

## Quantificação de artemisinina em *Artemisia annua* L. – Uma comparação entre as técnicas de cromatografia em camada delgada com detecção densitométrica e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta

Marchese, J. A.<sup>1</sup>; Rehder, V. L.G.<sup>2</sup>; Sartoratto, A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal do CEFET-PR/AGRONOMIA, Pato Branco-PR, CEP 85503-390 ([abramo@pb.cefetpr.br](mailto:abramo@pb.cefetpr.br)). <sup>2</sup>Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA-UNICAMP, Paulínia-SP, CEP 13140-000.

**RESUMO:** *Artemisia annua* L., planta nativa da China e aclimatada no Brasil, é uma rica fonte de artemisinina, uma lactona sesquiterpênica que contém em sua estrutura uma função endoperóxido, a qual é atribuída sua atividade antimalárica. Este trabalho teve como objetivo verificar as vantagens e inconvenientes da técnica Cromatografia em Camada Delgada com Detecção Densitométrica (CCD/DT), comparando-a com a técnica Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção no Ultravioleta (CLAE/UV), nos métodos de quantificação de artemisinina em *A.annua*. Os resultados mostraram que a técnica CCD/DT não apresentou o grau de seletividade e sensibilidade necessários para considerá-la um método quantitativo. A técnica CLAE/UV foi o método mais seletivo e sensível para análises quantitativas de artemisinina. A técnica CCD/DT superestimou os teores de artemisinina quando comparada a técnica CLAE/UV.

**Palavras-chave:** artemisinina, *Artemisia annua* L., densitometria, cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta pressão.

**ABSTRACT:** A comparison of thin layer chromatography and high performance liquid chromatography for artemisinin analyses. *Artemisia annua* L., a native of China and adapted to Brazilian climate, is a rich source of artemisinin, a sesquiterpene lactone proven to be effective against the malaria agent Plasmodium. The scope of this work was to compare the method of thin layer chromatography (TLC) using densitometric detection with high performance liquid chromatography (HPLC) using ultraviolet detection for the analytical quantification of the artemisinin contents. The results show that the TLC method does not have the same selectivity and sensibility necessary to be a useful alternative method to HPLC. Under experimental conditions the TLC method over-estimated the artemisinin contents, compared to those determined by HPLC.

**Key Words:** artemisinin, *Artemisia annua* L., densitometry, thin layer chromatography, high pressure liquid chromatography.

### INTRODUÇÃO

A malária é a mais importante doença parasitária tropical. A estimativa mundial de ocorrência da doença é da ordem de 300 a 500 milhões de casos clínicos por ano e a mortalidade causada pela malária é superior a 1 milhão ao ano (WHO, 1998). O aparecimento de cepas do *Plasmodium* spp, principalmente do *P.falciparum*, resistentes às drogas para o combate da malária, particularmente a cloroquina, é o fator que mais colabora para o crescimento dos casos clínicos e mortes causadas pela doença. Além da cloroquina, outros medicamentos como a sulfadoxina/pirimetamina e a mefloquina estão perdendo sua eficácia no combate à malária (Klayman, 1985; Butler *et al.*, 1997; WHO, 1998). Até o momento, a melhor alternativa para o tratamento da malária, causada pelo *P.falciparum*,

é a utilização dos derivados semi-sintéticos da artemisinina (Figura 1), uma lactona sesquiterpênica isolada das folhas de *Artemisia annua* L., que contém em sua estrutura uma função endoperóxido, à qual é atribuída sua potente atividade antimalárica (Klayman, 1985; WHO, 1998).

Análises de rotina ou experimentos que necessitam estimar o teor de artemisinina em grandes quantidades de amostras provenientes de *A.annua* exigem um método analítico que alie precisão suficiente à rapidez na sua execução (Delabays, 1997). Outro fator a considerar é que o método deve oferecer a possibilidade da detecção simultânea de outros sesquiterpenos, como o ácido artemisinínico (Woerdenbag *et al.*, 1991; Delabays, 1997), que é o mais abundante bioprecursor da artemisinina e tem sido usado na síntese química parcial da mesma (Geldre *et al.*, 1997; Woerdenbag *et al.*, 1991).

Recebido para publicação em 13/02/01 e aceito para publicação em 07/11/01.

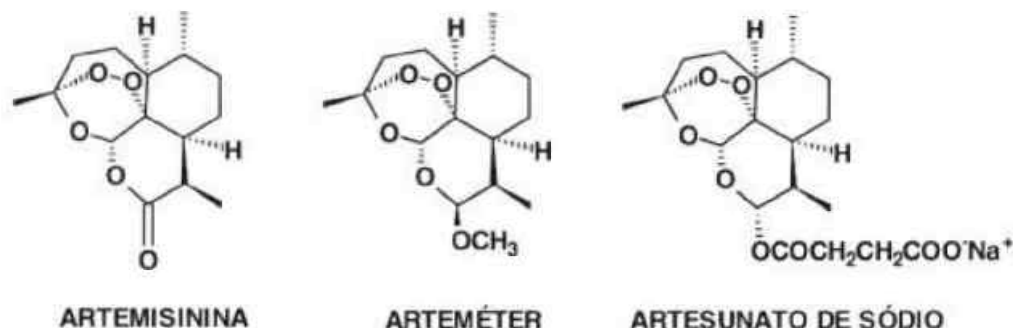


FIGURA 1: Artemisinina e alguns de seus derivados semi-sintéticos antimaláricos.

Vários autores afirmam que a análise de artemisinina por CLAE/UV é dificultada devido à inexistência de cromóforos (Zhao & Zeng, 1986; Elsohly *et al.*, 1987; Woerdenbag *et al.*, 1991; Jaziri *et al.*, 1993; Delabays, 1997) e de grupos funcionais na molécula (Jaziri *et al.*, 1993; Geldre *et al.*, 1997). Outra desvantagem é que vários compostos do extrato bruto de *A. annua* interferem na sua detecção (Elsohly *et al.*, 1990; Geldre *et al.*, 1997).

Diversos métodos analíticos têm sido descritos na literatura para a determinação do teor de artemisinina e outras lactonas sesquiterpênicas em *A. annua*. Métodos considerados semiquantitativos, como a cromatografia em camada delgada com quantificação por densitometria - CCD/DT (Bryson & Croom, 1991; Delabays *et al.*, 1994; Gupta *et al.*, 1996; Magalhães, 1996; Delabays, 1997; Magalhães *et al.*, 1997; Marchese, 1999) e CCD com leitura visual (Pras *et al.*, 1991; Foglio, 1996; Magalhães, 1996) são utilizados. Outros métodos mais sensíveis e específicos envolvem a cromatografia líquida de alta eficiência com detector eletroquímico - CLAE/EQ (Acton *et al.*, 1985; Charles *et al.*, 1990; Delabays *et al.*, 1994; Ferreira, 1994; Ferreira *et al.*, 1994; Ferreira & Janick, 1996; Delabays, 1997); a cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta - CLAE/UV sem derivatização da artemisinina (Elhag *et al.*, 1992); a CLAE/UV com derivatização pré-coluna (Zhao & Zeng, 1986; Liersch *et al.*, 1986; Pras *et al.*, 1991; Marchese, 1999); a CLAE/UV com derivatização pós-coluna (Elsohly *et al.*, 1987); a cromatografia gasosa - CG (Sipahimalani *et al.*, 1991) e a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa - CG/EM (Woerdenbag *et al.*, 1991; Ferreira *et al.*, 1994). Algumas técnicas imunológicas também são descritas (Jaziri *et al.*, 1993; Ferreira & Janick, 1996b).

Devido à ausência de cromóforos na molécula, CLAE/EQ é a técnica mais adequada para quantificar a artemisinina (Acton *et al.*, 1985; Charles *et al.*, 1990; Ferreira *et al.*, 1994). CLAE/EQ. Porém, é considerado um método demorado quando há necessidade de se realizar um grande número de análises em curto espaço de tempo (Woerdenbag *et al.*, 1991; Elhag *et al.*, 1992; Delabays, 1997). Outro fator a considerar é que o

detector eletroquímico exige um sistema totalmente isento de oxigênio, pois o oxigênio molecular é reduzido no mesmo potencial catódico da artemisinina (-0,8 a -0,9 V), conferindo um grau de dificuldade para estabilizar o detector (Foglio, 1996; Delabays, 1997; Geldre *et al.*, 1997). Outros compostos análogos à artemisinina, produzidos naturalmente por *A. annua*, podem interferir na sua detecção, como é o caso do artemisiteno (Ferreira *et al.*, 1994).

A CLAE/UV está entre as técnicas mais comumente usadas para análises fitoquímicas (Delabays, 1997), principalmente pelo detector UV ser facilmente encontrado nos laboratórios. Elhag *et al.* (1992), consideram a técnica usando CLAE/UV com detecção em  $\lambda = 216\text{nm}$  um método simples, rápido, sensível e seletivo para determinar artemisinina e compostos similares. No entanto, a artemisinina apresenta pouca absorvidade na região ultravioleta devido à ausência de grupos cromóforos na molécula que permitam uma detecção adequada (Zhao & Zeng, 1986; Elsohly *et al.*, 1987; Woerdenbag *et al.*, 1991; Jaziri *et al.*, 1993; Delabays, 1997), além da ausência de grupos funcionais para uma derivatização direta (Jaziri *et al.*, 1993; Geldre *et al.*, 1997). Outra desvantagem, é que muitos compostos presentes em extratos de *A. annua* também absorvem entre 210 e 220 nm, obliterando completamente o pico da artemisinina (Elsohly *et al.*, 1987; Charles *et al.*, 1990; Ferreira *et al.*, 1994). Uma reação química da molécula de artemisinina visando a sua modificação estrutural para um composto espectrometricamente ativo (cromóforo) se faz necessária. Para tal, Zhao & Zeng (1986), usando CLAE/UV, descrevem um tratamento pré-coluna para artemisinina com solução alcalina, transformando-a em um composto denominado Q292, que é instável, e este, por sua vez, através de tratamento ácido, é rearranjado para um produto estável, que absorve em 260 nm, o qual foi denominado de Q260 (Figura 2). Segundo Delabays (1997), citando Zhao (1987), este método apresenta uma sensibilidade elevada, próxima a 2,5 ng/mL. Paralelamente, é possível a dosagem simultânea do ácido artemisinínico, bem como a automatização do método (Delabays, 1997).

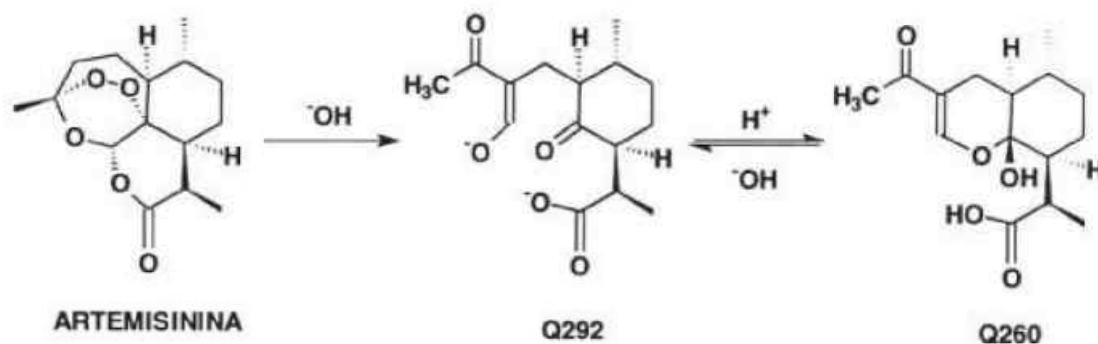


FIGURA 2. Conversão de artemisinina em Q260, segundo Zhao & Zeng (1986).

A técnica CCD é considerada, por alguns autores, reprodutível, rápida e barata (Foglio, 1996; Gupta *et al.*, 1996; Delabays, 1997), permitindo dosar várias amostras em uma mesma corrida, além de possibilitar a análise simultânea de artemisinina e ácido artemisinínico (Woerdenbag *et al.*, 1991; Foglio, 1996). Pras *et al.* (1991), comparando CLAE-UV e CCD com leitura visual, encontraram uma boa correlação entre as duas técnicas, justificando que a CCD pode ser utilizada em trabalhos de seleção de plantas ricas em artemisinina, com grande quantidade de amostras, possibilitando obter uma idéia global da percentagem de artemisinina. Gupta *et al.* (1996), comparando CCD/DT com CLAE/UV, e Delabays (1997), comparando CCD/DT com CLAE/UV e CLAE/EQ, encontraram boas correlações entre CCD/DT e os métodos CLAE, utilizando CCD/DT com sucesso na análise de grande número de amostras de plantas, em experimentos de melhoramento de *A. annua*. Entretanto, Delabays *et al.* (1994), comparando CCD/DT com CLAE/EQ, encontraram diferença nos resultados de ambas as técnicas, com CCD/DT apresentando teores em média 20% (mínimo de 16% e máximo de 28%) inferiores a CLAE/EQ. Segundo os autores, a explicação para tais desvios deve-se aos diferentes modos de extração. Charles *et al.* (1990), Ferreira (1994) e Geldre *et al.* (1997) não consideram o método por CCD suficientemente sensível e preciso para quantificar artemisinina, devido à pouca quantidade da molécula encontrada na forma intacta nos extratos da planta de *A. annua*, além de não ser possível evitar a interferência de outros compostos constituintes presentes nos mesmos extratos. Outra desvantagem que a análise quantitativa de substâncias através da CCD/DT demonstra, é o fato de compostos incolores, ao serem revelados, apresentarem distribuição desigual da mancha ou má resolução (Woerdenbag *et al.*, 1991; Lopes, 1995), em função da quantidade do revelador utilizado, aquecimento ou volatilização da amostra (Lopes, 1995). Por outro lado, Delabays (1997) afirma que os autores que consideram o método por CCD pouco adaptado para análises quantitativas de

artemisinina obtiveram suas conclusões a partir de resultados de análises de plantas pobres em artemisinina, com teor aproximado de 0,1% nas folhas, quando necessita-se de no mínimo 0,25%, sendo o teor ótimo próximo ou superior a 0,5%.

O objetivo deste trabalho foi verificar as vantagens e inconvenientes da técnica cromatografia em camada delgada com detecção densitométrica (CCD/DT), comparando-a com a técnica cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta (CLAE/UV), para a quantificação de artemisinina em *A. annua*.

## MATERIAL E MÉTODO

### Material Vegetal e Reagentes Utilizados

Como material vegetal, foi utilizado o híbrido de *A. annua* CPQBA 2/39x1V, que apresenta altos teores de artemisinina (0,87%) (Magalhães *et al.*, 1997), o que é recomendado para análises em CCD/DT (Delabays, 1997). Folhas de nove repetições de cada tratamento (11/20°C e 18/28°C) foram utilizadas nas análises para comparar a técnica CCD/DT com CLAE/UV. As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento CONVIRON CMP 4030, colhidas no Estádio B (Delabays, 1997) e secas em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 34°C±1°C durante 48 horas. Posteriormente, as folhas foram separadas dos talos e finamente moídas em moinho de facas com malha 40. Durante a moagem, junto às folhas, foi adicionado gelo seco. Os cristais de artemisinina utilizados nas análises foram purificados na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA/UNICAMP (ponto de fusão obtido = 154-155°C). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Em CLAE/UV foram utilizadas acetofenona e acetonitrila grau CLAE. Para comparar CCD/DT com CLAE/UV foram calculadas as correlações entre as duplicatas das repetições dentro de cada técnica e entre as técnicas, além do teste *t de Student* comparando as repetições destas. Também foram determinados os coeficientes de correlação.

### Análise por Cromatografia em Camada Delgada

Esta análise baseou-se no método descrito por Delabays (1997). Para cada amostra, 100 mg de folhas finamente moídas foram extraídas em 5 mL de tolueno, em ultradispersor por 30 segundos a 20.000 RPM. Posteriormente, o extrato foi centrifugado durante 6 minutos a 3200 RPM. Com uma microseringa, 3  $\mu$ L de cada extrato foi aplicado sobre uma cromatoplaça de sílica-gel 60 F<sub>254</sub> (MERCK art. 1.05554). Cada cromatoplaça recebeu 4 diferentes concentrações de artemisinina padrão (1,5; 2,0; 2,5 e 3,0  $\mu$ L de uma solução contendo 0,25  $\mu$ g/ $\mu$ L) ao centro, mais 4 aplicações laterais, em duplicata, das amostras. As cromatoplaças foram eluídas em cuba de vidro previamente saturada com uma mistura de clorofórmio:metanol (98:2). Para a revelação, uma solução contendo 50 mL de ácido acético glacial, 0,5 mL de anisaldeído e 1,0 mL ácido sulfúrico concentrado, foi borrifada sobre as cromatoplaças. Posteriormente, cada cromatoplaça foi colocada em uma estufa a 110°C durante 5 minutos. Em seguida, para quantificar a artemisinina, usou-se um densitômetro Pharmacia-Biothech/Image-Master 1D, escaneando-se as cromatoplaças mancha por mancha e avaliando-se por comparação, a densidade óptica dos padrões e amostras. As medições foram feitas na região da luz visível e a resposta medida no modo reflectância.

### Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A quantificação de artemisinina por CLAE/UV foi conduzida de acordo com o método proposto por Zhao & Zheng (1986), modificado por Delabays (1997). Este método utiliza inicialmente uma derivatização pré-coluna da artemisinina, com solução alcalina, para a produção do composto Q292, que é transformado em meio ácido para Q260, este último detectável na região UV (Figura 2). Aproximadamente 100 mg de folhas finamente moídas foram extraídas com 5 mL de solução de extração contendo acetonitrila mais 0,5 mg/mL de acetofenona, usada como padrão interno. A extração foi feita em um ultradispersor por 30 segundos a 20.000 RPM, seguida de uma centrifugação a 3200 RPM por 6 minutos. Para a derivatização da artemisinina, foram adicionadas em um tubo de reação, alíquotas (em duplicata) de 1,0 mL de cada extrato, 1,0 mL de EtOH 95% e 4,0 mL de solução aquosa de NaOH 0,2%. Os tubos foram fechados com tampas de borracha e a mistura foi

aquecida a 40°C durante exatos 15 minutos (com agitação magnética), para depois ser rapidamente resfriada em banho de gelo e neutralizada com a adição de 4 mL de ácido acético 0,1 M. Para a derivatização dos padrões de artemisinina, substituiu-se 1,0 mL de EtOH 95% por 1 mL da solução de extração. Quatro diferentes concentrações de artemisinina foram utilizadas como padrão, respectivamente, 0,04; 0,2; 0,5 e 1,0 mg de artemisinina por mL de EtOH 95%. O teor de artemisinina foi calculado utilizando-se uma curva de calibração com padrão interno (acetofenona). Anteriormente à injeção, a mistura foi filtrada em filtro WATERS GVWP 0,2  $\mu$ m. O equipamento utilizado para dosar o Q260 por CLAE/UV constituiu-se de um cromatógrafo WATERS modelo M-45 de pistão simples, com injeção manual e um compartimento de aquecimento para a coluna, onde a temperatura foi mantida a 47°C. A separação foi efetuada em uma coluna WATERS/NOVA-PAK® C18/4 $\mu$ m (3,9x150 mm). Como fase móvel foi utilizada uma solução de tampão fosfato 10 mM mais acetonitrila, numa proporção de 80:20, numa vazão de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. Nestas condições, o tempo de retenção para Q260 foi de aproximadamente 3 minutos e para o padrão interno acetofenona de aproximadamente 8,5 minutos. A detecção foi feita no modo absorvância (comprimento de onda 260nm), através de um detector WATERS MODELO 481. O volume de amostra injetado foi de 20 $\mu$ l.

### RESULTADO E DISCUSSÃO

Os coeficientes de correlação ( $R^2$ ) encontrados para os padrões de artemisinina em CCD/DT variaram entre 0,900 e 0,988 (Figura 3), sendo em média superiores a 0,950. Todavia, os coeficientes de correlação para CCD/DT, quando comparados aos encontrados para CLAE/UV,  $R^2 = 0,999$  (Figura 4), foram menores e mostraram maior variação, apresentando uma menor linearidade que a técnica CLAE/UV. Para a técnica CCD/DT, foi comum encontrar pontos localizados fora da reta na curva padrão, obrigando a confecção da cromatoplaça. Isto, provavelmente, é decorrente do fato de compostos como a artemisinina presentes nos extratos, ao serem revelados, apresentarem distribuição desigual da mancha ou má resolução. Outros fatores que podem prejudicar a utilização da cromatoplaça são a quantidade do revelador utilizado, aquecimento ou volatilização da amostra durante a aplicação (Woerdenbag *et al.*, 1991; Lopes, 1995).

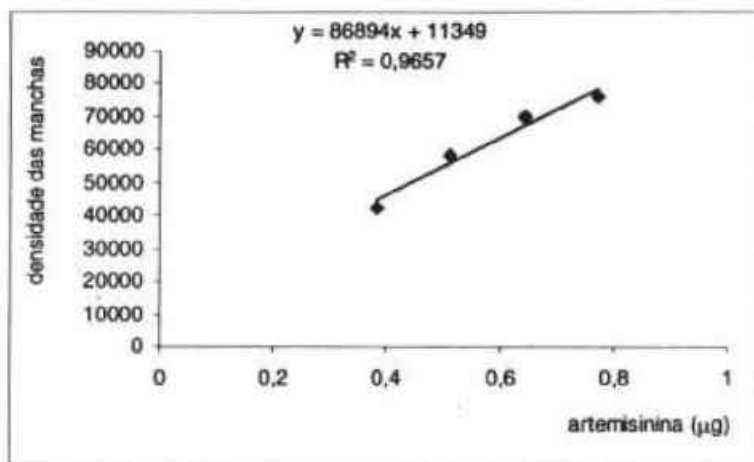


FIGURA 3. Curva padrão para análise de artemisinina por CCD/DT.

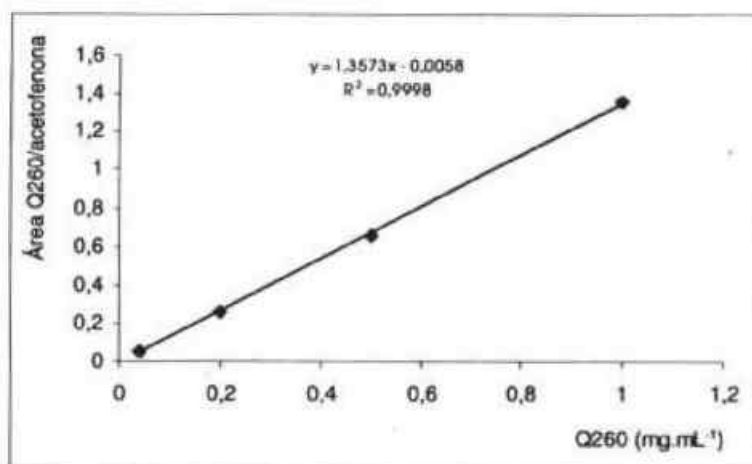


FIGURA 4. Curva padrão para análise do derivado da artemisinina Q260 por CLAE/UV.

Conforme pode-se observar na Tabela 1, a CCD/DT apresentou maior variação nos teores de artemisinina que a CLAE/UV, registrando um

coeficiente de variação (C.V.) de 19% para o tratamento 11/20 °C.

TABELA 1. Teores de artemisinina, expressos em porcentagem da massa seca de folhas de plantas de *A.annua*, submetidas a duas amplitudes térmicas de cultivo e analisadas por CLAE/UV e CCD/DT.

Amplitudes térmicas	CLAE/UV		CCD/DT		% variação em relação a CLAE/UV
	Q260 <sup>1</sup> ( $\text{mg.g}^{-1}$ )	C.V. <sup>2</sup> %	Artemisinina <sup>1</sup> ( $\text{mg.g}^{-1}$ )	C.V. <sup>2</sup> %	
11/20°C	6,3	11	8,5	19	+ 34,9
18/28°C	7,8***	13	9,9	12	+ 26,9

<sup>1</sup> Média de 09 repetições.

<sup>2</sup> C.V.: coeficiente de variação.

\*\*\* Significativo ( $p \leq 0,003$ ) pelo teste *t* de Student.

Ainda na Tabela 1, verificamos que o método CCD/DT apresentou teores de artemisinina superiores àqueles encontrados para CLAE/UV, aumentando em 34,9% para o tratamento 11/20°C e 26,9% para 18/28°C. Isso deve-se, provavelmente, à interferência de outros compostos presentes no extrato de *A. annua* (Charles *et al.*, 1990; Ferreira, 1994; Geldre *et al.*, 1997), levando a uma superestimação dos teores de artemisinina. Esses resultados contrariam os encontrados por Delabays *et al.* (1994), que encontraram uma redução de 20% no teor de artemisinina detectada através de CCD/DT quando comparada com CLAE/EQ.

Essas diferenças podem ser atribuídas às diversas operações manuais realizadas no método CCD/DT (Lopes, 1995), as quais podem gerar diferenças nas leituras, principalmente quando todas as repetições não são aplicadas em uma mesma cromatoplaca. Face a isto, algumas considerações devem ser feitas: 1 - para este experimento, as aplicações das amostras e padrões nas cromatoplasmas foram feitas manualmente com uma microseringa. Dependendo do tempo de aplicação, pode ocorrer evaporação do solvente e consequente cristalização de parte da amostra na agulha da microseringa; 2 - durante a revelação, o revelador é borrifado manualmente na e a quantidade distribuída pode ser desigual entre placas diferentes ou até mesmo em cromatoplaca, uma única placa, interferindo na quantidade de artemisinina detectada na densitometria. Sendo assim, uma alternativa para minimizar esses erros, seria o uso de aplicadores automáticos (não disponíveis no laboratório), o que melhoraria a reprodutibilidade das aplicações.

Portanto, pode-se concluir nas condições deste experimento, que o método que utiliza a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta foi mais preciso para análises quantitativas de artemisinina. A sensibilidade para as técnicas CCD/DT e CLAE/UV foram similares nos níveis de concentração estudados, sendo que a menor concentração de artemisinina detectada para CCD/DT foi 0,375 µg.mL<sup>-1</sup>, enquanto que para CLAE/UV foi de 0,04 µg.mL<sup>-1</sup>.

## AGRADECIMENTO

Agradecemos às Divisões de Agrotecnologia e de Química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA/UNICAMP pelo apoio na execução deste trabalho. Também agradecemos à CAPES pela bolsa PICDT e à Fundação Banco do Brasil pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ACTON, N., KLAYMAN, D.L., ROLLMAN, I.J. Reductive electrochemical HPLC assay for artemisinin (qinghaosu). *Planta Medica*, v.5, p.445, 1985.
- BRYSON, C.T., CROOM JUNIOR, E.M. Herbicide inputs for a new agronomic crop, annual wormwood (*Artemisia annua*). *Weed Technology*, v.5, p.117-24, 1991.
- BUTLER, D., MAURICE, J., O'BRIEN, C. Time to put malaria control on the global agenda. *Nature*, v.386, p.535-541, 1997.
- CHARLES, D.J., SIMON, J.E., WOOD, K.V., HEINSTEIN, P. Germplasm variation in artemisinin content of *Artemisia annua* using an alternative method of artemisinin analysis from crude plant extracts. *Journal of Natural Products*, v.53, n.1, p.157-60, 1990.
- DELABAYS, N. *Biologie de la reproduction chez L'Artemisia annua L. et genetique de la production en artemisinine*. Lausanne, 1997. 169p. Tese (Doutorado) - Université de Lausanne.
- DELABAYS, N., JENELTEN, U., PARIS, M., PIVOT, D., GALLAND, N. Aspects agronomiques et génétiques de la production d'artémisinine à partir d'*Artemisia annua* L. *Revue Suisse de Viticulture Arboriculture Horticulture*, v.26, p.291-296, 1994.
- ELHAG, H.M., EL-DOMIATY, M.M., EL-FERALY, F.S., MOSSA, J.S. & EL-OLEMY, M.M. Selection and micropropagation of high artemisinin producing clones of *Artemisia annua* L. *Phytotherapy Research*, v.6, p.20-4, 1992.
- ELSOHLY, H.N., CROOM, E.M., ELSOHLY, M.A. Analysis of the antimalarial sesquiterpene artemisinin in *Artemisia annua* by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) with postcolumn derivatization and ultraviolet detection. *Pharmaceutical Research*, v.4, n.3, p.258-60, 1987.
- FERREIRA, J.F.S. *Production and detection of Artemisinin in Artemisia annua L.* Indianapolis, 1994. 125p. Tese (Doutorado) - Purdue University.
- FERREIRA, J.F.S., JANICK, J. Immunoquantitative analysis of artemisin from *Artemisia* using ptyclonal antibodies. *Phytochemistry*, v.41, n.1, p.97-104, 1996.
- FERREIRA, J.P.S., CHARLES, D.J., WOOD, K., JANICK, J., SIMON, J.E. A comparison of gas chromatography and high performance liquid chromatography for artemisinin analyses. *Phytochemical Analysis*, v.5, p.116-20, 1994.
- FOGLIO, M.A. *estudo químico da Artemisia annua L. aclimatada no Brasil*. Campinas, 1996. 169p. Tese (Doutorado). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.
- 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.

- GUPTA, M.M., JAIN, D.C., VEMIA, R.K., GUPTA, A.P. A rapid analytical method for the estimation of artemisinin in *Artemisia annua*. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v.18, p.5-6, 1996.
- JAZIRI, M., DIALLO, B., VANHAELEN, M., HOMÈS, J., YOSHIMATSU, K., SHIMOMURA, K. Immunodetection of artemisinin in *Artemisia annua* cultivated in hydroponic conditions. **Phytochemistry**, v.33, n.4, p.821-6, 1993.
- KLAYMAN, D.L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. **Science**, v.228, p.1049-55, 1985.
- LIERSCH, R., SOICKE, H., STEHR, C., TÜLLNER, H.U. Formation of artemisinin in *Artemisia annua* during one vegetation period. **Planta Medica**, v.52, p.387-90, 1986.
- LOPES, J.L.C. Cromatografia em camada delgada. In: Collins, G.L. Braga, G.L. e Bonato, P.S. coord. **Introdução a métodos cromatográficos**. 6ª ed., Campinas: Editora da UNICAMP, 1995. 45-56.
- MAGALHÃES, P.M. **Seleção, melhoramento e nutrição da *Artemisia annua* L., para cultivo em região Intertropical**. Campinas, 1996. 117p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- MAGALHÃES, P.M., DELABAYS, N., SARTORATTO, A. New hybrid lines of the antimalarial species *Artemisia annua* L. guarantee its growth in Brazil. **Ciência e Cultura**, v.49, n.5/6, p.413-5, 1997.
- MARCHESE, J.A. **Produção e detecção de artemisinina em plantas de *Artemisia annua* L. submetidas a estresses abióticos**. Campinas, 1999. 88p. Tese (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
- PRAS, N., VISSER, J.F., BATTERMAN, S., WOERDENBAG, H.J. & MALINGRÉ, T.M. Laboratory selection of *Artemisia annua* L. for high artemisinin yielding types. **Phytochemical Analysis**, v.2, p.80-3, 1991.
- SIPAHIMALANI, A.T., FULZELE, D.P., HEBLE, M.R. Rapid method for the detection and determination of artemisinin by gas chromatography. **Journal of Chromatography**, v.538, p.452-5, 1991.
- WHO (World Health Organization), 1998. **"Malaria."** *Fact Sheet n° 94*. 10/1998. Disponível em: <<http://www.who.int/inffs/en/fact094.html>> Acesso (01/09/2000).
- WOERDENBAG, J.H., PRAS, 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**, v.2, p.215-9, 1991.
- ZHAO, S., ZENG, M.Y. Application of precolumn reaction to high-performance liquid chromatography of qinghaosu in animal plasma. **Analytical Chemistry**, v.58, p.289-92, 1986.