

lâmpada de deutério como corretor da absorção de fundo e nitrato de lantânio como supressor de interferentes na determinação de cálcio. As medidas de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn foram realizadas nos comprimentos de onda, 422,7; 324,7; 248,3; 285,2; 279,5 e 213,9 nm, respectivamente.

Referências

- ¹ Matos F J A. Farmácias Vivas, Edições UFC. Fortaleza. 1994, 179 p
- ² Jain N, Shahoo R K, Sondhi S M. Analysis for Mineral Elements of Some Medicinal Plants. Indian Drugs. 1992; 29 (4): 187-190
- ³ Moraes NMT, Nogueira CMD, Lopes MFG, Vasconcelos NMS, Sá MJHC. Estudo Inorgânico Analítico de Plantas Medicinais. Anais Assoc. Bras. Quím. 1995; 44 (4): 14-19
- ⁴ Nogueira CMD, Lopes MFG, Moraes NMT, Almeida MB, Vasconcelos NMS, Sá MJHC. Determinação de Elementos Minerais em Plantas Medicinais. Anais Assoc. Bras. Quím. 1998; 47 (1): 22-24
- ⁵ Association of Official analytical Chemistry - Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry, 13^a ed. Washington. 1980: 1018p
- ⁶ do Instituto Adolfo Lutz - Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Vol. I 3^a ed. São Paulo. 1985; 533p

Dosagem de artemisinina em *Artemisia annua* L. por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por índice de refração

Vera Lúcia Garcia Rehder^{1*}; Marili Villa Nova Rodrigues¹; Adilson Sartoratto¹; Mary Ann Foglio²

¹ Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA, UNICAMP, Paulínia, SP

² Divisão de Fitoquímica do CPQBA, UNICAMP, Paulínia, SP
rehder@cpqba.unicamp.br

Abstract

Artemisinin is a sesquiterpene lactone used in treatment of chloroquine-resistant malaria. This paper presents high-performance liquid chromatographic assay for artemisinin in leaves of *A. annua* using differential refractometer detector and a single step of clean-up in a silica cartridge. The average of recoveries were 95% and the limit of quantification was 0,21% p/p using 200 mg of the leaves. This method was found to be simple, robust and relatively rapid.

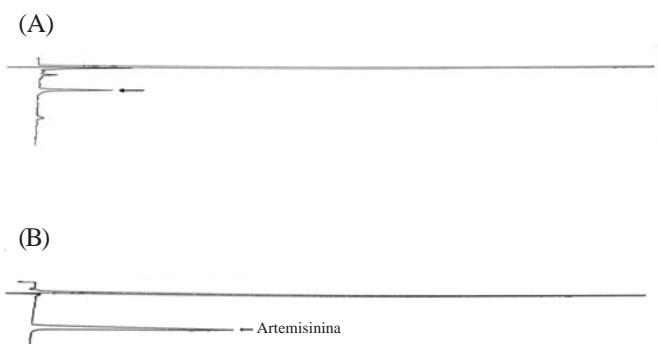
A malária é a mais importante doença parasitária tropical. A estimativa mundial de ocorrência da doença é da ordem de 300 a 500 milhões de casos clínicos por ano e a mortalidade causada pela malária é superior a 1 milhão ao ano¹. Até o momento, a melhor alternativa para o tratamento da malária, causada pelo *P. falciparum*, é a utilização dos derivados semi-sintéticos da artemisinina, uma lactona sesquiterpênica isolada das folhas de *Artemisia annua* L., que contém em sua estrutura uma função endoperóxido, a qual é atribuída sua potente atividade antimalárica^{1,2}. A inexistência de grupos cromóforos e funcionais nas moléculas de artemisinina e derivados, dificulta sua análise, e na maioria das vezes, para facilitar sua detecção, torna-se necessária a derivatização para outra espécie. Vários métodos por cromatografia líquida de alta eficiência têm sido propostos utilizando-se diferentes detectores: detecção eletroquímica³, detecção por ultravioleta sem derivatização⁴, com derivatização pré-coluna⁵, com derivatização pós-coluna⁶.

O procedimento de limpeza da amostra foi eficiente, mostrando um cromatograma com poucos interferentes, num tempo de eluição de 10 min (Figura 1). O método foi linear na faixa entre 90 a 900 mg/ml de artemisinina e o estudo de recuperação apresentou uma recuperação média de 95,24% com coeficiente de variação de 9,12% (Tabela 1).

Tabela 1. Estudo de recuperação de artemisinina em folhas de *Artemisia annua* L

Fortificações (% p/p)	Concentração recuperada	% de recuperação
0,256	0,254	99,22
0,479	0,536	111,8
0,512	0,520	101,56
0,695	0,640	92,09
0,695	0,580	83,45
1,024	0,942	91,99
1,023	0,925	90,42
1,390	1,270	91,37
Média (%)		95,24
Coeficiente de variação (%)		9,12

O limite de quantificação da curva de artemisinina através do método proposto foi de 84,57 mg/ml. Considerando como material de partida, 200 mg de folhas secas, o limite de quantificação do método foi de 0,21% p/p (utilizando a expressão $LQ = 10 SD/a$, onde LQ é o limite de quantificação, SD é a estimativa do desvio padrão da curva analítica e a é a inclinação da reta de regressão linear) e o limite de detecção de 25 mg/ml.

**Figura 1.** Cromatogramas: (A) da solução padrão de artemisinina 92 mg/ml (tR = 5,03min) e (B) amostra de *A. annua* (teor 0,610 % p/p).

Nas condições cromatográficas propostas, o tempo de eluição da artemisinina foi de 5 min e o cromatograma apresentou poucos interferentes. A metodologia proposta é simples e de fácil execução, uma vez que não envolve técnicas de derivatização e nem o uso de detectores mais sofisticados. O método apresentou-se robusto e com uma porcentagem de recuperação média de 95%.

Material e Métodos

A planta utilizada (*Artemisia annua* L.) foi cultivada no Campo Experimental do CPQBA, e as folhas secas, moídas e

armazenadas em freezer até análise.

Os reagentes utilizados foram: Acetonitrila grau HPLC (Mallinckrodt), Metanol grau HPLC (Mallinckrodt), Tolueno P.A. (Synth), Fosfato monobásico de potássio P.A. (Ecibra), Cartuchos de sílica (1 ml) para extração em fase sólida (Supelco), Filtro Millex 0,45 µm (Millipore).

Para o preparo da curva padrão de artemisinina utilizou-se o seguinte procedimento: Cerca de 25 mg do padrão de artemisinina (CPQBA-UNICAMP com pureza de 96,64% p/p) foram pesados em balão volumétrico de 25 ml e o volume completado com o eluente cromatográfico. Foram preparados padrões na faixa de 90 a 900 mg/ml, por diluição da solução padrão inicial.

Cerca de 200 mg de folhas secas e moídas de *A. annua* foram extraídas com 5 ml de tolueno em homogeneizador do tipo Polytron durante 30 s. Após decantação, o sobrenadante foi transferido com auxílio de uma pipeta Pasteur para um funil de placa sinterizada e o resíduo sólido extraído novamente com 5 mL de tolueno.

Filtrou-se sob funil sinterizado lavando-se o resíduo com tolueno. O filtrado foi concentrado em rotaevaporador até cerca de 2 ml e o volume acertado para 5 ml em balão volumétrico com tolueno, que foi transferido para o cartucho de sílica e eluído com 7 ml de tolueno.

O volume eluído foi evaporado até *secura* no rotaevaporador e ressuscitado no eluente cromatográfico em balão volumétrico de 5 ml.

Utilizou-se o sistema cromatográfico Waters, com bomba Waters 510, injetor Rheodyne 7161 (loop 20 µl), forno para aquecimento de coluna operando a 35 °C, detector de índice de refração Waters 410 e integrador Intralab 4270. A separação cromatográfica foi realizada numa coluna de fase reversa Nova-Pak C-18 (150 x 3,9 mm) acoplada a uma pré-coluna C-18. O eluente utilizado foi a mistura de KH₂PO₄ 0,01M pH= 3,2 com H₃PO₄, acetonitrila e metanol na proporção 350 + 130 + 520 V/V a uma vazão de 1ml/min.

Referências

- Who (World Health Organization), 1998. "Malaria." Fact Sheet n° 94. 10/1998, <http://www.who.int/inffs/en/fact094.html> (01/09/2000)
- Klayman DL. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*. 1985;228:1049-55
- Ferreira J F S & Janick J. Distribution of artemisinin in *Artemisia annua*. IN: Progress in new crops. In: Janick J, editor. ASGS Press, Arlington. 1996; 579-84
- Elhag H M, El-Doiaty M M, El-Ferally F S, Mossa J S, El-Olemy M M. Selection and micropropagation of high artemisinin producing clones of *Artemisia annua* L. *Phytotherapy Research*. 1992; 6: 20-4
- Delabays N. Biologie de la reproduction chez *L'Artemisia annua* L. et genetique de la production em artemisinine,

Universite de Lausanne, France, Thèse de Doctorat., 1997

⁶Elsohly H N, Croom E M, Elesohly M A. Analysis of the antimalarial sesquiterpene artemisinin in *Artemisia annua* by high-performance liquid chromatography with postcolumn derivatization and ultraviolet detection. *Pharmaceutical Research*. 1987; 4: 258-60

Preparation and activity of diterpenoids against trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*

Jacqueline A. Takahashi ^{1*}; Henriete S. Vieira¹; Eliane A. Silva¹; Maria A. D. Boaventura¹; Alaíde B. de Oliveira²; Egler Chiari³

¹Departamento de Química, ICEx, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

²Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, UFMG, Av. Olegário Maciel, 2360, 30180-112, Belo Horizonte, MG

³Departamento de Parasitologia, ICB, UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627, CP 2486, 31270-901, Belo Horizonte, MG
jacque@Ag.arizona.edu

Abstract

A systematic investigation on the trypanocidal effect of several natural products isolated from Brazilian plant species has been carried out. In this paper we report on the results obtained from the screening of 26 diterpenes from natural sources or of synthetic/microbial transformations origin (mainly derivatives of kaurenoic acid) against trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas'disease. In the *in vitro* assays, kaurenoic acid, kaurenol, acutifloric acid and stemodin showed a complete elimination of parasites from the blood. Therefore, such diterpenoids can be considered as starting materials for molecular modification in the search for lead compounds for clearance of infected blood to be used in transfusions. Blood previously treated with active compounds was submitted to an infectivity test. Samples proceeded from treatment with kaurenol and kaurenoic acid showed to be completely clean from *T. cruzi* as no infection was observed in mice inoculated with contaminated blood treated by these compounds.

During the last decades, many efforts have been done aiming at the discovery of a suitable substitute of gentian violet for sterilization of chagasic blood. Among the active compounds resulting from these works, amphiphilic cationic drugs showed *in vitro* activity against trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*¹. However, none of these compounds was able to substitute gentian violet and new lead compounds are still to be found.

Kaurenoic acid (1), a diterpenoid that presents some interesting biological activities², has been reported as active against *T. cruzi*³. However, we have observed that, besides its low solubility in the media used for the biological assay, its activity is accompanied by some erythrocytes lysis. The trypanocidal activity of kaurenoic acid (1) was firstly described with no reference to the erythrocyte lysis³, that has been systematically observed in our experiments. In the same work, sodium and triethylammonium salts of (1) were prepared and