**NUTRIÇÃO MINERAL, PRODUÇÃO E CONCENTRAÇÃO
DE ARTEMISININA EM *Artemisia annua* L.**

GLYN MARA FIGUEIRA

Engenheira Agrônoma

ORIENTADOR: Prof. Dr. Antonio Roque Dechen

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz", da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Ciências, Área
de Concentração : Fisiologia e Bioquímica
de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Março - 1995

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

F475n Figueira, Glyn Mara
Nutrição mineral, produção e concentração de arte
misinina em *Artemisia annua* L. Piracicaba, 1995.
74p. ilus.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Artemisia - Nutrição 2. Planta medicinal I. Escola
Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 633.88355

**NUTRIÇÃO MINERAL, PRODUÇÃO E CONCENTRAÇÃO
DE ARTEMISININA EM *Artemisia annua* L.**

GLYN MARA FIGUEIRA

Aprovada em 08.05.1995

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Antonio Roque Dechen

ESALQ/USP

Prof. Dr. Quirino Augusto de Camargo Carmello

ESALQ/USP

Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder

CPQBA/UNICAMP

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Antonio Roque Dechen', with a stylized, cursive script.

Prof. Dr. Antonio Roque Dechen

Orientador

Ao meu filho Jose Guilherme,

Ao meu marido Sergio,

A minha mãe Ophélia e

As minhas irmãs Joy e Sylmara

Dedico este trabalho

Ao Prof. Dr. Antonio Roque Dechen;

Ao Prof. Dr. Quirino Augusto de Camargo Carmello, pelas análises estatísticas;

Ao Prof. Dr. Francisco Antonio Monteiro;

Ao Eng. Agr. Pedro Melillo de Magalhães;

À Dra. Vera Lucia Garcia Rehder, pela ajuda nas análises cromatográficas;

Aos funcionarios do Setor de Nutrição Mineral de Plantas do Departamento de Química da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Lucia H.S.P. Forte, Lourdes A.D. de Gonzales, Mirtes Ventura Sesso, Edneia C.S. Mandoni, Nivanda M.de Moura, Fernando Eder Ré, Sueli M.A.C. Bovi e Ricardo S. de Oliveira pelas facilidades e grande ajuda prestada;

À bibliotecaria Eliana M.G. Sabbino pela ajuda na revisão das referências bibliográficas;

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo e

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade de Campinas,

sinceros agradecimentos

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	iv
SUMMARY	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Histórico	5
2.2. Descrição botânica	6
2.3. Cultivo e estadios de desenvolvimento	7
2.4. Nutrição mineral	10
2.5. Outros usos da espécie	11
2.6. Metodologia analítica	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Crescimento, nutrição, teores e produção de componentes ...	21
4.2. Sintomatologia de deficiências nutricionais	62
4.2.1. Primeiro experimento.....	62
4.2.2. Segundo experimento	66
5. CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

NUTRIÇÃO MINERAL, PRODUÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE ARTEMISININA EM *Artemisia annua* L.

Autora: GLYN MARA FIGUEIRA

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO ROQUE DECHEN

RESUMO

A organização mundial de saúde estima que a ocorrência global de malária aguda e crônica atinge, atualmente, 210 a 220 milhões de casos/ano no mundo, sendo responsável por 2 milhões de mortes/ano, o que a coloca como a maior epidemia do mundo.

A *Artemisia annua* L., espécie utilizada há mais de 15 séculos pela medicina tradicional chinesa, possui uma substância denominada artemisinina com atividade antimalárica.

Devido à falta de informações sobre a nutrição mineral dessa planta medicinal foi proposto o presente trabalho, com o objetivo de conhecer as exigências nutricionais, caracterizar a sintomatologia de deficiências em *Artemisia annua* L., e estudar as correlações entre o estado nutricional, a produção de material seco e a

produção de artemisinina, foram realizados experimentos de cultivo hidropônico em casa de vegetação.

Os tratamentos utilizados foram solução nutritiva completa, com omissão de macronutrientes e com níveis de nitrogênio. Os experimentos foram realizados por dois anos consecutivos, com algumas modificações entre eles.

Os resultados obtidos permitiram concluir-se que:

o teor de artemisinina obtido no segundo experimento(0,069%), para o tratamento completo, pode ser considerado alto nas condições de cultivo estudadas;

o método analítico desenvolvido mostrou-se eficiente para a comparação entre tratamentos, com a vantagem de quantificar também o ácido artemisinínico, que é um produto de interesse, uma vez que pode ser sinteticamente convertido em artemisinina;

as omissões de nitrogênio e fósforo no substrato afetaram drasticamente o crescimento e a produção de material seco de *Artemisia*;

os níveis de nitrogênio testados não permitiram determinar-se a dose de nitrogênio necessária para a *Artemisia*;

as produções tanto de artemisinina como de ácido artemisinínico correlacionaram-se com as extrações de todos os nutrientes estudados.

**MINERAL NUTRITION, PRODUCTION AND ARTEMISININ
CONTENT IN *Artemisia annua* L.**

Author: GLYN MARA FIGUEIRA

Adviser: Prof. Dr. ANTONIO ROQUE DECHEN

SUMMARY

The world health organization estimates acute and chronicle malaria affects presently 210-220 million people per year in the world, being responsible for 2 million deaths.

Artemisia annua, a species being utilized by the Chinese traditional medicine for over 15 centuries, contents a substance called artemisinin, with recognized antimalarical activity.

Due to the lack of information about the mineral nutrition of this species, this work was conducted, with the objectives of studying the mineral requirements and nutrient deficiency sintomatology. Also, the correlation between mineral nutritional condition and dry material and artemisinin production were evaluated. The experiments were conducted in greenhouse conditions.

The treatments utilized were complete mineral solution, omissions of macronutrients and various levels of N. Experiments were conducted during two years, with some modifications between them. The results obtained show that:

the artemisinin content obtained on the second experiment (0.069%) for the complete treatment may be considered high on the conditions of this study;

the methodology developed proved to be efficient for the purpose of comparing different treatments, with the advantage of also quantifying the artemisininic acid, product that can be converted into artemisinin;

the omissions of N and P drastically affected the plant growth and dry matter production;

the N levels tested did not allow conclusion about its requirement by *Artemisia annua*;

the artemisinin and artemisininic acid production were related to the levels of all nutrients studied.

1. INTRODUÇÃO

De acordo com WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1989, a estimativa global de ocorrência de malária aguda e crônica atinge anualmente 210 - 220 milhões de casos/ano no mundo, dos quais 85% são causadas por *Plasmodium falciparum*, a mais insidiosa espécie de parasita causadora da malária. A malária, responsável por cerca de dois milhões de mortes por ano, é considerada a maior epidemia do mundo.

O desenvolvimento de linhagens do parasita, resistentes à cloroquina, desde a década de 1960, teve como resultado o fato de nenhum dos antimaláricos sintéticos poder hoje, ser considerado confiável. A resistência do parasita à cloroquina, constitui-se num dos maiores problemas enfrentados pela medicina tropical na atualidade, além de ser uma grande ameaça à vida das pessoas que vivem nas áreas endêmicas da doença.

A situação atual da doença no mundo é apresentada na figura 1.

Figura 01 : Distribuição de malária no mundo (FORNETI, 1992).

Nos anos 50 o Brasil chegou a ter 7 milhões de casos anuais, índice que 20 anos depois caiu para 50 mil casos, estando agora no patamar de meio milhão de casos/ano. Durante o ano de 1992, foram registradas 560 mil notificações de casos de malária.

Estima-se que atualmente, aproximadamente 20 mil pessoas morrem de malária por ano no Brasil. Assim, a procura de novos agentes antimaláricos mais eficientes é uma necessidade premente.

Deve-se aos pesquisadores chineses, a descoberta da atividade antimalárica da espécie vegetal *Artemisia annua* L., membro da família Asteraceae. Esta espécie é utilizada, há mais de 15 séculos pela medicina tradicional chinesa, na forma de chás e infusões, no combate das febres e da febre malárica em particular.

Em 1967 iniciou-se a busca de novos agentes antimaláricos, e o reexame das drogas da medicina tradicional chinesa, levou à descoberta de uma pronunciada atividade antimalárica, na fração neutra, da droga obtida pela extração com solventes de baixa polaridade, sendo esta substância denominada artemisinina.

A artemisinina, atua sobre o *Plasmodium vivax* e o *Plasmodium falciparum*, inclusive nas formas resistentes à cloroquina. Os resultados mais impressionantes foram obtidos no tratamento de coma malárico, que atinge quase 10% do total dos casos.

Pouco foi relatado na literatura sobre seu cultivo, talvez por ser praticado o extrativismo nos países de origem para produção de óleo essencial até a cerca de 20 anos, quando foi descoberta a sua função como produtora de uma substância antimalárica.

A espécie *Artemisia annua* L. é considerada aqui como planta exótica (nunca foi cultivada anteriormente em nossas condições), e não se conhece portanto, suas características de cultivo. A introdução no Brasil ocorreu em 1987, pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade de Campinas, através de sementes provenientes dos Estados Unidos. Desde então,

plantios vem sendo realizados e suas sementes multiplicadas e seu comportamento observado em nossas condições.

Os objetivos deste estudo, são: conhecer as exigências nutricionais, caracterizar as sintomatologias de deficiência de nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio e enxofre em *Artemisia annua* L., estudar níveis de nitrogênio e correlacionar o estado nutricional, produção de material seco e a produção de artemisinina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

A mais antiga citação de recomendação de *Artemisia annua* L., contra febres, aparece no Manual de Receitas para Tratamentos de Emergência (Zhou Hou Bei Ji Fang), escrito por Ge Hong em 340 d.C., citado por KLAYMAN (1985) cuja prescrição era de um litro de infusão da planta. Em 1596 Li Shizhen, escreveu um Compêndio de Matéria Médica (Ben Cao Gang Mu), citado pelo mesmo autor onde descreveu o uso de preparações com *Artemisia* (qinghao) contra as febres de malária.

Em 1972 o componente ativo dessa fração, foi isolado da parte aérea da planta, e sua estrutura química foi determinada em 1979, e o composto foi denominado artemisinina (qinghaosu), KLAYMAN et al. (1984).

A estrutura química da artemisinina e do ácido artemisinínico estão na figura 2.

Figura 2: Estrutura química da artemisinina e do ácido artemisinínico.

2.2. Descrição botânica

A espécie *Artemisia annua* L. pertence à família Asteraceae e tribo Anthemideae. ARANHA & YAHN (1988) descreveram-na como uma planta herbácea, anual, ereta, muito aromática e que floresce e frutifica nos meses mais quentes do ano. A haste é cilíndrica, longitudinalmente estriada, verde-pálida e com pilosidade simples, curta, unicelular e alvo-translúcida. As folhas são simples, profundamente partidas, pinatissectadas, membranáceas, sendo as inferiores rosuladas e as superiores alternadas, com dimensões progressivamente menores à medida que se aproxima do ápice da planta. Apresentam as faces superiores verde-claras, pilosas e com nervura principal proeminente e as faces inferiores verde mais claras, pilosas e com nervura principal proeminente. O pecíolo é longo, triangulado, verde-claro, piloso, superiormente leve e canaliculado.

As inflorescências são em panículas de capítulos pequenos e multifloros, distribuídas ao longo de toda a haste. O involúcro é composto por brácteas em 2 séries, sendo as anteriores maiores, todas verdes, glabras e de bordos hialinos. O receptáculo floral é convexo, com em média de 50-60 flores pediceladas. As flores marginais são femininas, férteis, tubuloso-liguladas, em uma só série, glabras e de coloração verde-amarelada. O gineceu de ovário é ínfero, unilocular, uniovulado. O estilete é simples, com estigma bifido, deplexo, fimbriado. As flores centrais são hermafroditas, tubulosas, com 5 lobos triangulados, amarelas e glabras. O androceu é formado por 5 estames sinanteros, inseridos no fundo da corola, com anteras brancacentas, glabras e apiculadas.

O fruto do tipo aquênio, acastanhado quando da maturação, floresce e frutifica nos meses mais quentes do ano. Reproduz-se exclusivamente por sementes e é originária da Ásia Boreal e da Europa.

2.3. Cultivo e estágios de desenvolvimento

Existem poucos trabalhos na literatura sobre os aspectos de cultivo dessa espécie, sendo que a maioria busca relacioná-lo com a produção do óleo essencial, e mais recentemente à seu princípio ativo antimalárico. É ainda bastante encontrada em estado selvagem nos locais onde é nativa, sendo utilizada à partir de coletas. Também por se tratar de espécie de interesse farmacológico, existe sigilo por parte das empresas que visam a comercialização do medicamento.

GALAMBOSI (1980) relatou os resultados do cultivo de algumas espécies aromáticas e medicinais, nos campos da cooperativa de Szolasmanti, Hungria, sendo a *Artemisia annua* L. usada como fonte de um óleo essencial com ação fungicida e bactericida, além de poder ser utilizado nas indústrias de perfumaria e farmacêuticas. O material vegetal foi coletado e investigado quanto aos métodos de propagação, controle de plantas daninhas, mecanização e a secagem, que foi realizada em pequenas parcelas e em larga escala. O maior teor de óleos voláteis obtido foi de 0,53% no início do florescimento e a produção de material fresco foi de 10t/ha.

YOU-YOU et al. (1982) estudaram os constituintes químicos de plantas de *Artemisia annua* L. que cresciam espontaneamente na região, o que o fazem até hoje, como afirmam os chineses, sem ser cultivada em larga escala.

KLAYMAN et al. (1984) isolaram artemisinina de *Artemisia annua* L. cultivada nos Estados Unidos sem relato de cultivo, tendo cultivado somente em pequena escala, para verificar-se a presença da substância de interesse.

LIENSCH et al. (1986) quando investigaram amostras do material cultivado e de outras espécies de *Artemisia*, relataram que o baixo conteúdo relativo de artemisinina nas plantas cultivadas tanto na Europa como nos Estados Unidos era um fator limitante no isolamento da substância em maior escala, além da síntese da molécula não ser economicamente viável. O conteúdo de artemisinina foi determinado em diferentes estágios de desenvolvimento, obtendo-se uma curva crescente, além de ensaios com aplicações de reguladores de crescimento, que afetaram o teor de artemisinina e a morfologia da planta.

CHEN & ZHONG (1987) estudaram o efeito da temperatura e da iluminação sobre o conteúdo de artemisinina, e demonstraram que as altas temperaturas, isto é, 30°C, e a iluminação levaram ao acúmulo de artemisinina.

SINGH et al. (1988) avaliaram a produção de artemisinina por plantas introduzidas de três diferentes locais, coletando material para análise em vários estágios de desenvolvimento. Obtiveram máximo rendimento em plantas de sementes provenientes da Europa, e observaram também um aumento no teor de artemisinina com o desenvolvimento, sendo que o máximo foi atingido com 50% de florescimento nas plantas europeias e completo florescimento nas americanas, revelando uma correlação positiva entre a idade da planta e seu rendimento, devido ao aumento no teor e também à maior produção de material seco.

DENYS et al. (1990) estudaram a distribuição relativa de artemisinina na planta e demonstraram que as folhas superiores contêm a máxima porcentagem, isto é, 0,15g/100g e também a maior porcentagem de artemisinina total por planta (41,7%). A porcentagem de rendimento e a artemisinina total por planta, decresceram nas partes inferiores e apresentaram-se apenas como traços no caule principal, sendo ausente nas raízes.

MAYNARD (1985) e ELSOHLY et al. (1990) relataram uma técnica de extração em larga escala, após experiências de cultivo extensivo e o desenvolvimento de técnicas de produção de mudas, transplante, manejo, colheita, secagem e finalmente a extração.

SHARMA et al. (1991) revisaram aspectos de cultivo além da sua utilização e estudos químicos da *Artemisia annua*. SRIVASTAVA et al. (1991) identificaram os melhores herbicidas a serem utilizados para o controle de plantas daninhas em um cultivo em larga escala.

SHUKLA et al. (1992) estudaram o efeito de reguladores de crescimento sobre o teor de artemisinina e o desenvolvimento da planta em campo, verificando que o efeito no teor de artemisinina parecia ser compensado pelo efeito no crescimento da planta.

Muitos estudos tem sido feitos em áreas como: cultura de tecidos, micropropagação, produção de callus, bem como o uso de bioreatores, numa tentativa de se produzir plantas de maior rendimento, bem como a produção de artemisinina in vitro, NAIR et al. (1986), PARK et al. (1989), LÊ & COLLET (1991).

DELABAYS et al. (1992), cultivando plantas de origem européia, e promovendo cruzamentos com um clone da China de elevado teor e fazendo a micropropagação dos híbridos, conseguiram elevar os teores de artemisinina para 0,64 a 0,73%.

2.4. Nutrição mineral

SRIVASTAVA & SHARMA (1990) estudaram a influência do balanço de micronutrientes sobre o crescimento e o teor de artemisinina em *Artemisia annua* L. cultivada em solução nutritiva e em casa de vegetação. Eles observaram que a *Artemisia*

annua L. foi altamente sensível à deficiência de boro, seguida das deficiências de ferro, zinco, cobre e manganês, com significativo decréscimo no crescimento e no teor de artemisinina. Altos fornecimentos de boro e de ferro, aumentaram significativamente o rendimento da material seco, sendo que o cobre e manganês o inibiram. Os pesos do material fresco e seco tiveram uma correlação positiva com o teor de artemisinina.

LAUGHLIN (1992), estudando aspectos agronômicos, ressaltou que na faixa de pH no solo entre 5,0 e 8,2, os teores tanto de artemisinina como do ácido artemisinínico não foram afetados ocorrendo porem decréscimo na produção de folhas, quando o pH era inferior a 5,5 e superior a 7,5.

2.5. Outros usos da espécie

Além do interesse medicinal mais recente, DUKE et al. (1987) e CHEN & LEATHER (1990) estudaram o efeito da artemisinina, inibindo a germinação de sementes, o desenvolvimento de mudas e a indução de raízes, verificando uma atividade na membrana celular de algumas espécies.

CHEN et al. (1991) compararam a artemisinina com 2,4-D e glifosato, devido à descoberta de uma ação herbicida da artemisinina e também por ser um produto natural, com estudos toxicológicos em humanos já desenvolvidos, devido ao seu uso farmacêutico, porém sua produção para uso como herbicida ainda não é economicamente viável.

2.6. Metodologia analítica para determinação da artemisinina

Antes da discussão sobre metodologias analíticas, é importante ressaltar os trabalhos que vem procurando descrever a via biossintética de artemisinina em *Artemisia annua*.

Desde a identificação do composto "artemisinina", trabalhos científicos descrevem o isolamento de outros compostos, tais como ácido artemisinínico, desoxiartemisinina, artenuina B, artesunato, artenuina C, artemisinina G, entre outros, e também o papel desses compostos na biossíntese da artemisinina (SCHMID & HOFHEINZ, 1983; ACTON & KLAYMAN, 1985; MISRA, 1986; ROTH & ACTON, 1987; EL-FERALY, et al. 1989).

Somente em 1990 AKHILA et al., utilizando isótopos radioativos (^3H e ^{14}C), descreveram a biossíntese da artemisinina em *Artemisia annua* a partir do ácido mevalônico e a biossíntese do ácido artemisinínico, que se encontra em maior quantidade na planta e pode servir como precursor para a síntese da artemisinina, sendo assim de grande importância seu estudo.

Diversos métodos tem sido descritos para análise de artemisinina. TU et al., 1982; KLAYMAN et al., 1984; ROTH & ACTON, 1989; PRASS et al., 1991; DELABAYS et al. (1992); utilizaram cromatografia em camada delgada (CCD), tendo testado diversos solventes para o processo de extração, partindo de folhas secas, obtendo teores da ordem de 0,06% a 0,1%.

Outro método mais sensível e específico utiliza cromatografia líquida de alta precisão (HPLC), com redução eletroquímica, implicando em precauções especiais, com relação à redução do oxigênio molecular, não sendo porém apropriado para método de rotina (ACTON et al., 1985); ou detecção HPLC/UV após hidrólise da artemisinina, utilizando técnica de derivatização em pós-coluna para conversão em um produto com melhores características espectrofotométricas, sendo trabalhoso e introduzindo diluições na amostra (ELSOHLY et al. 1990). Existem também, os métodos por polarografia e radioimunoensaio descritos na literatura, (PRASS et al., 1991).

WOERDENBAG et al. (1990) revisaram vários aspectos químicos da *Artemisia annua* como biossíntese, isolamento, estrutura dos derivados e sua atividade, mecanismo de ação, dosagem, resultados clínicos, toxicidade e os diversos métodos analíticos utilizados.

WOERDENBAG et al. (1991) descreveram a metodologia analítica para artemisinina e sesquiterpenóides relacionados de *Artemisia annua*, combinando cromatografia gasosa e espectrômetria de massa (CG/MS), onde foram analisadas diferentes partes da planta tendo sido encontrados teores próximos a 0,1% de artemisinina em peso de material seco, além de serem dosados artenuina B e ácido arteanuico. FERREIRA et al. (1994) compararam os métodos para análise de artemisinina por cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida (HPLC-EC).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados entre julho de 1992 e novembro de 1993. Foram realizados dois cultivos., conduzidos na casa de vegetação do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas - CPQBA, Universidade de Campinas - UNICAMP, Campinas (SP). O primeiro experimento foi de julho a setembro de 92 e o segundo de junho a novembro de 93.

Cada cultivo consistiu-se das seguintes etapas: produção de mudas em tubetes, transplante para os vasos, cultivo em solução nutritiva, acompanhamento do desenvolvimento e observação de sintomatologia de deficiências nutricionais, colheita, secagem e análise do material vegetal.

Foram utilizadas sementes produzidas em cultivos experimentais no próprio CPQBA. As sementes foram colocadas para germinar em tubetes, deixando-se uma planta por tubete após o desbaste, para serem transplantadas para os vasos definitivos.

Foram utilizados vasos plásticos cilíndricos, com capacidade para 2 litros, sendo adicionado igual volume de quartzo moído e lavado, para onde foram transplantadas duas plântulas com aproximadamente 35 dias.

Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas - CPQBA, Universidade de Campinas - UNICAMP, Campinas (SP). O primeiro experimento foi de julho a setembro de 92 e o segundo de junho a novembro de 93.

Cada cultivo consistiu-se das seguintes etapas: produção de mudas em tubetes, transplante para os vasos, cultivo em solução nutritiva, acompanhamento do desenvolvimento e observação de sintomatologia de deficiências nutricionais, colheita, secagem e análise do material vegetal.

Foram utilizadas sementes produzidas em cultivos experimentais no próprio CPQBA. As sementes foram colocadas para germinar em tubetes, deixando-se uma planta por tubete após o desbaste, para serem transplantadas para os vasos definitivos.

Foram utilizados vasos plásticos cilíndricos, com capacidade para 2 litros, sendo adicionado igual volume de quartzo moído e lavado, para onde foram transplantadas duas plântulas com aproximadamente 35 dias.

As plantas foram irrigadas com solução nutritiva completa, segundo SARRUGE (1975), diluída na razão de 1:2 com água destilada, sendo renovada a cada 7 dias. Após 14 dias, quando as mudas apresentavam um aspecto uniforme e com um número médio de 5 folhas por planta, iniciaram-se os tratamentos. Antes disso, procedeu-se à lavagem do quartzo moído com água destilada, visando eliminar os nutrientes retidos nesse material.

Foram utilizadas soluções estoque para compor as soluções dos tratamentos, conforme a tabela 1:

Tabela 01 - Composição química das soluções nutritivas (ml/l), SARRUGE(1975).

Scs estoque M	Completo	-N	-P-	-K	-Ca	-Mg	-S
KH_2PO_4	1	1	-	-	1	1	1
KNO_3	5	-	5	-	5	3	3
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	5	-	5	5	-	4	4
MgSO_4	2	2	2	2	2	-	-
KCl	-	5	1	-	-	2	2
CaCl_2	-	5	-	-	-	1	1
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	-	-	-	1	-	-	-
NH_4NO_3	-	-	-	2	5	-	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	-	-	-	-	2	-
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	-	-	-	-	-	-	2
MICRO*	1	1	1	1	1	1	1
Fe-EDTA**	1	1	1	1	1	1	1

* A solução de micronutrientes tem a seguinte composição (g/l): H_3BO_3 , 2,86, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1,81, ZnCl_2 , 0,10, CuCl_2 , 0,04, $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,02.

**26,1g de EDTA dissódico em 286ml de NaOH N, 24,0g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

A composição das soluções nutritivas utilizadas nos tratamentos, em mg/l está na tabela 2, devendo-se esclarecer que para os tratamentos com níveis de N foi utilizada a solução estoque de NH_4NO_3 M como fonte de N.

Tabela 02 - Composição das soluções nutritivas utilizadas nos tratamentos com diferentes níveis de nitrogênio e omissões de fósforo, potássio, cálcio, magnésio enxofre (mg/l) no experimento de 1992 e 1993.

Tratamentos	N	P	K	Ca	Mg	S
Completo	210	31	234	200	48	64
Omissão N	0	31	234	200	48	64
70 mg N/l	70	31	234	200	48	64
105 mg N/l	105	31	234	200	48	64
140 mg N/l	140	31	234	200	48	64
280 mg N/l	280	31	234	200	48	64
305 mg N/l	305	31	234	200	48	64
Omissão P	210	0	234	200	48	64
Omissão K	210	31	0	200	48	64
Omissão Ca	210	31	234	0	48	64
Omissão Mg	210	31	234	200	0	64
Omissão S	210	31	234	200	48	0

Obs; 1: Os micronutrientes fornecidos (mg/l) foram: boro 0,5; manganês 0,5; zinco 0,05; cobre 0,02; molibdênio 0,01; ferro 5,0.

2: O ferro foi fornecido com Fe-EDTA.

Cada tratamento tinha 4 repetições sendo cada repetição composta por dois vasos, com duas plantas cada um. As plantas desses dois vasos foram colhidas e pesadas como uma repetição. Este procedimento foi adotado unicamente por uma questão operacional (espaço físico e obtenção de material suficiente para as análises).

As plantas foram irrigadas três vezes ao dia, ocorrendo drenagem através de um orifício no fundo de cada recipiente, ligados através de tubos plásticos a frascos coletores com capacidade para 1 litro. A renovação das soluções nutritivas foi

feita a cada 7 dias, sendo que as soluções foram completadas com água destilada quando necessário, durante esse período.

Decorridos 75 dias do plantio e as plantas estando em início de florescimento, realizou-se a colheita do experimento. O segundo experimento foi colhido 140 dias após o plantio, tendo chegado até pleno florescimento.

No primeiro ano, o material colhido foi pesado, retirando-se uma amostra de aproximadamente 2g de folhas frescas, para que a quantificação e análise da artemisinina pudesse ser realizada. O restante do material foi seco em estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 40 - 45°C, até peso constante, pesado, moido, homogeneizado, separando-se uma amostra para análise mineral e o restante foi armazenado em câmara fria (10°C).

No segundo ano, o material colhido foi seco em estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 30°C até peso constante, pesado, as folhas separadas e homogeneizadas para a retirada de uma amostra para a análise do teor de artemisinina e do ácido artemisinínico e o restante foi utilizado para a análise mineral.

Para a análise dos teores de artemisinina, de acordo com a metodologia seguida na primeira etapa do experimento, a extração foi feita a partir de uma amostra do material fresco, e determinada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometro de massa (GC/MS). Esta análise apresentou problemas de inconsistência de resultados, devido à falta de reprodutibilidade da curva obtida, quando da injeção do padrão. A metodologia utilizada na segunda etapa para a análise dos teores de artemisinina e do

ácido artemisinínico foi de cromatografia em camada delgada (CCD), desenvolvida para esse experimento, análise também realizada para o primeiro cultivo após um ano de armazenamento.

A determinação dos teores de artemisinina e do ácido artemisinínico dos experimentos foi modificada, partindo-se da metodologia descrita por PRASS et al. (1991), que a utilizou para a seleção de plântulas dentro de um programa de melhoramento genético para teores de artemisinina. Nesse trabalho, são comparados os métodos por TLC e HPLC, apresentando uma estreita correlação. DELABAYS et al. 1992, utilizaram essa metodologia citada, em seu programa de melhoramento genético para *Artemisia annua*. As modificações foram efetuadas, possibilitando quantificar também o ácido artemisinínico, o que não é citado nas referências.

A metodologia descrita estabelece a extração com: 100mg de planta fresca, 100mg de sílica, 2ml de tolueno, maceração por 2min. Análise por CCD : aplicação de 1ul em cromatoplaça, eluente utilizado eter de petróleo:eter etílico (1:1)(40 60°C). Revelador : ácido acético glacial (50ml), ác. sulfúrico (1ml) e anisaldeído (0,5ml) em imersão por 10s, seguido de aquecimento.

A metodologia utilizada foi a extração com: 100mg de planta seca, 2ml de tolueno, maceração por 2min. Análise por CCD: aplicação de 1ul em cromatoplaça, eluente utilizado diclorometano:metanol 1,5%. Revelador : ác.acético glacial (50ml), ác. sulfúrico (1ml) e anisaldeído (0,5ml) em imersão por 10s, seguido de aquecimento.

A quantificação foi feita por comparação visual com uma série de aplicações dos padrões tanto da artemisinina como do ácido puros com as amostras. Para se verificar a confiabilidade da metodologia, realizou-se a quantificação de uma amostra, a seguir, extraíndo-se e purificando-se até obtenção da artemisinina.

A secagem a 30°C por três dias foi adotada, após haverem sido testadas extrações com o material fresco, seco a 60°C por 24h e a 30°C por 3 dias. Na extração das amostras secas a 60°C foram obtidos menores teores, sendo que não ocorreu variação entre as extrações das amostras de material fresco e seco a 30°C por três dias. Além desse fator, secando-se o material a 30°C por três dias, a manipulação da amostra tornou-se mais fácil, dispensando o uso da sílica, sem alteração de resultados. Outra alteração foi o eluente utilizado, pois não só foi possível melhor separação, como também a quantificação do ácido artemisinínico, o que não é citado em nenhum trabalho anterior. O ácido artemisinínico sendo um precursor da artemisinina também pode ser extraído e transformado em artemisinina, daí a importância em quantificá-lo.

As amostras foram analisadas quanto aos nutrientes nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxôfre, boro, cobre, ferro, manganês e zinco, conforme a metodologia descrita por SARRUGE e HAAG (1974).

Os resultados obtidos nos experimentos foram analisados estatisticamente, segundo GOMES (1972), através do programa SANEST.

Durante o experimento, foram registradas as condições de temperatura e umidade relativa em um termohigrógrafo, sendo as máximas e mínimas semanais apresentadas nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 03 - Temperatura e umidade relativa - máximas e mínimas semanais, durante o período de condução do experimento na casa de vegetação, no ano de 1992.

Semanas		1	2	3	4	5	6	7
T	max.	26	32	26	32	32	32	32
(°C)	min.	12	20	18	18	16	14	16
UR	max.	98	96	96	96	92	96	96
(%)	min.	44	44	44	40	28	34	38

Tabela 04 - Temperatura e umidade relativa - máximas e mínimas semanais, durante o período de condução do experimento na casa de vegetação, no ano de 1993.

Semanas		1	2	3	4	5	6	7
T	max.	36	32	32	36	38	36	34
(°C)	min.	15	14	14	12	15	18	16
UR	max.	94	96	92	96	94	92	96
(%)	min.	22	32	30	34	38	32	50

Semanas		8	9	10	11	12	13	14
T	max.	36	37	36	38	32	34	36
(°C)	min.	22	20	18	18	23	24	20
UR	max.	98	96	96	96	92	96	96
(%)	min.	34	32	44	36	38	44	38

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Crescimento, nutrição, teores e produção de componentes

Os resultados de crescimento, nutrição, teores e produção dos compostos de interesse, são apresentados separadamente, para cada um dos cultivos realizados.

As tabelas 5 e 6 mostram o acompanhamento semanal da altura das plantas, durante o primeiro cultivo para, os tratamentos nutricionais estudados.

Tabela 05 - Altura das plantas (cm) em função dos níveis de N (mg/l) e das épocas de medida, no experimento de 1992.

Níveis de N	Épocas de medida, dias						
(mg/l)	50	57	64	71	78	85	Média
0	5,4 aD	8,2 aCD	14,7 bBC	19,5 dB	31,5 cA	37,2 cA	19,4 c
70	5,9 aE	8,8 aE	19,2 bD	30,5 cC	54,8 bB	68,6 bA	31,3 b
140	7,2 aE	9,6 aE	19,5 bD	31,7 bcC	54,5 bB	66,5 bA	31,5 b
210	8,7 aE	10,3 aE	26,3 aD	37,2 abC	60,5 abB	71,6 abA	36,3 a
280	8,0 aE	11,7 aE	27,8 aD	40,2 aC	64,5 aB	75,3 aA	37,4 a
Média	7,1 E	9,7 E	21,5 D	31,8 C	53,2 B	63,8 A	31,2

- médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical, diferam entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Pode-se observar uma relação direta entre os níveis crescentes de N e o desenvolvimento vegetativo. a diferenciação foi gradativa ao longo do desenvolvimento, como é melhor ilustrado na figura 3.

Figura 3 - Desenvolvimento das plantas (cm) em função da idade nos níveis de N (mg/l).

Esses resultados não permitem entretanto, inferir uma conclusão sobre o nível ótimo de N, pois, o nível máximo testado (280 mg/l) está abaixo do ponto máximo ou seja ainda na ascendência da curva de crescimento vegetativo.

Tabela 06 - Altura das plantas (cm) em função dos tratamentos e das épocas de medida, no experimento de 1992.

Tratamentos	Épocas de medida, dias						
	50	57	64	71	78	85	Média
Completo	8,7 aE	11,7 aE	27,8 aD	37,2 abC	60,5 abB	71,6 aA	36,3 a
Omissão P	6,9 aD	9,7 aD	20,9 bC	28,7 cB	48,0 cA	55,1 bA	28,2 c
Omissão K	6,9 aE	9,7 aE	21,0 bD	34,5 bcC	58,2 bB	69,0 aA	33,2 b
Omissão Mg	8,5 aD	13,4 aD	30,0 aC	43,3 aB	64,2 abA	70,8 aA	38,3 a
Omissão S	7,8 aE	12,1 aE	28,1 abD	38,6 abC	66,0 aB	73,9 aA	37,8 a
Média	7,7 F	11,3 E	25,5 D	36,4 C	59,4 B	68,1 A	34,8

- médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical, diferiram entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Pode-se observar uma sensibilidade das plantas à omissão de P, pois suas alturas diferiram estatisticamente das do tratamento completo. Em relação aos demais nutrientes, houve pequena diferença em relação ao tratamento completo.

As tabelas 7 e 8 mostram o peso do material seco e os teores de macro e micronutrientes para os níveis de N estudados no primeiro cultivo.

Tabela 07 - Peso do material seco e teores de macronutrientes em função dos níveis de N no experimento de 1992.

Níveis de N	Peso material	N	P	K	Ca	Mg	S
(mg/l)	seco (g)	(mg/g)					
0	1,00 c	9,9 c	2,4 a	37,3 ab	1,3 c	5,7 b	3,2 a
70	6,14 b	12,3 c	1,4 cd	36,2 ab	1,9 bc	7,7 a	4,0 c
140	6,74 b	15,3 bc	1,7 bc	41,9 a	3,0 a	7,6 a	1,1 bc
210	6,84 b	24,0 a	1,0 d	37,2 ab	2,5 a	8,1 a	1,5 b
280	9,27 a	19,8 ab	2,0 ab	24,1 b	2,4 ab	6,7 ab	2,4 a
Média	6,00	16,3	1,7	35,3	2,2	7,1	1,7
CV%	14,40	19,40	15,50	19,40	11,70	10,10	24,10
d.m.s.	1,94	0,71	0,06	1,55	0,06	0,16	0,09

- médias seguidas por letras distintas na vertical, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

O peso do material seco aumentou em proporção direta aos níveis de N. Os diferentes níveis de N não tiveram influência significativa sobre a absorção de K e Mg. Em relação ao P e S não foi possível a identificação de um padrão de absorção. Em relação ao Ca, houve um aumento da absorção com o aumento dos níveis de N.

Tabela 08 - Teores de micronutrientes em função dos níveis de N, no experimento de 1992.

Níveis de N	B	Cu	Fe	Mn	Zn
(mg/l)	(mg/g)				
0	24,00 c	7,25 a	198,00 a	210,00 a	32,25 a
70	25,75 c	4,25 b	109,75 ab	34,25 b	25,50 ab
140	34,25 bc	4,50 b	111,25 ab	70,25 b	21,75 b
210	37,75 ab	4,50 b	87,00 b	59,75 b	20,25 b
280	45,00 a	5,50 ab	84,00 b	64,25 b	20,25 b
Média	33,35	5,20	118,00	87,70	24,00
CV%	13,80	19,00	38,30	21,30	18,00
d.m.s.	10,38	2,23	101,88	42,12	6,70

- médias seguidas por letras distintas na vertical, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Observa-se que o B teve sua taxa de absorção aumentada enquanto o Cu, Fe, Mn e Zn tiveram suas taxas de absorção diminuídas com o aumento dos níveis de N. Cabe ressaltar, que a diminuição na absorção de Mn, foi mais drástica que para os demais nutrientes.

As tabelas 9 e 10 mostram a extração de macro e micro nutrientes para os níveis de N estudados no primeiro cultivo.

Tabela 09 - Extração de macronutrientes em função dos níveis de N, no experimento de 1992.

Níveis de N	N	P	K	Ca	Mg	S
(mg/l)	(mg/planta)					
0	9.61 d	2.16 b	36.73 b	5.65 b	1.54 b	2.92 b
70	68.55 cd	9.63 ab	216.88 a	47.07 a	11.34 a	5.35 b
140	104.16 bc	11.39 a	286.23 a	51.14 a	19.91 a	11.78 ab
210	164.38 ab	8.87 ab	215.41 a	49.47 a	17.28 a	10.06 ab
280	183.53 a	15.37 a	223.96 a	53.22 a	18.84 a	21.99 a
Média	106.05	9.48	195.84	41.31	13.78	10.42
CV%	28.40	40.50	34.50	31.60	28.60	54.70
d.m.s.	67.98	8.65	152.21	29.38	8.88	12.86

- médias seguidas por letras distintas na vertical, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 10 - Extração de micronutrientes em função dos níveis de N, no experimento de 1992.

Níveis de N	B	Cu	Fe	Mn	Zn
(mg/l)	(ug/planta)				
0	23,75 d	6,26 b	576,16 a	239,88 a	32,23 b
70	172,68 c	24,52 ab	674,61 a	237,82 a	151,20 a
140	229,08 bc	30,44 ab	763,83 a	486,94 a	145,58 a
210	311,82 ab	30,75 ab	532,73 a	489,46 a	139,12 a
280	364,32 a	39,60 a	1078,38 a	499,63 a	172,02 a
Média	220,33	26,31	724,94	390,74	128,03
CV%	20,80	53,60	66,70	43,40	30,10
d.m.s.	103,18	31,79	1090,24	382,56	87,07

- médias seguidas por letras distintas na vertical, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

A extração dos macronutrientes aumentou proporcionalmente com os níveis de N, sendo significativamente menor no tratamento com omissão de N. A extração de K, Ca e Mg não diferiu e a extração de P e S variou ligeiramente entre os tratamentos com 70, 140, 210 e 280 mgN/l.

Quanto aos micronutrientes, a extração de Fe e Mn não diferiu entre os tratamentos, a de Cu e Zn foi menor para o tratamento com omissão de N, e em relação ao B observou-se um aumento gradativo na taxa de absorção com o aumento dos níveis de N.

Na tabela 11 observa-se os teores de artemisinina e ácido artemisinínico e a produção desses compostos por planta para os tratamentos com os níveis de N estudados no primeiro cultivo.

Tabela 11 - Teores de artemisinina e ácido artemisinínico e produção desses compostos em função dos níveis de N, no experimento de 1992.

Níveis de N	Artemisinina	Ac.Artemisinínico	Artemisinina	Ac.Artemisinínico
(mg/l)	(%)		(mg/planta)	
0	0,0375 a	0,2375 a	0,3833 b	2,4425 b
70	0,0200 b	0,2250 a	1,2280 b	13,6775 ab
140	0,0250 ab	0,2625 a	1,5733 ab	17,4725 a
210	0,0225 ab	0,1875 a	1,5333 ab	12,7450 ab
280	0,0325 ab	0,2500 a	2,7655 a	23,2400 a
Média	0,0275	0,2325	1,4967	13,9155
CV%	28,00	32,60	41,80	37,60
d.m.s.	0,0174	0,1707	1,4093	11,8054

- médias seguidas por letras distintas na vertical, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

O teor de artemisinina máximo foi obtido no tratamento com omissão de N, o mínimo no tratamento com 70 mg N/l, ficando os demais com valores intermediários. A produção de artemisinina aumentou proporcionalmente com os níveis

de N, porém com pouca variação entre os valores (exceção feita aos tratamentos com omissão de N e 70 mg N/l, que tiveram menores produções).

O teor de ácido não diferiu significativamente com os tratamentos estudados, a sua produção cresceu proporcionalmente com os níveis de N, porém significativamente pouco (exceção feita a omissão de N que teve menor produção).

Cabe neste momento ressaltar, que as análises foram feitas após um ano de armazenamento, pela metodologia desenvolvida (CCD). Não foi possível avaliar o efeito do armazenamento na alteração dos teores da artemisinina e do ácido, bem como o efeito da secagem à uma temperatura maior que 30°C.

Nas tabelas 12 e 13 observa-se o peso do material seco, os teores de macro e micronutrientes, para os tratamentos completo e as omissões de nutrientes estudados no primeiro cultivo.

Tabela 12 - Peso do material seco e teores de macronutrientes em função dos tratamentos completo, omissões de P, K, Mg e S no experimento de 1992.

Tratamentos	Peso material	N	P	K	Ca	Mg	S
	seco (g)	(mg/g)					
Completo	6,84 a	24,0 a	1,0 bc	37,2 a	2,5 b	3,3 b	1,5 a
Omissão N	1,00 c	9,9 c	2,4 a	37,3 ab	1,3 c	5,7 b	3,2 a
Omissão P	2,90 b	19,6 a	7,0 c	25,6 ab	2,4 b	8,4 ab	1,3 a
Omissão K	6,39 a	28,5 a	2,5 b	16,6 b	4,8 a	6,6 ab	1,0 a
Omissão Mg	7,03 a	37,2 a	4,5 a	38,5 a	2,0 b	8,8 a	1,1 a
Omissão S	7,93 a	25,8 a	2,1 bc	29,1 ab	2,7 b	8,0 ab	1,0 b
Média	6,22	27,0	2,2	29,4	2,9	7,0	1,0
CV%	19,64	29,15	35,06	19,64	27,67	32,84	38,30
d.m.s.	2,75	1,78	0,17	1,30	0,18	0,52	0,09

- médias seguidas por letras distintas na vertical, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

O peso do material seco só foi significativamente menor para o tratamento com omissão de P. O teor de N não variou significativamente, e o de S só foi menor na sua omissão. O teor de P foi maior no tratamento com omissão de Mg, seguido dos tratamentos com omissões de K, S e completo. Em relação aos teores de K e Mg não foi possível a identificação de um padrão de absorção. O Ca foi mais absorvido no tratamento com omissão de K, mantendo valores semelhante nos demais.

Tabela 13 - Teores de micronutrientes em função tratamentos, no experimento de 1992.

Tratamentos	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	(mg/g)				
Completo	45,00 ab	4,50 a	87,00 b	59,75 b	20,25 b
Omissão N	24,00 c	7,25 a	198,00 a	210,00 a	32,25 a
Omissão P	41,00 b	5,75 a	103,00 b	65,75 b	24,25 ab
Omissão K	59,00 ab	6,50 a	111,25 b	97,75 ab	23,50 ab
Omissão Mg	63,00 a	6,00 a	169,00 a	129,00 a	39,25 a
Omissão S	50,75 ab	5,50 a	129,75 ab	58,00 b	30,25 ab
Média	51,75	5,65	120,00	82,05	27,50
CV%	18,24	17,70	16,10	23,26	28,00
d.m.s.	21,28	2,26	43,54	43,03	17,32

- médias seguidas por letras distintas na vertical, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

O teor de Cu não variou significativamente. Em relação aos demais micronutrientes, os maiores teores foram obtidos no tratamento com omissão de Mg, sendo ligeiramente menores para os demais.

As tabelas 14 e 15 mostram a extração de macro e micronutrientes por plantas de Artemisia, para os tratamentos completo e de omissões estudados no primeiro cultivo.

Tabela 14 - Extração de macronutrientes em função dos tratamentos, no experimento de 1992.

Tratamentos	N	P	K	Ca	Mg	S
	(mg/planta)					
Completo	164,38 ab	8,87 b	215,41 ab	49,47 ab	17,28 bc	10,06 a
Omissão N	9,61 d	2,16 b	36,73 b	5,65 b	1,54 b	2,92 b
Omissão P	54,64 b	1,88 b	73,11 b	29,92 b	6,82 c	4,50 ab
Omissão K	178,40 ab	15,55 ab	85,85 b	47,69 ab	30,11 a	5,00 ab
Omissão Mg	252,68 a	30,43 a	271,36 a	62,59 a	14,03 bc	6,63 ab
Omissão S	205,57 ab	16,80 ab	212,90 ab	63,20 a	21,55 ab	2,43 b
Média	171,13	14,71	171,73	49,37	17,96	5,72
CV%	39,63	53,41	42,25	29,53	29,93	58,63
d.m.s.	152,93	17,71	163,59	32,88	12,12	7,57

- médias seguidas por letras distintas na vertical, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 15 - Extração de micronutrientes em função dos tratamentos, no experimento de 1992.

Tratamentos	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	(ug/planta)				
Completo	311,82 ab	30,75 ab	532,73 ab	489,46 ab	139,12 ab
Omissão N	23,75 d	6,26 b	576,16 a	239,88 a	32,23 b
Omissão P	120,61 b	16,84 b	263,90 a	203,91 b	75,75 b
Omissão K	302,88 ab	41,06 a	795,70 ab	547,95 ab	148,97 ab
Omissão Mg	445,52 a	42,23 a	1798,57 a	952,40 a	293,07 a
Omissão S	403,15 a	43,73 a	1026,88 ab	504,46 ab	238,46 ab
Média	316,80	34,72	883,56	539,64	179,07
CV%	32,63	22,55	72,11	46,46	46,18
d.m.s.	233,11	17,65	1436,68	565,34	185,48

- médias seguidas por letras distintas na vertical, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

No tratamento com omissão de P foram obtidos os menores valores de absorção de todos os nutrientes, com exceção do S.

No tratamento com omissão de K, não observou-se diferenças significativas nas extrações de N, Ca, B, Cu, Fe, Mn e Zn; sendo menores as extrações de K e S, e maiores as extrações de P e Mg, quando comparadas ao tratamento completo.

No tratamento com omissão de Mg houve, a maior extração de macro e micronutrientes, excetuando-se o próprio Mg. Em alguns casos, os valores obtidos foram

superiores as do tratamento completo. No tratamento com omissão de S observou-se extrações superiores de todos os nutrientes superior ao completo, exceto o próprio S (extração menor) e K (extração maior).

Na tabela 16 são apresentados os teores de artemisinina e ácido artemisinínico e a produção por planta, para os tratamentos completo e omissões de nutrientes estudados no primeiro cultivo.

Tabela 16 - Teores de artemisinina e ácido artemisinínico e produção desses compostos em função dos tratamentos, no experimento de 1992.

Tratamentos	Artemisinina	Ac.Artemisinínico	Artemisinina	Ac.Artemisinínico
	(%)		(mg/planta)	
Completo	0,0225 a	0,1875 b	1,5333 a	12,7450 ab
Omissão N	0,0375 a	0,2375 a	0,3833 b	2,4425 b
Omissão P	0,0275 a	0,2500 ab	0,8025 a	7,6125 b
Omissão K	0,0275 a	0,3105 a	1,7863 a	19,8775 a
Omissão Mg	0,0300 a	0,2750 ab	1,8560 a	19,0825 a
Omissão S	0,0275 a	0,2125 ab	2,1685 a	16,7750 ab
Média	0,0270	0,2475	1,6293	15,2185
CV%	36,42	20,45	40,37	30,10
d.m.s.	0,0222	0,1142	1,4831	10,3249

- médias seguidas por letras distintas na vertical, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Os teores e a produção de artemisinina não variaram para os diferentes tratamentos. Os teores e a produção de ácido variaram porém, sem estabelecimento de

um padrão. Para essas análises também, cabe ressaltar o efeito do armazenamento e secagem que não puderam ser avaliados.

As tabelas 17 e 18 mostram o acompanhamento semanal do crescimento das plantas durante o segundo cultivo, para os tratamentos estudados.

Tabela 17 - Altura das plantas (cm) em função dos níveis de N (mg/l) e das épocas de medida, no experimento de 1993.

Níveis de N	Épocas de medida, dias							
(mg/l)	45	52	59	66	73	80	87	94
0	6,8 aA	9,8 aA	9,9 aA	10,0 bA	10,1 bA	10,5 bA	10,5 bA	10,5 bA
105	5,6 aF	8,6 aEF	12,1 aE	16,3 aD	18,3aCD	18,3aCD	19,8aCD	20,3 aC
210	5,6 aG	9,5 aF	11,6 aF	15,8 aE	18,3aDE	19,0aDE	19,8 aD	19,8 aD
315	6,3 aK	9,4 aJK	11,3aIJ	14,8aHI	17,5aGH	18,5aFGH	20,5aFG	22,0aEF
Média	6,1 J	9,3 I	11,2 H	14,2 G	16,0 FG	16,6 EF	17,6DEF	18,1 DE

Níveis de N	Fases de desenvolvimento, dias							
(mg/l)	101	108	115	122	129	136	141	Media
0	10,5 cA	10,5 cA	10,5 bA	10,5 bA	10,5 bA	10,5 cA	10,5 bA	10,1 c
105	24,5 aB	27,8 aB	27,8 aB	31,8 aA	34,5 aA	34,5 abA	34,5 aA	22,3 ab
210	20,8bCD	24,3 bC	28,5 aB	30,5aAB	34,3 aA	33,8 bA	34,3 aA	21,7 b
315	22,0abEF	25,8abDE	28,5aCD	31,5aB	35,0aAB	37,0 aA	37,0 aA	22,5 a
Média	19,4 D	22,1 C	23,8 C	26,1 B	28,6 A	29,0 A	29,1 A	19,1

- médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical, diferam entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Somente no tratamento com omissão de N foi observada redução significativa de crescimento. Todas as alturas nesse segundo experimento foram menores do que as do primeiro experimento. Essa variação também foi observada em plantios no campo e pode ser explicada pelo uso de sementes não melhoradas geneticamente.

Tabela 18 - Altura das plantas (cm) em função dos tratamentos e das épocas de medida, no experimento de 1993.

Tratamentos	Épocas de medida, dias							
	45	52	59	66	73	80	87	94
Completo	5,6aG	9,5aFG	11,6aEFG	15,8aDEF	18,3acDE	19,0aCD	19,8abCD	9,8bcCD
Omissão N	6,8 aA	9,8 aA	9,9 aA	10,0 bA	10,1 bA	10,5 bA	10,5 bA	10,5 bA
Omissão P	6,3aF	8,0aEF	10,5aEDF	13,4aCDEF	14,8aCDE	15,0aCDE	15,5bCDE	15,9cCD
Omissão K	5,4aH	10,8aGH	12,5aFGH	16,5aEFG	18,0aEFG	19,3aEF	23,5aDE	29,0aCD
Omissão Ca	5,5aD	9,3aCD	11,4aBCD	14,8aABC	17,3aAB	18,0aAB	18,0abAB	19,3bcA
Omissão Mg	5,1aG	9,0aFG	12,9 aEF	17,8 aDE	20,3aCDE	20,3aCDE	22,0 aCD	23,3bBCD
Omissão S	5,4aF	8,8aEF	11,7aEF	16,0 aDE	19,5 aCD	20,5aBCD	22,0aBCD	22,0bBCD
Média	5,5 J	9,2 I	11,8 I	15,7 H	18,0 GH	18,7 G	20,1 FG	21,5 EF

Tratamentos	Épocas de medida, dias							
	101	108	115	122	129	136	141	Média
Completo	20,8bcdCD	24,3cdBC	28,5cAB	30,5bcAB	34,3bcA	34,3 bA	34,3bcA	21,7 c
Omissão N	10,5 cA	10,5 cA	10,5 bA	10,5 bA	10,5 bA	10,5 cA	10,5	10,1 c
Omissão P	16,1dCD	18,3dBC	24,8cdAB	24,8dAB	27,3deA	28,8 bA	31,0cA	18,1 d
Omissão K	32,8aBC	37,5aAB	40,3aAB	40,3aAB	41,3aA	41,3aA	41,3aA	27,3 a
Omissão Ca	20,0 cdA	20,0 dA	20,3 dA	22,0 dA	22,0 eA	22,0 cA	22,0dA	17,4 d
Omissão Mg	26,0bBC	30,3bAB	34,5bAB	34,5 bA	37,3abA	29,8 bA	37,3abA	24,0 b
Omissão S	23,0bcBCD	26,3bcABC	27,5cAB	27,5cdAB	31,0cdA	32,2bA	31,8bcA	21,7 c
Média	23,1 E	26,3 D	29,3 C	29,9 BC	32,2 AB	31,4ABC	32,9 A	21,8

- médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical, diferam entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

A menor altura observada no final do experimento, foi a do tratamento com omissão de Ca, seguida pelos tratamentos com omissões de P, S e completo. As alturas das omissões de Mg e K ultrapassaram a altura do tratamento completo.

As tabelas 19 e 20 mostram o peso do material seco e os teores de macro e micronutrientes, para os níveis de N estudados no segundo cultivo.

Tabela 19 - Peso do material seco por planta e os teores de macronutrientes em função dos níveis de N, no experimento de 1993.

Níveis de N	Peso material	N	P	K	Ca	Mg	S
(mg/l)	seco (g)	(mg/g)					
0	0,76 c	12,7 c	5,0 a	35,9 a	15,4 a	3,5 b	2,4 a
105	4,84 b	32,2 b	4,2 ab	21,8 b	6,8 b	3,7 b	2,3 a
210	8,11 a	38,3 a	3,7 b	41,9 a	8,4 b	5,4 a	2,2 a
315	4,24 b	43,2 a	4,1 ab	21,4 b	8,6 b	4,2 b	2,4 a
Média	4,49	31,6	4,2	30,2	9,8	4,2	2,3
CV%	14,21	8,12	11,72	12,96	11,92	8,77	7,53
d.m.s.	1,41	0,57	0,11	0,87	0,26	0,08	0,04

- médias seguidas por letras distintas na vertical, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

O peso do material seco obedeceu à uma curva crescente até o nível com 210mg N/l, caindo no nível maior.

Os teores de P, K e Ca foram mais elevados no tratamento com omissão de N. O teor de S não variou entre os diferentes tratamentos. Os teores de K e Mg foram maiores no tratamento com 210 mg N/l.

Tabela 20 - Teores de micronutrientes em função dos níveis de N, no experimento de 1993.

Níveis de N	B	Cu	Fe	Mn	Zn
(mg/l)	(ug/g)				
0	94,00 a	9,50 a	212,75 b	204,75 a	75,25 a
105	69,25 a	5,25 bc	388,75 a	157,75 b	46,00 b
210	76,25 a	3,50 c	251,75 b	71,25 c	43,75 b
315	92,00 a	7,83 ab	381,50 a	202,75 a	49,50 a
Média	82,88	6,52	300,44	159,13	53,63
CV%	14,23	18,26	6,87	4,52	13,26
d.m.s.	26,06	2,63	45,61	15,91	15,72

- médias seguidas por letras distintas na vertical, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

O teor de B não variou significativamente nos tratamentos estudados.

Os teores de Cu, Mn e Zn foram mais elevados tanto na omissão de N como no nível mais elevado estudado. Para o teor de Fe não se identificou um padrão de absorção.

As tabelas 21 e 22 mostram a extração de macro e micronutrientes por plantas de Artemisia, para os níveis de nutrição de N estudados.

Tabela 21 - Extração de macronutrientes em função dos níveis de N, no experimento de 1993.

Níveis de N	N	P	K	Ca	Mg	S
(mg/l)	(mg/planta)					
0	9,68 c	3,78 c	27,44 c	11,76 c	2,67 c	1,80 c
105	155,86 b	20,20 b	106,19 b	33,45 b	17,90 b	11,14 b
210	309,41 a	29,78 a	337,92 a	68,81 a	43,73 a	18,10 a
315	184,86 b	20,20 b	89,88 b	35,81 b	17,55 b	9,83 b
Média	164,95	17,97	140,35	37,47	20,46	10,22
CV%	17,64	19,33	17,57	25,91	23,13	18,10
d.m.s.	64,30	6,68	54,49	21,45	10,46	4,09

- médias seguidas por letras distintas na vertical, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Observou-se um aumento na extração de macronutrientes até o tratamento 210 mg N/l, caindo no tratamento 315 mg N/l, como foi observado para o peso do material seco.

Tabela 22 - Extração de micronutrientes em função dos níveis de N, no experimento de 1993.

Níveis de N	B	Cu	Fe	Mn	Zn
(mg/l)	(ug/planta)				
0	71,31 c	36,52 a	162,22 c	155,19 c	57,05 c
105	337,21 b	25,25 a	1886,31 ab	766,29 ab	221,01 b
210	622,73 a	28,11 a	2041,74 a	580,80 b	356,97 a
315	393,91 b	35,17 a	1463,72 b	862,01 a	209,36 b
Média	356,29	31,39	1388,50	591,07	211,10
CV%	26,71	59,01	16,40	19,84	22,26
d.m.s.	210,30	40,94	503,12	259,18	103,85

- médias seguidas por letras distintas na vertical, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

As extrações de B, Fe e Zn seguiram o mesmo padrão de comportamento dos macronutrientes. A extração de Cu não variou significativamente e a de Mn aumentou sempre.

Na tabela 23 são apresentados os teores de artemisinina e ácido artemisinínico e a sua produção por planta, para os tratamentos com variação nos níveis de N estudados, no segundo cultivo.

Tabela 23 - Teores de artemisinina e ácido artemisinínico e produção desses compostos em função dos níveis de N, no experimento de 1993.

Níveis de N	Artemisinina	Ac.Artemisinínico	Artemisinina	Ac.Artemisinínico
(mg/l)	(%)		(mg/planta)	
0	0,0340 b	0,1375 a	0,2600 c	1,0475 c
105	0,0670 a	0,1923 a	3,2400 b	9,0900 bc
210	0,0690 a	0,2500 a	5,4550 a	20,2175 a
315	0,0600 a	0,2500 a	2,5050 b	10,1375 b
Média	0,0560	0,2074	2,8650	10,1231
CV%	19,08	38,80	19,53	37,25
d.m.s.	0,0200	0,1800	1,2368	8,3342

- médias seguidas por letras distintas na vertical, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

O teor de artemisinina foi significativamente menor no tratamento com omissão de N, não diferindo nos demais tratamentos. A produção aumentou até o nível de 210 mg N/l, caindo no nível de 315 mg N/l. O teor de ácido não diferiu entre os tratamentos, porém a sua produção seguiu o mesmo modelo de curva da produção de artemisinina e das extrações de nutrientes.

A figura 4 mostra o peso, a produção de artemisinina e do ácido artemisinínico, para os níveis de N estudados.

Figura 4 - Peso do material seco, produção de artemisinina e ácido artemisinínico em função dos níveis de N, estudados no experimento de 1993.

As tabelas 24 e 25 mostram o peso de material seco, os teores de nutrientes, para os tratamentos completo e com omissões estudados no segundo cultivo.

Tabela 24 - Peso do material seco por planta e teores de macronutrientes em função dos tratamentos, no experimento de 1993.

Tratamentos	Peso material	N	P	K	Ca	Mg	S
	seco (g)	(mg/g)					
Completo	8,11 a	38,3 b	3,7 a	41,a	8,4 b	5,4 a	2,2 b
Omissão N	0,76 c	12,7 c	5,0 a	35,9 a	15,4 a	3,5 b	2,4 a
Omissão P	3,28 c	27,1 d	1,3 b	28,4 cd	12,1 a	5,7 a	2,5 ab
Omissão K	5,85 b	38,2 bc	3,5 a	8,4 e	8,2 b	5,3 a	2,7 a
Omissão Ca	6,37 ab	41,8 ab	3,8 a	31,3 bc	2,3 c	4,4 b	2,6 ab
Omissão Mg	8,21 a	45,2 a	3,4 a	36,6 ab	8,5 b	2,4 c	2,6 ab
Omissão S	5,95 b	33,8 c	3,3 a	22,5 d	9,9 ab	4,4 b	1,5 c
Média	6,30	37,4	3,2	28,2	8,2	4,6	2,3
CV%	14,56	5,27	14,72	11,28	16,18	8,40	6,66
d.m.s.	2,11	0,45	0,11	0,73	0,31	0,09	0,04

- médias seguidas por letras distintas na vertical, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 25 - Teores de micronutrientes em função dos tratamentos, no experimento de 1993.

Tratamentos	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	(ug/g)				
Completo	76,25 abc	3,50 b	251,75 b	71,25 b	43,75 abc
Omissão N	94,00 a	9,50 a	212,75 b	204,75 a	75,25 a
Omissão P	62,00 c	11,00 a	324,00 a	103,75 b	46,75 abc
Omissão K	85,75 ab	6,75 ba	335,50 a	112,50 b	39,75 c
Omissão Ca	92,25 a	6,25 b	243,50 bc	184,00 a	56,50 a
Omissão Mg	57,50 c	4,00 b	200,50 c	120,75 b	55,25 ab
Omissão S	69,00 bc	5,00 b	200,00 c	104,25 b	41,75 bc
Média	7,29	6,08	259,21	116,08	47,29
CV%	12,48	23,63	7,67	20,65	13,55
d.m.s.	21,32	3,31	45,70	55,14	14,73

- médias seguidas por letras distintas na vertical, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Os tratamentos completo e com omissão de Mg foram os com maior peso, diferindo significativamente dos demais, que decresceram na seguinte ordem: omissões de Ca, S, K e P.

No tratamento com omissão de P, os teores de N e P foram os mais baixos obtidos, os teores de K e B foram mais baixos que os do tratamento completo e os

teores de Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn e Fe foram maiores que os teores do tratamento completo.

No tratamento com omissão de K, os teores de N, P, Ca, Mg, B, Mn e Zn não diferiram dos teores do tratamento completo. Foram ligeiramente maiores para os teores de S, Cu e Fe e somente menor para o teor de K.

No tratamento com omissão de Ca, os teores de N, P, S, B, Cu, Fe e Zn não diferiram dos teores do tratamento completo, sendo menores para os teores de K, Ca e Mg e maior somente para o teor de Mn.

No tratamento com omissão de Mg, os teores de P, K, Ca, S, B, Cu, Mn e Zn não diferiram dos teores no tratamento completo, sendo maior para o teor de N e menor para Mg e Fe.

No tratamento com omissão de S, os teores de P, Ca, B, Cu, Mn e Zn não diferiram dos teores no tratamento completo, sendo menores para os demais nutrientes.

As tabelas 26 e 27 mostram a extração de macro e micronutrientes por plantas de *Artemisia*, para os tratamentos completo e de omissões estudados.

Tabela 26 - Extração de macronutrientes em função dos tratamentos, no experimento de 1993.

Tratamento	N	P	K	Ca	Mg	S
	(mg/planta)					
Completo	309,41 ab	29,78 a	337,92 a	68,81 a	43,73 a	18,10 a
Omissão N	9,68 c	3,78 c	27,44 c	11,76 c	2,67 c	1,80 c
Omissão P	88,58 d	4,14 b	92,91 cd	39,50 bc	18,56 c	8,20 b
Omissão K	222,35 c	20,66 a	49,44 d	47,79 ab	31,05 b	15,62 a
Omissão Ca	267,43 bc	24,51 a	196,30 b	14,35 c	27,58 bc	16,59 a
Omissão Mg	371,12 a	27,88 a	229,71 a	69,63 a	19,47 bc	21,19 a
Omissão S	200,40 c	19,56 a	131,39 c	58,20 ab	26,47 bc	9,13 b
Média	243,21	21,09	184,61	49,71	27,81	14,80
CV%	15,33	21,35	12,33	24,63	18,58	18,57
d.m.s.	85,77	10,36	52,36	28,16	11,89	6,32

- médias seguidas por letras distintas na vertical, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 27 - Extração de micronutrientes em função dos tratamentos completo, no experimento de 1993.

Tratamentos	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	(ug/planta)				
Completo	622,73 a	28,11 a	2041,74 a	580,80 c	356,97 ab
Omissão N	71,31 c	36,52 a	162,22 c	155,19 c	57,05 c
Omissão P	201,35 b	35,30 a	1060,94 b	342,35 c	153,25 c
Omissão K	496,13 a	38,50 a	1980,71 a	629,87 c	231,25 bc
Omissão Ca	609,83 a	39,84 a	1558,30 ab	1152,38 a	358,56 ab
Omissão Mg	472,65 a	32,64 a	1643,90 ab	993,34 ab	452,69 a
Omissão S	412,14 ab	29,26 a	1203,93 b	632,35 bc	246,61 bc
Média	469,14	33,94	581,59	722,02	300,39
CV%	23,34	20,88	19,64	21,89	22,97
d.m.s.	251,85	16,30	716,40	363,43	158,66

- médias seguidas por letras distintas na vertical, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

A extração dos macronutrientes e de B, Cu e Zn foram igualmente maiores para os tratamentos completo e omissão de Mg (exceto para o nutriente Mg neste último).

O tratamento com omissão de P extraiu menos que o completo, para a maioria dos nutrientes (exceto Cu).

O tratamento com omissão de K não diferiu do completo, para a extração de P, Ca, S e micronutrientes, sendo menor para as extrações de N, K e Mg.

O tratamento com omissão de Ca não diferiu do completo, para a extração de N, P, S, B, Cu, Fe e Zn e extraiu menos K, Ca e Mg, e mais de Mn.

O tratamento com omissão de Mg não diferiu do completo, a não ser para os teores de Mg que foi menor e o de Mn que foi maior.

No tratamento com omissão de S, observou-se uma extração menor que no tratamento completo para quase todos os nutrientes, exceto para o Cu e Mn que não diferiram significativamente.

Na tabela 28 a seguir são apresentados os teores de artemisinina e ácido artemisinínico e a sua produção por planta, para os tratamentos completo e omissões de nutrientes estudados.

Tabela 28 - Teores de artemisinina e ácido artemisinínico e produção desses compostos por planta de artemisia em função dos tratamentos, no experimento de 1993.

Tratamentos	Artemisinina	Ac.Artemisinínico	Artemisinina	Ac.Artemisinínico
	(%)		(mg/planta)	
Completo	0,0690 a	0,2500 a	5,4550 a	20,2200 a
Omissão N	0,0340 b	0,1375 a	0,2600 c	1,0475 c
Omissão P	0,0565 a	0,0880 b	1,8275 c	3,0225 b
Omissão K	0,0498 a	0,0750 b	2,8600 bc	4,5075 b
Omissão Ca	0,0533 a	0,0750 b	3,4400 bc	4,6575 b
Omissão Mg	0,0583 a	0,0908 b	4,7200 ab	7,3775 b
Omissão S	0,0468 a	0,1500 ab	2,7600 bc	8,7975 b
Média	0,0556	0,1215	1,4967	13,9155
CV%	25,45	42,80	24,91	48,26
d.m.s.	0,0325	0,1200	2,0100	8,7900

- médias seguidas por letras distintas na vertical, diferem entre si pelo

teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

O teor de artemisinina não diferiu entre os tratamentos estudados, no entanto, a menor produção de artemisinina foi observada no tratamento com omissão de P, que foi o que mais se aproximou do tratamento completo, seguido das omissões de S, K, Ca e Mg. O teor do ácido foi significativamente maior no tratamento completo quando comparado às omissões, seguindo o mesmo padrão em sua produção.

O peso do material seco e as produções obtidas, são ilustrados na figura 5.

Figura 5 - Peso do material seco, produção de artemisinina e ácido artemisinínico nos tratamentos completo e com omissões, estudados no cultivo de 1993.

Se os resultados de teor de artemisinina obtidos no segundo experimento (média de 0,06%) forem comparados com os resultados de SRIVASTAVA & SHARMA (1990), que estudaram a influência do balanço de micronutrientes sobre o crescimento e o teor de artemisinina em *Artemisia annua* L. cultivada com solução nutritiva em casa-de-vegetação, cujo valor do tratamento completo foi de 0,02%; verificamos que os teores obtidos nas mesmas condições de cultivo foram superiores aos do trabalho, demonstrando o potencial da planta em nossas condições.

A tabela 29 apresenta as correlações simples entre os parâmetros avaliados e as porcentagens de artemisinina e ácido artemisinínico e as produções dos mesmos para os níveis de N estudados, no primeiro cultivo.

Tabela 29 - Coeficientes de correlação entre os parâmetros avaliados e a % de artemisinina, % de ácido artemisinínico e a produção dos mesmos para os tratamentos de níveis de N, no experimento de 1992.

Parâmetros	Coeficiente de Correlação ¹
% P x % artemisinina	0.5464 *
% K x % ácido artemisinínico	- 0.4537 **
% Ca x Produção artemisinina	0.5395 *
% Ca x Produção ác. artemisinínico	0.5857 **
% S x % artemisinina	0.5664 **
% B x Produção artemisinina	0.4515 *
% B x Produção ác. artemisinínico	0.4648 *
% Cu x Produção ác. artemisinínico	- 0.4548 *
% Fe x Produção artemisinina	- 0.4631 *
% Fe x Produção ác. artemisinínico	- 0.4893 *
% Mn x Produção artemisinina	- 0.4805 *
% Mn x Produção ác. artemisinínico	- 0.6395 **
% Zn x Produção artemisinina	- 0.4688 *
% Zn x Produção ác. artemisinínico	- 0.5261 *
Extração N x Produção artemisinina	0.5902 **
Extração N x Produção ác. artemisinínico	0.6676 ***

¹ Só estão apresentados os parâmetros com correlação significativa.

Tabela 29 - Coeficientes de correlação entre os parâmetros avaliados e a % de artemisinina, % de ácido artemisinínico e a produção dos mesmos para os tratamentos de níveis de N no experimento de 1992 (continuação).

Parâmetros	Coeficiente de Correlação ¹
Extração P x Produção artemisinina	0.6558 ***
Extração P x Produção ác. artemisinínico	0.8391 ***
Extração K x Produção artemisinina	0.4921 *
Extração K x Produção ác. artemisinínico	0.6157 **
Extração Ca x Produção artemisinina	0.6623 **
Extração Ca x Produção ác. artemisinínico	0.7693 ***
Extração Mg x Produção artemisinina	0.6679 ***
Extração Mg x Produção ác. artemisinínico	0.7456 ***
Extração S x Produção artemisinina	0.6631 ***
Extração S x Produção ác. artemisinínico	0.7500 ***
Extração B x Produção artemisinina	0.6405 **
Extração B x Produção ác. artemisinínico	0.7797 ***
Extração Cu x Produção artemisinina	0.5782 **
Extração Cu x Produção ác. artemisinínico	0.6397 **
Extração Fe x Produção ác. artemisinínico	0.4494 *
Extração Mn x Produção artemisinina	0.5019 *
Extração Mn x Produção ác. artemisinínico	0.5242 **
Extração Zn x Produção artemisinina	0.6053 **
Extração Zn x Produção ác. artemisinínico	0.7804 ***

¹ Só estão apresentados os parâmetros com correlação significativa.

Observou-se que, o peso do material seco correlacionou-se significativamente com as produções de artemisinina e de ácido artemisinínico. Os

teores de P e S correlacionaram-se com a % de artemisinina e a % de K com a % de ácido artemisinínico. Já a produção de artemisinina correlacionou-se com os teores de Ca, B, Fe, Mn e Zn e a produção de ácido artemisinínico com os teores de Ca, B, Cu, Fe, Mn e Zn. As produções tanto da artemisinina como do ácido artemisinínico correlacionaram-se com as extrações de todos os nutrientes estudados.

A tabela 30 apresenta as correlações simples entre os parâmetros avaliados e as porcentagens de artemisinina e ácido artemisinínico e a produção dos mesmos para os tratamentos completo e de omissões estudados, no primeiro cultivo.

Tabela 30 - Coeficientes de correlação entre os parâmetros avaliados e a % de artemisinina, % de ácido artemisinínico e a produção dos mesmos para os tratamentos completo e omissões de P, K, Mg e S, no experimento de 1992.

Parâmetros	Coeficiente de Correlação ¹
% P x Produção ác. artemisinínico	0.4909 *
% B x % ácido artemisinínico	0.4605 *
% B x Produção ác. artemisinínico	0.5998 **
% Fe x Produção ác. artemisinínico	0.4902 *
% Mn x Produção ác. artemisinínico	0.5117 *
% Zn x Produção ác. artemisinínico	0.4706 *
Extração N x Produção ác. artemisinínico	0.6609 **
Extração P x Produção ác. artemisinínico	0.6981 ***
Extração K x Produção ác. artemisinínico	0.4554 *
Extração Ca x Produção artemisinina	0.4899 *
Extração Ca x Produção ác. artemisinínico	0.7131 ***

¹ Só estão apresentados os parâmetros com correlação significativa.

Tabela 30 - Coeficientes de correlação entre os parâmetros avaliados e a % de artemisinina, % de ácido artemisinínico e a produção dos mesmos para os tratamentos completo e omissões de P, K, Mg e S, no experimento de 1992 (continuação).

Parâmetros	Coeficiente de Correlação ¹
Extração Mg x Produção ác. artemisinínico	0.6012 **
Extração B x Produção artemisinina	0.4410 *
Extração B x Produção ác. artemisinínico	0.6610 **
Extração Cu x Produção ác. artemisinínico	0.6819 **
Extração Fe x Produção ác. artemisinínico	0.5936 **
Extração Mn x Produção ác. artemisinínico	0.6878 ***
Extração Zn x Produção ác. artemisinínico	0.6820 **

¹ Só estão apresentados os parâmetros com correlação significativa.

Observou-se que o peso do material seco correlacionou-se significativamente com as produções de artemisinina e de ácido artemisinínico. A produção do ácido artemisinínico correlacionou-se com os teores de P, B, Fe e Zn e com as extrações de N, P, K, Ca, Mg, B, Cu, Fe, Mn e Zn. Já a produção de artemisinina correlacionou-se com a extração de Ca e B.

A tabela 31 apresenta as correlações simples entre os parâmetros avaliados e as porcentagens de artemisinina e ácido artemisinínico e a produção dos mesmos para os níveis de N estudados no segundo cultivo.

Tabela 31 - Coeficientes de correlação entre os parâmetros avaliados e a % de artemisinina, % de ácido artemisinínico e a produção dos mesmos para os tratamentos de níveis de N, no experimento de 1993.

Parâmetros	Coeficiente de Correlação ¹
Peso de Material seco x % artemisinina	0.6340 **
% N x % artemisinina	- 0.6830 **
% N x % ácido artemisinínico	0.5033 *
% N x Produção artemisinina	0.7087 *
% N x Produção ác. artemisinínico	0.6534 **
% P x % artemisinina	- 0.4908 *
% P x Produção artemisinina	- 0.7147 **
% P x Produção ác. artemisinínico	- 0.6477 **
% Ca x % artemisinina	- 0.7836 ***
% Ca x Produção artemisinina	- 0.7258 ***
% Ca x Produção ác. artemisinínico	- 0.5521 *
% Mg x Produção artemisinina	0.7713 ***
% Mg x Produção ác. artemisinínico	0.7142 **
% B x % artemisinina	- 0.6553 **
% B x Produção artemisinina	- 0.5269 *
% Cu x % artemisinina	- 0.5798 *
% Cu x Produção artemisinina	- 0.8476 ***
% Cu x Produção ác. artemisinínico	- 0.6953 **
% Fe x % artemisinina	0.5496 *
% Mn x % artemisinina	- 0.5473 *
% Mn x Produção artemisinina	- 0.8643 ***

¹ Só estão apresentados os parâmetros com correlação significativa.

Tabela 31 - Coeficientes de correlação entre os parâmetros avaliados e a % de artemisinina, % de ácido artemisinínico e a produção dos mesmos para os tratamentos de níveis de N no experimento de 1993 (continuação).

Parâmetros	Coeficiente de Correlação ¹
% Mn x Produção ác. artemisinínico	- 0.7537 ***
% Zn x % artemisinina	- 0.8165 ***
% Zn x Produção artemisinina	- 0.8184 ***
% Zn x Produção ác. artemisinínico	- 0.6416 **
Extração N x % artemisinina	0.6216 **
Extração N x Produção artemisinina	0.9086 ***
Extração N x Produção ác. artemisinínico	0.8328 ***
Extração P x % artemisinina	0.6374 **
Extração P x Produção artemisinina	0.9039 ***
Extração P x Produção ác. artemisinínico	0.7720 ***
Extração K x % artemisinina	0.4906 *
Extração K x Produção artemisinina	0.8720 ***
Extração K x Produção ác. artemisinínico	0.8480 ***
Extração Ca x Produção artemisinina	0.8392 ***
Extração Ca x Produção ác. artemisinínico	0.8058 ***
Extração Mg x % artemisinina	0.5307 *
Extração Mg x Produção artemisinina	0.8933 ***
Extração Mg x Produção ác. artemisinínico	0.8099 ***
Extração S x % artemisinina	0.6091 **
Extração S x Produção artemisinina	0.9021 ***
Extração S x Produção ác. artemisinínico	0.8487 ***
Extração B x % artemisinina	0.5048 *

¹ Só estão apresentados os parâmetros com correlação significativa.

Tabela 31 - Coeficientes de correlação entre os parâmetros avaliados e a % de artemisinina, % de ácido artemisinínico e a produção dos mesmos para os tratamentos de níveis de N no experimento de 1993 (continuação).

Parâmetros	Coeficiente de Correlação ¹
Extração B x Produção artemisinina	0.8353 ***
Extração B x Produção ác. artemisinínico	0.8041 ***
Extração Fe x % artemisinina	0.7238 **
Extração Fe x Produção artemisinina	0.8637 ***
Extração Fe x Produção ác. artemisinínico	0.6505 **
Extração Mn x % artemisinina	0.5162 *
Extração Mn x Produção artemisinina	0.4872 *
Extração Zn x % artemisinina	0.5407 *
Extração Zn x Produção artemisinina	0.8469 ***
Extração Zn x Produção ác. artemisinínico	0.7828 ***

¹ Só estão apresentados os parâmetros com correlação significativa.

Observou-se que o peso do material seco correlacionou-se tanto com as produções de artemisinina e de ácido artemisinínico, como com a % de artemisinina.

A % de artemisinina correlacionou-se com os teores de N, P, Ca, B, Cu, Fe, Mn e Zn e com as extrações de N, P, K, Mg, S, B, Fe, Mn e Zn. Já a % de ácido só correlacionou-se com o teor de N.

A produção de artemisinina correlacionou-se com os teores de N, P, Ca, Mg, B, Cu, Mn e Zn, e com as extrações de N, P, Ca, Mg, S, B, Fe, Mn e Zn. Já a

produção de ácido artemisinínico correlacionou-se com os teores de N, P, Ca, Mg, Cu, Mn e Zn, e com as extrações de N, P, K, Ca, Mg, S, B, Fe e Zn.

A tabela 32 apresenta as correlações simples entre os parâmetros avaliados e as porcentagens de artemisinina e ácido artemisinínico e a produção dos mesmos para os tratamentos completo e de omissões estudados, no segundo cultivo.

Tabela 32 - Coeficientes de correlação entre os parâmetros avaliados e a % de artemisinina, % de ácido artemisinínico e a produção dos mesmos para os tratamentos completo e omissões de P, K, Ca, Mg e S no experimento de 1993.

Parâmetros	Coeficiente de Correlação¹
% N x Produção artemisinina	0.6131 **
% P x Produção artemisinina	0.5464 **
% K x % artemisinina	0.4732 *
% K x % ácido artemisinínico	0.4547 *
% K x Produção artemisinina	0.5722 **
% K x Produção ác. artemisinínico	0.5089 **
% S x % ácido artemisinínico	- 0.4062 *
% Cu x % ácido artemisinínico	- 0.4264 *
% Cu x Produção artemisinina	- 0.6143 **
% Cu x Produção ác. artemisinínico	- 0.5756 **
% Mn x % ácido artemisinínico	- 0.4939 *
% Mn x Produção ác. artemisinínico	- 0.4765 *
Extração N x Produção artemisinina	0.7568 ***
Extração N x Produção ác. artemisinínico	0.4384 *

¹ Só estão apresentados os parâmetros com correlação significativa.

Tabela 32 - Coeficientes de correlação entre os parâmetros avaliados e a % de artemisinina, % de ácido artemisinínico e a produção dos mesmos para os tratamentos completo e omissões de P, K, Ca, Mg e S no experimento de 1993 (continuação).

Parâmetros	Coeficiente de Correlação ¹
Extração P x Produção artemisinina	0.7297 ***
Extração P x Produção ác. artemisinínico	0.4983 *
Extração K x % ácido artemisinínico	0.4997 *
Extração K x Produção artemisinina	0.7898 ***
Extração K x Produção ác. artemisinínico	0.6649 ***
Extração Ca x % ácido artemisinínico	0.4240 *
Extração Ca x Produção ác. artemisinínico	0.5247 **
Extração K x Produção artemisinina	0.7898 ***
Extração K x Produção ác. artemisinínico	0.6649 ***
Extração Ca x % ácido artemisinínico	0.4240 *
Extração Ca x Produção ác. artemisinínico	0.5247 **
Extração Mg x % ácido artemisinínico	0.5014 *
Extração Mg x Produção artemisinina	0.4716 *
Extração Mg x Produção ác. artemisinínico	0.6467 ***
Extração S x Produção artemisinina	0.6511 ***
Extração B x Produção artemisinina	0.5385 **
Extração B x Produção ác. artemisinínico	0.4456 *
Extração Cu x % ácido artemisinínico	- 0.4468 *
Extração Fe x Produção artemisinina	0.5557 **
Extração Zn x Produção artemisinina	0.6675 ***

¹ Só estão apresentados os parâmetros com correlação significativa.

Observou-se que o peso do material seco correlacionou-se significativamente com as produções de artemisinina e de ácido artemisinínico e a % de artemisinina com a % de K. Já a % de ácido correlacionou-se com os teores de K, S, Cu e Mn e com as extrações de K, Ca, Mg e Cu.

A produção de artemisinina correlacionou-se com os teores de N, P, K e Cu e com as extrações de N, P, K, Mg, S, B, Fe e Zn. Já a produção de ácido artemisinínico correlacionou-se com os teores de K, Cu e Mn, e com as extrações de N, P, K, Ca, Mg e B.

4.2. Sintomatologia de deficiências nutricionais

Os sintomas de deficiências nutricionais observados nos dois experimentos estão apresentadas a seguir:

4.2.1. Primeiro experimento

Nitrogênio

Nas plantas com omissão de nitrogênio houve grande redução do crescimento. As folhas mais velhas perderam a coloração tornando-se amareladas no início secando depois. Nos níveis 70 ppm N e 140 ppm N houve uma pequena diminuição no tamanho e na produção de material seco, porém sem apresentarem

sintomas de deficiência de N. O nível 280 ppm N apresentou coloração verde intensa e maior massa foliar, sem diferença no tamanho.

Fósforo

As plantas com omissão de fósforo apresentaram menor crescimento, as folhas mais velhas apresentavam pontos cloróticos e necrosados, chegando a secar ao final do experimento.

Potássio

As plantas com omissão de potássio não apresentaram sintomas visuais de deficiências.

Magnésio

As plantas com omissão de magnésio apresentaram clorose acentuada nas folhas mais velhas, sem redução no tamanho das plantas.

Enxofre

As plantas com omissão de enxofre não apresentaram sintomas visuais de deficiências.

As figuras 5, 6, 7 e 8 se referem a vista geral do experimento e aos tratamentos que apresentaram drástico sintoma de deficiência.

Figura 6 - Vista geral do experimento na casa de vegetação.

Figura 7 - Tratamento completo x Omissão de N.

Figura 8 - Tratamento completo x Omissão de P.

Figura 9 - Folhas dos tratamentos completo, com omissão de N e P.

4.2.2. Segundo ensaio

Nitrogênio

Nas plantas com omissão de nitrogênio houve grande redução do crescimento. As folhas mais velhas perderam a coloração tornando-se amareladas no início e depois secando. O tratamento foi colhido aos 94 dias antes dos demais, devido a seca quase total da planta.

No nível 105 ppm N houve uma pequena diminuição no tamanho das plantas e na produção de material seco, porém sem apresentar sintomas de deficiência de N.

O nível 315 ppm N apresentou coloração verde intensa e maior massa foliar, sem diferença no tamanho.

Fósforo

As plantas com omissão de fósforo apresentaram menor crescimento, as folhas mais velhas apresentavam pontos cloróticos e necrosados, chegando a secar ao final do tratamento.

Potássio

As plantas com omissão de potássio não apresentaram sintomas visuais de deficiências.

Cálcio

As plantas com omissão de cálcio apresentaram redução de tamanho, porém sem sintomas nas folhas.

Magnésio

As plantas com omissão de magnésio não apresentaram sintomas visuais de deficiência, estando com o mesmo tamanho e demais características do tratamento completo. Como na composição da solução com omissão de magnésio são colocadas duas fontes de N, sugere-se que esse fator esteja relacionado à sua semelhança ao tratamento completo tanto visual como nos demais parâmetros avaliados.

Enxofre

As plantas com omissão de enxofre não apresentavam sintomas visuais de deficiências.

5.CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

os teores de artemisinina obtido (0.06%), no tratamento completo do segundo experimento pode ser considerado alto, nas condições de cultivo estudadas,

o método desenvolvido mostrou-se eficiente para a comparação entre tratamentos, com a vantagem de quantificar também o ácido artemisinínico, que é um produto de interesse, uma vez que pode ser sinteticamente convertido em artmisinina,.

as omissões de nitrogênio e fósforo no substrato afetaram drasticamente o crescimento e a produção de matéria seca de artemisia,.

os níveis de nitrogênio testados não permitiram concluir-se sobre a necessidade de nitrogênio pela artemisia,

as produções tanto de artemisinina como de ácido artemisinínico correlacionaram-se com as extrações de todos os nutrientes estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARANHA, C. & YAHN, I. Descrição taxonômica de *Artemisia annua* L. comunicação pessoal.
- ACTON, N. & KLAYMAN, D.L. Artemisitene, a new sesquiterpene lactone endoperoxide from *Artemisia annua*. **Planta Medica**, Stuttgart,.51, 441-2 1985.
- ACTON, N., KLAYMAN, D.L., ROLLMAN, I.J. Reductive electrochemical HPLC assay for artemisinin (qinghaosu). **Planta Medica**, Stuttgart,.51, 445-6 1985.
- AKHILA, A., THAKUR, R.S. POPLI, S.P. Biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua* **Phytochemistry**, Stuttgart. 26: 1972-30, 1987.
- CHARLES, T.B. & CROOM Jr., E.M. Herbicide inputs for a new agronomic crop, annual wormwood (*Artemisia annua*) **Weed Technology**, Champaign, 5: 117 - 24, 1991.
- CHEN, P.K. & LEATHER, G.R. Plant growth regulatory activities of artemisinin and its related compounds. **Journal of Chemical Ecology**, New York, 16(6): 1867 - 76, 1990.

- CHEN, F. & ZHONG, G. Studies on several physiological factors on artemisinin synthesis in *Artemisia annua* L. Zhiwu Shenglixme Tongxum, Xangai, **5**: 26 - 30, 1987.
- CHEN, P.K.; POLATNICK, M.; LEATHER, G. Comparative study on artemisinin, 2,4-D, and glyphosate. Journal of Agriculture and Food Chemistry, Easton, **39**: 991-4, 1991.
- DELABAYS, N.; BLANC, C.; COLLET, G. La culture et la sélection d'*Artemisia annua* L. en vue de la production d'artémisinine. Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture, Lausanne, **24** (4): 245 - 51, 1992.
- DENYS, J.C.; SIMON, J.E.; WOOD, K.V.; HEINSTEIN, P. Germoplasm variation in artemisinin content of *Artemisia annua* using alternative method of artemisinin analysis from crude plant extract. Journal of Natural Products, Cincinnati, **53**: 157 - 60, Jan-feb 1990.
- DUKE, S.O., VAUGHN, K.C., CROOM Jr, E.M., ELSOHL, H.N. Artemisinin, a constituent of annual wormwood (*Artemisia annua*), is a selective phytotoxin. Weed Science, Davis, **35**: 499-505, 1987.
- EL-FERALY, F.S., AL-MESHAL, I.A., KHALIFA, S.I. Epi-deoxyarteannuin B and 6,7-dehydroartemisinic acid from *Artemisia annua* Journal of Natural Products, Cincinnati, **52**: 196-8, 1989.

- ELSOHLY, H.N.; CROOM Jr., E.M.; EL-FERALY, F.S.; EL-SHEREI, M.M. A large-scale extraction technique of artemisinin from *Artemisia annua*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, **53**(6): 1560 - 4, nov-dec, 1990.
- FERREIRA, J.F.S.; DENYS, J.C.; KALR, W.; JANICK,J.; SIMON,J.E. A comparison of Gas Chromatography and High Performance Liquid Chromatography for Artemisinin Analyses. **Phytochemical Analysis**, in press.
- FORMENTI, L. Brasileiro aprova droga contra malária. **O Estado de São Paulo**. São Paulo, 12dez.1992, p. 23.
- GALAMBOSI, B. Results of cultivation of some wildflower medicinal plants in the "Szilasmenti" cooperative. **Acta Horticulturae**, Wageningen, **96**: 343 - 52, 1980.
- GOMES, F.P. Curso de estatística experimental 5 ed. São Paulo, Nobel, 1972.530p.
- KLAYMAN, D.L.; LIN, A.J.; ACTON, N.; SCOVILL, J.P.; HOCH, J.M. Isolation of artemisinin (qinghaosu) from *Artemisia annua* growing in the United States. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, **47**(4) 715 - 7 July/Aug. 1984.
- KLAYMAN,D.L. Qinghaosu (artemisinin) an antimalarial drug from China. **Science**, Baugalore, **228**:1049 - 55, May 1985.
- LAUGHLIN, L. Physiological studies of *Artemisia annua*. *Acta Horticulturae*, Geneve, **320**: 145, 1992.
- LÊ, C.L. & COLLET, G.F. The *in vitro* culture of *Artemisia annua* L. **Recherche agronomie en Suisse**, Geneve, **31**(3): 111 - 6, 1991.

- LIENSCH, R.; SOICKE, H.; STOHN, C.; TULLNER, H.U. Formation of artemisinin in *A. annua* during one vegetation period. **Planta Medica**, Stuttgart, **52**(5): 387 - 90, Sept-Oct. 1986.
- MAYNARD, L. Malaria cure? hope from a harvest **Fall & Winter**, New York, 10 - 3, 1985.
- MISRA, L.N. Artemisinin-C, a sesquiterpene lactone from *Artemisia annua*. **Phytochemistry**, Stuttgart, 25:2892-3, 1986.
- NAIR, M.S.R.; ACTON, N.; KLAYMAN, D.L. Production of artemisinin in tissue culture of *Artemisia annua*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, **49**(3) 504 - 7, May/June 1986.
- PRASS, N.; VISSER, J.F.; SIEB, B.; WOERDENBAG, H.J.; MALINGRÉ, T.M. Laboratory selection of *Artemisia annua* L. for high artemisinin yielding types. **Phytochemical Analysis**, Utrecht 2: 80 - 3, 1991.
- ROTH, R.J. & ACTON, N. Isolation of epi-deoxyartemisinin B from *Artemisia annua*. **Planta Medica**, Stuttgart, 53:576, 1987.
- ROTH, R.J. & ACTON, N. Isolation of sesquiterpenes from *Artemisia annua*. **Journal Chemistry Education**, Stuttgart, 66:349-50, 1989.
- SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, 1: 223 - 33, 1975.
- SARRUGE, J.R. & HAAG, H.P. **Análise química em plantas**. Piracicaba, E.S.A. "Luiz de Queiroz", 1974, 56p.

- SCHMID, G. & HOFHEINZ, W. Total synthesis of qinghaosu. Journal of American Chemistry Society, Cincinnati, 105:624-5, 1983.
- SINGH, A.; VISHWAKARMA, R.A.; HUSAIN, A. Evaluation of *Artemisia annua* strains for higher artemisinin production. Planta Medica Stuttgart, 54(4):475 - 6, Oct. 1988.
- SRIVASTAVA, N.K. & SHARMA, S. Influence of micronutrient imbalance on growth and artemisinin content in *Artemisia annua*. Indian Journal of Pharmaceutical Science, Lucknow, 48(5): 225 - 7 Sept./Oct. 1990.
- SHARMA, A.; BINDRA, R.L.; RAKESH, T. *Artemisia annua* : Cultivation, Utilization & Chemical Studies. Current Research on Medicinal and Aromatic Plants, Lucknow, 13(1): 46 - 60, Jan/Mar. 1991.
- SHUKLA, A.; ABAD FAROOQI, A.H.; SHUKLA, Y.N.; SHARMA, S. Effect of triacontanol and chlormequat on growth, plant hormones and artemisinin yield in *Artemisia annua* L. Plant Growth Regulation, The Hague, 11: 165 - 71, 1992.
- TU, Y.Y., NI, M.Y., ZHONG, Y.R. Studies on the constituents of *Artemisia annua*. Part 2 Planta Medica Stuttgart, 44:143-5, 1982.
- WOERDENBAG, H.J.; PRASS, N.; BOS, R.; VISSER, J.F.; HENDRIKS, H.; MALINGRÉ, T.M. Analysis of artemisinin and related sesquiterpenoids from *Artemisia annua* L. by combined gas chromatography/mass spectrometry. Phytochemical Analysis, Utrecht, 2: 251 - 219, 1991.

WOERDENBAG, H.J.; LUGT, C.B.; PRASS, N. *Artemisia annua* L.: a source of novel antimalarial drugs. **Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition**, Utrecht, 12 (5): 169 - 81, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Artemisia annua* in: **Medicinal Plants in China**, Manila, Western Pacific Series 2: 42-3, 1989.

YOU-YOU, T.N.; MU-YUN, M.; YU-RONG, Z.; LAN-NA, L.; SHU-LIAN, C.; MU-QUN, Z.; XIU-ZENG, W.; ZHENG, J.; XIANO-TIAN, L. Studies on the constituents of *Artemisia annua* Part II. **Planta Medica**, Stuttgart, 44: 143 - 5 1982.