artificial desse princípio ativo é muito cara, demorada e resulta em baixo rendimento, tornando a própria planta sua única fonte economicamente viável.

A produção de óleos essenciais e princípios medicinais é altamente integrada à fisiologia da planta de depende do seu estado metabólico, da diferenciação pré-estabelecida dos tecidos de síntese e das condições ecofisiológicas e ambientais nas quais a planta se desenvolve (SANGWAN et al. 2001).

As plantas micorrizadas apresentam-se bioquímica e fisiologicamente diferentes das não micorrizadas. Assim, a micorrização de plantas pode influenciar a síntese de compostos secundários, como já descrito para diversas plantas medicinais, tais como *Castanospermum australe* (ABU-ZEYAD, et al., 1999), *Mentha arvensis* (GUPTA et al., 2002; FREITAS et al., 2004), *Coriandrum sativum*, *Spilanthes calva* e *Withania*

somnifera (RAI et al., 2001), *Anethum graveolens* (WEI e WANG, 1991), *Trachyspermum amni* e *Foeniculum vulgare* (KAPOOR et al., 2003), *Stevia rebaudiana* (PORTUGAL, 2006) entre outras. Porém não foram encontrados na literatura estudos que relatem o efeito da micorrização em *Artemisia annua* L..

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência de algumas espécies de fungos micorrízicos arbusculares sobre o crescimento e nutrição mineral de *Artemisia annua* L., assim como sobre a produção de artemisinina.

2 REVISÃO BILIOGRÁFICA

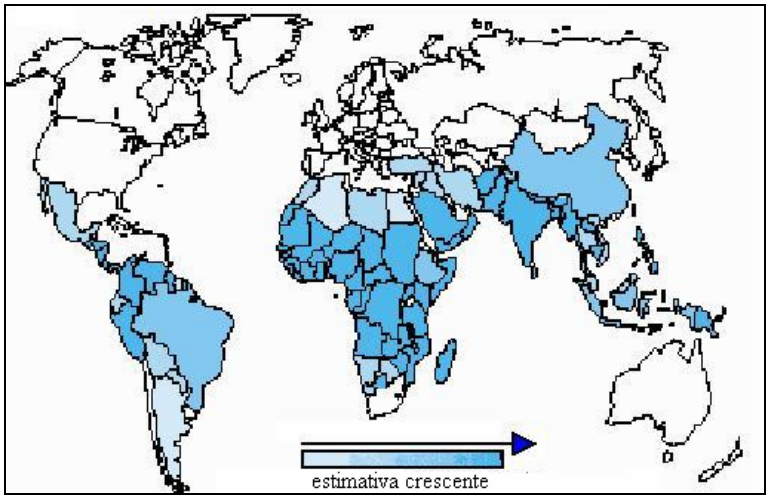
2.1 A Malária

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 40% da população mundial está sujeita a contrair malária (Figura 1), uma doença endêmica principalmente em áreas de climas tropical e subtropical, que atinge de forma aguda cerca de 3 milhões de pessoas e mata pelo menos 1 milhão anualmente. Essa estatística a evidencia como a doença tropical parasitária responsável pelo maior número de óbitos no mundo, e quando comparada às demais doenças, perde apenas para o número de vítimas da AIDS (Imuno Deficiência Adquirida).

No Brasil, os programas de controle da malária instituídos na década de cinqüenta, foram eficientes e reduziram consideravelmente o número de casos. Vinte anos depois, devido ao desenvolvimento da região Amazônica e a tomada desordenada de áreas por uma grande quantidade de trabalhadores rurais, garimpeiros e outros tipos de trabalhadores, o número de casos de malária aumentou novamente. No início dos anos 90 eram 700 mil novos casos por ano rendendo ao Brasil o título de país com o maior risco de contração da malária das Américas (MARQUES *et al.* 1987). A estimativa para este ano de 2006é de 600 mil novos casos.

Quatro espécies de protozoários parasitas do gênero *Plasmodium* spp. podem desencadear a doença: *Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Palsmodium ovale* e *Plasmodium malariae.* Dentre eles, o *P. falciparum* é o mais comum e mais mortal, pois é responsável pela malária cerebral, caracterizada por fortes dores de cabeça e derrame cerebral. Essa espécie é predominante na África, Amazônia, sudeste da Ásia e Oceania (WHO, 2003).

As medidas sanitárias no combate aos mosquitos do gênero *Anopheles*, vetores responsáveis pela transmissão dos plasmódios, não são eficazes, pois há um constante aumento no número de áreas desmatadas e intolerância do mosquito a inseticidas. Além disso, os principais problemas enfrentados no controle e tratamento da doença são a crescente resistência do parasita às monoterapias convencionais como cloroquina, amodiaquina ou sulfadocinina/perimetamina, e também a resistência dos mosquitos aos inseticidas (WHO 2002, BUTLER *et al.* 1997).



Fonte: WHO (2003).

Figura 1 - Mapa mundial de ocorrência de malária.

Há duas maneiras de solucionar o problema da resistência dos plasmódios aos medicamentos: a primeira mais complicada e que levaria anos de pesquisas, propõe o desenvolvimento de novas drogas que utilizem diferentes princípios ativos para tratar os pacientes, e a segunda, mais prática, sugere a combinação de drogas que possuem diferentes princípios ativos e agem independentemente uma da outra.

A OMS adotou a segunda opção e recomenda a utilização de terapias de combinações baseada na artemisinina, (no inglês, ACT - Artemisinin-based Combinations Therapies) para substituir as monoterapias ineficazes. De acordo com a disponibilidade dos medicamentos em cada país, as seguintes combinações são propostas: a) artemether/lumefantrina; b)a rtesunato com amodiaquina; c) artesunato com mefloquina; d) artesunato com sulfadoxina/pirimetamina (WHO, 2006).

2.2 *Artemisia annua* L.

O crescente aumento da resistência dos parasitas às drogas convencionais impulsionou nas últimas décadas pesquisas em busca de novas fontes de um antimalárico eficiente. Essa busca deparou-se com uma planta utilizada há séculos na medicina tradicional chinesa para o tratamento de febre e malária. Em 1972, químicos chineses isolaram das folhas de *Artemisia annua* L. o "*qinghaosu*", uma molécula proveniente do metabolismo secundário da planta classificada no ano de 1979 como uma lactona sesquiterpênica. A ela deu-se o nome de artemisinina (KLAYMAN, 1985).

A artemisia, como é conhecida popularmente, pertence à família Asteraceae e é nativa da Ásia ocorrendo naturalmente nas planícies da China, ente 1000 e 1500 metros de altitude. Fora da Ásia também cresce naturalmente em países da Europa (Hungria, Bulgária, Romênia e França), América do Norte (EUA) e América do Sul (Argentina). Além disso, está sendo introduzida em muitos outros países como Vietnam, Tailândia, Burma, Madagascar, Malásia, Holanda, Suiça e Brasil (KLAYMAN, 1989).

Trata-se de uma espécie anual, herbácea, pertencente à família *Asteraceae*. Sua altura pode variar entre 30-250 cm, dependendo da região onde é produzida e de aspectos agronômicos, principalmente espaçamento. Suas flores são pequenas e tipicamente amarelas, heterogâmica e com tamanho que varia entre 2-3 mm (KEYS, 1976). Suas folhas são simples, alternadas e possuem a maior concentração e síntese de artemisinina, havendo pequenas concentrações nos caules e nenhuma produção nas raízes (KUMAR, *et al.* 2004). Sua propagação dá-se naturalmente por fecundação cruzada, mas pode também propagar-se vegetativamente através de técnicas artificiais de propagação *in vitro* (MAGALHÃES, 1996).

No Oriente é utilizada não somente como fonte de artemisinina, mas também como fonte de óleo essencial, muito utilizado em produtos sanitários e cosméticos.

Embora originária de regiões de clima temperado, apresenta boa adaptabilidade em locais de clima tropical através da seleção de sementes e híbridos. Um dos fatores que contribuem para isso é a capacidade que tem em crescer em diferentes tipos de solo (LAUGHLIN, 2002).

No Brasil, as pesquisas têm como objetivo adaptá-la às condições tropicais pelo estudo da reprodução, seleção de genótipos de florescimento tardio e seleção de híbridos com boa produção de biomassa e artemisinina. Esses estudos tiveram início na década de oitenta e se estende até os dias atuais sempre em busca de otimizar a produção de artemisinina (MAGALHÃES, 1996).

O processo de melhoramento genético desenvolvido no CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas) da UNICAMP, iniciou-se com uma grande variedade de populações, as quais rendiam baixas produções de artemisinina e biomassa. Somente com a introdução de genótipos superiores vindos do Vietnã, e do desenvolvimento de novas técnicas realizadas na Suiça, foi possível desenvolver híbridos específicos adaptados às condições brasileiras (MAGALHÃES *et al.* 2004).

Antes do processo de melhoramento, obtinham-se plantas baixas e com ciclo muito rápido acarretando baixo teor de artemisinina, cerca de 0,01% por peso de matéria seca. Atualmente, após processo adaptativo, obtêm-se plantas de até 2 m de altura e cerca de 1% de concentração de artemisinina (FOGLIO, 2006).

Existem poucos relatos sobre as respostas de *A. annua* aos elementos nutricionais mais essenciais como nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) e seus efeitos na produção de artemisinina.

Nos Estados Unidos, bons resultados de produção de matéria seca total e de folhas, foram alcançados com a adição de 100 kg ha^{-1} de N, P e K (WHO, 1988). Similarmente na Austrália, esse resultado foi alcançado com 60 kg ha^{-1} de N e P e 50 kg ha^{-1} de K distribuídos no campo, semeadura e transplante das mudas para o campo (LAUGHLIN, 1993).

FIGUEIRA (1996) desenvolveu um estudo em hidroponia onde avaliou a influência de nutrientes na produção de artemisinina, verificando que a omissão dos elementos N, P, K, Ca, Mg ou S diminuiu drasticamente a produção de matéria seca e limitou a produção de artemisinina e ácido artemisinínico.

Um estudo realizado com relação à adubação nitrogenada foi desenvolvido por Magalhães *et al.* (1996), que compararam diferentes fontes de nitrogênio nas concentrações de 0, 32, 64 e 97 kg $há^{-1}$ em cultivares de *A. annua*. Constataram que a aplicação da maior concentração aumentou significativamente a produção de matéria seca de folhas de artemisia, porém a produção de artemisinina decaiu 22%. Concluiu-se então que a melhor recomendação para aplicação de nitrogênio é de 64 Kg $há^{-1}$ na forma de uréia com a qual obteve-se aumento de 50% na produção de artemisinina quando comparado ao controle e não apresentou diferença significativa na produção de massa da matéria seca quando comparado ao tratamento com maior adubação.

ADLER *et al* (1989) também verificaram a influência de diversas formas de fertilizantes nitrogenados no crescimento e concentração de óleo essencial de manjericão (sweet basil).

O estresse também foi estudado como uma forma de estímulo à produção de artemisinina. Dentre os estresses estudados que interferem na produção de metabólitos secundários, cita-se o estresse hídrico, os extremos de temperatura, a radiação ultravioleta, a salinidade, a deficiência nutricional, os metais pesados, ataques de insetos e patógenos, e danos mecânicos.

As adaptações a esses estresses envolvem mudanças bioquímicas e fisiológicas nas plantas, tanto no metabolismo primário quanto no secundário, o que pode acarretar maior produção de metabólitos secundários (MARCHESE, 1999).

No geral, em plantas herbáceas e arbustivas, a síntese de compostos terpênicos como a artemisinina, tendem a aumentar em condições de estresse (MARCHESE, 1999). Esse fato é explicado devido aos processos de crescimento da planta serem rapidamente paralisados, enquanto que a fotossíntese líquida não é sensível a limitações moderadas de água, ocorrendo um desvio excedente de carboidratos requeridos para o metabolismo secundário (MARCHESE, 1999).

Com o objetivo de estudar a influência da deficiência hídrica e da temperatura no acúmulo da artemisinina e produção de fitomassa, MARCHESE (1999) realizou dois experimentos em câmara de crescimento. No primeiro, induziu deficiências hídricas (DH) moderadas e drásticas em dois diferentes estádios da planta – 84 e 147 dias. No experimento com plantas de 84 dias, no tratamento de desidratação moderado (38 horas) o teor de artemisinina teve acréscimo significativo de 29%. Para os tratamentos com supressão de 14, 62 e 86 horas, não houve diferenças para o teor de artemisinina. As plantas de 147 dias foram submetidas a 114,5 horas de supressão hídrica e posteriormente hidratadas. Nos tratamentos de 72 e 144 horas de reidratação, verificou-se um acúmulo significativo de artemisinina de 16 e 17% respectivamente.

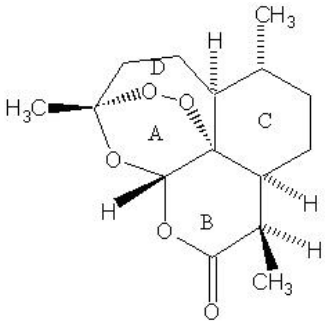
Quanto à massa da matéria seca de folhas, somente o tratamento de 38 horas de supressão em plantas de 84 dias foi significativamente maior que o controle. No experimento com plantas de 147 dias, verificou-se redução significativa na massa da matéria seca foliar com relação ao controle. Os demais aumentos dos teores de artemisinina em ambos os experimentos foram anulados por uma redução na matéria seca de folhas, não resultando em maior acúmulo de artemisinina por planta.

Para os ensaios de temperatura, foram aplicadas duas amplitudes térmicas (dia/noite) 18/28 ^{o}C e 11/20 ^{o}C. As temperaturas maiores induziram um aumento no teor de artemisinina. MAGALHÃES (1996) também observou que temperaturas próximas da mesma amplitude térmica (22/26 ^{o}C) induziram maior teor de artemisinina em detrimento de temperaturas mais elevadas de 25/31^{o}C, porém sem obter diferenças significativas entre os tratamentos quanto ao acúmulo, pois a maior temperatura resultou no aumento da produção da massa da matéria seca foliar, ao contrário de MARCHESE (1999) que não obteve diferenças significativas quanto à massa da matéria seca foliar e ao acúmulo de artemisinina.

Esses resultados estimulam o interesse da indústria farmacêutica nacional e internacional que não vêem grandes vantagens em se produzir remédios de baixo custo para doenças que atingem uma camada social de baixo valor aquisitivo, propiciando a oportunidade de autonomia na extração do princípio ativo, tornando o Brasil independente da importação que é feita do Vietnã.

2.3 Artemisinina

A artemisinina (FIGURA 2) é um poderoso oxidante e desde a descoberta de seu potencial antimalárico, vem-se buscando alternativas para solucionar o problema da sua produção em larga escala.



Fonte: http://www.bo.ibimet.cnr.it/index.php?id=523&L=3

Figura 2 – Estrutura molecular da artemisinina.

O crescimento do número de países que adotaram a ACT como terapia contra o plasmódio da malária provocou um rápido crescimento na demanda por artemisinina e seus derivados. O consumo global subiu de algumas centenas de milhares de doses em 2001/2002 para 10 milhões em 2005. Em 2006, a OMS previu a necessidade de pelo menos 120 milhões de doses de ACTs (WHO, 2006).

Normalmente, assim que a estrutura molecular da substância que possui uma resposta farmacológica é isolada da planta, estudos iniciam-se a fim de sintetizar o elemento. No caso da artemisinina, a primeira síntese total da substância foi registrada em 1983, porém a forma encontrada para fazê-lo é muito complexa, exige várias etapas e resulta em baixo rendimento. A partir daí deu-se início à busca para melhorar a forma de obtenção da artemisinina natural, porém nenhuma das tentativas resultou em métodos viáveis para a obtenção em larga escala do antimalárico. Portanto, a extração de artemisinina das plantas de *Artemisia annua* continua sendo a única fonte economicamente viável (DELABAYS, 2001).

BALINT (2001) observou que a artemisinina reage com o grupo heme, na presença de células vermelhas, oxidando as proteínas e destruindo a membrana celular do plasmódio. Como os parasitas da malária são ricos em heme isso pode explicar a toxicidade seletiva da artemisinina contra eles, acarretando pouco ou nenhum efeito colateral ao paciente.

A lactona presente em sua fórmula molecular pode facilmente ser transformada em dihidroartemisinina, substância comprovadamente mais eficaz que a artemisinina pura, e que pode originar outros derivados como o artemether e artesunato (BALINT, 2001). Comprovadamente mais eficazes que a artemisinina, o artemether é solúvel em lipídeos e o artesunato solúvel em água, o que viabiliza ainda mais sua aplicação. Além disso, o artesunato atua rapidamente na restauração da consciência em pacientes em coma, vítimas da malária cerebral (KLAYMAN, 1985).

A rapidez de ação da artemisinina e seus derivados, praticamente desprovidos de efeitos colaterais, os colocam entre as mais importantes e estudadas drogas antimaláricas da atualidade.

2.4 Micorriza arbuscular em plantas medicinais

Para viabilizar a produção de artemisinina e antimaláricos semi-sintetizados de artemisinina é necessária contínua melhoria dos cultivares de artemisia.

Sabendo-se que a biossíntese de metabólitos secundários é geneticamente determinada e influenciada por aspectos fisiológicos e ambientais (bióticos e abióticos), sugere-se que a colonização da planta por fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) pode influenciar na produção de artemisinina, seja pela melhora nutricional da planta ou por sua resposta à presença do fungo.

Micorrizas vêm sendo estudadas nos últimos 100 anos, porém nos últimos 20 anos houve uma explosão de interesses que incluem a sua utilização como um potencial biofertilizante de baixo custo, alternativo aos caros fertilizantes químicos (SMITH e GIANINAZZI-PEARSON, 1988).

Provavelmente apenas 5-10% das plantas não formam associação micorrízica e dos outros 90-95%, cerca de dois terços formam a associação com FMAs (FINLAY, 2004), os quais colonizam o tecido cortical das raízes durante o período de crescimento ativo da planta e são de grande importância em solos distróficos para obtenção de elementos de baixa mobilidade (MOSSE, 1980).

As vantagens dessa associação estão relacionadas com: efeitos no crescimento da planta, aumento da absorção de nutrientes, melhora na relação água-planta, auxílio na fixação biológica do nitrogênio em leguminosas com dupla simbiose (rizóbio e FMA), efeito antagônico a fitopatógenos, modificações anatômicas, histoquímicas, bioquímicas e fisiológicas da planta, além de efeito na estruturação física do solo (SILVEIRA, 2000).

Caracteriza-se principalmente pela troca de carbono por fósforo entre o hospedeiro e o fungo. Por ser biotrófico obrigatório, o FMA adquire da planta todo o carbono que precisa para seu desenvolvimento, enquanto que a planta recebe fosfato absorvido do solo pelo fungo.

O fosfato é um íon excepcionalmente imóvel no solo, pois forma complexos insolúveis com a maioria dos cátions, tais como Fe^{3+}, Al^{3+} e Ca^{2+}. Conseqüentemente, a difusão do íon fosfato torna-se lenta no solo e as raízes que absorvem fosfato formam uma zona de depleção do íon. As hifas do fungo crescem além das raízes e capturam fosfato além dessa zona de depleção formada pelas raízes da planta. Como a hifa é tipicamente 10 vezes mais fina que a raiz, o custo para a planta desenvolver hifas ao invés de raízes é pelo menos 100 vezes menor. Essa simples análise de custo-benefício explica porque a simbiose beneficia tanto a planta como o fungo (HELGASON e FITTER, 2005).

Segundo alguns autores, (KAPOOR *et al*. 2003; ABU-ZEYAD *et al.* 1999; RAI *et al*., 2001; WEI e WANG, 1991; GUPTA *et al.* 2001), as plantas micorrizadas apresentam-se bioquímica e fisiologicamente diferentes das não micorrizadas, o que, portanto, pode influenciar na síntese de compostos secundários, como óleos essenciais e princípios ativos de plantas aromáticas e medicinais.

Sabendo-se que fitohormônios exercem uma função importante em vários processos de desenvolvimento de plantas e da simbiose entre o FMA e a planta hospedeira, SHAUL-KEINAN (2002) estudou as mudanças hormonais nas raízes de tabaco (*Nicotiana tabacum*) em estágio precoce de desenvolvimento enquanto colonizadas por *G. intraradices,* a fim de caracterizar as mudanças nas concentrações de auxinas, citoquininas e giberilinas. O estudo demonstrou que as mudanças hormonais ocorrem durante a simbiose micorrízica antes mesmo dos benefícios da colonização se manifestarem.

Em milho (*Zea mays* L.), verificaram-se as quantidades dos fitohormônios: ácido abscisico (ABA), citoquinina e ácido-indol acético (AAI) em plantas colonizadas por

Glomus – isolado T6 e plantas não micorrizadas. As análises demonstraram níveis consideravelmente mais elevados de ABA livre em plantas colonizadas em relação às plantas controle em todos os estágios de desenvolvimento (40, 60, 80 e 110 dias). Contraditoriamente, a quantidade de citoquinina foi igual para ambos os tratamentos, com exceção das plantas de 110 dias, que obtiveram aumento na concentração de citoquinina em detrimento da colonização micorrízica. A concentração de auxina foi essencialmente igual para plantas colonizadas e o controle. As concentrações de giberilinas foram maiores em plantas micorrizadas. Devido ao baixo teor de fósforo em que o experimento foi realizado, acredita-se que o incremento na absorção do elemento, desempenhado pela micorriza, tenha resultado no aumento das concentrações de ABA (DANNEBERG *et al.*, 1992).

Em condições naturais, GORSI (2002) identificou a presença de associação micorrízica em todas as plantas coletadas em Azad Jammu e Kashimira, na Índia. Foram 80 espécies diferentes, dentre elas, cinco pertencentes à família *Asteraceae*: *Artemisia gmelinii*, *Artemsia marítima* L., *Artemisia scoparia* Waldst., *Sussurea heteromalta* e *Xanthium strumarium* L.

No entanto, poucos estudos sobre o emprego de FMA visando o aumento na produção de princípios ativos estão disponíveis, e nenhum trata especificamente de *Artemisia annua* L.

ABU-ZEYAD *et al.* (1999) verificaram a presença de colonização micorrízica em *Castanospermum australe* e sua influência na produção de castopermina, um alcalóide sintetizado pela planta que é eficiente contra AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida) e câncer. Em campo, observaram que quanto maior a porcentagem de colonização, maior os teores de castopermina na planta. Esse resultado se repetiu em testes feitos em casa de vegetação, demonstrando que o teor do princípio ativo e a biomassa total das plantas foram significativamente maiores em tratamentos com adição de P e inoculação de *Glomus intraradices* e *Gigaspora margarita*, sendo que a concentração aumentou de 1,6 mg/100 g de folhas da testemunha para 3,5 e 2,9 mg/100g de folhas, respectivamente.

O mesmo efeito positivo foi encontrado em estudo que testou o efeito do FMA *Glomus fasciculatum* na colonização das raízes, crescimento, concentração de óleo essencial e aquisição de nutrientes de três diferentes cultivares de *Mentha arvensis* (menta): Kalka, Shivalik e Gomti, sob condições de campo. Os resultados demonstraram aumento significativo na colonização micorrízica das raízes, na altura da

planta, na matéria fresca e seca da parte aérea, concentração e rendimento de óleo essencial. A colonização surtiu mais efeito na cultura de Shivalik do que na Kalka e Gomti, apresentando maior colonização das raízes, crescimento e produção de menta, indicando que é mais dependente de micorrizas que as outras duas espécies. A inoculação também surtiu efeito positivo na nutrição da planta, aumentando a absorção de P, N e K, principalmente de P, apresentando-se como uma alternativa econômica no cultivo da menta (GUPTA *et al.* 2001).

No Brasil, os efeitos de diferentes FMAs na produção e qualidade de óleos essenciais da mesma planta cultivada com diferentes doses de fósforo foram avaliados. Empregaram-se quatro FMAs - *Glomus clarum, Glomus etunicatum, Gigaspora margarita, Acaulospora scrobiculata*, e quatro doses de P: 0, 50, 100 e 200 mg kg^{-1}. Observou-se nos resultados que sem adubação fosfatada, os fungos *G. margarita* e *G. clarum* aumentaram em 206 e 198%, respectivamente, a produção de matéria fresca em relação ao controle. A maior produção de matéria fresca foi observada no tratamento de *A. scrobiculata* com 133 mg kg^{-1} de fósforo. Na ausência de adubação fosfatada, teores de óleos essenciais e de mentol no óleo foram menores em plantas sem inoculação, e os tratamentos com inoculação proporcionaram incrementos de até 89% nos teores de óleos e de mentol, em relação ao tratamento sem inoculação. Com o incremento da adubação fosfatada, não foram observados incrementos dos teores de óleos essenciais e mentol em razão dos FMAs. As maiores produtividades de óleos essenciais e de mentol nos óleos foram encontradas em plantas com inoculação de *Acaulospora scrobiculata* nas concentrações de P de 126 e 123 mg kg^{-1} de solo.

KAPOOR *et al.* (2002 a, b; 2004) estudaram o efeito da associação de dois FMAs, *Glomus macrocarpum* e *Glomus fasciculatum,* na concentração e composição do óleo essencial de *Coriandrum sativum,* e na biomassa e concentração de óleos essenciais em *Anethum graveolens* L., *Trachyspermum ammi* (Linn.) e *Foeniculum vulgare*. Em *Coriandrum sativum,* constataram aumento de 43% na concentração de óleo essencial nas frutas. A eficácia da colonização também foi observada na qualidade do óleo essencial produzido. Os resultados da aplicação dos FMAs na biomassa e concentração de óleo essencial em *Anethum graveolens* L. e *Trachyspermum ammi* (Linn.) demonstraram significativa variação nos efeitos dos dois fungos. Nas plantas micorrizadas, houve aumento da biomassa e a concentração do óleo essencial aumentou 90% em *A. graveolens* e 72% em *T. ammi* (Linn.). Também, observou-se que o *G.*

macrocarpum foi mais eficiente que o *G. fasciculatum* no aumento da concentração de óleo essencial.

Em *Foeniculum vulgare*, planta aromática muito utilizada como agente flavorizante na culinária européia, japonesa, indiana e norte americana, os FMAs promoveram aumento significativo na biomassa e produção de óleo essencial. Nos tratamentos com inoculação de *G. fasciculatum* e adição de fosfato, equivalente a 20 kg ha^{-1}, houve um aumento de 78% na produção de óleo essencial.

WEI e WANG (1991) descreveram significativo aumento da síntese de óleo volátil, biomassa e absorção de fósforo, enxofre e micronutrientes em *Schizonepeta tenuifolia* colonizada por FMA.

A influência do fungo *Piriformospora indica* na biomassa de duas plantas medicinais tradicionalmente utilizadas na Índia, *Spilanthes calva*, responsável pelo aumento de imunidade e *Whathania somnifera*, da qual são originados mais de 91 produtos farmacêuticos, foi estudada. Constatou-se significativo aumento no desenvolvimento da biomassa das plantas em resposta à inoculação, com incremento de nove vezes em *S. calva* e de oito vezes em *W. somnifera*, além de um aumento de cerca de quatro vezes no número de flores ou inflorescências (RAI *et al*. 2001).

Coleus forskohlii, uma importante planta medicinal cujo princípio ativo é empregado no tratamento de doenças cardiovasculares, glaucoma e alguns tipos de câncer, foi analisada com o objetivo de investigar a influência de 11 diferentes espécies de FMAs no crescimento, nutrição de fósforo e produção de "forskolin" nas raízes da planta. Os fungos inoculados foram: *Acaulospora laevis*, *Gigaspora margarita*, *Glomus bagyarajii*, *G. monosporum*, *G. fasciculatum*, *G. mosseae*, *G. leptotichum*, *G. macrocarpum*, *G. intraradices*, *G. etunicatum* e *Scutellospora calospora*. Segundo os autores, Coleus apresentou diferentes respostas à inoculação dos FMAs, concluindo-se que a colonização das raízes por *Glomus bagyarajii* foi a mais eficiente, seguida por *Scutellospora calospora*, que promoveram maior concentração do princípio ativo. Quanto à absorção de fósforo, tempo para transplante, crescimento e produção de matéria seca da parte aérea, o melhor resultado também foi obtido em plantas colonizadas por *Glomus bagyarajii* diferindo significativamente dos demais tratamentos (SAILO & BASIARAJ 2005).

PORTUGAL e QUITÉRIO (2005) estudaram o efeito da micorrização em *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, planta que tem como principal valor econômico a produção de esteviosídeo, um edulcorante sem calorias e que possui também propriedades

cardiotônicas. Os FMAs inoculados foram: *Glomus macrocarpum, Glomus intraradices, Glomus etunicatum, Entrophospora* sp, *Acaulospora* sp e dois isolados das raízes de culturas pré-estabelecidas de estévia denominados CP13 e CPVG. O experimento realizado em casa de vegetação, em solo esterilizado, determinou a porcentagem de colonização micorrízica, a massa da matéria seca da parte aérea e a produção de esteviosídeo nas plantas. Os melhores resultados na produção de biomassa foram obtidos em plantas colonizadas por *G. intraradices.* A maior produção de esteviosídeo também foi obtida em plantas colonizadas por *G. intraradices*, sendo 350% superior ao controle. Os resultados mostraram que os fungos nativos, pré-estabelecidos na cultura podem não ser os mais eficientes para o desenvolvimento das plantas. PORTUGAL (2006) também constatou que maior produção de biomassa de estévia foi obtida com o cultivo em aeroponia, enquanto no campo, obteve-se maior quantidade acumulada de esteviosídeos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimento 1

O experimento foi realizado em câmara de crescimento da Conviron (FIGURA 3) localizada no CPQBA/UNICAMP programada com fotoperíodo de 12 horas, temperatura diurna de 25^{o}C e noturna de 20^{o}C, com 50% de umidade relativa do ar, e 400 µmol m^{-2} s^{-1} , em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento.

O solo utilizado foi um latossolo vermelho eutroférrico coletado no campo experimental do CPQBA, o qual foi peneirado e esterilizado por duas horas em autoclave, a 121^{o}C em baldes de 20 L. A análise química do solo, feita anteriormente à calagem, foi realizada no Laboratório de Análises de Solo e Planta do IAC (TABELA 1).

Tabela 1 - Análise química do solo utilizado no experimento 1.

pH	P	K	Ca	Mg	V	M.O.	H+Al	S.B.	CTC
	mg /dm^{-3}	_____	mmol/dm^{-3}	_____	%	g dm^{-3}	_____	mmol /dm^{-3}	_____
4,9	15	2,8	27	16	49	43	47	45,8	92,8

Figura 3 - Instalações do Experimento 1 em câmara de crescimento. Vista externa (A); Vista interna - cerca de 20 dias após semeadura (B).

Após esterilização o solo foi colocado em vasos de 2,5 L previamente lavados e esterilizados com vapor e álcool 70%.

O experimento compreendeu oito tratamentos com cinco repetições cada, sendo sete inoculados com os FMAs: *Glomus intraradices*, *Scutellospora gregaria*, *Acaulospora scrobiculata*, *Glomus clarum*, *Entrophospora* sp, *Glomus etunicatum* e *Glomus macrocarpum*, e uma testemunha sem inoculação.

Os inóculos foram obtidos na coleção do Setor de Microbiologia do Solo do Centro de Solos do IAC e constaram de pedaços de hifas e raízes colonizadas de *Brachiaria brizantha*, planta utilizada como hospedeira para multiplicação de esporos.

As sementes de artemísia, híbrido CPQBA 3M x POP, foram obtidas na Divisão de Agrotecnologia do CPQBA/UNICAMP e são oriundas de plantas que passaram por processo de melhoramento genético por cruzamentos controlados.

Foram utilizados cerca de 1000 esporos por vaso de cada FMA, colocados numa camada cerca de 2 cm abaixo das sementes.

A semeadura ocorreu com número aleatório de sementes, que após 15 dias sofreu o primeiro desbaste deixando-se 5 plantas por vaso. O segundo desbaste ocorreu sete dias depois, deixando-se as duas plantas mais homogêneas em relação à altura e número de folhas. As plantas foram irrigadas com uma solução de Minercal® na concentração de 2 t ha $^{-1}$, após o desbaste. A irrigação foi feita diariamente com 100 mL de água destilada por vaso, de acordo com a necessidade das plantas.

A colheita da parte aérea e raízes ocorreu aos 65 dias após a semeadura, época de pré-florescimento, e as variáveis analisadas foram: colonização micorrízica, matéria seca da parte aérea total (MSPA), matéria seca de folhas (MSF), teor de artemisinina e teor de nutrientes nas folhas. A partir do teor de nutrientes e artemisinina, calculou-se a quantidade acumulada por planta.

3.2 Experimento 2

Os dois FMAs que melhor influenciaram a produção de artemisinina no Experimento 1, *Glomus macrocarpum* e *Scutellospora gregaria,* foram empregados em solo esterilizado e não esterilizado.

O experimento foi realizado em casa de vegetação em vasos de 8 L e delineamento estatístico inteiramente casualizado, totalizando oito tratamentos com sete repetições: dois FMAs, solo esterilizado e não esterilizado e dois controles, com e sem adubação fosfatada.

O tipo de solo e procedência foram os mesmos do experimento anterior. O solo foi corrigido anteriormente à autoclavagem, com 2 t ha^{-1} de Minercal® e incubado por um período de 30 dias. A análise química do solo após calagem consta na TABELA 2.

Tabela 2 - Análise química do solo utilizado no experimento 2 .

pH	P	K	Ca	Mg	V	M.O.	H+Al	S.B.	CTC
	mg /dm^{-3}	_____	mmol/dm^{-3}	_____	%	g/dm^{-3}	_____	mmol/dm^{-3}	_____
5,2	23	3,7	53	25	73	41	31	81,7	112,7

A adubação com super fosfato simples foi feita individualmente em cada vaso controle, recebendo o equivalente a 90 kg ha^{-1} de P.

A semeadura, esterilização e inoculação foram realizadas da mesma forma que no Experimento 1. A irrigação foi feita de acordo com a necessidade das plantas, pelo sistema de irrigação automático, três vezes ao dia por 15 segundos cada.

A colheita foi feita 75 dias após a semeadura, no pré-florescimento, e posteriormente analisou-se a matéria seca da parte aérea total, matéria seca de folhas, colonização micorrízica, teor e acúmulo de artemisinina e nutrientes nas folhas.

3.3 Variáveis Analisadas

3.3.1 Massa da matéria seca da parte aérea total e de folhas

A parte aérea total (folhas e caules) coletada de ambos os experimentos foi desidratada em estufa de circulação forçada a 40 ^{o}C até apresentar massa constante. Foram obtidos os valores de matéria seca total da parte aérea de cada planta. Em seguida, os ramos foram desfolhados para a obtenção da matéria seca das folhas. Após moagem do material foliar em moinho do tipo martelo em malha de 40 mesh, foi armazenado em freezer para melhor conservação até o momento das análises para determinação do teor de artemisinina e nutrientes.

3.3.2 Teor e acúmulo de macro e micronutrientes

A análise química das folhas de artemísia para obtenção dos teores de nutrientes foi realizada no Laboratório de Análises de Solo e Planta do IAC, pelo método ICP-OES, após digestão nítrico-perclórica, e o N determinado pelo método Kejdahl (BATAGLIA *et al*., 1983). . O acúmulo dos nutrientes foi calculado a partir dos teores.

O índice de eficiência de utilização do nutriente foi calculado segundo SIDDIQI & GLASS (1981), da seguinte forma: IEU = (matéria seca)^2/ acúmulo do nutriente.

3.3.3 Porcentagem de colonização micorrízica

As raízes coletadas foram separadas, lavadas e conservadas em álcool 50% para avaliação da colonização micorrízica.

Amostras de raiz foram clarificadas em KOH 5% por 10 minutos em banho-maria, acidificadas com HCl 10% e coradas com trypan-blue por 10 minutos (PHILLIPS e HAYMAN, 1970). A porcentagem de colonização foi avaliada pelo método da placa quadriculada com auxílio de microscópio estereoscópio (GIOVANETTI e MOSSE, 1980).

3.3.4 Teor de artemisinina

O método empregado foi desenvolvido e é utilizado pela Divisão de Fitoquímica do CPQBA/UNICAMP baseado em estudos anteriores.

Os extratos foram obtidos a partir de 0,5g de folhas secas e moídas, adicionando-se 15mL de metanol, em Ultra Turrax, por 3 minutos, 6000 rpm à temperatura ambiente. O extrato foi filtrado a vácuo em funil de placa porosa com papel de filtro e evaporado a secura em rotaevaporador.

O cartucho de Florisil® (170µm, 80A) foi completado com mais 1g de Florisil® FX 0284-1 (60-100 mesh). Conectado ao Manifold, foi condicionado com 10 mL de hexano, e em seguida introduziu-se o extrato dissolvido em 2 mL de diclorometano, eluindo com 3 mL de hexano e 60 mL de diclorometano. As frações foram coletadas separadamente e monitoradas por CCD**.** A fração de diclorometano das amostras foi evaporada à secura e ressuspendida em metanol grau HPLC avolumada em balão volumétrico de 5 mL, filtrada e injetada no cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado ao detector de índice de refração (CLAE/IR).

O procedimento e as injeções foram realizados em triplicata para cada uma das amostras. As condições cromatográficas para determinação do teor de artemisinina estão descritas na TABELA 3.

Tabela 3 - Condições cromatográficas para determinação do teor de artemisinina.

Equipamentos e acessórios	**Especificação**
Bomba	HPLC Waters 515
Coluna	- CN Phenomenex - (250 mm x 4,6 mm x 5μm)
Volume de injeção	20μL
Fluxo	1 mL min^{-1}
Fase móvel	- H_2O: Metanol (60:40 v/v) - H_2O: Acetonitrila (70:30 v/v)
Detector	Índice de Refração Waters 2414
Sensibilidade	32
Temperatura interna detector	35°C
Software	Empower / Waters

3.4 Análise Estatística

Os dados obtidos - matéria seca da parte aérea, matéria seca de folhas, teor de artemisinina, colonização micorrízica e teor, acúmulo e índice de eficiência de utilização dos nutrientes nas folhas, foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey a 5% utilizando-se o programa SANEST (ZONTA *et al.* 1984).

Os valores em porcentagem referentes à colonização micorrízica e teor de artemisinina foram transformados em arco seno antes de serem submetidos aos testes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento 1

Os resultados referentes ao crescimento das plantas do primeiro experimento constam na TABELA 4. O presente trabalho não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos quanto à massa da matéria seca da parte aérea, indicando que as plantas não forma influenciadas pela inoculação dos diferentes fungos.

Como já preconizado por PACOVSKY (1984), nos estudos sobre fisiologia de micorriza, é importante comparar plantas com o mesmo grau de desenvolvimento e

estádio fenológico para não se incorrer em erros de interpretação dos resultados. Nesse aspecto, foi interessante obter crescimento semelhante entre as plantas micorrizadas e o controle sem inoculação, pois a comparação entre plantas micorrizadas e não micorrizadas de massa semelhantes evita o efeito de diluição/concentração e permite uma observação mais precisa sobre a influência dos FMAs no metabolismo secundário da planta, e conseqüentemente, na produção de artemisinina.

Entretanto, a matéria seca de folhas variou com o tratamento, sendo que as plantas micorrizadas por *G. macrocarpum* e *G. clarum* não difeririam do controle, enquanto que as demais apresentaram massa de folhas significativamente inferior, com média de 3,31g por vaso.

Esses resultados contrariam outras observações em que se obteve ganho na produção de biomassa das plantas em razão da inoculação de FMAs, que variaram entre 78 e 350% dependendo da planta e do fungo empregados.

ABU-ZEYAD *et al.* (1999) demonstraram que *Castanospermum australe*, obteve aumento significativo da biomassa da planta com a inoculação de FMAs e constataram que as plantas colonizadas por *Glomus* spp foram superiores às plantas colonizadas por *Gigaspora margarita.* O mesmo efeito positivo foi constatado por outros autores em diferentes plantas medicinais e FMAs: KAPOOR *et al*. (2002 a, b; 2004) em *Anethum graveolens, Trachypermum ammi* e *Foeniculum vulgare;* RAI *et al*. (2001) em *Spilanthes calva* e *Witania somnifera;* GUPTA *et al.* (2001) e FERREIRA *et al* (2004) em *Mentha arvensis*.

O fato de as plantas terem crescido em um ambiente controlado, mais artificial, talvez tenha prejudicado o pleno desempenho da associação micorrízica estabelecida na artemísia. Fatores como luminosidade e aeração do ambiente de cultivo podem não ter sido, qualitativamente, os mais adequados para sustentar a presença do fungo no hospedeiro, desenvolvendo, de certa forma, uma interação parasítica, provavelmente com maior dreno de carbono pelos FMAs, resultando na menor produção de massa foliar.

Tabela 4 - Matéria seca da parte aérea (MSPA) e matéria seca de folhas (MSF) de *Artemisia annua* L. sob influência de diferentes fungos micorrízicos arbusculares.

Tratamento	MSPA	MSF
	g	
Controle	7,80 a	3,94 a
Glomus macrocarpum	7,45 a	3,00 ab
Glomus clarum	7,44 a	2,99 ab
Glomus intraradices	7,33 a	2,73 b
Entrophospora sp	6,94 a	2,78 b
Acaulospora scrobiculata	6,56 a	2,39 b
Scutelospora gregaria	6,54 a	2,31 b
Glomus etunicatum	6,31 a	2,71 b

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Assim como em SAILO e BAGYARAJ (2005) que obtiveram variadas porcentagens de colonização dentre as 11 espécies de FMAs estudados em coleus, a colonização de *Artemisia annua* no presente estudo apresentou uma adequada porcentagem de colonização que variou entre 34,58 e 46,71% (TABELA 5). *S. gregaria e G. macrocarpum* obtiveram maiores médias, diferindo significativamente dos demais. O controle, feito em solo esterilizado e sem inoculação de FMA, apresentou o resultado esperado, não apresentando colonização nas raízes.

Tabela 5 - Colonização micorrízica em *Artemisia annua* L. colonizada por sete espécies de fungos micorrízicos arbusculares.

Tratamento	Médias
	%
Controle	0 c
Glomus macrocarpum	46,31 a
Glomus clarum	35,08 b
Glomus intraradices	39,45 ab
Entrophospora sp	34,58 b
Acaulospora scrobiculata	34,77 b
Scutelospora gregaria	46,71 a
Glomus etunicatum	36,49 ab

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%

Diferenças na porcentagem de colonização entre diferentes FMAs numa mesma planta são comumente descritas na literatura. Em plantas medicinais foram observadas diferentes porcentagens em *Coriandrum sativum* (KAPOOR *et al.* 2002) e *Foeniculum*

vulgare (KAPOOR *et al.* 2004), ambas colonizadas por *G. macrocarpum* e *G. fasciculatum.*

Em relação à produção de massa foliar, a colonização correlacionou-se significativa e negativamente (r = - 0.86 $p > 0,007$), indicando possível efeito negativo da micorrização, ou seja, os FMAs que se estabeleceram mais abundantemente nas raízes causaram um maior desequilíbrio na associação, provavelmente promovendo maior dreno de C, resultando em menor produção de fitomassa.

Diferenças significativas quanto à produção de artemisinina foram observadas entre os FMAs, obtendo-se tratamentos que tanto elevaram o teor do princípio ativo quanto diminuíram (TABELA 6).

As plantas colonizadas por *G. macrocarpum* obtiveram maior produção de artemisinina e diferiram significativamente dos demais tratamentos, com aumento de 39,03% quando comparado ao controle. *S. gregaria* também apresentou aumento de 7,31% e não diferiu significativamente do controle. Nas plantas colonizadas pelos demais FMAs, houve decréscimos que variaram entre 7 e 53% quando comparados ao controle sem inoculação, sendo que nas plantas colonizadas por o *G. clarum* a diminuição na produção de artemisinina foi mais pronunciada, 53%.

Tabela 6 - Teor de artemisinina em *A. annua* colonizada por diferentes espécies de fungos micorrízicos arbusculares.

Tratamento	**Teor**
	__%__
Controle	0,41 bc
Glomus macrocarpum	0,57 a
Glomus clarum	0,19 f
Glomus intraradices	0,38 cd
Entrophospora sp	0,37 cd
Acaulospora scrobiculata	0,25 e
Scutelospora gregaria	0,44 b
Glomus etunicatum	0,36 d

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

KAPOOR *et al.* (2002) também observaram diferentes resultados com a inoculação de dois FMAs, *G. macrocarpum* e *G. fasciculatum,* em *Coriandrum sativum* L., obtendo aumento de 28 e 43% no teor do princípio ativo, respectivamente. Nenhuma

literatura consultada descreveu queda na produção de princípios ativos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas associadas a FMA.

Assim como o teor, o acúmulo de artemisinina também variou significativamente entre os tratamentos, apresentando quedas de produção que variaram entre 12, 02% em plantas colonizadas por *S. gregaria* e 53,96% em plantas colonizadas por *G. clarum* (TABELA 7). Apenas o tratamento que recebeu inoculação de *G. macrocarpum* apresentou aumento na produção de artemisinina, superando a produção do controle em 34,69%, diferindo significativamente dos demais tratamentos.

Tabela 7 - Acúmulo de artemisinina em *A. annua* colonizada por diferentes espécies de fungos micorrízicos arbusculares.

Tratamento	**Acúmulo**
	__mg/vaso__
Controle	32,43 ab
Glomus macrocarpum	43,68 a
Glomus clarum	14,93 d
Glomus intraradices	26,94 bc
Entrophospora sp	26,23 bcd
Glomus etunicatum	21,92 bcd
Acaulospora scrobiculata	15,73 cd
Scutelospora gregaria	28,53 b

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

Os diferentes resultados obtidos entre espécies de FMAs inoculados, demonstram que o efeito da micorrização no desenvolvimento da planta é influenciado tanto pela planta hospedeira quanto pelo o FMA. Diferentes isolados de FMA podem resultar em diferentes efeitos na mesma planta (JAKOBSEN *et al.*, 1992), inclusive observando-se um comportamento parasítico, que prejudica a produção de metabólitos secundários.

Quanto ao teor de nutrientes, o mais evidente efeito da associação micorrízica foi a diminuição significativa dos teores de Mn, observando-se uma redução de 37% nas plantas colonizadas por *G. macrocarpum* e *G. etunicatum* quando comparadas ao controle (TABELA 8).

Em alguns casos, a micorrização da planta pode influenciar na absorção de concentrações excessivas de certos elementos do solo, resultando na maior retenção nas

raízes e menor translocação para a parte aérea. Esse efeito foi descrito por CARDOSO *et al.* (2003), que avaliaram o efeito intrínseco do FMA na absorção e translocação de Mn por plantas de soja, observando que absorção do nutriente foi superior em plantas não micorrizadas e que em plantas colonizadas por *G. macrocarpum* houve maior retenção de Mn nas raízes, indicando a diminuição de sua translocação para a parte aérea.

Os teores de N e de Ca nas folhas de artemisia não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (TABELA 8). Com exceção do controle sem inoculação, os maiores teores de P foram encontrados nas plantas colonizadas por *G. macrocarpum, Entrophospora* sp, *G. clarum* e *G. intraradices.*

Assim como em artemisia, a micorrização de *Anethum graveolens* e *Trachyspermum ammi* em experimento realizado em solo esterilizado, também resultou no aumento do teor de P nas plantas e diferiu significativamente do controle sem inoculação (KAPOOR *et al.* 2002). Em *Coriandrum sativum*, as plantas colonizadas por *G. macrocarpum e Glomus fasciculatum* também apresentaram maior teor de P quando comparadas às plantas não micorrizadas.

O mais conhecido benefício do FMA ao hospedeiro é o aumento da absorção de nutrientes minerais, principalmente fósforo. O fosfato inorgânico, a maior fonte de P disponível para as plantas, possui pouca mobilidade no solo. As hifas radicais dos FMAs se estendem além da zona de depleção das raízes da planta hospedeira aumentando a superfície de absorção de P. (SMITH e READ, 1997). O mesmo ocorre para os demais nutrientes de baixa mobilidade, como o Zn e Cu.

Considerando-se que os teores de N e P são dois dos elementos que mais exercem influência sobre a produção da planta (MAGALHÃES, 1996; FIGUEIRA, 1996), a falta de diferença significativa entre os tratamentos com relação à produção de matéria seca da parte aérea pode ser em parte explicada, em parte, pela similaridade dos teores encontrados nas folhas de artemisia. As plantas colonizadas por *G. macrocarpum* apresentaram os maiores teores de K, P e Zn nas folhas além de menor teor de Mn (TABELA 8), o que pode ter promovido maior produção de fitomassa foliar (TABELA 4).

O efeito da micorrização sobre a absorção de Mn continua evidente também em relação aos acúmulos encontrados. Em média houve redução de 54% no acúmulo de Mn nas plantas micorrizadas (TABELA 9) por todos os FMAs empregados.

Exceto o acúmulo de P nas folhas que se mostrou significativamente maior nas plantas colonizadas por *G. macrocarpum*, para os demais nutrientes, as plantas micorrizadas não diferiram ou foram significativamente inferiores ao controle, exceto quanto ao acúmulo de Mn (TABELA 9). Somente para o acúmulo de N não houve diferença significativa entre os tratamentos, assim como ocorreu no teor (TABELA 8).

Assim como ABU-ZEYAD *et al.* (1999) que verificaram que o acúmulo de fósforo foi significativamente maior em *Castanospermum australe* colonizada por *G. intraradices* e *Gigaspora margarita*, a artemisia colonizada por *G. macrocarpum* apresentou maior acúmulo de P quando comparado ao controle.

Portanto, pode-se concluir que a micorrização da artemísia em solo esterilizado e mantendo-se as plantas em condições artificiais de cultivo (câmara de crescimento) não contribuiu para o crescimento (TABELAS 4 e 5) e nem absorção (TABELAS 8 e 9). Entretanto, as associações micorrízicas estabelecidas protegeram a planta dos altos níveis de Mn do solo, diminuindo seu teor e acúmulo nas folhas, ou seja, conferiram tolerância à planta quanto ao excesso de Mn no solo (TABELAS 8 e 9).

As plantas colonizadas por *G. macrocarpum* apresentaram maiores teor e acúmulo de artemisinina nas folhas (TABELAS 6 e 7), o que pode estar relacionado aos maiores teores e acúmulos de P e Zn nas plantas colonizadas por este FMA (TABELAS 8 e 9).

Tabela 8 - Teor de macro e micro nutrientes nas folhas de *A. annua* colonizada por sete espécies de fungos micorrízicos arbusculares.

	Teor								
	g kg^{-1}					mg kg^{-1}			
	N	**K**	**P**	**Ca**	**Mg**	**Cu**	**Fe**	**Mn**	**Zn**
Controle	36,36 a	24,56 ab	1,93 b	8,10 a	5,23 ab	62,93 a	16191,00 a	833,33 a	37,29 bc
G. macrocarpum	38,66 a	28,13 a	3,23 a	7,0 a	4,76 ab	51,46 ab	2975,00 b	523,33 b	50,20 a
G. etunicatum	36,23[a]	26,93 ab	2,70 ab	7,03 a	5,03 ab	48,36 b	2764,00 b	554,66 b	41,13 abc
***Entrophospora* sp**	44,63 a	25,56 ab	3,13 a	7,20 a	4,46 b	51,23 ab	4365,00 b	723,33 ab	41,83 ab
G. clarum	39,26 a	25,60 ab	2,96 a	7,16 a	6,10 a	47,13 b	2113,66 b	605,66 ab	44,76 ab
A. scrobiculata	37,89 a	26,23 ab	2,56 ab	7,03 a	5,36 ab	40,23 b	1655,33 b	624,33 ab	29,50 c
S. gregária	40,96 a	24,06 b	2,56 ab	6,56 a	5,23 ab	63,26 a	3028,66 b	693,66 ab	42,46 ab
G. intraradices	40,66 a	23,73 b	2,76 a	7,53 a	5,56 ab	46,53 b	3005,00 b	621,00 ab	39,20 abc

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 9 - Acúmulo de macro e micro nutrientes nas folhas de *A. annua* colonizada por sete espécies de fungos micorrízicos arbusculares.

	Acúmulo								
	mg/vaso					µg/vaso			
	N	**K**	**P**	**Ca**	**Mg**	**Cu**	**Fe**	**Mn**	**Zn**
Controle	142,16 a	96,80 a	7,50 abc	32,03 a	20,56 a	247,36 a	70941,82 a	3271,53 a	146,90 a
G. macrocarpum	115,7 a	84,43 ab	9,73 a	21,06 ab	14,33 ab	154,83 ab	8990,36 b	1582,79 b	151,06 a
G. etunicatum	98,00 a	73,06 abc	7,33 abc	19,13 b	13,66 ab	131,56 b	9385,00 b	1511,66 b	112,00 ab
***Entrophospora* sp**	89,73 a	71,03 abc	8,60 abc	20,00 b	18,23 ab	109,90 b	9927,39 b	2031,23 b	116,59 ab
G. clarum	117,69 a	76,59 abc	8,90 ab	21,33 ab	18,23 ab	141,50 ab	7504,40 b	1803,73 b	135,43 a
A. scrobiculata	90,56 a	62,66 bc	6,13 bc	16,96 b	12,86 b	96,70 b	3965,36 b	1495,36 b	70,73 b
S. gregária	94,83 a	54,83 c	5,93 c	15,36 b	15,26 ab	144,73 ab	9014,93 b	1596,93 b	97,86 ab
G. intraradices	111,09 a	65,73 bc	7,53 abc	20,66 b	12,19 b	127,23 b	6719,63 b	1698,86 b	106,93 ab

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

4.2 Experimento 2

4.2.1 Massa da matéria seca da parte aérea e folhas

Em solo esterilizado, não houve diferenças significativas na produção de matéria seca da parte aérea entre as diferentes espécies de FMAs inoculadas, obtendo-se uma média entre os tratamentos de 25,3 g (TABELA 10). Em solo não esterilizado, houve redução na produção de biomassa para os tratamentos com *G. macrocarpum*, *S. gregaria* e controle sem fósforo, ou seja, as plantas do controle + P apresentaram maior produção de matéria seca de parte aérea. Quando se comparam os solos, apenas o controle e controle que recebeu adubação não apresentaram diferenças significativas entre o esterilizado e não esterilizado. As plantas dos tratamentos com inoculação dos FMAs obtidas em solo esterilizado superaram significativamente as cultivadas em solo não esterilizado.

Tabela 10 - Matéria seca da parte aérea e matéria seca de folhas de *A. annua* L. colonizada por *Glomus macrocarpum* e *Scutelospora gregaria* ou não colonizada (controle e controle + P) cultivada em solo esterilizado (SE) e solo não esterilizado (SNE).

	G.macrocarpum	***S. gregaria***	**Controle**	**Controle + P**
		MSPA		
		g		
SE	25,55 a A	25,64 a A	24,41 a A	25,60 a A
SNE	23,44 b B	22,19 b B	22,85 b A	26,06 a A
		MSF		
		g		
SE	11,08 ab A	11,00 ab A	11,46 a A	10,08 b B
SNE	9,96 b B	9,62 b B	9,66 b B	12,10 a A

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam fungos dentro de solos e letras maiúsculas, solos dentro de fungos.

Em solo não esterilizado, o controle que recebeu adubação fosfatada apresentou um produção de folhas significativamente maior que o controle sem fósforo e que as plantas dos tratamentos que receberam inoculação de *G. macrocarpum* e *S. gregária.* Exceto para o controle + P, as melhores produções foram obtidas em solo esterilizado, provavelmente porque os FMAs introduzidos foram mais eficientes que os FMAs nativos e o solo esterilizado permitiu um melhor desempenho da associação devido à baixa ou nenhuma competição com os demais FMAs nativos e outros microorganismos

já estabelecidos no solo não esterilizado. Portanto, os FMAs nativos somente foram eficientes em promover aumento na biomassa foliar com a adição de P ao solo. Em uma condição de menor disponibilidade de P no solo, os FMAS nativos e introduzidos somente causaram aumento na massa de folhas no solo esterilizado.

Portanto, maior crescimento das plantas ocorreu quando colonizadas por FMAs nativos (solo não esterilizado) mas no solo com adição de P. Esses FMAs nativos somente foram eficientes em promover aumento de massa foliar.

4.2.3 Porcentagem de colonização micorrízica

A maior porcentagem de colonização micorrízica foi encontrada nas raízes das plantas em solo não esterilizado (TABELA 11), o que era esperado, devido à presença dos FMAs nativos presentes no solo. As plantas colonizadas por *G. macrocarpum* tiveram maior colonização micorrízica, seguidas pelas colonizadas por *S. gregaria*, em ambos os solos. As plantas dos tratamentos que não receberam inóculo, apesar de se diferenciarem estatisticamente dos demais, também obtiveram uma colonização adequada das raízes pelos FMAs nativos do solo, apesar de terem sido significativamente menores que as obtidas nas plantas dos tratamentos com inoculação.

As plantas dos controles do solo esterilizado não apresentaram estruturas fúngicas em suas raízes, verificando-se a eficiência da esterilização.

Tabela 11 – Porcentagem de colonização micorrízica de *A. annua* L. colonizada por *Glomus macrocarpum* e *Scutelospora gregaria* ou não colonizadas (controle e controle + P) cultivada em solo esterilizado (SE) e solo não esterilizado (SNE).

	Colonização			
	G. macrocarpum	***S. gregaria***	**Controle**	**Controle + P**
		%		
SE	61,84 a B	47,59 b B	0,00 c B	0,00 c B
SNE	71,75 a A	63,82 b A	43,54 c A	31,71 d A

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam fungos dentro de solos e letras maiúsculas, solos dentro de fungo.

4.2.3 Teor e acúmulo de artemisinina

No solo não esterilizado, os maiores teores de artemisinina foram obtidos nas plantas dos controles com e sem adição de fósforo, superando significativamente as plantas colonizadas também por *G. macrocarpum* e *S. gregária*, que não diferiram significativamente entre si. Provavelmente a planta já está adaptada aos FMAs nativos

do solo que foi utilizado no experimento, visto que a domesticação e adaptação da espécie foram realizadas no mesmo campo experimental do qual foi coletado.

Em solo esterilizado, plantas colonizadas por *G. macrocarpum* apresentaram teores de artemisinina significativamente maiores que plantas colonizadas por *S. gregaria* e os controles, confirmando os resultados do primeiro experimento.

Quando comparados os solos, novamente não se observa diferenças significativas entre o esterilizado e não esterilizado para os tratamentos com *S. gregaria*, controle com adição de fósforo e controle. Plantas colonizadas por *G. macrocarpum* obtiveram melhor resultado em solo esterilizado, mostrando influência na produção de artemisinina, porém essa vantagem se perde quando se trata de solo não esterilizado. Esse tratamento apresentou um aumento de 20,5% no teor de artemisinina em relação ao controle (planta não micorrizada). Em solo não esterilizado, a competição com fungos micorrízicos nativos é evidente e anula a influência positiva do *G. macrocarpum* na produção do princípio ativo.

As plantas do controle com adição de fósforo tiveram queda de produção de artemisinina em ambos os solos. Além disso, observou-se que as planta colonizadas por FMAs nativos não foram eficientes em promover maior teor do princípio ativo, pois não diferiram das não micorrizadas (controle do solo esterilizado).

As plantas colonizadas por *S. gregaria* apresentaram menor produção de artemisinina em qualquer condição de solo, esterilizado ou não. Esse efeito demonstra que a associação entre esse FMA e a planta foi provavelmente parasítica e influenciou negativamente a produção de artemisinina.

Tabela 12 – Acúmulo e teor de artemisinina nas folhas de *Artemisia annua* colonizada por *Glomus macrocarpum* e *Scutelospora gregaria* ou não colonizada (controle e controle + P) cultivada em solo esterilizado (SE) e solo não esterilizado (SNE).

	G. macrocarpum	***S. gregaria***	**Controle**	**Controle + P**
		Acúmulo (µg/g)		
SE	91,38 a A	31,28 c A	75,43 ab A	58,45 b A
SNE	47,35 ab B	34,13 b A	60,19 a A	63,50 a A
		Teor (%)		
SE	0,81 a A	0,32 c A	0,67 ab A	0,48 b A
SNE	0,46 b B	0,42 b A	0,63 a A	0,54 ab A

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam fungos dentro de solo e letras maiúsculas, solos dentro de fungo.

Confirmando os resultados do primeiro experimento, em solo esterilizado, as plantas colonizadas por *G. macrocarpum* superaram em 70% o acúmulo de artemisinina

nas folhas quando comparadas ao controle com adição de fósforo e em 56%, as plantas do controle sem adubação fosfatada (TABELA 12). As plantas colonizadas por *S. gregaria* diferiram dos demais tratamentos apresentando uma queda significativa na produção de artemisinina.

Em solo não esterilizado, as plantas dos controles, colonizadas por FMAs nativos, apresentaram maior acúmulo de artemisinina e superaram os tratamentos com FMAs introduzidos.

As plantas do controle, controle com adição de fósforo e plantas colonizadas por *S. gregaria* não apresentaram diferenças significativas entre si quando comparados solo esterilizado e não esterilizado. Apenas as plantas colonizadas por *G. macrocarpum* apresentaram maior desempenho em solo esterilizado do que em solo não esterilizado.

Esses resultados mostram pouca dependência da planta aos FMAs, visto que nas plantas do controle, não houve diferenças significativas na produção de artemisinina entre solo esterilizado ou não, ou seja, em relação às plantas não micorrizadas, evidenciando que os FMAs nativos também não foram eficientes ou não influenciaram a produção do antimalárico. PORTUGAL e QUITÉRIO (2005) já observaram resposta semelhante em *Stevia rebaudiana*, concluindo que nem sempre a micorrização que ocorre naturalmente com fungos nativos é a mais eficiente para a planta.

4.2.4 Teor e acúmulo de macro e micronitrientes

Os teores e acúmulos de nutrientes nas folhas encontrados estão de acordo com os observados por FIGUEIRA (1996) no estudo que desenvolveu sobre a nutrição de artemisia.

Como constatado no primeiro experimento, os teores de nutrientes estavam adequados, exceto para o K que estava abaixo e para o Cu e Mn que estavam em excesso (TABELA 13). Novamente observa-se o efeito protetor da micorriza ao excesso de Mn no solo, como relatado por NOGUEIRA E CARNEIRO (2002) podendo-se observar que, comparativamente ao controle, as plantas colonizadas por *G. macrocarpum* e *S. gregaria* apresentaram menores teores de Mn, inclusive sendo mais eficientes que os FMAs nativos quanto ao controle na absorção do elemento.

Sintomas visuais de toxicidade nas plantas não foram observados. Provavelmente a planta já está adaptada ao solo utilizado no experimento, visto que é o

mesmo do campo experimental em que foi realizada sua adaptação e domesticação ao longo de 10 anos.

Em solo esterilizado, os maiores teores de P, Ca, B, Fe e Zn foram encontrados nas plantas colonizadas por *G. macrocarpum* que superaram significativamente os teores encontrados nas plantas colonizadas por *S. gregaria* e os controles com e sem adição de fósforo. Os teores de N, K, Mg e Mn apresentaram-se maiores nas plantas do controle sem adição de fósforo. O tratamento com *S. gregaria* promoveu aumento significativo apenas no teor de Cu.

Em solo não esterilizado, o controle com adição de fósforo mostrou maiores concentrações de P, Ca, Mg, B e Mn em relação ao controle sem adição de P e os FMAs introduzidos (TABELA 13).

Tabela 13 - Teor de macro e micronutrientes nas folhas de *A. annua* L. colonizada por *Glomus macrocarpum* e *Scutelospora gregaria* ou não colonizada (controle e controle + P) cultivada em solo esterilizado (SE) e solo não esterilizado (SNE).

	G. macrocarpum	***S. gregária***	**Controle**	**Controle +P**
		P (g kg^{-1})		
SE	2,30 a B	2,06 b B	1,90 c B	1,80 cB
SNE	2,60 b A	2,60 b A	2,60 b A	2,80 a A
		Ca (g kg^{-1})		
SE	14,23 a A	10,06 d B	13,69 b A	12,00 c B
SNE	13,70 c B	14,10 b A	12,50 d B	15,33 a A
		Mg (g kg^{-1})		
SE	4,50 c A	4,13 d B	5,26 a A	5,00 b B
SNE	4,50 c A	5,43 a A	4,83 b B	5,43 a A
		N (g kg^{-1})		
SE	21,46 b B	22,03 b B	25,23 a B	22,53 b A
SNE	23,00 b A	22,86 b A	27,10 a A	21,66 c B
		K (mg kg^{-1})		
SE	17,43 b B	16,13 c B	19,03 a B	11,83 d B
SNE	20,26 c A	21,73 b A	22,83 a A	16,63 d A
		B (mg kg^{-1})		
SE	127,26 a B	108,00 c B	113,00 b B	77,59 d B
SNE	144,93 c A	148,40 b A	123,16 d A	160,03 a A
		Cu (mg kg^{-1})		
SE	38,93 b B	43,76 a B	34,46 c B	32,53 d B
SNE	49,73 a A	42,29 b A	46,36 b A	41,50 c A
		Fe (mg kg^{-1})		
SE	2928 a A	1119 c B	1207 c B	1520 b A
SNE	4047 a B	2026 b A	2026 b A	1589 c A
		Mn (mg kg^{-1})		
SE	879,66 c A	750,66 d A	1885,00 a A	1133,66 b A
SNE	439,33 b B	396,33 c B	408,66 c B	517,33 a B
		Zn (mg kg^{-1})		
SE	68,46 a B	49,73 c B	57,50 a B	52,26 c B
SNE	73,19 a A	66,46 b A	60,26 c A	56,79 d A

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam fungos dentro de solos e letras maiúsculas, solos dentro de fungos.

Similarmente ao primeiro experimento, o efeito benéfico dos FMAs introduzidos contra a absorção excessiva de Mn pode ser observada. As plantas colonizadas por *G. macrocarpum* e *S. gregaria* apresentaram acúmulos menores de Mn quando comparados aos FMAs nativos. Houve maiores acúmulos de Mn nas plantas controle com e sem adição de fósforo do que nas plantas micorrizadas tanto pelos fungos introduzidos quanto pelos fungos nativos. Isto significa que os FMAs introduzidos e os FMAs nativos protegeram a planta contra o excesso de Mn disponível no solo, o que não ocorreu nas plantas não micorrizadas (controles do solo esterilizado). Os teores de Cu, Fe e Zn foram maiores nas plantas colonizadas por *G. macrocarpum* e diferiram estatisticamente dos controles e das plantas colonizadas por *S. gregária*, no solo não esterilizado (Tabela 13).

Assim como no primeiro experimento, os acúmulos de nutrientes nas folhas de artemisia variaram de acordo com a espécie de FMA inoculada, como pode ser observado na Tabela 14. No solo esterilizado, constatou-se que não houve diferenças significativas no acúmulo de P entre as plantas colonizadas por *G. macrocarpum* e *S. gregaria* e os controles com e sem adição de fósforo. As plantas não micorrizadas do controle com adição de P apresentaram menores acúmulos de N, K, B, Cu e Zn. Maiores acúmulos de Fe, Zn e B foram observados nas plantas colonizadas por *G. macrocarpum.* Em solo não esterilizado, as plantas do controle com adição de P, ou seja, as colonizadas somente por FMAs nativos, apresentaram maiores acúmulos de P, Ca, Mg, N, B, Cu, Mn e Zn nas folhas.

O acúmulo de K nas folhas de artemisia não variou significativamente entre os tratamentos de solo e de fungos.

Quando os solos são comparados, observa-se que as plantas do controle com P apresentaram maiores acúmulos de nutrientes em solo não esterilizado, com exceção apenas do Mn. Isto significa que as plantas colonizadas somente pelos FMAs nativos acumularam significativamente mais nutrientes que as plantas não micorrizadas. A adição de P aumentou os teores e acúmulos dos nutrientes nas folhas de artemísia, ou seja, os FMAs nativos responderam positivamente à adubação fosfatada, estimulando a absorção de nutrientes pela planta (TABELA 13 e 14). Isto causou aumento na massa de folhas da planta, sem, entretanto, estimular a produção de artemisinina (TABELA 11).

FIGUEIRA (1996) observou influência direta dos nutrientes N, P, K, Ca, Mg e S na produção de artemisinina, o que, nas condições deste experimento, parece não ter ocorrido.

Tabela 14 - Acúmulo de nutrientes nas folhas de *A. annua* L. colonizada por *Glomus macrocarpum* e *Scutelospora gregaria* ou não colonizada (controle e controle + P) cultivada em solo esterilizado (SE) e solo não esterilizado (SNE).

	G. macrocarpum	***S. gregaria***	**Controle**	**Controle +P**
		P (mg/planta)		
SE	26 a A	23 a A	20 a A	20 a B
SNE	23 ab A	23 ab A	20 b A	33 a A
		Ca (mg/planta)		
SE	163 a A	113 b B	156 a A	123 b B
SNE	133 b B	133 b A	110 b B	186 a A
		Mg (mg/planta)		
SE	50 ab A	46 b A	60 a A	50 ab B
SNE	43 b A	50 b A	40 b B	63 a A
		N (mg/planta)		
SE	243 ab A	253 ab A	286 a A	226 b B
SNE	223 ab A	210 b B	240 ab B	266 a A
		K (mg/planta)		
SE	200 a A	186 a A	216 a A	123 b B
SNE	193 a A	203 a A	203 a A	203 a A
		B (µg/planta)		
SE	1466 a A	1180 b B	1293 ab A	790 c B
SNE	1383 b A	1383 b A	1100 c B	1876 a A
		Cu (µg/planta)		
SE	450 ab A	506 a A	396 bc A	330 c B
SNE	480 ab A	423 ab B	413 b A	503 a A
		Fe (µg/planta)		
SE	34480 a B	12859 b A	13803 b B	15403 b B
SNE	40516 a A	6656 c B	18076 b A	19363 b A
		Mn (µg/planta)		
SE	10136 bc A	8636 c A	21570 a A	11496 b A
SNE	4230 b B	3530 b B	3650 b B	6290 a B
		Zn (µg/planta)		
SE	816 a A	570 bc A	656 b A	530 c B
SNE	703 a B	590 b A	540 b B	693 a A

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Letra minúscula compara fungos dentro de solos e letra maiúscula compara solos dentro de fungos.

A colonização micorrízica correlacionou-se significativa e negativamente com os teores de Ca, Fe, Mn e acúmulos de N, K, Ca, Mg Cu, Fe e Mn, mas de forma positiva com o teor de P ($r = 0,79$, $p > 0,02$), o que pode indicar um possível efeito do fungo na absorção de P.

Nas condições do experimento, a inoculação de FMAs mostrou-se vantajosa somente em solo esterilizado, o que de certa forma inviabiliza sua aplicação no campo. Provavelmente, a planta já está adaptada às condições do solo empregado visto que é o

mesmo solo no qual passou por processo adaptativo na última década. Entretanto, como o cultivo de artemisia passa por uma formação de mudas em viveiro, novos estudos podem ser realizados em diferentes substratos e estádios de desenvolvimento da muda, para que se possa avaliar melhor o papel da micorriza, já que o estudo com plantas medicinais é escasso e com *Artemisia annua* L., o presente trabalho é pioneiro.

5 CONCLUSÕES

a) A inoculação de *Glomus macrocarpum* em solo esterilizado promoveu aumento no teor e acúmulo de artemisinina nas plantas de *Artemisia annua*.

b) Os fungos micorrízicos introduzidos protegeram a planta contra o excesso de Mn no solo.

c) As plantas colonizadas por fungos micorrízicos arbusculares nativos apresentaram maiores teor e acúmulo de artemisinina nas folhas.

d) Os fungos micorrízicos nativos não foram eficientes em promover o aumento na produção do princípio ativo nas plantas.

6 REFERÊNCIAS

ABU-ZEYAD, R.; KHAN, A.G.; KHOO, C. Occurrence of arbuscular mycorrhiza in *Castanospermum australe* A. Cunn. & Fraser and effects on growth and production castanospermine. **Mycorrhiza**. v. 9, p. 111-117, 1999.

BALINT, G.A. Artemisinin and its derivatives, an important new class of antimalarial agents. **Pharmacology & Terapeutics**. v. 90, p. 261-265, 2001.

BATAGLIA, O.C.; FURLANI, A.M.C.; TEIXEIRA, J.P.F.; FURLANI, P.R.; GALLO, J.R. **Métodos de análises químicas de plantas**. Circular 78, Instituto Agronômico, Campinas, 48p., 1983.

BUTLER, D.; MAURICE, J.; O´BRIEN, C. Time to put malaria control on the global agenda. **Nature**. v. 386, p. 535-541, 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, p. 1795-1801, 2001.

FIGUEIRA, G.M. Nutrição mineral, produção e concentração de artemisinina erm *Artemisia annua* L. Dissertação (Mestre) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 1996.

FINLAY, R.D. Mycorrhizal fungi and their multifunctional roles. **Mycologist**. v.18, p. 91-96, 2004.

FOGLIO, M.A. A terapia da artemisia. **Revista Pesquisa Fapesp**. n.118, p. 68-71, 2005.

FREITAS, M.S.M.C; MARTINS M.A., VIEIRA, I.J.C. Produção e qualidade de *Mentha arvenis* em resposta à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. Revista Agropecuária Brasileira, v.39, (9) p. 887-894. 2005.

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

GIOVANNETTI, M. & MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist.** v.84, p. 498-500, 1980.

GORSI, M.S. Studies on mycorrhizal association in some medicinal plants of Azad Jammu and Kashmir. **Asian Journal of Plant Sciences**. v.1, n.4, p. 383-387, 2002.

GUPTA, M.L.; PRASAD, A.; RAM, M.; KUMAR, S. Effect of vesicular arbuscular mycorrhiza (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. **Bioresearch Technology.** v. 81, p. 77-79, 2001.

HELGASON, T. e FITTER, A. The ecology and evolution pf the arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycologist.** v. 19, p. 96-101, 2005.

JACKOBSEN, I.; ABBOTT, L.K.; ROBSON A.B. External hyphae of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifilium subterraneum* L. I spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. **New Physiology.** n.120, p. 371-378, 1992.

KAPOOR, R.; GIRI, B.; MUKERJI, K.G. *Glomus macrocarpum*, a potential bioinoculant to improve essential oil quality and concentration in Dill (*Anethum graveolens* L.) and Carum (*Trachyspercum ammi* (Linn.) Sprague). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 18, p. 459-463, 2002a.

KAPOOR, R.; GIRI, B.; MUKERJI, K.G. Mycorrhization of coriander (*Coriandrum sativum* L) to enhance the concentration and quality of essential oil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 82, p. 339-342, 2002b.

KAPOOR, R.; GIRI, B.; MUKERJI, K.G. Improved growth and essential oil yield and quality in *Foeniculum vulgare* mill on mycorrhizal inoculation supplemented with P-fertilizer. **Bioresource Technology**. v. 93, p. 307-311, 2004.

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

KLAYMAN, DL. Weeding out malaria. **Natural History**. v.1, p. 18-26, 1989.

KEYS, J.D. Chinese herbs. P. 216-217. Swindow Book Company, Londres, 1976. In: LAUGHLIN, J.C.; HEAZLEWWOOD, G.N.; BEATTIE, B.M. Cultivation of *Artemisia annua* L. In: Artemisia - medicinal and aromatic plants – Industrial profiles series. WRIGHT, C.W. (eds.). Brodford University. London, U.K. p. 159-195, 2002.

LAUGHLIN, J.C. Effect of agronomic practices on plant yield and antimalarial constituents of *Artemisia annua* L. **Acta Horticulturae** v. 331, p.53-61, 1993.

LAUGHLIN, J.C.; HEAZLEWWOOD, G.N.; BEATTIE, B.M. Cultivation of *Artemisia annua* L. In: Artemisia - medicinal and aromatic plants – Industrial profiles series. WRIGHT, C.W. (eds.). Brodford University. London, U.K. p. 159-195, 2002.

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

MAGALHÃES, P.M., PEREIRA, B., SARTORATTO, A. Yields of Antimalarial *Artemisia annua* species. **Acta Horticulturae**. V. 629, p. 421-424, 2004.

MOSSE, B.; STRIBKEY, D.P.; LE TACON, F. Ecology of micorrhizae and mycorrhizal fungi. **Advances in Microbial Ecology**. v.5, p. 137-210, 1981.

MARQUES, A.C. Human imigration and the spread of malaria in Brazil. **Parasitology Today** v. 3, p. 166, 1987

PATTARO, F.C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; VIEIRA, P.S.; RAMOS, F.S. Efeito da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares na produção de óleos essenciais em plantas medicinais. Disponível em: http://www.cca.uem.br/ano6600.htm. Acessado em: 04/01/2006.

PHILLIPS, J.M. & HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society.** v.55, p. 158-160, 1970.

PORTUGAL, E.P & QUITÉRIO, G.C.M. Efeito da inoculação de Fungos Micorrízicos Arbusculares em estévia (*Stevia rebaudiana*). VII Jornada Paulista de Plantas Medicinais. Campinas. 2005.

PORTUGAL, E.P. **Influência de fungos micorrízicos arbusculares, sistemas de cultivo e parâmetros pós-colheita na concentração de esteviosídeos e desenvolvimento de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni.** Campinas, 2006. 114p. Tese (Doutorado) UNICAMP.

RAI, M.; ACHARYA, D.; SINGH, A. Positive growth of the medicinal plants *Spilanthes calva* and *Withania somnifera* to inoculation by *Piriformosphora indica* in a field trial. **Mycorrhiza**. v. 11, p. 123-128, 2001.

RIDLEY, R.G. Malaria, to kill a parasite. **Nature**. v. 424, p. 887-889, 2003.

SILVEIRA, A. P. D. Micorrizas. **Microbiologia do Solo.** Campinas, 1992.

SMITH, S.E. & GIANINAZZI-PEARSON, V. Physiological interaction between symbionts in vesicular arbuscular mycorrhizal plants. **Annual Review of Plant Physiology and plant Molecular Biology**. v.39, p. 211-244, 1988.

VAN AGTMAEL, M.A.; EGGELTE, T.A.; VAN BOXTEL, C.J. Artemisinin drugs in the treatment of malaria, from medicinal herb to registered medication – a review. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 20, p. 199-205, 1999.

WEI G. & WANG H. Efect of vesiculo-arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient uptake and synthesis of volatic oil in *Schizonepeta tenuifolia* Briq. (ABSTRACT). **Zhongguo Zongh Yao Za Zhi** 16 (3) : 139-42, 189-90. 1991.

WHO (World Health Organization). The development of artemisinin and its derivatives. World Health Organization mimeographed document WHO TDR CHEMAL ART 86.3, 1988.

WHO (World Health Organization). Disponível em: http://www.who.int/en/ . Acessado em: 15/12/2003