

**MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE**

École doctorale «Sciences de la nature et de  
l'Homme» (ED 227)



**UNIVERSIDADE DE BRASILIA**

Pós-Graduação em Ciências  
Médicas

**Année 2010**

N° attribué par la Bibliothèque

□□□□□□□□□□□□□□



**« Activités antiparasitaires et antifongiques des plantes du  
Cerrado : *Spiranthera odoratissima* et *Diospyros hispida* »**

par

**ALBERNAZ Carneiro Lorena**  
Pour obtenir le grade

**de Docteur  
du Muséum national d'Histoire naturelle  
en Chimie de Substances Naturelles**

**et de Docteur en Sciences Médicales  
de l'Université de Brasília**

**Présentée et soutenue publiquement le 29 Octobre 2010**

Sous la direction de :

**Mme Lengo MAMBU, MC HDR, MNHN**  
**Mme Laila Salmen ESPINDOLA, Professeur, Universidade de Brasília**

**JURY**

<b>M. SANTOS Cid Aimbiré</b>	<b>Professeur</b>	<b>Universidade Federal do Paraná</b>	<b>Examineur</b>
<b>M. STIEN Didier</b>	<b>Chargé de Recherche</b>	<b>UMR Ecofog- Guyane</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Mme TALLARICO PUPO Monica</b>	<b>Professeur</b>	<b>Universidade de São Paulo</b>	<b>Rapporteuse</b>
<b>M. GRELLIER Philippe</b>	<b>Professeur</b>	<b>MNHN</b>	<b>Examineur</b>
<b>Mme Laïla Salmen ESPINDOLA</b>	<b>Professeur</b>	<b>Universidade de Brasília</b>	<b>Co-directrice de thèse</b>
<b>M. Lengo MAMBU</b>	<b>Maître de Conférences, HDR</b>	<b>MNHN</b>	<b>Co-directrice de thèse</b>

LORENA CARNEIRO ALBERNAZ

**Atividades antiparasitárias e antifúngicas de  
plantas do Cerrado: *Spiranthera odoratissima* e  
*Diospyros hispida***

Tese em co-tutela apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Médicas da Universidade de Brasília e a Escola Doutoral do Museu Nacional de  
História Natural de Paris.

Orientadora: Profa. Dr<sup>a</sup>. Laila Salmen ESPINDOLA

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Lengo MAMBU

BRASÍLIA

2010

LORENA CARNEIRO ALBERNAZ

**Atividades antiparasitárias e antifúngicas de plantas do Cerrado:  
*Spiranthera odoratissima* e *Diospyros hispida***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas para obtenção do grau de doutor em co-tutela entre a Universidade de Brasília, sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Laila Salmen Espindola e a Escola Doutoral do Museu Nacional de História Natural de Paris, sob a orientação da Dr<sup>a</sup>. Lengo Mambu

Brasília, 29 de outubro de 2010

Essa tese é dedicada à minha Mimi

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me permitir todos os dias correr atrás dos meus sonhos e por me dar a força que eu preciso.

A minha querida professora Laila pelos ensinamentos, pelos puxões de orelha e por me guiar por essa vida científica tão apaixonante. Nunca saberei agradecer o bastante. Obrigada.

A minha diretora de tese Dra. Angèle Lengo Mambu pela oportunidade de realizar parte da minha pesquisa em um ambiente tão rico em ciência e cultura. Obrigada pelos ensinamentos da parte química. Merci beaucoup.

Ao professor Philippe Grellier por ter permitido que eu realizasse os testes em *Plasmodium*, além da orientação durante o desenvolvimento de parte deste trabalho. Merci beaucoup.

Ao professor Didier Stien pela ajuda com o RMN e por ter aceitado avaliar esse trabalho. Merci beaucoup.

Ao professor Dr. José Elias de Paula pela coleta e identificação botânica das plantas utilizadas neste trabalho.

A professora Mônica Tallarico Pupo por ter aceitado avaliar esse trabalho. Muito obrigada.

Ao professor Cid Aimbiré de Moraes Santos por ter aceitado participar desta banca.

A Elisabeth Mouray pelos ensinamentos na parte de manutenção da cultura de *Plasmodium falciparum*.

A Alexandre Deville e Alain Blond por auxiliar nas análises dos espectros de RMN, a Lionel Dubost e Arul Marie pela realização das análises de espectrometria de massa.

A Sylvie Rebuffat (Diretora da FRE 3206 CNRS/MNHN, Moléculas de Comunicação e Adaptação de Micro-organismos) por ter me acolhido no laboratório. Merci beaucoup.

A Roger Joyeau por seus conselhos, suas palavras de incentivo, sua paciência e sua gentileza. Merci beaucoup de votre aide pour ce travail.

A Christel Edmond e a Catherine Pougault pela ajuda e gentileza com que me receberam. Merci beaucoup.

A Maria Lúcia Espíndola que gentilmente sempre me ajudou.

Aos meus amigos: Mariana Mesquita, Alice, Ellen, Flávia, Mariana, Thiago, Phellipe por passarem comigo essa etapa e por todo apoio, afinal vocês sabem como é difícil essa vida de fazer pesquisa. Vocês são parte da minha família.

Aos amigos que eu fiz no MNHN e que fizeram a minha estada na França ser muito mais leve e alegre: Cathy, Marion, Hichem, Nassima, Damien e Christine. Mes chers amis merci beaucoup.

Ao Dan, meu companheiro, meu alicerce, que me deu forças quando eu achei que iria desistir. Obrigada por estar do meu lado desde o dia que eu descobri que iria embora pra Paris até hoje. Eu te amo.

Ao meu pai e meu irmão por estarem em Ipameri me esperando de braços abertos e com um sorriso no rosto sempre que eu precisava de um.

Minhas tias, meus primos, em especial à Geo. Eu amo muito todos vocês.

As minhas amigas queridas: Vivian (obrigada especial), Ana, Bibi, Dri, Janine, Liana, Rê, Dani, Pri, Marcela, Meline pelas risadas e por me fazerem esquecer um pouco desse doutorado.

À Capes e ao programa Alban (bolsa nºE07D401533BR) pela bolsa que permitiu que eu concluísse o doutorado.

Aos meus amigos que fiz a pouco tempo, mais que foram muito importantes nessa reta final.

Perdoem-me se esqueci de alguém, mas saibam que todas as pessoas que passaram pela minha vida, desde a infância em Ipameri até hoje, contribuíram de alguma forma para o que eu sou hoje. Essa parte nunca é fácil.

Muito Obrigada!

Merci beaucoup!

## RESUMO

Um total de 217 extratos obtidos de 22 espécies de plantas do bioma Cerrado utilizadas na medicina tradicional para tratar doenças parasitárias, feridas na pele e febre foram avaliados em *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina (cepa FcB1, Colômbia). Dentre estes, 32 demonstraram capacidade de inibir acima de 75% o crescimento do parasito. Estes 32 extratos foram também avaliados em 5 espécies de leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*. Os 11 extratos que inibiram acima de 90% do *P. falciparum* foram então testados em *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* e *Trypanosoma cruzi*. A citotoxicidade foi avaliada em células NIH-3T3 de fibroblastos de mamífero. Dois extratos mais ativos e não citotóxicos foram selecionados: extrato acetato de etila das folhas de *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae) (IC<sub>50</sub> de 9,2 e 56,3 µg/mL em *P. falciparum* e *T. cruzi*) e extrato acetato de etila da raiz de *Diospyros hispida* (Ebenaceae) (IC<sub>50</sub> de 1,0; 18,9 e 89,9 µg/mL em *P. falciparum*, *L. (L.) chagasi* e *T. cruzi*). *D. hispida* foi ativo em todos os microorganismos analisados. Foi realizado um estudo químico bioguiado com o extrato acetato de etila das folhas de *S. odoratissima* em *P. falciparum*, e com o extrato acetato de etila da raiz de *D. hispida* em *L. (L.) amazonensis*. Técnicas cromatográficas permitiram isolar dez compostos que foram identificados por espectrometria de RMN 1D (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) e 2D (HSQC, HMBC, COSY, NOESY), ESI-MS, UV, IR. Cinco compostos foram isolados de *S. odoratissima*, sendo três deles isolados pela primeira vez de planta (LC-1, LC-4 e LC-5), e um descrito pela primeira vez em *S. odoratissima* (LC-2). A atividade desses compostos foi verificada em protozoários e em duas cepas de *C. albicans*: 6-acetoxi,1-hidroxi-4-(15)-eno (LC-1) apresentou IC<sub>50</sub> de 4,8 µg/mL, sesamina (LC-2) IC<sub>50</sub> de 9,1 µg/mL, β-sitosterol (LC-3) IC<sub>50</sub> de 8,6 µg/mL em *P. falciparum*; spiranthenona B (LC-5) apresentou CIM de 12,5 µg/mL em *Candida albicans* ATCC 10231 e isolado clínico LMGO 102. O composto LC-4 não apresentou atividade em nenhum dos alvos testados. Cinco compostos foram isolados de *D. hispida*, três já foram descritos em espécies do gênero *Diospyros*: ácido betulínico (LC-6), isodiospirina (LC-7) e 4-hidroxi-5-metoxi-2-naftaldeído (LC-8), e os outros dois LC-9 e LC-10 estão em fase de identificação. Esses compostos foram avaliados em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. A melhor atividade em promastigota foi a do composto LC-9 com IC<sub>50</sub> de 4,2 µg/mL. O composto LC-7 foi o que teve melhor



atividade em formas amastigotas ( $IC_{50}$  de 50,9  $\mu\text{g/mL}$ ). Este trabalho possibilitou o isolamento de substâncias com atividades antiprotozoárias e antifúngicas, que serão alvos de estudos futuros para o desenvolvimento de compostos líderes.

Palavras-chave: Cerrado, *Spiranthera odoratissima*, *Diospyros hispida*, *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Candida*, *Cryptococcus*

## ABSTRACT

Two hundred seventeen extracts from 22 species of Cerrado used in traditional medicine to treat parasitic diseases, skin injuries and fever were evaluated against *Plasmodium falciparum* chloroquine resistant (FcB1 Colombia strain). Among them, 32 showed the ability to inhibit over 75% of the growth of *P. falciparum*. These 32 extracts were also evaluated in 5 yeast species of the genus *Candida* e *Cryptococcus*. The eleven extracts that inhibited over 90% of *P. falciparum* were then tested against *Leishmania (Leishmania) chagasi* and *Trypanosoma cruzi*. Cytotoxicity was observed in mammalian fibroblast cells NIH-3T3. Two most active and non-cytotoxic extracts were chosen: the ethyl acetate extract from leaves of *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae), with IC<sub>50</sub> of 9.2, and 56.3 µg/mL against *P. falciparum* and *T. cruzi*; and the ethyl acetate extract from the root of *Diospyros hispida* (Ebenaceae), with IC<sub>50</sub> of 1.0, 18.9 and 89.9 µg/mL against *P. falciparum*, *L. (L.) chagasi* and *T. cruzi*. *D. hispida* showed activity against all the microorganisms analyzed. A bioguided chemical study was performed with the ethyl acetate extract from leaves of *S. odoratissima* against *P. falciparum*, and with the ethyl acetate extract from the root of *D. hispida* against *L. (L.) amazonensis*. Chromatography techniques allowed to isolate ten compounds identified through NMR spectrometry 1D (<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C ) and 2D (HSQC, HMBC, COSY, NOESY), ESI-MS, UV, IR. Five compounds were isolated from *S. odoratissima*, from which three were isolated for the first time from plant (LC-1, LC-4 and LC-5), and one described for the first time in *S. odoratissima* (LC-2). The activity of these compounds was verified in protozoans and two strains of *C. albicans*: 6-acetoxy,1-hydroxy-eudesma-4(15)-ene (LC-1) with IC<sub>50</sub> of 4.8 µg/mL, sesamin (LC-2) with IC<sub>50</sub> of 9.1 µg/mL, β-sitosterol (LC-3) with IC<sub>50</sub> of 8.6 µg/mL against *P. falciparum*, and spiranthenone B (LC-5) which demonstrated CIM of 12.5 µg/mL against *Candida albicans*. Five compounds were isolated from *D. hispida*, from which three have previously been described in species of the genus *Diospyros*: betulinic acid (LC-6), isodyospirin (LC-7) and 4-hydroxy-5-methoxy-2-naphthaldehyde (LC-8), and the other two LC-9 and LC-10 are at a identification phase. The compounds were evaluated in promastigotes and amastigotes of *L. (L.) amazonensis*. The best activity against promastigotes was shown in compound LC-9 with IC<sub>50</sub> of 4.2 µg/mL. Compound LC-7 showed the best activity against amastigotes (IC<sub>50</sub> of 50.9 µg/mL). The importance of this work was to enable the isolation of

compounds with antiprotozoal and antifungal activities, which will be addressed in future studies to develop new drugs.

Keywords: Cerrado, *Spiranthera odoratissima*, *Diospyros hispida*, *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Candida*, *Cryptococcus*

## RESUMÉ

Le paludisme est une maladie infectieuse provoquée par quatre espèces de protozoaire du genre *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*. Cette maladie constitue la troisième cause de mortalité dans tout le monde, dont le cycle peut être divisé en deux phases : une sexuée chez le moustique transmetteur du protozoaire et une asexuée chez l'hôte vertébré. Les médicaments utilisés pour le traitement du paludisme aujourd'hui comprennent: la quinine extraite des écorces des tiges et de la racine de l'espèce *Cinchona calisaya* (Rubiaceae) et ses dérivés tels que la chloroquine et la méfloquine, et l'artémisinine, originaire de l'espèce *Artemisia annua* (Asteraceae) et dérivés semi-synthétiques, telles que l'artésunate et l'arteéter. Cependant, des cas de résistance au traitement ont été décrits à partir de 1957, où les premières souches résistantes à la chloroquine ont été mises en évidence, en 1977 des cas de résistance à la méfloquine ont été décrites, et en 2008, une réduction de sensibilité des souches par rapport à l'utilisation de l'artémisinine et ses dérivés a été rapporté.

La leishmaniose est une maladie infectieuse présente dans des régions relevant environ 88 pays dans tout le monde, touchant approximativement 12 millions de personnes. Cette maladie est transmise par des espèces de phlébotomes, où des protozoaires flagellés appartenant au genre *Leishmania* attendent un stade infectieux qui sera injecté chez l'homme lors d'une piqûre.

Historiquement, les médicaments les plus couramment utilisés pour le traitement de leishmanioses chez les humains contiennent l'antimoine comme Pentostan<sup>®</sup> (stilbogluconate de sodium) et Glucantine<sup>®</sup> (antimoniote de meglumine). De plus, comme médicaments d'utilisation secondaire nous pouvons trouver notamment la pentamidine et l'amphotéricine B. Les principales contraintes menées par le traitement des leishmanioses sont la voie d'administration des médicaments (obligatoirement parentérale), le temps prolongé de traitement et les effets extrêmement toxiques des médicaments, notamment à l'antimoine (cardiotoxicité) et à l'amphotéricine (dommages néphrologiques).

La miltefosine (Impavido<sup>®</sup>), utilisé depuis 2002 pour le traitement des leishmanioses, est le seul traitement par voie orale disponible, et est actuellement en phase de tests en Inde. Ce médicament montre des bons résultats pour le

traitement de leishmaniose cutanée, mais au même temps des cas de résistance ont été enregistrés peu après le début de son utilisation.

La maladie de Chagas ou trypanosomiase américaine est présente dans presque toutes les Amériques, au sud des États-Unis, au sud de l'Argentine et au Chili, où l'on estime que de 16 à 18.000.000 personnes sont exposées au risque de contracter cette maladie. Le traitement est basé sur l'utilisation de deux dérivés nitrés : le nifurtimox et le benznidazole, mais de résistance à ces molécules ont été déjà rapportées.

La maladie connue par Cryptococcose est une infection fongique opportuniste due à une levure, le *Cryptococcus neoformans*. La contamination se produit essentiellement par voie respiratoire, l'infection peut atteindre notamment le système nerveux central, à l'origine d'une méningite, encéphalite ou méningo-encéphalite.

Les candidoses sont aussi des infections fongiques causées par des levures du genre *Candida*. Cette maladie peut désigner une gamme de manifestations pathologiques ayant pour facteurs ces champignons qui peuvent atteindre la peau, à l'origine des lésions muco-cutanées, les ongles et les muqueuses de l'oro-pharynx et des organes génitaux, ainsi que la circulation sanguine (infection systémique) ou les viscères (infection viscérale).

Le traitement de ces deux infections fongiques est basé sur des médicaments azoles, tels que l'itraconazole et le fluconazole, ainsi que l'amphotéricine B. Des nouveaux azoles, comme le posaconazole, le voriconazole, également utilisé pour la maladie de Chagas, et le ravuconazole montrent actuellement des bons résultats, sur une gamme plus large des champignons par rapport aux anciennes molécules utilisées pour le traitement de ces maladies.

Ces cinq maladies infectieuses (paludisme, leishmaniose, maladie de Chagas et les infections fongiques causées par des champignons des genres *Candida* et *Cryptococcus*) sont abordées au sein de cet étude comme axe principale dans la recherche des molécules d'origine végétale potentiellement intéressantes pour l'éradication des microorganismes responsables de ces maladies.

Premièrement, une Banque d'extraits obtenus à partir d'espèces végétales du Cerrado brésilien, appartenant au Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Brasilia (UnB), a été triée par rapport à l'activité des extraits sur des formes intra-érythrocytaires de *Plasmodium falciparum* résistant à la chloroquine, souche FcB1 (Colombie), de formes promastigotes et amastigotes de *Leishmania (Leishmania)*

*chagasi* et *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, de formes épimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, de champignons pathogènes chez l'homme appartenant aux genres *Candida* et *Cryptococcus*, et des cellules de fibroblastes de mammifères (NIH 3T3). Un total de 217 extraits bruts provenant de 27 espèces végétales appartenant à 19 familles ont été évalués.

Cette première étape de travail nous a permis de sélectionner les extraits les plus actifs sur les microorganismes utilisés. L'utilisation traditionnelle de certaines espèces concernant le traitement des leishmanioses, infections fongiques, paludisme et la fièvre avait déjà été rapportée auparavant.

Parmi les 217 extraits testés, onze ont montré un pourcentage d'inhibition de *P. falciparum* supérieur à 90% à une concentration de 10 µg/ml. L'extrait dichlorométhane des racines d'*Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae) a montré une valeur de  $CI_{50}$  de 6,7 µg/mL. Les extraits d'espèces de la famille Calophyllaceae, tel que l'extrait dichlorométhane de l'écorce de *Kielmeyera coriacea* ont montré une valeur de  $CI_{50}$  de 8,7 µg/mL. L'extrait dichlorométhane du bois et de l'écorce des racines de *Calophyllum brasiliense* ont montré des valeurs de  $CI_{50}$  de 6,7 et 9,5 µg/mL, respectivement. L'extrait hexanique du bois de *Croton urucurana* (Euphorbiaceae) a montré une activité très intéressante avec une valeur de  $CI_{50}$  de 3,5 µg/mL et en plus ce même extrait n'a pas été toxique envers les cellules de fibroblastes ( $IC_{50}$  supérieur à 1000 µg/mL). L'extrait acétate d'éthyle des racines de l'espèce *Diospyros hispida* (Ebenaceae) a montré une excellente activité sur *P. falciparum*, avec une valeur de  $CI_{50}$  de 1 µg/mL. L'extrait dichlorométhane des feuilles de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* (Anacardiaceae), des feuilles de *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) ont montré des valeurs de  $CI_{50}$  de 6,4 et 3,1 µg/mL, respectivement, ainsi que l'extrait hexanique des racines et acétate d'éthyle des feuilles de *Spiranthera odoratissima* ont montré des valeurs de  $CI_{50}$  de 5,5 et 9,2 µg/mL respectivement.

En ce qui concerne l'activité sur le protozoaire *Leishmania (Leishmania) chagasi* les trois espèces qu'ont présenté l'activité la plus intéressante sont : *Calophyllum brasiliense* ( $IC_{50}$  de 27,6 µg/mL), *Diospyros hispida* ( $IC_{50}$  de 18,9 µg/mL) et *Spiranthera odoratissima* ( $IC_{50}$  de 22,3 µg/mL). Ces trois espèces ont montré également une activité très intéressante sur *Trypanosoma cruzi*, avec une valeur de  $CI_{50}$  inférieur à 100 µg/mL. L'extrait acétate d'éthyle des racines de *D. hispida* nous a permis de démontrer que l'activité sur les cibles biologiques testés ne sont pas

directement liés à une forte toxicité sur les cellules de fibroblastes humaines, avec une valeurs de  $CI_{50}$  sur ces dernières de 435,8  $\mu\text{g/mL}$ .

25 extraits ont été évalués sur des souches de levures du genre *Candida* et *Cryptococcus*. Les extraits de l'espèce *C. brasiliense* ont montré une activité intéressante avec des valeurs de CIM entre 1,95 et 250  $\mu\text{g/mL}$  sur toutes les souches testées. L' extrait dichlorométhane des racines et de l'écorce des racines de *C. brasiliense* ont montré une valeur de CIM de 1,95  $\mu\text{g/mL}$  sur *Cryptococcus gattii*, similaire au médicament fluconazole utilisé comme contrôle positif. L'extrait dichlorométhane des racines de *C. brasiliense* a montré une valeur de CIM de 7,8  $\mu\text{g/mL}$ , au même temps que l'extrait de l'écorce des racines ont montré une CIM de 15,62  $\mu\text{g/mL}$ , valeur très similaire sur *C. albicans* (ATCC 10231). L'extrait hydro-ethanolique des feuilles de *Byrsonima crassa* (Malpighiaceae), ont montré des valeurs de CIM de 3,9 et 31,25  $\mu\text{g/mL}$  sur les souches *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) et *Cryptococcus neoformans* (LMGO 02).

Les extraits à l'acétate d'éthyle de feuilles et de racines *Spiranthera odoratissima* et de *Diospyros hispida*, respectivement, ont ensuite passé par fractionnement bioguidé sur colonne chromatographique pour l'obtention des composés responsables de l'activité biologique de ces extraits.

À partir du fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle des feuilles de *S. odoratissima*, ont été récupérés 22 fractions, qui ont été testés sur *P. falciparum*, conformément les tests précédents. Les fractions, F4, F6, F12, F21 et F22, ont montré un taux d'inhibition supérieur à 90% des parasites dans une concentration de 10  $\mu\text{g/mL}$ . Après des étapes successives de purification par HPLC, MPLC, chromatographie sur colonne, LH-20, CCM préparative, cinq composés ont été isolés et identifiés dans cet extrait.

Le composé LC-1 a été isolé sous la forme d'un cristal optiquement actifs avec  $[\alpha]_D^{20} = -24^\circ$  (c 0,10;  $\text{CHCl}_3$ ). Le spectre de masse HRESI-TOF menées en mode positif révélé la présence d'un ion moléculaire protoné  $[M^+H]^+$  m/z 281,1982 qui correspond à la formule brute  $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_3$  (calculé pour  $\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{O}_3$ : 281,2109), qui suggère à 4 degrés d'insaturation. spectre ESI-TOF semble également ions m/z 441  $[2M^+H]^+$ , 319  $[M^+K]^+$ , 303  $[M^+Na]^+$ , 221  $[M^+CH_3CO_2H]^+$ . Le pic le plus intense a été observée à m/z 203  $[M^+H_2O^+CH_3CO_2H]^+$ , suggérant la présence d'un groupe hydroxyle et un groupement acétate dans les composés analysés. Après analyse

des spectres de  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  1D et 2D ont été en mesure d'identifier ce composé comme un sesquiterpène nommé: 6-acétoxy-4,1-hydroxyeudesm (15)-ène.

LC-2 Le composé a été isolé sous forme de solide amorphe. Son spectre de masse a été obtenu en HRESI-TOF d'une manière positive et a montré la présence d'un ion pseudomoléculaire  $[2\text{M}^+\text{H}]^+$  à  $m/z$  709,2465 qui nous a permis de déduire une formule brute  $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$ , ce qui signifie moins 12 degrés d'insaturation. Des pics à  $m/z$  377  $[\text{M}^+\text{Na}]^+$ , 337  $[\text{M}^+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$  ont été observés. Ce fait est la sésamine, comme décrit dans la littérature, isolés de plantes diverses, en particulier ceux de la famille des Rutaceae.

Le composé LC-3, a également été identifiés après l'analyse des spectres 1D et 2D RMN a permis de construire la structure de ce stérol a été identifié comme le  $\beta$ -sitostérol.

LC-4 Le composé a été isolé sous forme d'une huile visqueuse de couleur jaune. Il est optiquement actif,  $[\alpha]_D^{20}$  13 ° ( $c$  0,17,  $\text{CHCl}_3$ ). Leur brut,  $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_4$  a été déduite de son spectre de masse effectuée en mode ESI-TOF haute résolution à partir d'un pic de l'ion protoné a été observé à  $m/z$  483,3485 (calculé pour  $\text{C}_{31}\text{H}_{47}\text{O}_4$ : 483,3474), qui suggère neuf degrés d'insaturation. Ce composé est un acilfloroglucinol poliprenilado polycycliques (PPAPS) poliprenilado acilfloroglucinol ou de type B, ce qui signifie avoir une chaîne acylés en position 3, appelé 4-hydroxy-8,8-diméthyl-1,5,7-tri-(3-méthyl-2-butenil)-3 (2-méthyl-butanoïla) bicyclo [3.3.1] non-3-ène-2,9-dione.

LC-5 Le composé a été isolé comme optiquement actif,  $[\alpha]_D^{20}$  11 ° ( $c$  0,19,  $\text{CHCl}_3$ ). Son spectre de masse obtenu à partir de ESI-TOF en mode positif a permis de visualiser la présence d'un ion pseudomoléculaire avec  $m/z$  513,3217  $[\text{MH}]$  correspondant à la formule brute  $\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{O}_6$  (calculé pour  $\text{C}_{31}\text{H}_{45}\text{O}_6$ : 514,3216), ce qui suggère 10 degrés d'insaturation. La structure moléculaire de ce composé a été établie comme acilfloroglucinol poliprenilado polycycliques dérivés (PPAP). La structure de ce composé tricyclique a été déterminé que le 9-hydroxy-3,9-hémiacétal-8,8-diméthyl-3 (butenil-2-3metil), 5,7-tri-1 (2-méthyl-butanoïla) bicyclo [3.3.1] nonane-2,4-dione et n'ont pas été décrits. Nous suggérons le nom commun de spiranthenone A.

L'activité de ces composés a été trouvé dans les protozoaires et chez deux souches de *C. albicans*: 6-acétoxy-4,1-hidroxi-eudesm (15)-ène (LC-1)  $\text{CI}_{50}$  de 4,8  $\mu\text{g/mL}$ , sésamine (LC-2)  $\text{CI}_{50}$  de 9,1  $\mu\text{g/mL}$ ,  $\beta$ -sitostérol (LC-3)  $\text{CI}_{50}$  de 8,6  $\mu\text{g/mL}$



dans *P. falciparum* et spiranthenona B (LC-5) a montré une CMI de 12,5 µg/mL chez *Candida albicans* ATCC 10231 et isolat clinique LMGO 102. LC-4 Le composé n'a montré aucune activité dans l'un des objectifs testés.

L'acétate d'éthyle extrait des racines de *Diospyros hispida* a montré une activité avec une  $CI_{50}$  de 18,9 µg/mL lors d'un essai en *L. (L.) chagasi*, et  $CI_{50} < 1,95$  µg/mL lors d'un essai en *L. (L.) amazonensis*, un résultat qui sélectionnés pour les études chimiques. Après purification successives en utilisant des techniques chromatographiques telles que la chromatographie sur colonne et CCM préparative, il a été possible d'isoler et d'identifier et d'isoler les composés tés de deux autres. fractionnement chromatographique de l'extrait d'EtOAc des racines de *D. hispida* colonne ouverte de gel de silice conduit à 28 fractions. Ces fractions ont été testées sur promastigotes de *L. (L.) amazonensis*.

Les composés isolés et identifiés à partir de cet extrait ont été: LC-6, LC et LC-7-8. LC-6 Le composé a été identifié comme une triterpénique, appelé acide 3β-hydroxy-lup-20 (29) d'acide-en-28-oïque (acide bétulinique), l'identification du composé LC-7, isodiospirina a montré la couleur orange, et quand révélé avec KOH / alcool a montré la couleur pourpre. LC-8 Le composé a été identifié comme étant un dérivé du naphthalène, le 4-méthoxy-5-hidrori-2-naftaldeído. Les deux autres LC-9 et LC-10 sont dans le processus d'identification.

Ces composés ont été évalués en promastigotes et amastigotes de *L. (L.) amazonensis*. La meilleure activité en promastigotes était composé de LC-9 avec une  $CI_{50}$  de 4,2 µg/mL. Le composé LC-7 a été celui qui a la plus forte activité en amastigotes ( $IC_{50}$  de 50,9 µg/mL).

Ce travail a permis l'isolement de substances à activité antifongique et antiprotozoaires qui seront abordées dans les études futures de développer des leaders composés.

Mots clés: Cerrado, *Spiranthera odoratissima*, *Diospyros hispida*, *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Candida*, *Cryptococcus*

## Abreviações

### Solventes

**AcOEt:** acetato de etila

**CD<sub>3</sub>OD:** metanol deuterado

**Me<sub>2</sub>CO-d<sub>6</sub>:** acetona deuterada

**MeOH:** metanol

**CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:** diclorometano

**C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>:** ciclohexano

### Técnicas cromatográficas

**CLAE:** cromatografia líquida de alta eficiência

**MPLC:** cromatografia líquida de média eficiência

**CCD:** cromatografia em camada delgada

**CC:** cromatografia em coluna

**SiO<sub>2</sub>:** sílica normal 60F<sub>254</sub>

### Determinação estrutural

**[α]<sub>D</sub>:** rotação ótica

**COSY:** correlated spectroscopy

**d:** dubleto

**dd:** duplo-dubleto

**ddd:** duplo-duplo-dubleto

**dt:** duplo-tripleto

**ESI:** ionização por eletrospray

**HMBC:** Heteronuclear Multiple Bond Correlation

**HRMS:** Espectroscopia de Massa de alta resolução

**HSQC:** Heteronuclear Single Quantum Coherence

**Hz:** Hertz

**IV:** Infravermelho

**J:** Constante de acoplamento

**Jmod:** modo *J* modulado (RMN <sup>13</sup>C)

**m:** multipletto

**m/z:** massa / carga atômica

**NOESY:** Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy

**RMN:** Ressonância magnética nuclear

**RMN <sup>13</sup>C:** Ressonância magnética nuclear do carbono 13

**RMN <sup>1</sup>H:** Ressonância magnética nuclear do hidrogênio

**s:** simpleto

**EM:** espectroscopia de massa

**t:** tripleto

**td:** tripleto de dubleto

**UMR:** Unidade Mista de Pesquisa

**UV:** Ultravioleta

$\delta$ : deslocamento químico em ppm

### **Atividade Biológica**

**IC<sub>50</sub>:** Concentração inibitória de 50% dos parasitos

**CIM:** Concentração inibitória mínima

**mm:** Milímetro

**cm:** Centímetro

**LISTA DE ANEXOS**

Anexo 1: Espectros RMN de LC-1 .....	201
Anexo 2: Espectros RMN de LC-2 .....	222
Anexo 3: Espectros RMN de LC-3 .....	231
Anexo 4: Espectros RMN de LC-4 .....	249
Anexo 5: Espectros RMN de LC-5 .....	264

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Distribuição da malária no mundo.....	4
<b>Figura 2:</b> Áreas endêmicas de malária no Brasil.....	5
<b>Figura 3:</b> Fêmea do mosquito <i>Anopheles darlingi</i> realizando o repasto sanguíneo. ..	6
<b>Figura 4:</b> Formas parasitárias presentes no hospedeiro vertebrado .....	8
<b>Figura 5:</b> Ciclo parasitário do <i>Plasmodium</i> ssp. . .....	9
<b>Figura 6:</b> Estruturas químicas da quinina e seu derivado cloroquina. ....	11
<b>Figura 7:</b> Estruturas químicas da artemisinina e seus derivados semi-sintéticos.....	12
<b>Figura 8:</b> Mudança no perfil de medicamentos adotados no continente africano.....	14
<b>Figura 9:</b> Formas amastigotas e formas promastigotas. ....	16
<b>Figura 10:</b> Mapa com a distribuição da leishmaniose visceral (LV).....	18
<b>Figura 11:</b> Leishmaniose visceral e leishmaniose dérmica pós-calazar. ....	19
<b>Figura 12:</b> Mapa da coinfeção Leishmaniose e HIV. ....	20
<b>Figura 13:</b> Mapa com os países endêmicos da leishmaniose cutânea .....	21
<b>Figura 14:</b> Leishmaniose cutânea; Paciente com a forma mucosa. ....	22
<b>Figura 15:</b> Ciclo evolutivo do parasita <i>Leishmania</i> sp. ....	23
<b>Figura 16:</b> Antimonial pentavalente - Glucantime <sup>®</sup> e Pentostam <sup>®</sup> . ....	24
<b>Figura 17:</b> Estrutura química da pentamidina.....	25
<b>Figura 18:</b> Estrutura química da Anfotericina B. ....	26
<b>Figura 19:</b> Distribuição da doença de Chagas no mundo.....	29
<b>Figura 20:</b> Formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> encontradas no vetor.....	30
<b>Figura 21:</b> Espécie <i>Triatoma infestans</i> .....	31
<b>Figura 22:</b> Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	33
<b>Figura 23:</b> Estruturas químicas do Nirfutimox e benznidazol.....	34
<b>Figura 24:</b> Estrutura química do itraconazol.....	41
<b>Figura 25:</b> Estrutura química do fluconazol. ....	41
<b>Figura 26:</b> Estrutura química da nistatina.....	42
<b>Figura 27:</b> Abrangência do Cerrado no território brasileiro.....	43
<b>Figura 28:</b> Queimadas na região de Sobradinho / DF .....	44
<b>Figura 29:</b> <i>Diospyros hispida</i> (Ebenaceae).....	47
<b>Figura 30:</b> <i>Simarouba versicolor</i> (Simaroubaceae) .....	49
<b>Figura 31:</b> <i>Spiranthera odoratissima</i> (Rutaceae).....	50
<b>Figura 32:</b> Moléculas isoladas de <i>S. odoratissima</i> . ....	52

<b>Figura 33:</b> <i>Kielmeyera coriacea</i> (Calophyllaceae).....	53
<b>Figura 34:</b> <i>Calophyllum brasiliense</i> (Calophyllaceae).....	56
<b>Figura 35:</b> <i>Schinus terebinthifolius</i> var. <i>radiannus</i> (Anacardiaceae).....	58
<b>Figura 36:</b> <i>Croton urucurana</i> (Euphorbiaceae).....	60
<b>Figura 37:</b> <i>Aspidosperma tomentosum</i> (Apocynaceae).....	62
<b>Figura 38:</b> Halos de inibição do crescimento fúngico. ....	85
<b>Figura 39:</b> Procedimento de extração das folhas de <i>S. odoratissima</i> .....	93
<b>Figura 40:</b> Fluxograma de purificação do extrato as folhas de <i>S. odoratissima</i> . ....	94
<b>Figura 41:</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C do composto LC-1.....	95
<b>Figura 42:</b> Espectro de <sup>1</sup> H do composto LC-1. ....	96
<b>Figura 43:</b> Estrutura química do 6-acetoxy,1-hydroxyeudesm-4(15)-eno.....	97
<b>Figura 44:</b> Espectro HMBC do composto LC-1 .....	98
<b>Figura 45:</b> Correlações <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H NOESY e estrutura do composto LC-1 .....	99
<b>Figura 46:</b> Subestrutura do composto LC-2.....	102
<b>Figura 47:</b> Estrutura do composto LC-2 ou sesamina .....	102
<b>Figura 48:</b> Esquema da biogênese da sesamina .....	103
<b>Figura 49:</b> Estrutura química do β-sitosterol.....	105
<b>Figura 50:</b> Estrutura plana de LC-4, subestruturas obtidas de <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY .....	108
<b>Figura 51:</b> Correlações <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H NOESY do composto LC-4 (isômero 2A).....	110
<b>Figura 52:</b> Estruturas dos isômeros isolados de <i>Spiranthera odoratissima</i> .....	110
<b>Figura 53:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto LC-5.....	114
<b>Figura 54:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do composto LC-5.....	115
<b>Figura 55:</b> Espectro HSQC do composto LC-5 .....	116
<b>Figura 56:</b> Espectre COSY do composto LC-5 entre 0,5 -6,6 ppm.....	117
<b>Figura 57:</b> Estrutura plana de LC-5, subestruturas <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY.....	118
<b>Figura 58:</b> Espectre HMBC do composto LC-5 .....	119
<b>Figura 59:</b> Correlações <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C observadas no espectro HMBC de LC-5. ....	120
<b>Figura 60:</b> Correlações <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H NOESY do composto LC-5. ....	122
<b>Figura 61:</b> Hipótese de biossíntese dos compostos LC-4 e LC-5.....	123
<b>Figura 62:</b> Estrutura química da sessiflorena e do sessiliflorol. ....	124
<b>Figura 63:</b> Procedimento de extração das raízes de <i>D. hispida</i> . ....	130
<b>Figura 64:</b> Esquema ilustrando o isolamento do extrato de <i>D. hispida</i> .....	131
<b>Figura 65:</b> Estrutura química do ácido betulínico .....	132
<b>Figura 66:</b> Espectro de <sup>1</sup> H do composto LC-6 .....	133

<b>Figura 67:</b> Estrutura química da isodiospirina .....	134
<b>Figura 68:</b> Estrutura química do composto LC-8 .....	135
<b>Figura 69:</b> Coleta; Secagem; 3- Moinho de facas. ....	142
<b>Figura 70:</b> Adição dos extratos nas placas de Petri. ....	151

**LISTA DE GRÁFICOS**

<b>Gráfico 1:</b> Número de mortes registradas nos países da América Latina. ....	2
<b>Gráfico 2:</b> Número de casos de infecções por <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> no Brasil. ....	3
<b>Gráfico 3:</b> Dados obtidos de cepas fúngicas isoladas em 35 países. ....	39
<b>Gráfico 4:</b> Quantidade de extratos produzidos para cada órgão vegetal .....	66



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Porcentagem de inibição dos extratos em <i>P. falciparum</i> .	69
<b>Tabela 2:</b> Valores de IC <sub>50</sub> dos extratos que inibiram acima de 90% dos parasitos...	70
<b>Tabela 3:</b> Atividade dos extratos em <i>L. (L.) chagasi</i> .	75
<b>Tabela 4:</b> Atividade dos extratos em <i>Trypanosoma cruzi</i> .	78
<b>Tabela 5:</b> Citotoxicidade dos extratos em células NIH-3T3 .	80
<b>Tabela 6:</b> Atividade dos extratos vegetais em leveduras.....	83
<b>Tabela 7:</b> CIM dos extratos vegetais em leveduras .	86
<b>Tabela 8:</b> Dados de RMN <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H do composto LC-1.....	100
<b>Tabela 9:</b> Dados de RMN <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H do composto LC-2.....	104
<b>Tabela 10:</b> Dados RMN <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H de LC-3.....	105
<b>Tabela 11:</b> Dados de <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H do isômero majoritário 2A do composto LC-4: .....	111
<b>Tabela 12:</b> Dados de RMN do LC-4: isômero minoritário .....	112
<b>Tabela 13:</b> Dados de RMN <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H do composto LC-5.....	121
<b>Tabela 14:</b> Atividade dos compostos isolados de <i>Spiranthera odoratissima</i> .	125
<b>Tabela 15:</b> Atividade dos compostos de <i>S. odoratissima</i> em <i>Candida albicans</i> . ....	128
<b>Tabela 16:</b> Resultados de IC <sub>50</sub> do extrato AcOEt das raízes de <i>D. hispida</i> . ....	137
<b>Tabela 17:</b> Atividade dos compostos de <i>D. hispida</i> em <i>Candida</i> e <i>Cryptococcus</i> . ....	138
<b>Tabela 18:</b> Frações obtidas do extrato AcOEt das folhas de <i>S. odoratissima</i> .....	154
<b>Tabela 19:</b> Frações do extrato AcOEt da raiz de <i>D. hispida</i> .....	157

**LISTA DE QUADROS**

<b>Quadro 1:</b> Principais medicamentos antimaláricos existentes.....	13
<b>Quadro 2:</b> As três formas de leishmaniose com suas principais características. ....	16
<b>Quadro 3:</b> Espécies vegetais que foram utilizadas no estudo .....	67

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	1
1.1.	DOENÇAS Infecciosas .....	1
1.1.1.	Malária.....	2
1.1.2.	<i>Leishmania</i> ssp.....	15
1.1.2.1.	Vetor .....	17
1.1.2.2.	Leishmaniose Visceral (LV) .....	17
1.1.2.3.	Leishmaniose Tegumentar (LT) .....	21
1.1.2.4.	Ciclo biológico.....	22
1.1.2.5.	Tratamento.....	23
1.1.3.	Doença de Chagas.....	28
1.1.3.1.	O parasito .....	29
1.1.3.2.	O vetor .....	30
1.1.3.3.	Ciclo de vida .....	32
1.1.3.4.	Tratamento.....	33
1.1.4.	Fungos .....	35
1.1.4.1.	Cryptococcose .....	36
1.1.4.2.	Candidíase.....	37
1.1.4.3.	Tratamento.....	39
1.2.	Cerrado .....	42
1.2.1.	Características do Cerrado.....	42
1.2.2.	Plantas medicinais do Cerrado.....	44
1.2.3.	<i>Diospyros hispida</i> .....	46
1.2.4.	<i>Simarouba versicolor</i> .....	48
1.2.5.	<i>Spiranthera odoratissima</i> .....	50
1.2.6.	<i>Kielmeyera coriacea</i> .....	53
1.2.7.	<i>Calophyllum brasiliense</i> .....	55
1.2.8.	<i>Schinus terebinthifolius</i> .....	57
1.2.9.	<i>Croton urucurana</i> .....	59
1.2.10.	<i>Aspidosperma tomentosum</i> .....	61
2.	OBJETIVOS .....	64
2.1.	Objetivo Geral .....	64

2.2. Objetivos específicos .....	64
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	65
3.1. Preparação dos extratos vegetais.....	65
3.2. Atividade Anti-Plasmodial .....	69
3.3. Atividade em <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> .....	74
3.4. Atividade em <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	77
3.5. Citotoxicidade .....	79
3.6. Atividade antifúngica.....	82
3.7. Estudo fitoquímico de <i>Spiranthera odoratissima</i> .....	93
3.7.1. Determinação estrutural dos compostos obtidos.....	94
3.7.2. Testes em protozoários dos compostos extraídos de <i>Spiranthera odoratissima</i> .....	124
3.7.3. Atividade antifúngica dos compostos LC-1 à LC-5.....	127
3.8. Estudo fitoquímico de <i>Diospyros hispida</i> .....	130
3.8.1. Testes em parasitos dos compostos extraídos de <i>Diospyros hispida</i> ...	136
4. CONCLUSÃO .....	140
5. PERSPECTIVAS.....	141
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	142
6.1. Coleta do material vegetal .....	142
6.2. Preparação dos extratos brutos .....	142
6.3. Métodos cromatográficos.....	143
6.3.1. Cromatografia em camada delgada (CCD) .....	143
6.3.2. Cromatografia de camada delgada preparativa .....	143
6.3.3. Cromatografia líquida à pressão atmosférica .....	144
6.3.4. Filtração em gel de dextrano: Sephadex LH-20 .....	144
6.3.5. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC) .....	144
6.3.6. Cromatografia líquida à média pressão (MPLC) .....	144
6.4. Métodos espectrométricos de análise.....	145
6.4.1. Espectrometria de massa.....	145
6.4.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	145
6.4.2.1. Espectros unidimensionais: RMN-1D .....	146
6.4.2.2. Espectros bidimensionais: RMN-2D .....	146
6.4.2.3. Rotação ótica.....	147
6.5. Testes biológicos .....	147

6.5.1. Atividade in vitro em <i>Plasmodium falciparum</i> .....	147
6.5.2. Atividade in vitro em formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> e <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> .....	148
6.5.3. Atividade in vitro em formas amastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> .....	149
6.5.4. Atividade in vitro em formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	150
6.5.5. Atividade antifúngica in vitro .....	150
6.5.5.1. Fungos .....	150
6.5.5.2. Teste de difusão em ágar .....	150
6.5.5.3. Teste microdiluição em placa de 96 poços .....	151
6.6. Citotoxicidade .....	152
6.7. Análise estatística .....	153
6.8. Isolamento dos constituintes de <i>Spiranthera odoratissima</i> .....	153
6.8.1. Obtenção do extrato acetato de etila (AcOEt) das folhas de <i>Spiranthera odoratissima</i> .....	153
6.8.2. Fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt das folhas de <i>Spiranthera odoratissima</i> .....	153
6.8.3. Isolamento de LC-1 (2mg) .....	155
6.8.4. Isolamento de LC-2 (4 mg) .....	156
6.8.5. Isolamento de LC-3 (25 mg) .....	156
6.8.6. Isolamento de LC-4 (2mg) e LC-5 (3 mg) .....	156
6.9. Isolamento dos constituintes de <i>Diospyros hispida</i> .....	156
6.9.1. Obtenção do extrato de acetato de etila das raízes de <i>D. hispida</i> .....	156
6.9.2. Fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt de <i>D. hispida</i> .....	157
6.9.3. Isolamento de LC-6 (4mg) .....	158
6.9.4. Isolamento de LC-7 (5 mg) .....	159
6.9.5. Isolamento de LC-8 (2 mg) .....	159
6.9.6. Isolamento de LCA-9 (1 mg) .....	159
6.9.7. Isolamento de LC-10 (1 mg) .....	160
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	161

## INTRODUÇÃO

### 1.1. DOENÇAS INFECCIOSAS

A evolução de novos agentes infecciosos se intensifica devido à urbanização, às mudanças demográficas, às viagens aéreas, ao uso inadequado de antibióticos, e à mudança climática (Avila et al., 2008).

As doenças parasitárias afetam a população mundial, provocando mortes e limitando a qualidade de vida e o desenvolvimento de muitos países. As protozooses são causadas por aproximadamente 10.000 espécies de protozoários. Dentre elas, cerca de trinta infectam o homem, e são características de regiões menos desenvolvidas, onde os níveis de escolaridade e saneamento básico são baixos.

De acordo com a OMS, em 2006 foram registrados 247 milhões de casos de malária no mundo, e um milhão de mortes, sendo a maioria crianças com menos de cinco anos. Em 2008, a malária foi considerada endêmica em 109 países (World Malaria Report 2008), sendo no Brasil potencialmente transmitida em 60% do território, sobretudo em locais onde as condições socioeconômicas e ambientais propiciam a proliferação do mosquito vetor, o *Anopheles* sp. (de Mesquita et al., 2007).

A doença de Chagas - tripanossomíase americana - afeta 9 milhões de pessoas na América Central e do Sul, e é responsável por 14 mil mortes por ano (Senior, 2007; Schmunis & Yadon, 2010). No Brasil, os casos chegam a 4 milhões de pessoas infectadas (Dias & Vinhaes, 2000), e no mundo são 9 milhões (Schofield et al., 2006).

A leishmaniose ocorre, predominantemente, em regiões tropicais e subtropicais, e é considerada endêmica em 88 países, onde se estima que existam 12 milhões de pessoas infectadas e 200 milhões em áreas de risco de contaminação (Desjeux, 2004).

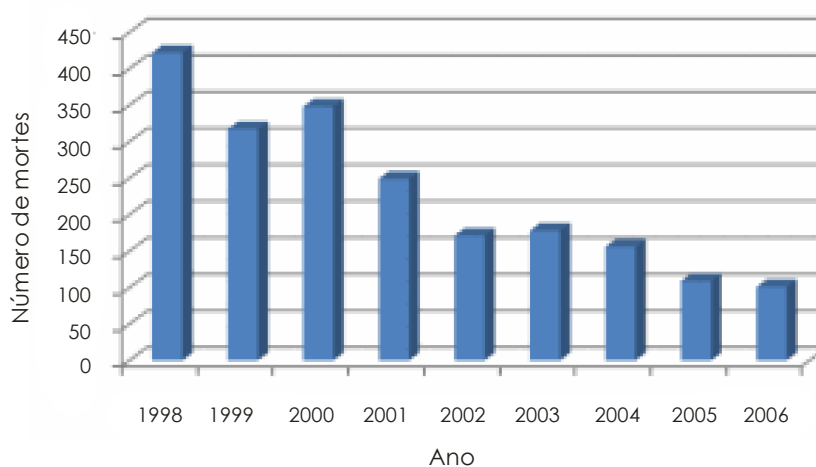
Outro problema alarmante é o aumento do número de infecções fúngicas, particularmente entre pacientes imunocomprometidos (Vazquez, 2000; Traboulsi et al., 2008). Nestes pacientes, as espécies do gênero *Candida* são frequentemente isoladas (Falagas et al., 2006; Davis et al., 2007; Hernández-Castro et al., 2010), e causam infecções oportunistas.

A crescente resistência dos parasitos e fungos aos medicamentos disponíveis e a resistência dos insetos vetores aos inseticidas justificam a pesquisa de novos compostos líderes (Sutherland et al., 2002; Dondorp et al., 2009; Dondorp et al., 2010). O potencial para encontrar moléculas promissoras em espécies de plantas do bioma Cerrado já foi demonstrado em diferentes alvos biológicos (Espíndola et al., 2004; de Mesquita et al., 2005a, 2005b; Rodrigues et al., 2005; de Mesquita et al., 2007; Melo e Silva et al., 2009; de Mesquita et al., 2009).

### 1.1.1. Malária

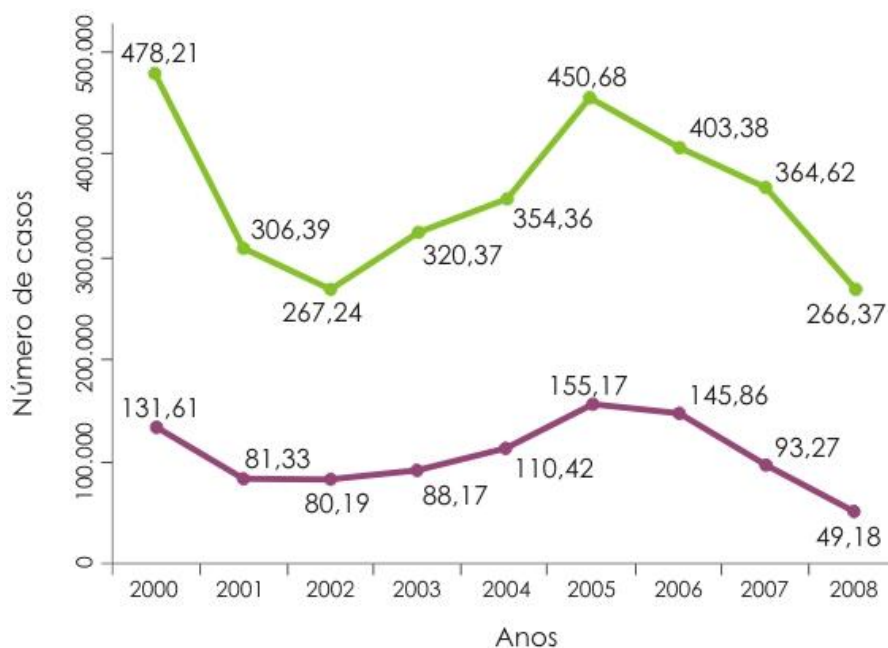
A malária, um dos mais sérios problemas de saúde pública no mundo, é uma doença infectoparasitária causada pelo protozoário *Plasmodium* ssp., pertencente ao filo *Apicomplexa*, classe *Aconoidasida*, ordem *Haemosporida* e família *Plasmodiidae*.

Países como o Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela sofrem com a malária, sendo que os países andinos notificaram 45,4% dos casos e o Brasil 40,1% em 2001. Devido as campanhas para eliminação do vetor, o número de mortes pela malária na América Latina diminuiu de 1998 a 2006 (Gráfico 1), conforme dados da Organização Pan Americana de Saúde (World Malaria Report, 2008).



**Gráfico 1:** Número de mortes (x 1000) registradas nos países da América Latina de 1998 a 2006, segundo dados da OPAS.

A diminuição do número de casos e de mortes devido à doença deve-se ao trabalho da Organização Mundial de Saúde (OMS) no combate à malária, iniciado no final da década de 1970 (Gráfico 2- Ministério da Saúde, 2008). Porém, a doença ainda é uma ameaça na América Latina, África, e grandes áreas da Ásia Meridional e Oceania, onde causa por ano muito mais mortes em valores absolutos que a AIDS.

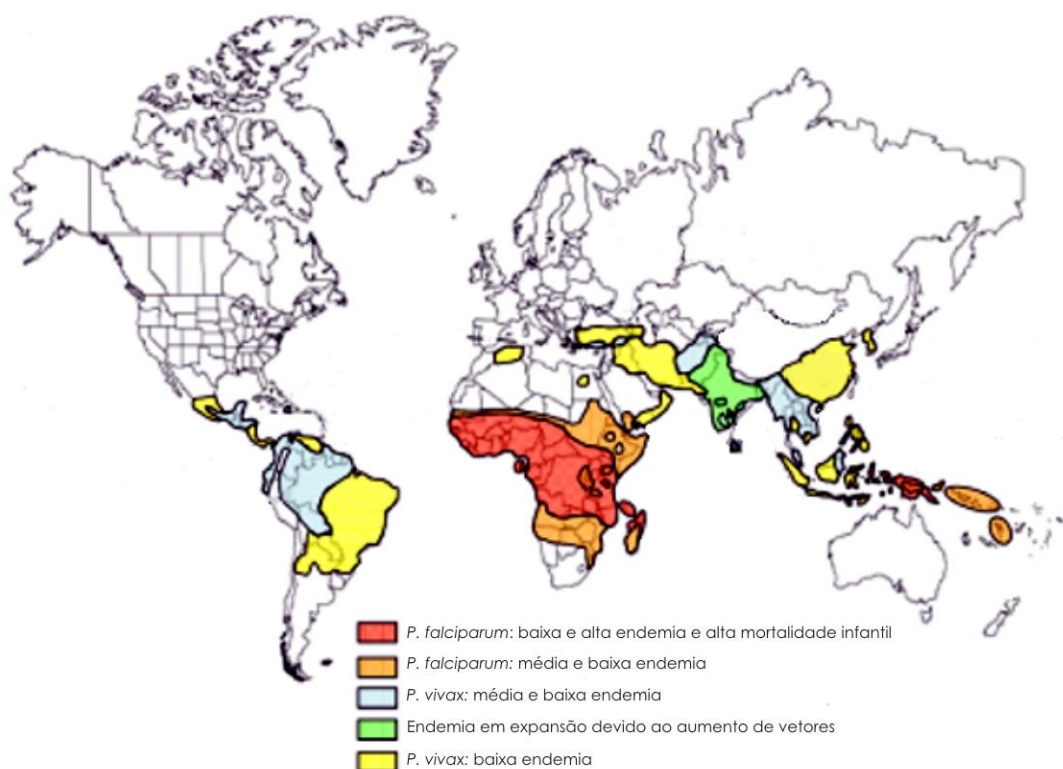


**Gráfico 2:** Número de casos de infecções por *P. vivax* (azul) e *P. falciparum* (vermelho) no Brasil de 2000 a 2008.

O maior número de casos da doença ocorre na África, atingindo principalmente crianças de até 5 anos de idade. Além da África, os países com maior número de casos são: Afeganistão, Bangladesh, Brasil, Burma, Camboja, Colômbia, China, Irã, Índia, Indonésia, México e Filipinas. De um total aproximado de 100 espécies de protozoários, quatro são responsáveis por infectar seres humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*, sendo *P. falciparum* o mais perigoso por causar a forma mais grave da malária, a cerebral, que frequentemente leva à morte.

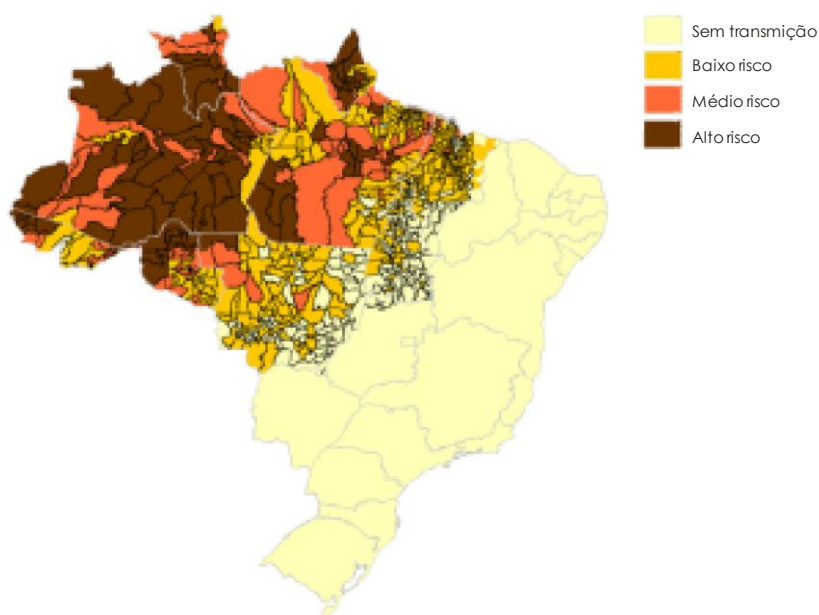
O mapa abaixo (Figura 1) destaca, em vermelho, que as áreas de maior transmissão estão na África e Ásia. No Brasil encontramos áreas de média e baixa endemia de *P. vivax* (Manguin et al., 2008).





**Figura 1:** Distribuição da malária no mundo (mapa modificado de Manguin et al., 2008).

No Brasil, a malária é transmitida em 60% do território (Figura 2), o maior número de casos é registrado na região Amazônica, cujas condições ambientais e socioculturais favorecem a expansão de sua transmissão (de Mesquita et al., 2007). Um total de 99,9% dos casos autóctones notificados de malária procede dos estados que compõem a Amazônia Legal (Ministério da Saúde, 2002). Segundo dados do Sistema de Vigilância Epidemiológica em Malária do Ministério da Saúde (SIVEP/Malária), em 2009, 306.342 casos da doença foram notificados na Amazônia Legal (Amazônia, Acre, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins). Entre os casos de malária no país, 78% ocorrem no Amazonas, Rondônia e Pará, com uma incidência parasitária anual, respectivamente, de 46,3/1.000 habitantes, 64,4/1.000 habitantes e 17,6/1.000 habitantes, respectivamente. Em toda a Amazônia, as infecções causadas pelo *P. vivax* (79%) prevaleceram sobre as causadas por *P. falciparum* (21%).



**Figura 2:** Áreas endêmicas de malária no Brasil segundo dados do SIVEP/ Malária (Ministério da Saúde, 2002).

#### 1.1.1.1. Vetor

Cerca de 4.000 espécies de mosquitos são conhecidas. Destas, em torno de 10% são considerados eficientes vetores patogênicos de doenças infecciosas, tanto de forma direta como indireta (Kyelem et al., 2008).

As quatro espécies de plasmódios causadoras da malária em humanos são transmitidas exclusivamente pela picada do mosquito fêmea da ordem dos dípteros, família Culicidae, gênero *Anopheles*, e cerca de 70 espécies (Manguin et al., 2008) são responsáveis pela transmissão do parasito. A comprovação da capacidade vetorial de uma espécie de anofelino é detectada a partir de espécimes capturadas em áreas endêmicas, contendo as formas esporozoítas do parasito nas suas glândulas salivares; e a partir de testes imunoenzimáticos, que permitem detectar e identificar antígenos específicos do parasito.

Os anofelinos se reproduzem na água, onde além dos ovos, vivem as larvas e as pupas. Tem como criadouros preferenciais a água limpa ou salobra, quente e sombreada e de baixo fluxo, situação muito frequente na Amazônia. Os mosquitos fêmeas, na fase adulta, para a produção dos ovos alimentam-se de sangue de

humanos (ou outros mamíferos) ou pássaros, e durante este repasto sanguíneo pode ocorrer a transmissão do parasito. As fêmeas infectadas pelo parasito geralmente mantêm a capacidade de transmissão da doença durante toda a sua vida (Manguin et al., 2010).

Na África, as espécies do complexo *Anopheles gambiae* são as mais difundidas, e as mais eficazes na transmissão do *P. falciparum*. Esta espécie tem a capacidade de se adaptar e manter-se estável em uma ampla gama de condições bioecológicas e sazonais (Al Coluzzi et al., 2002).

Os principais transmissores no Brasil são: grupo do subgênero *Nyssorhynchus*: *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*, *A. (N.) aquasalis* e *A. albitarsis* e outro do subgênero *Kerteszia*: *A. (Kerteszia) cruzii* e *A. (K.) bellator* (Rey, 2001). O *A. darlingi* (Figura 3) é considerado o principal transmissor no Brasil (Chadee, 2003). Temperaturas inferiores a 16 °C e altitudes superiores a 900 m interrompem o ciclo evolutivo do parasito no mosquito (Auto et al., 2002).

Desde a introdução dos piretróides, inseticidas de origem natural, no ano de 1949 (Braga & Valle, 2007) para controle de vetores, nenhum novo inseticida contra os vetores da malária foi aprovado pela OMS (Nauen, 2007). Um estudo feito por Oliver et al. (2010) avaliou o clorfenapir, um inseticida utilizado para o controle de pragas agrícolas, porém menos eficiente que os piretróides. A busca de inseticidas para driblar a resistência dos vetores ainda está longe de acabar (Braga & Valle, 2007).



**Figura 3:** Fêmea do mosquito *Anopheles darlingi* realizando o repasto sanguíneo.

Desde a década de 1990, os piretróides são os compostos eleitos em substituição ao dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) na detetização das casas em áreas de elevada endemicidade malárica na Amazônia (dos Santos et al., 2007). Estes autores relataram que a suscetibilidade das espécies brasileiras de anofelinos ao inseticida cipermetrina vem sendo monitorada anualmente pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. Segundo este estudo, as espécies *A. darlingi*, *A. aquasalis*, *A. nuneztovari* e *A. albicans* permanecem susceptíveis ao inseticida. *A. gambiae*, principal vetor do *P. falciparum* na África mostrou resistência aos inseticidas deltametrina e permetrina (Kerah-Hinzoumbé et al., 2008).

#### 1.1.1.2. Ciclo de vida

A biologia das diferentes espécies de *Plasmodium* inclui um ciclo de vida em um hospedeiro vertebrado intermediário e em um hospedeiro definitivo invertebrado.

#### **Ciclo no Homem – hospedeiro vertebrado**

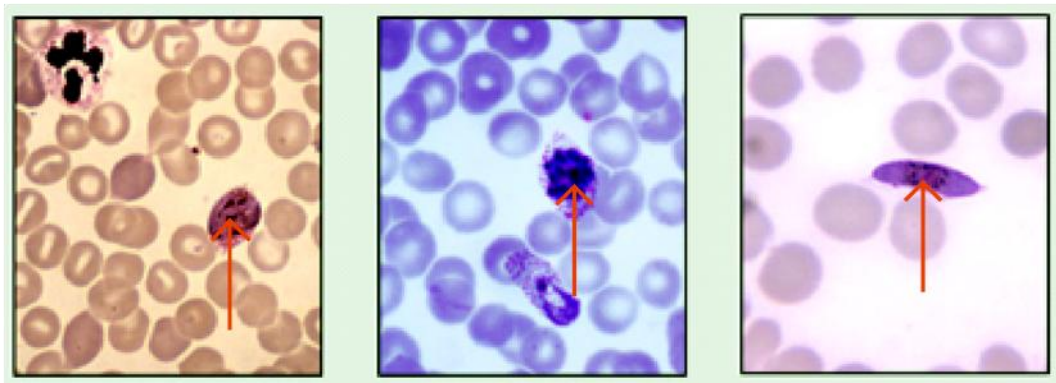
Durante o repasto sanguíneo, ocorre a inoculação dos esporozoítos, formas infectantes do *Plasmodium* que ficam acumulados nas glândulas salivares. Eles penetram em um capilar, por meio da pele, e utilizam a corrente sanguínea para chegar ao fígado. Este processo dura de 15 a 45 minutos. No órgão, os parasitos invadem as células, os hepatócitos, e transformam-se em trofozoítos, ou criptozoítos, estruturas arredondadas que iniciam um ciclo de reprodução assexuada, ciclo pré-eritrocítico ou esquizogonia pré-eritrocítica, resultando na formação dos esquizontes. Esta forma, por mitose, dá origem a milhares de elementos (10 a 40 mil), os merozoítos, que irão infectar as hemácias do hospedeiro (Figura 4).

A esquizogonia pré-eritrocítica dura uma semana para *P. falciparum* e *P. vivax*, e duas semanas para *P. malariae* (Funasa, 2001). No ciclo eritrocítico os merozoítos invadem os eritrócitos, e dividem-se por meio de mitose, transformando-se em trofozoíto eritrocitário. Os eritrócitos infectados se rompem e libertam merozoítos no plasma. O processo ocorre sequencialmente por todas as células do sistema circulatório, em períodos regulares de 36 a 48 h para *P. falciparum*, 48 h para *P. vivax* e *P. ovale*, e 72 h para *P. malariae*, provocando então os primeiros sintomas da malária. No momento da ruptura das hemácias, ocorre a liberação de

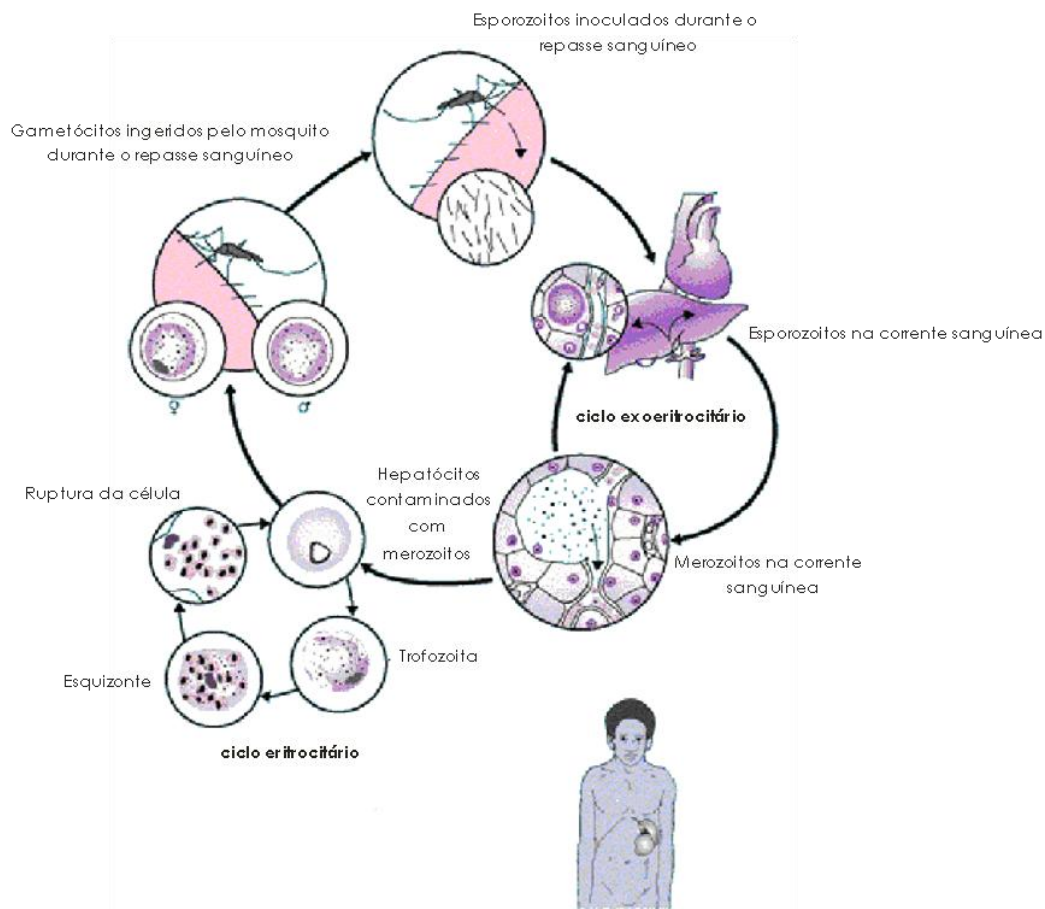
hemozoína e ocorrem as crises de febre e tremores bem marcantes da doença. A hemozoína é um pigmento produzido pela polimerização da ferriprotoporfirina IX durante a degradação celular e é conhecido como pigmento malárico.

### Ciclo no Inseto – hospedeiro invertebrado

Após o período de reprodução assexuada, alguns desses merozoítos tornam-se gametócitos, forma sexuada do parasito. Se o hospedeiro vertebrado estiver infectado por estas formas parasitárias e for picado novamente por uma fêmea *Anopheles* dar-se-á o início de um novo ciclo de transmissão. No estômago do mosquito, os gametócitos machos e fêmeas se unem formando o oocineto, que se dirige para a parede intestinal, perfurando-a e alojando-se entre o epitélio e a membrana basal, ou no próprio epitélio. O oócito maduro se rompe e libera os esporozoítos, que invadem a hemolinfa do inseto, e migram para vários órgãos, como as glândulas salivares. O ciclo de vida do *Plasmodium* ssp. está representado na figura 5.



**Figura 4:** Formas parasitárias presentes no hospedeiro vertebrado. As setas indicam o parasito no interior das hemácias ([www.ufrgs.br/parasite/siteantigo/Imagensatlas/Protozoa/Imagens/plasber1](http://www.ufrgs.br/parasite/siteantigo/Imagensatlas/Protozoa/Imagens/plasber1)).



**Figura 5:** Ciclo parasitário do *Plasmodium* spp. (Malaguarnera & Musumeci, 2002).

A manifestação clínica da malária é caracterizada por febre periódica, devido ao rompimento da membrana dos eritrócitos infectados, a cada 2 ou 3 dias. É nesse momento que ocorrem os acessos maláricos caracterizados por dores de cabeça, dores no corpo, anemia, icterícia e inchaço do fígado e baço. Ocorre também a liberação de endotoxinas durante a ruptura das hemácias promovendo o estímulo do sistema imune das interleucinas IL-6 e IL-10, e dos linfócitos T e TNF, causando febre e calafrios, que são sintomas bem característicos da malária (Malaguarnera & Musumeci, 2002). A infecção por *P. falciparum* pode ter efeitos graves como, por exemplo, complicações cerebrais, coma e convulsões, hipoglicemia e glomerulonefrite. A doença é mais grave nas pessoas com algum tipo de imunodeficiência, crianças, mulheres grávidas e turistas (Frevert, 2004; Idemyor, 2007). No caso da malária cerebral, o parasito pode comprometer progressivamente o sistema nervoso central.

Os aspectos clínicos da doença podem se dividir em não grave e grave. A forma não grave é a mais frequente e se caracteriza por uma síndrome febril aguda

indiferenciada (Maneerat et al., 2000). A forma grave da malária é responsável pelo grande número de mortes que ocorre nas áreas tropicais, principalmente na África. Essa forma é causada por *P. falciparum* cuja virulência é mais elevada que a de *P. vivax*, uma das espécies causadoras da forma não grave. Cada esporozoítio de *P. falciparum* que penetra em um hepatócito forma cerca de 40.000 novos merozoítos, enquanto que *P. vivax* forma 10.000 novos indivíduos. Outra característica exclusiva de *P. falciparum* é a capacidade de produzir citoaderência, o que confere à hemácia parasitada pequenas protuberâncias denominadas knobs. Esses knobs são responsáveis pela aderência dos eritrócitos infectados ao endotélio dos capilares e das vênulas pós-capilares (Kirchgatter & Portillo, 2005). Ao longo de sua evolução biológica, *P. falciparum* possivelmente desenvolveu mecanismos de escape para evitar ser destruído pelo baço (Kirchgatter & Portillo, 2005). Devido a este fenômeno, esquizontes e merozoítos do *P. falciparum* não são vistos no sangue periférico, pois se encontram sequestrados em capilares profundos das vísceras. Este mecanismo, denominado sequestração eritrocítica, constitui a base da patologia microvascular observada em vários órgãos nas formas graves causadas por *P. falciparum*.

#### 1.1.1.3. Tratamento

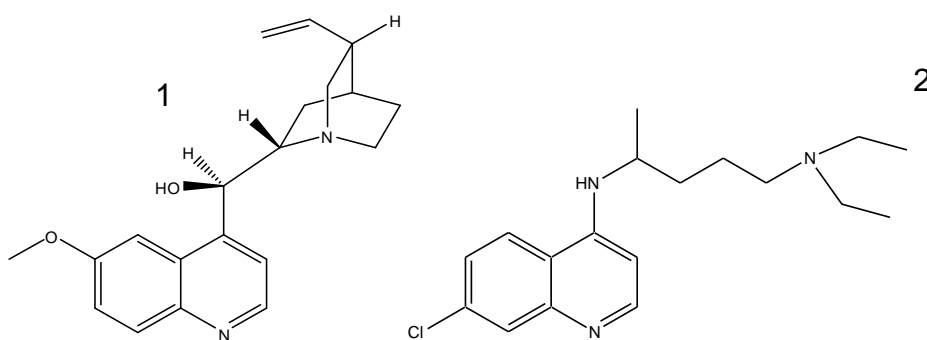
O histórico dos medicamentos utilizados contra a malária pode ser dividido em três períodos. O 1º Período (1630 a 1926) destaca-se pelo isolamento da quinina por Pelletier & Caventou, a descoberta do *Plasmodium*, por Laveran e o papel do mosquito do gênero *Anopheles* no ciclo da doença. O 2º Período (com a introdução da plasmocina na II Guerra) destaca-se pela introdução da metoquina e o descobrimento do ciclo exoeritrocítico da malária. E por fim, o 3º Período (da II Guerra aos dias atuais) quando ocorre o desenvolvimento da cloroquina, do uso do DDT no combate aos anofelinos na década de 70 e do isolamento da artemisinina (França et al., 2008).

Atualmente os fármacos antimaláricos são baseados em produtos naturais ou compostos sintéticos produzidos a partir da década de 40. Esses fármacos são específicos para cada etapa do ciclo de vida do *Plasmodium*. Existem fármacos chamados eritrocíticos, que atuam nas formas presentes nos eritrócitos do homem; os fármacos gametocíticos, que matam as formas sexuadas do parasito

(gametócitos) do indivíduo infectado, evitando a disseminação da doença para outras pessoas. Por último, há os fármacos esporonticidas (ou esporotocidas), que atuam contra esporozoítos e são capazes de matar os parasitos assim que eles entram na corrente sanguínea após a picada do mosquito, ou ainda destruí-los quando são liberados pelos esquizontes hepáticos ou sanguíneos (França et al., 2008).

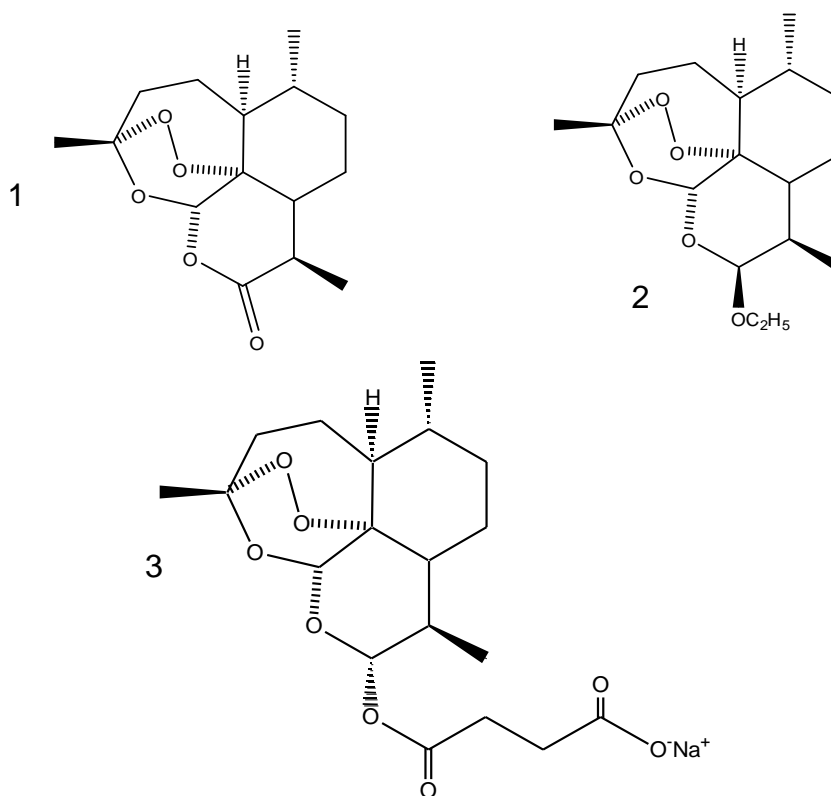
Os fármacos antimaláricos podem atuar em mais de uma forma do protozoário e serem efetivos contra uma espécie, mas totalmente ineficazes em outras (França et al., 2008).

O uso de plantas para o tratamento de doenças parasitárias é bem conhecido e documentado desde a antiguidade, como por exemplo, a utilização de *Cinchona calisaya* - quina (Rubiaceae) e a *Artemisia annua* (Asteraceae) para o tratamento da malária (Wright, 2005). A Organização Mundial da Saúde (OMS) inclui 15 fármacos como essenciais para o tratamento da malária, entre eles os principais são a quinina (oriundo de *C. calisaya*) e seus derivados (Figura 6) e a artemisinina (oriundo da *A. annua*) e seus derivados (Figura 7). Na China o uso das folhas de *A. annua* para o tratamento de febre era conhecido há centenas de anos pela medicina Chinesa.



**Figura 6:** Estruturas químicas da quinina (1) e seu derivado (2) cloroquina.





**Figura 7:** Estruturas químicas da artemisinina (1) e seus derivados semi-sintéticos: arteéter (2) e artesunato de sódio (3).

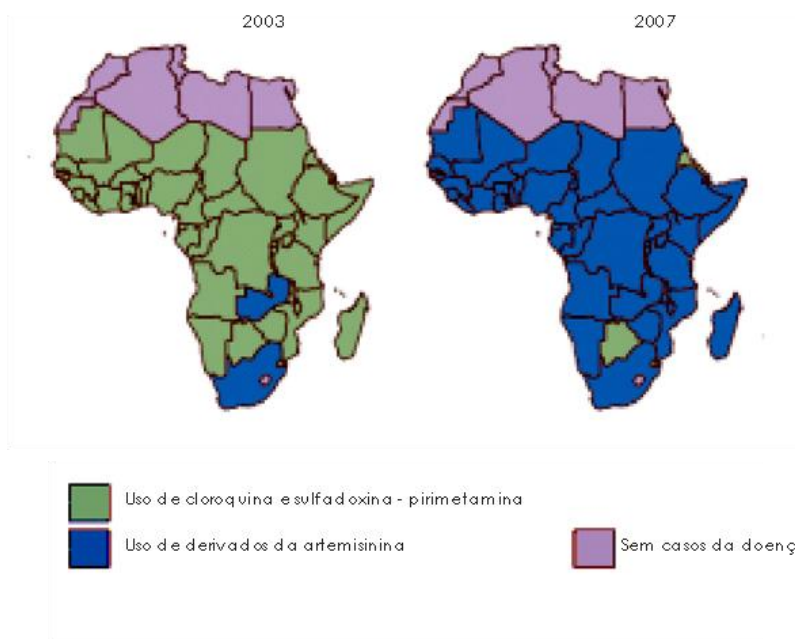
Análises das características estruturais de compostos isolados de fontes naturais têm sido intensificadas, a fim de se obter maiores informações sobre suas propriedades no parasito, incluindo as vantagens e limitações da quimioterapia. O estudo de Kaur et al. (2009) abrange alcaloides, terpenos, quassinoides, flavonóides, limonóides, chalconas, peptídeos, xantonas, quinonas e cumarinas com atividade antimalárica.

A escolha da terapia depende muito da espécie do *Plasmodium*, da ação nos diferentes ciclos, e da atividade sobre os esquizontes ou gametócitos. Os principais medicamentos antimaláricos disponíveis ou em desenvolvimento estão agrupados no Quadro 1 (Ringwald, 2007).

**Quadro 1:** Principais medicamentos antimaláricos existentes ou em fase de desenvolvimento (Ringwald, 2007).

<b>Grupo Químico</b>	<b>Medicamentos</b>
4- Amino-quinolínas	Cloroquina, amodiaquina, piperaquina, pironaridina
Quinolínas	Quinina, mefloquina, halofantrina, lumefantrina
Sulfanamidas / Sulfonas	Sulfadoxina, fulfaleno, dapsona
Bisguanidas	Proguanil, clorproguanil
Diamino-pirimidina	Pirimetamina
8-Amino-quinolínas	Primaquina
Lactonas sesquiterpênicas	Artemisinina, dihidroartemisinina, artesunato, artemeter, arteéter
Naftoquinonas	Atovaquona
Antibióticos	Tetraciclina, doxiciclina, clindomicina, azitromicina

Combinações à base de artemisinina são recomendadas pela OMS para tratamento de primeira escolha para malária (Eastman & Fidock, 2009), para a redução da morbidade e mortalidade. O artesunato, de aplicação parenteral, tem substituído a quinina para o tratamento de malária grave (Dondorp et al., 2005), depois do surgimento de resistência a este fármaco e seus derivados. Até 2003, medicamentos como a cloroquina e sulfadoxina-pirimetamina eram utilizados na África sub-saara. Em 2007 pode-se observar uma troca para o uso de derivados de artemisinina (Figura 8).



**Figura 8:** Mudança no perfil de medicamentos adotados no continente africano para o tratamento da malária (WHO, 2007).

A resistência de *Plasmodium falciparum* à cloroquina iniciou na fronteira entre a Tailândia e Camboja, nos anos 50 (World Malaria Report, 2008). Na Ásia, a resistência à cloroquina ficou inicialmente restrita à Indochina, até a década de 1970, quando se espalhou para o oeste, nas ilhas vizinhas, no sul e leste. Na África, esse evento ocorreu muito mais tarde, e levou uma década para atravessar o continente (Molinier, 1994). Cepas resistentes são encontradas em países da América Central, no norte do Canal do Panamá e na ilha de Hispaniola (World Malaria Report, 2008).

Apesar da resistência cruzada entre cloroquina e amodiaquina, esta continua a ser mais eficaz do que a cloroquina em áreas de resistência. No entanto, ela poderá perder rapidamente a sua eficácia se for usada intensivamente nas áreas, em que a resistência à cloroquina é generalizada (Ringwald, 2007).

No início da década de 1980, a combinação sulfadoxina-pirimetamina foi utilizada como substituta para a cloroquina na maioria dos países. No entanto, esse tratamento, tornou-se quase totalmente ineficaz na Tailândia e nos países vizinhos. E cepas resistentes logo se espalharam pela América do Sul. Em 1993, o Malawi foi o primeiro país da África Oriental a trocar a cloroquina pela sulfadoxina-pirimetamina, como tratamento de primeira escolha. Na década de 90, outros países da África seguiram este exemplo, porém, devido à ampla utilização, a resistência se espalhou no leste da África (Dorsey et al., 2004).

A resistência à mefloquina é encontrada principalmente no Camboja, Mianmar, Tailândia e Vietnã. Casos esporádicos de falha terapêutica da mefloquina na profilaxia e no tratamento de viajantes têm sido relatados na África, em países asiáticos e na América do Sul. Estudos *in vitro* na África Ocidental revelaram a existência de cepas com diminuição da sensibilidade à mefloquina, mesmo antes da sua introdução para uso terapêutico na região (Lim et al., 2005).

Dondorp et al. (2010) mostraram que a cepa de *P. falciparum* isolada de pacientes em Pailin, no Camboja ocidental, teve uma redução significativa na sensibilidade ao medicamento artesunato. O desenvolvimento de resistência aos fármacos como a cloroquina ou aos derivados da artemisinina alerta para a necessidade urgente em descobrir ou desenvolver novos agentes terapêuticos.

#### 1.1.2. *Leishmania* ssp.

A leishmaniose é uma doença causada por mais ou menos vinte espécies de protozoários flagelados encontrados em muitas regiões do mundo, particularmente na África, América Latina, Ásia Central, bacia do Mediterrâneo e Oriente Médio (Murray et al., 2005). A OMS estima que a prevalência mundial seja de aproximadamente 12 milhões de casos, e que 350 milhões de pessoas estão em risco de se contaminar (WHO, 2007a).

A leishmaniose é dividida em dois tipos: a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e leishmaniose visceral (LV) (Rath et al., 2003). A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, engloba vários sinais clínicos, mas pode permanecer assintomática ou subclínica. Uma característica dessa doença é que ela não se cura espontaneamente, e a infecção sistêmica pode ser fatal se não for tratada (Herwaldt, 1999).

Na leishmaniose cutânea, as lesões tendem a cicatrizar espontaneamente, e a imunidade que o indivíduo adquire após a cura permanece por toda vida, portanto, a prevenção da leishmaniose por meio de imunização profilática parece viável (Oliveira et al., 2009).

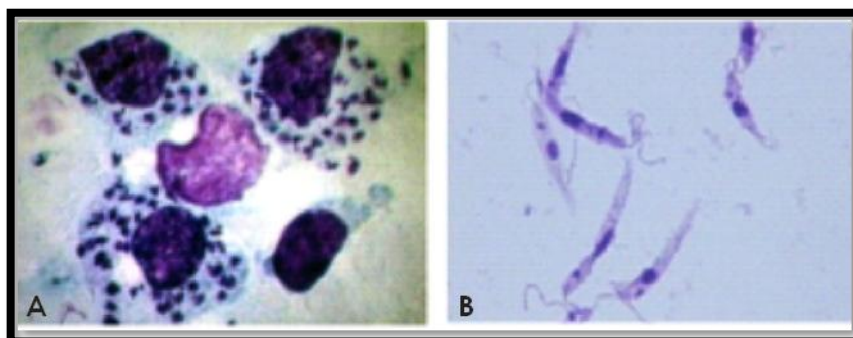
O Quadro 2 mostra as principais características das três formas de leishmaniose (Oliveira et al., 2004).

**Quadro 2:** Resumo das três formas de leishmaniose com suas principais características.

<b>Características</b>	<b>Mucocutânea</b>	<b>Cutânea</b>	<b>Visceral</b>
<b>Lesões</b>	Destruição do septo nasal	Ulcerações na pele bem definidas, com as bordas elevadas e o centro necrosado	Órgãos internos
<b>Histopatologia/ n° de parasitos</b>	Reações de granulócitos/ poucos parasitos	Respostas inflamatórias crônicas/ n° moderado de parasitos	Proliferação de macrófagos/ alto grau de parasitemia
<b>Níveis de anticorpos/ Resposta imune</b>	Baixo/ Altamente positivo	Baixo/ Positivo	Alto/ Negativo

O agente etiológico da leishmaniose é um protozoário do gênero *Leishmania* pertencente a ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, e subgênero *Leishmania* ou *Viannia* (Herwaldt, 1999), que incluem cerca de 20 espécies que diferem em sua distribuição geográfica (Vieira et al., 2007).

Os parasitos podem ser encontrados em dois estágios (Figura 9): promastigotas, que é a forma flagelada encontrada nos flebotomíneos, com 15 a 20 µm de comprimento por 1,5 a 3,5 µm de diâmetro e um flagelo de 15-28 µm; e amastigotas, que são formas arredondadas não-flageladas com 2 a 4 µm de diâmetro encontradas no sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados (Herwaldt, 1999).

**Figura 9:** A) formas amastigotas dentro de macrófagos do hospedeiro; B) formas promastigotas.

As espécies de *Leishmania*, causadoras da LTA, no Velho Mundo (Ásia, África e Europa) são *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica*. No Novo Mundo, principalmente na América Latina, a espécie mais envolvida é a *L. (Viannia) braziliensis* seguida por *L. (L.) amazonensis*. As espécies envolvidas na LV são do complexo *L. donovani* (*L. donovani* e *L. infantum* no Velho Mundo e *L. chagasi* no Novo Mundo) (Bacellar & Carvalho, 2005; Reinthinger et al., 2007).

#### 1.1.2.1. Vetor

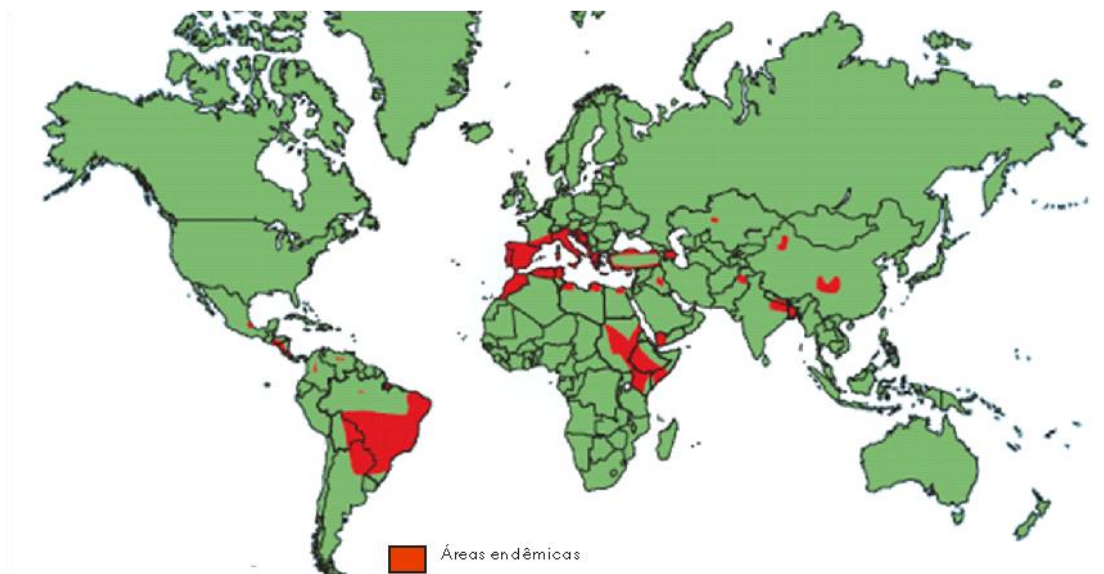
Os vetores são as fêmeas do gênero *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo), popularmente conhecidos como mosquito palha, tatuquira ou birigui. O parasito é transmitido pela picada da fêmea, inseto com 2-3 mm de comprimento bem adaptado ao ambiente peri-doméstico e encontrado em toda a América Latina. A espécie *L. infantum* também é transmitida por *Lutzomyia cruzi* no Brasil e *Lutzomyia evansi* na Colômbia e Venezuela (Feliciangeli, 1999).

Os vetores estão adaptados ao meio urbano onde encontram condições para proliferação, reprodução e infecção; perpetuam-se em diferentes biótipos e nenhuma outra espécie de flebotomíneo entre nós é tão sinantrópica quanto a *Lutzomyia longipalpis* (Madeira et al., 2003).

Os flebotomíneos são suscetíveis aos mesmos inseticidas que os mosquitos do gênero *Anopheles*, vetor da malária. Após o uso em grande escala de inseticidas, principalmente o DDT, para eliminar o vetor da malária nos anos 1950, a LV quase desapareceu. Mas, infelizmente, a doença rapidamente ressurgiu com a interrupção das campanhas de detetização com o DDT.

#### 1.1.2.2. Leishmaniose Visceral (LV)

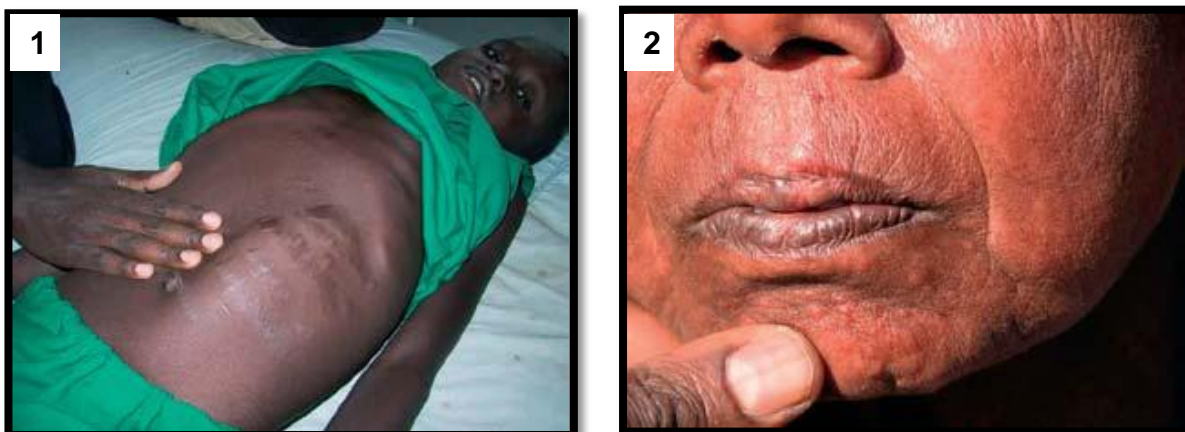
A leishmaniose visceral (Figura 10), conhecida como calazar, causada pelas espécies *L. donovani* e *L. chagasi*, afeta mais de 500.000 pessoas anualmente em todo o mundo (Murray et al., 2005; Sundar & Chatterjee, 2006; Alvar et al., 2006). A doença é uma zoonose, cujo principal reservatório doméstico é o cachorro (*Cannis familiaris*), enquanto a raposa e outros animais fazem o reservatório silvestre.



**Figura 10:** Mapa com a distribuição da leishmaniose visceral (LV). A maioria dos casos é encontrada em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão (Chappuis et al., 2007).

A leishmaniose visceral é caracterizada pelo hipertrofismo de órgãos como fígado, baço e medula, devido à presença dos parasitos (Desjeux, 2004, Murray et al., 2005), e quando não tratada causa 100% de mortalidade. Os sintomas são febre irregular, suores noturnos, anorexia, grande perda de peso, fraqueza, pancitopenia, anemia, hepatoesplenomegalia, leucopenia, trombocitopenia e hipergamaglobulinemia (Murray et al., 2005). Estes autores relatam ainda que crianças podem apresentar diarréia e retardo no crescimento e que a doença quando não tratada pode produzir caquexia profunda, sangramento e susceptibilidade a infecções secundárias. A LV é normalmente precedida por uma lesão seca ou ulcerada no local da picada (Ashford, 2000). Caso a doença não seja devidamente tratada, pode evoluir para o óbito.

A leishmaniose visceral pode se diferenciar como leishmaniose dérmica pós-calazar, que se desenvolve após aparente cura da doença (Murray et al., 2005) e é caracterizada por lesões na pele que podem ser de vários tipos, e ocorre principalmente na face (Figura 11).



**Figura 11:** 1- Criança com leishmaniose visceral; 2- Adulto com leishmaniose dérmica pós-calazar.

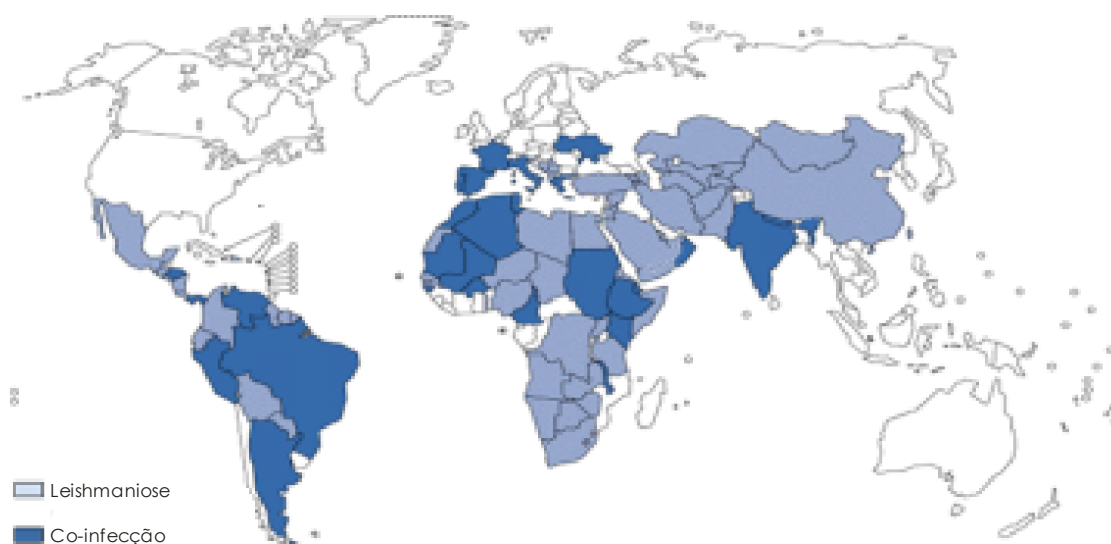
As duas espécies que causam a leishmaniose visceral estão distribuídas em diferentes áreas geográficas. Porém, *L. infantum* infecta principalmente as crianças e os indivíduos imunodeprimidos, enquanto *L. donovani* infecta todos os grupos etários (Bacellar & Carvalho, 2005). Há uma estimativa de aproximadamente 50.000 mortes pela doença todos os anos (Desjeux, 2004), número superado apenas pela malária (WHO, 2007c). Os três principais fatores no aumento dessa incidência são a migração, a falta das medidas de controle e a coinfeção HIV-leishmaniose visceral (Boelaert et al., 2000).

Epidemias severas da doença têm sido relatadas como a que ocorreu no sul do Sudão, em um contexto de guerra civil e fome, em que a leishmaniose visceral matou um número estimado de 100.000 pessoas de uma população de 280 mil, entre 1984 e 1994 (Seaman et al., 1996). O parasito afeta as comunidades pobres, geralmente em regiões remotas, como as áreas rurais. A doença é endêmica principalmente em países que estão entre os menos desenvolvidos do mundo (Davies et al., 2003).

Casos de coinfeção HIV-leishmaniose visceral têm sido relatados em 35 países (Figura 12). O primeiro caso foi descrito por De la Loma et al. (1985). A incidência da coinfeção está diminuindo no Brasil, graças à ação do governo em distribuir antirretrovirais aos pacientes HIV. Em pacientes coinfectados a resposta humoral e celular é diminuída em relação ao parasito, levando a um maior risco de desenvolver a doença, com aumento da carga parasitária no sangue e na medula



óssea, menor sensibilidade aos testes sorológicos, e maior taxa de falha no tratamento (Rabello et al., 2003).



**Figura 12:** Mapa da coinfeção Leishmaniose e HIV.

No Brasil, ocorrem de 3.000 a 5.000 novos casos por ano (Bhatia et al., 1999, WHO, 2007c). Aproximadamente 80% dos casos registrados ocorrem em crianças com menos de 10 anos, e predominantemente no Nordeste (Gontijo & Melo, 2004; Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006), com maior incidência na Bahia e Piauí (Gontijo & Melo, 2004). Porém, no Rio Grande do Norte, 82% dos municípios notificaram casos de LV e em Pernambuco a doença é notificada em 119 municípios (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006). O programa de controle da leishmaniose no Brasil prevê diagnóstico e tratamento imediato dos doentes como medida essencial de controle.

A letalidade da LV vem aumentando no Brasil, passando de 3,6% no ano de 1994 para 5,4% em 2007, o que representa um incremento de 50% (Maia-Elkhoury et al., 2008).

### 1.1.2.3. *Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)*

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é prevalente em 82 países, e sua incidência é estimada em 1,5 milhões de casos por ano. No Brasil a incidência anual chega a 32.000 casos (WHO, 2007a). No mundo, a maioria (90%) dos casos é relatada na África (principalmente no Marrocos, Etiópia e Tunísia), no Oriente Médio (principalmente no Afeganistão, Paquistão, Irã, Iraque, Síria e Arábia Saudita) e na América Latina (Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela) (Desjeux, 2004; Murray et al., 2005) (Figura 13).



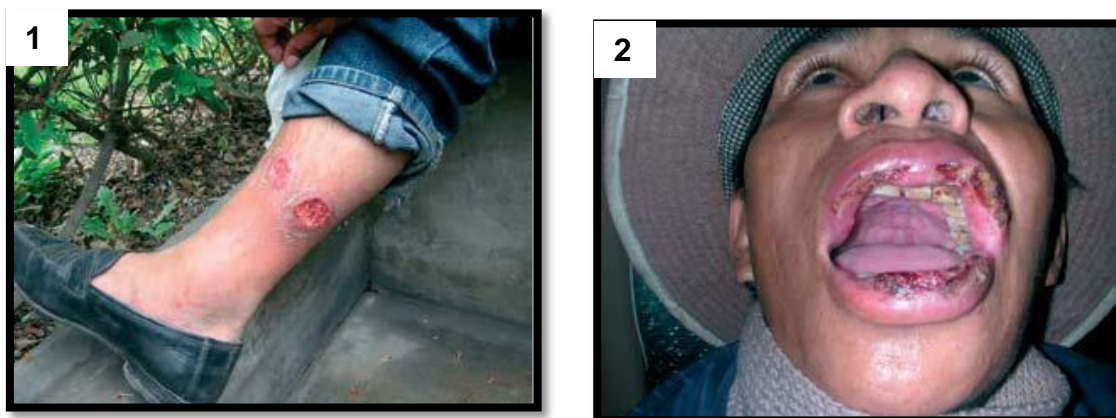
**Figura 13:** Mapa com os países endêmicos da leishmaniose cutânea (Vidyashankar & Agrawal, 2009).

A forma mucosa da leishmaniose (Figura 14) é uma variação da LT. Ocorre anos após o início da leishmaniose cutânea, caracterizada pela destruição da cavidade oral, nasal e faríngea, que eventualmente evolui para lesões desfigurantes. Os sintomas são suaves, no início como inflamação e congestão nasal, porém lentamente podem ocorrer ulceração e perfuração do septo. A lesão pode estender-se na face, palato mole, faringe e laringe.

A forma mucosa da leishmaniose é causada por *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* (Herwaldt, 1999). *L. braziliensis* se caracteriza pela alta agressividade aos tecidos mucosos, resistência ao tratamento por

antimoniais, com frequentes recidivas da doença. Cinco por cento dos pacientes com lesões nas mucosas evoluem para morte (TDR, 2005).

No Brasil, os casos encontrados são em torno de 0,4% na região sul, 1,4% na região central e 2,7% no Nordeste (Gontijo & Melo, 2004). Nos países andinos, o índice de leishmaniose mucosa chega a 7,1%, sendo que na Bolívia é onde se encontra o maior número de casos, com uma frequência de 20% (García et al., 2009).



**Figura 14:** 1- Leishmaniose cutânea com ulcerações bem definidas; 2- Paciente com a forma mucosa da leishmaniose (WHO, 2007a).

#### 1.1.2.4. Ciclo biológico

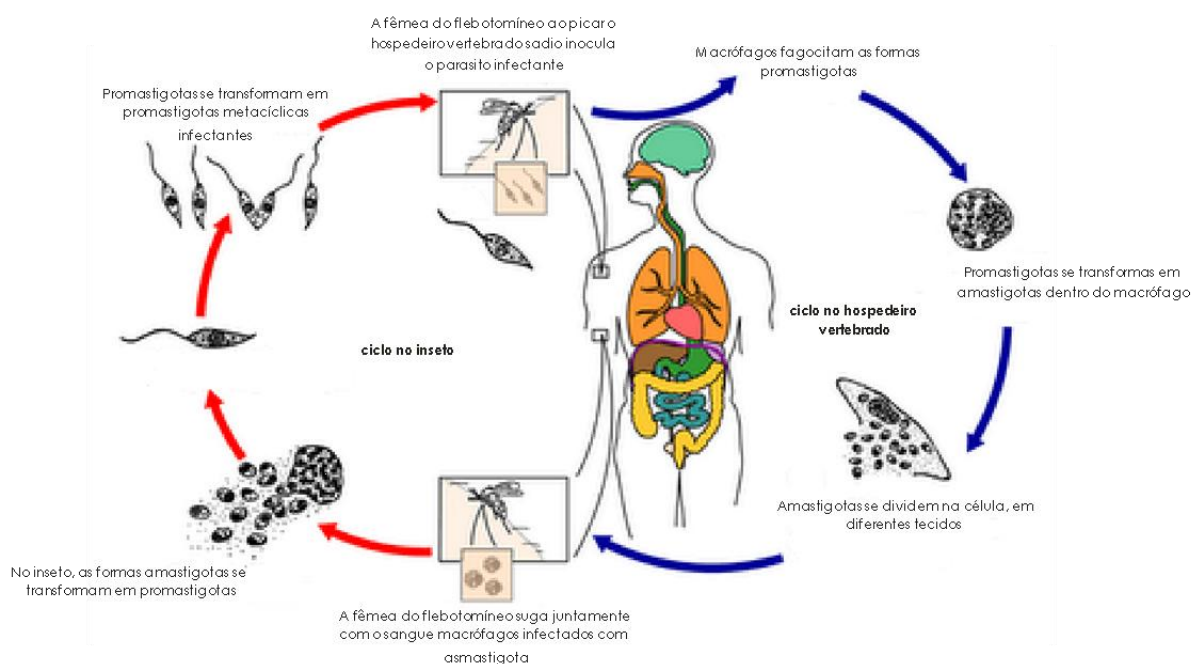
As formas infectantes de *Leishmania*, que são transmitidas aos hospedeiros vertebrados pelos vetores, são as promastigotas metacíclicas. O parasito também apresenta as formas paramastigotas e promastigotas não metacíclicas que se multiplicam no trato digestivo dos vetores e as formas amastigotas que são parasitos obrigatórios das células do sistema fagocitário mononuclear.

A transmissão (Figura 15) se inicia no momento em que o vetor faz a picada, durante seu repasto sanguíneo, quando as formas promastigotas são injetadas na epiderme e derme de seus hospedeiros vertebrados, incluindo o homem (Croft et al., 2006). Essas formas são fagocitadas pelos macrófagos do hospedeiro, onde assumem a forma amastigota e, passam a se multiplicar por divisão binária até provocarem o rompimento da célula, entrando no espaço intercelular, sendo fagocitadas por novos macrófagos e células do sistema fagocítico mononuclear.

Assim, os parasitos se espalham por todo o organismo do hospedeiro, provocando as lesões características da doença (Antinori et al., 2008).

Um dos problemas a ser vencido no combate à leishmaniose é a habilidade dos parasitos intracelulares de permanecerem no organismo do hospedeiro mesmo após a resolução da doença, persistindo na corrente sanguínea, na pele sadia, nas escaras e nos linfonodos de pacientes assintomáticos ou curados mesmo após décadas de infecção primária (Bogdan, 2008).

Em algumas áreas, a leishmaniose é uma infecção que envolve vários reservatórios, geralmente, animais silvestres como a preguiça, o tamanduá, roedores e raposas, entre outros (Rath, 2003). A doença, originalmente centrada no ambiente silvestre ou em pequenas localidades rurais, passou a ser identificada em centros urbanos. Essa situação deve-se à migração do mosquito transmissor em função do desmatamento, da expansão das áreas urbanas e da presença de reservatórios, principalmente do cão doméstico (Vieira et al., 2007).



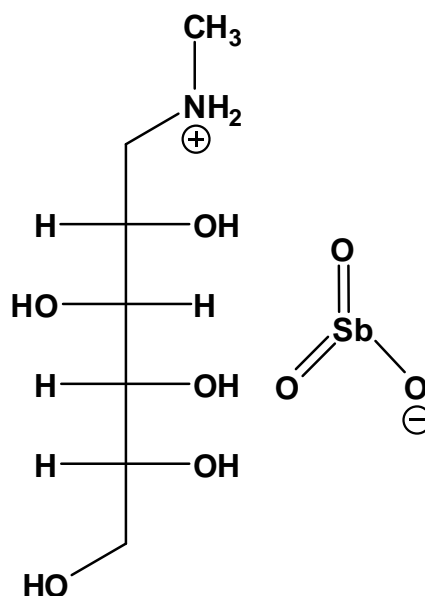
**Figura 15:** Ciclo evolutivo do parasita *Leishmania* ssp.

#### 1.1.2.5. Tratamento

Muitos são os fatores responsáveis pela disseminação da leishmaniose no mundo, entre eles, estão as falhas terapêuticas e a resistência aos medicamentos

(Dujardin, 2005). Além disso, a falta de acesso ao tratamento e a toxicidade dos medicamentos disponíveis são barreiras que dificultam a terapêutica (Hotez et al., 2007).

O tratamento humano, há mais de 60 anos, vem sendo realizado principalmente com antimoniais pentavalente. O antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup> - Sanofi-Aventis) e o estibogluconato de sódio (Pentostan<sup>®</sup> - GlaxoSmithKline) (Figura 16) são os medicamentos de primeira escolha para o tratamento (Demicheli et al., 2002; Baneth et al., 2008). Eles são eficazes no tratamento das formas cutânea, mucocutânea e visceral da doença (Rath et al., 2003). A combinação entre antimoniais e interferon-gama ou alopurinol (Amato et al., 2000) tem sido proposta como alternativa para melhora na eficácia terapêutica destes compostos, que no entanto, são tóxicos e nem sempre efetivos, sendo aplicados em esquemas prolongados.



**Figura 16:** Antimonial pentavalente - Glucantime<sup>®</sup>.

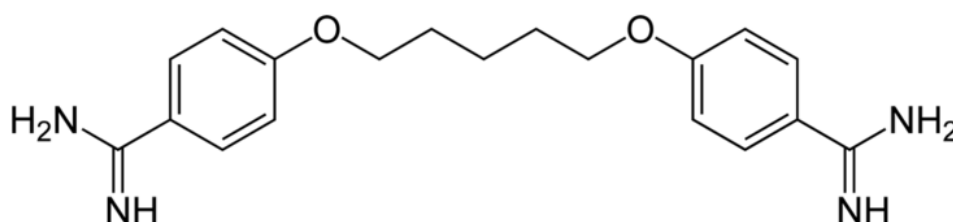
Romero & Boelaert (2010) fizeram uma revisão sistemática nas principais bases de dados, Medline, Lilacs e Cochrane Central Register, de 1960 a 2008 e chegaram à conclusão de que a eliminação de LV na América Latina ainda não é um objetivo a ser alcançado em curto prazo, visto a complexidade e diversidade dos cenários de sua transmissão. Muitos países consideram a leishmaniose como uma doença sem muita importância e, portanto, não existe financiamento para o controle da doença.

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes no combate a *Leishmania* é ainda controverso e pouco compreendido (Chai et al., 2005). Estudos têm demonstrado que o mecanismo de oxirredução é uma das hipóteses a ser considerada. Entretanto, outros estudos indicam que o papel do antimonial na forma trivalente - Sb(III) - não estaria ligado à atividade no parasito e sim associado à toxicidade (Dzamtika et al., 2006). Por outro lado, estudos têm proposto como mecanismo de ação, a capacidade do antimonial pentavalente - Sb(V) - de formar complexos com nucleotídeos do parasito, interferindo no seu metabolismo e inibindo a sua topoisomerase, o que o levaria à morte (Demicheli et al., 2002).

Os antimoniais são mal-tolerados pelos pacientes coinfectados com LV e HIV na Europa (Delgado et al., 1999) e muitos relatos mostram que, nestes pacientes, a espécie *L. infantum* desenvolve resistência após repetições do tratamento. Além disso, existem evidências de que o estibogluconato de sódio e o antimoniato de meglumina, este em menor escala, estimulam a replicação do HIV *in vitro* (WHO, 2007c).

Dados recentes indicam que a resistência aos antimoniais tem se tornado um problema na Índia e no Sudão. No Brasil, ainda não existe documentação da presença de cepas de *L. chagasi* resistentes, *in vitro*, aos antimoniais. Esses medicamentos devem ser evitados, pois têm sido associados a uma elevada taxa de letalidade (Amato et al., 2000).

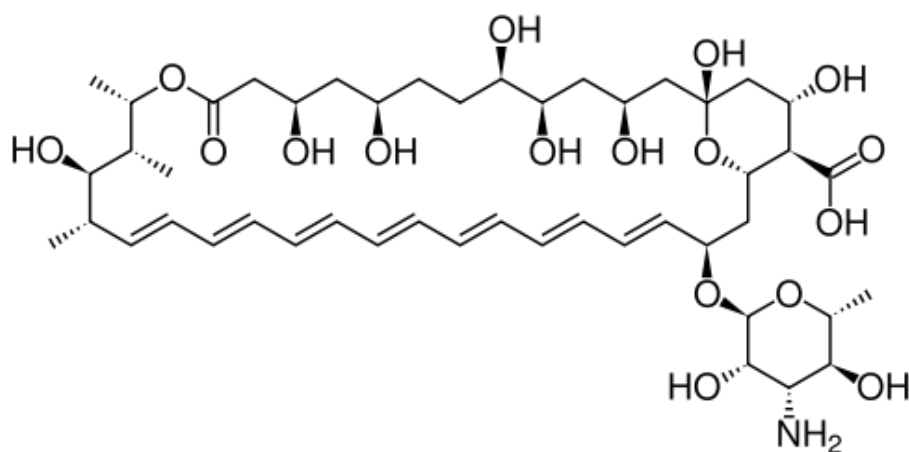
A pentamidina (Pentamidina<sup>®</sup> e Lomidina<sup>®</sup>) (Figura 17), uma diamidina usada para o tratamento de várias parasitoses, é o medicamento de segunda escolha mais recomendado, embora apresente efeitos adversos significantes e seja administrado por via parenteral. A pentamidina tem caráter catiônico e pode se apresentar na forma de isotionato ou cloridrato.



**Figura 17:** Estrutura química da pentamidina.

A pentamidina é uma molécula de grande interesse no tratamento de leishmaniose visceral e mucocutânea refratária a antimoniais pentavalentes (Amato et al, 2000). A alta toxicidade deste medicamento, com relatos de morte repentina, é um fator limitante de seu emprego. Dentre os principais efeitos adversos, estão hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas e nefrotoxicidade (Rath et al., 2003). Um mecanismo de ação proposto para a pentamidina é a inibição da topoisomerase mitocondrial do parasito (Kramp et al., 2005). Outro mecanismo proposto é a ligação da pentamidina às regiões ricas em adenina e timina do DNA. Porém, alterações na sequência do DNA poderiam impedir essa ligação e contribuiria com a resistência do parasito ao medicamento (Basselin & Robert-Gero, 1998). O declínio da eficácia da pentamidina na Índia tem sugerido que os parasitos estão se tornando resistentes (Ouellette et al., 2004).

A anfotericina B (Figura 18) derivado do ascomiceto *Streptomyces nodosus*, é usada no caso de falhas no tratamento com compostos antimonais. Apesar de sua elevada toxicidade e de ser administrado por via parenteral, este medicamento tem sido usado para o tratamento da leishmaniose visceral e de infecções sistêmicas causadas por fungos (Amato et al., 2000; Sereno et al., 2000; Odds et al., 2003). O mecanismo de ação, assim como a toxicidade, envolve a formação de poros artificiais ao longo da membrana celular do parasito e do hospedeiro, alterando a permeabilidade seletiva a cátions, e levando à morte celular (Cohen, 1998).



**Figura 18:** Estrutura química da Anfotericina B.

Como estratégia foi desenvolvida a anfotericina B encapsulada em lipossomas (AmBisome<sup>®</sup>) mostrando bons resultados, com níveis de 90 a 95% de cura LV na Índia (Prasad et al., 2004). No Brasil, como tratamento alternativo aos

antimoniais, vem sendo utilizado o desoxicolato sódico de anfotericina B e suas formulações lipossomais (anfotericina-B-lipossomal e anfotericina-B-dispersão coloidal) e as pentamidinas (sulfato e mesilato). Os imunomoduladores (interferon gama e citocinas) se encontram em fase de investigação. Estes medicamentos só devem ser administrados em hospitais.

Zauli-Nascimento et al. (2010) testaram em formas amastigotas de *L. amazonensis* e *L. brasiliensis*, isoladas de pacientes de um hospital de Goiânia, os medicamentos anfotericina B e meglumina, e afirmaram que nenhuma das cepas testadas foram consideradas resistentes.

Talvez o maior avanço dos últimos anos no tratamento da leishmaniose tenha sido o tratamento oral da LV com a miltefosina, o hexadecilfosfocolina (Impavido® - Asta Médica) (Croft & Coombs, 2003). A formulação oral é mais fácil de ser administrada, o que a torna uma ferramenta importante para reduzir as dificuldades socioeconômicas relacionadas ao tratamento em áreas onde a doença é endêmica (Fournet et al., 1996). O mecanismo de ação deste fármaco ainda não foi definido. Acredita-se que a miltefosina estimule células T e os macrófagos a secretarem interferon gama e aumentarem a produção de intermediários reativos de nitrogênio e oxigênio pelos macrófagos, o que levaria a morte do parasito (Palumbo, 2008).

Atualmente, a resistência de várias espécies de *Leishmania* aos medicamentos está associada a um aumento da expressão gênica de sistemas de transporte ativo da família das proteínas transmembranares ABC (Mandal et al., 2009). Faz parte deste grupo de proteínas o subgrupo MRP (P-glicoproteínas), com maior similaridade à proteína humana e associada a mecanismos de multirresistência, e o subgrupo PGPA (proteína A como glicoproteína P). O mecanismo de resistência inclui uma série de eventos celulares, dentre os quais o aumento da atividade destas proteínas transportadoras no efluxo de agentes quimioterápicos (Machuca et al., 2006).

Algumas quimioterapias estão em desenvolvimento, entre elas a sitamaquina, uma 8-amino-quinolína desenvolvida pela GlaxoSmithKline para o tratamento oral da LV (Croft et al., 2006); a paromomicina, um antibiótico usado para o tratamento de infecções causadas por *L. donovani* (WHO, 2007c), mais vantajoso pelo tempo de duração do tratamento ser de 21 dias, ou seja 9 dias a menos quando comparada a anfotericina B. O imiquimod, composto de uso tópico para o tratamento de LT é um



importante indutor de citocinas em células mononucleares humanas, e estimula a liberação de óxido nítrico pelos macrófagos (Arevalo et al., 2001).

### 1.1.3. Doença de Chagas

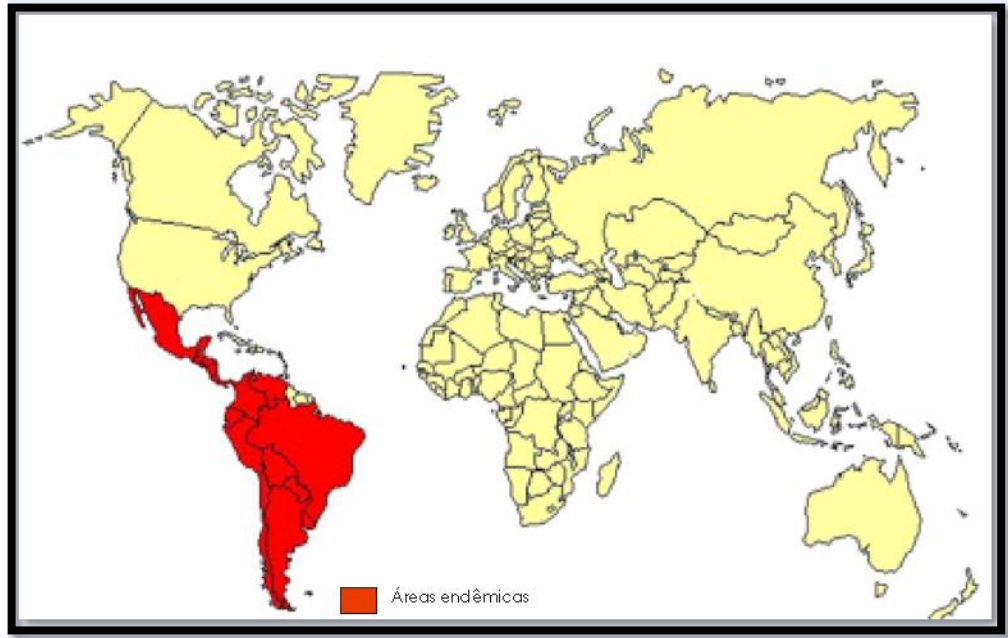
A tripanossomíase americana foi descrita em 1909 por Carlos Chagas e é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*.

Durante a maior parte do século 20, a doença de Chagas foi considerada, em todos os países da América Latina, a enfermidade parasitária de maior impacto sobre as economias nacionais e sistemas públicos de saúde (WHO, 2002). No entanto, desde o começo da década de 1990, na maioria dos países latino-americanos deu-se início a programas regionais de controle de vetores domésticos. Estes programas levaram a uma redução de 16-18 milhões de pessoas infectadas para um número estimado em 9 milhões (Jannin & Salvatella, 2006). Porém ainda existem muitos obstáculos para o controle efetivo da doença com milhões de pacientes chagásicos necessitando de ajuda médica específica. A doença de Chagas é considerada uma doença negligenciada porque acomete comumente populações pobres e marginalizadas, e faltam incentivos para a pesquisa e desenvolvimento de fármacos (Ault, 2007).

A doença de Chagas está presente em toda a América Latina, desde o México até a Argentina (Figura 19). No início dos anos 1980, a estimativa era de 16 a 18 milhões de pessoas infectadas com uma incidência anual de 300 mil casos. Em 2007, os números eram de 9 milhões de pessoas infectadas com 50 mil novos casos e 14 mil mortes anuais por complicações da doença. Desde 2006, a OPAS/OMS concedeu ao Brasil, ao Uruguai e ao Chile um certificado de interrupção da transmissão vetorial da doença. Porém, tem sido reportado o aumento da doença na região Amazônica, sobretudo por transmissão oral (Technical Note, Department of Health Surveillance, 2008).

A imigração, o transplante de órgãos, a transfusão de sangue e infecções congênitas são maneiras de aumentar o risco de infecção (Schmunis & Yadon, 2010). Os casos de doença de Chagas na Europa foram notificados na França, Itália, Suíça, Dinamarca, Suécia e Espanha, todos em imigrantes da América Latina (Enemark et al., 2000).

Como na leishmaniose, é comum os casos de coinfeção entre *T. cruzi* e o vírus da imunodeficiência adquirida (Bocchi & Fiorelli, 2001).



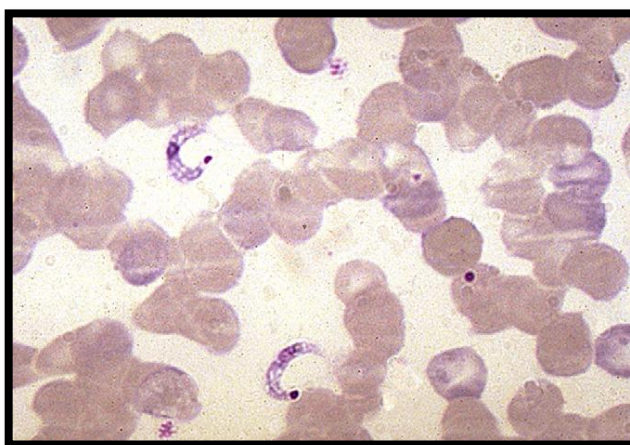
**Figura 19:** Distribuição da doença de Chagas no mundo.

#### 1.1.3.1. O parasito

O gênero *Trypanosoma* é um dos mais importantes da família *Trypanosomatidae*, por incluir uma série de espécies causadoras de doenças humanas importantes, como o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, além do *T. rhodesiense* e *T. gambiense*, agentes da doença do sono. Com base no comportamento do parasito nos seus hospedeiros, principalmente no vetor, o gênero *Trypanosoma* foi dividido em dois grupos. O primeiro, chamado de *Stercoraria*, inclui tripanosomas que se desenvolvem no tubo digestivo do vetor, progredindo no sentido da porção intestinal com liberação de formas infectivas pelas fezes, neste grupo encontra-se *T. cruzi*. O segundo, chamado *Salivaria*, inclui tripanosomas que se desenvolvem inicialmente no tubo digestivo e que, posteriormente, atravessam o epitélio digestivo atingindo as glândulas salivares, onde podemos encontrar as formas infectivas que são inoculadas mecanicamente.

Morfologicamente, *T. cruzi* é um protozoário flagelado, que se apresenta sob diferentes formas durante o seu ciclo de vida: amastigotas (no interior de células do

hospedeiro vertebrado ou em cultura de células), esferomastigotas (no estômago do inseto vetor e em determinadas situações experimentais *in vitro*), epimastigotas (em cultivo axênico e no tubo digestivo do inseto vetor) e tripomastigotas (no inseto vetor, em cultura de células, no sangue e espaço intercelular do hospedeiro vertebrado) (Figura 20). Os tripomastigotas são formas móveis e grandes (15-25  $\mu\text{m}$ ) encontradas no sangue do paciente. As formas amastigotas, imóveis, são menores (2-4  $\mu\text{m}$ ) e infectam as células do hospedeiro.



**Figura 20:** Formas tripomastigotas de *T. cruzi* encontradas no vetor (Develoux et al., 2009).

#### 1.1.3.2. O vetor

Os insetos hemípteros da família *Reduviidae* possuem uma probóscida especializada para a sucção sanguínea, e foram agrupados na subfamília *Triatominae*, onde estão os vetores do *T. cruzi*. Embora possuam hábitos diversos, todas as espécies de triatomíneos são potencialmente vetores do *T. cruzi*. No Brasil, os nomes vulgares dos triatomíneos são: barbeiro, bicho-de-parede, bicudo, borrachudo, cafote, chupa-pinto, chupança, chupão, fincão, furão, percevejo, percevejo de cama, percevejo-do-sertão, percevejão, piolho da piaçava, procotó, vum-vum e tampa-de-alforge (Develoux et al., 2009).

Os hemípteros, de uma maneira geral, são morfologicamente muito parecidos fazendo com que os triatomíneos hematófagos, vetores do *T. cruzi*, sejam facilmente confundidos com os fitófagos e predadores. Os triatomíneos medem, na fase adulta, cerca de 1,6 mm (*Alberprosenia*) a 44 mm (*Dipetologaster*). As fêmeas geralmente são maiores que os machos. A cor geral dos triatomíneos vai do negro ao palha-

claro, com uma combinação de manchas e desenhos variados, de cores negra, branca, castanho-claro e escuro, palha, vermelha ou laranja, muitas vezes características da espécie.

O *Triatoma infestans* (Figura 21), principal responsável pela transmissão da doença de Chagas, é encontrado nos países do cone sul – Brasil, Chile, Argentina, Uruguai, Paraguai e Bolívia. Esta espécie é extremamente domiciliada, vivendo em frestas nas paredes e em telhados de palha (Develoux et al., 2009). Durante o dia, o inseto mantém-se escondido e, à noite, sai para realizar o repasto sanguíneo.



**Figura 21:** Espécie *Triatoma infestans* (Develoux et al., 2009).

A classificação atual do *Triatominae* reconhece 140 espécies agrupadas em 6 tribos e dezoito gêneros. Duas espécies - *Rhodniini* e *Triatomini* - têm maior importância epidemiológica como vetor da doença de Chagas.

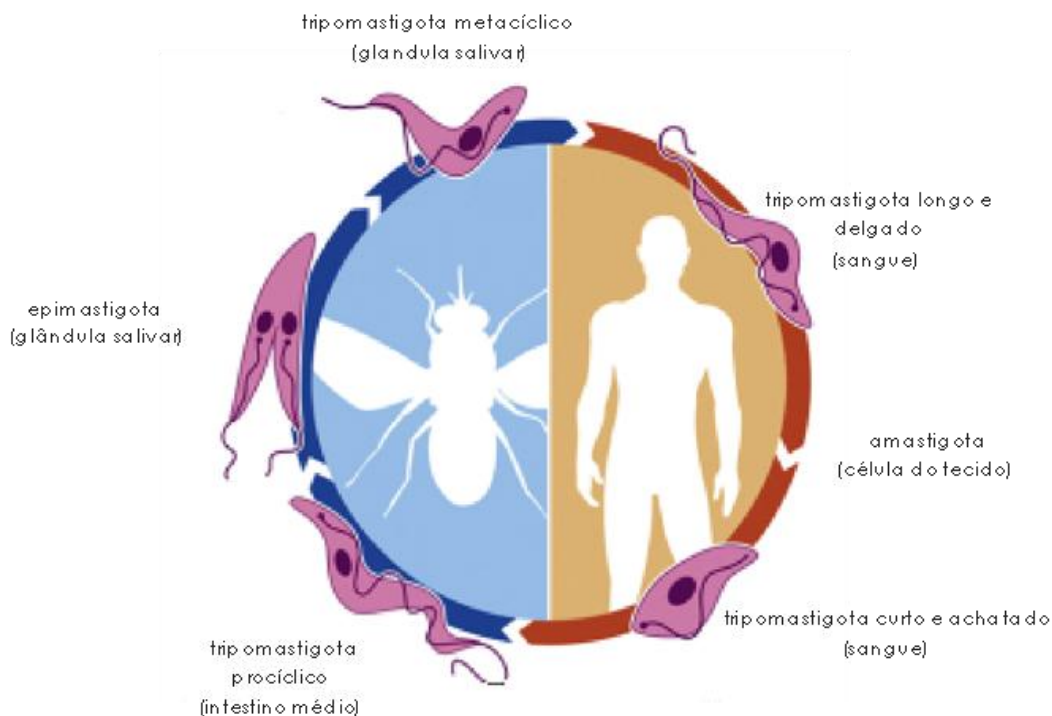
Na região amazônica, formada por nove países (Brasil, Peru, Colômbia, Bolívia, Venezuela, Equador, Guiana, Suriname e Guiana Francesa), das 25 espécies registradas, as encontradas em habitats domésticos são: *Triatoma maculata*, *Panstrongylus geniculatus*, *Rhodnius neglectus* e *R. stali*. Em outras áreas da Amazônia, as populações humanas mantêm contato com algumas das espécies silvestres, tais como *Rhodnius robustus*, *R. pictipes* e *R. brethesi*, aumentando assim o risco de transmissão de *T. cruzi* (Aguilar et al., 2007). No cone sul, o *T. infestans* é o principal vetor. Outros vetores podem ser: *Panstrongylus megistus*, *Triatoma sordida*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* e *Rhodnius nasutus* (Dias, 2007).

### 1.1.3.3. Ciclo de vida

O ciclo biológico do *T. cruzi* (Figura 22) no hospedeiro invertebrado tem início quando o sangue de animais infectados é ingerido durante o repasto sanguíneo. Ao chegar ao estômago do inseto, a forma tripomastigota se transforma gradualmente em formas arredondadas, algumas com um flagelo longo colado ao corpo e outras com um flagelo curto, chamadas de esferomastigotas e epimastigotas, respectivamente. Em seguida, os parasitos migram para o intestino, onde se multiplicam como formas epimastigotas, o que pode ser observado cerca de 20 horas após o repasto sanguíneo. Em seguida, migram para a parte mais posterior, atingindo o reto, e transformam-se em tripomastigotas, que serão eliminados junto com as fezes ou urina do triatomíneo (Andrade et al., 2000).

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado inicia-se quando formas tripomastigotas eliminadas nas fezes e urina do inseto vetor são inoculadas na pele ou mucosas do vertebrado. A forma tripomastigota pode potencialmente penetrar em quase todo tipo celular encontrado no local, exceto em neutrófilos e eosinófilos. Por sua vez, as formas epimastigotas são fagocitadas por células existentes no local. Logo após a penetração na célula, a forma tripomastigota pode ser encontrada dentro de um vacúolo chamado vacúolo parasitóforo (Andrade et al., 2000).

Imediatamente, inicia-se o processo de transformação para a forma amastigota. Após algum tempo, a forma amastigota encontra-se livre, em contato direto com várias estruturas citoplasmáticas da célula do hospedeiro. Cerca de 35 horas depois, inicia-se o processo de divisão celular binária que prossegue por vários dias, dependendo das características da cepa de *T. cruzi* e da célula hospedeira. O tempo de geração é em torno de 14 horas. Após cinco dias, quando a célula hospedeira contém aproximadamente 500 amastigotas, inicia-se um processo quase que sincrônico de transformação das formas amastigotas em tripomastigotas, passando por um estágio intermediário. Logo que as formas adquirem um flagelo mais longo, começa um movimento intenso, que, aparentemente, é o responsável pela ruptura da célula hospedeira, com liberação de muitos tripomastigotas e amastigotas no espaço intercelular. Os dados disponíveis sugerem que todas essas formas têm capacidade de infectar outras células no próprio ambiente onde foram liberadas, ou atingir a corrente sanguínea e distribuir-se por todo organismo (Andrade et al., 2000).



**Figura 22:** Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Representação esquemática adaptada (Cuervo et al., 2010).

A transmissão vetorial da doença vem sofrendo algumas alterações: *Triatominae* silvestres com tendências sinantrópicas têm, cada vez mais, entrado em contato com seres humanos (Noireau et al., 2009). Além disso, microepidemias recentemente registradas no Brasil, causadas pela ingestão de alimentos contaminados com o protozoário, preocupam as autoridades de saúde, uma vez que a sua transmissão por via oral é caracterizada por sua grande severidade que culmina, em muitos casos, na morte rápida do paciente. Um desses casos ocorreu, em 2005, no Estado de Santa Catarina devido à ingestão de caldo de cana contaminado e, em 2006, no norte do país devido à ingestão de sucos de açaí (*Euterpe oleracea*) e bacaba (*Oenocarpus bacaba*) contaminados (Yoshida, 2008).

#### 1.1.3.4. Tratamento

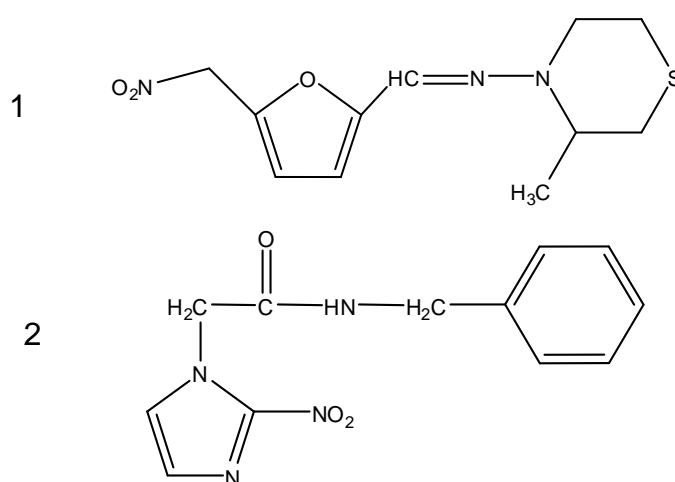
Dois fármacos são usados para o tratamento: nifurtimox e benznidazol (Figura 23), com eficácia terapêutica semelhante, mas a sensibilidade pode variar entre as cepas de *T. cruzi*. O nifurtimox, comercializado desde 1972, foi o primeiro fármaco

utilizado na doença de Chagas e tem sido fornecido pela OMS (WHO). Os efeitos colaterais deste fármaco incluem anorexia, perda de peso, alterações psíquicas, insônia, náusea, vômitos, cólicas, diarréias, perda de memória, entre outros (Urbina & Docampo, 2003), e neuropatia periférica dose-dependente.

Em abril de 2009, a OMS incluiu a combinação de eflornitina e nifurtimox em sua lista de medicamentos essenciais para melhorar a gestão de casos de tripanossomíase africana humana. Os ensaios clínicos confirmaram que a combinação dos medicamentos reduz a duração do tratamento em comparação com a monoterapia de eflornitina e é mais fácil de administrar, mantendo o mesmo nível de eficácia e segurança.

O benznidazol foi anunciado em 1974 e lançado na América Latina em 1978. O Laboratório Roche transferiu a produção deste medicamento para seu laboratório no Brasil, que atualmente assume o mercado local. Os efeitos colaterais são dermatite, vômitos e dores abdominais, polineurite, hepatite tóxica, anorexia, fadiga, dores de cabeça, mialgia e insônia (Urbina & Docampo, 2003), dermatite alérgica secundária que pode ser acompanhada de outros sinais gerais, como aplasia. O benznidazol é melhor tolerado que o nifurtimox (Urbina & Docampo, 2003).

Esses dois medicamentos apresentam atividade contra todas as formas do parasito, principalmente na fase aguda da doença, com até 80% de cura em pacientes tratados (Sanchez-Sancho et al., 2009).



**Figura 23:** Estruturas químicas do (1) nifurtimox e (2) benznidazol

Quando o tratamento é feito durante a fase aguda, há chances de cura que variam entre 60-70%. Um estudo mostrou que em adultos, o tratamento com

benznidazol reduz o risco de progressão do dano cardíaco e aumenta a porcentagem de reversão sorológica sem os efeitos secundários graves observados (Viotti et al., 2006).

Novas substâncias estão sendo desenvolvidas e algumas se revelaram eficazes em infecções experimentais em animais. Este é o caso de azóis de quarta geração, como o posaconazol, que é o produto mais promissor atualmente (Molina et al., 2000).

#### 1.1.4. Fungos

Os fungos são organismos eucarióticos com características semelhantes às das células hospedeiras, o que torna difícil a elaboração de estratégias terapêuticas específicas (Schaechter, 2002). Possuem parede celular rígida que determina a forma e garante a integridade da célula protegendo-a de choques osmóticos, sendo composta por várias camadas de quitina dentro de uma matriz de polissacarídeos complexos, glicoproteínas, sais inorgânicos e pigmentos, que variam de acordo com a espécie (Schaechter, 2002).

As infecções fúngicas podem ser divididas em três grupos principais: infecções superficiais, como as dermatofitoses e candidíase superficial; subcutâneas, como as esporotricoses e lobomicoses; e sistêmicas, como a criptococose e a candidíase (Hay, 2006).

As infecções sistêmicas podem ser divididas em infecções oportunistas e endêmicas. As oportunistas são infecções debilitantes e potencialmente fatais, que afetam pessoas com sistema imunológico comprometido, como por exemplo, pacientes com neutropenia, ou HIV positivo, ou em uso de implante subcutâneo (Hay, 2006). A candidíase oral atinge cerca de 90% dos pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Reichart, 2003).

O uso indiscriminado de antibióticos de largo espectro, a quimioterapia, e o transplante aumenta ainda mais o risco de infecções fúngicas (Nucci & Marr, 2005).

As espécies de *Candida* ssp. e *Cryptococcus* ssp. causaram grande parte das infecções fúngicas registradas entre os anos de 1997 a 2003. Pfaller et al. (2005) isolaram 14.767 fungos de pacientes, neste período. As espécies *C. albicans* e *C.*



*glabrata*, estavam presentes em 95,7% dos casos e as espécies de *Cryptococcus* em 1,37% dos casos.

#### 1.1.4.1. Cryptococccose

*Cryptococcus neoformans* é uma levedura patogênica oportunista encontrada em ocos de árvores (Kidd et al., 2005) e excretas de pombos e outros pássaros. Estas excretas constituem fator importante na transmissão de *C. neoformans* tanto em área urbana quanto em zona rural (Reolon et al., 2004).

A infecção por *C. neoformans* ocorre por meio da inalação de partículas infecciosas (leveduras ou basidiósporos) a partir do ambiente, primariamente causando infecção no pulmão, que pode se disseminar para outros órgãos e tecidos, principalmente para o sistema nervoso central, onde pode causar quadros de meningite, meningoencefalite ou encefalite e em casos severos até a morte (Chayakulkeeree & Perfect, 2006).

Tradicionalmente, o gênero *Cryptococcus* é caracterizado por se tratar de células do tipo leveduras arredondadas ou ovais envoltas por cápsulas (Benham, 1955). Independentemente do sistema de classificação, os membros da espécie *C. neoformans* que são patogênicos ao homem incluem duas variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A e D) e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C). *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* foi classificada como uma espécie distinta, e os sorotipos A e D foram separados em duas variedades: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) e *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) (Kwon-Chung et al., 2002, Kwon-Chung & Varma, 2006).

Esporos ou células da espécie *C. neoformans* entram no trato respiratório por inalação e passam a colonizar o sistema respiratório por meses ou anos sem causar quaisquer sintomas clínicos (Goldman et al., 2001). No entanto, pode ser que ocorra a criptococose aguda, doença que se desenvolve após a exposição a um grande número de células fúngicas (Nosanchuk et al., 2000).

Normalmente, as células fúngicas se encontram dentro de granulomas, onde podem permanecer em estado latente por tempo indeterminado. Quando a imunidade do hospedeiro fica comprometida, no entanto, as células são reativadas podendo causar infecções sistêmicas que afetam órgãos como a pele, olhos, ossos,

pulmões, próstata e trato urinário (Goldman et al., 2001; Igreja et al., 2004). *C. neoformans* tem uma predileção para infectar o sistema nervoso central (SNC) e causar meningite criptocócica, principalmente em pacientes imunocomprometidos.

As manifestações clínicas da criptococose incluem desde um simples nódulo no pulmão até a disseminação sistêmica do micro-organismo. Essa variedade depende do estado e da resposta imune do hospedeiro, bem como da virulência da cepa. A criptococose pulmonar está comumente associada a pacientes imunocompetentes (Chayakulkeeree & Perfect, 2006), ao contrário da meningite criptocócica que está diretamente associada a pacientes com AIDS ou com depressão do sistema imune devido ao tratamento com corticóides, falência crônica dos órgãos (rins, fígado e pulmões), transplante de órgãos, doenças reumáticas, outras infecções fúngicas, terapias imunossupressivas e desordens linfoproliferativas (Thompson, 2005).

A síndrome da criptococose cutânea corresponde à terceira forma mais comum da doença causada por *C. neoformans*. É uma forma encontrada em 10 a 15% dos pacientes com criptococose, sendo a cabeça e o pescoço os locais mais atingidos. Em pacientes imunocomprometidos, a forma cutânea da doença é ocasionada pela espécie *C. gattii* (Bicanic & Harrison, 2005).

Da Silva et al. (2008) relataram a existência de cepas de *C. neoformans* resistentes aos antifúngicos itraconazol e anfotericina B. Drummond et al. (2007) mostraram que os isolados clínicos de *Cryptococcus* são mais suscetíveis aos antifúngicos do que os isolados do ambiente.

A grande incidência de criptococose em decorrência do aumento crescente de indivíduos imunodeprimidos, sua descoberta em indivíduos competentes e os efeitos colaterais dos fármacos utilizados para o tratamento desta infecção, têm incentivado a pesquisa de novos agentes antifúngicos (Lizarazo et al., 2007).

#### 1.1.4.2. Candidíase

Em 1839, Langenbeck observou pela primeira vez em aftas bucais de um paciente com tifo a mais importante levedura patogênica ao homem, hoje conhecida como *Candida albicans*. Essa espécie, junto a outras deste gênero, são as causadores da candidíase ou candidose (Sidrim & Moreira, 1999).

O gênero *Candida* pertence ao Reino Fungi, grupo *Eumycota*, filo *Deuteromycota*, classe *Blastomycetes* e à família Criptococcacea. As principais espécies de interesse clínico neste gênero são *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (Sidrim & Rocha, 2004). A *Candida* é uma levedura dimórfica, considerada um patógeno oportunista, que depende de fatores próprios de virulência e de predisposição do hospedeiro para causar a infecção. As leveduras do gênero *Candida* estão presentes no intestino e na vagina, e permanecem neste habitat como colonizadoras. Quando encontram condições apropriadas, elas se multiplicam, expõem os fatores de virulência, invadem a mucosa e causam a infecção. As candidíases apresentam uma grande variedade de manifestações clínicas, as quais podem ser divididas em candidíase muco-cutânea, caracterizada pelo surgimento de lesões de pele, unhas e mucosas da orofaringe e genitais; candidíase sistêmica ou visceral, caracterizada pela disseminação do micro-organismo por via sanguínea para outros órgãos; e, candidíase alérgica, com lesões semelhantes às dermatofitoses (Sidrim & Rocha, 2004).

Para realizar a colonização e invasão nos tecidos e evitar mecanismos de defesa do hospedeiro, a espécie *C. albicans* desenvolveu uma série de complexos fatores de virulência (Schaller et al., 2005). Esses incluem a troca fenotípica com habilidade de mudar a morfologia da célula, ou seja, de levedura para crescimento de hifas; habilidade de adesão à célula hospedeira; e atividade lipolítica e proteolítica extracelular (Naglik et al., 2004).

Observa-se uma mudança do perfil epidemiológico das candidíases, com o aumento de espécies de *Candida* não-*albicans*. Develoux & Bretagne (2005) mostraram que espécies de *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* são comumente isoladas do ambiente e de hospedeiros humanos e muito frequentemente apresentam resistência aos antifúngicos usuais.

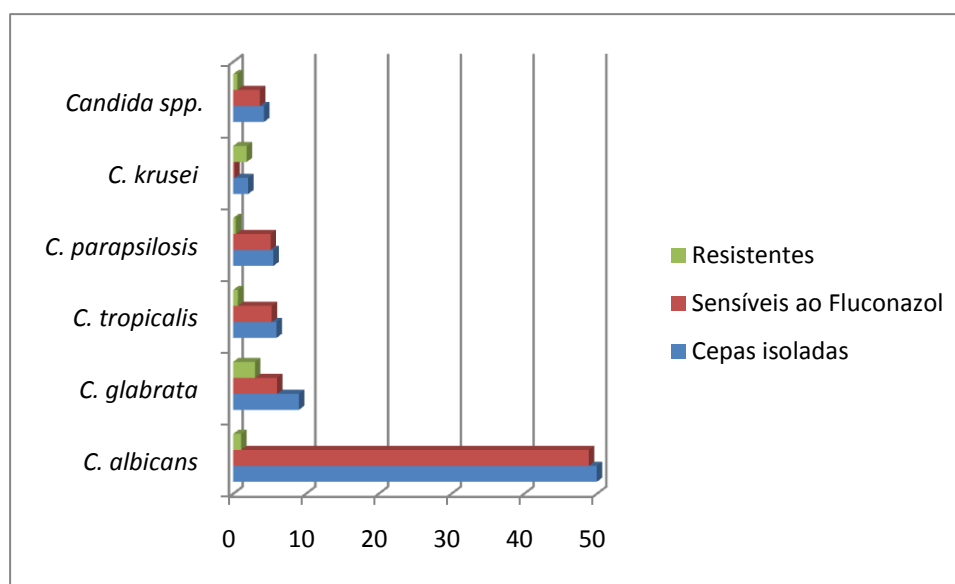
A espécie *C. parapsilosis* é encontrada com frequência na pele, sendo de transmissão predominantemente exógena (Bonassoli et al., 2005). Sua ocorrência também é alta em crianças e recém-nascidos prematuros internados em unidades de terapia intensiva. Os fatores de risco associados a sua transmissão são a nutrição parenteral e o uso prolongado de catéteres (San Miguel et al., 2005). *C. glabrata* constitui-se a quarta causa de infecção hospitalar fúngica por leveduras no Brasil, embora seja relatada com menor frequência em nosso país do que na Europa ou nos Estados Unidos e Canadá (Antunes et al., 2004; Pfaller & Diekema, 2007).

Além disso, esta espécie desenvolve resistência à terapêutica pelo fluconazol (Colombo & Guimarães, 2003; Pfaller & Diekema, 2007).

As infecções sistêmicas por *Candida* levam à prolongada internação hospitalar, a custos significativos e à alta mortalidade (Falagas et al., 2006). O diagnóstico rápido é fundamental para aumentar a probabilidade de sobrevivência (Morrel et al., 2005). *C. glabrata* é mais resistente que *C. albicans* à terapia antifúngica e pode estar associada a uma alta mortalidade.

#### 1.1.4.3. Tratamento

O aumento do número de infecções fúngicas, juntamente com o surgimento de cepas resistentes aos antifúngicos existentes (Pfaller et al., 2005) (Gráfico 3) têm criado uma necessidade de novos agentes antifúngicos (Kauffman, 2006).



**Gráfico 3:** Dados obtidos de um estudo de Pfaller et al. (2005), onde foram isoladas cepas de 35 países. Os valores estão expressos (x 1000).

Por muitos anos, o único antifúngico disponível para infecções foi o deoxicolato de anfotericina B (Pappas et al., 2004). Porém, com a introdução dos triazóis, nos anos 1990, o uso da anfotericina B tem diminuído devido sua toxicidade e por não ser adequado ao tratamento domiciliar (Maertens & Boogaerts, 2005). Os

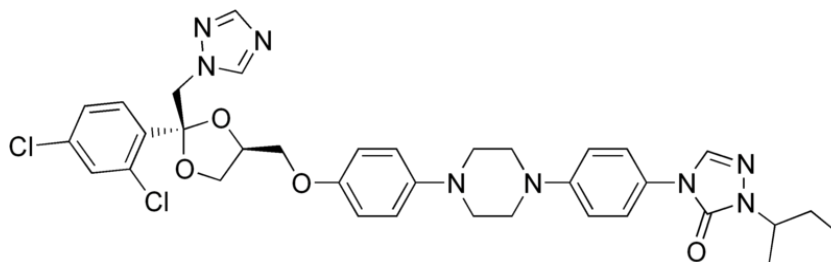
triazóis por sua vez estão frequentemente ligados a interações medicamentosas, principalmente no caso dos pacientes que recebem quimioterapia anti-HIV.

Nos últimos anos, seis novos triazóis e equinocandinas foram aprovados para uso, apresentando menor toxicidade e maior efetividade (Petrikos & Skiada, 2007). Os novos triazóis voriconazol, posaconazol, que é usado também para a doença de Chagas (Molina et al., 2000) e ravuconazol apresentam maior potência e espectro de ação mais amplo do que os antigos azóis. Os três compostos apresentam ação via oral (VO) e o voriconazol pode ser administrado, também, na forma intravenosa (IV) (Tkacz & Di Domenico, 2001).

Nos últimos anos, os azóis - principalmente o cetoconazol, fluconazol e itraconazol - têm sido os fármacos de primeira escolha na terapia. Essas duas classes de medicamentos têm como alvo a membrana celular dos fungos. Os polienos se ligam a uma porção esterol, basicamente ergosterol, presente na membrana de fungos sensíveis, formando poros ou canais.

Os azóis são compostos totalmente sintéticos. O mecanismo de ação desses fármacos baseia-se na inibição da enzima esterol-14- $\alpha$ -desmetilase, um sistema enzimático microsomal dependente do citocromo P450, prejudicando a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática e levando ao acúmulo de 14- $\alpha$ -metilesteróis. Esses metilesteróis não possuem a mesma forma e propriedades físicas que o ergosterol e levam à formação da membrana com propriedades alteradas que não desempenham as funções básicas necessárias ao desenvolvimento do fungo. Os azóis causam menos reações adversas que a anfotericina B, porém, são menos potentes. Podem ter ação fungistática ou fungicida. O uso excessivo desses azóis levou ao aparecimento de resistência em espécies suscetíveis. Além disso, os azóis ainda apresentam a desvantagem da resistência cruzada (Williams & Lemke, 2002).

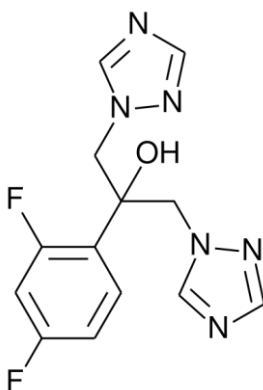
O itraconazol (Figura 24) tem atividade em leveduras e alguns fungos filamentosos, inclusive *Aspergillus*. As desvantagens desse medicamento são as variáveis biodisponibilidades, havendo uma grande variação do pico plasmático entre diferentes pessoas, e o gosto desagradável (Chen & Sorrell, 2007).



**Figura 24:** Estrutura química do itraconazol.

O uso prolongado e as altas doses de itraconazol podem provocar hipopotassemia, hipertensão moderada (Catalan & Montejo, 2006) e falência cardíaca, necessitando de acompanhamento (Eggimann et al., 2003).

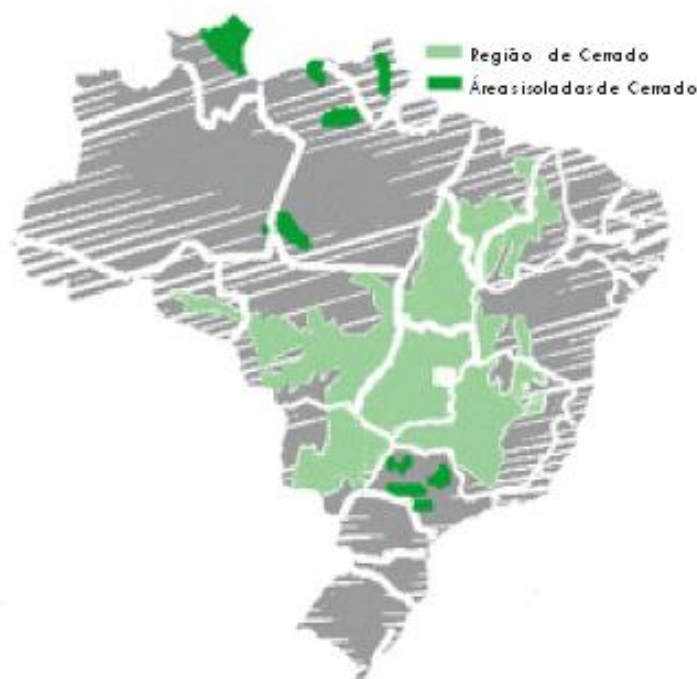
O fluconazol (Figura 25), outro derivado imidazólico, possui excelente tolerabilidade e o limitado número de interações medicamentosas o torna agente de primeira escolha para quase todos os casos de candidíase em pacientes imunocomprometidos (Eggimann et al., 2003). O fluconazol está disponível na formulação oral e intravenosa, com atividade em espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans*, porém com casos de resistência em certas espécies de *Candida não-albicans* (Chen & Sorrell, 2007).



**Figura 25:** Estrutura química do fluconazol.

Hoje têm surgido algumas cepas resistentes aos fármacos de primeira escolha, com isso muitos outros antifúngicos estão sendo utilizados, entre eles os triazóis de segunda geração (variconazol e posaconazol), as equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina) e a flucitosina (uso limitado devido às falhas terapêuticas) (Petrikos & Skiada, 2007).





**Figura 27:** Abrangência do Cerrado no território brasileiro (IBGE, 2004).

A precipitação média anual varia entre 1200 e 1800 mm e caracteriza uma estação seca, de abril a setembro e uma chuvosa, de outubro a março (Ferreira et al., 2003), com temperaturas variando entre 18-28 °C (Dias, 1992). O relevo do domínio Cerrado é, em geral, bastante plano ou com poucas ondulações, com altitudes entre 300 e 600 metros acima do nível do mar; apenas cerca de 10% de sua área estão acima de 900 metros de altitude chegando a 1800 m, no Pico do Itacolomi, em Minas Gerais, e na chapada dos Veadeiros, em Goiás (Coutinho, 2002). As diversas fitofisionomias variam desde campos abertos, matas de galeria, matas secas, cerradão e vereda, até florestas densas, com árvores de 30 m de altura (Oliveira-Filho & Ratter, 2002). Uma paisagem típica do Cerrado são as árvores e os arbustos tortuosos, de porte baixo e com casca grossa, com muita cortiça, macrofilia (folhas grandes) e esclerofilia (folhas rígidas, com textura áspera). Seu sistema subterrâneo é composto por raízes pivotantes que podem atingir mais de 15 m de profundidade, buscando, no período de seca, as zonas permanentemente úmidas do solo. A vegetação herbácea e subarborescente é composta também por espécies perenes que possuem órgãos subterrâneos de resistência à seca e ao fogo (bulbos e xilópódios, por exemplo). Suas raízes são superficiais e seus ramos aéreos são anuais, morrendo durante a estação seca, o



que gera toneladas de palha por hectare. Essa palha é o combustível que favorece a ocorrência e alastramento das queimadas no Cerrado (Coutinho, 2002) (Figura 28).



**Figura 28:** Queimadas na região de Sobradinho / DF, ocorrência bastante comum na época da seca (www.g1.globo.com).

Foram registradas mais de 10 mil espécies de plantas no Cerrado (Ratter, 1997), onde muitas têm ocorrência restrita ao bioma. Apesar da importância desse bioma, suas áreas nativas vêm diminuindo em decorrência da falta de planejamento no uso da terra (Klink & Machado, 2005). Apenas 2% do Cerrado estão dentro de área protegida (Klink & Machado, 2005). Devido ao seu alto endemismo e forte pressão humana, o Cerrado é considerado um dos pontos críticos para a conservação da biodiversidade no mundo (Myers et al., 2000).

A diversidade deve-se às variações ambientais, principalmente em relação aos fatores peculiares do Cerrado, como a proximidade do lençol freático, à variação topográfica, à altitude e ao regime do fogo (Ratter et al., 2003).

### 1.2.2. Plantas medicinais do Cerrado

De acordo com a OMS, cerca de 80% da população mundial faz uso de tratamentos sugeridos pela medicina tradicional (Basso et al., 2005).

O fruto da espécie do Cerrado, *Dimorphandra mollis* (Fabaceae), conhecido como faveira, é uma das fontes da rutina, flavonóide que compõe medicamentos que combatem a fragilidade capilar. A infusão das folhas de mangaba, *Hancornia speciosa* (Apocinaceae) é utilizada no tratamento da tuberculose e de úlceras e o chá das folhas para cólica menstrual. A espécie *Guarea kunthiana* (de Mesquita et al., 2005a) apresentou importante atividade para as formas promastigotas de *Leishmania donovani* com IC<sub>50</sub> de 10 µg/mL.

Em nosso grupo de pesquisa, o estudo do extrato hexânico da casca da raiz de *Matayba guianensis* em *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina culminou no isolamento de quatro matayosídeos ativos inéditos (de Mesquita et al., 2005b; de Mesquita et al., 2007).

As espécies *Xylopia aromatica* e *X. emarginata* (Annonaceae) tiveram excelentes resultados quando testadas em *P. falciparum* (de Mesquita et al., 2007). Os extratos hexânicos e diclorometano das folhas de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) demonstraram atividade citotóxica em células tumorais (de Mesquita et al., 2009). Estudos *in vitro* e *in vivo* reportaram atividades antibacteriana, antifúngica, cicatrizante e antileishmanial de *S. terebinthifolius* (Lucena et al., 2006; Braga et al., 2007).

As espécies do Cerrado, *Cupania vernalis*, conhecida como olho de cotia e utilizada como anti-inflamatório; e *Serjania lethalis* conhecida como timbó e usada como analgésico e anti-inflamatório demonstraram acentuada atividade anti-*Plasmodium* e anti-*Leishmania* (de Mesquita et al., 2007). Além dessas, outras espécies do Cerrado, usadas tradicionalmente para tratar a malária ou como antipiréticos são descritas pela importante atividade anti-*Plasmodium*, como *Aspidosperma* spp., *Annona squamosa* (El Tahir et al., 1999), *Casearia elliptica* (Simonsen et al., 2001), *Duguetia hadrantha* e *Xylopia frutescens* (Jenett-Siems et al., 1999).

Os extratos diclorometânicos de raízes de *Brosimum gaudichaudii* e *Lantana camara* foram capazes de inibir o fungo fitopatogênico *Cladosporium sphaerospermum*. Essa primeira espécie é amplamente utilizada no Brasil para o tratamento do vitiligo (DEF, 2000), atividade atribuída à presença das furanocumarinas, bergapteno e psolareno (Alves et al., 2000).

Fisher et al. (2004) mostraram que as espécies do Cerrado, *Cissampelos ovalifolia* e *Siparuna guianensis* utilizadas na medicina tradicional para o tratamento

de febres e como antimaláricos (Rodrigues & Carvalho, 2001) foram ativas em *P. falciparum*, corroborando o uso tradicional. Da infusão de folhas de *Byrsonima crassa*, utilizada tradicionalmente como febrífuga e para o tratamento de doenças de pele (Funke & Melzig, 2006) foram isolados compostos com atividades biológicas, como imunomodulação, proteção contra o câncer e doenças cardiovasculares (Montouro et al., 2005).

Este trabalho de tese de doutorado selecionou oito espécies de plantas do Cerrado após triagem em cepas de *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina (FcB1), que serão descritas a seguir:

### 1.2.3. *Diospyros hispida*

#### **Nome científico**

*Diospyros hispida* DC (Figura 29)

#### **Família**

Ebenaceae

#### **Nome popular**

Caqui-do-cerrado, bacupari-bravo, olho-de-boi e mucuíba

#### **Descrição botânica**

Árvore ou arbusto de tronco tortuoso, com casca escamosa e fissurada, galhos acinzentados e tronco enegrecido, com copa irregular e aberta. As folhas são simples, coriácea, verde escuro quando jovem e ferrugínea a marrom, quando mais velha, densamente pubescente (coberta de pequenos pêlos) e esbranquiçadas no dorso. As flores são subsésseis, dióicas, esverdeadas na corola externa, com pétalas de coloração creme.

#### **Uso na medicina tradicional**

Esta espécie tem sido usada por comunidades do Cerrado para o tratamento de doenças infecciosas.



**Figura 29:** *Diospyros hispida* DC (Ebenaceae).

### **Atividade biológica**

A família Ebenaceae tem mais de 350 espécies espalhadas nos trópicos e subtropicais. Mais de 300 compostos já foram identificados no gênero *Diospyros*, rico em naftoquinonas e triterpenos. O primeiro composto isolado deste gênero, em 1952, foi a plumbagina, uma naftoquinona encontrada principalmente nas folhas de plantas desse gênero. A plumbagina (2-metil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona), pigmento de coloração amarela foi encontrada na espécie *D. maritima* (Van der Vijver, 1972).

Gu et al. (2004) mostraram que a plumbagina apresentou forte atividade antibacteriana e antifúngica. Outros compostos foram isolados a partir desta espécie como a maritina, a chitranona, a zeylanona e a 8-di-hidroxi-6-metil-1-tetralona.

O estudo do extrato clorofórmico dos galhos de *Diospyros discolor* permitiu o isolamento de 4 novos triterpenos desta espécie: 24-etil-3 $\beta$ -metoxilano-9-(11)-en-25-ol, 3 $\beta$ -metoxi-24-metilelano-9-(11)-en-25-ol, 3 $\beta$ -metoxi-25-metil-24-metilelano-9-(11)-en-21-ol, 3 $\beta$ -metoxi-24-metilelano-9-(11), 25-dien-24-ol (Ganapaty et al., 2005, Chen et al., 2007).

O estudo do extrato diclorometânico da casca do caule de *Diospyros crassiflora* (Tangmouo et al., 2006) permitiu isolar uma naftoquinona, a crassiflorona, além do gerberiol. A atividade antimicrobiana desses compostos foi avaliada e foram considerados ativos em *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Candida albicans* e *C. krusei*.

A investigação do extrato clorofórmico das raízes de *Diospyros assimilis* permitiu isolar seis derivados naftalenos: 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-2-naftaldeído, 4-hidroxi-5-metoxi-2-naftaldeído, 5-hidroxi-4-metoxi-2-naftaldeído, 8'-hidroxiisodiospirina, diospirina e plumbagina. Esses compostos foram testados em protozoários *Trypanosoma* sp., *Leishmania* sp. e *Plasmodium* sp. As quinonas diméricas, 8'-hidroxisodiospirina e diospirina mostraram acentuada atividade em *Trypanosoma brucei* e *Leishmania donovani*, moderada atividade em *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina e à pirimetamina, e baixa atividade em *T. cruzi* (Ganapaty et al., 2006).

As frações lipofílicas da raiz e do caule de *Diospyros anisandra* apresentaram concentração inibitória mínima (CIM) de 6,25 µg/mL em *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Clostridium gloeosporioides*. O estudo do extrato hexânico da mesma espécie, resultou no isolamento da plumbagina (Borges-Argáes, 2007). O extrato metanólico da espécie inibiu cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* a uma concentração de 25 µg/mL.

#### 1.2.4. *Simarouba versicolor*

##### **Nome científico**

*Simarouba versicolor* A. St.-Hil (Figura 30)

##### **Família**

Simaroubaceae

##### **Nome popular**

Pau-paraíba, mata-barata

##### **Descrição botânica**

Árvore pequena, 4-5 metros de altura, ramos densamente folhosos; folhas coriáceas glabras, de 15-20 cm de comprimento, imparipinadas; folíolos oblongos, até 6 cm de comprimento, quase sempre alternos, às vezes opostos, 5-6 cm de comprimento, 20-25 cm de largura; ápice obtuso, sub-truncado ou emarginado, ferrugineo-pilosa em baixo; panícula de 30-50 cm de comprimento; ramos eretos,

patentes, compostos-paniculados, ramos com 3-5 flores; brácteas oblongas ou linear-espatuladas; pedicelos de 2-4 mm, cálice com apenas 1 mm de comprimento; pétalas oblongas 3, 5-4 mm de comprimento, dorso carenado.

### Uso na medicina tradicional

A decocção da raiz e da casca do caule é utilizada para tratar a fraqueza (Mendes & Carlini, 2007). A casca do caule e os frutos são usados como anti-helmíntico, anti-hemorrágico, antidiarréico, antissifilítico, antifebrífugo (Fernandes et al., 2004).



**Figura 30:** *Simarouba versicolor* A. St.-Hil (Simaroubaceae)

### Atividade biológica

A família Simaroubaceae, com suas 25 espécies de arbustos tropicais e semitropicais, tem sido muito usada na medicina tradicional. Os efeitos encontrados nas espécies desta família são as atividades antimaláricas e anti-inflamatórias (Polonsky, 1973). No Brasil, a família Simaroubaceae é representada pelos gêneros *Quassia* e *Picrolemma* na região Amazônica; *Castela* e *Picrasma* no sul do país; e *Simaba*, *Simarouba* e *Picrolemma* presentes em todo o Brasil. Espécies do gênero *Simarouba* são relatadas como anticancerígenas, antivirais, antimaláricas, anti-inflamatórias (Polonsky, 1973), inseticidas e amebicidas (Polonsky, 1985). Arriaga et al. (2002) isolaram vários compostos como quassinóides, triterpenóides, mistura de esteróides e o flavonóide campferol, entre outros das raízes, caules e frutos de *S. versicolor*.

### 1.2.5. *Spiranthera odoratissima*

#### **Nome científico**

*Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil (Figura 31)

#### **Família**

Rutaceae

#### **Nome popular**

Acabadeira ou sarrinha (Bahia) e manacá (Mato Grosso e Goiás).

#### **Descrição botânica**

Planta arbustiva com odor bem característico, cachos de flores brancas bastante perfumadas, e folhas com odor cítrico.

#### **Uso na medicina tradicional**

Folhas e caules subterrâneos utilizados na forma de decocto no vinho ou na cachaça, para o tratamento de reumatismo, gota, infecções renais e inflamações em geral, tendo ainda ação diurética e depurativa. As informações tradicionais relatam que seu consumo em excesso pode provocar coceiras, diarreia e vômito (de La Cruz et al., 1997).



**Figura 31:** *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil (Rutaceae).

### Atividade biológica

A família Rutaceae, que tem cerca de 1600 espécies com composição química bastante diversificada, é capaz de produzir grande variedade de alcaloides, além de cumarinas, lignanas, flavonóides e terpenóides, inclusive do tipo limonóides.

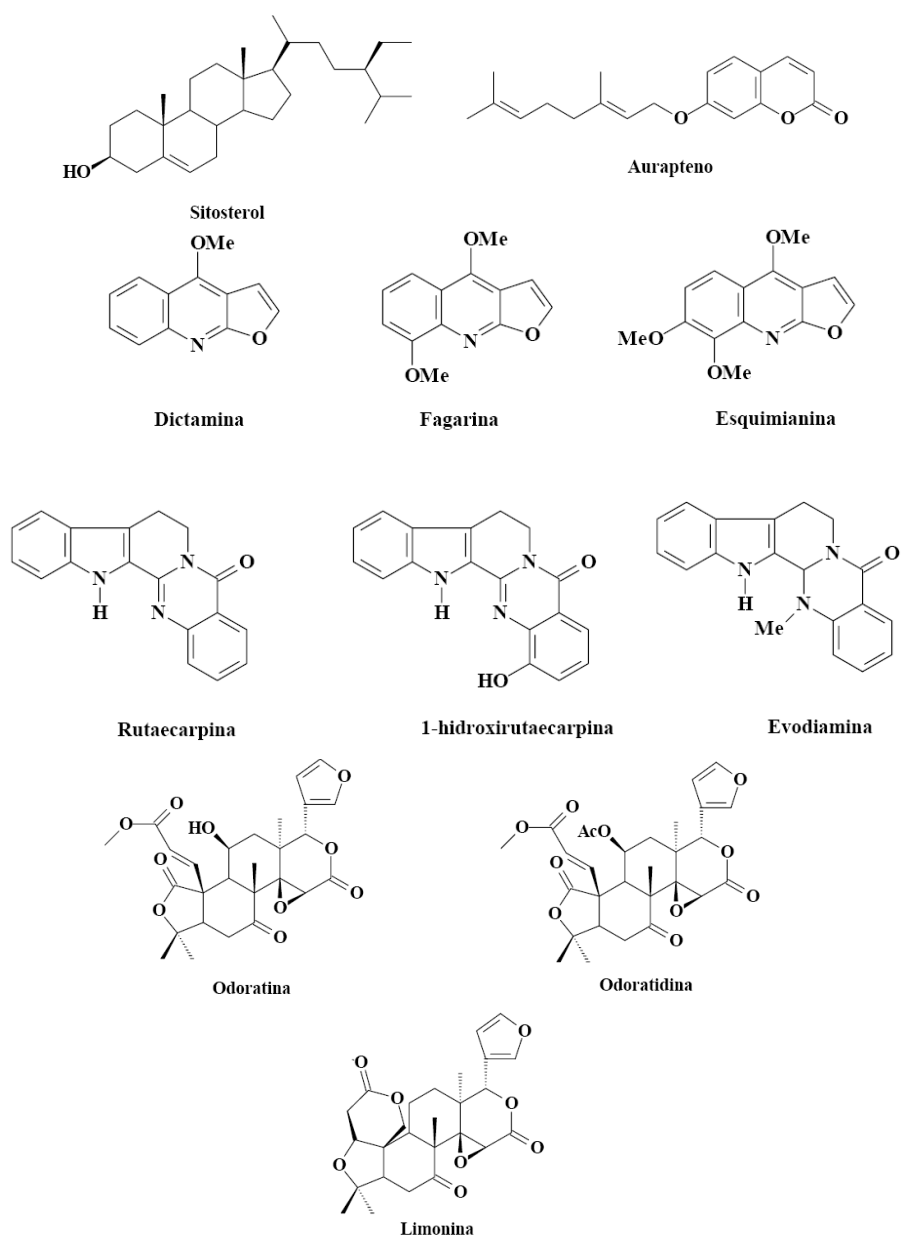
O gênero *Spiranthera* é constituído por árvores ou arbustos encontrados na região neotropical (região amazônica, cerrado e campos do Brasil) com 4 espécies descritas: *S. guianensis* Sandwinth, *S. parviflora* Sandwinth, *S. muricata* Pirani e *S. odoratissima* St. Hil. (Pirani, 1999).

Ribeiro et al. (2005) isolaram onze substâncias do extrato diclorometânico das raízes de *Spiranthera odoratissima*, sendo, dois novos limonoides, e o conhecido limonoide limonina, três alcaloides furoquinolínicos (dictamina,  $\gamma$ -fagarina e esquimianina), três alcaloides  $\beta$ -indoloquinazolínicos (rutaecarpina, evodiamina e 1-hidroxitrutaecarpina), a cumarina do tipo aurapteno e o esteróide  $\beta$ -sitosterol.

O estudo do extrato hexânico das folhas e diclorometânico dos rizomas de *S. odoratissima* (de Jesus Freitas et al., 2003) (Figura 32) identificou monoterpenos do tipo pineno, canfeno, limoneno, mirceno, sesquiterpenos copaeno, germacreno B e D, cariofileno e óxido de cariofileno spatulenol. Os constituintes isolados das raízes foram: aurapteno (Agrawal et al., 1989), ostol (Ito & Furukawa, 1987), braylin (Silva et al., 1971), alcaloides furoquinolínicos skimmianina (Rouffiac et al., 1969) e  $\gamma$ -fagarina (Tillequin et al., 1980).

Matos et al. (2003 e 2005) avaliaram a atividade analgésica e/ou anti-inflamatória da fração aquosa proveniente da partição do extrato etanólico das folhas e das raízes de *S. odoratissima*. O resultado do estudo com o extrato etanólico das raízes mostrou que em uma concentração de 0,25 g/kg houve diminuições significativas nas contrações abdominais induzidas pelo ácido acético, corroborando o uso tradicional desta parte da planta. O extrato etanólico das folhas apresentou uma baixa atividade, sendo que a concentração capaz de inibir cerca de 50% das contrações abdominais foi de 500 g/kg.





**Figura 32:** Moléculas isoladas de *S. odoratissima* (Ribeiro et al., 2005).

Terezan et al. (2010) isolaram desta espécie os compostos 1-metil-2-fenilquinolin-4-ona e o ácido limonéxico. Esse mesmo grupo mostrou que o extrato metanólico e diclorometânico dos galhos desta espécie apresentaram atividade inseticida em formigas da espécie *Atta sexdens rubropilosam*, sendo que o ácido limonéxico mostrou-se ativo na concentração de 500 µg/mL.

### 1.2.6. *Kielmeyera coriacea*

#### **Nome científico**

*Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. (Figura 33)

#### **Família**

Calophyllaceae

#### **Nome popular**

Pau-santo

#### **Descrição botânica**

Arbusto pequeno de tronco tortuoso e casca suberosa, espessa, clara, tuberculosa nas árvores velhas, ramos espessos, glabros, látex abundante e amarelado. As folhas são simples, alternas, congestas no ápice dos ramos, coriáceas, glabras, oblanceoladas ou elípticas, sésseis ou subsésseis, base aguda a atenuada, ápice arredondado a obtuso, cerca de 5 cm de largura. As flores são grandes, em panículas terminais curtas e os frutos são em forma de cápsula septicida oblonga, cerca de 15 cm de comprimento.



**Figura 33:** *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. (Calophyllaceae).

### **Uso na medicina tradicional**

Utilizada no Brasil para o tratamento de malária, esquistossomose, leishmaniose, e para infecções causadas por fungos ou bactérias (Audi et al., 2002; Zagoto et al., 2006) e também em preparações com ação no sistema nervoso central (Rodrigues & Carlini 2005).

### **Atividade biológica**

O extrato hidroalcoólico de *K. coriacea* é capaz de aumentar a resistência da mucosa gástrica contra os agentes necrosantes, e é promissor como antiulcerogênico (Goulart et al., 2005). A análise dos extratos diclorometânico e hidroalcoólico de folhas e caule de *K. coriacea*, revelaram a presença de várias xantonas (Cortez et al., 1998), sendo que quatro delas apresentaram atividade para o fungo *Cladosporium cucumerinum*, e duas xantonas preniladas inibiram o crescimento em bioautografia de *Candida albicans* (Cortez et al., 1998), numa quantidade de 10 µg.

As xantonas parecem ser ativas nas funções mitocondriais (Kawai et al., 1984), o que justificaria o seu uso tradicional em infecções por protozoários, fungos e bactérias. O mecanismo de ação das hidroxinaftoquinonas usadas em infecções por protozoários inclui a inibição da função mitocondrial (Tracy & Webster, 1996). Resultados da avaliação do extrato hidroalcoólico de *K. coriacea* no metabolismo energético hepático sugerem que o extrato impede o metabolismo, atuando como inibidor de atividades enzimáticas associadas à cadeia respiratória (Zagoto et al., 2006).

O efeito no sistema nervoso central do extrato hidroalcoólico das folhas de *K. coriacea* foi avaliado em modelo de nado forçado. O tratamento oral com 120 mg/kg/dia, durante 30 dias, exibiu um efeito ansiolítico significativo (Audi et al., 2002). Martins et al. (2004) avaliaram as propriedades psicotrópicas após sua administração orogástrica aguda e crônica em ratos. Os resultados demonstram que o extrato é efetivo como ansiolítico e antidepressivo.

### 1.2.7. *Calophyllum brasiliense*

**Nome científico**

*Calophyllum brasiliense* Cambess. (Figura 34)

**Família**

Calophyllaceae

**Nome popular**

Bálsamo-jacareuba, guanadi-amarelo

**Descrição botânica**

Quando adulta, a árvore pode atingir até 20 m de altura. Na região Amazônica chega a atingir 40 m de altura. Seu tronco é geralmente reto e cilíndrico, apresentando fuste de até 15 m de altura. O guanandi é uma espécie de folhas perenes, simples, opostas, elípticas, coriáceas, com copa larga e arredondada, densa e de coloração verde-escuro. A casca externa é marrom-escuro ou pardacenta, fissurada de alto a baixo, descamando em placas retangulares. A casca interna possui coloração rósea, é aromática, amargosa e ácida, exsudando látex amarelado e pegajoso. Possui flores hermafroditas e brancas. Os frutos são do tipo drupa globosa, indeiscentes, carnosos, com pericarpo verde lactescentes quando maduros. A polpa é oleaginosa, envolvendo uma semente, que é globosa e de coloração castanha.



**Figura 34:** *Calophyllum brasiliense* Cambess. (Calophyllaceae).

### **Uso na medicina tradicional**

A infusão e o banho preparados a partir da casca do caule são utilizados no tratamento de reumatismo, varizes, hemorróidas e úlceras crônicas (Guimarães et al., 1993) e as folhas para o tratamento de processos inflamatórios (Noldin et al., 2006).

### **Atividade biológica**

Souza et al. (2009) demonstraram a atividade de medicamentos tradicionais preparados com *C. brasiliense* para o tratamento de úlceras e gastrites causadas por *Helicobacter pylori*. Um estudo das cascas do caule de *C. brasiliense* relatou a presença de xantonas com propriedades anticancerígenas, sendo que 6 delas apresentaram 100% de inibição das células tumorais (Ito et al., 2002) e antifúngica (Reyes-Chilpa et al., 1997). Os extratos polares das folhas contêm hiperina, amentoflavona, quercetina, ácido gálico e ácido protocatecólico; as frações hexano e AcOEt deste extrato exibiram efeito antinociceptivo.

Reyes-Chilpa et al. (2004) relataram a atividade citotóxica de cumarinas do tipo mammea isoladas do extrato hexânico das folhas, em três linhagens de células tumorais humanas. Estes compostos, juntamente com vários ácidos fenólicos, triterpenos e uma biflavona foram também testados em HIV-1, porém não foram ativas. Entretanto, quando testados em quatorze bactérias enteropatogênicas foram considerados tão ativos quanto o controle cloranfenicol.

O extrato hexânico das folhas de *C. brasiliense* foi capaz de inibir a enzima transcriptase reversa HIV-1 além de inibir a replicação viral (Huerta-Reyes et al., 2004).

Os extratos metanólicos das folhas e caule de *C. brasiliense* apresentaram atividade para as formas epimastigotas de *T. cruzi* em concentrações < 125 e > 500 µg/mL (Abe et al., 2005).

#### 1.2.8. *Schinus terebinthifolius*

##### **Nome científico**

*Schinus terebinthifolius* Raddi var. *radiannus* Engl. (Figura 35)

##### **Família**

Anacardiaceae

##### **Nome popular**

Aroeira-da-mata

##### **Descrição botânica**

Árvore de até 10 m de altura com casca fina. Folhas compostas, imparipenadas com dois pares de folíolos membranáceos, 5 a 7 cm de comprimento por 2,5 a 3 cm de largura, com aroma. Flores abundantes, minúsculas, de cor bege, reunidas em panículas. Frutos abundantes, pequenos e avermelhados na maturação. Madeira dura e pesada de múltipla utilização inclusive para a produção de carvão e lenha.



**Figura 35:** *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* Engl. (Anacardiaceae).

### Uso na medicina tradicional

Tem sido usado como remédio para úlcera, problemas respiratórios, feridas, reumatismo, gota, tumores, diarreia, doenças de pele, artrite (Morton, 1978), como antisséptico, anti-inflamatório, balsâmico e hemostático (Medeiros et al., 2007).

### Atividade biológica

O extrato etanólico das folhas de *S. terebinthifolius* foi ativo em *Candida glabrata* e *Sporothrix schenckii* (Johann et al., 2007), em *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans* (Schmourlo et al., 2005; Braga et al., 2007).

*S. terebinthifolius* permitiu o isolamento de terpenos (Campello & Arsaoli, 1975), fenóis (Ceruks et al., 2007), pentagaloliglicose (Hayashi et al., 1989), flavonóides, antraquinonas, xantonas e esteróides livres (de Lima et al., 2006).

O óleo essencial de *S. terebinthifolius* é usado para tratar problemas respiratórios, micoses e infecções por *Candida* (uso tópico), atividade atribuída a presença de  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno,  $\lambda^3$ -careno, limoneno,  $\alpha$  e  $\beta$ -felandreno, *p*-cimeno e terpinoleno além de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, alcoóis, cetonas e triterpenos (Lloyd et al., 1977). A análise do extrato etanólico da casca do caule mostrou a presença de fenóis, triterpenos pentacíclicos e antraquinonas; enquanto o extrato hexânico do mesmo órgão mostrou a presença de flavonas, flavonóides, xantonas, esteróides livres, antraquinonas e triterpenos pentacíclicos. O extrato etanólico da casca do caule mostrou atividade para cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* (de Lima et al., 2006).

Queires et al. (2006) isolaram de *S. teribinthifolius* polifenóis indutores de apoptose e autofagia na linhagem celular DU 145. De Mesquita et al. (2009) relataram atividade do extrato hexânico das folhas desta espécie em células de melanoma (MDA-MB-435) e de leucemia (HL-60). O potencial genotóxico do extrato da casca do caule de *S. terebinthifolius* foi demonstrado por de Carvalho et al. (2003), que reportaram danos ao DNA e mutações em bactérias.

#### 1.2.9. *Croton urucurana*

##### **Nome científico**

*Croton urucurana* Baill. (Figura 36)

##### **Família**

Euphorbiaceae

##### **Nome popular**

Sangra-d'água ou sangue-de-dragão

##### **Descrição botânica**

É uma árvore grande, de até 16 m, com folhas alternas, longo-pecioladas, coliformes, 3-5 nervadas, pubescentes, argêneas na parte inferior. Suas flores são dispostas em racemos compridos sendo encontrada em veredas ou solos hidromórficos (Corrêa, 1984).





**Figura 36:** *Croton urucurana* Baill. (Euphorbiaceae).

### **Uso na medicina tradicional**

O uso de infusões de espécies do gênero é conhecido por acelerar a cura de ferimentos infectados (Esmeraldino et al., 2005). A seiva retirada das cascas do caule de algumas espécies de *Croton*, conhecidas como sangue de dragão são utilizadas na América do Sul para a cicatrização de feridas, câncer e reumatismo (Gupta et al., 2008).

### **Atividade biológica**

O gênero *Croton* possui aproximadamente 1300 espécies incluindo ervas, arbustos e árvores. Extratos ou infusões de diferentes partes de plantas pertencentes a este gênero como *C. lechleri*, *C. palanostigma*, *C. draconoides* e *C. urucurana* são utilizados como remédios tradicionais por índios do rio Amazonas, para o tratamento de feridas infectadas e para acelerar a cicatrização de feridas (Duke & Vasquez, 1994; Lorenzi & Mattos, 2002).

Gurgel et al. (2005) demonstraram a atividade do látex vermelho extraído da madeira desta espécie em *Trichophyton tonsurans*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Microsporum canis* e *Epidermophyton floccosum*.

Na seiva da casca do caule de *Croton lechleri* proveniente do Equador, Cai et al. (1991) encontraram mais de 90% de protoantocianidinas, com vários monômeros de heptâmeros de unidades flavan-3-ol, além de 4 novos diterpenos clerodano, crolechinol, ácido crolechínico e korberinas A e B (Cai et al., 1993). As avaliações

desses compostos demonstraram atividades antibacterianas e anti-inflamatórias, além de inibir a proliferação de células endoteliais (Chen et al., 1994).

Peres et al. (1997) identificaram nesta espécie a presença de ácido acetil aleurítico, catequina, galocatequina, sonderianina,  $\beta$ -sitosterol e seu glicosídeo, estigmasterol, campesterol, e dois diterpenos do tipo clerodano. O principal polissacarídeo, o fucoarabinogalactano, foi isolado do exsudato de *C. urucurana* (Milo et al., 2002). O extrato aquoso, as frações hexânicas deste extrato, os compostos isolados, a catequina e o ácido acetil aleurítico, obtidos da casca do caule desta espécie foram ativos em *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium* (Peres et al., 1997).

Rao et al. (2007) demonstraram a propriedade antinociceptiva da seiva vermelha de *C. urucurana* em doenças, como a síndrome do intestino irritável, doença inflamatória intestinal e cistite. Os resultados revelam que a atividade antinociceptiva pode ser bloqueada pela naloxona, um antagonista dos receptores opióides, mas não por ioimbina, sugerindo o envolvimento de um mecanismo opióide. Outro estudo demonstrou o efeito inibitório do sangue de dragão para as correntes de sódio tetrodotoxina resistentes, o que pode indicar uma promissora atividade antinociceptiva (Liu et al., 2006).

#### 1.2.10. *Aspidosperma tomentosum*

##### **Nome científico**

*Aspidosperma tomentosum* Mart. (Figura 37)

##### **Família**

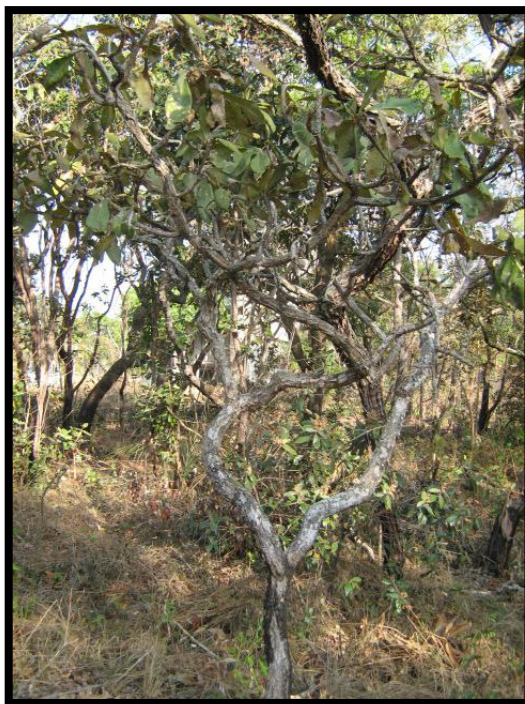
Apocynaceae

##### **Nome popular**

Peroba-do-cerrado

##### **Descrição botânica**

Árvore de até 10 m com folhas alternadas, oblongas e branco-tomentosas na parte inferior. Flores hipocrateriformes, pequenas, brancas e dispostas em umbelas.



**Figura 37:** *Aspidosperma tomentosum* Mart. (Apocynaceae).

### **Uso na medicina tradicional**

Utilizada no tratamento da malária e da leishmaniose, inflamações do útero e ovário, anticonceptiva, diabetes e problemas estomacais, contra câncer, febre e reumatismo (Di Stasi, 2002).

As cascas do caule de *A. nitidum* (carapanaúba) são utilizadas por mais de 8.000 nativos em várias partes do Brasil para curar malária (Brandão et al., 1992). Os índios Makunas e Taiwanos relatam que o látex desta árvore é eficaz na cura de lesões provocadas pela hanseníase (Tratado de Cooperação Amazônica - TCA, 1978). No estado do Amapá, a espécie *A. nitidum* é utilizada no tratamento de bronquites e diabetes, e em Manaus é utilizada como anti-inflamatória, cicatrizante e contraceptiva (TCA, 1978).

### **Atividade biológica**

Espécies de *Aspidosperma* são ricas em alcaloides indólicos (Bourdy et al., 2004; Pereira et al., 2007) com atividade antibacteriana, tripanocida, leishmanicida e anticancerígena (Ferreira et al., 2004; Tanaka et al., 2006). A espécie *Aspidosperma*

*quebracho blanco* contém o alcaloide aspidoespermina ativo em *P. falciparum* resistente à cloroquina (Mitaine-Offer et al., 2002).

O extrato de alcaloides totais das cascas do caule e as substâncias isoladas de *A. ramiflorum* apresentaram maior efetividade em *L. amazonensis* do que em *L. brasiliensis*, principalmente as substâncias puras, ramiflorina A e ramiflorina B, além da atividade para o fungo *Cryptococcus neoformans* (Ferreira et al., 2004). Os extratos brutos diclorometânico e metanólico das folhas secas de *A. tomentosum* apresentaram atividade antiproliferativa para as células de câncer, UACC62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI 460 (fígado), K562 (leucemia) e NCI-ADR (mama) em uma concentração dose-dependente (Kohn et al., 2006).

Neste trabalho, o Banco de Extratos e Substâncias de Plantas do bioma Cerrado do Laboratório de Farmacognosia/UnB possibilitou a investigação da atividade em diferentes protozoários e fungos patógenos humanos. As espécies *Spiranthera odoratissima* e *Diospyros hispida* foram selecionadas como objeto de estudo, devido à importante atividade antiparasitária e antifúngica, e por apresentarem poucos relatos na literatura.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1. OBJETIVO GERAL

Investigar as atividades químicas e biológicas de extratos e substâncias de plantas do bioma Cerrado em *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *Trypanosoma cruzi*, fungos patógenos humanos dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*, e em células NIH-3T3 de fibroblastos de mamíferos.

### 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar *in vitro* a atividade dos extratos vegetais e das substâncias isoladas em formas intraeritrocitárias de *P. falciparum* resistente à cloroquina, cepa FcB1 (Colômbia).
- Avaliar os extratos e moléculas ativas para *P. falciparum* em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (L.) chagasi*, epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e fungos do gênero *Candida* e *Cryptococcus*.
- Realizar o fracionamento cromatográfico bioguiado dos extratos ativos selecionados.
- Determinar a estrutura das moléculas isoladas.
- Determinar a citotoxicidade de extratos ativos e substâncias isoladas em células da linhagem NIH-3T3 de fibroblastos de mamíferos.

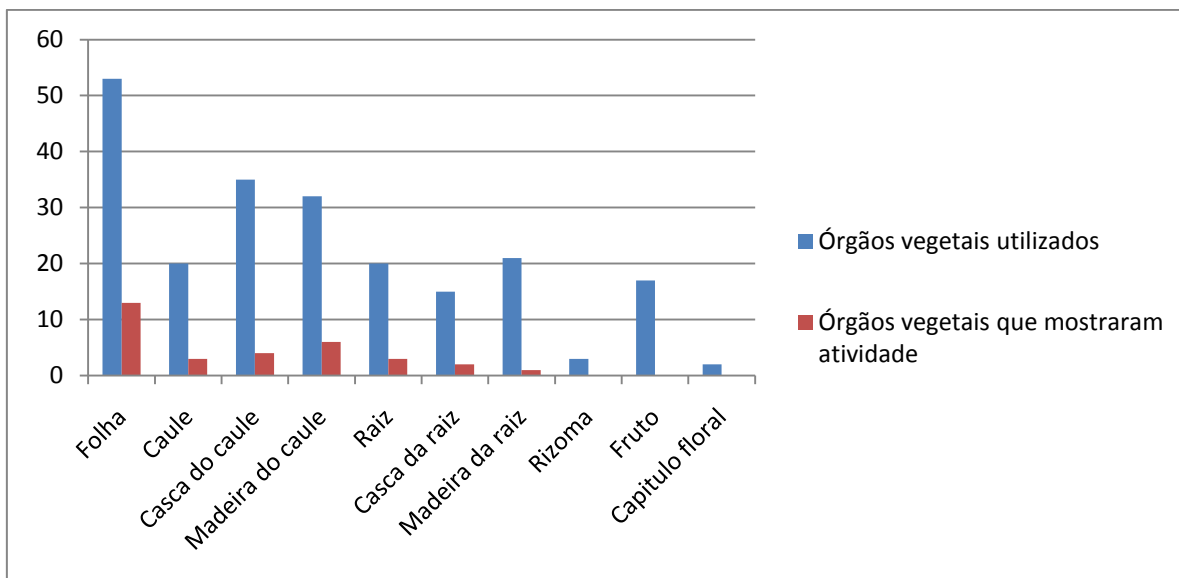
## 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.1. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

Um total de 217 extratos brutos oriundos de 27 espécies vegetais, pertencentes a 19 famílias foram preparados (Quadro 3) e avaliados em *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina, cepa FcB1. Dentre esses, 91 eram hexânicos, 49 diclorometânicos, 6 acetato de etila, 31 etanólicos e 40 hidroalcoólicos. Os extratos correspondiam aos seguintes órgãos vegetais: folhas (53), casca do caule (35), madeira do caule (32), caule (madeira + casca) (19), casca da raiz (15), madeira da raiz (21), raiz (madeira + casca) (20), rizomas (3), frutos (17) e capítulo floral (2). Dos 217 extratos testados, 32 apresentaram atividade de inibição  $\geq 75\%$  em *Plasmodium falciparum*, e 11 mostraram uma inibição  $\geq 90\%$  e foram selecionados para o cálculo da concentração inibitória em 50% dos parasitos ( $IC_{50}$ ). O gráfico 4 representa a quantidade de órgãos vegetais utilizados na preparação dos 217 extratos brutos comparado com a quantidade dos que apresentaram inibição em *P. falciparum*  $\geq 75\%$ .

Após um levantamento bibliográfico sobre as espécies consideradas ativas, dois extratos foram selecionados para o estudo químico: extratos AcOEt das folhas de *Spiranthera odoratissima* e da madeira da raiz de *Diospyros hispida*. Foram obtidos 20 g do extrato AcOEt das folhas de *S. odoratissima*, correspondendo a um rendimento de 3,71%; e 8 g do extrato AcOEt da madeira da raiz de *D. hispida*, correspondendo a um rendimento de 0,45%.

Algumas das plantas estudadas são utilizadas pela medicina tradicional para o tratamento de leishmaniose, infecções fúngicas, malária e febre. A espécie *Aspidosperma tomentosum* é usada para tratamento da malária, leishmaniose, câncer, inflamações, febre e reumatismo (Di Stasi, 2002), as folhas de *Renealmia alpinia* são usadas para o combate à febre (Zhou et al., 1997). *Kielmeyera coriacea* é usada para tratamento de leishmaniose, malária e infecções bacterianas e fúngicas (Zagoto et al., 2006). *Simarouba versicolor* é usada como anti-helmíntico, anti-hemorragico e febrífugo (Fernandes et al., 2004).



**Gráfico 4:** Quantidade de extratos produzidos para cada órgão vegetal em comparação com os que mostraram atividade.

Algumas substâncias desenvolvidas para um determinado alvo terapêutico podem ter outras indicações. A miltefosina, um alquilfosfolípídeo desenhado como antineoplásico foi licenciado pelo governo indiano para o tratamento da leishmaniose visceral (Sindermann & Engel, 2006). A paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo, está sendo avaliado para o tratamento tópico da leishmaniose cutânea (Gonçalves, 2005). É amplamente reconhecido que alguns antifúngicos como a anfotericina B e o itraconazol tem efeito em espécies de *Leishmania* (Sundar et al., 2010), e a pentamidina, um agente leishmanicida, demonstrou um efeito antifúngico em *Pneumocystis jiroveci* (Brendle et al., 2002).

Esta abordagem foi usada neste estudo para otimizar o processo de seleção. Os resultados obtidos em *Plasmodium falciparum* foram aplicados em outros modelos de protozoários e fungos.

**Quadro 3:** Espécies vegetais que foram utilizadas na preparação dos diferentes extratos brutos.

<b>Familia</b>	<b>Nºde Herbario</b>	<b>Espécies</b>	<b>Orgãos vegetais (solventes)</b>
Alismataceae	(UB) 3752	<i>Echinodorus macrophyllus</i> (Kunth) Micheli	F (hs,d)
Anacardiaceae	(UB) 3753	<i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi var. <i>radiannus</i> Engl.	F (hs,h,d), MC (hs,h,d), CC (hs,h,d), MR (hs,h,d), CR (h)
Apocynaceae	(UB) 3744	<i>Aspidosperma tomentosum</i> Mart.	F (hs,h,d), C (h), R (hs,d), MC (hs,h,d), CC (hs,h,d)
Asteraceae	(UB) 3708	<i>Eremanthus sphaerocephalus</i> (DC. ex Baker)	C (h,e)
Bignoniaceae	(UB) 3714	<i>Arrabidaea florida</i> DC.	F (h,e), Fr (h,d)
	(UB) 3715	<i>Anemopaegma chamberlaynii</i> Bureau & K. Schum.	F (h,d), C (h,e,d)
Calophyllaceae	(UB) 3745	<i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc.	F (hs,h), MC (h,d), CC (hs,h,d), MR (h,d), CR (h,d), Fr (hs,h)
	(UB) 3754	<i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess.	F (hs,h,d), MC (hs,h,d), CC (hs,h,d), MR (hs,h,d), CR (hs,h,d)
Ebenaceae	(UB) 3760	<i>Diospyros hispida</i> DC.	MC (h,d), CC (hs,h,d), MR (h,a)
Euphorbiaceae	(UB) 3813	<i>Croton urucurana</i> Baill.	F (h), MC (h), CC (h)
Magnoliaceae	(UB) 3738	<i>Talauma ovata</i> A.St.-Hil.	F (h,e), MC (h,e), CC (h,e)
Meliaceae	(UB) 3710	<i>Guarea Kunthiana</i> A. Juss.	F (h,e), C (h,d,e), R (h,d,e), Fr (h,e)
	(UB) 3712	<i>Guarea guidonea</i> Sleumet.	F (h,e), C (h,e), R (h,e)
Malpighiaceae	(UB) 3743	<i>Byrsonima crassa</i> Nied.	F (hs,h), MC (hs,h,d), CC (hs,h,d), MR (hs,h,d), CR (h)



Mimosaceae	(UB) 3739	<i>Enterolobium ellipticum</i> Benth.	F (hs,d,h), C (hs,d,h), CC (h), MC (h), CR (h,a), MR (hs,d,h),
	(UB) 3740	<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	F (hs,h,d), MC (hs,h,d), CC (h,d), MR (h,d), CR (h), Fr (h)
Monimiaceae	(UB) 3712	<i>Siparuna guianensis</i> Aubl.	F (h,e), MC (h,e), CC (h,e)
	(UB) 3737	<i>Siparuna cujabana</i> A.DC.	F (h,e), C (h,e), R (h,e) Fr (h,e)
Rubiaceae	(UB) 3709	<i>Sabicea brasiliensis</i> Wernham	F (h,e), R (h,e)
	(UB) 3722	<i>Palicourea rigida</i> H.B. & K.	F (hs,d,h), C (h), CC (h) , R (hs,d,h)
	(UB) 3741	<i>Chomelia pohliana</i> Müll.Arg.	F (hs,d,h), C (h,d), R(hs,h)
Rutaceae	(UB) 3768	<i>Spiranthera odoratissima</i> A. St. Hil.	F (h,a,e), R (a)
Simaroubaceae	(UB) 3724	<i>Simarouba versicolor</i> A. St.-Hil.	F (h,d,e), C (e), CC (h,e), CR (h,e), Fr (h,e)
Solanaceae	(UB) 3720	<i>Solanum licocarpum</i> A. St.-Hil.	F (h)
Vochysiaceae	(UB) 3746	<i>Qualea grandiflora</i> Mart.	F (hs,d), C (h,d), MC (hs,e,h), CC (hs,h), CR (hs,d), R (hs,e,h), Fr (hs,d, h)
	(UB) 3742	<i>Qualea parviflora</i> Mart.	MC (hs,d, h), CC (hs,d, h), MR (hs,d,h), CR (hs,h), Fr (h)
Zingiberaceae	(UB) 3719	<i>Renealnia alpinia</i> (Rottb.) Maas	F (e,h), Rz (hs,d,h)

F: folha; C: caule (madeira+casca), CC: casca do caule, MC: madeira do caule, R: raiz (madeira+casca), CR: casca da raiz, MR: madeira da raiz, Fr: fruto, Rz: rizoma, CF: capitulo floral; h: hexano, d: diclorometano, a: acetato de etila, e: etanol, hs: solução hidroalcoólica (90%).

## 2.2. ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL

A atividade de inibição de *P. falciparum* cepa FcB1 resistente à cloroquina foi avaliada para os 217 extratos. Esta triagem permitiu verificar que 32 destes extratos apresentaram inibição  $\geq 75\%$  a uma concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ . Os resultados obtidos estão descritos na tabela 1.

**Tabela 1:** Porcentagem de inibição dos extratos à 10  $\mu\text{g/mL}$  em *P. falciparum* resistente à cloroquina.

<b>Plantas</b>	<b>Partes da planta (solvente)</b>	<b><i>P. falciparum</i> (% de inibição)</b>
<i>Aspidosperma tomentosum</i>	CC (d)	>75
	F (hs)	>75
	R (d)	>90
<i>Byrsonima crassa</i>	F (hs)	>75
	MC (d)	>75
	F (h)	>75
<i>Calophyllum brasiliense</i>	MC (d)	>75
	CR (d)	>90
	MR (d)	>90
<i>Croton urucurana</i>	MC (h)	>90
<i>Diospyros hispida</i>	R (a)	>90
	CC (d)	>90
<i>Enterolobium ellipticum</i>	F (h)	>75
	F (d)	>75
<i>Guarea guidonea</i>	R (h)	>75
<i>Guarea kunthiana</i>	F (e)	>75
	C (h)	>75
<i>Kielmeyera coriacea</i>	CC (d)	>90
<i>Renealmia alpinia</i>	F (h)	>75
<i>Schinus terebinthifolius</i>	F (d)	>90
<i>Simarouba versicolor</i>	F (d)	>90
	CR (e)	>75
<i>Siparuna cujabana</i>	C (h)	>75

	C (e)	>75
	F (h)	>75
<i>Siparuna guianensis</i>	CC (h)	>75
<i>Spiranthera odoratissima</i>	F (a)	>90
	R (h)	>90
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	F (d)	>75
	MC (d)	>75
	F (h)	>75
<i>Talauma ovata</i>	MC (h)	>75

F: folha; C: caule (madeira+casca), CC: casca do caule, MC: madeira do caule, R: raiz (madeira+casca), CR: casca da raiz, MR: madeira da raiz, h: hexano, d: diclorometano, a: acetato de etila, e: etanol, hs: solução hidroalcoólica (90%).

Destes 217 extratos, apenas onze apresentaram porcentagem de inibição do parasito  $\geq 90\%$  na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ . O  $\text{IC}_{50}$  foi, portanto, calculado para estes onze extratos (Tabela 2).

**Tabela 2:** Valores de  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos extratos que na triagem inibiram acima de 90% dos parasitos.

<b>Plantas</b>	<b>Partes da planta (Solventes)</b>	<b><i>P. falciparum</i> (<math>\text{IC}_{50}</math> <math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
<i>A. tomentosum</i>	R (d)	6,7 $\pm$ 0,5
<i>C. brasiliense</i>	MR (d)	6,7 $\pm$ 0,87
	CR (d)	9,5 $\pm$ 0,02
<i>C. urucurana</i>	MC (h)	3,5 $\pm$ 0,02
<i>D. hispida</i>	R (a)	1,0 $\pm$ 0,9
	CC (d)	9,6 $\pm$ 3,4
<i>K. coriacea</i>	CC (d)	8,7 $\pm$ 0,66
<i>S. versicolor</i>	F (d)	3,1 $\pm$ 0,01
<i>S. odoratissima</i>	F (a)	9,2 $\pm$ 1,8
	R (h)	5,5 $\pm$ 1,6
<i>S. terebenthifolius</i>	F (d)	6,4 $\pm$ 0,86
Cloroquina (2 $\mu\text{M}$ )		0,07 $\pm$ 0,7

R: raiz; MR: madeira da raiz; CR: casca da raiz; CC: casca do caule; MC: madeira do caule; F: folha; h: hexano; d: diclorometano; a: acetato de etila

Neste ensaio a cloroquina foi utilizada como controle positivo e o DMSO como controle negativo. Os testes foram realizados em triplicata.

Um total de 72,7% dos extratos ativos em *P. falciparum* foi obtido de casca e madeira de caule e raiz, órgãos que ficam muito expostos ao ataque de patógenos, o que pode estimular a produção de metabólitos secundários de defesa (de Mesquita et al., 2005a; de Mesquita et al., 2007; Silva et al., 2009; Melo e Silva et al., 2009). Foram encontradas atividades antiplasmodial com IC<sub>50</sub> entre 1,0 e 9,6 µg/mL. Esses extratos são de grande interesse para realizar um fracionamento bioguiado e encontrar moléculas líderes.

O extrato diclorometânico das raízes de *A. tomentosum* (Apocynaceae) foi ativo para *P. falciparum* com IC<sub>50</sub> de 6,7 µg/mL. Esta espécie é utilizada na medicina tradicional para o tratamento da malária e da febre. De Mesquita et al. (2007) descreve a atividade do extrato etanólico de madeira da raiz de *A. macrocarpon* com IC<sub>50</sub> de 4,9 µg/mL para a mesma cepa de *P. falciparum*. Kvist et al. (2006) avaliou 43 plantas da medicina tradicional do Peru usadas para o tratamento de malária e leishmaniose, em cepa 3D7 de *P. falciparum* susceptível à cloroquina. Os extratos etanólicos da madeira do caule de *Aspidosperma excelsum* e *A. rigidum* mostraram IC<sub>50</sub> de 42 e < 10 µg/mL.

As espécies *Aspidosperma vargasii* e *A. desmanthum* são usadas na região amazônica para o tratamento da malária. Destas espécies foram extraídos dois alcaloides indólicos, a ellipticina e a aspidocarpina ativos em *P. falciparum* cepa K1, com IC<sub>50</sub> de 0,018 e 0,007 µg/mL, respectivamente, valores comparáveis aos controles cloroquina (IC<sub>50</sub> = 0,46 µg/mL) e quinina (IC<sub>50</sub> = 0,004 µg/mL). Este trabalho corrobora com o uso tradicional de espécies de *Aspidosperma* para o tratamento da malária.

Extratos de plantas da família Calophyllaceae, como o diclorometânico da casca do caule de *Kielmeyera coriacea* e diclorometânicos da madeira e casca da raiz de *Calophyllum brasiliense* apresentaram IC<sub>50</sub> de 8,7; 6,7 e 9,5 µg/mL, respectivamente, em *P. falciparum*. Importante destacar que a espécie *K. coriacea* conhecida como “pau-santo” é usada na medicina tradicional para o tratamento da malária (Audi et al., 2002). O látex da madeira de *Moronobea coccine*, espécie pertencente à família Clusiaceae, antiga família das duas espécies acima, apresentou 95% de inibição para *P. falciparum*, e permitiu o isolamento de 11 policíclios poliprenilados acilfloroglucinóis, com potente atividade antiplasmodial, com

IC<sub>50</sub> variando de 3,3 a 37,2 µM (Marti et al., 2009). A associação de conhecimentos etnomedicinais e quimiotaxonômicos pode apoiar os resultados observados.

O extrato hexânico da madeira do caule de *Croton urucurana* (Euphorbiaceae), espécie conhecida tradicionalmente como sangue de dragão, utilizada para o tratamento de feridas infeccionadas, úlceras, diarreia, reumatismo e câncer, mostrou importante atividade antiplasmodial com IC<sub>50</sub> de 3,5 µg/mL e não apresentou toxicidade em células de fibroblastos, com valor de IC<sub>50</sub> de 1562,7 µg/mL (Tabela 5).

Gurgel et al. (2001) observaram a atividade da seiva vermelha de *Croton urucurana* na diarreia induzida com óleo de mamona ou com a toxina da cólera, em ratos.

O extrato acetato de etila das raízes de *Diospyros hispida* (Ebenaceae) apresentou forte atividade para *P. falciparum*, com valor de IC<sub>50</sub> de 1 µg/mL. Espécies do gênero *Diospyros* são usadas como febrífugo por alguns povos (Mallavadhani et al., 1998). É a primeira vez que a atividade antiplasmodial de *D. hispida* é relatada, e foi então descrita neste trabalho.

O gênero *Diospyros* é usado na medicina tradicional indiana (Ayurveda), africana e chinesa para o tratamento de coqueluche, hanseníase, mordida de cobra, sarna, erupções de pele, disenteria, infecções oculares, problemas menstruais, dores abdominais, feridas, úlceras, dores torácicas e gonorréia (George Watt, 1956).

Muitas espécies do gênero *Diospyros* são descritas por apresentarem atividades biológicas interessantes. Esse gênero é rico em naftoquinonas simples, monoméricas e diméricas (Hegnauer, 1989; Ganapaty et al., 2005; Ganapaty et al., 2006) reportadas pela toxicidade em células cancerígenas (Hazra et al., 2007). Quinonas diméricas de *D. assimilis* foram relatadas pela atividade em *T. cruzi*, *Leishmania donovani* e *P. falciparum* com valores de IC<sub>50</sub> de 12,28; 8,82 e 5,85 µg/mL, respectivamente (Ganapaty et al., 2006). O ácido betulínico 3-cafeato foi isolado de *D. quaesita* por Ma et al. (2008), composto ativo em *P. falciparum* clone D - cloroquina-sensível e W - cloroquina-resistente - com IC<sub>50</sub> de 1,4 e 0,98 µM respectivamente. Neste mesmo estudo, ainda foram isolados a neolignana diospirina, o pinoresinol, lariciresinol, *N*-benzoil-l-fenilalaninol, escopoletina e poriferast-5-en-3β,7α-diol.

Compostos do tipo quinonas, frequentemente encontrados em espécies de *Diospyros*, são uma das maiores classes de compostos de origem natural com atividade significativa em vários alvos biológicos (Fournet et al., 1992; Akendengue et al., 1999). As mais interessantes são as relacionadas com a atividade em *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Plasmodium* (Perez et al., 1997; Likhitwitayawuid et al., 1998).

O extrato diclorometânico das folhas de *Schinus terebinthifolius* var. *radiannus* (Anacardiaceae) apresentou IC<sub>50</sub> de 6,4 µg/mL para *P. falciparum*. A espécie *S. terebinthifolius* é conhecida como fonte de triterpenos, fenóis e flavonóis (Hegnauer, 1964). Os extratos hexânico e diclorometânico das folhas mostraram atividade em células tumorais (de Mesquita et al., 2009).

O extrato diclorometânico das folhas de *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) apresentou IC<sub>50</sub> de 3,1 µg/mL em *P. falciparum*. Esta espécie é usada pelas populações tradicionais como febrífugo e para o tratamento de doenças infecciosas. A glaucarubinona, extraída desta espécie é ativa em células cancerígenas (de Mesquita et al., 2009), possui algumas atividades antiprotozoárias descritas, como para *P. falciparum* com IC<sub>50</sub> de 0,004 µg/mL (Franssen et al., 1997; Guo et al., 2005; Wright, 2005; Rocha et al., 2005). Substâncias como os quassinóides são bastante comuns na família Simaroubaceae (O'Neill et al., 1988; Arriaga et al., 2002; Houël et al., 2009). Wright et al. (2005) mostraram que a atividade antiplasmodial de espécies da família Simaroubaceae são devido a presença dos quassinóides como brusatol, glaucarubinona e quassina.

A espécie *Simarouba glauca* teve o extrato metanólico do córtex avaliado em cepas de *P. falciparum* K1 (resistente a multidrogas) e NF54 (cloroquina sensível) mostrando interessante atividade. E quando avaliado em modelo experimental de *P. berghei* reduziu significativamente a parasitemia (Franssen et al., 1997).

As folhas e caules subterrâneos de *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae) são utilizados tradicionalmente na forma de decocto no vinho ou na cachaça para o tratamento de reumatismo, gota, acne, furúnculo, infecções renais e inflamações em geral. O extrato hexânico da raiz de *S. odoratissima* apresentou valores de IC<sub>50</sub> de 5,5 µg/mL para *P. falciparum*. O extrato acetato de etila das folhas de *S. odoratissima* foi ativo em *P. falciparum* com IC<sub>50</sub> de 9,2 µg/mL. Alguns estudos com a espécie descrevem o isolamento de substâncias do tipo alcaloides (Rouffiac et al., 1969; Ribeiro et al., 2005), cumarinas (Agrawal et al., 1989) e terpenos (de Jesus

Freitas et al., 2003). Kvist et al. (2006) avaliaram extratos etanólicos das raízes de *Citrus limon* e *C. paradise* (Rutaceae) que apresentaram  $IC_{50}$  em *P. falciparum* < 10 e 20  $\mu\text{g/mL}$ .

Devido ao alto rendimento do extrato das folhas e de poucos relatos na literatura, *S. odoratissima* foi escolhida para realização do estudo químico biomonitorado a fim de isolar os compostos responsáveis pela atividade observada.

A abordagem deste trabalho foi testar primeiramente todos os extratos em um modelo de parasito - *Plasmodium falciparum* cepa FcB1 resistente à cloroquina. Em seguida, os extratos ativos foram investigados em outros protozoários e fungos. Os 32 extratos que apresentaram inibição  $\geq 75\%$  em *P. falciparum* foram avaliados em leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus*. Os onze extratos que apresentaram inibição  $\geq 90\%$  em *P. falciparum* foram avaliados em *Leishmania (Leishmania) chagasi* e *Trypanosoma cruzi*. Portanto, para obter maiores informações sobre os extratos ativos em *P. falciparum*, optamos por analisar estes extratos em outros micro-organismos.

### 2.3. ATIVIDADE EM *Leishmania (Leishmania) chagasi*

Os onze extratos ativos em *P. falciparum* foram testados em formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* e mostraram-se menos ativos. Apenas três deles mostraram atividade para o parasito. O extrato diclorometânico da madeira da raiz de *C. brasiliense* com  $IC_{50}$  de 27,6  $\mu\text{g/mL}$ ; acetato de etila das raízes de *D. hispida* com  $IC_{50}$  de 18,9  $\mu\text{g/mL}$  e hexânico das raízes de *S. odoratissima* com  $IC_{50}$  de 22,3  $\mu\text{g/mL}$ . A miltefosina, controle positivo apresentou  $IC_{50}$  de 2,9  $\mu\text{g/mL}$ . Os demais extratos apresentaram  $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$  (Tabela 3).

**Tabela 3:** Atividade dos extratos (IC<sub>50</sub> em µg/mL) em formas promastigotas de *L. (L.) chagasi*.

Planta	Partes da planta (Solventes)	<i>L. (L.) chagasi</i> promastigotas (IC <sub>50</sub> µg/mL)
<i>A. tomentosum</i>	R (d)	>100
<i>C. brasiliense</i>	MR (d)	27,6 ± 0,82
	CR (d)	>100
<i>C. urucurana</i>	MC (h)	>100
<i>D. hispida</i>	R (a)	18,9 ± 0,53
	CC (d)	>100
<i>K. coriacea</i>	CC (d)	>100
<i>S. versicolor</i>	F (d)	>100
<i>S. odoratissima</i>	F (a)	>100
	R (h)	22,3 ± 0,45
<i>S. terebenthifolius</i>	F (d)	>100
Miltefosina (25 µg/mL)		2,9 ± 0,4

R: raiz; MR: madeira da raiz; CR: casca da raiz; MC: madeira do caule; CC: casca do caule; F: folha; d: diclorometano; h: hexano; a: acetato de etila

Derivados de plantas estão entre os agentes mais ativos contra diferentes infecções causadas por protozoários (Delorenzi et al., 2001). O nerolidol, constituinte de óleos essenciais de algumas plantas quando testado em formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. braziliensis* reduziu a síntese de ergosterol e dolicol dos parasitos (Arruda et al., 2005).

Rosa et al. (2003) investigaram o óleo essencial de *Croton cajucara* e seu composto isolado linalol em formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, observando 100% de inibição dos parasitos sem toxicidade celular para hemácias.

Honda et al. (2010) descreveram que os extratos hexânico e diclorometânico das folhas de *C. brasiliense* inibiram 100% do crescimento de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em concentrações de 20 e 40 µg/mL, respectivamente. A utilização do extrato hexânico à 80 µg/mL e do extrato diclorometânico na concentração de 40 µg/mL no tratamento de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* reduziu em mais de 60% os macrófagos infectados. A atividade foi relacionada à presença de cumarinas do tipo mammea. A literatura revela que a cumarina (-) mammea



A/BB, isoladas do extrato diclorometânico de folhas de *C. brasiliense* é ativa em formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* com IC<sub>50</sub> de 3 e 0,88 µg/mL, respectivamente (Brenzan et al., 2007). A citotoxicidade deste composto em macrófagos da linhagem J774-G8 foi de 63,5 µM. Segundo Singh et al. (2008) extratos e compostos com IC<sub>50</sub> em células de mamíferos menor que 250 µg/mL são considerados citotóxicos.

Recentes estudos têm mostrado que mammea A/BB tem alta atividade citotóxica contra algumas linhagens de células tumorais (Reyes-Chilpa et al., 2004). Foi relatado previamente que os extratos, frações e a cumarina (-) mammea A/BB isoladas de folhas de *C. brasiliense* mostra significativa atividade moluscicida em *Biomphalaria glabrata* (Gasparotto-Junior et al., 2005). Compostos isolados da espécie como xantonas, sitosteróis, terpenos, cumarinas, flavonóides e triterpenos foram descritos pela atividade analgésica (Isaias et al., 2004), antimicrobiana (Yassunaka et al., 2005), anti-protozoária (Abe et al., 2004) e anti-viral (Ito et al., 2003).

A atividade leishmanicida da espécie *D. hispidia* é pela primeira vez relatada neste trabalho. Contudo existem relatos desta atividade em outras espécies de *Diospyros*, devido principalmente à presença, neste gênero, de compostos do tipo naftoquinonas. Os compostos plumbagina e biplumbaginas derivados do tipo quinonóides isolados de espécies do gênero *Diospyros* possuem propriedades leishmanicidas. *D. montana* mostrou significativa atividade atribuída a diospirina em formas promastigotas de *Leishmania donovani* (Hazra et al., 1987). A diospirina mostrou ser um inibidor específico da enzima topoisomerase I do DNA de *L. donovani* (Ray et al., 1998), alvo considerado importante para o desenho de fármacos antiprotozoário. Hazra et al. (2002) relataram que a diospirina inibiu 22,7% da parasitemia de *L. major* a 5 µg/mL, e que o análogo diospirina dimetil éter inibiu 98% do parasito na mesma concentração.

A família Rutaceae é constantemente citada em trabalhos devido a sua atividade antiparasitária (Lavaud et al., 1995; Fournet et al., 1993 e 1996). Lavaud et al. (1995) relataram a atividade leishmanicida de alcaloides do tipo 4-quinolona, como dictiolomida A e dictiolomida B isolados de *Dictyoloma peruviana*. Fournet et al. (1996) relataram a atividade leishmanicida de alcaloides isolados de *Galipea longiflora*, em modelos experimentais, semelhante à do medicamento antimonial clássico.

Ribeiro et al. (2005) isolaram o alcaloide  $\gamma$ -fagarina das raízes de *S. odoratissima*. Ostan et al. (2007) relataram a atividade do extrato de *Haplophyllum myrtifolium* (Rutaceae), contendo 50% de  $\gamma$ -fagarina em *L. tropica*, um dos agentes etiológicos da leishmaniose cutânea.

O extrato alcaloídico bruto das cascas do caule de *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolia* (Rutaceae) exibiu atividade *in vitro* em várias cepas de *Leishmania* ssp. a 100  $\mu\text{g/mL}$  (Ferreira et al., 2002). Dois constituintes isolados, cantin-6-ona e 5-metoxicantin-6-ona foram avaliados em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*. Porém, a administração intralesional da cantin-6-ona não reduziu a carga de parasitos significativamente quando comparado ao grupo tratado com o fármaco.

As três espécies que apresentaram atividade interessante, *Calophyllum brasiliense*, *Diospyros hispida* e *Spiranthera odoratissima* são de grande interesse para estudos futuros, principalmente porque os medicamentos disponíveis para o tratamento das leishmanioses são sobretudo tóxicos.

#### 2.4. ATIVIDADE EM *Trypanosoma cruzi*

Os onze extratos ativos em *P. falciparum* foram também avaliados em formas epimastigotas de *T. cruzi*. Destes, quatro apresentaram atividade (Tabela 4), com valores de  $\text{IC}_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ : extrato diclorometânico da casca da raiz de *C. brasiliense* com  $\text{IC}_{50}$  de 97,1  $\mu\text{g/mL}$ ; acetato de etila da raiz de *D. hispida* com  $\text{IC}_{50}$  de 89,9  $\mu\text{g/mL}$ ; diclorometânico das folhas de *S. versicolor* com  $\text{IC}_{50}$  de 100  $\mu\text{g/mL}$  e acetato de etila das folhas de *S. odoratissima* com  $\text{IC}_{50}$  de 56,3  $\mu\text{g/mL}$ . O benznidazol na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  apresentou um  $\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ . O extrato acetato de etila das folhas de *S. odoratissima* foi considerado promissor para o estudo químico biomonitorado.

**Tabela 4:** Atividade dos extratos (IC<sub>50</sub> em µg/mL) em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Plantas	Partes da planta (Solvente)	<i>T. cruzi</i> epimastigotas (IC <sub>50</sub> µg/mL)
<i>A. tomentosum</i>	R (d)	>100
<i>C. brasiliense</i>	MR (d)	>100
	CR (d)	97,1 ± 0,35
<i>C. urucurana</i>	MC (h)	>100
<i>D. hispida</i>	R (a)	89,9 ± 0,3
	CC (d)	>100
<i>K. coriacea</i>	CC (d)	>100
<i>S. versicolor</i>	F (d)	100 ± 0,4
<i>S. odoratissima</i>	F (a)	56,3 ± 0,20
	R (h)	>100
<i>S. terebenthifolius</i>	F (d)	>100
Benznidazol (100 µg/mL)		< 10

R: raiz; MR: madeira da raiz; CR: casca da raiz; MC: madeira do caule; CC: casca do caule; F: folha; d: diclorometano; h: hexano; a: acetato de etila

De Mesquita et al. (2007) demonstraram atividade de extratos de plantas do Cerrado em formas amastigotas de *T. cruzi*. O extrato hexânico da casca da raiz de *Casearia sylvestris* var. *lingua* apresentou valor de IC<sub>50</sub> menor que o encontrado para o fármaco referência benznidazol.

Reyes-Chilpa et al. (2008) mostraram que a cumarina (-) mammea A/BB isoladas de folhas de *C. brasiliense* é ativa em formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. Abe et al. (2004) isolaram do extrato da madeira do caule de *C. brasiliense* os compostos jacareubina, 6-deoxijacareubina, 1,3,5,6-tetrahydroxi-2-(3-metil-2-butenil)xantona e 1,3,5,6-tetrahydroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutil)xantona, que mostraram atividade entre 15 e 200 µg/mL.

Não existem relatos da atividade de *D. hispida* em *T. cruzi*. Ganapaty et al. (2006) isolaram do extrato diclorometânico das raízes de *D. assimilis* os compostos diospirina ativo em *T. brucei* e o 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-2-naftaldeído ativo em *T. cruzi*.

As avaliações nos diferentes alvos parasitários mostraram que três espécies, *Calophyllum brasiliense*, *Diospyros hispida* e *Spiranthera odoratissima* possuem amplo espectro de atividade.

## 2.5. CITOTOXICIDADE

A avaliação *in vitro* da toxicidade dos extratos e das frações em células NIH-3T3 de fibroblastos de mamífero foi investigada por meio dos ensaios com redução do MTT. Bernhard et al. (2003) sugerem que em mitocôndrias intactas o MTT é reduzido a formazan pela enzima succinato-desidrogenase da cadeia respiratória.

Os extratos brutos testados em *P. falciparum*, *L. (L.) chagasi*, e *T. cruzi* foram avaliados em células NIH-3T3 e a maioria não apresentou toxicidade significativa (Tabela 5). Estudos recentes consideram seguros extratos com valores de IC<sub>50</sub> em células de mamíferos acima de 250 µg/mL (Singh et al., 2008).

A partir dos resultados obtidos para as células NIH-3T3 foi possível calcular o Índice de Seletividade (IS), que relaciona a citotoxicidade e a atividade do extrato no modelo biológico avaliado ( $IS = IC_{50} \text{ em células NIH-3T3} / IC_{50} \text{ em parasitos}$ ) (Atjanasuppat et al., 2009; Muganga et al., 2010). O IS representa o potencial efetivo do extrato para o parasito em relação a citotoxicidade. Um valor de IS elevado sugere maior segurança do extrato bruto, considerando que ele terá maior seletividade pelo parasito do que para a célula de mamífero. Os extratos que possuem uma alta seletividade, com valores de  $IS > 10$  são potencialmente mais seguros na pesquisa por novas opções terapêuticas (Weniger et al., 2001; Vonthron-Sénécheau et al., 2003; Lenta et al., 2007; de Mesquita et al. 2007).

Na Tabela 5 estão especificados os valores de IS dos extratos para os três parasitos utilizados nos testes biológicos. Pode-se observar que os extratos ativos em *T. cruzi* não foram seletivos para o parasito, pois todos tiveram valores de  $IS < 10$ . O extrato hexânico da raiz de *S. odoratissima* apresentou IS de 34,8 para *P. falciparum* e de 8,6 para *L. (L.) chagasi*, o que demonstra que um mesmo extrato pode apresentar uma maior especificidade por um parasito do que por outro.

**Tabela 5:** Citotoxicidade dos extratos em células NIH-3T3 de fibroblastos de mamífero e os respectivos índices de seletividade para os protozoários estudados.

Plantas	Órgãos vegetais (Solventes)	Células NIH-3T3 IC <sub>50</sub> µg/mL	IS	IS	IS
			<i>P. falciparum</i>	<i>L. (L.) chagasi</i>	<i>T. cruzi</i>
<i>A. tomentosum</i>	R (d)	452,25 ± 0,1	67,5	-	-
<i>C. brasiliense</i>	MR (d)	813,57 ± 0,3	121,4	29,5	-
	CR (d)	136,97 ± 0,03	14,4	-	1,4
<i>C. urucurana</i>	MC (h)	1562,7 ± 0,1	446,5	-	-
<i>D. hispida</i>	R (a)	435,8 ± 0,16	435,8	23,1	4,8
	CC (d)	1214,1 ± 0,03	126,5	-	-
<i>K. coriacea</i>	CC (d)	285,24 ± 0,11	32,8	-	-
<i>S. versicolor</i>	F (d)	199,81 ± 0,51	64,4	-	1,9
<i>S. odoratissima</i>	F (a)	187,16 ± 0,04	20,3	-	3,4
	R (h)	191,72 ± 0,4	34,8	8,6	-
<i>S. terebinthifolius</i>	F (d)	205,19 ± 0,33	32	-	-

R: raiz; MR: madeira da raiz; CR: casca da raiz; CC: casca do caule; F: folha; d: diclorometano; h: hexano; a: acetato de etila; -: não determinado.

IS: índice de seletividade

O extrato acetato de etila das raízes de *D. hispida* que demonstrou atividade em todos os alvos testados neste trabalho não foi citotóxico, apresentando IC<sub>50</sub> em NIH-3T3 de 435,8 µg/mL. Esse resultado faz com que esse extrato seja interessante para estudo. Não existem relatos sobre a citotoxicidade de *D. hispida*, porém outras espécies do gênero foram investigadas anteriormente. Buenz et al. (2007) verificaram a citotoxicidade do extrato hidroalcoólico das folhas de *D. seychellarum* e descreveram sua capacidade em causar apoptose em linfócitos T com doses superiores a 100 µg/mL. Esse fato foi justificado pela presença de naftoquinonas, que induziram a apoptose por meio da inibição das topoisomerases (Ting et al., 2003).

*S. versicolor*, conhecida popularmente como mata-barata, é usada como inseticida. A toxicidade desta espécie pode ser devido à presença de compostos do tipo quassinóides, comuns em espécies desta família. A literatura descreve a toxicidade de *S. versicolor* em camundongos (Bhatnagar et al., 1984). No teste em células NIH-3T3 o extrato diclorometânico das folhas desta espécie apresentou IC<sub>50</sub> de 199,8 µg/mL, com IS de 64,4 para *P. falciparum* podendo, portanto, ser considerado um extrato com maior seletividade pelo parasito do que para as células de mamífero.

O extrato hexânico da madeira do caule de *C. urucurana* e diclorometânico da casca do caule de *D. hispida* apresentaram IC<sub>50</sub> 1562,7 e 1214,1 µg/mL, respectivamente, em NIH-3T3, não sendo, portanto, tóxicos para estas células. Já o extrato diclorometânico da casca da raiz de *C. brasiliense* apresentou IC<sub>50</sub> de 136,9 µg/mL em NIH-3T3, mas o IS em *P. falciparum* foi de 14,4, demonstrando, portanto seletividade para este parasito. De Mesquita et al. (2009) relataram que este mesmo extrato apresentou IC<sub>50</sub> de 3,0 µg/mL em células tumorais.

A avaliação da citotoxicidade foi importante para ajudar na escolha dos extratos que passariam para a etapa de fracionamento químico bioguiado. Pois o nosso interesse era encontrar um extrato ativo, porém, com baixa citotoxicidade no modelo de células de mamífero utilizado.

## 2.6. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

A escolha dos fungos utilizados neste trabalho se deve a necessidade de se encontrar novos compostos com atividade em leveduras que hoje são as maiores causas de infecções fúngicas em todo o mundo. Além disso, existe o crescente aparecimento de cepas resistentes aos fármacos utilizados hoje no tratamento clínico (Pfaller et al., 2005).

Trinta e dois extratos com atividade de inibição superior a 75% em *P. falciparum* foram avaliados em levedura por meio do teste de difusão em ágar (Figura 38).

Os 32 extratos brutos avaliados pertenciam a dezessete espécies de plantas, sendo doze provenientes do caule, treze das folhas e sete das raízes. O total de extratos ativos em leveduras na concentração de 100 µg/mL foi: *Candida albicans* ATCC 10231 (4), *Candida krusei* LMGO 174 (15), *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (5), *Cryptococcus neoformans* LMGO 02 (12), *Cryptococcus gattii* LMGO 01 (18) (Tabela 6). O controle negativo DMSO 100% não interferiu no teste visto que não formou nenhum halo de inibição quando testado puro. O Fluconazol não formou halo e o itraconazol formou halos de 22 mm em *C. neoformans* LMGO 02 e de 26 mm em *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. gattii* LMGO 01.

Dois extratos apresentaram excelente atividade para as cepas *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida krusei* LMGO 174, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Cryptococcus neoformans* LMGO 02, *Cryptococcus gattii* LMGO 01: extrato acetato de etila da raiz de *D. hispida*, que formaram halos entre 13 e 23 mm e o extrato etanólico de folhas de *Byrsonima crassa*, que formaram halos entre 11 e 41 mm.

Um problema que podemos encontrar no teste de difusão em ágar é a dificuldade do extrato apolar em se difundir no meio de cultura, gerando erros na leitura dos resultados. Por isso, o teste de difusão em ágar é preliminar e pouco sensível, sendo importante a realização do teste de microdiluição para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

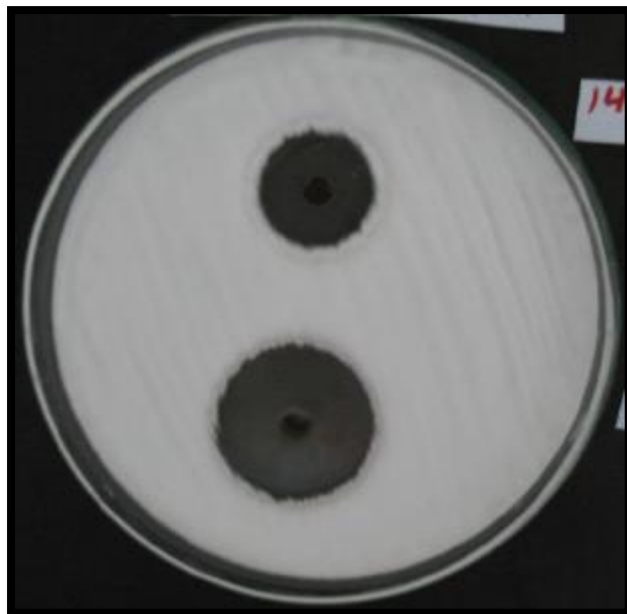
**Tabela 6:** Atividade dos extratos vegetais em leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* - halo de inibição (mm).

Planta	Parte da Planta (Solvente)	Fungos				
		<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. krusei</i> LMGO 174	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. neoformans</i> LMGO 02	<i>C. gattii</i> LMGO 01
<i>Aspidosperma tomentosum</i>	CC (d)	-	-	-	-	-
	F (hs)	-	11	-	-	-
	R (d)	11	20	-	-	17
<i>Byrsonima crassa</i>	F (hs)	-	14	-	-	-
	MC (d)	-	12	-	-	11
	F (h)	11	14	14	41	19
<i>Calophyllum brasiliense</i>	MC (d)	-	14	12	21	20
	CR (d)	-	10	-	-	-
	MR (d)	8	13	-	-	19
<i>Croton urucurana</i>	MC (h)	-	-	-	-	31
<i>Diospyros hispida</i>	CC (d)	-	-	-	-	-
	R (a)	13	16	13	23	18
<i>Enterolobium ellipticum</i>	F (h)	-	-	-	-	-
	F (d)	-	-	-	15	-
<i>Guarea guidonea</i>	R (h)	-	10	9	-	14
<i>Guarea Kunthiana</i>	F (e)	-	-	-	-	-
	C (h)	-	-	-	14	16



<i>Kielmeyera coriacea</i>	CC (d)	-	-	-	-	-
<i>Renealmia alpinia</i>	F (h)	-	-	-	-	15
<i>Schinus terebinthifolius</i>	F (d)	-	-	-	15	12
<i>Simarouba versicolor</i>	F (d)	-	-	-		12
	CR (e)	-	-	-	11	
<i>Siparuna cujabana</i>	C (h)	-	9	-	9	21
	C (e)	-	17	-		24
	F (h)	-	-	-	10	9
<i>Siparuna guianensis</i>	CC (h)	-	11	-	14	20
<i>Spiranthera odoratissima</i>	F (a)	-	11	-	-	-
	R (h)	-	-	-	-	11
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	F (d)	-	-	-	-	-
	MC (d)	-	-	-	-	-
	F (h)	-	-	-	10	-
<i>Talauma ovata</i>	MC (h)	-	17	12	-	15
Fluconazol		-	-	-	-	-
Itraconazol		-	-	28	21	25
DMSO 100%		-	-	-	-	-

*C. albicans*: *Candida albicans*; *C. krusei*: *Candida krusei*; *C. parapsilosis*: *Candida parapsilosis*; *C. neoformans*: *Cryptococcus neoformans*; *C. gattii*: *Cryptococcus gattii*; F: folha; C: caule (madeira+casca); CC: casca do caule; MC: madeira do caule; R: raiz (madeira+casca); CR: casca da raiz; MR: madeira da raiz; h: hexano; d: diclorometano; a: acetato de etila; e: etanol; hs: solução hidroalcoólica (90%); -: não formou halo de inibição.



**Figura 38:** Halos de inibição do crescimento fúngico. A leitura é feita pela medida do diâmetro do halo em milímetro.

Dos 32 extratos iniciais, 25 foram ativos em pelo menos um dos fungos e então escolhidos para avaliação da atividade pelo método de microdiluição (Tabela 7). Esses 25 extratos pertenciam a quinze espécies vegetais, sendo 84% (21) extratos de pouca ou média polaridade (hexânicos, diclorometânicos e acetato de etila), e somente 16% (4) de alta polaridade (etanólicos e hidroalcoólicos).

Não existe consenso na literatura de qual valor da concentração inibitória mínima (CIM) deve ser considerado para qualificar um extrato de planta como promissor para o fracionamento. Alguns autores consideram um extrato potente quando o valor de CIM é inferior a 1000  $\mu\text{g/mL}$  (Webster et al., 2008) enquanto outros consideram CIM < 500  $\mu\text{g/mL}$  (Algiannis et al., 2001). Nós consideramos os extratos com CIM  $\leq$  125  $\mu\text{g/mL}$  como sendo extratos ativos.

**Tabela 7:** Atividade dos extratos vegetais - CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) em leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*.

Planta	Parte da Planta (Solvente)	Fungos				
		<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>
		ATCC 10231	LMGO 174	ATCC 22019	LMGO 02	LMGO 01
<i>Aspidosperma tomentosum</i>	F (hs)	>1000	>1000	>1000	500	>1000
	R (d)	500	31,25	250	31,25	125
<i>Byrsonima crassa</i>	F (hs)	250	500	3,9	31,25	>1000
	MC (d)	250	125	62,5	125	62,5
	F (h)	1000	500	250	250	62,5
<i>Calophyllum brasiliense</i>	MC (d)	125	125	125	250	250
	CR (d)	15,62	250	31,25	62,5	1,95
	R (d)	7,8	7,8	15,62	3,9	1,95
<i>Croton urucurana</i>	MC (h)	>1000	62,5	>1000	500	500
<i>Diospyros hispida</i>	R (a)	250	500	250	15,62	250
<i>Enterolobium ellipticum</i>	F (d)	>1000	250	1000	1000	250
<i>Guarea guidonea</i>	R (h)	500	250	500	125	>1000
<i>Guarea kunthiana</i>	C (h)	1000	31,25	>1000	>1000	250
<i>Renealmia alpinia</i>	F (h)	500	250	250	250	250
<i>Schinus terebinthifolius</i>	F (d)	125	250	250	31,25	31,25
<i>Simarouba versicolor</i>	F (d)	250	500	250	125	125
	CR (e)	>1000	1000	>1000	>1000	>1000

<i>Siparuna cujabana</i>	C (h)	250	500	250	500	250
	C (e)	1000	62,5	500	500	500
	F (h)	>1000	62,5	>1000	1000	250
<i>Siparuna guianensis</i>	CC (h)	500	250	250	500	62,5
<i>Spiranthera odoratissima</i>	F (a)	>1000	1000	>1000	>1000	500
	R (h)	250	125	125	-	31,25
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	F (h)	>1000	250	1000	1000	250
<i>Talauma ovata</i>	MC (h)	250	62,5	125	62,5	31,25
Fluconazol		16	2	4	6	4
Itraconazol		0,5	1	0,25	0,25	0,25
DMSO 100%		Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo

*C. albicans*: *Candida albicans*; *C. krusei*: *Candida krusei*; *C. parapsilosis*: *Candida parapsilosis*; *C. neoformans*: *Cryptococcus neoformans*; *C. gattii*: *Cryptococcus gattii*; F: folha; C: caule (madeira+casca); CC: casca do caule; MC: madeira do caule; R: raiz (madeira+casca); CR: casca da raiz; MR: madeira da raiz; h: hexano; d: diclorometano; a: acetato de etila; e: etanol; hs: solução hidroalcolica (90%); -: não testado.

Os extratos de *C. brasiliense* apresentaram importante atividade com CIM variando entre 1,95 e 250 µg/mL em *Candida* e *Cryptococcus*. O controle itraconazol apresentou CIM de 0,25 µg/mL para o isolado clínico *C. gattii* LMGO 01, e os extratos diclorometânicos da raiz e casca da raiz de *C. brasiliense* foram capazes de inibir o crescimento dos fungos com CIM de 1,95 µg/mL, sendo, portanto, comparáveis ao controle positivo. Os extratos diclorometânicos de *C. brasiliense* apresentaram CIM de: raiz - 7,8 µg/mL e casca da raiz- 15,62 µg/mL em *C. albicans* ATCC 10231. O extrato diclorometânico da madeira do caule foi ativo a 125 µg/mL para as espécies do gênero *Candida*. A atividade antimicrobiana desta espécie foi descrita em *Staphylococcus aureus* (Yassunaka et al., 2005; Souza et al., 2009).

Reyes-Chilpa et al. (1997) demonstraram que o extrato metanólico e as xantonas naturais e acetiladas isoladas de *C. brasiliense* mostraram importante atividade fungistática para *Postia placenta*, um fungo que ataca madeiras. Souza et al. (2009) mostraram que os extratos hexânicos e diclorometânicos da casca do caule desta espécie inibiu o crescimento de *Helicobacter pylori*, com CIM de 31 e 125 µg/mL, respectivamente. O mesmo estudo mostrou que grupos de camundongos com úlcera gástrica tratados por via oral com estes extratos mostraram significativa redução da área ulcerada.

Cottiglia et al. (2004) relataram que *C. brasiliense* produz ácidos derivados de cromanona com elevado potencial antibacteriano, principalmente em *Bacillus cereus* e *Staphylococcus epidermidis*. São muitos os relatos sobre a atividade antibacteriana da espécie, porém pouco é pesquisado sobre a atividade antifúngica. Morel et al. (2002) relataram a atividade de *Calophyllum caledonicum* em *C. albicans*. Hay et al. (2003) relataram a atividade antifúngica de xantonas encontradas em *C. brasiliense*.

No teste de difusão em ágar o extrato hexânico das folhas de *Byrsonima crassa* (Malpighiaceae) inibiu o crescimento das cinco leveduras, formando halos de inibição entre 11 e 41 mm. Quando avaliado no teste de microdiluição este extrato apresentou atividade somente em *Cryptococcus gattii* LMGO 01, com CIM de 62,5 µg/mL. O extrato hidroalcoólico das folhas de *B. crassa*, que no primeiro teste foi ativo somente em *C. krusei* LMGO 174, com halo de inibição de 14 mm, mostrou CIM de 3,9 e 31,25 µg/mL em *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. neoformans* LMGO 02.

Espécies de *Byrsonima* são popularmente conhecidas como murici. As cascas e folhas de *Byrsonima crassa* são usadas tradicionalmente como febrífugas ou para tratar úlcera, gastrite e diarreia (Silva et al., 2001). A atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos de raízes e caule de *B. crassifolia* foi descrita por Martinez-Vasquez et al. (1999), enquanto Berger et al. (1998) relataram a atividade tripanocida. A espécie *B. verbascifolia* mostrou atividade antiviral (Lopez et al., 2001). Os extratos metanólicos das folhas das espécies *B. fagifolia*, *B. basiloba* e *B. intermedia* são descritos por mostrarem atividade em *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Salmonella* sp. e *Shigella* sp. a uma concentração de 30 mg/mL (Michelin et al., 2008). A investigação fitoquímica de três espécies: *B. crassifolia*, *B. microphylla* e *B. verbascifolia* demonstrou a ocorrência de esteróides, triterpenos, ésteres aromáticos, aminoácidos e proantocianidinas (Rastrelli et al., 1997). Sannomiya et al. (2005) relataram o isolamento de amentoflavona, quercetina-3-O- $\beta$ -D-galactopiranosídeo e quercetina-3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosídeo do extrato metanólico das folhas de *B. crassa*.

O extrato acetato de etila das raízes de *Diospyros hispida* ativo em todos os alvos estudados apresentou boa atividade em *C. neoformans* LMGO 02 com CIM de 15,62  $\mu$ g/mL. A literatura mostra compostos isolados de espécies do mesmo gênero com atividade antimicrobiana. As naftoquinonas, diospirina e isodiospirina, isoladas da raiz de *D. piscatoria*, demonstraram largo espectro de atividade antibacteriana. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) de diospirina em *Streptococcus pyogenes* ATCC 12344 e *Streptococcus pneumoniae* ATCC 33400 foram de 1,56 e 50  $\mu$ g/mL, respectivamente, e em *Salmonella choleraesuis* sorotipo *typhi* ATCC 6539 e *Mycobacterium chelonae* ATCC 19977 de 25 e 100  $\mu$ g/mL, respectivamente.

A naftoquinona crassiflorona e a cumarina gerberinol, extraídas de *D. anisandra* e *D. crassiflora* foram descritas pela atividade em espécies de *Candida* (Tangmouo et al., 2006; Borges-Argães et al., 2007; Dzoyem et al., 2007). As naftoquinonas diospirona, crassiflorona e plumbagina extraídas de *D. canaliculata* e *D. crassiflora* tiveram atividade relatada para *Mycobacterium smegmatis* e a diospirona ainda inibiu o crescimento de *Neisseria gonorrhoeae* (Kuate et al., 2009).

A espécie *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) mostrou importante atividade, sendo que o extrato diclorometânico das folhas inibiu as espécies *C. albicans* ATCC 10231 (CIM 125  $\mu$ g/mL), *C. neoformans* LMGO 02 e *C. gattii* LMGO

01 (CIM 31,25 µg/mL). A atividade antioxidante das partes aéreas desta espécie foi descrita por Velázquez et al. (2003). O extrato hidroalcoólico das folhas mostrou atividade em *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, e em *Candida albicans* (Martinez et al., 1996). O extrato etanólico da casca do caule de *S. terebinthifolius* demonstrou atividade em cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* (de Lima et al., 2006). Guerra et al. (2000) relatou a atividade deste extrato em *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa*. O óleo essencial de *S. terebinthifolius* é usado para o tratamento respiratório, micoses e uso tópico em infecções por *Candida*, atividades atribuídas devido à alta concentração de monoterpenos presentes (de Lima et al., 2006). Hegnauer (1964) isolou compostos do tipo triterpenos, fenóis e flavonóis.

Schmourlo et al. (2005) avaliaram o extrato aquoso das folhas de *S. terebinthifolius* em *C. neoformans*, *C. albicans* e *Trichophyton rubrum*, encontrando atividade para *C. albicans* com CIM de 120 µg/mL. O nosso trabalho mostrou atividade do extrato diclorometânico nas duas espécies de *Cryptococcus* testadas com CIM de 31,25 µg/mL. Braga et al. (2007) avaliaram o extrato metanólico das folhas desta espécie e determinou CIM de 125 µg/mL em *C. albicans* ATCC 18804.

Em nosso estudo, o extrato acetato de etila das raízes de *D. hispida* apresentou CIM de 15,62 µg/mL em *C. neoformans* LMGO 02. É a primeira vez que a atividade desta espécie é descrita para *C. neoformans*.

O extrato hexânico das folhas de *Renealmia alpinia* apresentou halo de 15 mm e CIM de 250 µg/mL em *C. gattii* LMGO 01. Membros da família Zingiberaceae são muito utilizados na medicina tradicional no tratamento de infecções fúngicas, inclusive a espécie *R. alpinia* (Fenner et al., 2006).

O extrato diclorometânico das raízes de *Aspidosperma tomentosum* foi ativo, em nossos testes, com valores de CIM de 31,25 µg/mL em *C. krusei* LMGO 174 e *C. neoformans* LMGO 02 e de 125 µg/mL em *C. gattii* LMGO 01. Tanaka et al. (2006) avaliaram o extrato metanólico da casca do caule de *A. tomentosum* em bactérias Gram-positivas, *Bacillus subtilis* (CIM 250 µg/mL) e *Staphylococcus aureus* (CIM 500 µg/mL). As ramiflorinas, alcaloides extraídos desta espécie, mostraram atividade em *S. aureus* (CIM 25 µg/mL) e *Enterococcus faecalis* (CIM 50 µg/mL).

*Croton urucurana* (Euphorbiaceae), conhecido popularmente como sangue de dragão, utilizada para o tratamento de feridas infeccionadas, úlceras, diarreia, reumatismo e câncer demonstrou em estudos anteriores atividade antiviral,

antidiarréica, antibacteriana, antifúngica e cicatrizante (Peres et al., 1997; Gurgel et al., 2001). A literatura reporta a presença de esteróis, proantocianidinas e diterpenos (Peres et al., 1997). Nos nossos estudos o extrato hexânico da madeira do caule desta espécie apresentou CIM de 62,5 µg/mL em *C. krusei* LMGO 174. A atividade antimicrobiana de *C. urucurana* é bastante conhecida, o extrato liofilizado do látex apresentou atividade para os fungos dermatófitos *Trichophyton tonsurans* e *T. rubrum* com CIM de 1,25 e 2,5 mg/mL, respectivamente (Gurgel et al., 2005).

O extrato hexânico das raízes de *S. odoratissima* foi ativo para os isolados clínicos *C. krusei* LMGO 174 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 com valores de CIM de 125 µg/mL; e para *C. gattii* LMGO 01 com CIM de 31,25 µg/mL. Nesse trabalho foram pela primeira vez relatadas as atividades antifúngicas desta espécie.

Os extratos etanólico do caule e hexânico do fruto de *Siparuna cujabana* (Siparunaceae) apresentaram CIM de 62,5 µg/mL em *C. krusei* LMGO 174. E o extrato hexânico da casca do caule de *S. guianensis* também apresentou CIM de 62,5 µg/mL em *C. gattii* LMGO 01.

O extrato diclorometânico das folhas de *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) apresentou CIM de 125 µg/mL para as duas espécies de *Cryptococcus* avaliadas.

O extrato hexânico do caule de *Guarea kunthiana* (Meliaceae) apresentou CIM de 31,25 µg/mL em *C. krusei* LMGO 174; e o extrato hexânico da raiz de *G. guidonea* CIM de 125 µg/mL em *C. neoformans* LMGO 02. As espécies *G. guidonia* e *G. polymera* foram avaliadas em *P. falciparum*, *T. cruzi* e *Leishmania* sp. e mostraram boa atividade *in vitro* (Weniger et al., 2001). Em nossos experimentos, os extratos de *Guarea* mostraram um índice de inibição em *P. falciparum* menor que 90%. Constituintes do tipo terpenoides foram extraídos de *G. kunthiana* (Garcez et al., 2004).

O extrato hexânico de madeira do caule de *Talauma ovata* apresentou atividade em diferentes cepas: *C. krusei* LMGO 174 e *C. neoformans* LMGO 02 (CIM de 62,5 µg/mL), em *C. parapsilosis* ATCC 22019 (CIM de 125 µg/mL) e *C. gattii* LMGO 01 (CIM de 31,25 µg/mL). O amplo espectro de atividade é importante, quando se considera o surgimento de resistência aos antifúngicos disponíveis.

Sundar et al. (2010) e Galanis et al. (2009) demonstraram que a anfotericina B pode ser usada como leishmanicida e antifúngico, diferindo apenas a dose utilizada em cada tratamento. Brendler et al., 2002; Del Poeta et al., 1998 e Bell et al., 1990

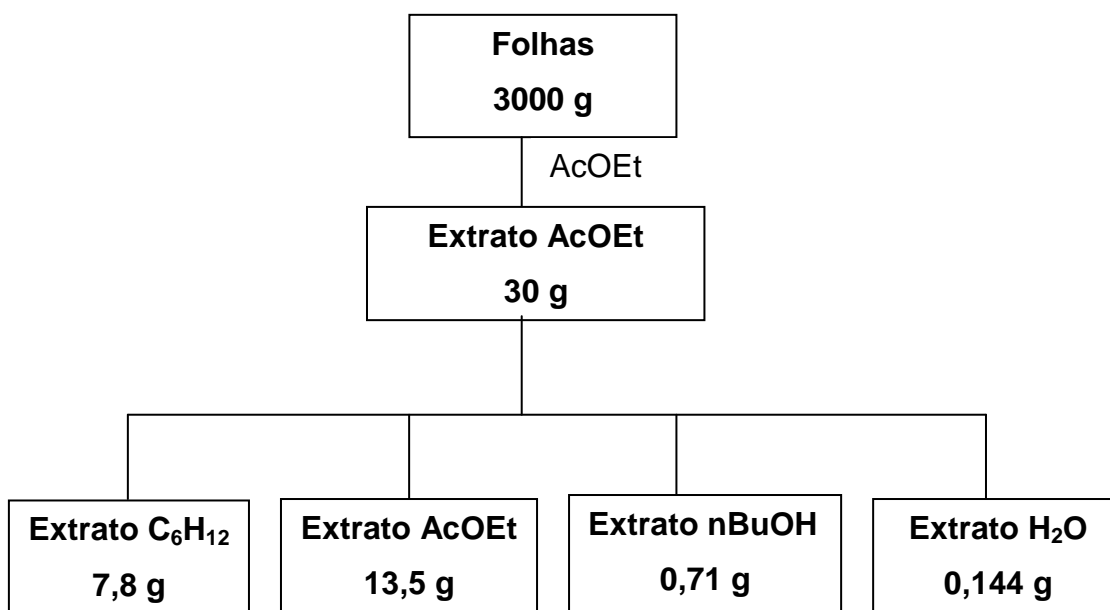


relataram que os compostos aromáticos dicatiônico a base de pentamidina, tais como 2,5-bis [2-(5-amidino) cloridrato] pirrol e benzimidazol 2,7-bis [2-(5 isopropilamidino-N)] mostraram atividade, com valores de concentração fungicida mínima em *C. albicans* de 0,78 e 12,5 µg/mL, respectivamente. Outros compostos à base de pentamidina, tais como 2,5-bis (4-aminofenil)furano e di-(isopropilanilina) apresentaram atividade em *Leishmania donovani* com valores de IC<sub>50</sub> de 2,76 e 83,96 µg/mL, respectivamente.

Apesar do extrato diclorometânico da raiz de *Calophyllum brasiliense* ter demonstrado boa atividade, com valores de CIM entre 15,62 e 1,95 µg/mL em todas as leveduras testadas, nós escolhemos inicialmente aprofundar este estudo com as espécies *Diospyros hispida* e *Spiranthera odoratissima*, pois estas possuem poucos estudos relatados na literatura.

## 2.7. ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Spiranthera odoratissima*

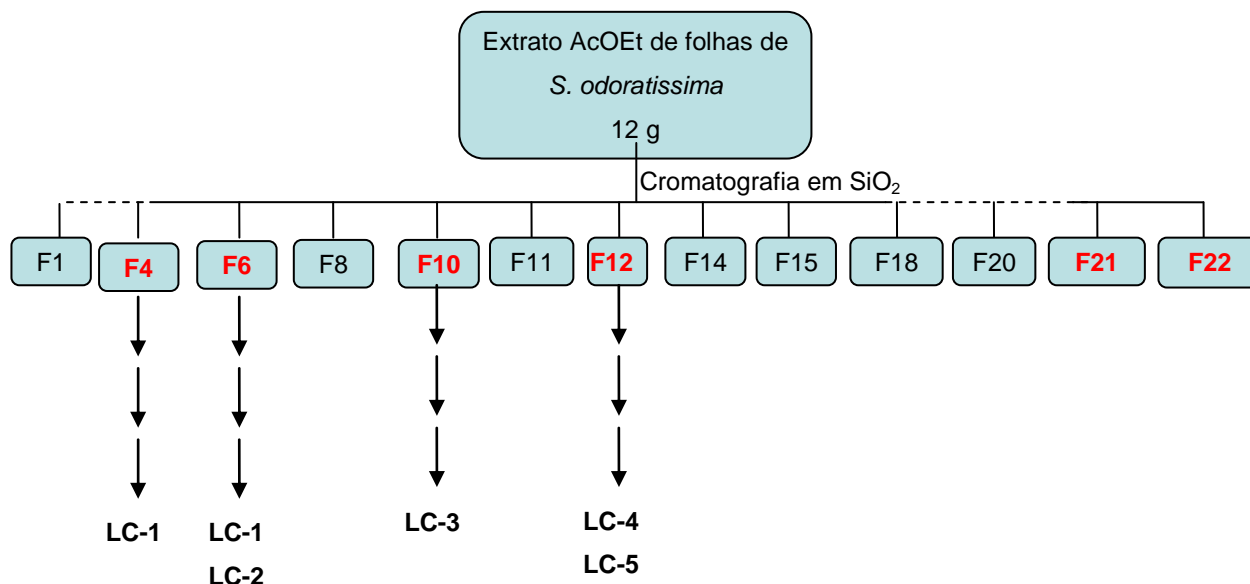
A extração do pó das folhas desta espécie foi realizada com AcOEt. Um primeiro fracionamento a partir deste extrato (8 g) mostrou problemas na identificação dos compostos por causa da presença de derivados lipídicos em grande quantidade. Uma parte deste extrato (21 g) foi então submetido à partição com água seguida por uma extração sucessiva com solventes de polaridade crescente, como podemos ver no esquema abaixo (Figura 39). Este procedimento de partição nos permitiu retirar os lipídios do extrato AcOEt com ciclohexano para que assim fosse feita uma purificação eficaz. A fração AcOEt foi a ativa em *P. falciparum*.



**Figura 39:** Procedimento de extração das folhas de *S. odoratissima*.

O fracionamento do extrato acetato de etila das folhas de *S. odoratissima* gerou 22 frações que foram testadas em *P. falciparum*. As frações que inibiram acima de 90% dos parasitos a uma concentração de 10 µg/mL foram consideradas ativas.

As frações 4, 6, 10, 12, 21 e 22 apresentaram porcentagem de inibição no parasito maior que 96%, e por isso foram selecionadas para dar continuidade ao estudo, conforme podemos observar no fluxograma abaixo (Figura 40).



**Figura 40:** Fluxograma de purificação do extrato AcOEt das folhas de *S. odoratissima*.

A purificação das diferentes frações foi realizada por cromatografia em coluna aberta de sílica gel, por MPLC, por CCD preparativa, bem como por cromatografia de exclusão estérica em Sephadex<sup>®</sup> LH-20.

Das quatro frações purificadas, cinco compostos foram isolados e identificados. A seguir, será descrito a elucidação estrutural dos compostos isolados, baseado nos dados espectrométricos (IV, EM, RMN 1D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C), e 2D COSY, HSQC, HMBC e NOESY). Para os compostos conhecidos, uma comparação com os dados da literatura permitiu a confirmação das estruturas.

### 2.7.1. Determinação estrutural dos compostos obtidos

Os compostos isolados foram intitulados pela sigla LC. Dois terpenos foram isolados, o composto LC-1 que é um sesquiterpeno e LC-3 que é um esterol. O composto LC-2 é uma lignana, enquanto o LC-4 e LC-5 são compostos do tipo acilfloroglucinol poliprenilado policíclico.

### Estrutura de LC-1: 6 $\alpha$ -acetoxi,1 $\beta$ -hidroxieudesm-4(15)-eno

O composto LC-1 foi isolado na forma de um cristal opticamente ativo com  $[\alpha]_D^{20} = -24^\circ$  (c 0,10; CHCl<sub>3</sub>). O espectro de massa HRESI-TOF realizado em modo positivo revelou a presença de um íon molecular protonado  $[M+H]^+$  a  $m/z$  281,1982 que corresponde à fórmula bruta C<sub>17</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub> (calc. para C<sub>17</sub>H<sub>29</sub>O<sub>3</sub>: 281,2109), o que sugere 4 graus de insaturação. No espectro ESI-TOF aparece ainda íons à  $m/z$  441  $[2M+H]^+$ , 319  $[M+K]^+$ , 303  $[M+Na]^+$ , 221  $[M-CH_3CO_2H]^+$ . O pico mais intenso foi observado à  $m/z$  203  $[M-H_2O-CH_3CO_2H]^+$ , o que sugere a presença de um grupamento hidroxila e um grupamento acetato no composto analisado. As bandas de absorção observadas no espectro IV a 3448 e 1732 cm<sup>-1</sup> reforçam a presença do grupamento hidroxila e carbonila, enquanto que os picos a 1458, 1250 e 1020 cm<sup>-1</sup> correspondem às funções etilênicas. A banda a 1651 cm<sup>-1</sup> é característica de um grupamento exometileno.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto LC-1 (Figura 41) obtido apresentou 17 sinais de carbonos sendo 3 quaternários em  $\delta$  43,3; 147,0 e 173,1; 5 terciários em  $\delta$  27,4; 50,3; 54,8; sendo 2 oximetínicos em  $\delta$  72,5 e 79,7; 5 metilenos em  $\delta$  19,1; 33,1; 36,3; 37,3 e 107,5 e 4 metílicos em  $\delta$  12,2; 16,4; 21,1 e 21,6.

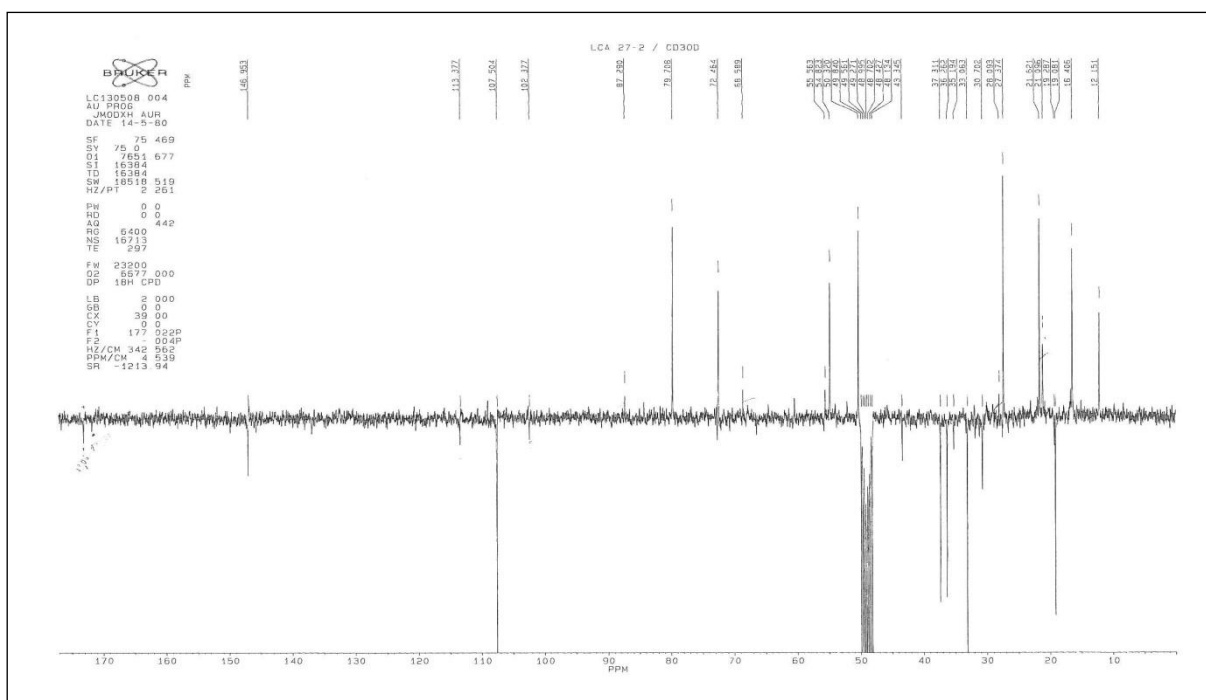
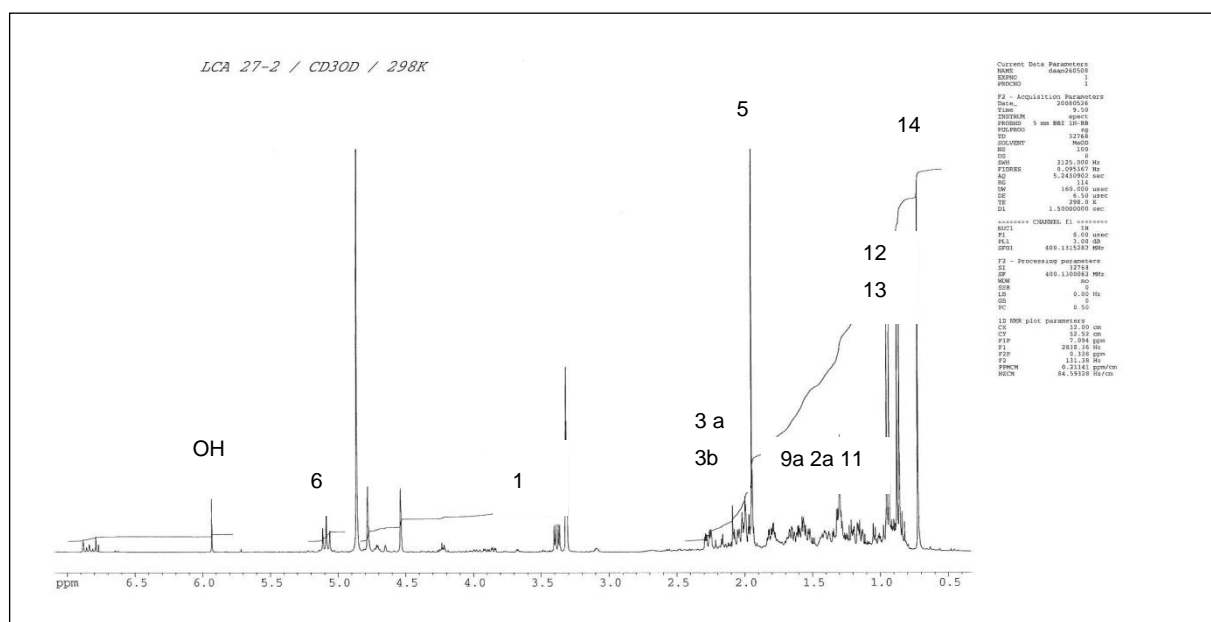


Figura 41: Espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto LC-1 (CD<sub>3</sub>OD, 300 Hz).

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto LC-1 (Figura 42) aparecem os sinais correspondentes a uma metila angular em  $\delta$  0,72, uma metila na forma de um simpleto em  $\delta$  1,95, e duas metilas na forma de dupletos em  $\delta$  0,85 (3H, d,  $J = 6,9$  Hz) e  $\delta$  0,93 (3H, d,  $J = 6,9$  Hz) e um hidrogênio em  $\delta$  1,61 característico de um grupamento isopropila. Os sinais de oito hidrogênios alifáticos estão presentes entre  $\delta$  1,11 e 2,0. Quatro outros sinais estão presentes entre  $\delta$  3,36 e 5,06.



**Figura 42:** Espectro de  $^1\text{H}$  do composto LC-1 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz).

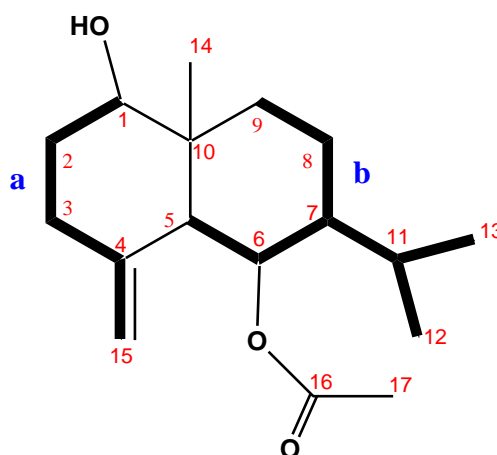
As interações diretas observadas no espectro HSQC entre hidrogênios e carbonos permitiram distinguir a sua natureza. Em primeiro lugar, os dois dupletos em  $\delta$  4,53 e 4,77, que possuem uma fraca constante de acoplamento ( $J = 1$  Hz) se correlacionam com o carbono em  $\delta$  107,5 e são característicos de uma dupla ligação exocíclicas. Por outro lado, o hidrogênio em  $\delta$  3,36 correlaciona com o carbono em  $\delta$  79,7, e o hidrogênio em  $\delta$  5,06 correlaciona ao carbono  $\delta$  72,5.

Levando em consideração as quatro insaturações na molécula, a presença de uma carbonila e de uma dupla ligação sugere que este composto é um sesquiterpeno bicíclico.

O espectro COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  colocou em evidência as duas subestruturas **a** e **b** da seguinte forma: o hidrogênio em  $\delta$  3,36 (H-1) acopla com os dois H em  $\delta$  1,48 e em  $\delta$  1,77 (H<sub>2</sub>-2) ligados ao carbono em  $\delta$  33,1 (C-2). Esses últimos acoplam com os

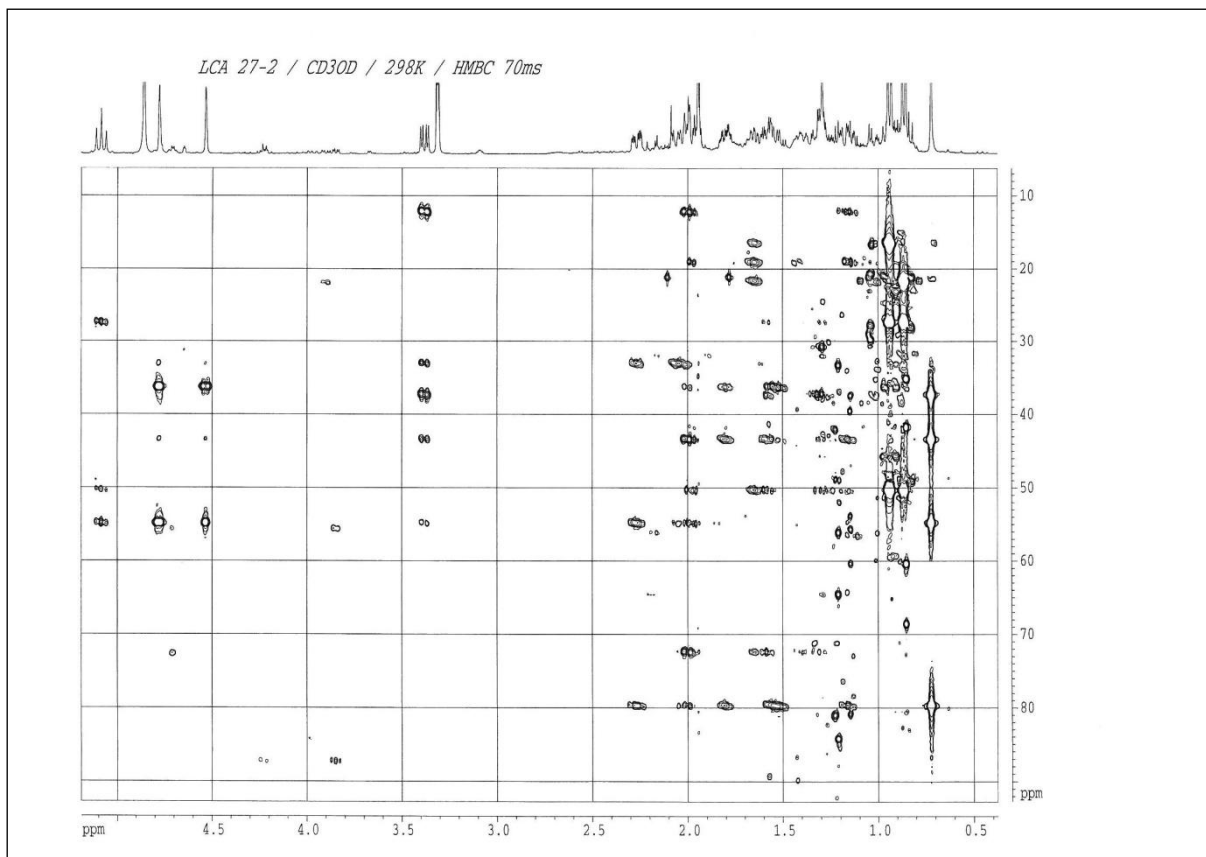
hidrogênios em  $\delta$  2,0 e à 2,24 (H<sub>2</sub>-3) pertencentes ao carbono  $\delta$  36,3 ppm (C-3). O H  $\delta$  2,0 (H-3) acopla com os H em  $\delta$  4,53 e 4,77 (H<sub>2</sub>-15). Essas correlações reunidas permitiram definir a subestrutura **a** (Figura 43).

A metila em  $\delta$  0,85 (CH<sub>3</sub>-13) está fortemente acoplada com o hidrogênio em  $\delta$  1,61 (H-11) ligado ao carbono à  $\delta$  27,4 (C-11). Esse último está ligado com o hidrogênio da metila à  $\delta$  0,93 (CH<sub>3</sub>-12) definindo, portanto, um grupamento isopropila. Um acoplamento foi observado entre o hidrogênio à 1,61 ppm (H-11) e o hidrogênio  $\delta$  1,35 (H-7) ligado ao carbono à  $\delta$  50,3 (C-7), que por sua vez se relaciona à sua volta com hidrogênios metilênicos à  $\delta$  1,24 e  $\delta$  1,56 ligados ao carbono em  $\delta$  19,1 (C-8), que estão acoplados aos hidrogênios equivalentes à  $\delta$  1,11 e 1,96 ligados ao carbono em  $\delta$  37,3 (C-8). Outro acoplamento foi observado entre o hidrogênio H-7 e o hidrogênio à  $\delta$  5,06 (H-6), que está também acoplado com o hidrogênio em  $\delta$  1,99 pertencente ao carbono  $\delta$  54,8 ppm (C-5). Estes dados permitiram definir a subestrutura **b**.



**Figura 43:** Estrutura química do 6-acetoxy,1-hydroxyeudesm-4(15)-eno isolado com as correlações obtidas do COSY.

A união das estruturas **a** e **b**, bem como a obtenção da estrutura plana deste composto, foram possíveis graças às correlações dos hidrogênios e dos carbonos de longa distância observadas no espectro HMBC (Figura 44).



**Figura 44:** Espectro HMBC do composto LC-1 (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz)

Os hidrogênios do grupamento metila em  $\delta$  0,72 (CH<sub>3</sub>-14) apresentam correlação com os carbonos  $\delta$  37,3 (C-9); 54,8 (C-5) e 79,7 (C-1) e com o carbono quaternário  $\delta$  43,3 (C-10), o que permitiu ligar os dois ciclos via C-10. As correlações suplementares de H-5 com o carbono quaternário em  $\delta$  147,0 (C-4) e o carbono metilênico sp<sup>2</sup> (C-15) permitiu a junção dos dois ciclos via C-5.

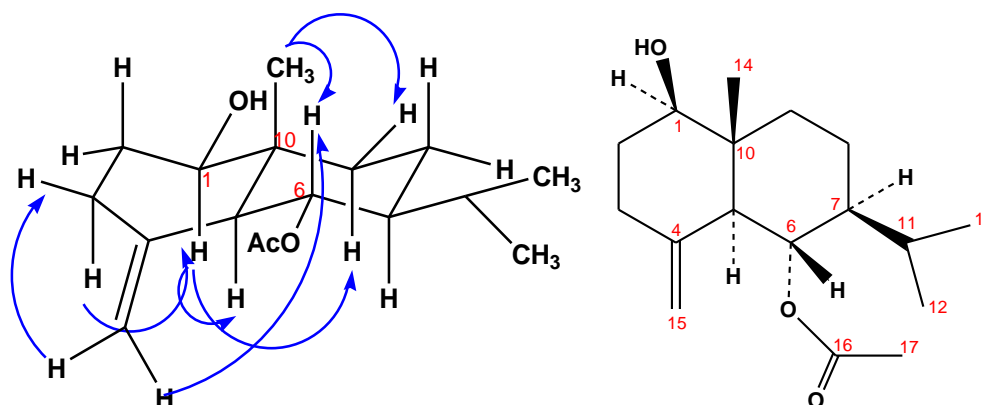
A presença do grupamento acetoxila foi colocada em evidência pelas interações dos hidrogênios H-5; H-6 e CH<sub>3</sub>-17 pertencente ao carbono  $\delta$  21,1 ppm com a carbonila à  $\delta$  173,1.

A estrutura deste composto foi estabelecida como sendo o 6-acetoxi, 1-hidroxi, 4(15)-eudes-meno. A configuração relativa foi estabelecida pela análise do espectro de <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY e as constantes de acoplamento.

O hidrogênio H-1 encontra-se em posição pseudoaxial e estabeleceu uma relação *trans* diaxial com H-2<sub>ax</sub> ( $J = 11,6$  Hz) e uma relação com H-2<sub>éq</sub> ( $J = 4,8$  Hz). Isto implica em dizer que o grupamento hidroxila OH-1 esteja em posição pseudoequatorial. As correlações do hidrogênio H-1 com H-5, H-2<sub>b</sub>, H-3<sub>b</sub> e H-9<sub>b</sub>

mostraram que eles estão situados do mesmo lado que H-7 que correlaciona com H-5. Esses hidrogênios adotam uma orientação  $\alpha$ -axial, o que implica que o grupamento isopropila se encontra em posição  $\beta$ -equatorial (Figura 45).

O hidrogênio H-6 possui uma constante de acoplamento de  $J = 10,4$  Hz com H-5 e H-7, e está também em posição axial. Este próton correlaciona com os grupamentos metilas CH<sub>3</sub>-14 e CH<sub>3</sub>-13, bem como com H-15b. Por outro lado, CH<sub>3</sub>-14 correlaciona com H-8a ( $\beta$  axial) e H-9a ( $\beta$  equatorial).



**Figura 45:** Correlações  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY e estrutura do composto LC-1 isolado do extrato AcOEt das folhas de *S. odoratissima*.

A estrutura do composto LC-1 foi determinada como sendo o  $6\alpha$ -acetoxi, $1\beta$ -hidroxi-4(15)-eudesmeno, um sesquiterpeno do tipo selinano ou eudesmano. Esse composto foi obtido por uma reação biomimética a partir do epoxigermacreno-D (Niwa, 1978). A reação do epoxigermacreno D na presença do ácido acético forneceu o  $6\alpha$ -acetoxi, $1\beta$ -hidroxi-4(15)-eudesmeno e  $1\beta,6\alpha$ -dihidroxi-eudesm-4(15)-eno ou volenol e 4 outros sesquiterpenos do tipo opositano.

Foi também obtido na forma racêmica por destilação do diacetato voleneol racêmico isolado a partir de *Lepidotrichilia volensii* (Hoffmann et al., 1978). O voleneol foi isolado a partir de várias plantas como *Ambrosia elatior* (Ohmoto et al., 1987); *Senecio microglossus* (Bohlmann et al., 1983) e *Artemisia eriopoda* (Feng Hu et al., 1996).

A pesquisa bibliográfica mostrou que o composto LC-1 nunca tinha sido isolado a partir de uma planta. Portanto LC-1 foi isolado de *Spiranthera odoratissima*.



Os dados do RMN podem ser visualizados na Tabela 8. Nesta estão incluídos os dados de correlações HMBC e NOESY do composto LC-1.

**Tabela 8:** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (75,47 MHz) e  $^1\text{H}$  (400,13 MHz) do composto LC-1.

N°	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$ , multipeto (J em Hz)	COSY	HMBC (H para C)	NOESY
1	79,7	3,36, dd, (4,8; 11,6)	2	2, 5, 9, 10, 14	5, 2b, 3b, 9b
2b	33,1	1,48, m	1, 3	1, 3, 4, 10	1
a		1,77, dddd, (2,5; 4,8; 10,0;14,9)			3a
3b	36,3	2,0, m	2, 15	1, 2, 4, 5, 15	1, 2b
a		2,24, ddd, (2,2, 4,9, 12,9)			2a, 15
4	147,0	-			
5	54,8	1,99, m	6	1, 3, 4, 10, 14, 15	1, 5
6	72,5	5,06, t, (10.4)	5,7	4, 5, 7, 11, 16	14, 13, 15b
7	50,3	1,35, m	8, 11	6, 8	5, 11, 12
8b	19,1	1,24, m	7, 9, 11		14
a		1,56, m			
9b	37,3	1,11, m	8	5, 6, 7, 8, 10	1
a		1,96, m			14
10	43,3	-			
11	27,4	1,61, m	7, 8, 12, 13	6, 8, 7, 12, 13	7, 12, 13
12	21,6	0,93, d, (6,9)	11	7, 11, 13	11
13	16,4	0,85, d, (6,9)	11	7, 11, 12	11
14	12,2	0,72, s		1, 5, 9, 10	6, 8a, 9a
15b	107,5	4,53, d, (0,95)	3	2, 3, 4, 5, 10	6, 14
a		4,77, d, (0,95)			3a
16	173,1	-			
17	21,1	1,95, s		16	

O mesmo composto foi isolado a partir da fração F-4. As análises de RMN 1D e 2D foram realizadas em  $\text{CDCl}_3$ . Nos vegetais a biossíntese dos sesquiterpenos inicia-se com a condensação dos pirofosfatos de dois isoprenóides, o pirofosfato de geranilo com o pirofosfato de isopentenilo, originando o pirofosfato de farnesilo. O

pirofosfato de farnesilo é o precursor de todos os sesquiterpenos. A oxidação a partir do farnesilo pirofosfato via germacreno D irá provavelmente dar origem ao composto LC-1. O germacreno D é descrito na literatura como o precursor biossintético de muitas classes de sesquiterpenos (Adio, 2009).

### **Estrutura do composto LC-2: Sesamina**

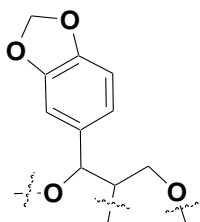
O composto foi isolado na forma de sólido amorfo. Seu espectro de massas foi obtido em HRESI-TOF no modo positivo e mostrou a presença de um íon pseudomolecular  $[2M+H]^+$  à  $m/z$  709,2465 que nos permitiu deduzir uma fórmula bruta de  $C_{20}H_{18}O_6$ , que implica em 12 graus de insaturação. Picos à  $m/z$  377  $[M+Na]^+$ , 337  $[M+H-H_2O]^+$  foram observados.

O seu espectro RMN de  $^{13}C$  obtido em  $CDCl_3$  mostrou os sinais de 10 carbonos sendo 3 quaternários em  $\delta$  147,9; 147,0 e 135,1; 5 terciários em  $\delta$  54,3 e 85,8 que correspondem a um oximetínico;  $\delta$  106,5 ; 108,1 e 119,3; 2 oximetilenos à  $\delta$  71,7 e 101,0. A molécula parece duplicada ou sob forma de dímero, o que foi confirmado pela aparência simplificada do espectro  $^1H$  que coloca em evidência a presença de 3 hidrogênios aromáticos, de um simpleto intenso à  $\delta$  5,93 que é integrado por 2 hidrogênios, de um dubleto à  $\delta$  4,69, de dois duplos-dubletos à  $\delta$  3,83 e  $\delta$  4,19 e de um quadrupeto à  $\delta$  3,02.

A análise do espectro HSQC mostra hidrogênios metilênicos em  $\delta$  3,83 e 4,19 que correlacionam com o carbono em  $\delta$  71,7 , enquanto os dois hidrogênios à  $\delta$  5,93 são equivalentes e estão ligados ao carbono em  $\delta$  101,1. Existe uma superposição de dois hidrogênios aromáticos à  $\delta$  6,76 que estão ligados aos carbonos em  $\delta$  108,1 e 119,3.

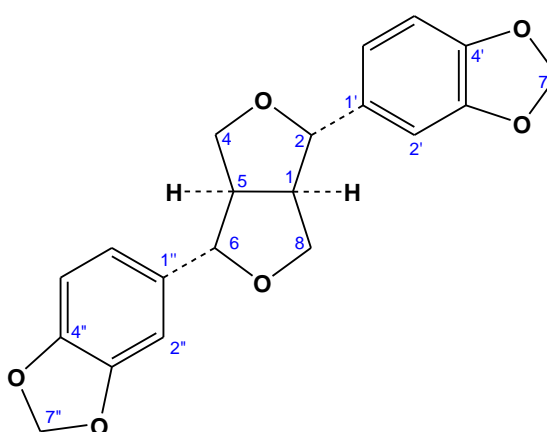
O espectro COSY colocou em evidência o acoplamento do hidrogênio em  $\delta$  3,02 com os hidrogênios à  $\delta$  3,83 e 4,19 e com o hidrogênio à  $\delta$  4,69 ligado ao carbono  $\delta$  85,8. Este por sua vez se correlaciona com os dois hidrogênios formando assim uma subunidade  $CH_2(O)-CH-CH(O)$ . Uma correlação fraca é observada entre o hidrogênio à  $\delta$  4,69 com os hidrogênios aromáticos em  $\delta$  6,73 e 6,82, o que prova que a parte alifática está ligada a parte aromática.

Essas informações são reforçadas pelas interações à longa distância evidenciadas no espectro HMBC entre o hidrogênio à  $\delta$  6,82 ligado ao carbono à  $\delta$  106,5 e aos carbonos em  $\delta$  85,8; 108,1; 119,3; 135,1; 147,1 e 147,9. Além do mais o hidrogênio em  $\delta$  5,93 correlaciona com os carbonos em  $\delta$  147,1 e 147,9. Estas observações permitiram montar a subestrutura demonstrada na figura 46:



**Figura 46:** Subestrutura do composto LC-2 obtida da análise do espectro HMBC.

A correlação do hidrogênio em  $\delta$  3,02, ligado ao carbono a  $\delta$  54,3, com os carbonos a  $\delta$  85,8 e 135,1, permitiu mostrar a existência de uma segunda subestrutura semelhante. O que explica a fraca correlação deste hidrogênio,  $\delta$  3,02, com o carbono  $\delta$  71,7, que se encontra em  $^3J$  e não em  $^2J$ . Isto indica que H-1 correlaciona com C-4 e inversamente H-5 correlaciona com C-8. Existe, portanto, uma ciclização entre as duas subestruturas e a formação de dois núcleos furânicos. A estrutura plana deste composto que é uma lignana foi, portanto, determinada de acordo com sua fórmula bruta (Figura 47).

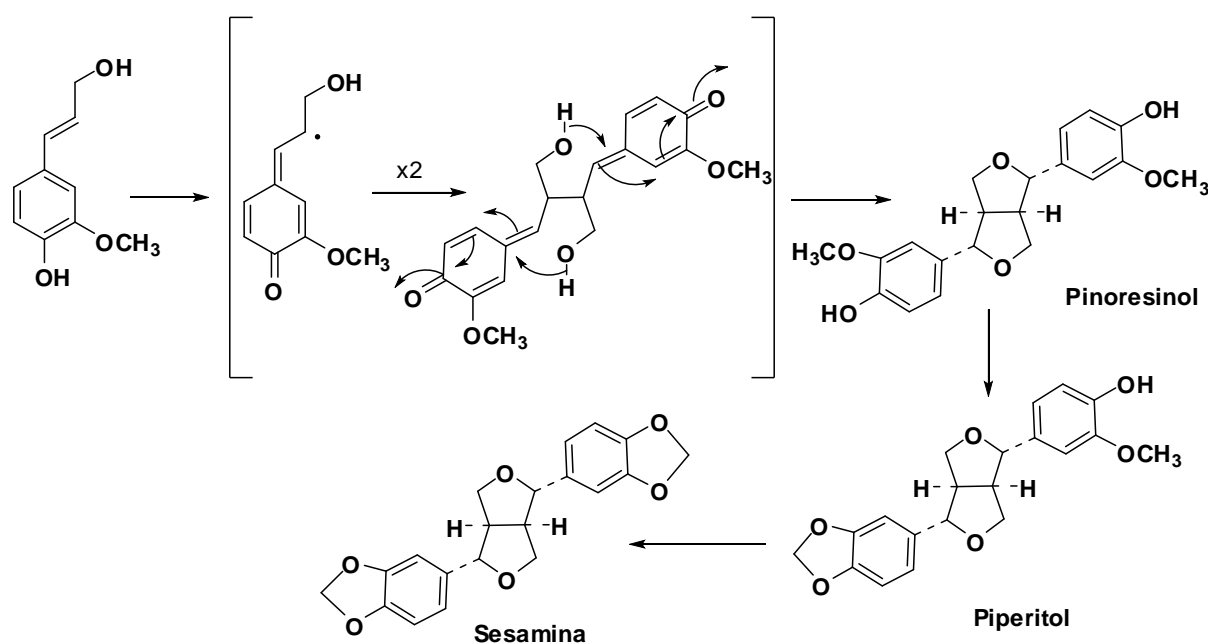


**Figura 47:** Estrutura do composto LC-2 ou sesamina isolado do extrato AcOEt das folhas de *S. odoratissima*.

A estereoquímica relativa foi determinada pela análise do espectro NOESY. Os hidrogênios H-2 e H-6 correlacionam com os hidrogênios 4 b ou 8b, respectivamente, e estão situados no mesmo plano da molécula. Uma correlação muito fraca foi observada entre H-1 e H-2 devido à proximidade, mas esses dois hidrogênios não estão situados no mesmo plano da molécula.

Esse composto está descrito na literatura, isolado a partir de várias plantas em particular as da família Rutaceae. Os dados espectrais (Tabela 9) encontrados na análise dos dados estão em conformidade com os publicados na literatura (Nan-Jun et al., 1987; Jayasinghe et al., 2003; Meselhy, 2003).

Do ponto de vista biossintético (Figura 48), a reação das duas moléculas de álcool coniferílico catalisado pelas enzimas forneceu o pinosinol e a formação de dois grupos metilenodioxílicos (Bayindir et al. 2008)



**Figura 48:** Esquema da biogênese da sesamina

**Tabela 9:** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (75,47 MHz) e  $^1\text{H}$  (400,13 MHz) do composto LC-2 em  $\text{CDCl}_3$ .

Nº	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$ , multiplicidade (J em Hz)	COSY	HMBC (H para C)	NOESY
1	54,3	3,02, q, (0,87)	2, 8	2, 5, 1'	2', 6'
2	85,8	4,69, d, (4,4)	1, 8, 2', 6'	1, 4, 8, 1', 2', 6'	4b/8b
4b	71,7	3,83, dd, (3,7; 9,2)	5, 6	1, 5, 2, 6, 1"	2/6
a		4,19, dd, (6,9; 9,2)			
5	54,3	3,02, q, (0,87)	4, 6	1, 6, 1"	2", 6"
6	85,8	4,69, d, (4,4)	4, 5, 2", 6"	4, 5, 8, 1", 2", 6"	4b/8b
8b	71,7	3,83, dd, (3,7; 9,2)	1, 2	1, 5, 2, 6, 1'	2/6
a		4,19, dd, (6,9; 9,2)			
1'	135,1	-			
2'	106,5	6,82, d, (1,5)	2, 6'	2, 1', 3', 4', 5', 6'	1
3'	147,9	-		-	
4'	147,1	-		-	
5'	108,1	6,76, m	6'	1', 3'	
6'	119,3	6,76, m	2, 5'	2, 2', 4'	1
7'	101,1	5,93, s		3', 4'	
1"	135,1	-		-	
2"	106,5	6,82, d, (1,5)	6, 6"	6, 1", 3", 4", 5", 6"	5
3"	147,9	-		-	
4"	147,1	-		-	
5"	108,1	6,76, m	2"	1", 3",	
6"	119,3	6,76, m	6, 2"	6, 2", 4"	5
7"	101,1	5,93, s		3", 4"	

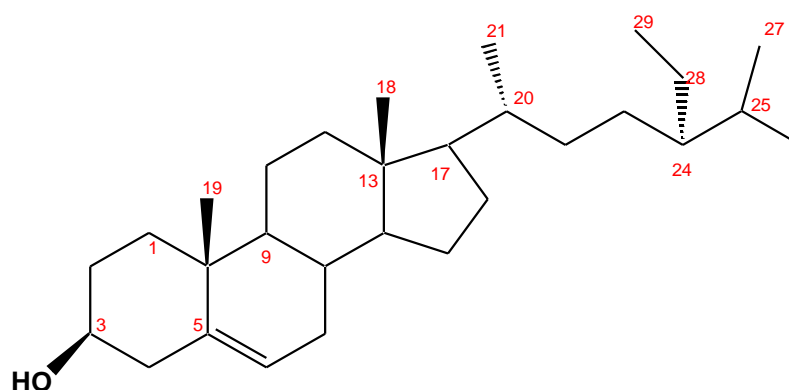
### Estrutura do composto LC-3: $\beta$ sitosterol

O espectro RMN  $^{13}\text{C}$  obtido em  $\text{CDCl}_3$  apresentou 29 sinais, dos quais 3 quaternários, 9 terciários, sendo um oximetínico, 11 secundários e 6 primários. No espectro RMN de  $^1\text{H}$  foi observado um sinal de um hidrogênio ligado a um carbono  $\text{sp}^2$  em  $\delta$  5,32, de um hidrogênio à  $\delta$  3,46, e de vários hidrogênios alifáticos entre

$\delta$  0,98 e 2,18 bem como de sinais intensos, onde alguns encontram-se sobrepostos entre  $\delta$  0,66 e 0,98. Este espectro é característico de compostos do tipo terpênico ou esterol.

O espectro de massa em alta resolução do composto indica a presença de um íon  $[M+H-H_2O]^+$  em  $m/z = 397,4030$  o que corresponde a fórmula bruta  $C_{29}H_{50}O$ , implicando em 4 graus de insaturação.

A análise dos espectros RMN 1D e 2D nos permitiu construir a estrutura deste esterol (Figura 49). Os dados RMN obtidos (Tabela 10) foram comparados com os dados do  $\beta$ -sitosterol (Nes et al., 1992).



**Figura 49:** Estrutura química do  $\beta$ -sitosterol isolado do extrato AcOEt das folhas de *S. odoratissima*.

**Tabela 10:** Dados RMN  $^{13}C$  (75,47 MHz) e  $^1H$  (400,13 MHz) de LC-3 em  $CDCl_3$ .

Nº	$\delta C$	$\delta H$ , multiplete (J em Hz)	COSY	HMBC (H para C)
1	37,3	1,77, m	2	2, 3, 5, 10, 19
2	31,6	1,41, m 1,77, m	1, 3, 4	1, 3, 4, 10
3	71,9	3,46, m	2, 4	
4	42,3	2,18, m	2, 3, 6	2, 3, 5, 6, 10
5	140,8	-	-	-
6	121,7	5,32, t,	4, 7	2, 4, 10
7	32,0	1,38, m 1,96, m	6	5, 6, 8, 14
8	32,1	1,40, m	15	4, 5, 6, 9
9	50,2	0,86, m	11, 12	
10	36,7	-	-	

11	21,1	1,37, m	12, 14	9, 10, 12
12	39,8	1,10, m 1,98, m	9, 14, 11	9, 11, 14, 18
13	42,4	-	-	
14	56,8	0,93, m	11, 12,15	13, 15, 18
15	24,3	0,98, m 1,45, m	8, 14, 16	13, 14, 16
16	28,2	1,21, m 1,77, m	15, 17	15, 17
17	56,1	1,04, m	16, 20	14, 16, 18
18	11,9	0,66, s	-	12, 13, 14, 17
19	19,4	0,98, s	-	1, 5, 9,10
20	36,2	1,28, m	17, 21, 22	17, 21
21	18,8	0,89, d,	20, 22	17, 20, 22
22	34,0	0,96, m 1,26, m	20, 21, 23, 24	17, 21, 23
23	26,2	1,11, m	22, 24	
24	45,9	0,86, m	22, 23, 25	
25	29,2	1,60, m	24, 27	23, 24, 26, 27, 28
26	19,1	0,78, d,		24, 25, 27
27	19,8	0,80, d,	25, 28	24, 25, 26
28	23,1	1,19, m	27, 29	23, 24, 25, 29
29	12,0	0,80, t,	28	24, 28

## Estrutura dos compostos LC-4 e LC-5

### LC-4

O composto LC-4 foi isolado na forma de um óleo amarelo viscoso. Ele é opticamente ativo,  $[\alpha]_D^{20} +13^\circ$  (c 0,17 ;  $\text{CHCl}_3$ ). Sua fórmula bruta,  $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_4$  foi deduzida de seu espectro de massa realizado em modo ESI-TOF em alta resolução a partir do íon protonado um pico foi observado em m/z 483,3485 (calc. para  $\text{C}_{31}\text{H}_{47}\text{O}_4$ : 483,3474), o que sugere nove graus de insaturação.

O espectro no infravermelho mostra bandas de absorção relativas à carbonilas saturadas e insaturadas à 1732 e 1662  $\text{cm}^{-1}$  e mostra ainda grupamentos etilênicos à 1543, 1446 e 840  $\text{cm}^{-1}$ .

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (acetona- $\text{d}_6$ , 400 MHz), observa-se desdobramento de picos característicos de uma mistura de dois isômeros, intitulados de **2A** e **2B**, em uma proporção 2/3 e 1/3 como indicado pela curva de integração. A presença de simpletos fortemente desblindados em  $\delta$  18,7 e 18,66 confirma a hipótese de uma mistura de dois tautômeros em equilíbrio ceto-enólico. Esses sinais são devido às ligações hidrogênio intramoleculares entre uma hidroxila e um grupamento cetona. Seis hidrogênios em  $\text{C sp}^2$  estão presentes entre  $\delta$  4,74 e 5,09, o que sugere a presença de três grupamentos isoprenilas para cada isômero. Foi observado hidrogênio a  $\delta$  3,06 para o isômero majoritário e a  $\delta$  3,11 para o minoritário. Muitos hidrogênios alifáticos estão presentes entre  $\delta$  1,65 e 2,77, enquanto os grupamentos metilas foram observados entre  $\delta$  0,75 e 1,67. Observou-se a superposição de muitos hidrogênios, o que dificultou a interpretação dos espectros.

A análise do espectro de HSQC permitiu distinguir todos os carbonos protonados da molécula e por comparação com o espectro de  $^{13}\text{C}$  foi possível deduzir os carbonos quaternários.

Em função da intensidade dos sinais, distinguiram-se as correlações entre hidrogênios e carbonos do isômero majoritário **2A** e do minoritário **2B**. O hidrogênio em  $\delta$  5,09 se correlaciona com o carbono à  $\delta$  120,8 e um à  $\delta$  4,75 com o carbono à  $\delta$  121,2. Essas correlações pouco intensas sugerem que elas pertencem ao isômero minoritário **2B**. As correlações mais fortes observadas são entre o hidrogênio em  $\delta$  5,02 e o carbono em  $\delta$  121,4, assim como o hidrogênio em  $\delta$  4,74 correlaciona com o carbono à  $\delta$  121,1, para o isômero majoritário **2A**.

Dois hidrogênios em  $\delta$  4,95 correlacionam com o carbono à  $\delta$  123,5, o que sugere uma superposição e significa que existe um mesmo deslocamento químico para os dois isômeros. Na região dos hidrogênios alifáticos, entre  $\delta$  1,5 e 1,7 surge uma superposição de metilenos sob forma de singleto e dubleto intensos e dois hidrogênios de um metino e de um metileno.

Foi possível distinguir que os carbonos metilenos ( $\text{CH}_2$ ) à  $\delta$  48,6; 43,1; 25,0; os metinos ( $\text{CH}$ ) à  $\delta$  30,8 e 43,3 e as metilas à  $\delta$  23,7; 22,7 e 16,3 aparecem no



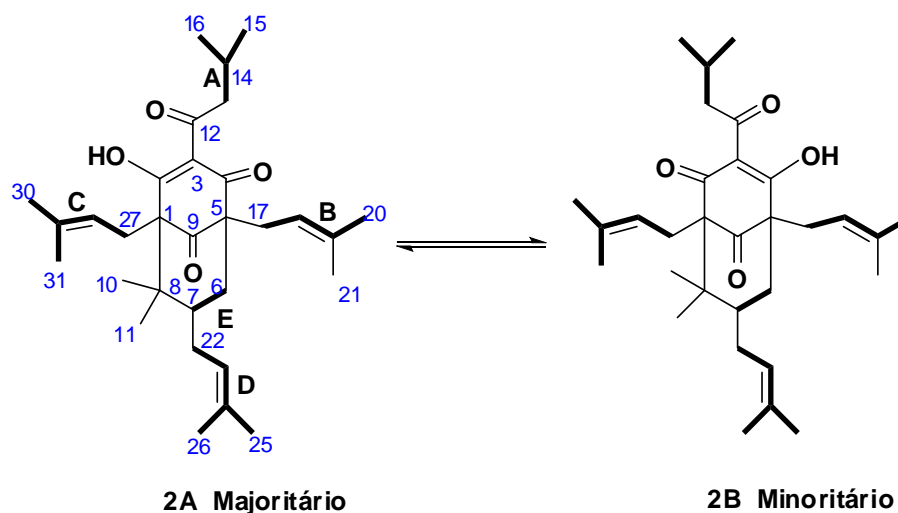
isômero **2A**. Os mesmos metilenos à  $\delta$  48,7; 42,1; 26,0; os metinos (CH) à  $\delta$  30,1 e 43,3, assim como as metilas à  $\delta$  23,0; 22,6 e 16,2 estão presentes no isômero **2B**. O metino à  $\delta$  27,0; o metileno à  $\delta$  29,0 e as metilas à  $\delta$  17,8; 18,3; 23,1; 26,2 e 26,3 estão presentes nos dois isômeros.

Os dados espectrais podem ser observados na tabela 11 para o **2A**, tautômero majoritário, e tabela 12 para o **2B**, o minoritário.

A análise do espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  confirma a presença dos dois isômeros **2A** e **2B** e coloca em evidência os cinco sistemas marcados em negrito na figura 50.

Os três grupamentos isoprenilas estão identificados pelo acoplamento do hidrogênio em C  $\text{sp}^2$  com os dois hidrogênios em  $\alpha$  e com um dos dois grupamentos metilas em  $\beta$ .

O hidrogênio H-7 está correlacionado com H<sub>2</sub>-6, enquanto H-14 está relacionado com o hidrogênio H<sub>2</sub>-13 e com as metilas CH<sub>3</sub>-14 e CH<sub>3</sub>-15. O acoplamento observado entre H-27 a e b com H-28 e com os singletos a  $\delta$  1,67 e 1,52 permitiu a atribuição de CH<sub>3</sub>-30 e 31.



**Figura 50:** Estrutura plana de LC-4, subestruturas obtidas de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (em negrito).

As correlações à longa distância observadas no espectro HMBC entre os hidrogênios enólicos e os diferentes carbonos permitiram a construção e a diferenciação dos núcleos floroglucinóis destes dois tautômeros.

Para o isômero **2A**: o próton enólico encontra-se à  $\delta$  18,78 e correlaciona de maneira intensa com os carbonos a  $\delta$  198,6 (C-2) e em  $\delta$  117,3 (C-3) e também com

os  $\delta$  48,6 (C-13); 69,0 (C-1) e 205,5 (C-12). Essas correlações sugerem que o hidroxil enólico está localizado em C-2 e sua proximidade com a carbonila à  $\delta$  205,5 bem como as interações dos hidrogênios H<sub>2</sub>-13, justificam a presença da cadeia isopentanoíla (ou cadeia acilada) em C-3 (subestrutura A).

As correlações do hidrogênio em  $\delta$  2,38 (H<sub>2</sub>-17) com os carbonos quaternários em  $\delta$  66,4 (C-5); 195,2 (C-4) e 207,6 (C-9) e com C-6, permitiram ligar os grupamentos isoprenilas (subestrutura B) ao ciclo A em C-5. Enquanto que à  $\delta$  2,60 e 2,71 (H<sub>2</sub>-27) estão ligados com a carbonila à  $\delta$  207,6; C-1; C-2 e C-8 permitiram ligar C5-C9-C1 e unir o grupamento isoprenila (subestrutura C) em C-1.

O H-6 à  $\delta$  1,93 se correlaciona com os carbonos em  $\delta$  29,0 (C-22); 30,8 (C-17); 43,3 (C-7); 48,3 (C-8); 66,4 (C-5); 195,2 (C-4) o que confirma as posições de C-4 e C-5 e permite ligar o grupamento isoprenila (subestrutura E) ao C-7.

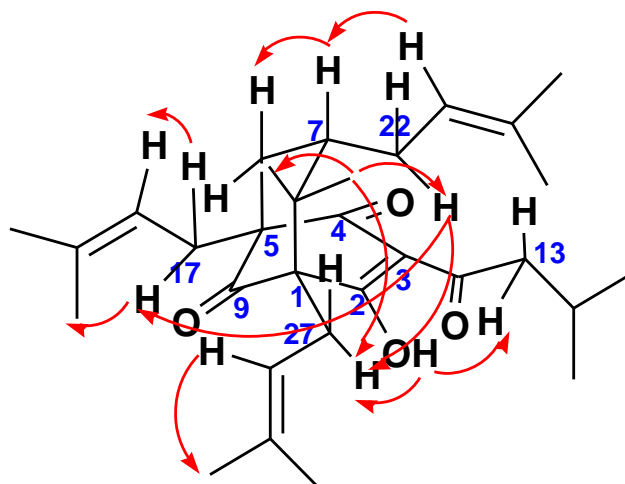
A formação do segundo ciclo em 6 pelas interações das metilas em  $\delta$  0,81 (CH<sub>3</sub>-10) e 1,20 (CH<sub>3</sub>-11) com C-1, C-7 e C-8. O isômero **2A** foi identificado como sendo o 2-hidroxi-8,8-dimetil-1,5,7-tri-(3metil-2-butenil)-3(2-metil-butanoíla) biciclo[3.3.1]non-3-en-4,9-diona.

Para o isômero **2B**, as correlações da hidroxila enólica à  $\delta$  18,66 com os carbonos à  $\delta$  199,7 (C-4) e a  $\delta$  116,8 (C-3) indicam que este está situado em C-4 (carbono enólico) e que o grupamento isopentanoíla (ou isovaleroíla) está ligado a este núcleo em C-3.

As correlações dos hidrogênios H<sub>2</sub>-27 com os carbonos quaternários à  $\delta$  72,0 (C-1); 195,2 (C-2); 48,2 (C-8); 207,6 (C-9), e as correlações de H<sub>2</sub>-17 com C-5 assim como as de H<sub>2</sub>-22 com o carbono à  $\delta$  43,0 (C-7), demonstram que as posições C-1, C-5 e C-7 são substituídas pelos grupamentos isoprenilas.

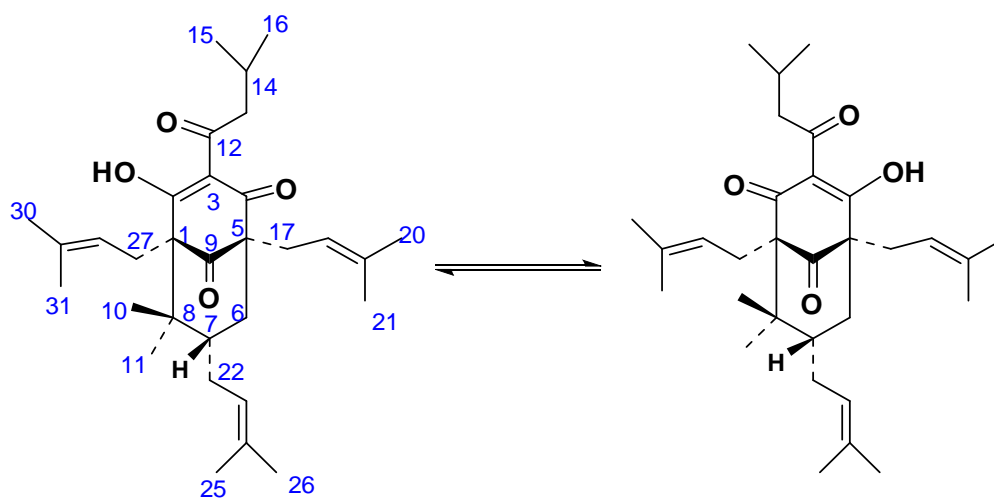
A posição das *gem*-dimetilas (CH<sub>3</sub>-10 e 11) no carbono quaternário C-8 foi determinada pelas correlações das metilas à  $\delta$  0,75 e 1,12 com o carbono à  $\delta$  42,1 (C-6) assim como  $\delta$  72,0 (C-1) e  $\delta$  48,2 (C-8) (Figura 51).

O isômero **2B** foi identificado como sendo o 4-hidroxi-8,8-dimetil-1,5,7-tri-(3-metil-2-butenil)-3(2-metil-butanoíla) biciclo[3.3.1]non-3-ene-2,9-diona.



**Figura 51:** Correlações  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY do composto LC-4 (isômero **2A**).

Todos estes dados (Tabelas 11 e 12) são compatíveis com a estrutura plana destes dois tautômeros. Esse composto não tinha sido descrito na literatura. Nós propusemos o nome comum de spiranthenona B (Figura 52).



**Figura 52:** Estruturas dos isômeros isolados de *Spiranthera odoratissima*.

Este composto é um policíclico poliprenilado acilfloroglucinol (PPAPS) ou acilfloroglucinol poliprenilado do tipo B, o que indica possuir uma cadeia acilada na posição 3 (Ciochina & Grossman, 2006). Essa estrutura está próxima da hiperpapuanona que foi isolada de *Hypericum papuanum*. Esta, a hiperpapuanona, é substituído em posição 3 por uma cadeia isobutanoíla e em 5 por uma metila (Winkelmann et al., 2001).

**Tabela 11:** Dados de  $^{13}\text{C}$  (75,47 MHz) e  $^1\text{H}$  (400,13 MHz) do isômero majoritário 2A em acetona d6 do composto LC-4:

Nº	$\delta$ C	$\delta$ H, multiplicidade (J em Hz)	COSY	HMBC (H para C)	NOESY
1	69,0	-	-		
2	198,6	-	-		
3	117,3	-	-		
4	195,2	-	-		
5	66,4	-	-		
6	43,6	1,49, m 1,93, dd, (3,9; 13,1)	7	4, 5, 7, 8, 17, 22	
7	43,3	1,66, m	6	4, 5, 6, 17, 22	
8	48,3	-	-		
9	207,6	-	-		
10	16,3	0,81, s	-	1, 7, 8, 11	
11	23,7	1,20, s	-	1, 7, 8, 10	
12	205,5	-	-		
13	48,7	2,74, m 3,06, dd, (6,7 ; 13,8)	14, 16	12, 14, 15, 16	
14	27,0	1,96, m	13, 15, 16	13, 15, 16	
15	23,1	0,93, t, (6,8)	13, 14	13, 14, 16	
16	22,7	0,90, t, (6,8)	13, 14	13, 14, 15	
17	30,8	2,38, m	18, 20	5, 6, 9	
18	121,4	5,02, m	17, 20, 21	17, 20, 21	
19	133,6 134,3	-	-		
20	26,3	1,52, s	-	18, 19, 20	
21	18,3	1,67, s	-	18, 19, 21	
22	29,0	1,69, m 2,12, m	23	7, 23, 24	
23	123,5	4,95, m	7, 22, 25, 25, 26 26		
24	133,6	-	-		

	134,3			
25	17,8	1,54, s	-	23, 24, 26
26	26,2	1,66, s	-	23, 24
27	25,0	2,60, dd, (5,2; 13,7) 2,71, m	28	1, 2, 8, 9, 28, 29
28	121,1	4,74, m	27, 30, 31	30, 31
29	134,3	-	-	
30	18,3	1,67, s	28	29, 31
31	26,3	1,52, s	28	29, 30
OH-2	-	18,78, s	-	1, 2, 3, 12, 13

**Tabela 12:** Dados de RMN em acetona d6 (LC-4): isômero minoritário do composto LC-4.

N°	δC	δH, multipletos (J em Hz)	COSY	HMBC (H para C)	NOESY
1	72,0	-	-		
2	195,2	-	-		
3	116,8	-	-		
4	199,7	-	-		
5	61,0	-	-		
6	42,1	1,68, m 2,05, m	7	5, 7	
7	43,1	1,65, m	6, 23	5, 6, 22	
8	48,2	-	-		
9	207,6	-	-		
10	16,2	0,75, s	-	1, 6, 8, 11	
11	23,0	1,12, s	-	1, 6, 8, 10	
12	205,5	-	-		
13	48,7	2,71, m 3,11, dd, (6,6 ; 13,8)	14	12, 14, 15, 16	
14	27,0	1,96, m	13, 15, 16	13, 15, 16	
15	23,1	0,93, d, (6,8)	13, 14	13, 14, 16	
16	22,6	0,89, d, (6,8)	13, 14	13, 14, 15	

17	30,1	2,53, t, (7,0)	18	5, 18, 19
18	120,8	5,09, t, (7,0)	17	
19	133,6	-	-	
	134,3			
20	26,4	1,65, s	-	18, 19, 20
21	18,3	1,67, s	-	18, 19, 21
22	29,0	1,69, m	23	7, 23, 24
		2,12, m		
23	123,5	4,95, m,	7, 22	
24	133,6	-	-	
	134,3			
25	17,8	1,54, s	-	23, 24, 26
26	26,2	1,66, s	-	23, 24
27	26,0	2,42, m	27	1, 2, 8, 9, 28, 29
		2,70, m		
28	121,2	4,75, m	26, 30, 31	30, 31
29	134,3	-	-	
30	18,3	1,67, s	28	29, 31
31	26,3	1,52, s	28	29, 30
OH-4		18,66, s		3, 4, 5, 12, 13

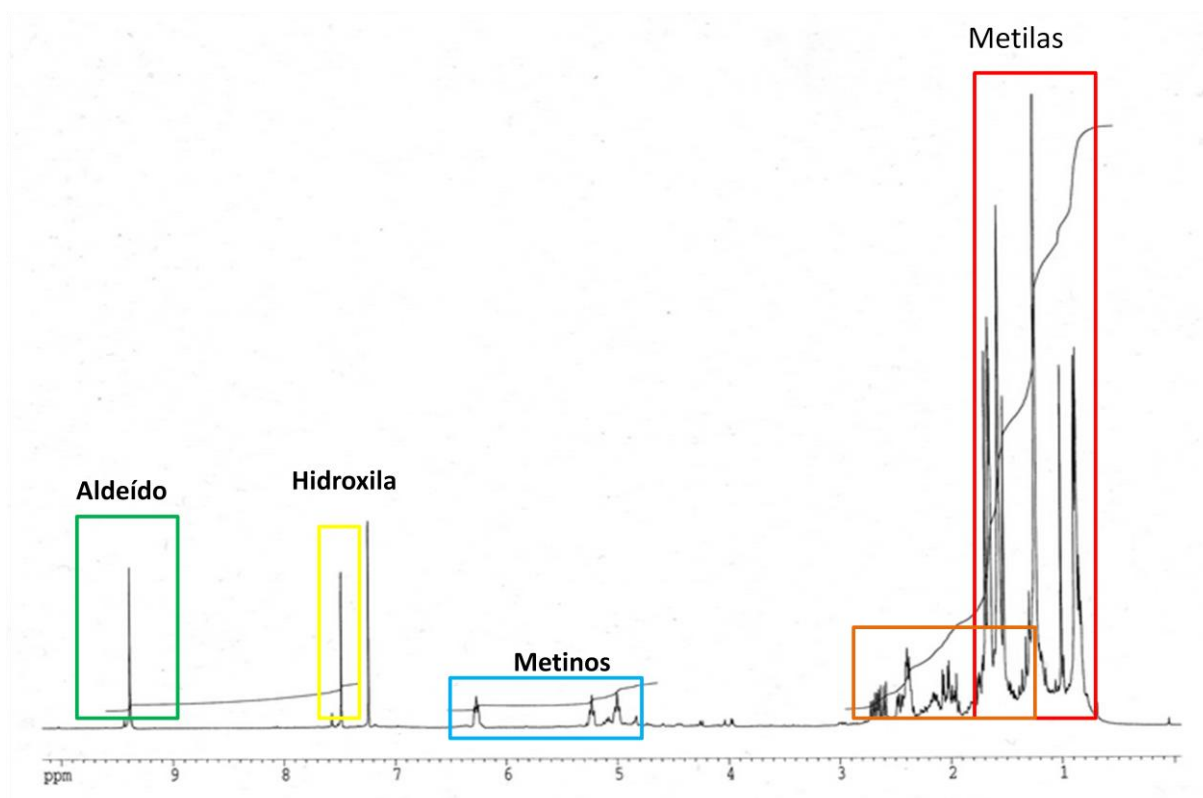
### LC-5

O composto LC-5 foi isolado na forma opticamente ativa,  $[\alpha]_D^{20} +11^\circ$  (c 0,19,  $\text{CHCl}_3$ ). Seu espectro de massa obtido em ESI-TOF em modo positivo possibilitou visualizar a presença de um íon pseudomolecular com  $m/z$  513,3217  $[\text{M}+\text{H}]^+$  correspondendo a fórmula bruta de  $\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{O}_6$  (calc. para  $\text{C}_{31}\text{H}_{45}\text{O}_6$ : 514,3216), o que sugere 10 graus de insaturação.

O espectro IV mostrou bandas de absorção a 1774, 1685  $\text{cm}^{-1}$ , características de um aldeído  $\alpha$  e  $\beta$  insaturado; a 1740  $\text{cm}^{-1}$  atribuída as funções carbonilas; 1458, 1215 e 756  $\text{cm}^{-1}$  correspondente as duplas ligações.

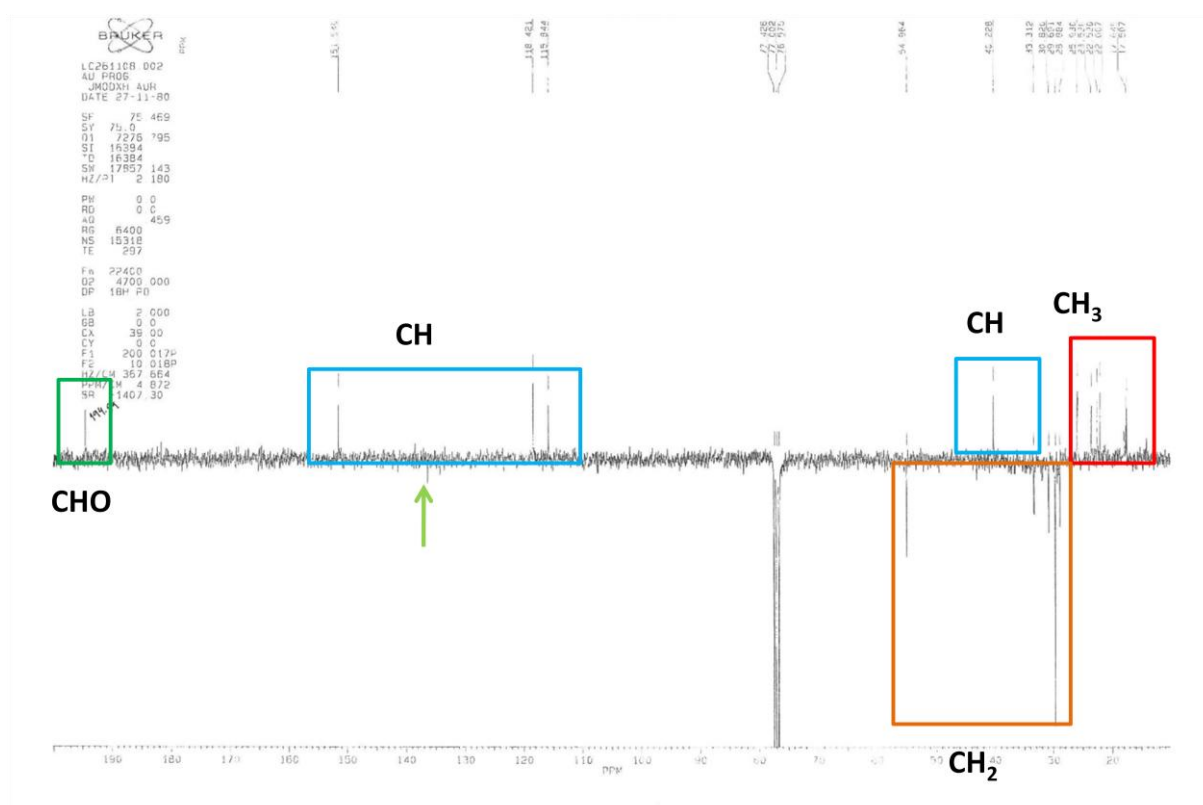
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto LC-5 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) (Figura 53) caracterizado pela presença de dois sinais singletos intensos à  $\delta$  9,38 e 7,48,

integrados cada um por um hidrogênio, de dois tripletos à  $\delta$  6,25 ; 5,21 e a  $\delta$  4,98, integrados cada um por um hidrogênio, correspondem a um dos hidrogênios etilênicos. Dois duplo-dubletos a  $\delta$  2,58, vários sinais entre  $\delta$  1,28 e 2,33 que correspondem aos hidrogênios alifáticos e sinais intensos entre  $\delta$  0,86 e 1,68 integrados por 3 H correspondem aos grupamentos metilas.



**Figura 53:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto LC-5 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

O espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto LC-5 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $J$  modulado) (Figura 54) mostra a presença de 16 sinais, dos quais 5 correspondem aos carbonos primários ( $\text{CH}_3$ ) à  $\delta$  17,5; 17,6; 22,0; 22,5 e 25,9; 5 carbonos secundários ( $\text{CH}_2$ ) à  $\delta$  23,0; 28,9; 30,8; 33,0 e 55,4; 4 carbonos terciários ou seja metinos ( $\text{CH}$ ) à  $\delta$  115,8; 118,4 e 151,5 bem como o carbono à  $\delta$  40,2. O sinal  $\delta$  194,5 é característico de uma carbonila e seu deslocamento químico sugere um grupamento aldeído. Não foram observados os sinais correspondentes aos carbonos quaternários presentes no composto, os quais foram obtidos apenas a partir da análise do espectro do HMBC. Além de, em função da fórmula bruta, constatar-se a superposição de carbonos.



**Figura 54:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto LC-5 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)

As atribuições dos hidrogênios e dos carbonos foram complementadas pela análise detalhada dos espectros de RMN-2D (Tabela 13). A análise do espectro HSQC (Figura 55) mostra as correlações diretas entre os hidrogênios e os carbonos. Esta permitiu visualizar um hidrogênio à  $\delta$  7,48, e a presença de uma metila blindada no carbono à  $\delta$  9,3.



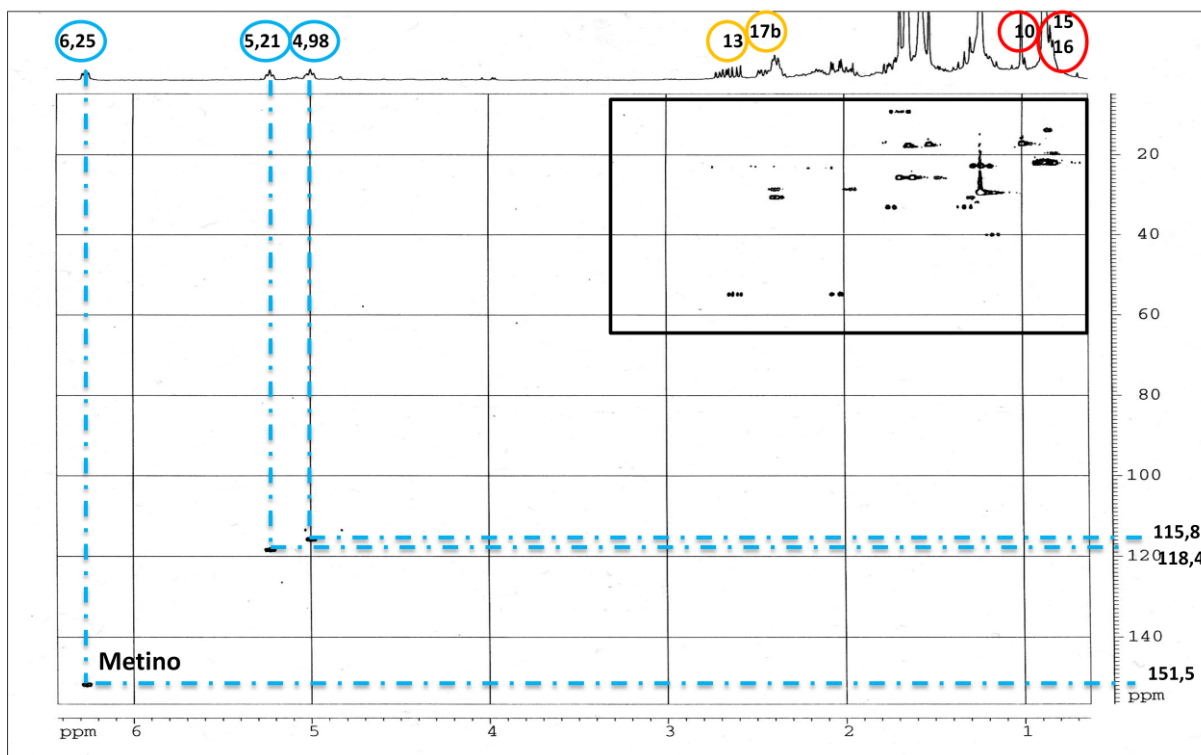
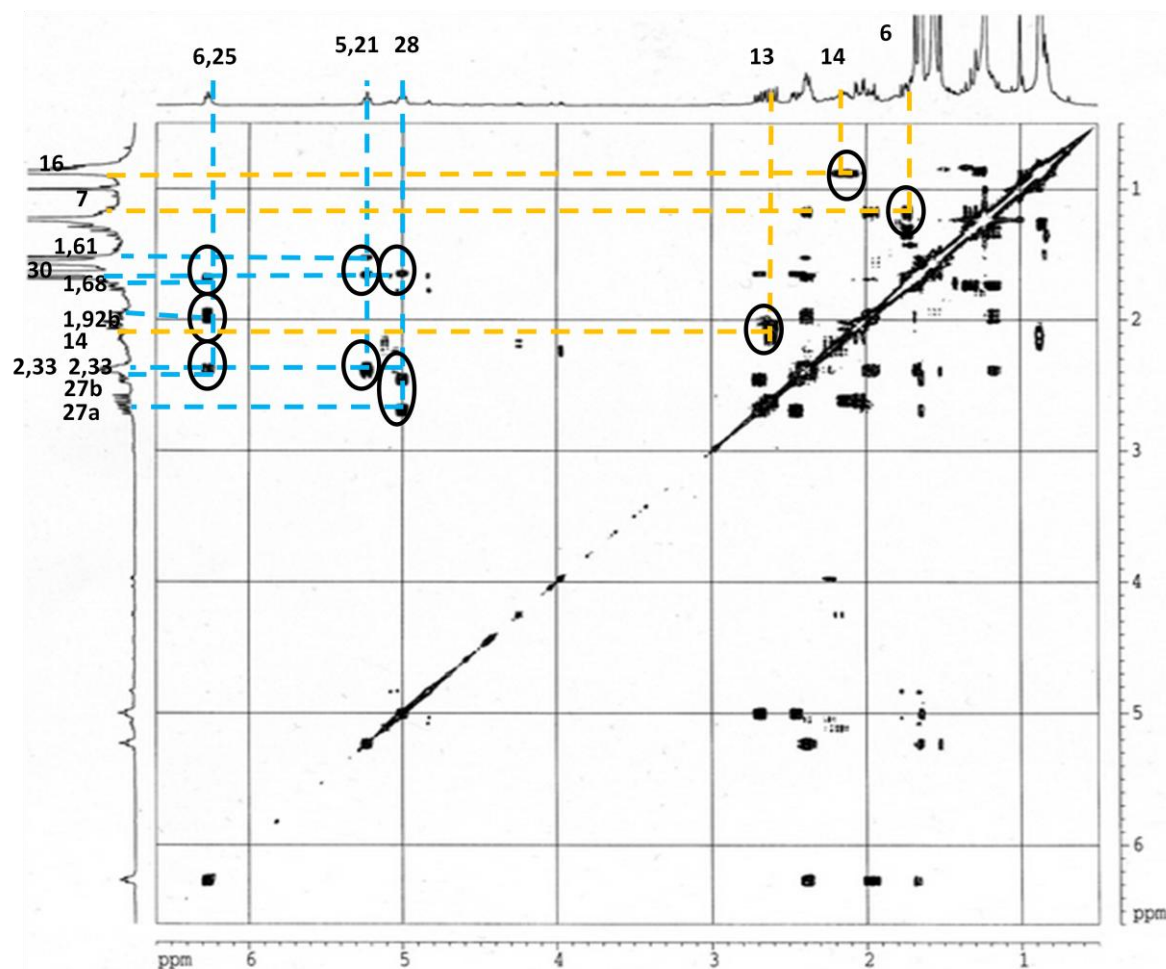


Figura 55: Espectro HSQC do composto LC-5 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

A análise do espectro COSY do composto LC-5 (Figura 56) mostra os acoplamentos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  permitindo visualizar quatro subestruturas. O hidrogênio à  $\delta$  6,25 (H-18) ligado ao carbono em  $\delta$  151,5 está acoplado com um grupamento metila à  $\delta$  1,68 ( $\text{CH}_3$ -20) e com dois hidrogênios em  $\delta$  1,92 e à  $\delta$  2,33 ( $\text{H}_2$ -17) que por sua vez estão ligados ao carbono que aparece à  $\delta$  28,9 formando assim um grupamento isoprenila. Além do mais, os acoplamentos suplementares de H-7 com os dois hidrogênios em  $\delta$  1,29 e 1,71 ( $\text{H}_2$ -6) permitiram definir a subestrutura 1.

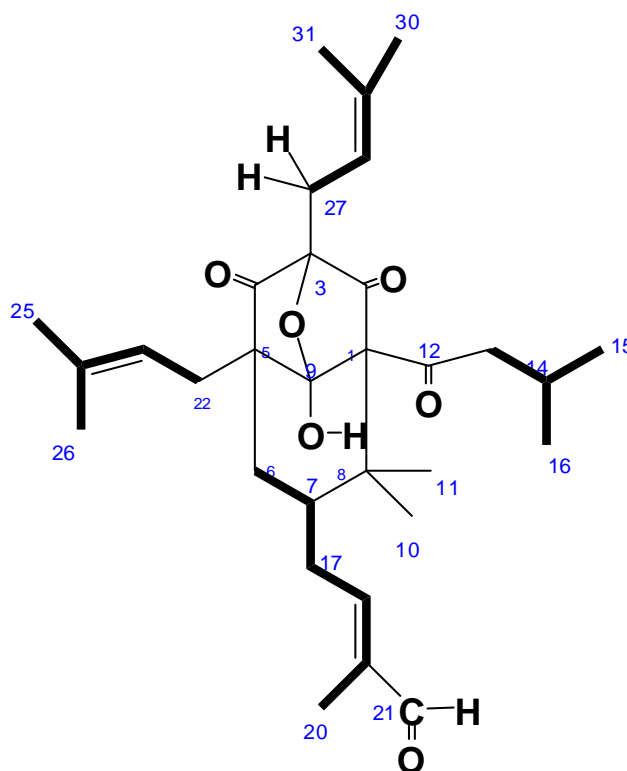


**Figura 56:** Espectro COSY do composto LC-5 entre 0,5 -6,6 ppm ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

O segundo hidrogênio etilênico em  $\delta$  5,21 (H-23) ligado ao carbono à  $\delta$  118,4 está acoplado com dois hidrogênios à  $\delta$  1,28 e à 2,33 (H<sub>2</sub>-22) ligados ao carbono que aparece em  $\delta$  30,8. Dois outros acoplamentos de baixa intensidade são observadas entre esse hidrogênio e as metilas à  $\delta$  1,52 e 1,61 (CH<sub>3</sub>-26 e 25) formando assim o segundo grupamento isoprenila desta molécula ou subestrutura 2.

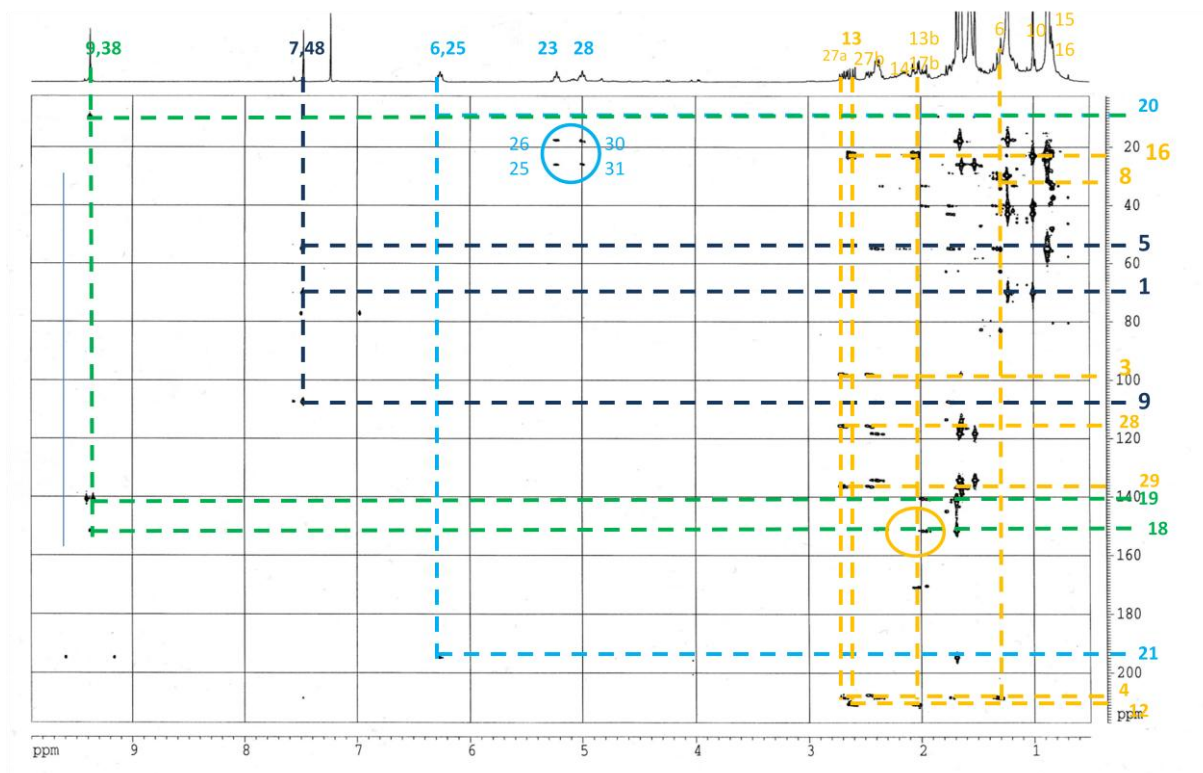
O terceiro grupamento isoprenila (subestrutura 3) foi determinada devido ao acoplamento intenso do hidrogênio à  $\delta$  4,98 (H-28) com os hidrogênios em  $\delta$  2,42 e 2,66 (H<sub>2</sub>-27) e um outro pouco intenso com o grupamento metila à  $\delta$  1,64 (CH<sub>3</sub>-30). O hidrogênio à  $\delta$  2,09 (H-14) está acoplado com os dois em  $\delta$  2,02 e 2,58 (H<sub>2</sub>-13) e também com as duas metilas à  $\delta$  0,86 (CH<sub>3</sub>-16) e à  $\delta$  0,87 (CH<sub>3</sub>-15), o que permitiu construir a quarta subestrutura que corresponde a um grupamento isobutila. Esses diferentes acoplamentos mostraram que o composto LC-5 é uma molécula poliisoprenilada.

As informações obtidas a partir da análise do espectro HMBC permitiram colocar em evidência a presença de carbonos quaternários devido as correlações de longa distância com diferentes hidrogênios. A reunião das 4 subestruturas resultou na estrutura plana da molécula vista na figura 57.



**Figura 57:** Estrutura plana de LC-5, subestruturas  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (em negrito).

As correlações do hidrogênio à  $\delta$  9,38 com os carbonos  $\delta$  9,3 (C-20);  $\delta$  141,0 (C-19) e  $\delta$  151,5 (C-18) permitiram atribuir à carbonila ao carbono  $\delta$  194,5 (Figura 58). Isto sugeriu que o carbono a  $\delta$  141,0 é quaternário e que a segunda metila do grupamento isoprenila foi oxidada em um aldeído. O H-6 está correlacionado com quatro carbonos quaternários a  $\delta$  55,0 (C-5), 43,0 (C-8), 107,2 (C-9) e a carbonila a  $\delta$  208,1 (C-4) assim como o carbono a  $\delta$  30,8 (C-22). Assim, foi possível ligar a subestrutura 1 com a subestrutura 2 por meio do carbono C-5.



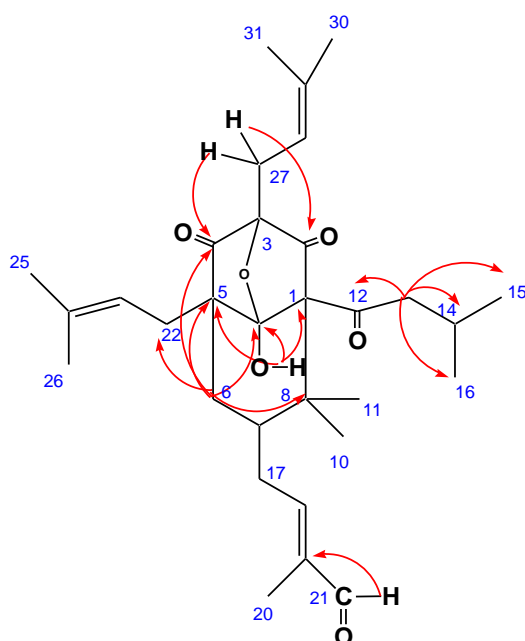
**Figura 58:** Espectro HMBC do composto LC-5 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

As correlações dos grupamentos metilas à  $\delta$  1,00 ( $\text{CH}_3$ -17) e 1,23 ( $\text{CH}_3$ -23) com o carbono quaternário à  $\delta$  43,0 mostraram que estes carregam uma *gem*-dimetila. Logo, o H-7 correlaciona com o carbono à  $\delta$  43,0 (C-8), com a metila à  $\delta$  17,3 (C-10) e com o carbono à  $\delta$  33,0 (C-6), enquanto os hidrogênios do grupamento metila  $\text{CH}_3$ -11 correlacionam com o carbono à  $\delta$  70,1 (C-1), 43,0 (C-8), 40,2 (C-7) e 17,3 (C-10). Assim, direciona-se a ligação da subestrutura 1 via C-8 ao carbono C-1 e ocorre a formação do primeiro ciclo.

E ainda, o hidrogênio à  $\delta$  7,48 correlaciona com os dois carbonos C-1 e C-5 e o carbono a  $\delta$  107,2 (C-9), que corresponde a um hemiacetal interno. Foi confirmado também que estes estão ligados ao carbono à  $\delta$  107,2 (C-9). O hidrogênio à  $\delta$  2,66 (H-27a) correlaciona intensamente com os carbonos à  $\delta$  98,2 (C-3), 115,8 (C-28), 136,5 (C-29) e de maneira fraca com a carbonila a  $\delta$  207,5, enquanto o hidrogênio  $\delta$  2,42 (H-27b) correlaciona com estes mesmos carbonos e com uma carbonila à  $\delta$  208,1 (C-4).

Não foi observada a correlação do hidrogênio à  $\delta$  2,42 com a carbonila à  $\delta$  207,5. O deslocamento químico de  $\delta$  98,2 (C-3) sugere a presença de uma ligação C-O. O que permitiu anexar a subestrutura 3 ao segundo ciclo desta molécula.

Os hidrogênios à  $\delta$  2,02 e 2,58 (H<sub>2</sub>-13) correlacionam aos carbonos à  $\delta$  22,0 (C-16), 22,5 (C-15), 23,5 (C-14) e a carbonila à  $\delta$  210,4. Para obter a estrutura da molécula, a subestrutura 4 foi ligada ao carbono 1 e um oxigênio foi colocado entre C-3 e C-9 formando um ciclo à 5 suplementar à fórmula bruta (Figura 59).



**Figura 59:** Correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  observadas no espectro HMBC de LC-5.

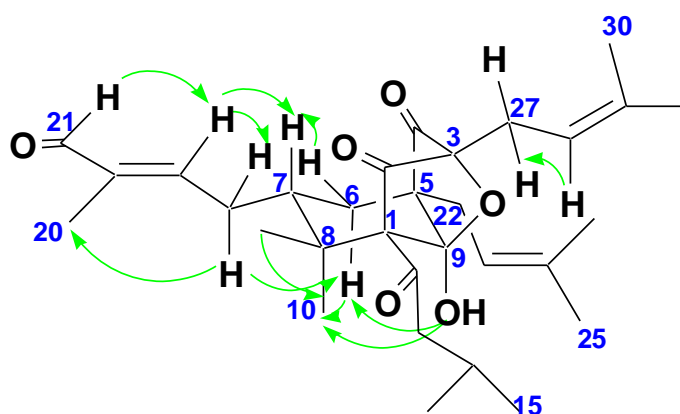
A estrutura plana deste composto foi estabelecida como sendo um derivado policíclico poliprenilado acilfloroglucinol (PPAP). Este é constituído de um núcleo acilfloroglucinol trissubstituído com uma cadeia terpênica em C-10, onde ocorre ciclização intramolecular. Este composto pertence a classe de PPAPs do tipo A, ou seja, a ciclização ocorre entre C-1 e C-5, o grupamento acila é encontrado na posição 1 e é adjacente a um carbono quaternário na posição 8. Os carbonos foram numerados segundo Ciochina & Grossman (2006).

**Tabela 13:** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (75,47 MHz) e  $^1\text{H}$  (400,13 MHz) do composto LC-5 em  $\text{CDCl}_3$ .

Nº	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$ , multiplicidade (J em Hz)	COSY	HMBC (H para C)	NOESY
1	70,1	-			
2	207,5	-			
3	98,8	-			
4	208,1	-			
5	55,0	-			
6 b	33,0	1,29, m	7	4, 5, 7, 8, 9, 17,	9
a		1,71, dt, (7,8, 14,9)		22	7, 18
7	40,2	1,14, m	6	6, 8, 10	6a, 18
8	43,0	-			
9	107,2	-			
10	17,3	1,00, s		1, 7, 8, 11	6a, OH, 11
11	23,0	1,23, s		1, 7, 8, 10	10, 13a
12	210,4	-			
13 b	55,0	2,02, dd, (4,6 ; 18,5)	14	12, 14, 16	
a		2,58, dd, (8,3 ; 18,5)			11
14	23,5	2,09, m	13, 15, 16	13	15, 16
15	22,5	0,87, d, (6,8)	14	13, 14, 16	14
16	22,0	0,86, d, (6,8)	14	13, 14, 15	14
17 b	28,9	1,92, m	18	6, 7, 18, 19	20
a		2,33, m			OH
18	151,5	6,25, t, (6,8)	17, 20	20, 21	7, 21
19	141,0	-			
20	9,3	1,68, s	18	18, 19, 21	17b
21	194,5	9,38, s		18, 19, 20	18
22 b	30,8	1,28, m	23	4, 5, 9, 23, 24	
a		2,33, m			23, 26
23	118,4	5,21, t, (7,1; 8,2)	22, 23, 25	25, 26	22a, 25, 27b
24	135,2	-			
25	25,9	1,61, s	23	28, 29, 30	23
26	17,5	1,52, s	23	23, 24, 25	22a

27 b	23,0	2,42, dd, (6,9; 15,3)	28	2, 3, 4, 28, 29	23, 28
a		2,66, dd, (8,1; 15,3)			
28	115,8	4,98, t, (6,9; 8,1)	27, 30	30, 31	27b, 30
29	136,5	-			
30	17,6	1,64, s	28	28, 29, 31	28
31	25,9	1,65, s		28, 29, 30	
9-OH	-	7,48, s		1, 5, 9	6b, 10, 17a, 22a

A estereoquímica relativa da molécula foi determinada pela análise do espectro NOESY (Figura 60). A hidroxila OH-9 correlaciona com a metila CH<sub>3</sub>-10 e H-6b, os dois em posição  $\alpha$ -pseudo-axial. Este correlaciona também com H-17a e H-22a. A correlação do H-13a com a metila CH<sub>3</sub>-10 indica que o grupamento isoprenila em C-1 está localizado no lado  $\alpha$  da molécula.



**Figura 60:** Correlações <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY do composto LC-5.

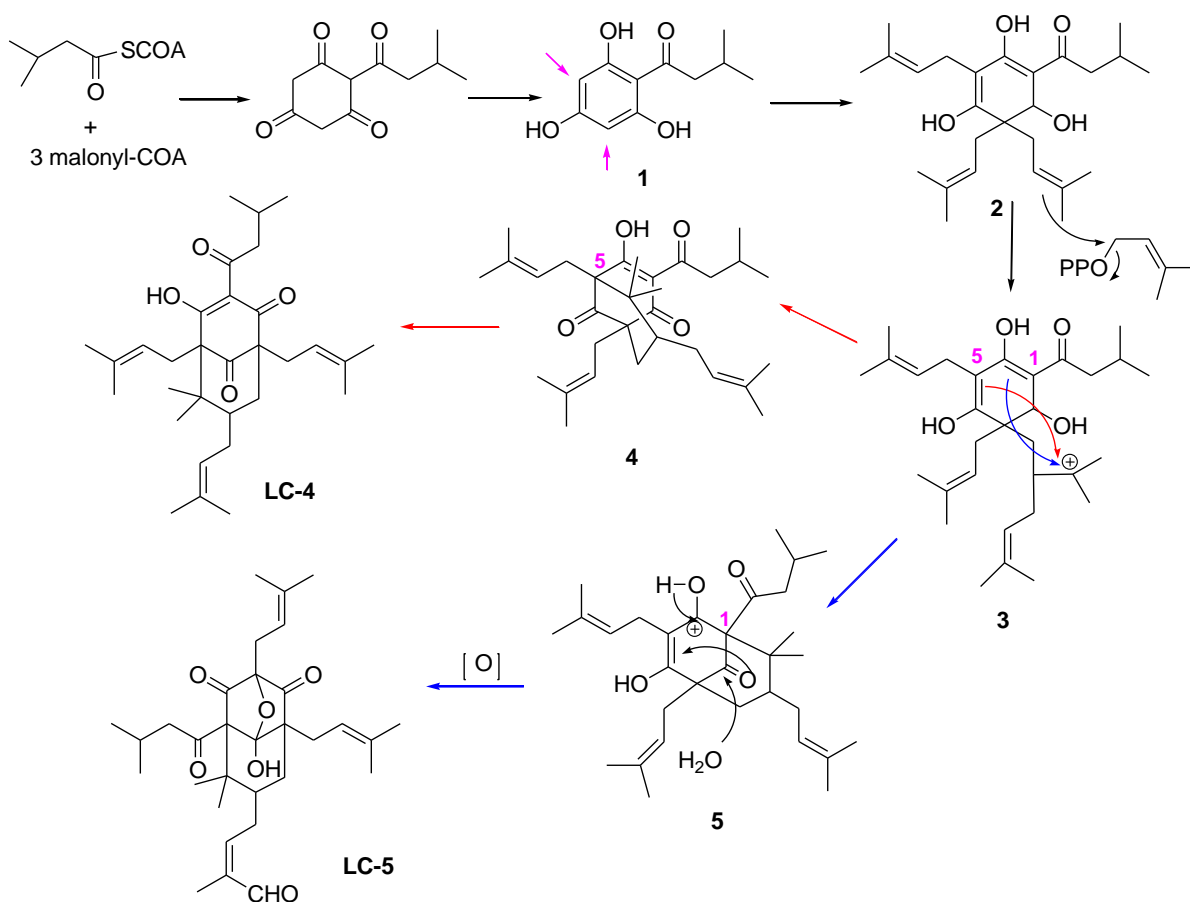
A estrutura deste composto tricíclico foi determinada como sendo 9-hidroxi-3,9-hemiacetal-8,8-dimetil-3,5,7-tri-(3metil-2-butenil)-1(2-metil-butanoíla) biciclo[3.3.1] nonano-2,4-diona e não tinha sido descrito na literatura. Sugerimos o nome comum de spiranthenona A.

Nestes compostos, a estrutura em ponte de éter influencia a configuração em C-3 e C-9.

A via biossintética desse composto origina-se da acetil-coenzima A e o malonil-coenzima A, que após reações de ciclização irão dar origem aos compostos. Esses compostos possuem centros quaternários com assimétrica vicinal e muito funcionalizados. Possuem um biciclo prenilado conservado, diferente de outros

derivados acilfloroglucinóis. Rotas sintéticas para tais compostos policíclicos acilfloroglucinóis poliprenilados já foram relatadas (Usuda et al., 2002; Kraus et al., 2003).

Foi demonstrado na literatura que a biossíntese dos acilfloroglucinóis sugere que ocorre a condensação de três unidades de malonil-CoA e uma unidade de acil-CoA, catalizada pela policetídeo sintase (Figura 61). O resultado é a formação do tetracetídeo que é ciclizado em seguida em acilfloroglucinol. A prenilação deste intermediário pela prenilpirofosfatase leva a formação do PPAP (Adam et al., 2002).



**Figura 61:** Hipótese de biossíntese dos compostos LC-4 e LC-5.

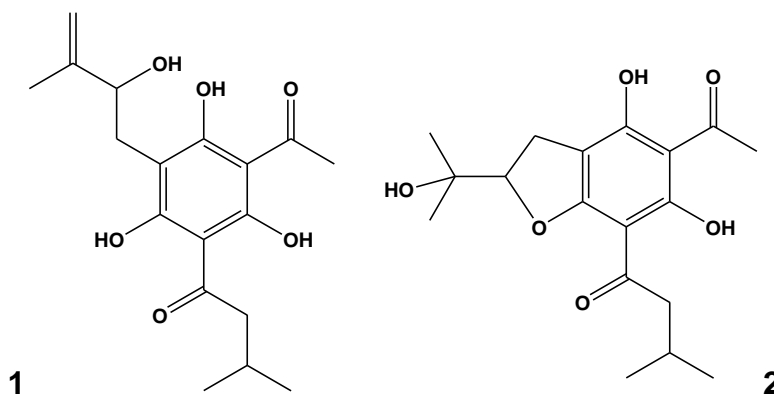
Os compostos isolados de *Spiranthera odoratissima* seguiram as mesmas hipóteses biogenéticas descritas na literatura para compostos desse grupo. A condensação do isovaleril CoA com três unidades de malonil CoA 1 forma, após uma prenilação, um intermediário comum denominado 2. O ataque de um grupamento prenil por uma prenilfosfatase leva a formação de um carbocátion 3. A condensação intramolecular de C-5 com este carbocátion leva a formação de uma



triketona **4** que corresponde ao composto **LC-4**, que pode estar sob a forma de dois tautômeros. A condensação de C-1 sobre o carbocátion forma uma dicetona, visualizada em **5**, que é transformada em hemiacetal, e a reação de oxidação em um grupamento prenil leva ao composto **LC-5**.

Os derivados acilfloroglucínóis poliprenilados são frequentemente isolados de plantas pertencentes à família Guttiferae (Clusiaceae) e aos gêneros *Clusia*, *Garcinia* e *Symphonia* (Verotta, 2002).

Quanto à família Rutaceae, os acilfloroglucínóis simples, como a sessiflorena e o sessiliflorol (Figura 62), foram isolados a partir de *Melicope sessiliflora* (Chan et al., 1989). Estes compostos possuem a particularidade de serem substituídos por uma cadeia isopentanoíla (ou isovaleroíla) devido à incorporação da leucina, como nos compostos isolados de *Spiranthera odoratissima*.



**Figura 62:** (1) Estrutura química da sessiflorena e (2) estrutura química do sessiliflorol.

### 2.7.2. Testes em protozoários dos compostos extraídos de *Spiranthera odoratissima*

Todos os compostos isolados do extrato acetato de etila das folhas de *S. odoratissima* foram submetidos a ensaios em *P. falciparum* resistente à cloroquina, *L. (L.) chagasi*, *T. cruzi* e células de mamífero da linhagem NIH-3T3. Os valores podem ser visualizados na Tabela 14, que também apresenta os índices de seletividade em cada um dos parasitos.

**Tabela 14:** Atividade dos compostos isolados de *Spiranthera odoratissima* em parasitos.

<b>Moléculas</b>	<b><i>P. falciparum</i> IC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>	<b>IS</b>	<b><i>T. cruzi</i> epimastigotas IC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>	<b>IS</b>	<b><i>L. (L.) chagasi</i> promastigotas IC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>	<b>IS</b>	<b>Células NIH-3T3 IC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>
Extrato Bruto	9,2 ± 1,8	20,3 4	56,3 ± 0,20	3,32	>100	-	187,16 ± 0,04
LC-1	13,9 ± 0,2	95,7 7	96,8 ± 0,45	13,7 5	58,3 ± 0,53	22,8 3	1331,16 ± 0,08
LC-2	9,1 ± 0,9	27,9 2	>100	-	>100	-	254,1 ± 0,07
LC-3	8,6 ± 1,4	36,3 4	92 ± 0,25	3,4	103,2 ± 0,30	3,03	312,5 ± 0,1
LC-4	15,5 ± 3,8	22,2	102,0 ± 0,15	3,37	>100	-	344,1 ± 0,03
LC-5	23,4 ± 1,9	4,21	>100	-	>100	-	98,6 ± 0,09
Cloroquina (2 µM)	0,07 ± 0,7		-		-	-	-
Miltefosina (25 µg/mL)	-		-		2,9 ± 0,4	-	-
Benznidazol (100 µg/mL)	-		< 10		-	-	-

O 6-acetoxi,1-hidroxi,4(15)-eno (LC-1), mostrou atividade em *P. falciparum*, *L. (L.) chagasi* e *T. cruzi* (Tabela 14) com IC<sub>50</sub> de 13,9; 58,3 e 96,8 µg/mL, respectivamente. Quanto a sua citotoxicidade, quando avaliado em células NIH-3T3 não se mostrou tóxico, com IC<sub>50</sub> de 1331,16 µg/mL, o que permitiu a determinação do índice de seletividade do composto LC-1 de 95,77; 22,83 e 13,75. Kaur et al. (2009) em uma revisão relatou diversos terpenos com atividade antimalárica com estruturas semelhantes ao composto LC-1.

Existem muitos relatos de compostos terpênicos com atividade antimalárica, como por exemplo, a artemisinina, que é uma lactona sesquiterpênica.

O composto LC-2, sesamina, foi ativo em *P. falciparum* com IC<sub>50</sub> de 9,1 µg/mL e não mostrou atividade para os outros parasitos. Quando testado em células NIH-3T3 mostrou IC<sub>50</sub> de 254,1 µg/mL, o que permitiu calcular um índice de seletividade de 27,92, significando maior afinidade do composto pelo parasito.

A sesamina (LC-2), nomenclatura usual deste composto, é pela primeira vez isolada desta espécie. Esta foi encontrada em várias subfrações, sendo, portanto abundante neste extrato. A sesamina é uma lignana já conhecida, e muitos estudos atribuem diferentes atividades biológicas a este composto. Considerado como antioxidante (Ikeda et al., 2003; Ghafoorunissa et al., 2004), possuindo sinergia com o α-tocoferol e aumentando a biodisponibilidade do γ-tocoferol (Ghafoorunissa et al., 2004), conhecido ainda por diminuir o colesterol e os lipídios (Lee et al., 2009), possuir atividade hepatoprotetora e anticarcinogênica (Miyahara et al., 2000) e inibir a peroxidação lipídica e regular a produção de citocinas (Khan et al., 2010). Estudo de Cui et al. (2010) mostrou a ação da sesamina na resposta inflamatória induzida pelo peptídeo quimiotático bacteriano *N*-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLF) *in vitro* e *in vivo*, explorando os mecanismos envolvidos. A sesamina em concentrações entre 12,5 e 50 µmol/L inibiu o fMLF. Estes resultados sugerem que a sesamina inibe a ativação de leucócitos pelo fMLF por meio das vias de sinalização e, portanto, é um composto promissor no tratamento de doenças inflamatórias.

Bodiwala et al. (2007) avaliaram lignanas isoladas de extratos de *Piper cubeba* e *P. retrofractum* (Piperaceae) em formas promastigotas de *Leishmania donovani*. A lignana cubebina exibiu IC<sub>50</sub> para o parasito de 100 µM. As demais lignanas isoladas, hinokinina, bis-epoxi lignana, (-)-sesamina, não exibiram atividade significativa. No nosso estudo a sesamina também não foi considerada ativa em *L.(L.) chagasi*.

O composto LC-3,  $\beta$ -sitosterol apresentou  $IC_{50}$  de 8,6; 92 e 103,2  $\mu\text{g/mL}$  em *P. falciparum*, *T. cruzi* e *L. (L.) chagasi*, respectivamente. Existem relatos de sua atividade anti-inflamatória, antitérmica (Gupta et al., 1980) e anticancerígena (Awad et al., 2008). Estudos indicam que o  $\beta$ -sitosterol pode estimular a proliferação de leucócitos e aumenta significativamente a atividade das células helper T, citocinas, interleucina 2, interferon-g e das células NK, e ser dessa maneira útil no tratamento de diversas doenças causadas por disfunção imune (Bouic et al., 1999). Compostos triterpênicos foram relatados pela sua atividade antiplasmodial. O extrato bruto de *Grewia bilamellata* (Malvaceae) apresentou atividade anti-*Plasmodium*, e seu fracionamento levou ao isolamento de dois triterpenoides  $3\alpha,20$ -lupandiol ( $IC_{50}$  de 19,8  $\mu\text{M}$ ) e do ácido  $2\alpha,3\beta$ -dihidroiolean-12-en-28-óico ( $IC_{50}$  de 21,1  $\mu\text{M}$ ) (Ma et al., 2006). Murata et al. (2008) relataram a atividade antiplasmodial dos triterpenoides acíclicos de *Ekebergia capensis* (Meliaceae) com  $IC_{50}$  de 7  $\mu\text{M}$ .

### 2.7.3. Atividade antifúngica dos compostos LC-1 à LC-5

Os cinco compostos isolados do extrato acetato de etila das folhas de *S. odoratissima* foram avaliados em duas cepas de *Candida albicans*, uma ATCC e uma isolado clínico LMGO 102. Apenas o composto LC-4 apresentou atividade < 100  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 15), com CIM de 12,5  $\mu\text{g/mL}$  nas duas cepas de *C. albicans* testadas. Este resultado foi melhor que o encontrado para o controle itraconazol (CIM > 16  $\mu\text{g/mL}$ ) demonstrando que o composto LC-4 é promissor para dar continuidade aos estudos. Vários são os relatos sobre a atividade antibacteriana e antifúngica dos compostos do tipo policíclico poliprenilado acilfloroglucinol, bastante comum em espécies do gênero *Hypericum* (Fenner et al., 2005).

**Tabela 15:** Atividade dos compostos isolados do extrato acetato de etila das folhas de *S. odoratissima* em *Candida albicans*.

Compostos	CIM µg/mL	
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Candida albicans</i> LMGO 102
LC-1	>100	>100
LC-2	>100	>100
LC-3	>100	>100
LC-4	12,5	12,5
LC-5	>100	>100
Itraconazol	0,5	16
Fluconazol	1	64
DMSO 100%	-	-

-. não ativo

Os compostos LC-4 e LC-5 não foram considerados ativos para os protozoários, com IC<sub>50</sub> >10 µg/mL para *P. falciparum*; e > 100 µg/mL para *L. (L.) chagasi* e *T. cruzi*. Compostos do tipo PPAPS já foram isolados de espécies da família Clusiaceae e apresentaram excelente atividade antiplasmodial, com IC<sub>50</sub> variando de 2,1 a 37,2 µM (Marti et al., 2009).

Os compostos isolados não foram testados nas mesmas cepas que o extrato bruto, devido a pequena quantidade obtida. Por isso verificou-se a atividade apenas em *Candida albicans* cepa padrão (ATCC 10231) e cepa isolado clínico (LMGO 102). Observa-se, portanto, que não houve diferença de atividade em relação as duas cepas. Contudo os fármacos itraconazol e fluconazol foram ativos para a cepa padrão, com CIM de 0,5 e 1 µg/mL, e não ativos para o isolado clínico, com CIM de 16 e de 64 µg/mL, respectivamente. Esses resultados demonstram menor resistência do isolado clínico ao composto LC-4.

Winkelmann et al. (2001) testaram derivados prenilados bi e triciclícos do tipo floroglucinol de *Hypericum papuanum*, que são compostos muito parecidos estruturalmente com os compostos LC-4 e LC-5 em diferentes cepas bacterianas. Demonstraram que estes têm importante atividade antimicrobiana, sendo que a hiperpapuanona, que como o LC-4 também possui um tautômô, apresentou CIM de 8 µg/mL em *Bacillus cereus* e *Staphylococcus epidermidis*.

Gibbons et al. (2005) isolaram de *Hypericum foliosum* (Hypericaceae) uma molécula inédita do tipo acilfloroglucinol (1,3,5trihidroxi-6-[2''-3''-metilepóxi-3''-metil-butil]-2-[2'' metilbutanoil]- 4-[3'-metil-2''-butenil]-benzeno), molécula ativa em cepas multiresistentes de *Staphylococcus aureus* com concentração inibitória mínima entre 16 e 32 µg/mL.

O ácido filicínico e floroglucinóis, derivados desse ácido, identificados em *Hypericum ternuum* foram ativos em *Candida albicans*, *Trychophyton mentagrophytes* e *T. rubrum*, responsáveis pela maioria das infecções em pacientes imunodeficientes (Fernner et al., 2005).

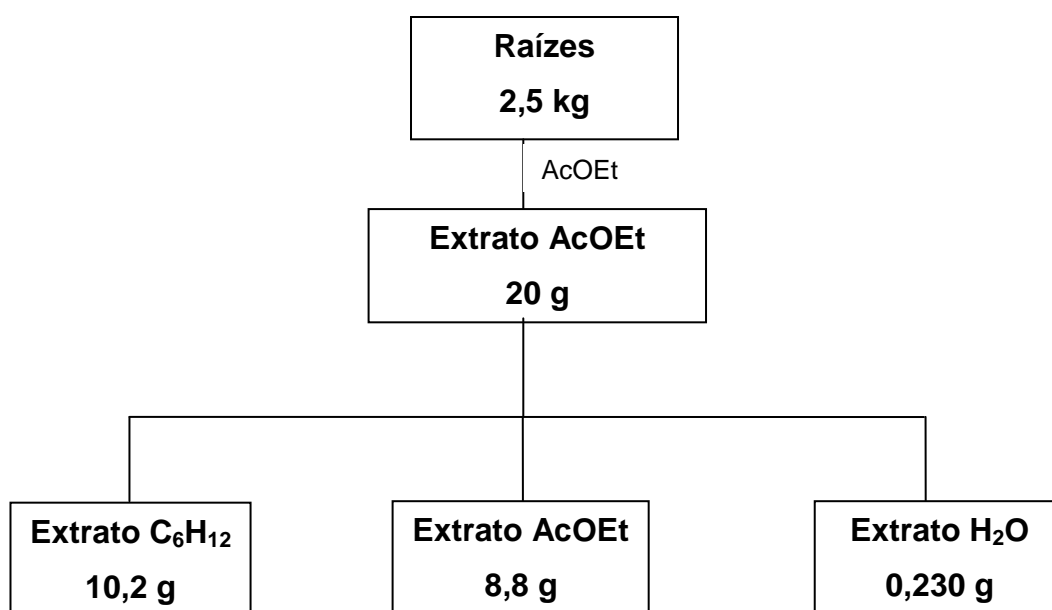
Alguns dos compostos isolados do extrato acetato de etila das folhas de *S. odoratissima* não foram considerados seguros em relação ao modelo utilizado, por apresentarem IS menores que 10, como é o caso do LC-5 com IC<sub>50</sub> em NIH-3T3 de 98,6 µg/mL e IS de 4,21 para *P. falciparum*, sendo, portanto, citotóxico. Em *T. cruzi*, o extrato bruto e os compostos LC-3 e LC-4 também não foram considerados seguros, pois apresentaram IS de 3,32; 3,4 e 3,37. Para *L. (L.) chagasi* LC-2 mostrou IS de 3,03.

## 2.8. ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Diospyros hispida*

O extrato AcOEt da raiz de *D. hispida* mostrou atividade com  $IC_{50}$  de 18,9  $\mu\text{g/mL}$  quando testado em *L. (L.) chagasi*, e  $IC_{50} < 1,95 \mu\text{g/mL}$  quando testado em *L. (L.) amazonensis*, resultado que o selecionou para os estudos químicos.

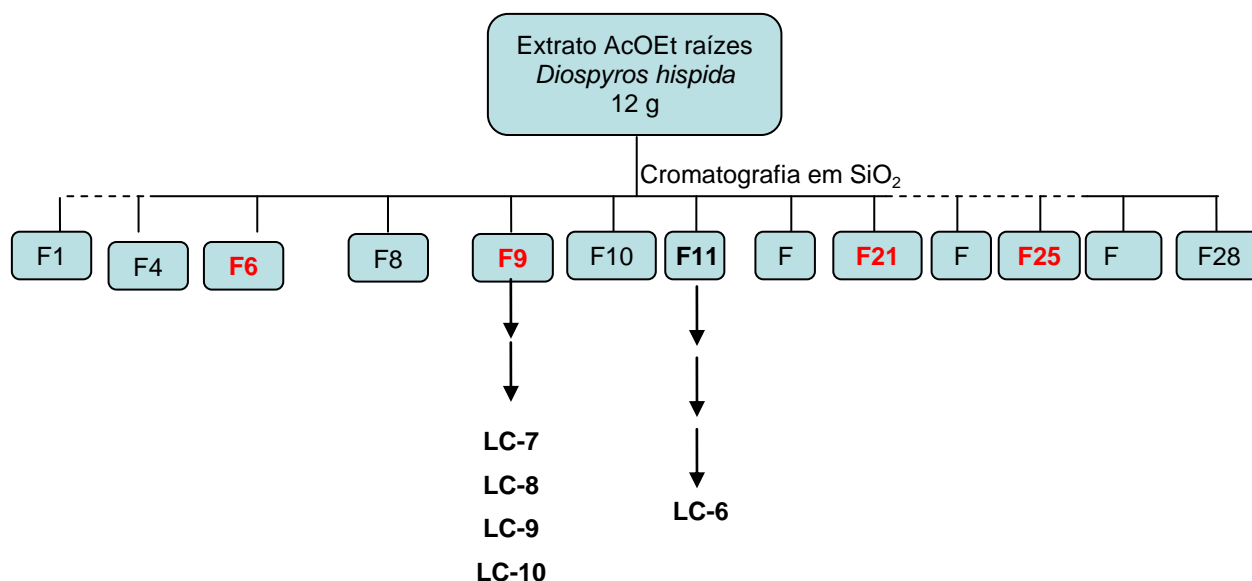
Este extrato (8,8 g) foi submetido a uma partição líquido-líquido com solventes em polaridade crescente (Figura 63), o que permitiu eliminar a provável presença de ácidos graxos do extrato com ciclohexano, para em seguida realizar a purificação do extrato AcOEt.

O fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt da raiz de *D. hispida* em coluna aberta de sílica gel gerou 28 frações. Estas frações foram testadas em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.



**Figura 63:** Procedimento de extração das raízes de *D. hispida*.

As frações que inibiram 100% dos parasitos a uma concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  foram consideradas ativas (Figura 64). Apenas 4 apresentaram atividade: F-6, F-9, F-21 e F-25. A fração 11 mostrou-se pura e por isso também foi identificada.



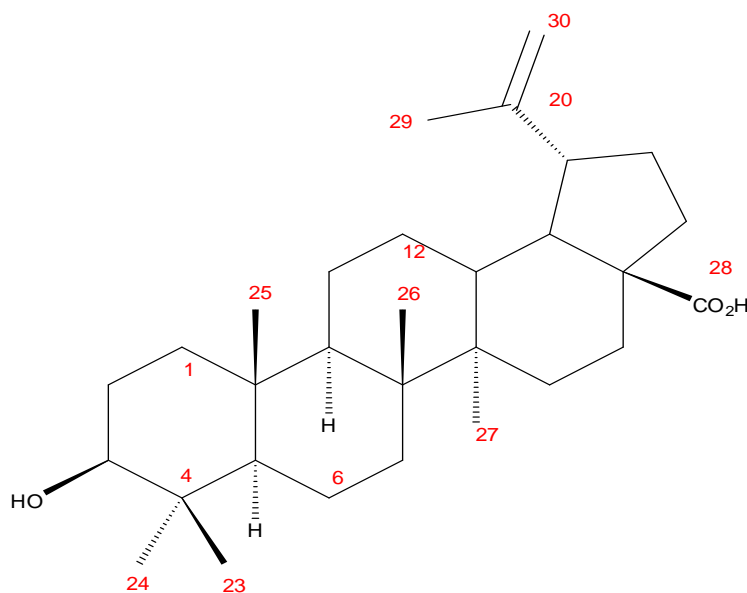
**Figura 64:** Esquema ilustrando a origem dos compostos isolados do extrato AcOEt das raízes de *D. hispida*.

Existem poucos relatos na literatura sobre estudos biológicos da espécie *D. hispida*, contudo muito já foi estudado sobre outras espécies do mesmo gênero. Do fracionamento biomonitorado desta espécie foram isolados 5 compostos: 1 triterpeno (ácido betulínico), 2 naftoquinonas (isodiospirina e uma outra não identificada), um composto do tipo naftaleno (4-hidrori-5-metoxi-2-naftaldeído) e 1 antraquinona (não identificada). Esses compostos foram avaliados em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*.



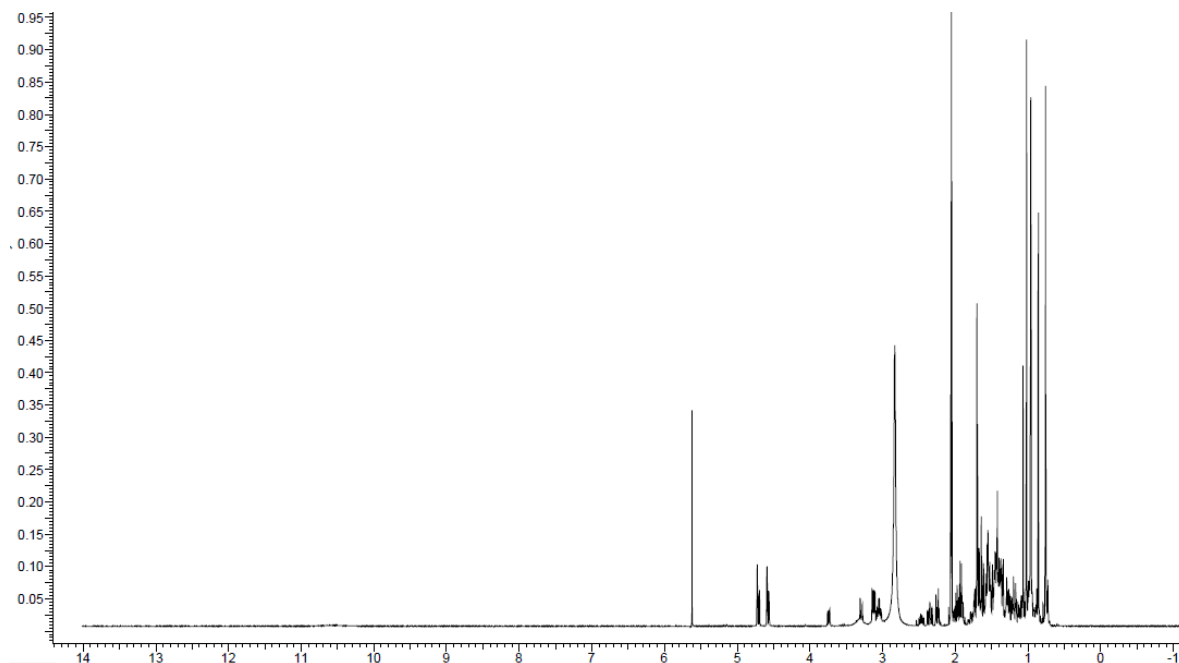
### Estrutura do composto LC-6: Triterpeno

A F-11, um sólido branco, apresentou um perfil cromatográfico praticamente puro e por isso foi submetido a avaliação em RMN  $^1\text{H}$ . Após análise dos dados, foi possível, a identificação do composto LC-6, um triterpeno pentacíclico da série dos lupanos, denominado ácido  $3\beta$ -hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico (ácido betulínico, Figura 65).



**Figura 65:** Estrutura química do ácido betulínico, composto LC-6 extraído das raízes de *D. hispida*.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de LC-6 (Figura 66) mostrou sinais em  $\delta$  4,74 e 4,61 correspondentes aos hidrogênios vinílicos H-29, os quais se apresentam como dubletos com constante de acoplamento de 1,5 Hz. Destaca-se ainda a presença de um hidrogênio carbinólico em  $\delta$  3,18 (H-3), como um duplo dubleto com constantes de acoplamento de 5,4 e 10,8 Hz, evidenciando a configuração  $\beta$  para o grupo hidroxila, e de seis hidrogênios metílicos com deslocamentos químicos em  $\delta$  0,96 (s, H-23), 0,76 (s, H-24), 0,82 (s, H-25), 0,94 (s, H-26), 0,98 (s, H-27) e 1,68 (s, H-30).

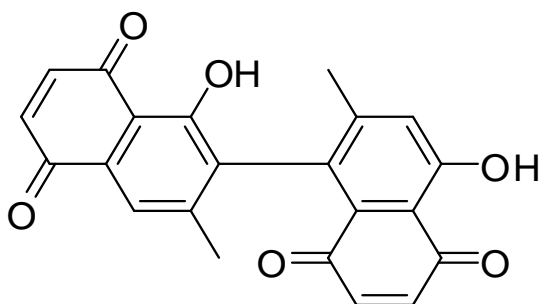


**Figura 66:** Espectro de <sup>1</sup>H do composto LC-6 (400 Hz, acetona-d<sub>6</sub>).

Dentre os sinais no espectro de <sup>13</sup>C destacam-se aqueles com deslocamento químico em  $\delta$  79,2 do carbono carbinólico (C-3), em  $\delta$  109,9 atribuídos ao carbono metilênico (C-29) e em  $\delta$  150,6 correspondente ao carbono vinílico (C-20). Os carbonos metílicos apresentam deslocamentos químicos entre  $\delta$  14,9 (C-27) e  $\delta$  28,2 (C-23).

### Estrutura do composto LC-7: Naftoquinona

A subfração SF-9-3 foi purificada e foram obtidas 7 subfrações. As subfrações SF-2, SF-3 e SF-4 em CCD estavam aparentemente puras e tinham o mesmo perfil cromatográfico. Foram reagrupadas e submetidas à análise espectral em RMN <sup>1</sup>H. O espectro dessa subfração mostrou que se tratava de uma naftoquinona pura e por esse motivo seguiu-se com a identificação. As demais subfrações se tratavam de mistura de compostos e devido à pequena quantidade não continuou-se o fracionamento. Foi possível a identificação do composto LC-7, a isodiospirina (Figura 67) que apresentou coloração alaranjada, e quando revelada com KOH/álcool apresentou coloração roxa.



**Figura 67:** Estrutura química da isodiospirina, composto LC-7, isolado das raízes de *D. hispida*.

O gênero *Diospyros* é conhecido como fonte de naftóis, naftoquinonas e derivados de naftaleno (Ganapaty et al., 2006). Estudos relatam a presença de glicosídeos antraquinônicos (Srivastava & Pitre, 1985) e os triterpenos lupeol, betulina e ácido betulínico (Zakaria et al., 1984) na casca do caule de espécies pertencentes a este gênero.

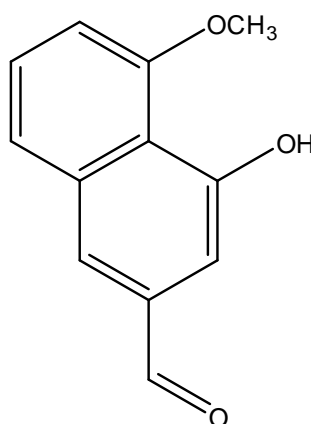
A isodiospirina é um composto já conhecido e isolado de outras espécies do gênero *Euclea* e *Diospyros* (Ganapaty et al., 2006). A identificação da molécula foi feita por comparação com os dados de RMN encontrados na literatura (Sidhu & Prasad, 1967).

O composto LC-7, isodiospirina, possui fórmula molecular de  $C_{22}H_{14}O_6$ . O espectro de RMN de  $^1H$  confirmou que o composto possuía anéis aromáticos, devido aos sinais de H presentes em  $\delta > 6,0$ . Dois simpletos em  $\delta$  12,43 e 12,05 representavam um par de hidrogênios-OH fenólicos em que cada um formava ligação de hidrogênio intramolecular com o oxigênio da carbonila. Seis hidrogênios aromáticos foram observados, por meio de dois singletos em  $\delta$  7,61 e 7,30 e quatro duplas ligações em  $\delta$  6,95, 6,93, 6,91 e 6,72. Dois sinais de metila estavam presentes em  $\delta$  2,03 e 2,01.

O composto foi então determinado como sendo o 1',4'-diidroxí-2, 3'-dimetil-[1,2'-binaphthaleno]-5,5',8,8'-tetrone, mais comumente conhecido como isodiospirina. A molécula foi isolada pela primeira vez em 1967, a partir do caule de *Diospyros chloroxylon* em 1967.

### Estrutura do composto LC-8

A fração F-9 foi fracionada para obtenção de um extrato de naftoquinonas e como produto secundário foi separado uma fração  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Dessa fração foi realizada uma CCD preparativa, da qual obtivemos 2 bandas principais: sendo a mais apolar separada e identificada, por análise espectral em RMN de  $^1\text{H}$ , como sendo o composto 8, um derivado naftaleno, o 4-hidroxi-5-metoxi-2-naftaldeído (Figura 68).



**Figura 68:** Estrutura química do composto LC-8, 4-hidroxi-5-metoxi-2-naftaldeído extraído das raízes de *D. hispida*.

O composto 4-hidroxi-5-metoxi-2-naftaldeído foi isolado pela primeira vez do extrato clorofórmico das raízes de *D. assimilis*. O extrato clorofórmico apresenta polaridade semelhante ao do AcOEt, o que pode explicar o isolamento do mesmo composto, em um gênero rico em compostos derivados do naftaleno. Os dados obtidos do espectro de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram comparados com os dados de Ganapaty et al. (2006).

A fórmula molecular do 4-hidroxi-5-metoxi-2-naftaldeído (LC-8) é  $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_3$ . Analisando o espectro de  $^1\text{H}$  foi possível visualizar picos referentes a dois dubletos entre  $\delta$  7,8 e 7,3, respectivamente. Além disso, o espectro também mostrou a presença de uma metoxila em um singlete a  $\delta$  4,1 (C-4). O composto LC-8 é isômero do composto já conhecido, 5-hidroxi-4-metoxi-2-naftaldeído, anteriormente isolado a partir da madeira do caule de *D. quiloensis* (Harper et al., 1970). Antes de ter sido isolado, o 4-hidroxi-5-metoxi-2-naftaldeído, já havia sido sintetizado por Harper et al. (1970).

### Isolamento do composto LC-9

Um composto de coloração alaranjada foi isolado da fração F-9-2. Seu perfil cromatográfico em CCD, usando eluente diclorometano (100%) quando revelado com KOH/álcool mostrou uma mancha arroxeada indicando que este pertencia à classe das naftoquinonas.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  não permitiu identificar corretamente o composto LC-9, devido a problemas de degradação.

### Isolamento do composto LC-10

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  permitiu deduzir que se tratava de um composto do tipo antraquinona. A identificação não foi possível devido a presença de picos característico de hidrogênios pertencentes a ácidos graxos, e apesar da tentativa, não foi possível eliminá-la o que impossibilitou a identificação.

#### 2.8.1. Testes em parasitos dos compostos extraídos de *Diospyros hispida*

O extrato bruto, as frações e os compostos isolados de *D. hispida* foram testados em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. A atividade pode ser visualizada na tabela 16. Todos foram também avaliados em células NIH-3T3, para determinação da citotoxicidade e posterior cálculo do índice de seletividade.

Os índices de seletividade da fração F-9, e de quatro compostos foram calculados e todos foram menores que 10, indicando citotoxicidade em relação às células utilizadas no estudo. A isodiospirina apresentou atividade em formas promastigotas e amastigotas com  $\text{IC}_{50}$  de 38,6 e 50,9  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Observou-se que não existe relação entre a atividade dos compostos nas duas formas do parasito. O composto LC-9 apresentou excelente atividade para as formas promastigotas, com  $\text{IC}_{50}$  de 4,2  $\mu\text{g/mL}$  e não apresentou atividade em amastigotas, com um  $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ .

A anfotericina B, medicamento referência usada no tratamento clínico da leishmaniose apresentou  $\text{IC}_{50}$  de 0,2  $\mu\text{g/mL}$  em formas amastigotas do parasito.

Porém tanto o fármaco, como o extrato bruto e o composto LC-10 mostraram citotoxicidade acentuada na concentração de 100 µg/mL, com todos os macrófagos destruídos, quando visualizados nas lâminas.

Diversas naftoquinonas presentes em gêneros das famílias Ebenaceae, Bignoniaceae e Plumbaginaceae apresentaram atividade em *Leishmania* (Iwu et al., 1994). Naftoquinonas isoladas de extratos de *Kigelia pinnata* e *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae) foram responsáveis por atividades antibacterianas, antifúngicas e antitumorais (Houghton et al., 1994).

**Tabela 16:** Resultados de IC<sub>50</sub> (µg/mL) do extrato AcOEt das raízes de *D. hispida*, da fração 9 e dos compostos isolados em *L. (L.) amazonensis* e células NIH-3T3 de fibroblastos de mamífero .

<i>D. hispida</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i> Promastigota IC <sub>50</sub> (µg/mL)	IS	<i>L. (L.) amazonensis</i> Amastigota IC <sub>50</sub> (µg/mL)	IS	Células NIH-3T3 IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Extrato	1,96± 0,9	222,3	68*	6,4	435,8 ± 0,2
AcOEt Raíz					
F-9	129,8± 1,1	1,8	91,5	2,57	235,1± 0,2
LC-6	113,7±0,8	4,7	82,6	6,44	531,6± 0,4
LC-7	38,6± 0,6	-	50,9	-	>1000
LC-8	29,9± 0,7	7,8	82,2	2,84	233,3± 0,9
LC-9	4,2± 0,6	-	>100	-	>1000
LC-10	>100	-	65,11*	-	-
Anfotericina B (100 µg/mL)	-	-	0,2	-	-

\*na concentração de 100 µg/mL não havia células viáveis; -: não calculado

As quinonas representam uma ampla e variada família de metabólitos de distribuição natural. Nos últimos anos intensificou-se o interesse por estas substâncias, devido à sua importância nos processos bioquímicos vitais e ao destaque cada vez maior que apresentam em variados estudos farmacológicos (Silva et al., 2003).

O extrato AcOEt das raízes de *D. hispida* e os compostos isolados não apresentaram atividade antifúngica destacada (Tabela 17). O extrato bruto mostrou CIM de 15,63 µg/mL em *C. neoformans* LMGO 02, o composto 4-hidroxi-5-metoxi-2-

naftaldeído (LC-8) apresentou boa atividade em *C. gattii* LMGO 01 com CIM de 25 µg/mL. Prajoubklang et al. (2005) avaliaram a atividade da isodiospirina em *C. albicans* ATCC 90028 e o CIM encontrado foi > 20 µg/mL. No nosso estudo a isodiospirina (LC-7) demonstrou CIM > 200 µg/mL para *Candida albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* LMGO 174; CIM de 200 µg/mL para *Cryptococcus gattii* LMGO 01 e de 100 µg/mL em *C. neoformans* LMGO 02.

**Tabela 17:** Atividade do extrato acetato de etila das raízes de *D. hispida*, fração 9 e compostos isolados em leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus*.

	CIM (µg/mL)				
	Ca	Cp	Ck	Cg	Cn
Extrato bruto	>200	>200	>200	>200	15,62
F-9	>200	>200	>200	200	100
LC-6	>200	>200	>200	100	200
LC-7	>200	>200	>200	200	100
LC-8	>200	>200	200	25	200
LC-9	>200	>200	>200	100	50
LC-10	>200	>200	>200	100	100

Ca: *Candida albicans* ATCC 10231; Cp: *C. parapsilosis* ATCC 22019; Ck: *C. krusei* LMGO 174; Cg: *Cryptococcus gattii* LMGO 01; Cn: *Cryptococcus neoformans* LMGO 02

O ácido betulínico havia sido isolado anteriormente das folhas de *D. melanoxylon*. O ácido betulínico é um tipo de triterpeno - lupano encontrado em muitas espécies de plantas, que tem sido relatado como tendo atividades anti-HIV, antibacteriana, antifúngica, antiplasmódica e anti-inflamatória (Yogeeswari & Sriram, 2005), e por inibir o crescimento das células cancerosas, sem afetar a células normais (Mullauer et al., 2009), aliás, a não citotoxicidade foi demonstrada em células de mamíferos, em astrócitos humanos (Wick et al., 1999), e em fibroblastos e linfoblastos de sangue periférico (Einzhammer & Xu, 2004). Em nosso estudo foi possível demonstrar a ausência da citotoxicidade de *D. hispida* em células NIH-3T3 com IC<sub>50</sub> de 531,6 µg/mL.

Domínguez-Carmona et al. (2010) avaliaram o ácido betulínico em *T. cruzi* (IC<sub>50</sub> 50 µM) e *P. falciparum* (IC<sub>50</sub> 22,5 µM), e o derivado acetilado do ácido

betulínico em *L. amazonensis* (IC<sub>50</sub> 44,9 µM) e *P. falciparum* (IC<sub>50</sub> 11,8 µM). Em nosso estudo o ácido betulínico (LC-6) não foi ativo em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, com IC<sub>50</sub> de 113,7 µg/mL, entretanto um dado novo do nosso estudo é a atividade apresentada para as formas amastigotas com IC<sub>50</sub> de 82,6 µg/mL.

O composto LC-9 apresentou a melhor atividade em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* com IC<sub>50</sub> de 4,2 µg/mL.



### 3. CONCLUSÃO

Esse trabalho isolou e avaliou a atividade antiparasitária e antifúngica de compostos de *Spiranthera odoratissima* e *Diospyros hispida*.

A triagem de 217 extratos do banco de extratos de plantas do bioma Cerrado (Laboratório de Farmacognosia/UnB) permitiu selecionar 32 extratos com atividade de inibição  $\geq 75\%$  em *Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina cepa FcB1, sendo que destes onze tiveram uma atividade  $\geq 90\%$  de inibição. Estes onze extratos foram avaliados em *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania (Leishmania) chagasi*, sendo 4 ativos no primeiro e 3 no segundo parasito.

As espécies, *S. odoratissima* e *D. hispida*, devido à atividade apresentada em *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania (Leishmania) chagasi* e leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus*, foram estudadas química e biologicamente. O fracionamento cromatográfico dos dois extratos permitiu o isolamento de 10 compostos com alguma atividade antiparasitária ou antifúngica.

Cinco compostos foram extraídos do extrato acetato de etila das folhas de *S. odoratissima*: um sesquiterpeno: 6-acetoxi,1-hidroxiudesm-4(15)-eno (IC<sub>50</sub> de 13,9  $\mu\text{g/mL}$  em *P. falciparum*); uma lignana: sesamina (IC<sub>50</sub> de 9,1  $\mu\text{g/mL}$  em *P. falciparum*); um triterpeno:  $\beta$ -sitosterol (IC<sub>50</sub> de 8,6  $\mu\text{g/mL}$  em *P. falciparum*); e dois compostos poliprenil biciclo acilfluoracil: spiranthenona A e B (CIM de  $> 100$  e 12,5  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente em *Candida albicans* ATCC 10231 e *C. albicans* isolado clínico LMGO 102).

Os compostos 6-acetoxi,1-hidroxiudesm-4(15)-eno e spiranthenona A e B foram pela primeira vez extraídos de uma planta. A sesamina foi pela primeira vez relatada na espécie *S. odoratissima*.

Do extrato acetato de etila das raízes de *D. hispida* foi possível isolar cinco compostos: isodiospirina, 4-hidroxi-5-metoxi-2-naftaldeído, ácido betulínico, e dois compostos não identificados: LC-9 e LC-10. Esses compostos são pela primeira vez descritos para a espécie *Diospyros hispida*. A atividade dos compostos foi monitorada em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

O conjunto dos resultados evidencia a atividade antiparasitária de *S. odoratissima* e *D. hispida*, principalmente em *P. falciparum* e *L. (L.) amazonensis*. Esse trabalho vem valorizar o patrimônio vegetal do Cerrado brasileiro.

#### 4. PERSPECTIVAS

Avaliar a eficácia dos compostos isolados de *Spiranthera odoratissima* em formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Avaliar os compostos isolados de *S. odoratissima* em modelo *in vivo* de leishmaniose cutânea.

Analisar os compostos spiranthenona A e B em modelos animais de infecção fúngica.

Avaliação da toxicidade *in vivo* dos compostos ativos.

A triagem realizada nestes extratos de plantas foi capaz de demonstrar as atividades antiparasitárias de diferentes partes de *Spiranthera* e *Diospyros*. Estes extratos ativos foram obtidos em acetato de etila, sugerindo que as moléculas de interesse são moderadamente polares. O estudo destas espécies não foi completamente abordado nesta tese e merece uma investigação mais aprofundada.

Diversos extratos apresentaram atividade antifúngica interessante, o que abre novas perspectivas para o estudo.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As espécies vegetais foram coletadas (Quadro 3) e identificadas juntamente com o botânico Prof. José Elias de Paula – UnB, entre os anos de 2006 e 2007. Exsicatas foram mantidas no Herbário da Universidade de Brasília (UB/UnB). Os diferentes órgãos foram separados (casca e madeira do caule e da raiz, fruto, folhas e capítulo floral), dessecados, estabilizados e pulverizados (Figura 69).



**Figura 69:** 1- Coleta de casca do caule; 2- Secagem do material vegetal; 3- Moinho de facas utilizado para pulverizar o material vegetal.

### 5.2. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

O Laboratório de Farmacognosia/ UnB possui uma extensa coleção de extratos brutos no « Banco de Extratos de Plantas do bioma Cerrado », registrado no Conselho de Gestão do Patrimônio Genético do Ministério do Meio Ambiente sob o

processo CGEN/MMA n° 02000.002272/2006-73. O pó do material vegetal foi submetido ao processo de extração por maceração com os solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e solução hidroalcoólica. Esses solventes possuem diferentes polaridades. A pré-filtração e a filtração permitiram a obtenção da solução extrativa, que foi concentrada em rotaevaporador, fornecendo diferentes extratos brutos, que foram armazenados em freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 5.3. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

#### 5.3.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

- Fase estacionária: Sílica gel 60 PF<sub>254</sub> (230-400 mesh - Merck®).
- Fase móvel: ciclohexano (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>), diclorometano (Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), acetado de etila (AcOEt) e metanol (MeOH).

A placa foi observada sob lâmpada UV a 254 e a 365 nm e revelada com reativos não-específicos e específicos. Os reagentes utilizados foram: Ácido fosfomolibdico (revelador universal), vanilina sulfúrica (revelador universal) e anisaldeído (revelador de açúcares, esteróides e terpenos).

#### 5.3.2. Cromatografia de camada delgada preparativa

A cromatografia em camada delgada preparativa foi feita utilizando-se o mesmo princípio da CCD analítica. A diferença é que as zonas de sílica correspondente aos compostos foram recuperadas da placa no final da migração.

A amostra foi solubilizada em Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> de maneira a obter a sua dissolução total, sendo em seguida, depositada sobre a placa com o auxílio de um capilar. A placa foi colocada em uma cuba saturada com um eluente C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> /AcOEt e, no fim da migração, foi seca e examinada sob a luz UV. Uma parte desta placa foi revelada com revelador adequado e as zonas onde se encontravam os compostos foram delimitadas. Com o auxílio de uma espátula, a sílica foi recuperada e lavada com

diclorometano, depois filtrada e concentrada sob pressão reduzida em rotaevaporador.

### 5.3.3. Cromatografia líquida à pressão atmosférica

- Fase estacionária: Sílica gel 70-230 mesh (Merck®) para cromatografia em coluna (CC). As frações obtidas foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico em CCD.

- Fase móvel: C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>, Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, AcOEt, MeOH.

### 5.3.4. Filtração em gel de dextrano: Sephadex LH-20

- Fase estacionária: gel reticulado de dextrano – Sephadex LH-20. As substâncias foram separadas de acordo com o peso molecular.

- Fase móvel: MeOH

### 5.3.5. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC)

- Fase estacionária: coluna fase reversa AIT CHROMATO Kromasil C<sub>18</sub> 5µm 100 Å®

- Fase móvel: acetonitrila grau HPLC, H<sub>2</sub>O milique, Ácido trifluoracético (TFA).

A mistura e o fluxo, 0,8 mL/min, foram regulados por uma bomba (Bomba GILSON 321®). Foi usado o detector de arranjo de fotodiodos GILSON 170®.

### 5.3.6. Cromatografia líquida à média pressão (MPLC)

Bomba: KNAUER® K-120

Detector: KNAUER® detector UV K-2001

- Suportes para cromatografia: coluna fase reversa AIT CHROMATO® Coluna Flash C-18, 40 – 60 µm (2, 4, 10 e 40 g) e AIT CHOMATO® Coluna Flash, 40-60 µm (2, 4, 10 e 40 g).

- Fase móvel: C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt, MeOH, acetronitrila grau HPLC e H<sub>2</sub>O milique.

O MPLC é um método de separação com o mesmo princípio do HPLC. Foram utilizadas colunas constituídas de sílica reversa com cadeias de carbono C<sub>18</sub> e colunas de SiO<sub>2</sub>.

#### 5.4. MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS DE ANÁLISE

##### 5.4.1. Espectrometria de massa

- Aparelho utilizado: Espectrômetro híbrido ESI-Qq-TOF QSAR Pulsar.

A ionização foi realizada por eletronebulização (ESI) e permitiu obter íons não fragmentados, do tipo (M+nH)<sup>n+</sup> em modo positivo, ou íons desprotonados do tipo (M-nH)<sup>n-</sup> em modo negativo. O analisador a tempo de voo (TOF) permitiu a separação unicamente em função da energia cinética adquirida após a aceleração do campo elétrico, a distância percorrida foi dada em função da massa. A interpretação dos espectros de massa permitiu calcular a massa do composto, e associada à interpretação dos espectros de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C permitiu deduzir sua fórmula bruta.

##### 5.4.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

- Aparelho: Brüker AC 300 para os experimentos de 1D (300,13 MHz para <sup>1</sup>H e 75,47 MHz para <sup>13</sup>C) e Brüker avance 400 para os experimentos de 2D (400,13 MHz para <sup>1</sup>H e 100,61 MHz para <sup>13</sup>C).

- Solvente: Sigma<sup>®</sup> (RMN) 98- 99,9% deuterados.

Nas descrições dos espectros de RMN, *s* significa simpleto, *d* dubleto, *t* tripleto, *q* quadrupeto, *m* multipeto. As constantes de acoplamento (*J*) são medidas em Hz (Hertz) e os deslocamentos químicos são medidos em ppm, tendo como referência o deslocamento químico de tetrametilsilano.

#### 5.4.2.1. Espectros unidimensionais: RMN-1D

##### Espectro RMN de $^1\text{H}$

Por meio deste espectro, foi possível visualizar os deslocamentos químicos do hidrogênio ( $d_{\text{H}}$ ) que permitem determinar as regiões do espectro característicos de certos grupamentos químicos. A intensidade do sinal é proporcional ao número de hidrogênios considerados; assim, a curva de integração permitiu determinar o número de hidrogênios representados por este sinal.

##### Espectro RMN $^{13}\text{C}$ *J*-modulado

Este espectro mostrou o número de carbonos, assim como seus deslocamentos químicos, característicos de certos grupamentos. O espectro *J*-modulado permitiu distinguir os carbonos quaternários e secundários, dos carbonos primários e terciários.

#### 5.4.2.2. Espectros bidimensionais: RMN-2D

##### Espectros HSQC: Heteronuclear Single Quantum Correlation (2D, $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )

Por meio desta técnica podem-se evidenciar as correlações diretas entre hidrogênios e carbonos ( $^1J_{\text{CH}}$ ), e também distinguir os carbonos protonados dos carbonos quaternários.

##### Espectro COSY: COrelated SpectroscopY (2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ )

Evidenciou os acoplamentos  $^2J_{\text{HH}}$  e  $^3J_{\text{HH}}$  e permitiu determinar os fragmentos das estruturas.

##### Espectro HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation (2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )

Indicou as correlações entre hidrogênios e carbonos à longa distância: acoplamentos  $^2J_{\text{CH}}$ ,  $^3J_{\text{CH}}$ , por vezes  $^4J_{\text{CH}}$ . Permitiu agrupar os fragmentos de estrutura determinados pelas análises precedentes.

##### Espectro NOESY: Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY (2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ )

Evidenciou os acoplamentos dipolares ( $d \approx 5\text{\AA}$ ), trazendo informações estereoquímicas, o que permitiu verificar a estrutura e determinar a configuração relativa das moléculas, principalmente de duas que são isômeras.

#### 3.4.2.3 Espectroscopia em Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção em infravermelho (IV) foram registrados em um aparelho FTIR SHIMADZU 8400S<sup>®</sup>. Cada espectro representa as características das funções químicas do composto de interesse.

#### 5.4.2.3. Rotação ótica

Os poderes rotatórios ( $[\alpha]_D$ ) foram determinados por um polarímetro Perkin-Elmer 341<sup>®</sup>. O raio D (589 nm) de uma lâmpada de sódio foi utilizado como origem da luz incidente. A concentração foi expressa em g/100 mL.

### 5.5. TESTES BIOLÓGICOS

#### 5.5.1. Atividade *in vitro* em *Plasmodium falciparum*

Os testes foram realizados no Laboratório de Biologia Funcional dos Protozoários USM 0504, do Museu Nacional de História Natural de Paris, França. A atividade em *Plasmodium falciparum*, cepa FcB1 resistente à cloroquina, foi avaliada por incorporação de hipoxantina tritiada no DNA do parasito, segundo a técnica descrita por Desjardins (1979). A cepa foi mantida em cultura de hemácias segundo o método descrito por Trager & Jensen (1976).

Os testes foram realizados em placas de 96 poços contendo 92  $\mu\text{L}$  de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com albumina 5%; 8  $\mu\text{L}$  do extrato ou fração ou composto a ser testado na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  no primeiro poço, com sucessivas diluições seriadas. As diluições variaram entre 100 e 1,56  $\mu\text{g/mL}$ . Uma suspensão de hemácias infectadas com o parasito na sua forma de anel, em 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura, foi adicionada na placa.

As placas foram incubadas durante 24 h a 37 °C, em ambiente enriquecido com 5% de  $\text{CO}_2$ . Após esse período, foram adicionados 25  $\mu\text{L}$  de hipoxantina tritiada, à concentração de 0,5  $\mu\text{Ci}$ , em cada poço e as placas foram recolocadas na



estufa durante 24 h a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. A hipoxantina tritiada se incorpora ao DNA do parasito viável, permitindo a quantificação por um cintilador. A etapa seguinte consistiu em se congelar a placa por 2 h, descongelando-a em seguida. Este procedimento teve a finalidade de lisar as células.

Os poços foram então filtrados para recuperação do DNA em filtros revestidos com fibra de vidro, lavados com água, secos (na estufa) e somente então foi adicionado o líquido cintilador. Um aparelho de leitura de cintilação permitiu a determinação da radioatividade. Valores baixos de radioatividade correspondem à inibição do crescimento do parasito. A curva dada em função f (taxa de radioatividade) = - log [concentração da amostra] permitiu determinar o IC<sub>50</sub>. A cloroquina foi utilizada como controle positivo.

#### 5.5.2. Atividade *in vitro* em formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Os extratos considerados ativos para *P. falciparum* foram avaliados em *L. (L.) chagasi* e um dos extratos teve o fracionamento cromatográfico biomonitorado em *L. (L.) amazonensis*. Os testes foram feitos em placa de cultura celular de 96 escavações. Cada poço recebeu 100 µL de meio Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino e gentamicina, para *L. (L.) amazonensis* e RPMI 1640, para *L. (L.) chagasi*. Em seguida, foram adicionados 8 µL dos extratos ou substâncias na concentração de 10 µg/mL, e 10<sup>6</sup> formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* ou *L. (L.) amazonensis*. O volume de cada poço foi completado para 200 µL com meio de cultura. A placa foi incubada a 22 °C por 48 h em estufa de B.O.D. Após o período de incubação foi realizada a análise dos parasitos por meio de um microscópio invertido. Foi utilizado o seguinte padrão: (0) não ativo; (+) pouco ativo; (++) ativo; (+++) muito ativo. Os extratos que inibiram 100% de parasitos na concentração de 100 µg/mL tiveram a IC<sub>50</sub> calculada.

Para este cálculo foram feitas diluições seriadas de 100 a 0,78 µg/mL. Como controle positivo foi utilizada a miltefosina<sup>®</sup> (25 µg/mL) e como controle negativo foi utilizado o DMSO a 1%. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### 5.5.3. Atividade *in vitro* em formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Camundongos Balb C de aproximadamente oito semanas receberam 0,5 mL de tioglicolato (5%) no peritônio, para estimular a produção de macrófagos, 3 dias antes do início do teste. Após este período, os animais foram sacrificados e com auxílio de uma seringa foram injetados 10 mL de meio RPMI 1640 gelado no peritônio dos animais. O meio de cultura foi recuperado juntamente com os macrófagos. Em seguida, o meio de cultura foi centrifugado por 7 minutos a uma rotação de 1200 gr a 4 °C.

O sobrenadante foi descartado e os macrófagos foram recuperados e ressuspensos em 3 mL de RPMI 1640. A contagem das células foi feita em uma câmara de Neubauer. Os testes foram feitos em placa de cultura celular de 24 escavações, contendo lamínulas de 13 mm, onde foram adicionadas  $8 \times 10^3$  células por poço e o volume completado para 400  $\mu$ L com meio de cultura. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>, *overnight*.

No segundo dia, foi retirado o meio de cultura de cada poço e adicionado 300  $\mu$ L de meio de cultura RPMI 1640 contendo  $8 \times 10^4$  de parasito, 10 vezes mais que o número de macrófagos. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C contendo 5% de CO<sub>2</sub>, por 4 h, período no qual os macrófagos realizaram a fagocitose dos parasitos presentes. Logo após esse período, o meio de cultura foi trocado pela diluição seriada das amostras a serem testadas, em concentrações variando de 100 a 12,5  $\mu$ g/mL. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C contendo 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 h.

Após esse período, o meio de cultura foi retirado e as lamínulas foram coradas com Giemsa<sup>®</sup>, por 10 minutos, lavadas com água destilada e as lâminas foram preparadas. A contagem do número de macrófagos infectados pelos parasitos foi realizada em microscópio.

Como controle positivo foi utilizada anfotericina B<sup>®</sup> (100 $\mu$ g/mL) e como controle negativo, o DMSO a 1%. Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 5.5.4. Atividade *in vitro* em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Os extratos considerados ativos para *P. falciparum* foram avaliados em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Os testes foram feitos em placa de cultura celular de 96 escavações. Cada poço recebeu 100 µL de meio LIT estéril suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 5% de soro fetal bovino. Em seguida, foram adicionados 8 µL dos extratos ou substâncias à concentração de 10 mg/mL, e  $10^6$  de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Cada poço foi completado com o volume de 200 µL de meio de cultura. A placa foi incubada a 22 °C por 72 h em estufa do tipo B.O.D. Após o período de incubação, foi realizada a análise dos parasitos por meio de um microscópio invertido. Foi utilizado o seguinte padrão: (0) não ativo; (+) pouco ativo; (++) ativo; (+++) muito ativo. Os extratos que inibiram 100% de parasitos à concentração de 100 µg/mL tiveram a IC<sub>50</sub> calculada. Como controle positivo, foi utilizado o benznidazol (100 µg/mL) e como controle negativo foi utilizado o DMSO a 1%. Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 5.5.5. Atividade antifúngica *in vitro*

##### 5.5.5.1. Fungos

Para os ensaios antifúngicos, foram utilizadas cepas de leveduras de *Cryptococcus neoformans* LMGO 02, *Cryptococcus gattii* LMGO 01, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* LMGO 174. Os micro-organismos foram mantidos em ágar batata dextrose inclinado à temperatura ambiente.

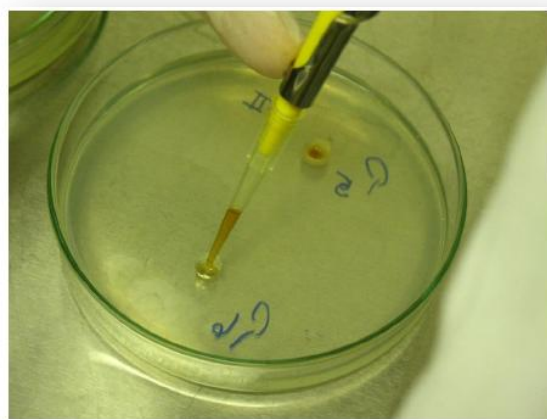
##### 5.5.5.2. Teste de difusão em ágar

As soluções de ágar batata dextrose foram preparadas com água destilada. Estas soluções foram então autoclavadas (20 min, 121 °C) e distribuídas em placas de Petri de 14 cm de diâmetro (20 mL de meio de cultura por placa). Após

solidificação do ágar, foram feitas cavidades de 6 mm de diâmetro, com auxílio de uma pipeta Pasteur.

Em seguida, uma suspensão de cada cepa foi preparada em solução salina a 0,85% ajustada para o padrão de turbidez McFarland 0,5 e distribuída uniformemente em toda a superfície de uma placa de Petri de 140 mm de diâmetro, contendo o meio de cultura puro e estéril. Na cavidade central de cada placa foram colocados 50  $\mu$ L de DMSO estéril, usado como controle negativo em nossos testes.

Os extratos a serem testados foram diluídos em DMSO estéril para a obtenção de uma concentração de 100 mg/mL. Um volume de 50  $\mu$ L desta solução foi depositado nas cavidades perfuradas (Figura 70), e as placas foram incubadas a 35 °C até que o crescimento dos fungos permitisse a medida visual de uma zona de inibição em torno de cada cavidade. A atividade antifúngica de cada extrato foi avaliada com base na presença ou ausência de halos de inibição do crescimento. Estes halos foram medidos com uma régua milimetrada, em quatro direções tendo como medida final o menor diâmetro. O teste foi realizado em duplicata e os resultados foram apresentados como a média da medida dos halos. Os antifúngicos fluconazol e itraconazol, a uma concentração de 10  $\mu$ g/mL, foram utilizados como controles positivos e o DMSO como controle negativo.



**Figura 70:** Adição dos extratos nas placas de Petri.

#### 5.5.5.3. Teste microdiluição em placa de 96 poços

O inóculo foi preparado a partir de cultura de 48 horas para espécies de *Candida* e *Cryptococcus*. A suspensão resultante foi homogenizada em vórtex durante 15 segundos e a densidade celular, ajustada à escala padrão de McFarland 0,5. Esse procedimento fornece uma suspensão-padrão de levedura contendo  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células/mL. A suspensão utilizada para realização dos testes antifúngicos foi produzida fazendo-se uma diluição 1:100, seguida de outra de 1:20 da suspensão-padrão com meio líquido RPMI 1640, resultando em uma concentração de  $5,0 \times 10^2$  a  $2,5 \times 10^3$  células/mL.

O teste de microdiluição foi realizado em placa estéril de 96 poços de fundo redondo. Inicialmente, foram colocados 100  $\mu$ L de meio RPMI em todos os poços da placa. Em seguida, nos poços da primeira coluna, foram adicionados 100  $\mu$ L do extrato e dos controles positivos, previamente diluídos na concentração adequada, que variou de 1000 a 1,95  $\mu$ g/mL. Foram realizadas diluições seriadas. Em seguida, adicionou-se 100  $\mu$ L do inóculo. A coluna onze foi preenchida com o meio RPMI e o micro-organismo (controle negativo) e a coluna doze com meio RPMI (controle de esterilidade do meio). As placas foram embaladas com filme PVC individualmente e incubadas em estufa a 35 °C por 48 h.

A leitura da concentração inibitória mínima (CIM) foi feita visualmente da direita para a esquerda, observando o crescimento do fungo no poço. No primeiro poço onde não foi observado crescimento do fungo foi considerado o valor do CIM. Os testes foram realizados em triplicata. O itraconazol e o fluconazol foram utilizados como controles positivos.

## 5.6. CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade foi avaliada em células de fibroblastos de mamífero da linhagem NIH-3T3. As células foram mantidas em meio DMEN, suplementado com gentamicina, em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>.

O teste foi realizado em placas de 96 poços seguindo a metodologia proposta por Mosmann (1983). No primeiro dia,  $8 \times 10^3$  células, contadas em câmara de Neubauer, foram colocadas em cada poço e o volume foi completado para 200  $\mu$ L com meio DMEN. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h, para que as células pudessem se aderir ao fundo do poço.

Os extratos e os compostos isolados foram então colocados em cada poço, previamente diluídos, em concentrações de 300 a 9,18 µg/mL. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h.

Após 24 h, a viabilidade celular foi determinada pelo teste colorimétrico do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolina bromido (MTT – Invitrogen®). Este teste consiste em adicionar 15 µL de uma solução de MTT a 5 mg/mL em PBS em cada poço. As placas são incubadas a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub> por 3 horas. Após este período, o meio de cultura foi retirado e 100 µL de DMSO adicionados em cada um dos poços. A absorbância é medida com um espectrofotômetro em um leitor de microplacas com comprimento de onda de 595 nm.

## 5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) do crescimento do parasito e da atividade em células NIH-3T3 foi determinada pela análise da regressão linear ou não-linear. Os resultados foram expressos como ± o desvio padrão, determinado a partir de três experimentos independentes (Microsoft Excel® 2003).

## 5.8. ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES DE *Spiranthera odoratissima*

### 5.8.1. Obtenção do extrato acetato de etila (AcOEt) das folhas de *Spiranthera odoratissima*

As folhas dessecadas, estabilizadas e pulverizadas (3000 g) de *S. odoratissima* foram submetidas a extrações sucessivas com AcOEt por um processo de maceração. O extrato bruto (20 g) foi obtido após a evaporação do solvente, sob pressão reduzida, a 40 °C em um rotaevaporador.

### 5.8.2. Fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt das folhas de *Spiranthera odoratissima*.

Em uma primeira etapa, 8 g do extrato foram submetido a uma coluna cromatográfica aberta em SiO<sub>2</sub> gel (800 g) com um gradiente C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/AcOEt (100:0 a 0:100) e em seguida, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (100:0 a 0:100).

Para eliminação dos ácidos graxos foi feita a deslipidização do extrato, por meio de uma separação líquido-líquido, em funil de separação.

Por esse motivo, foi realizada uma segunda etapa, em que outra parte do extrato (12 g) foi submetida a uma partição em funil de separação, com C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>, AcOEt, *n*-butanol e água. O objetivo desta partição foi reter os ácidos graxos na fração ciclohexânica. O extrato foi solubilizado em 100 mL de ciclohexano. Após 2 horas, a parte solúvel foi recuperada (m= 0,832 g). O restante foi solubilizado em 100 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, e concentrado em rotaevaporador. Esta fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foi novamente solubilizada em 200 mL de ciclohexano (m= 4,955 g). A fração solúvel no ciclohexano (m= 2,035 g) foi particionado em 100 mL de água (m= 0,057 g). A fração *n*-butanol obtida a partir da partição precipitou gerando duas sub-frações (m<sub>1</sub>= 0,435 e m<sub>2</sub>= 0,063 g). O resíduo insolúvel nesses três solventes foi solubilizado em 200 mL de AcOEt (m= 12,345 g). As frações foram testadas em cepas FcB1 de *P. falciparum* resistentes à cloroquina.

A fração ativa (inibição > 90% em *P. falciparum*) foi submetida à cromatografia em coluna aberta de sílica gel (800 g) com gradiente de C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/AcOEt (95:5 a 0:100), e em seguida AcOEt /MeOH (80:20 a 0:100). Foram obtidas 22 subfrações (Tabela 18).

**Tabela 18:** Frações obtidas do fracionamento do extrato acetato de etila das folhas de *S. odoratissima*, com respectivos rendimentos e % de inibição em *P. falciparum*.

Frações	Quantidade (mg)	Rendimento %	<i>P. falciparum</i> % de inibição
1	7	0,1	< 90
2	118	1	< 90
3	76	0,6	< 90
4	85	0,7	98,3
5	821	6,8	< 90
6	457	3,8	96,5
7	440	3,7	< 90
8	243	2	< 90

9	511	4,3	< 90
10	435	3,6	97,2
11	289	2,4	< 90
12	537	4,5	98,5
13	359	3	< 90
14	298	2,5	< 90
15	517	4,3	< 90
16	609	5,1	< 90
17	905	7,5	< 90
18	429	3,6	< 90
19	542	4,5	< 90
20	654	5,5	< 90
21	3.111	25,9	98,8
22	373	3,1	98,4

Os grupos obtidos foram testados e os ativos foram submetidos a novos fracionamentos em coluna aberta de sílica gel, coluna aberta de Sephadex LH-20 e MPLC, com gradientes variados de solventes.

### 5.8.3. Isolamento de LC-1 (2 mg)

O composto LC-1 foi isolado de duas frações obtidas do fracionamento do extrato AcOEt de folhas de *Spiranthera odoratissima*.

A fração F-6 (17,6 mg) foi submetida à cromatografia em MPLC (2 g) com gradiente de C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/AcOEt (90:10 a 0:100) seguido de um gradiente AcOEt/MeOH (100:0 a 0:100). Deste fracionamento foram obtidas 17 subfrações. As subfrações SF-6-3 e SF-6-4 (10 mg) foram reunidas e novamente submetidas à cromatografia em MPLC (1 g) com gradiente de C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/AcOEt (90:10 a 0:100). Desta purificação foram obtidas 10 subfrações sendo que a subfração SF-6-(3-4)-2 foi identificada como LC-1.

O composto LC-1 foi novamente isolado da fração F-4, também usando o MPLC para a purificação.



#### 5.8.4. Isolamento de LC-2 (4 mg)

A fração 4 (61 mg) foi submetida a cromatografia em MPLC (3 g) com gradiente de  $C_6H_{12}/AcOEt$  (95:5 a 90:10). Foram obtidas 8 subfrações, dentre as quais a SF-3 que corresponde ao composto denominado LC-2. As subfrações SF-4 e SF-2 apresentaram como uma mistura dos compostos LC-2 e LC-1.

#### 5.8.5. Isolamento de LC-3 (25 mg)

A fração F-10 (435 mg) foi submetida a cromatografia em coluna aberta de sílica (1,5 g) com gradiente de  $C_6H_{12}/AcOEt$  (90:10 a 0:100) e em seguida  $AcOEt/MeOH$  (100:0 a 0:100). Deste fracionamento foi obtido o composto LC-3 puro na SF-1.

#### 5.8.6. Isolamento de LC-4 (2 mg) e LC-5 (3 mg)

A fração F-12 (8 mg) foi purificada em cromatografia de camada delgada preparativa. Após sucessivas eluições com um sistema eluente  $C_6H_{12}/AcOEt$  (99:1), duas bandas foram visíveis quando expostas à luz ultravioleta 256 nm. A primeira banda foi isolada, raspada da placa e a sílica foi lavada com diclorometano e filtrada, originando o composto LC-4. A segunda banda também foi isolada originando o composto LC-5.

### 5.9. ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES DE *Diospyros hispida*

#### 5.9.1. Obtenção do extrato de acetato de etila das raízes de *D. hispida*

As raízes dessecadas, estabilizadas e pulverizadas (3000 g) de *D. hispida* foram submetidas a extrações sucessivas com  $AcOEt$  por um processo de maceração. O extrato bruto (8 g) foi obtido após a evaporação do solvente, sob pressão reduzida, a 40 °C, em um rotaevaporador.

### 5.9.2. Fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt das raízes de *D. hispida*.

Uma alíquota desse extrato (7,8 g) foi submetida a uma partição em funil de separação com C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/AcOEt/H<sub>2</sub>O. O objetivo desta partição foi retirar grande parte dos ácidos graxos na fração ciclohexânica. A fração ativa em *L. (L.) amazonensis* com 100% de inibição foi submetida à cromatografia em coluna aberta de sílica gel (500 g) com gradiente de C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/AcOEt (100:0 a 0:100) e em seguida AcOEt/MeOH (95:5 a 0:100).

Os grupos obtidos foram testados e os ativos (Tabela 19) foram submetidos a novos fracionamentos em coluna aberta de sílica gel, e CCD preparativa com gradientes variados de solventes.

**Tabela 19:** Frações do extrato AcOEt da raiz de *D. hispida*, com o sistema de eluentes utilizados e as respectivas quantidades obtidas

Frações	Eluente (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> /AcOEt/MeOH)	Quantidade (mg)
F-1	100:0:0	89,4
F-2	98:2:0	54
F-3	98:2:0	43
F-4	95:5:0	45
F-5	95:5:0	220
F-6	95:5:0 e 90:10:0	490,2
F-7	90:10:0	651,7
F-8	85:15:0	332,6
F-9	80:20:0	842
F-10	80:20:0	972,1
F-11	80:20:0	375,9
F-12	70:30:0	105
F-13	70:30:0	575,4
F-14	60:40:0	87,2
F-15	60:40:0	203,8
F-16	50:50:0	253,8
F-17	50:50:0 e 30:70:0	200,5

F-18	30:70:0	360,9
F-19	0:100:0	85,9
F-20	0:100:0	170
F-21	0:95:5	140,8
F-22	0:95:5	118,2
F-23	0:90:10	400,1
F-24	0:85:15 e 0:80:20	880,3
F-25	0:70:30 e 0:60:40	210,2
F-26	0:50:50	140,5
F-27	0:50:50	102,6
F-28	0:0:100	500

---

A fração 9 mostrou-se rica em naftoquinonas, segundo seu perfil cromatográfico em CCD. Por esse motivo decidimos realizar uma extração de naftoquinonas utilizando para isso um funil de separação. Foram adicionados 10 mL de KOH (1N) a 700 g da fração, em seguida foram misturados 500 mL de diclorometano. A fase aquosa foi recuperada e acidificada com aproximadamente 10 mL de ácido clorídrico (HCl 1N), o pH foi conferido com fita de medição de pH. A fase diclorometânica foi concentrada e denominada de FD9.

À fase aquosa acidificada foram adicionados mais 500 mL de diclorometano e em seguida a fase orgânica foi recolhida e concentrada. Esta fase foi denominada FN9. A partir da FN9 (250 mg) foi preparada uma coluna aberta de SiO<sub>2</sub> gel (2 g) utilizando-se um gradiente de C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/AcOEt.

### 5.9.3. Isolamento de LC-6 (4 mg)

A fração F-11, oriunda do fracionamento do extrato das raízes de *D. hispida*, foi obtida no eluente C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/AcOEt (80:20). Por apresentar perfil puro em CCD esta foi submetida ao RMN e os espectros foram analisados e comparados aos dados já existentes na literatura.

#### 5.9.4. Isolamento de LC-7 (5 mg)

A fração FN9 (250 mg), obtida a partir da metodologia utilizada para extração das naftoquinonas, foi purificada originando 16 subfrações. A subfração SF-3 foi repurificada em coluna de SiO<sub>2</sub> gel utilizando dois gradientes de C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/AcOEt (95:5 a 90:10), de onde foram recuperadas 4 subfrações. Após análise espectroscópica em RMN e comparação dos dados aos já existentes na literatura, foi possível determinar a estrutura do LC-7.

#### 5.9.5. Isolamento de LC-8 (2 mg)

A FD9 (14 mg) foi submetida a uma cromatografia em camada delgada preparativa. Após sucessivas eluições com o sistema eluente C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/AcOEt (95:5), duas bandas foram isoladas, raspadas da placa e a sílica foi lavada com diclorometano e filtrada.

Foram obtidos 2 mg do composto LC-8 (1<sup>a</sup> banda), analisado em RMN, e os dados comparados com os já disponíveis na literatura. A segunda banda não foi identificada devido à pequena quantidade de amostra disponível.

#### 5.9.6. Isolamento de LC-9 (1 mg)

A subfração SF-2 obtida da purificação de FN9 foi submetida a uma cromatografia em camada delgada preparativa. Após sucessivas eluições com o sistema eluente C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/AcOEt (98:2), duas bandas foram isoladas, raspadas da placa e a sílica foi lavada com diclorometano e filtrada.

Foram obtidos 3 mg do composto LC-9 (1<sup>a</sup> banda de coloração alaranjada), analisado em RMN e os dados comparados aos já disponíveis na literatura. A segunda banda, de coloração marrom, não foi identificada devido à pequena quantidade de amostra disponível.

#### 5.9.7. Isolamento de LC-10 (1 mg)

O composto LC-10 foi obtido da purificação da subfração SF-8 (70 mg), originada da purificação da fração FN9. Foi feita uma coluna de SiO<sub>2</sub> gel (2 g) com gradiente C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/AcOEt (97:3 e 92:8) que deu origem a 3 subfrações. A subfração SF-2 foi submetida ao RMN por estar aparentemente pura quando visualizada em CCD.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, F.; Nagafuji, S.; Okabe, H.; Akahane; H.; Estrada-Muñiz, E.; Huerta-Reyes, M.; Reyes-Chilpa, R., 2004. Trypanocidal constituents in plants 3 Leaves of *Garcinia intermedia* and heartwood of *Calophyllum brasiliense*. *Biological Pharmaceutical Bulletin* 27: 141 – 143.

Abe, F.; Nagafuji, S.; Okama, M.; Kinjo, J.; Akahane; H.; Ogura, T.; Martinez-Alfaro, M. A.; Reyes-Chilpa, R., 2005. Trypanocidal constituents in plants 5. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in the seeds of *Persea Americana*. *Biological Pharmaceutical Bulletin* 28: 1314 – 1317.

Adam, P.; Arigoni, D.; Bacher, A.; Eisenreich, W., 2002. Biosynthesis of Hyperforin in *Hypericum perforatum*. *Journal of Medicinal Chemistry*. 45(21): 4786–4793.

Agrawal, A.; Siddiqui, I. R.; Singh, J., 1989. Coumarins from the roots of *Feronia limonia*. *Phytochemistry* 28: 1229 – 1231.

Adio, A. M., 2009. Germacrenes A–E and related compounds: thermal, photochemical and acid induced transannular cyclizations. *Tetrahedron* 65 (8): 1533–1552.

Aguilar, H. M.; Abad-Franch, F.; Dias, J. C.; Junqueira, A. C.; Coura, J. R., 2007. Chagas disease in the Amazon region. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (1): 47 – 56.

Akendengue, B.; Ngou-Milama, E.; Laurens, A.; Hocquemiller, R., 1999. Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products. *Parasite* 6 (1): 3 – 8.

Al Coluzzi, M.; Sabatini, A.; Della Torre, A.; Di Deco, M. A.; Petrarca, V., 2002. A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science* 298: 1415 – 1418.

Algiannis, N.; Kalpotzakis, K.; Mitaku, S.; Chinou, L.B., 2001. Composition and antimicrobial activity of essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 4168 – 4170.

Alvar, J.; Yactayo, S.; Bern, C., 2006. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitology* 22: 552 – 557.

Alves, T. M. A; Silva, A. F.; Brandão, M., 2000. Biological Screening of Brazilian Medicinal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95: 367 – 373.

Amato, V. S.; Padilha, A. R. S.; Nicodemo, A. C.; Duarte, M. I. S.; Valentini, M.; Uip, D. E.; Boulos, M.; Amato, V. N., 2000. Use of Itraconazole in the treatment of mucocutaneous Leishmaniasis: A pilot study. *International Journal of Infectious Diseases* 4(3):153 – 157.

Andrade, Z.A.; Brener, Z. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Editora Guanabara Koogan 2ª Edição.

Antinori, S.; Cascio, A.; Parravicini, C.; Bianchi, R.; Corbellino, M., 2008. Leishmaniasis among organ transplant recipients. *Lancet Infectious Diseases* 8: 191-199.

Antunes, A. G. V.; Pasqualotto, A. C.; Diaz, M. C.; D`Azevedo, P. A.; Severo, L. C., 2004. Candidemia in a Brazilian Tertiary care Hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 46(5): 239 – 241.

Arevalo, I.; Ward, B.; Miller, R.; Meng, T. C.; Najar, E.; Alvarez, E.; Matlashewski, G.; Lanos, L.; Cuentas, A., 2001. Successful Treatment of Drug-Resistant Cutaneous Leishmaniasis in Humans by Use of Imiquimod, an Immunomodulator. *Clinical Infectious Diseases* 33: 1847 – 1851.

Arriaga, A. C.; De Mesquita, A. C.; Pouliquen, Y. B.; De Lima, R. A.; Cavalcante, S. H.; De Carvalho, M. G.; De Siqueira, J. A.; Alegrio, L. V.; Braz-Filho, R., 2002. Chemical constituents of *Simarouba versicolor*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 74: 415 – 424.

Arruda, D. C.; Dalexandri, F. L.; Katzin, A. M.; Uliana, S. R. B., 2005. Antileishmanial activity of terpene nerolidol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 1679 – 1687.

Ashford, R. W., 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology* 30: 1269 – 1281.

Atjanasuppat, K.; Wongkham, W.; Weepowpan, P.; Kittakoo, P.; Sobhon, P.; Bartlett, A.; Whitfield, P.J., 2009. *In vitro* screening for anthelmintic and antitumour activity of ethnomedicinal plants from Thailand. *Journal of Ethnopharmacology* 123: 475 – 482.

Audi, E. A.; Otobone, F.; Martins, J. V. C.; Cortez, D. A. G., 2002. Preliminary evaluation of *Kielmeyera coriacea* leaves extract on the central nervous system. *Fitoterapia* 73: 517 – 519.

Ault, S. K., 2007. Pan American Health Organization's Regional Strategic Framework for addressing neglected diseases in neglected populations in Latin America and the Caribbean. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (1): 99 – 107.

Auto, H. J. F., 2002. *Doenças Infecciosas e parasitárias*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 321 – 329.

Avila, M.; Saïd, N.; Ojcius, D. M., 2008. The book reopened on infectious diseases. *Microbes and Infection* 10: 942-947.

Awad, A. B.; Barta, S. L.; Fink, C. S.; Bradford, P. G., 2008. *Molecular Nutrition & Food Research* 52 (4): 419 – 426.

Bacellar, O.; Carvalho, E. M., 2005. Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral. *Gazeta Médica da Bahia* 75: 24 – 34.

Baneth, G.; Koutinas, A. F.; Soalno-Gallego, L.; Bourdeau, P.; Ferrer, L., 2008. Canine leishmaniosis – New Concepts and Insights on an Expanding Zoonosis. *Trends in Parasitology* 24 (7): 324-330.

Basselin, M.; Robert-Gero, M., 1998. Alterations in membrane fluidity, lipid metabolism, mitochondrial activity and lipophosphoglycan expression in pentamidine-resistant *Leishmania*. *Parasitology Research* 84: 78-83.

Basso, L. A.; Pereira da Silva, L. H.; Fett-Neto, A. G.; de Azevedo Jr.; W. F., Moreira, I. S.; Palma, M. S.; Calixto, J. B.; Astolfi Filho, S.; dos Santos, R. R.; Soares, M. B.



P.; Santos, D. S., 2005. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases - a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100(6):475-506.

Bayindir, U.; Alfermann, A.W.; Fuss, E., 2008. Hinokinin biosynthesis in *Linum corymbulosum* Reichenb. *Plant Journal* 55(5): 810-820.

Bell, C.; Hall, J.; Kyle, D.; Groggl, M.; Ohemeng, K.; Allen, M.; Tidwell, R., 1990. Structure-activity relationships of analogs of pentamidine against *Plasmodium falciparum* and *Leishmania (Mexicana) amazonensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34: 1381 – 1386.

Benham, R. W., 1955. The genus *Cryptococcus*: the present status and criteria for the identification of species. *Transactions of the New York Academy of Sciences* 17 (5): 418 – 429.

Berger, I.; Barrientos, A. C.; Caceres, A.; Hernandez, M.; Rastrelli, L.; Passreiter, C. M.; Kubelka, W., 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections: II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Ethnopharmacology* 62: 107-115.

Bernhard, D.; Schwaiger, W.; Crazzolaro, R.; Tinhofer, I.; Kofler, R.; Csordas, A., 2003. Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEMC7H2 lymphocytic leukemia cells. *Cancer Letters* 195: 193 – 199.

Bhatia, A.; Daifalla, N. S.; Jen, S.; Badaro, R.; Reed, S. G.; Skeiky, Y. A., 1999. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. *Molecular and Biochemistry Parasitology* 102(2): 249 – 261.

Bhatnagar, S.; Polonsky J.; Prange, T.; Pascard, C., 1984. New toxic quassinoid glucosides from *Simaba glauca*. *Tetrahedron Letters* 25: 299 – 302.

Bicanic, T.; Harrison, T., 2005. Cryptococcal meningitis. *British Medical Bulletin* 72: 99-118.

Bocchi, E. A.; Fiorelli, A., 2001. The Paradox of Survival Results After Heart Transplantation for Cardiomyopathy Caused by *Trypanosoma cruzi*. The Annals of Thoracic Surgery 71: 1833 – 1838.

Bodiwala, H. S.; Singh, G.; Singh, R.; Dey, C. S.; Sharma, S. S.; Bhutani, K. K.; Singh, I. P., 2007. Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. Journal of Natural Medicines 61:418 – 421.

Boelaert, M.; Criel, B.; Leeuwenburg, J.; Damme, van W .; Le Ray, D., 2000. Visceral leishmaniasis control: A public health perspective. Royal Society Tropical Medical and Hygiene 94: 465–471.

Bogdan, C., 2008. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. Cellular Microbiology 10: 1221 – 1234.

Bohlmann, F.; Ates (Gören), N.; King. R. M.; Robinson. H., 1983. Two sesquiterpenes from *Senecio* species. Phytochemistry 22 (1): 1675-1677.

Bonassoli, L. A.; Bertoli, M.; Svidzinski, T. I., 2005. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. Journal of Hospital Infections 59 (2): 159 – 162.

Borges-Argáez, R.; Canche-Chay, C. I.; Peña-Rodríguez, L. M.; Said-Fernández, S.; Molina-Salinas, G. M., 2007. Antimicrobial activity of *Diospyros anisandra*. Fitoterapia 78: 370 – 372.

Bouic, P. J.; Lamprecht, J. H., 1999. Plant sterols and sterolins: a review of their immune-modulating properties. Alternative Medicine Review 4(3):170 – 177.

Bourdy, G.; Oporto, P.; Gimenez, A.; Deharo, E., 2004. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaraní Indians. Journal of Ethnopharmacology 93: 269 – 277.

Braga, F. G.; Bouzada, M. L. M.; Fabri, R. L.; Matos, M. O.; Moreira, F. O.; Scio, E.; Coimbra, E. S., 2007. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. Journal of Ethnopharmacology 111 (2): 396 – 402.

Braga, I. A.; Valle, D., 2007. *Aedes aegypti*: Surveillance, Resistance Monitoring, and Control Alternatives in Brazil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 16: 295 – 302.

Brandão, M. G. L.; Grandi, T. S. M.; Rocha, T. M. M.; Sawyer, D. R.; Krettli, A. U., 1992. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology* 36: 175 – 182.

Brendle, J. J.; Outlaw, A.; Kumar, A.; Boykin, D. W.; Patrick, D. A.; Tidwell, R. R.; Werbovetz, K. A., 2002. Antileishmanial activities of several classes of aromatic dications. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 797 – 807.

Brenzan, M. A.; Nakamura, C. V.; Dias Filho, B. P.; Ueda-Nakamura, T.; Young, M. C. M.; Cortez, D. A. G., 2007. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. *Parasitology Research* 101:715 – 722.

Buenz, E. J.; Bauer, B. A.; Motley, T. J.; Limburg, P. J., 2007. Cytotoxic properties of *Diospyros seychellarum* extract. *Journal of Toxicological Science* 32(5):487 – 493.

Cai, Y.; Chen, Z. P.; Phillipson, J. D., 1993. Diterpenes From *Croton Lechleri*. Part 2. Biological And Chemical Investigations of Dragon's Blood From *Croton* Species Of South America. *Phytochemistry* 32: 755 – 760.

Cai, Y.; Evans, F. J.; Roberts, M. F.; Phillipson, J. D.; Zenk, M. H.; Gleba, Y., 1991. Polyphenolic Compounds From *Croton Lechleri*. Part 1. *Phytochemistry* 30: 2033 – 2040.

Campello, J. P.; Arsaioli, A. J., 1975. Terebenthifolic acid and bauerenone, new triterpenoid ketones from *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry* 14: 2300 – 2302.

Casimiro, S.; Coleman, M.; Mohloai, P.; Hemingway, J.; Sharp, B., 2006. Insecticide resistance in *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) from Mozambique. *Journal of Medical Entomology* 43(2):267 - 275.

Catalan, M.; Montejo, J. C., 2006. Antifúngicos sistémicos. *Revista Iberoamericana de Micología* 23: 39 – 49.

Ceruks, M.; Romoff, P.; Favero, O. A.; Lago, J. H. G., 2007. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Quimica Nova* 30: 597 – 599.

Chai, Y.; Yan, S.; Wong, I. L. K.; Chow, L. M. C.; Sun, H., 2005. Complexation of antimony (Sbv) with guanosine 5'-monophosphate and guanosine 5'-diphospho-Dmannose: Formation of both mono- and bis-adducts. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99: 2257-2263.

Chadee, D. D.; Rawlins, S. C.; Tiwari, T. S., 2003. Short communication: concomitant malaria and filariasis infections in Georgetown, Guyana. *Tropical Medicine and International Health* 8(2):140 – 143.

Chan, J. A.; Shultis, E. A.; Carr, S. A.; DeBrosse, C. W.; D. S. Eggleston, D. S.; Francis, T. A.; Hyland, L. J.; Johnson, W. P.; Killmer, L. B.; Staiger, D. B.; Westley, J. W., 1989. Novel Phloroglucinols from the Plant *Melicope sessiliflora* (Rutaceae). *Journal of Organic Chemistry* 54: 2098-2103

Chappuis, F.; Sundar S.; Hailu, A.; Ghalib, H.; Rijal, S.; Peeling, R. W.; Alvar, J.; Boelaert, M., 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews* 5: 873-882.

Chayakulkeeree, M.; Perfect, J. R., 2006. Cryptococcosis. *Infectious Diseases Clinical of North America* 20(3):507 – 544.

Chen, C. R.; Cheng, C. W.; Pan, M. H.; Liao, Y. W.; Tzeng, C. Y.; Chang, C. L., 2007. Lanostane-Type Triterpenoids From *Diospyros discolor*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 55: 908 – 911.

Chen, Z. P.; Cai, Y.; Phillipson, J. D., 1994. Studies On The Antitumour, Antibacterial And Wound Healing Properties Of Dragon's Blood. Part 4. Biological And Chemical Investigations Of Dragon's Blood From *Croton* Species Of South America. *Planta Medica* 60: 541 – 545.

Chen, S. C.; Sorrell, T. C., 2007. Antifungal agents. *The Medical Journal of Australia* 187(7):404-9.

Ciochina, R.; Grossman, R. B., 2006. Polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols. *Chemistry Reviews* 106(9): 3963-86.

Cohen, B. E., 1998. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. *International Journal of Pharmaceutical* 162: 95.

Colombo, A. L.; Guimarães, T., 2003. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36: 599 – 607.

Corrêa, M. P.; Penna, L. A., 1984. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Ed. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro.

Cortez, D. A. G.; Young, M. C. M.; Marston, A.; Wolfender, J. L.; Hostettmann, K., 1998. Xanthones, triterpenes and biphenil from *Kielmeyera coriacea*. *Phytochemistry* 47: 1367 – 1374.

Cottiglia, F.; Dhanapal, B.; Sticher, O.; Heilmann, J., 2004. New chromanone acids with antibacterial activity from *Calophyllum brasiliense*. *Journal of Natural Products* 67: 537-541.

Coutinho, L. M., 2002. O bioma do cerrado. In: Eugen Warming e o cerrado brasileiro – um século depois. São Paulo: Editora Unesp.

Croft, S. L.; Coombs, G. H., 2003. Leishmaniasis - current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology* 19: 502 – 508.

Croft, S. L.; Seifert, K.; Yardley, V., 2006. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian Journal of Medical Research* 123(3):399 – 410.

Cuervo, P. ; Domont, G. B.; De Jesus, J.B., 2010. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *Journal of Proteomics* 73(5): 845-867.

Cui, Y.; Hou, X.; Chen, J.; Xie, L.; Yang, L.; Le, Y., 2010. Sesamin inhibits bacterial formylpeptide-induced inflammatory responses in a murine air-pouch model and in THP – 1 human monocytes. *Journal of Nutrition* 140(2):377 – 381.

da Silva, P. R.; Rabelo, R. A. da S.; Terra, A. P. S.; Teixeira, D. N. S., 2008. Susceptibility to antifungal agents among *Cryptococcus neoformans* varieties isolated from patients at a university hospital. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41(2): 158-162.

Dantas-Torres, F.; Brandão-Filho, S.P., 2006. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 48(3):151 – 156.

Davies, C. R.; Kaye, P.; Croft, S. L.; Sundar, S., 2003. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *British Medical Journal* 326: 377 – 382.

Davis, S. L. ; Vazquez, J. A. ; McKinnon, P.S., 2007. Epidemiology, risk factors, and outcomes of *Candida albicans* versus non-albicans candidemia in nonneutropenic patients. *The Annals of Pharmacotherapy* 41: 568 – 573.

De Carvalho, M. C.; Barca, F. N.; Agnez-Lima, L. F.; De Medeiros, S. R., 2003. Evaluation of mutagenic activity in an extract of pepper tree stem bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Environmental and Molecular Mutagenesis* 42(3):185 – 191.

De Jesus Freitas, C. M.; Lucchese, A. M.; Silva, F. S.; Velozo, E. S., 2003. Coumarins, furoquinoline alkaloids and terpenes from *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae). *Biochemistry System Ecology* 31: 805 – 807.

De La Cruz, M. G. F., 1997. Plantas medicinais utilizadas por raizeiros. Uma abordagem etnobotânica no contexto da saúde e da doença. Cuiabá: Dissertação de Mestrado, UFMT.

De La Loma A.; Alvar, J.; Martinez, G. E.; Blázquez, J.; Alcalá, M. A.; Nájera R., 1985. Leishmaniasis or AIDS? *Royal Society Tropical Medicine and Hygiene* 79(3):421 – 422.

De Lima, M. R. F.; De Souza Luna, J.; Dos Santos, A. F.; De Andrade, M. C. C.; Sant'Ana, A. E. G.; Genet, J-P.; Marquez, B.; Neuville, L.; Moreau, N., 2006. Antibacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 105: 137 – 147.

De Mesquita, M. L. ; Grellier, P. ; Blond, A. ; Brouard, J. P. ; De Paula, J. E. ; Espindola, L. S. ; Mambu, L., 2005b. New ether diglycosides from *Matayba guianensis* with antiplasmodial activity. *Bioorganic Medicinal Chemistry* 13: 4499 – 4506.

De Mesquita, M. L.; De Paula, J. E.; Pessoa, C.; De Moraes, M. O.; Costa-Lotufo, L. V.; Grougnet, R.; Michel, S.; Tillequin, F.; Espindola, L.S., 2009. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology* 123 : 439 – 445.

De Mesquita, M. L.; Desrivot, J. ; Bories, C. ; Fournet, A. ; De Paula, J. E. ; Grellier, P. ; Espindola, L. S., 2005a. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100 (7): 783 – 787.

De Mesquita, M. L.; Grellier, P.; Mambu, L.; De Paula, J. E.; Espindola, L. S., 2007. *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. *Journal of Ethnopharmacology* 110: 165 – 170.

Del Poeta, M.; Schell, W.; Dykstra, C.; Jones, S.; Tidwell, R.; Czarny, A.; Bajic, M.; Bajic, M.; Kumar, A.; Boykin, D.; Perfect, J., 1998. Structure in vitro activity relationships of pentamidine analogs and dication-substituted bisbenzimidazoles as new antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42: 2495 – 2502.

Delgado, J.; Macias, J.; Pineda, J. A.; Corzo, J. E.; Gonzalez-Moreno, M. P.; De La Rosa, R.; Sanchez-Quijano, A.; Leal, M.; Lissen, E., 1999. High Frequency of serious side effects from meglumine antimoniate given without an upper limit dose for the treatment of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1 - infected patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 61: 766 – 769.

Delorenzi, J. C.; Attias, M.; Gattass, C.; Andrade, M.; Rezende, C.; Pinto, A. C.; Henriques, A. T.; Bou-Habib, D. C.; Saraiva, E. M., 2001. Antileishmanial activity of na índole alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(5):1349–1354.

Demicheli, C.; Frézard, F.; Lecouvey, M.; Garnier-Ssuillerot, A., 2002. Antimony (V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. *Biochimica et Biophysica Acta* 1570: 192 – 198.

Desjardins, R.; Canfield, C.; Haynes, J.; Chulay, J., 1979. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 16: 710 – 718.

Desjeux, P., 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 27: 305 – 318.

Develoux, M.; Bretagne, S., 2005. S. Candidiasis and yeast infections. *EMC - Maladies Infectieuses* 2: 119 – 139.

Develoux, M.; Lescure, F-X.; le Loup, G.; Pialoux, G., 2009. Maladie de Chagas. *La revue de medicine inteme* 30: 686 – 695.

Di Stasi, L. C., 2002. Asteridae medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. In: di Stasi, L.C., Hiruma-Lima, C.A. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. São Paulo: Editora UNESP 2ª Ed., 372-93.

Dias, B. F. S., 1992. Cerrados: Uma Caracterização. In: Dias BF de S, Ed. *Alternativas de Desenvolvimento dos Cerrados: Manejo e Conservação dos Recursos Naturais Renováveis*. Brasília, DF, Brazil: FUNATURA.

Dias, J. C. P., 2007. Globalization, inequity and Chagas disease. *Cadernos de Saúde Pública* 23 (1): 13 – 22.

Dias, J. C. P.; Vinhaes, M. C., 2000. Doença de Chagas no Brasil. *Caderno de Saúde Pública* 16, Suplemento 2.

Dicionário de Especialidades Farmacêuticas, DEF 2000. Editora Guanabara Kogan.

Domínguez-Carmona D. B.; Escalante-Erosa F.; García-Sosa K.; Ruiz-Pinell, G.; Gutierrez-Yapu, D.; Chan-Bacab, M. J.; Giménez-Turba, A.; Peña-Rodríguez, L. M., 2010. Antiprotozoal activity of betulinic acid derivatives. *Phytomedicine* 17(5): 379 – 382.

Dondorp, A. M.; Nosten, F.; Yi, P.; Das, D.; Phyto, A. P.; Tarning, J.; Lwin, K. M.; Arie, F.; Hanpithakpong, W.; Lee, S. J.; Ringwald, P.; Silamut, K.; Imwong, M.; Chotivanich, K.; Lim, P.; Herdman, T.; An, S. S.; Yeung, S.; Singhasivanon, P.; Day, N. P. J.; Lindegardh, N.; Socheat, D.; White, N. J., 2009. Artemisinin Resistance in



*Plasmodium falciparum* Malaria. The New England Journal of Medicine 361: 455 – 467.

Dondorp, A. M.; Yeung, S.; White, L.; Nguon, C.; Day, N. P.; Socheat, D.; Von Seidlein, L., 2010. Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. Nature Reviews Microbiology 8: 272 – 280.

Dondorp, A.; Nosten, F.; Stepniewska, K.; Day, N.; White, N., 2005. Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. South East Asian Quinine Artesunate Malaria Trial (SEAQUAMAT) group. Lancet 2 366: 717 – 725.

Dorsey, G.; Dokomajilar, C.; Kiggundu, M.; Staedke, S. G.; Kanya, M. R.; Rosenthal, P. J., 2004. Principal role of dihydropteroate synthase mutations in mediating resistance to sulfadoxine–pyrimethamine in single-drug and combination therapy of uncomplicated malaria in Uganda. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 71: 758 – 763.

Dos Santos, R. L. C.; Faya, A. S.; Aguiar, A. E. F.; Rodrigues, D. B.; Vieira; Póvoa, M. M., 2007. Avaliação do efeito residual de piretróides sobre anofelinos da Amazônia brasileira. Rev Saúde Pública 2007 41(2): 276 – 283.

Dujardin, J. C., 2005. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? Trends in Parasitology 22: 4 – 6.

Duke, J.; Vasquez, R., 1994. Amazonian Ethnobotanical Dictionary. CRC Press, Boca Raton, FL.

Dzamtika, S. A.; Falcão, C. A. B.; De Oliveira, F. B.; Marbeuf, C.; Garniersuillerot, A.; Demicheli, C.; Rossi-Bergmann, B.; Frézard, F., 2006. Role of residual Sb(III) in meglumine antimoniate cytotoxicity and MRP1-mediated resistance, Chemico-Biological Interactions 160(3): 217 – 224.

Dzoyem, J. P.; Tangmouo, J. G.; Lontsi, D.; Etoa, F. X.; Lohoue, P. J., 2007. *In vitro* antifungal activity of extract and plumbagin from the stem bark of *Diospyros crassiflora* Hiern (Ebenaceae). Phytotherapy Research 21: 671 – 674.

Eastman, R. T.; Fidock, D. A., 2009. Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria 7: 864 – 874.

Eggimann, P.; Gabino, J.; Pittet, D., 2003. Management of *Candida* species infections in critically ill patients. *Lancet infectious Diseases* 2(12): 772 – 785.

Eiznhamer, D. A.; Xu, Z. Q., 2004. Betulinic acid: a promising anticancer candidate. *IDrugs* 7(4):359-373.

El Tahir, A.; Satti, G. M. H.; Khalid, S. A., 1999. Antiplasmodial activity of selected Sudanese medicinal plants with emphasis on *Maytenus senegalensis* (Lam.) Exell. *Journal of Ethnopharmacology* 64: 227 – 233.

Enemark, H.; Seibaek, M. B.; Kirchhoff, L. V.; Jensen, G. B., 2000. Chronic Chagas diseaseas echo from youth. *Ugeskrift for Laeger* 162: 2567 – 2569.

Esmeraldino, L. E.; Souza, A. M.; Sampaio, S. V., 2005. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin. *Phytomedicine* 12: 570 – 576.

Espindola, L. S.; Vasconcelos Jr. J. R.; De Mesquita, M. L.; Marquié, P.; De Paula, J. E.; Mambu, L.; Santana, J. M., 2004. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. *Planta Medica* 70: 1093 – 1095.

Falagas, M. E.; Apostolou, K. E., Pappas, V. D., 2006. Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 25: 419 – 425.

Feliciangeli, M. D., 1999. Estudio integral de focos de leishmaniasis en Venezuela: Los vectores. Informe técnico del proyecto PCEE-VEN 96–002–006.

Feng Hu, J.; Bai, S-P.; Jia, W-J., 1996. Eudesmane sesquiterpenes from *Artemisia eripoda*. *Phytochemistry* 43 (4) : 815-817.

Fenner, R.; Betti, A. H.; Mentz, L. A.; Rates, S. M. K., 2006. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science* 42: 369 – 394.

- Fernandes, M. Z. L. C. M.; Fernandes, R. M.; Viana, G. E. N.; Lopes, J. B., 2004. Determinação da toxicidade aguda (DL<sub>50</sub>) do extrato aquoso da *Simarouba versicolor* St. Hill, em camundongos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 6: 48 – 51.
- Fernner, R.; Sortino, M.; Kuze Rates, S. M.; Dall’Agnol, R.; Ferraz, A.; Bernardi, A. P.; Albrig, D.; Nör, C.; Von Poser, G.; Schapoval, E. ; Zachinno, S., 2005. Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. *Phytomedicine* 5: 213 – 217.
- Ferreira, I.C.P.; Lonardoni, M.V.C.; Machado, G.M.C.; Leon, L.L.; Filho, L.G.; Pinto, L.H.B.; Oliveira, A.J.B. 2004. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 99: 325-327.
- Ferreira, L. G.; Yoshioka, H.; Huete, A.; Sano, E. E., 2003. Seasonal landscape and spectral vegetation index dynamics in the Brazilian Cerrado: An analysis within the Large-Scale Biosphere-Atmosphere Experiment in Amazônia (LBA). *Remote Sensing of Environment* 87 (4): 534 – 550.
- Ferreira, M. E.; Rojas de Arias, A.; Torres de Ortiz, S.; Inchausti, A.; Nakayama, H.; Thouvenel, C.; Hocquemiller, R.; Fournet, A., 2002. Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*. *Journal of Ethnopharmacology* 80(2-3): 199 – 202.
- Fisher, D. C. H.; Gualda, N. C. A.; Bachiega, D.; Carvalho, C. S.; Lupo, F. N.; Bonotto, S. V.; Alves M. O.; Yogi, A.; Di Santi, S. M.; Avila P. E.; Kirchegatter, K.; Moreno, P. R. H., 2004. *In vitro* screening for antiplasmodial activity of isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species. *Acta Tropica* 92 (3): 261 – 266.
- Fournet, A.; Barrios, A. A.; Muñoz, V.; Hocquemiller, R.; Cave, A.; Bruneton, J., 1993. 2-Substituted quinoline alkaloids as potencial antileishmanial drug. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37: 859 – 863.
- Fournet, A.; Barrios, A. A.; Muñoz, V.; Hocquemiller, R.; Roblot, F.; Bruneton, J.; Richomme P., Gantier, J. C., 1992. Quinoléines 2-substituées pour le traitement des leishmanioses. Brevet PCT/FR92/00903.
- Fournet, A.; Ferreira, M. E.; de Arias, A. R.; de Ortiz, S. T.; Fuentes, S.; Nakayama, H.; Schinini, A.; Hocquemiller, R., 1996. In Vivo Efficacy of oral and intralesional

administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leshmania amazonensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40: 2447 – 2451.

França T. C. C.; Santos, M. G.; Figueroa-Villar, J. D., 2008. Malária: Aspectos históricos e quimioterapia *Química Nova* 31: 1271 – 1278.

Franssen, F. F.; Smeijsters, L. J.; Berger, I.; Medinilla Aldana, B. E., 1997. *In vivo* and *in vitro* antiplasmodial activities of some plants traditionally used in Guatemala against malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 1500 – 1503.

Frevert, U., 2004. Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages. *Trends in Parasitology* 20 (9): 417 – 424.

Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), 2001. Ministério da Saúde. Manual de terapêutica da malária. Brasília.

Funke, I.; Melzig, M. F., 2006. Traditionally used plants in diabetes therapy - phytotherapeutics as inhibitors of  $\alpha$ -amylase activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16: 1 – 5.

Galanis, E.; Hoang, L.; Kibsey, P.; Morshed, M.; Philips, P., 2009. Clinical presentation, diagnosis and management of *Cryptococcus gattii* cases: Lessons learned from British Columbia. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology* 20: 23 – 28.

Ganapaty, S.; Thomas, P. S.; Karagianis, G.; Waterman, P. G.; Brun, R., 2006. Antiprotozoal and cytotoxic naphthalene derivatives from *Diospyros assimilis*. *Phytochemistry* 67: 1950 – 1956.

Ganapaty, S.; Thomas, P. S.; Mallika, B. N.; Balaji, S.; Karagianis, G.; Waterman, P. G., 2005. Dimeric naphthoquinones from *Diospyros discolor*. *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 313 – 315.

Garcez, F. R.; Garcez, W. S.; Da Silva, A. F. G.; Bazzoa, R. C.; Resende, U. M., 2004. Terpenoid Constituents from Leaves of *Guarea kunthiana*. *Journal of Brazilian Chemical Society* 15: 767 – 772.

García, A. L.; Parrado, R.; Rojas, E.; Delgado, R.; Dujardin, J. C.; Reithinger, R., 2009. Leishmaniasis in Bolivia: comprehensive review and current status. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 80(5):704 – 711.

Gasparotto-Júnior, A.; Brenzan, M. A.; Piloto, I. C.; Cortez, D. A. G.; Nakamura, C. V.; Dias-Filho, B. P.; Rodrigues-Filho, E.; Ferreira, A. G., 2005. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida do *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae). *Química Nova* 28 (4): 575 – 578.

George Watt, M. B., 1956. Dictionary of the Economic Products of India, Vol. III. In.: Ganapaty, S.; Thomas, P. S.; Karagianis, G.; Waterman, P. G.; Brun, R., 2006. Antiprotozoal and cytotoxic naphthalene derivatives from *Diospyros assimilis*. *Phytochemistry* 67: 1950 – 1956.

Ghafoorunissa; Hemalatha, S.; Rao, M. V., 2004. Sesame lignans enhance antioxidant activity of vitamin E in lipid peroxidation systems. *Molecular and Cellular Biochemistry* 262(1-2):195 – 202.

Gibbons, S.; Moser, E.; Hausmann, S.; Stavri, M.; Smith, E.; Clennett, C., 2005. An antistaphylococcal acylphloroglucinol from *Hypericum foliosum*. *Phytochemistry* 66: 1472 – 1475.

Goldman, D. L.; Khine, H.; et al., 2001. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. *Pediatrics* 107 (5): E66.

Gonçalves, G. S.; Fernandes, A. P.; Souza, R. C. C.; Cardoso, J. E.; Silva, F. O.; Maciel, F. C.; Rabello, A.; Ferreira, L. A. M., 2005. Activity of a paromomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Acta Tropica* 93: 161 – 167.

Gontijo, C. M. F.; Melo, M. N., 2004. Leishmaniose Visceral no Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 7 (3).

Goulart, Y. C. F.; Sela, V. R.; Obici, S.; Martins, J. V. C. ; Otobone, F.; Cortez, D. A. ; Audi, E. A., 2005. Evaluation of Gastric Anti-ulcer activity in a hydroethanolic extract from *Kielmeyera coriacea*. *Brazilian Archives of Biology and technology* 48: 211 – 216.

Gu, J-Q.; Graf, T. N.; Dongho, L.; Chai, H-B.; Qiuwen, M.; Kardono, L. B. S.; Setyowati, F. M.; Ismail, R.; Riswan, S.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Pezzuto, J. M.; Swanson, S. M.; Kroll, D. J.; Falkinham, J. O.; Wall, M. E.; Wani, M. C.; Kinghorn, A. D.; Oberlies, N. H., 2004. Cytotoxic And Antimicrobial Constituents Of The Bark Of *Diospyros Maritima* Collected In Two Geographical Locations In Indonésia. *Journal of Natural Products* 67 (7): 1156 – 1161.

Guerra, M. J. M.; Barreiro, M. L.; Rodrigues, Z. M.; Rublacaba, Y., 2000. Actividad antimicrobiana de um extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Roddi (Copal). *Revista Cubana de Plantas Mediciniais* 5: 23 – 25.

Guimarães, E. F.; Mautone, L.; Rizzini, C. T.; Mattos Filho, A., 1993. Árvores do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. *Jardim Botânico, Rio de Janeiro*, 99 – 100.

Guo, Z.; Vangapandu, S.; Sindelar, R. W.; Walker, L. A.; Sindelar, R. D., 2005. Biologically active quassinoids and their chemistry: Potential Leads for Drug Design. *Current Medicinal Chemistry* 12: 173 – 190.

Gupta, D.; Bleakley, B.; Gupta, R.K., 2008. Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. *Journal of Ethnopharmacology* 115: 361-380.

Gupta, M.B.; Nath, R.; Srivastava, N.; Hanker, K.; Kishor, K.; Bhargava, K.P., 1980. Anti-inflammatory and antipyretic activities of beta-sitosterol. *Planta Medica* 39(2): 157-63.

Gurgel, L. A.; Sidrim, J. J. C.; Martins, D. T.; Filho, V. C.; Rao, V. S., 2005. In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 409 – 412.

Gurgel, L.A.; Silva, R.M.; Santos, F.A.; Martins, D.T.; Mattos, P.O.; Rao, V.S., 2001. Studies on the antidiarrhoeal effect of Dragon's blood from *Croton urucurana*. *Phytotherapy Research* 15: 319–322.

Harper, S.H.; Kemp, A.D.; Tannoch, J. 1970. Methoxynaphthaldehydes as Constituents of the Heart wood of *Diospyros quiloensis* and their synthesis by the Stobbe condensation. *Journal of the American Chemical Society*, 626–636.

Hay, A.E.; Guilet, D.; Morel, C.; Larcher, G.; Macherel, D.; Le Ray, A.M.; Litaudon, M.; Richomme, P., 2003. Antifungal chromans inhibiting the mitochondrial respiratory chain of pea seeds and new xanthones from *Calophyllum caledonicum*. *Planta Medica* 69(12): 1130-1135.

Hay, R.J., 2006. Fungal Infections. *Clinical Dermatology* 24: 201 – 212.

Hayashi, T.; Nagayama, K.; Arisawa, M.; Shimizu, M.; Suzuki, S.; Yoshizaki, M.; Morita, N.; Ferro, E.; Basualdo, I.; Berganza, L.H. 1989. Pentagalloylglucose, a xanthine oxidase inhibitor from a Paraguayan crude drug, "Molle-i" (*Schinus terebinthifolius*). *Journal of Natural Products* 52(1): 210-211.

Hazra, B.; Das Sarma, M.; Kumar, B.; Basu, S.; Das, K.; Pandey, B.N.; Mishra, K.P., 2007. Cytotoxicity of diospyrin and its derivatives in relation to the generation of reactive oxygen species in tumour cells *in vitro* and *in vivo*. *Chemotherapy* 53(3): 173-176.

Hazra, B.; Golenser, J.; Nechemiya, O.; Bhattacharyya, S.; Azzam, T.; Domb, A.; Frankenburg, S., 2002. Inhibitory Activity of Diospyrin Derivatives Against *Leishmania major* Parasites *in vitro*. *Indian Journal of Pharmacology* 34:422-427.

Hazra, B.; Saha, A. K.; Ray, R.; Roy, D. K.; Sur, P.; Banerjee, A., 1987. Antiprotozoal activity of diospyrin towards *Leishmania donovani* promastigotes *in vitro*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 81: 738-741.

Hegnauer, R., 1964. Chemotaxonomie der Pflanzen III. Birkhäuser Verlag. In.: de Lima, M. R. F.; de Souza Luna, J.; dos Santos, A. F.; De Andrade, M. C. C.; Sant'Ana, A. E. G.; Genet, J-P.; Marquez, B.; Neuville, L., Moreau, N., 2006. Antibacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 105: 137 – 147.

Hegnauer, R., 1989. Ebenaceae Chemotaxonomie der Pflanzen. Birkhauser Verlag, Basel, 8, 402 – 411.

Hernández-Castro, R.; Arroyo-Escalante, S.; Carrillo-Casas, E. M.; Moncada-Barrón, D.; Álvarez-Verona, E.; Hernández-Delgado, L.; Torres-Narváez, P.; Lavalle-

Villalobos, A., 2010. Outbreak of *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: a health care workers source. *European Journal of Pediatrics* 169: 783-787.

Herwaldt, B. L., 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354: 1191 – 1199.

Hoffmann, J. J.; Cole, J. R.; Arora, S. K.; Bates, R. B.; Kriek, G. R., 1978. Voleneol diacetate: a new sesquiterpenoid from *Lepidotrichilia volensii* Leroy (Meliaceae). *Journal of Organic Chemistry* 43 (6): 1254–1256.

Honda, P. A.; Ferreira, I. C.; Cortez, D. A.; Amado, C. A.; Silveira, T. G.; Brenzan, M. A.; Lonardon, M. V., 2010. Efficacy of components from leaves of *Calophyllum brasiliense* against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Phytomedicine* 17: 333 – 338.

Hotez, P. J.; Molyneuz, D. H.; Fenwick, A.; Kumaresan, J.; Sachs, S. E.; Sachs, J. D.; Savioli, L., 2007. Control of neglected tropical diseases. *New England Journal of Medicine* 1018–1027.

Houël, E.; Bertani, S.; Bourdy, G.; Deharo, E.; Jullian, V.; Valentin, A.; Chevalley, S.; Stien, D., 2009. Quassinoid constituents of *Quassia amara* L. leaf herbal tea. Impact on its antimalarial activity and cytotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology* 126 (1): 114 – 118.

Houghton, P. J.; Photiou, A.; Uddin, S.; Shah, P.; Browning, M.; Jackson, S.J.; Retsas, S., 1994. Activity of extracts of *Kigelia pinnata* against melanoma and renal carcinoma cell lines. *Planta Medica* 60(5):430-433.

Huerta-Reyes, M.; Basualdo, M.del C.; Lozada, L.; Jimenez-Estrada, M.; Soler, C.; Reyes-Chilpa, R., 2004. HIV-1 inhibition by extracts of Clusiaceae species from Mexico. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 27(6): 916-920.

IBGE, 2004. Mapa de biomas do Brasil. <http://mapas.ibge.gov.br/biomas2/viewer.htm> (acessado em 16.9.2010).

Idemyor, V., 2007. Human immunodeficiency virus (HIV) and malaria interaction in sub-Saharan Africa: The collision of two titans. *HIV Clinical Trials* 8(4): 246 – 253.



Igreja, R. P.; Lazera Mdos, S.; et al., 2004. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. *Medical Mycology* 42 (3): 229 – 238.

Ikeda, S.; Kagaya, M.; Kobayashi, K.; Tohyama, T.; Kiso, Y.; Higuchi, N.; Yamashita, K., 2003. Dietary sesame lignans decrease lipid peroxidation in rats fed docosahexaenoic acid. *Journal of Nutritional Science Vitaminology (Tokyo)* 49: 270-276.

Isaias, D. E.; Niero, R.; Noldin, V. F.; de Campos-Buzzi, F.; Yunes, R.A.; Delle-Monache, F.; Cechinel-Filho, V., 2004. Pharmacological and phytochemical investigations of different parts of *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae). *Pharmazie* 59(11): 879-881.

Ito, C.; Furukawa, H., 1987. Constituents of *Murraya-Exotica* L. Structure Elucidation of New Coumarins. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 35: 4277.

Ito, C.; Itoigawa, M.; Mishina, Y.; Filho, V. C.; Enjo, F.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Furukawa, H., 2003. Chemical constituents of *Calophyllum brasiliense*. 2. Structure of three new coumarins and cancer chemopreventive activity of 4-substituted coumarins. *Journal of Natural Products* 66(3): 368-371.

Ito, C.; Itoigawa, M.; Mishina, Y.; Filho, V. C.; Mukainaka, T.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Furukawa, H., 2002. Chemical constituents of *Calophyllum brasiliensis*: structure elucidation of seven new xanthenes and their cancer chemopreventive activity. *Journal of Natural Products* 65(3): 267-272.

Iwu, M. M.; Jackson, J. E.; Schuster, B. G., 1994. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. *Parasitology Today* 10(2): 65-68.

Jannin , J.; Salvatella, R., 2006. Estimación Cuantitativa de la Enfermedad de Chagas en las Américas - Quantitative estimates of Chagas disease in the Americas. Washington DC: Pan American Health Organization.

Jayasinghe, L.; Kumarihamy, B. M. M.; Jayarathna, K. H. R. N.; Udishani, N. W. M. G.; Bandara, B. M. R.; Hara, N.; Fujimoto, Y., 2003. Antifungal constituents of the stem bark of *Bridelia retusa*. *Phytochemistry* 62 (4): 637-641.

- Jenett-Siems, K.; Mockenhaupt, F. P.; Bienzle, U.; Gupta, M. P.; Eich, E., 1999. *In vitro* antiplasmodial activity of Central American medicinal plants. *Tropical Medicine & International Health* 4: 611–615.
- Johann, S.; Pizzalatti, M. G; Donnici, C. L.; Resende, M. A., 2007. Atividade antifúngica de plantas utilizadas na medicina tradicional brasileira contra fungos de relevância clínica. *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 632-637.
- Kauffman, S. A., 2006. The evolution of future wealth. *Scientific American* 295(5): 44.
- Kaur, K.; Jain, M.; Kaur, T.; Jain, R., 2009. Antimalarials from nature. *Bioorganic & Medicinal* 17: 3229-3256.
- Kawai, K.; Nakamaru, T.; Nozawa, Y.; Maebayashi, Y.; Yamazaki, M.; Natori, S., 1984. Inhibitory effect of sterigmatocystin and 5, 6- dimethoxysterigmatocystin on ATP synthesis in mitochondria. *Applied and Environmental Microbiology* 48: 1001–1003.
- Kerah-Hinzoumbé, C.; Péka, M.; Nwane, P.; Donan-Gouni, I.; Etang, J.; Samè-Ekobo, A. ; Simard, F., 2008. Insecticide resistance in *Anopheles gambiae* from south-western Chad, Central Africa. *Malaria Journal* 7: 192.
- Khan, M. M.; Ishrat, T.; Ahmad, A.; Hoda, M. N.; Khan, M. B.; Khuwaja, G.; Srivastava, P.; Raza, S. S.; Islam, F.; Ahmad, S., 2010 Sesamin attenuates behavioral, biochemical and histological alterations induced by reversible middle cerebral artery occlusion in the rats. *Chemical-Biological Interactions* 183(1): 255-63.
- Kidd, S. E.; Bach, P. J.; Hingston, A. O.; Mak, S.; Chow, Y.; MacDougall, L.; Kronstad, J. W.; Bartlett, K. H., 2007. *Cryptococcus gattii* dispersal mechanisms, British Columbia, Canada. *Emerging Infectious Diseases* 13(1): 51-57.
- Kirchgatter, K.; Del Portillo, H. A., 2005. Clinical and molecular aspects of severe malaria. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 77(3): 455-475.
- Klink, C. A.; Machado, R. B. A., 2005. Conservação do Cerrado Brasileiro. *Megadiversidade* 1: 147 – 155.

Kohn, L. K.; Pizão, P. E.; Foglio, M. A.; Antônio, M. A.; Amaral, M. C. E.; Bittric, V.; Carvalho, J. E., 2006. Antiproliferative activity of crude extract and fractions obtained from *Aspidosperma tomentosum* Mart. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais de Botucatu* 8: 110-115.

Kramp K.L.; Dewitt, K.; Flora, J. W.; Muddiman, D. C.; Slunt, K. M.; Houston, T. A., 2005. Derivatives of pentamidine designed target the *Leishmania* lipophosphoglycan. *Tetrahedron Letters* 46: 695-698.

Kraus, G. A.; Nguyen, T. H.; Jeon, I., 2003. Synthesis of the core bicyclic system of hyperforin and nemorosone. *Tetrahedron Letters* 44 : 659–661.

Kuete, V.; Tangmouo, J. G.; Meyer, J. J.; Lall, N., 2009. Diospyrone, crassiflorone and plumbagin: three antimycobacterial and antigonorrhoeal naphthoquinones from two *Diospyros* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents* 34: 322 – 325.

Kvist, L. P.; Christensen, S. B.; Rasmussen, H. B.; Mejia, K.; Gonzalez, A., 2006. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. *Journal of Ethnopharmacology* 106: 390 – 402.

Kwon-Chung, K. J.; Boekhout, T.; Fell, J. W.; Diaz, M., 2002. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxonomy* 51: 804–806.

Kwon-Chung, K. J.; Varma, A., 2006. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Research* 6 (4): 574–587.

Kyelem, D.; Biswas, G.; Bockarie, M. J.; Bradley, M. H.; El-Setouhy, M.; Fischer, P. U.; Henderson, R. H.; Kazura, J. W.; Lammie, P. J.; Njenga, S. M.; Ottesen, E. A.; Ramaiah, K. D.; Richards, F. O.; Weil, G. J.; Williams, S. A., 2008. Determinants of Success in National Programs to Eliminate Lymphatic Filariasis: A Perspective Identifying Essential Elements and Research Needs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 79(4): 480 – 484.

Lavaud, C.; Massiot, G.; Vasquez, C.; Morett, C.; Sauvain, M. ; Balderrama, L., 1995. 4-Quinolinone alkaloids from *Dictyoloma peruviana*. *Phytochemistry* 40: 317-320.

Lee, W. J.; Ou, H. C.; Wu, C. M.; Lee, I. T.; Lin, S. Y.; Lin, L. Y.; Tsai, K. L.; Lee, S. D.; Sheu, W. H., 2009. Sesamin mitigates inflammation and oxidative stress in endothelial cells exposed to oxidized low-density lipoprotein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(23): 11406-11417.

Lenta, B. N.; Vonthron-Sénécheau, C. R.; Sohd, F.; Tantangmo, F.; Ngouela, S.; Kaiser, M.; Tsamo, E.; Anton, R.; Weniger, B., 2007. *In vitro* antiprotozoal activities and cytotoxicity of some selected Cameroonian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 111: 8 – 12.

Likhitwitayawuid, K.; Kaewamatawong, R.; Ruangrunsi, N.; Krungkai, J., 1998. Antimalarial naphthoquinones from *Nepenthes thorelii*. *Planta Medica* 64: 237 – 241.

Lim, P.; Chim, P.; Sem, R.; Nemh, S.; Poravuth, Y.; Lim, C.; Seila, S.; Tsuyuoka, R.; Denis, M. B.; Socheat, D., 2005. *In vitro* monitoring of *Plasmodium falciparum* susceptibility to artesunate, mefloquine, quinine and chloroquine in Cambodia: 2001 – 2002. *Acta Tropica* 93: 31 – 40.

Liu, X.; Chen, S.; Zhang, Y.; Zhang, F., 2006. Modulation of Dragon's blood on tetrodotoxin-resistant sodium currents in dorsal root ganglion neurons and identification of its material basis for efficacy. *Science in China. Series C, Life Sciences* 49: 274–285.

Lizarazo, J.; Linares, M.; de Bedout, C.; Restrepo, A.; Agudelo, C. I.; Castañeda, E., 2007. Results of nine years of the clinical and epidemiological survey on cryptococcosis in Colombia, 1997-2005. *Biomedica* 27(1): 94-109.

Lloyd, H. A.; Jaouni, T. M.; Evans, S. L.; Morton, J. F., 1977. Terpenes of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry* 16: 1301-1302.

Lopez, A.; Hudson, J. B.; Towers, G. H., 2001. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 77: 189-196.

Lorenzi, H.; Matos, F. J. A., 2002. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 512.

Lucena, P. L.; Ribas Filho, J. M.; Mazza, M.; Czeczko, N. G.; Dietz, U. A.; Correa Neto, M. A.; Henriques, G. S.; Santos, O. J.; Ceschin, A. P.; Thielle, E. S., 2006. Evaluation of the aroreira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in the healing process of surgical incision in the bladder of rats. *Acta cirurgica brasileira/ Sociedade Brasileira para Desenvolvimento em Pesquisa Cirúrgica* 21: 46 – 51.

Ma, C.Y.; Musoke, S.F.; Tan, G.T.; Sydara, K.; Bouamanivong, S.; Southavong, B.; Soejarto, D.D.; Fong, H.H.; Zhang, H.J., 2008. Study of antimalarial activity of chemical constituents from *Diospyros quaesita*. *Chemistry & Biodiversity* 5: 2442-2448.

Machuca, C.; Rodríguez, A.; Herrera, M.; Silva, S.; Ponte-Sucre, A., 2006. *Leishmania amazonensis*: metabolic adaptations induced by resistance to an ABC transporter blocker. *Parasitology* 114(1):1-9.

Madeira, M. F.; Uchoa, C. M. A.; Leal, C. A.; Silva, R. M. M.; Duarte, R.; Magalhães, C. M.; Serra, C. M. B., 2003. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36 (5): 551 – 555.

Maertens, J.; Boogaerts, M., 2005. The place for itraconazole in treatment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56: i33-i38.

Maia-Elkhoury, A. N.; Alves, W. A.; Sousa-Gomes, M. L.; Sena, J. M.; Luna, E. A., 2008. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cadernos de Saúde Pública* 24(12): 2941-2947.

Malaguarnera, L.; Musumeci, S., 2002. The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet Infectious Diseases* 2(8):472-478.

Mallavadhani, U. V.; Panda, A. K.; Rao, Y. R., 1998. Pharmacology and chemotaxonomy of *Diospyros*. *Phytochemistry* 49: 901 – 951.

Mandal, G.; Sarkar, A.; Saha, P.; Singh, N.; Sundar, S.; Chatterjee, M., 2009. Functionality of drug efflux pumps in antimonial resistant *Leishmania donovani* field isolates. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 46(1): 86-92.

Maneerat, Y.; Viriyavejakul, P.; Punpoowong, B.; Jones, M.; Wilairatana, P.; Pongponratn, E.; Turner, G. D. H.; Udomsangpetch, R., 2000. Inducible nitric oxide synthase expression is increased in the brain in fatal cerebral malaria. *Histopathology* 37: 269-277.

Manguin S.; Carnevale P.; Mouchet J.; Coosemans M.; Julvez J.; Richard-Lenoble D., 2008. Sircoulon J. Biodiversity of malaria in the world. Paris: John Libbey Eurotext 427.

Manguin, S.; Bangs, M. J.; Pothikasikorn, J.; Chareonviriyaphap, T., 2010. Review on global co-transmission of human *Plasmodium* species and *Wuchereria bancrofti* by *Anopheles* mosquitoes. *Infection, Genetics and Evolution* 10(2):159 – 177.

Marti, G.; Eparvier, V.; Moretti, C.; Susplugas, S.; Prado, S.; Grellier, P.; Retaillea, P.; Guéritte, F.; Litaudon, M., 2009. Antiplasmodial Benzophenones from the Trunk Latex of *Moronobea Coccinea* (Clusiaceae). *Phytochemistry* 70: 75 – 85.

Martinez, M. J.; Alonso González, N.; Badell, J. B., 1996. Actividad antimicrobiana del *Schinus terebinthifolius* Raddi (Copal). *Revista Cubana Planta Medica (Habana)* 1(3): 37 – 39.

Martinez-Vasquez, M.; Gonzalez-Esquinca, A. R.; Cazares Luna, L.; Moreno Gutiérrez, M. N.; Garcia-Argáz, A. N., 1999. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.). *Journal of Ethnopharmacology* 66: 79-82.

Martins, J. V. C.; Otobone, F. J.; Sela, V. R.; Obici, S.; Trombelli, M. A.; Cortez, D. A. G.; Audi, E. P., 2004. Activity of hydroethanolic extract from *Kielmeyera coriacea* stems on central nervous system in rats. *Acta Scientiarum* 26: 365-368.

Matos, L. G.; Pontes, I. S.; Tresvenzol, L. M. F.; Paula, J. R.; Costa, E. A., 2005. Analgesic And Anti-Inflammatory Activity Of The Ethanolic Extract From *Spiranthera Odoratissima* A. St. Hillaire (Manacá) Roots. *Phytoterapy Research* 18: 963 – 966.

Matos, L. G.; Santos, L. D. A. R.; Vilela, C. F.; Pontes, I. S.; Tresvenzol, L. M. F.; Paula, J. R.; Costa, E. A., 2003. Atividades analgésicas e/ou anti-inflamatória da fração aquosa do extrato etanólico das folhas da *Spiranthera odoratissima* A. St. Hillaire (manacá). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 13: 15 – 16.

Medeiros, K. C. P.; Monteiro, J. C.; Diniz, M. F. F. M.; Medeiros, I. A.; Silva, B. A.; Piuvezam, M. R., 2007. Effect of the activity of the brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globulus* Labill, *Peltodon radicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Radd. in inflammatory models. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 17: 23 – 28.

Melo e Silva, F. M.; De Paula, J. E.; Espindola, L. S., 2009. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Mycoses* 52: 511 – 517.

Mendes, F. R.; Carlini, E. A., 2007. Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 109: 493 – 500.

Meselhy, M. R., 2003. Constituents from Moghat, the Roots of *Glossostemon bruguieri*. *Molecules* 8: 614-621.

Michelin, D. C.; Sannomiya, M.; Figueiredo, M. E.; Rinaldo, D.; Dos Santos, L. C.; Souza-Brito, A. R. M.; Vilegas, W.; Salgado, H. R. N., 2008. Antimicrobial activity of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18: 690 – 695.

Milo, B.; Risco, E.; Vila, R.; Iglesias, J.; Cañigueral, S., 2002. Characterization of a fucoarabinogalactan, the main polysaccharide from the gum exudate of *Croton urucurana*. *Journal of Natural Products* 65: 1143 – 1146.

Ministério da Saúde, 2008. Disponível no [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder\\_malaria\\_2008\\_final.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2008_final.pdf) Acessado em 20 de agosto de 2010.

Ministério da Saúde do Brasil, 2002. Dados e pesquisa em DST e AIDS. Coordenação do Programa Nacional de DST/AIDS. Brasília (<http://www.aids.gov.br>).

Mitaine-Offer, A. C.; Sauvain, M.; Valentin, A.; Callapa, J.; Mallie, M.; Zèches-Hanrot, M., 2002. Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* indole alkaloids. *Phytomedicine* 9: 142 – 145.

Miyahara, Y.; Komiya, T.; Katsuzaki, H.; Imai, K.; Nakagawa, M.; Ishi, Y.; Hibasami, H., 2000. Sesamin and episesamin induce apoptosis in human lymphoid leukemia Molt 4B cells. *International Journal of Molecular Medicine* 6: 43 – 46.

Molina, J.; Brener, Z.; Romanha, A. J.; Urbina, J. A., 2000. *In vivo* activity of the bis-triazole D0870 against drug-susceptible and drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46: 137 – 140.

Molinier, S.; Imbert, P.; Verrot, D.; Morillon, M.; Parzy, D.; Touze, J. E., 1994. *Plasmodium falciparum* malaria: type R1 quinine resistance in East Africa. *Presse Medicale* 23: 1494.

Montouro, P.; Sannomiya, M.; Piacente, S.; Pizza, C.; Brito, A. R. M. S.; Vilegas, W., 2005. Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu. *Rapport Communication in Mass Spectrometry* 19 (16): 2244 – 2250.

Morel, C.; Séraphin, D.; Teyrouz, A.; Larcher, G.; Bouchara, J. P.; Litaudon, M.; Richomme, P.; Bruneton, J., 2002. New and antifungal xanthenes from *Calophyllum caledonicum*. *Planta Medica* 68(1):41 – 44.

Morrel, M.; Fraser, V.; Kollef, M. H., 2005. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrobial and Agents Chemotherapy* 49: 3640 – 3650.

Morton, J.F., 1978. Brazilian pepper - Its impact on people, animals and the environment. *Economic Botany* 32: 353 – 359.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55 – 63.

Muganga, R.; Angenot, L.; Tits, M.; Frédérick, M., 2010. Antiplasmodial and cytotoxic activities of Rwandan medicinal plants used in the treatment of malaria. *Journal of Ethnopharmacology* 128: 52 – 57.



Mullauer, F. B.; Kessler, J. H.; Medema, J. P., 2009. Betulin is a potent anti-tumor agent that is enhanced by cholesterol. *PLoS One* 4(4): e1.

Murata, T.; Miyase, T.; Muregi, F. W.; Naoshima-Ishibashi, Y.; Umehara, K.; Warashina, T.; Kanou, S.; Mkoji, G. M.; Terada, M.; Ishih, A., 2008. Antiplasmodial triterpenoids from *Ekebergia capensis*. *Journal of Natural Products* 71(2):167-74.

Murray, H. W.; Berman, J. D.; Davies, C. R.; Saravia, N. G., 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561 – 1577.

Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; Fonseca, G. A. B.; Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853 – 858.

Naglik, J.; Albrecht, A.; Bader, O.; Hube, B., 2004. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiology* 6(10):915 – 926.

Nan-Jun, S.; Ching-Jer, C.; Cassady, J. M., 1987. A cytotoxic tetralone derivative from *Pararistolochia flos-avis*. *Phytochemistry* 26 (11): 3051-3053.

Nauen, R., 2007. Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. *Pest Management Science* 63(7): 628 – 633.

Nes, W. D.; Norton, R. A.; Benson, M., 1992. Carbon-13 nmr studies on sitosterol biosynthesized from [<sup>13</sup>C]mevalonates. *Phytochemistry* 31 (3) 805-811.

Niwa, M.; Iguchi, M.; Yamamura, S., 1978. Biomimetic reactions of epoxygermacrene D. *Tetrahedron Letters* 42: 4043 – 4046.

Noireau, F.; Diosque, P.; Jansen, A. M., 2009. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Veterinary Research* 40(2): 26.

Noldin, V. F.; Isaias, D. B.; Cechinel Filho, V., 2006. Gênero *Calophyllum*: importância química e farmacológica. *Química Nova* 29: 549 – 554.

Nosanchuk, J. D.; Rosas, A. L.; Lee, S. C.; Casadevall, A., 2000. Melanisation of *Cryptococcus neoformans* in human brain tissue. *Lancet* 355:2049 – 2050.

Nucci, M.; Marr, K. A., 2005. Emerging fungal diseases. *Clinical Infectious Diseases* 41(4):521 – 526.

O'Neill, M. J.; Bray, D. H.; Boardman, P.; Wright, C. W.; Phillipson, J. D.; Warhurst, D. C.; Gupta, M. P.; Correya, M.; Solis, P., 1988. Plants as sources of antimalarial drugs, Part 6: Activities of *Simarouba amara* fruits. *Journal of Ethnopharmacology* 22: 183 – 190.

Odds, F. C., 2003. Synergy, antagonism and what the checkerboard puts between them. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 52: 1.

Ohmoto, T.; Ikeda, K.; Nomura, S.; Shimizu, M.; Soito, S., 1987. Studies on the sesquiterpenes from from ambrosia elatior linné. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 35(6): 2272 – 2279.

Oliveira, C. C.; Lacerda, H. G.; Martins, D. R.; Barbosa, J. D.; Monteiro, G. R.; Queiroz, J. W.; Sousa, J. M.; Ximenesf, M. F.; Jerônimo, S. M., 2004. Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban–rural interface. *Acta Tropica* 90(2): 155 – 162.

Oliveira, C. I.; Nascimento, I. P.; Barral, A.; Soto, M.; Barral-Netto, M., 2009. Challenges and perspectives in vaccination against leishmaniasis. *Parasitology International* 58: 319 – 324.

Oliver, S. V.; Kaiser, M. L.; Wood, O. R.; Coetzee, M.; Rowland, M.; Brooke, B. D., 2010. Evaluation of the pyrrole insecticide chlorfenapyr against pyrethroid resistant and susceptible *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) *Tropical Medicine and International Health* 15 (1): 127 – 131.

Oliveria-Filho, A. T.; Ratter, J. A., 2002. Vegetation physiognomies and Woody flora of the Cerrado biome. In: Oliviera, P. S.; Marquis, R. J. *The Cerrados of Brasil*. New York, Columbia University Press.

Ostan, I.; Saglam, H.; Limoncu, M. E.; Ertabaklar, H.; Toz, S. O.; Ozbel, Y.; Ozbilgin A., 2007. *In vitro* and *in vivo* activities of *Haplophyllum myrtifolium* against *Leishmania tropica*. *New Microbiology* 30(4): 439-45.

Ouellette, M.; Drummelsmith, J.; Papadopoulou, B., 2004. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resistance Updates* 7(4-5):257 – 266.

Palumbo, E., 2008. Oral Miltefosine treatment in children with visceral leishmaniasis: a brief review. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 12: 2 – 4.

Pappas, P. G.; Rex, J. H.; Sobel, J. D.; Filler, S. G.; Dismukes, W. E.; Walsh, T. J.; Edwards, J. E., 2004. Guidelines for treatment of candidiasis. *Infectious Diseases Society of America. Clinical of Infectious Diseases* 38(2):161 – 89.

Pereira, M. M.; Jácome, R. L. R. P.; Alcântara, A. F. C.; Alves, R. B.; Raslan, D. S., 2007. Indole alkaloids from species of the *Aspidosperma* (Apocynaceae) genus. *Química Nova* 30 (4).

Peres, M. T. L. P.; Delle Monache, F.; Cruz, A. B.; Pizzolatti, M. G.; Yunes, R. A., 1997. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 56: 223 – 226.

Perez, H.; Diaz, F.; Medina, J. D., 1997. Chemical investigation and *in vitro* antimalarial activity of *Tabebuia ochracea* ssp. *Neochrysantha*. *International Journal of Pharmacognosy* 35: 227 – 231.

Petrikkos, G.; Skiada, A., 2007. Recent advances in antifungal chemotherapy. *International Journal of Antimicrobial Agents* 30 (2): 108 – 117.

Pfaller, M. A.; Diekema, D. J., 2007. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clinical Microbiology Reviews* 20: 133 – 163.

Pfaller, M. A.; Diekema, D. J.; Rinaldi, M. G.; Barnes, R.; Hu, B.; Veselov, A. V.; Tiraboschi, N.; Nagy, E.; Gibbs, D. L.; The Global Antifungal Surveillance Group, 2005. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 5848 – 5859.

Pirani, J. R., 1999. Estudo Taxonômicos de Rutaceae. Departamento de Biociências – USP. Tese (Livre Docência).

Polonsky J., 1973. Quassinoid Bitter Principles. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe* 30: 101 – 150.

Polonsky J., 1985. Quassinoid Bitter Principles II. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe* 47: 221 – 264.

Prajoubklang, A.; Sirithunyalug, B.; Charoenchai, P.; Suvannakad, R.; Sriubolmas, N.; Piyamongkol, S.; Kongsaree, P.; Kittakoop, P., 2005. Bioactive deoxypreussomerins and dimeric naphthoquinones from *Diospyros ehretioides* fruits: deoxypreussomerins may not be plant metabolites but may be from fungal epiphytes or endophytes. *Chemistry & Biodiversity* 2(10):1358 – 1367.

Prasad, R.; Kumar, R.; Jaiswal, B. P.; Singh, U. K., 2004. Miltefosine: An oral drug for visceral leishmaniasis. *The Indian Journal of Paediatrics* 71(2): 143 – 144.

Queires, L. C.; Fauvel-Lafève, F.; Terry, S.; De la Taille, A.; Kouyoumdjian, J. C.; Chopin, D. K.; Vacherot, F.; Rodrigues, L. E.; Crépin, M., 2006. Polyphenols purified from the Brazilian aroeira plant (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) induce apoptotic and autophagic cell death of DU145 cells. *Anticancer Research* 26(1A): 379 – 387.

Rabello, A.; Orsini, M.; Disch, J., 2003. Leishmania/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 97: 17–S28.

TDR, 2005. Leishmaniasis – Seventeenth Programme Report / Progress 2003-2004: 19-23.

Rao, V. S.; Gurgel, L. A.; Lima-Júnior, R. C.; Martins, D. T.; Cechinel-Filho, V.; Santos, F. A., 2007. Dragon's blood from *Croton urucurana* (Baill.) attenuates visceral nociception in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 113(2):357 – 360.

Rastrelli, L.; Detommasi, N.; Berger, I.; Caceres, A.; Saravia, A.; De Simone, F., 1997. Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. *Phytochemistry* 45: 647.

Rath, S.; Trivelin, L. A.; Imbrunito, T. R.; Tomazela, D. M.; De Jesús, M. N.; Mazal, P. C., 2003. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Química Nova* 26: 550 – 555.

Ratter, J. A.; Bridgewater, S.; Ribeiro, J. F., 2003. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation. III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. *Edinburgh Journal of Botany* 60: 57 – 109.

Ratter, J. A.; Ribeiro, J. F.; Bridgewater, S., 1997. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. *Annals of Botany* 80: 223 – 230.

Ray, S.; Hazra, B.; Mitra, B.; Das, A.; Majumder, H. K., 1998. Diospyrin, a bisnaphthoquinone: a novel inhibitor of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. *Molecular Pharmacology* 54: 994 – 999.

Reichart, P. A., 2003. Oral manifestations in HIV infection: fungal and bacterial infections, Kaposi's sarcoma. *Medical Microbiology and Immunology* 192(3):165 – 169.

Reithinger, R.; Dujardin, J. C.; Louzir, H.; Pirmez, C.; Qlexqnder, B.; Brooker, S., 2007. Cutaneous Leishmaniasis. *Lancet Infectious Diseases* 7: 581 – 596.

Reolon, A.; Perez, L. R. R.; Mezzari, A., 2004. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 40 (5): 293 – 298.

Rey, L., 2001. *Parasitologia*, Guanabara-Koogan Ed.: Rio de Janeiro.

Reyes-Chilpa, R.; Estrada-Muñiz, E.; Apan, T.R.; Amekraz, B.; Aumelas, A.; Jankowski, C.K.; Vázquez-Torres, M., 2004. Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life Science* 13: 1635-1647.

Reyes-Chilpa, R.; Estrada-Muñiz, E.; Vega-Avila, E.; Abe, F.; Kinjo, J.; Hernández-Ortega, S., 2008. Trypanocidal constituents in plants: 7 Mammea-type coumarins. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103: 431-436.

Reyes-Chilpa, R.; Jiménez-Estrada, M, Estrada-Muñiz, E., 1997. Antifungal xanthenes from *Calophyllum brasiliensis* heartwood. *Journal Chem Ecol* 23: 1901-1911.

Ribeiro, T. A. N.; Ndiaye, E. A. S.; Velozo, E. S.; Vieira, P. C.; Ellena, J.; De Sousa, P. T., 2005. Limonoids from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. *Journal of Brazilian Chemical Society* 16: 1347 – 1352.

Ringwald, P., 2007. Médecine Et Maladies Infectieuses Synthèse Sur La Rèsistance Aux Antipaludiques Review On Antimalarial Drug Resistance. *Médecine et Maladies Infectieuses* 37: 34 – 36.

Rocha, L. G.; Almeida, J. R. G. S.; Macedo, R. O.; Barbosa-Filho, J. M., 2005. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine* 12: 514 – 535.

Rodrigues, A. M. S.; De Paula, J. E.; Roblot, F.; Fournet, A.; Espindola, L. S., 2005. Larvicidal activity of *Cybstax antisiphilitica* against *Aedes aegypti* larvae. *Fitoterapia* 76: 755 – 757.

Rodrigues, E.; Carlini, E. A., 2005. Ritual use of plants with possible action on the central nervous system by the Krahô Indians Brazil. *Phytotherapy Research* 19: 129 – 135.

Rodrigues, V. E. G.; Carvalho, D. A., 2001. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio cerrado na Região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia* 25, 102 – 123. In: Mesquita, M. L.; De Paula, J. E.; Pessoa, C.; De Moraes, M. O.; Costa-Lotufoc, L. V.; Grougnet, R.; Michel, S.; Tillequin, F.; Espindola, L. S., 2009. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology* 123 : 439 – 445.

Romero, G. A. S.; Boelaert, M., 2010. Control of visceral leishmaniasis in latin America – A systematic review. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 4: 1 – 17.

Rosa, M.do S.; Mendoca-Filho, R.R.; Bizzo, H.R.; Almeida Rodriguez, I.; Soares, R.M.; Souto-Padrón, T.; Alviano, C.S.; Lopes, A.H. 2003. Antileishmanial activity of a

linalool-Rich 2essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrobicicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 1895-1901.

Rouffiac, R.; Fouraste, I.; Stanislaw, E., 1969. Alkaloids of *Monnieria trifolia*. 1. Characterization of skimmianine. *Planta Medica* 17: 361 – 365.

San Miguel, L.G.; Cobo, J.; Otheo, E.; Sanchez-Sousa, A.; Abraira, V.; Moreno, S., 2005. Secular trends of candidemia in a large tertiary-care hospital from 1988 to 2000: emergence of *Candida parapsilosis*. *Infectious Control and Hospitalar Epidemiology* 26 : 548-552.

Sanchez-Sancho, F.; Campillo, N. E.; Páez, J. A., 2009. Chagas Disease: Progress and New Perspectives. *Current Medicinal Chemistry* 17: 423-452.

Sannomiya, M.; Fonseca, V. B.; da Silva, M. A.; Rocha, L.R.M.; dos Santos, L. C.; Hiruma-Lima, C. A.; Souza Brito, A. R. M.; Vilegas, W., 2005. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 1–6.

Schaechter, M. 2002. *Microbiologia: Mecanismos de doenças infecciosas*. 3ed, Ed. Guanabara Koogan, São Paulo-SP.

Schaller, M.; Borelli, C.; Korting, H.C.; Hube, B. 2005. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 48 (6): 365–377.

Schmourlo, G.; Mendonça-Filho, R. R.; Alviano, C. S.; Costa, S. S., 2005. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *Journal of Ethnopharmacology* 96: 563 – 568.

Schmunis, G. A.; Yadon, Z. E., 2010. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica* 115: 14-21.

Schofield C. J.; Jasmim, J.; Salvatela R., 2006. The Future of chagas disease control. *Trends in Parasitology* 22: 583 – 588.

Seaman, J.; Mercer, A.J.; Sondorp, E., 1996. The epidemic of visceral leishmaniasis in western Upper Nile, southern Sudan: course and impact from 1984 to 1994. *International Journal of Epidemiology* 25: 862- 71.

Senior, K., 2007. Chagas disease: moving towards global elimination. *The Lancet Infectious Diseases* 7 (9): 572.

Sereno, D.; Holzmuller, P.; Lemestre, J.L., 2000. Efficacy of second line drugs on antimonyl- resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. *Acta Tropica* 74: 25- 31.

Ship, J.A.; Vissink, A.; Challacombe, S.J. 2007. Use of prophylactic antifungals in the immunocompromised host. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology & Endodontics* 103: 1-14.

Sidhu, G. S.; Prasad, K. K., 1967. (-) Isodiospyrin - A Novel Binaphthoquinone Showing Atropisomerism and Other Extractives from *Diospyros chloroxylon*. In: Yoder, B. J., 2005. Isolation and structure elucidation of cytotoxic natural products from the rainforests of Madagascar and Suriname. Tese de doutorado.

Sidrim, J.J.C.; Moreira, J.L.B. 1999. Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.

Sidrim, J.J.C.; Rocha, M.F.G. 2004. Candidíase. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.

Silva, E. M.; Valencia, A.; Grossi-de-Sá, M. F.; Rocha, T. L.; Freire, E.; De Paula, J. E.; Espindola, L. S., 2009. Inhibitory action of Cerrado plants against mammalian and insect  $\alpha$ -amylases. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 95: 141 – 146.

Silva, M. N.; Ferreira, V. F.; Souza, M. C. B. V., 2003. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na Beta-Lapachona e derivados. *Química Nova* 26: 407 - 416.

Silva, M.; Cruz, M. A.; Sammes, P. G., 1971. Some constituents of *Pitavia punctata*. *Phytochemistry* 10: 3255 – 3258.

Silva, S.R.; Silva, A.P.; Munhoz, C.B.; Silva Jr, M.C.; Medeiros, M.B., 2001. Guia de Plantas do Cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros. Brasília, WWF.

Simonsen, J. B.; Nordskjold, U. W.; Smitt, U.; Nyman, P.; Palpu, P.; Joshi; Varughese, G., 2001. *In vitro* screening of Indian medicinal plants for antiplasmodial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 74: 195 – 204.



Sindermann, H.; Engel, J. 2006. Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100: 17-20.

Singh, N.; Kumarn R.; Gupta, S.; Dube, A.; Lakshmi, V., 2008. Antileishmanial activity *in vitro* and *in vivo* of constituents of sea cucumber *Actinopyga lecanora*. *Parasitology Research* 103: 351 – 354.

Souza, M.do C.; Beserra, A.M.; Martins, D.C.; Real, V.V.; Santos, R.A.; Rao, V.S.; Silva, R.M.; Martins, D.T., 2009. *In vitro* and *in vivo* anti-*Helicobacter pylori* activity of *Calophyllum brasiliense* Camb. *Journal of Ethnopharmacology* 25: 452-458.

Srivastava, S.K.; Pitre, S., 1985. A New anthraquinone Glycoside from the Stem Bark of *Diospyros discolor*. *Planta Medica* 51(6) : 537-538.

Sundar, S.; Chakravarty, J.; Agarwal, D.; Rai, M.; Murray, H. W., 2010. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. *The New England Journal of Medicine* 362: 504 – 512.

Sundar, S.; Chatterjee, M., 2006. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *Indian Journal of Medical Research* 123: 345 – 352.

Sutherland, C. J.; Allouche, A.; Curtis, J.; Drakeley, C. J.; Ord, R.; Duraisingh, M.; Greenwood, B. M.; Pinder, M.; Warhurst, D.; Targett, G. A., 2002. Gambian children successfully treated with chloroquine can harbor and transmit *Plasmodium falciparum* gametocytes carrying resistance genes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 67: 578 – 585.

Tanaka, J.C.; Silva, C.C.; Oliveira, A.J.; Nakamura, C.V.; Dias Filho, B.P. 2006. Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 39(3): 387-391.

Tangmouo, J. G.; Meli, A. L.; Komguem, J.; Kuete, V.; Ngounou, F. N.; Lontsi, D.; Beng, V. P.; Choudhary, M. I.; Sondengama, B. L., 2006. Crassiflorone, a new naphthoquinone from *Diospyros crassiflora* (Hien). *Tetrahedron Letters* 47: 3067 – 3070.

Thompson, H. J., 2005. Not your "typical patient": cryptococcal meningitis in an immunocompetent patient. *J. Neurosci Nurs. Review* 37: 144.

Tillequin, F.; Koch, M.; Sevenet, T. H., 1980. Alkaloids from *Flindersia fournieri* Stem Barks. *Planta Medica* 39: 383 – 387.

Ting, C.Y.; Hsu, C.T.; Hsu, H.T.; Su, J.S.; Chen, T.Y.; Tarn, W.Y.; Kuo, Y.H.; Whang-Peng, J.; Liu, L.F.; Hwang, J., 2003. Isodiospyrin as a novel human DNA topoisomerase I inhibitor. *Biochemical Pharmacology* 15: 1981-91.

Tkacz, J.S.; Di Domenico, B., 2001. Antifungals: what's in the pipeline. *Current Opinion in Microbiology* 4: 540-545.

Traboulsi, R. S.; Mukherjee, P. K.; Ghannoum, M. A., 2008. In vitro activity of inexpensive topical alternatives against *Candida* spp. isolated from the oral cavity of HIV-infected patients. *International Journal of Antimicrobial Agents* 31: 272 – 276.

Tracy, J.W.; Webster Jr., L.T. 1996. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections. In: Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; Molinoff, P.B.; Ruddon, R.W.; Gilman, A.G. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th ed., Pergamon-Press, New York, 965-985.

Trager, W.; Jensen, J. P., 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193: 673 – 675.

Tratado de cooperação Amazônica. In. *Resenha de Política Exterior do Brasil* jul/ago/set 1978, nº 18. Brasília: MRE, 1978.

Terezan, A. P.; Rossi, R. A.; Almeida, R. N. A.; Freitas, T. G.; Fernandes, J. B.; da Silva, M. F. G. F.; Vieira, P. C.; Bueno, O. C.; Pagnocca, F. C.; Pirani, J. R., 2010. Activities of Extracts and Compounds from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. (Rutaceae) in Leaf-cutting Ants and their Symbiotic Fungus. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 21: 882-886.

Urbina, J. A.; Docampo, R., 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology* 19(11): 495-501.

Usuda, H.; Kanai, M.; Shibasaki, M., 2002. Studies toward the total synthesis of garsubellin A: synthesis of 8-deprenyl-garsubellin A. *Tetrahedron Letters* 43: 3621–3624.

Van Der Vijver, L. M., 1972. Distribution Of Plumbagin In The Plumbaginaceae. *Phytochemistry* 11: 3247 – 3248.

Vazquez, J. A., 2000. Therapeutic options for the management of oropharyngeal and esophageal candidiasis in HIV/AIDS patients. *HIV Clinical Trials* 1: 47 – 59.

Velázquez, E.; Tournier, H.A.; Mordujovich de Buschiazzi, P.; Saavedra, G.; Schinella, G.R., 2003. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia* 74: 91-97.

Verotta, L., 2002. Are acylphloroglucinols lead structures for the treatment of degenerative diseases? *Phytochemistry Reviews* 1: 389–407.

Vidyashankar, C.; Agrawal, R., 2009. Leishmaniasis. Acessado pelo site [www.emedicine.medscape.com/article/998804-overview](http://www.emedicine.medscape.com/article/998804-overview), em 20 de agosto de 2010.

Vieira, M. L.; Jacobina, R. R.; Soares, N. M., 2007. Casos de leishmaniose em pacientes atendidos nos centros de saúde e hospitais de Jacobina – BA no período de 2000 a 2004. *Revista Baiana de Saúde Pública* 31: 102 – 114.

Viotti, R.; Vigliano, C.; Lococo, B.; Bertocchi, G.; Petti, M.; Alvarez, M.G.; Postan, M.; Armenti, A., 2006. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Annals of Internal Medicine* 16 : 724-34.

Vonthron-Sénécheau, C.; Weniger, B.; Ouattara, M.; Tra Bi, F.; Kamenan, A.; Lobstein, A.; Brun, R.; Anton, R., 2003. *In vitro* antiplasmodial activity and cytotoxicity of ethnobotanically selected Ivorian plants. *Journal of Ethnopharmacology* 87: 221 – 225.

Webster, D.; Taschereau, P.; Belland, R. J.; Sand, C.; Rennie, R. P., 2008. Antifungal activity of medicinal plant extracts preliminary screening studies. *Journal of Ethnopharmacology* 115: 140 – 146.

Weniger, B.; Robledo, S.; Arango, G.J.; Deharo, E.; Aragón, R.; Muñoz, V.; Callapa, J.; Lobstein, A.; Anton, R., 2001. Antiprotozoal activities of Colombian plants. *Journal of Ethnopharmacology* 78: 193-200.

WHO, 2002. Control of Chagas disease. Technical Report Series Geneva.

WHO, 2005. Library Cataloguing-In-Publication Data Susceptibility Of Plasmodium Falciparum To Antimalarial Drugs : Report On Global Monitoring : 1996-2004. 2005. ISBN 92 4 159346 6 (Lc/Nlm Classification: Qv 256)

WHO, 2007a. Cutaneous Leishmaniasis – Why are you neglecting me?

WHO, 2007b. Control of leishmaniasis Sixtieth World health Assembly – Provisional agenda.

WHO, 2007c. Report of the fifth Consultative meeting on *Leishmania*/HIV Coinfection – Addis Ababa, Ethiopia.

Wick, W.; Grimmel, C.; Wagenknecht, B.; Dichgans, J.; Weller, M. 1999. Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: A sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 289(3): 1306-1312.

Williams, D.A.; Lemke, T.L. 2002. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. Ed. 5. Philadelphia, Lippincot Williams & Wilkins, 1114- 2002.

Winkelmann, K.; Heilmann, J.; Zerbe, O.; Rali, T.; Sticher, O., 2001. New prenylated bi- and tricyclic phloroglucinol derivatives from *Hypericum papuanum*. *Journal of Natural Products* 64: 701–706.

World malaria report 2008. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. ISBN 978 92 4 156369 7.

Wright, C. W., 2005. Traditional antimalarials and the development of novel antimalarial drugs. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 67 – 71.

Yassunaka, K.; Abe, F.; Nagayama, A.; Okabe, H.; Lozada-Pérez, L.; Lopez-Villafranco, E.; Muñoz, E.E.; Aguilar, A.; Reyes-Chilpa, R., 2005. Antibacterial activity

of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 293-299.

Yogeeswari, P.; Sriram, D., 2005. Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. *Current Medicinal Chemistry* 12(6): 657-666.

Yoshida, N., 2008. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitology International* 57(2): 105-109.

Zagoto, J.N.; Bracht, A.; Pagadigorria, C.L.S.; Ishii-Iwamoto, E.L.; Cortez, D.A.G.; Yamamoto, N.S., 2006. Effects of the *Kielmeyera coriacea* extract on energy metabolism in the rat liver *Journal of Ethnopharmacology* 105: 47–54.

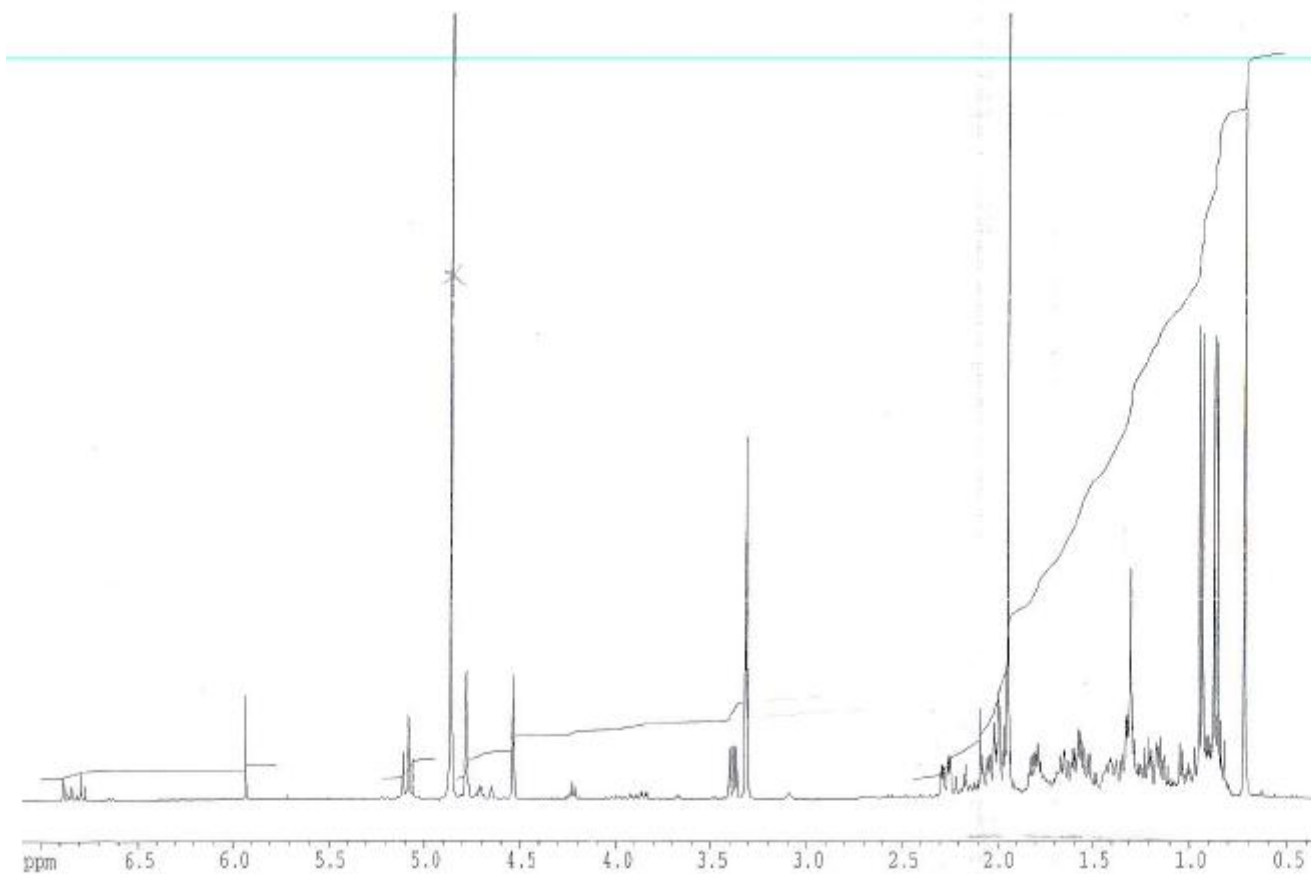
Zakaria, M.B.; Jeffreys, J.A.D.; Waterman, P.G.; Zhong, S.M., 1984. Naphthoquinones and triterpenes from some asian *Diospyros* species *Phytochemistry* 23: 1481-1484.

Zauli-Nascimento, R. C.; Miguel, D. C.; Yokoyama-Yasunaka, J. K.; Pereira, L. I.; Pelli de Oliveira, M. A.; Ribeiro-Dias, F.; Dorta, M. L.; Uliana, S. R., 2010. *In vitro* sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Tropical Medicine & International Health* 15(1):68-76.

Zhou, B-N.; Baj, N.J.; Glass, T.E.; Malone, S.; Werkhoven, M.C.M. Van Tronn, F.; David, J.H.; Wisse, J.H.; Kingston, D.G.I., 1997. Bioactive labdane diterpenoids from *Renealmia alpinia* collected in the suriname rainforest. *Journal of Natural Products* 60: 1287-1293.

## **Anexo 1: Espectros RMN de LC-1**

LCA 27-2 / CD3OD / 298K



```

Current Data Parameters
NAME      dms012300
EXPNO    1
PROCNO   1

F2 - acquisition parameters
Date_    20090326
Time     9.50
INSTRUM  qnp001
PROBHD   5 mm BBO 1H-2D
PULPROG  zgpg30
TD        65536
SOLVENT  H2O
NS        180
DS        4
SWH       3125.000 Hz
F230MHz   8.825847 Hz
AQ        5.2460981 sec
RG        314
DQ        180.886 usec
DE        6.52 usec
TE        300.2 K
D1        1.50000000 sec

----- CHANNEL f1 -----
NUC1      1H
P1        8.00 usec
PL1       0.00 dB
SFO1     400.146362 MHz

F2 - Processing parameters
SI        32768
SF        400.146362 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0.00 Hz
GB        0
PC        0.50

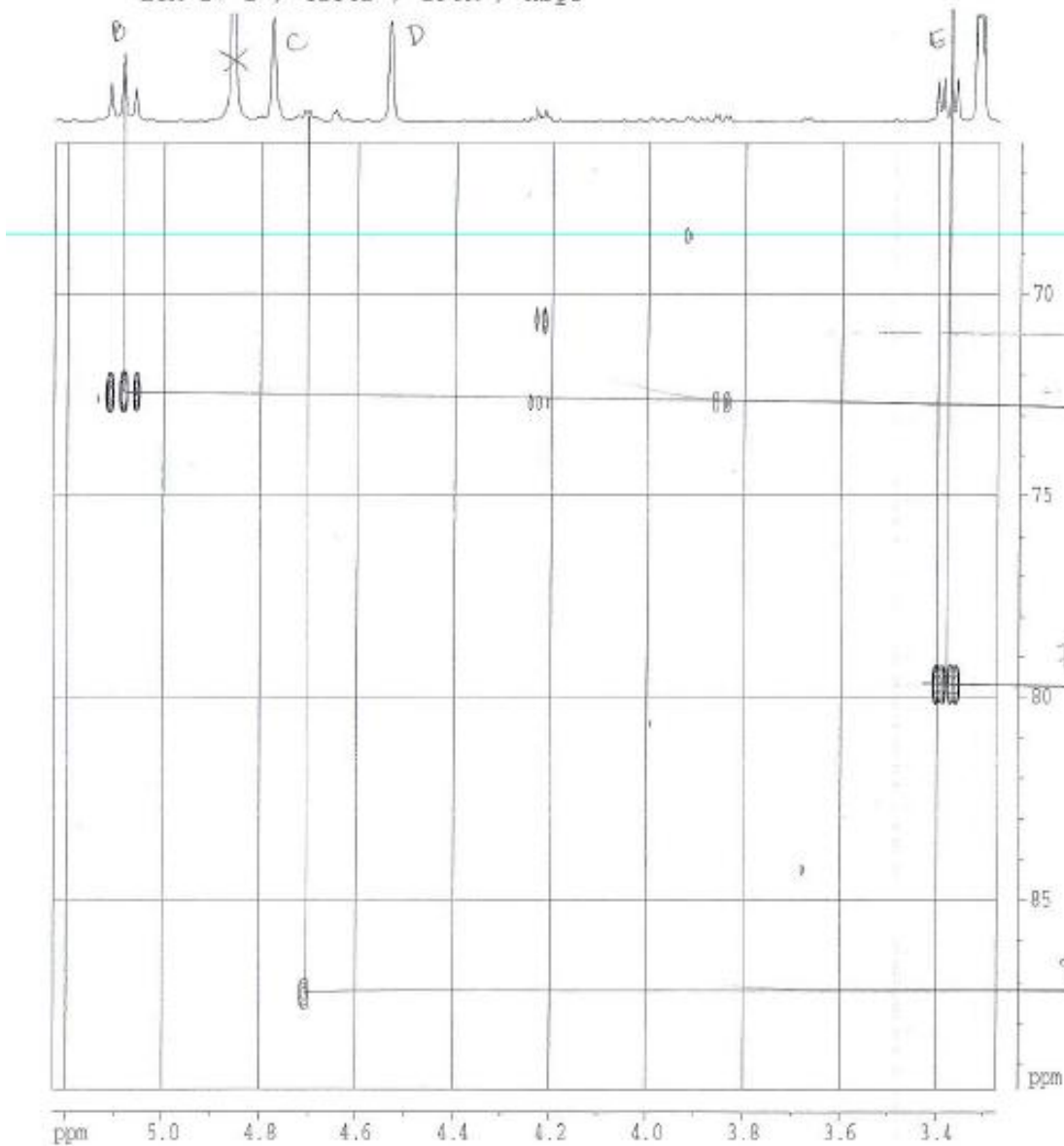
1D 1H NMR plot parameters
CX        33.60 cm
CY        52.12 cm
CZ        7.064 cm
PL1       2818.16 Hz
PL2       3.122 ppm
PL3       111.18 Hz
SFO1     8.21142 ppm/cm
SFO2     84.59128 Hz/cm

```





LCA 27-2 / CD3OD / 298K / HSQC



General Data Parameters

NAME	hsqc0404
EXPNO	1
PROCNO	1

F2 - Acquisition Parameters

DATE_	20040421
TIME	21.00
INSTRUM	zgpg30
PROBHD	5 mm BBO 1H-13
PULPROG	zgpg30
TD	65536
CYCLE	1000
RG	320
DE	1.0
DELTA	3.12000000
PTPROG	zgpg30
RG	320
RG2	320
RG3	320
RG4	320
RG5	320
RG6	320
RG7	320
RG8	320
RG9	320
RG10	320
RG11	320
RG12	320
RG13	320
RG14	320
RG15	320
RG16	320
RG17	320
RG18	320
RG19	320
RG20	320

===== CHANNEL f1 =====

NUC1	13C
PC1	13.00
PL1	0.00
PL2	0.00
PL3	0.00
PL4	0.00
PL5	0.00
PL6	0.00
PL7	0.00
PL8	0.00
PL9	0.00
PL10	0.00
PL11	0.00
PL12	0.00
PL13	0.00
PL14	0.00
PL15	0.00
PL16	0.00
PL17	0.00
PL18	0.00
PL19	0.00
PL20	0.00

===== CHANNEL f2 =====

NUC2	1H
PC2	1.00
PL2	0.00
PL3	0.00
PL4	0.00
PL5	0.00
PL6	0.00
PL7	0.00
PL8	0.00
PL9	0.00
PL10	0.00
PL11	0.00
PL12	0.00
PL13	0.00
PL14	0.00
PL15	0.00
PL16	0.00
PL17	0.00
PL18	0.00
PL19	0.00
PL20	0.00

===== CHANNEL f3 =====

NUC3	13C
PC3	13.00
PL3	0.00
PL4	0.00
PL5	0.00
PL6	0.00
PL7	0.00
PL8	0.00
PL9	0.00
PL10	0.00
PL11	0.00
PL12	0.00
PL13	0.00
PL14	0.00
PL15	0.00
PL16	0.00
PL17	0.00
PL18	0.00
PL19	0.00
PL20	0.00

F1 - Acquisition parameters

WDW	EM
SSB	0
LB	100.000000
GB	0.000000
PC	1.000000
PL1	0.000000
PL2	0.000000
PL3	0.000000
PL4	0.000000
PL5	0.000000
PL6	0.000000
PL7	0.000000
PL8	0.000000
PL9	0.000000
PL10	0.000000
PL11	0.000000
PL12	0.000000
PL13	0.000000
PL14	0.000000
PL15	0.000000
PL16	0.000000
PL17	0.000000
PL18	0.000000
PL19	0.000000
PL20	0.000000

F2 - Processing parameters

SI	32768
SF	400.1460000
WDW	EM
SSB	0
LB	100.000000
GB	0.000000
PC	1.000000

F3 - Processing parameters

SI	32768
SF	100.6262700
WDW	EM
SSB	0
LB	100.000000
GB	0.000000
PC	1.000000

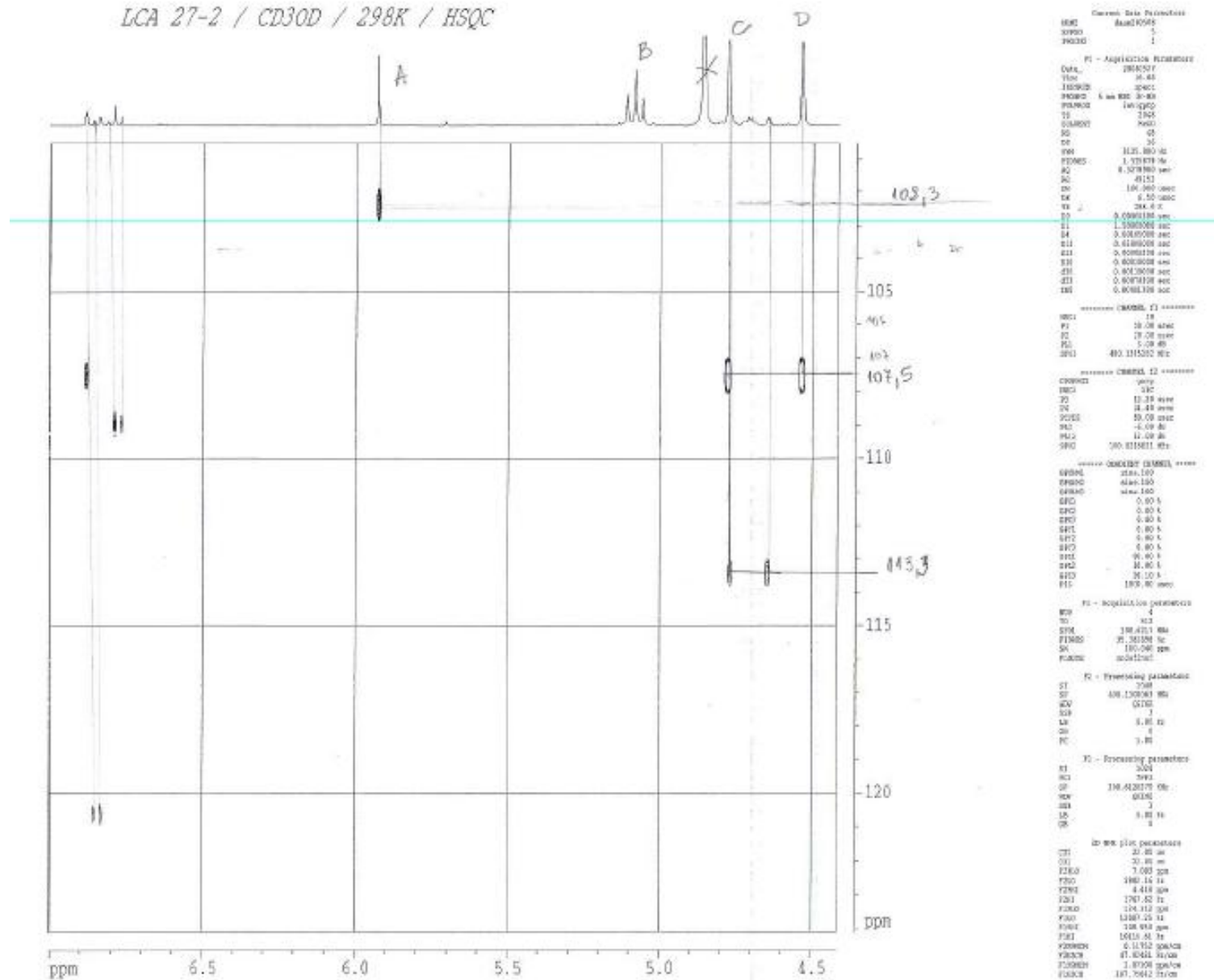
===== 2D plot parameters =====

CO	32.00
CC	32.00
YFWD	5.125
YBDO	2091.30
YDPO	1.174
YDPI	1495.00
YDPIB	99.000
YDPOB	9919.75
YDPOI	96.143
YDPII	6885.88
YDPOIB	0.6875
YDPOIC	96.5108
YDPOID	1.6100
YDPOIE	96.5214



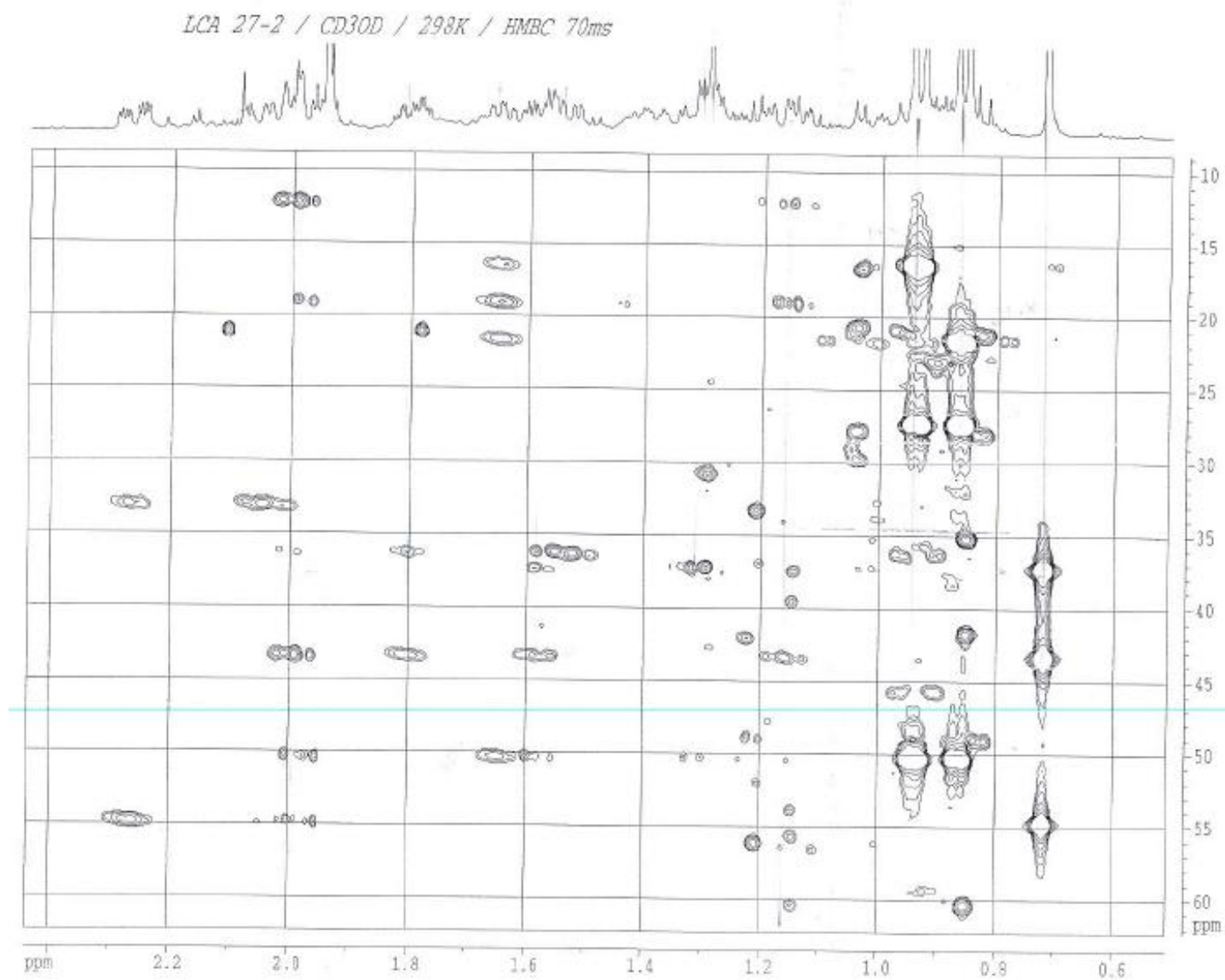


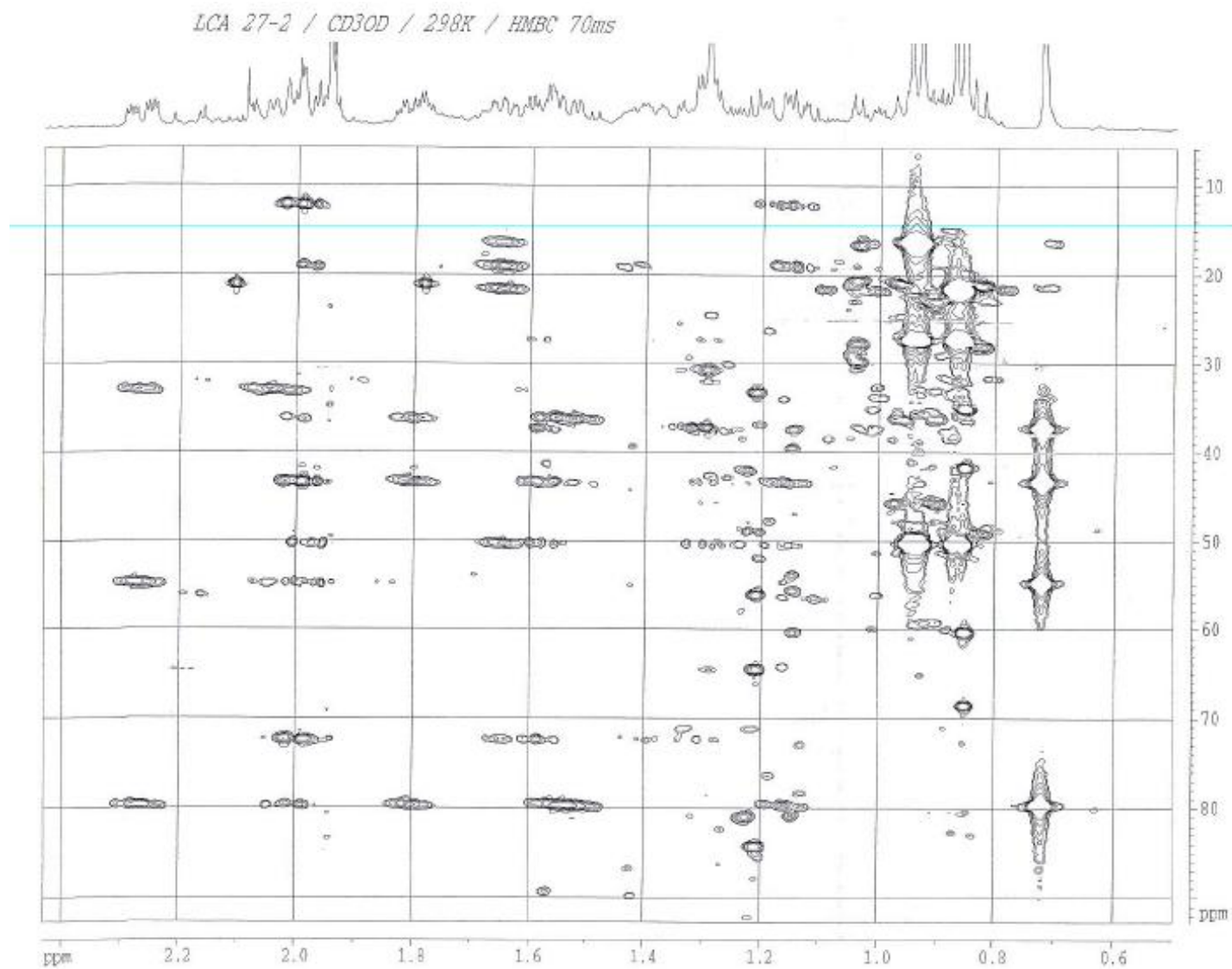
LCA 27-2 / CD3OD / 298K / HSQC



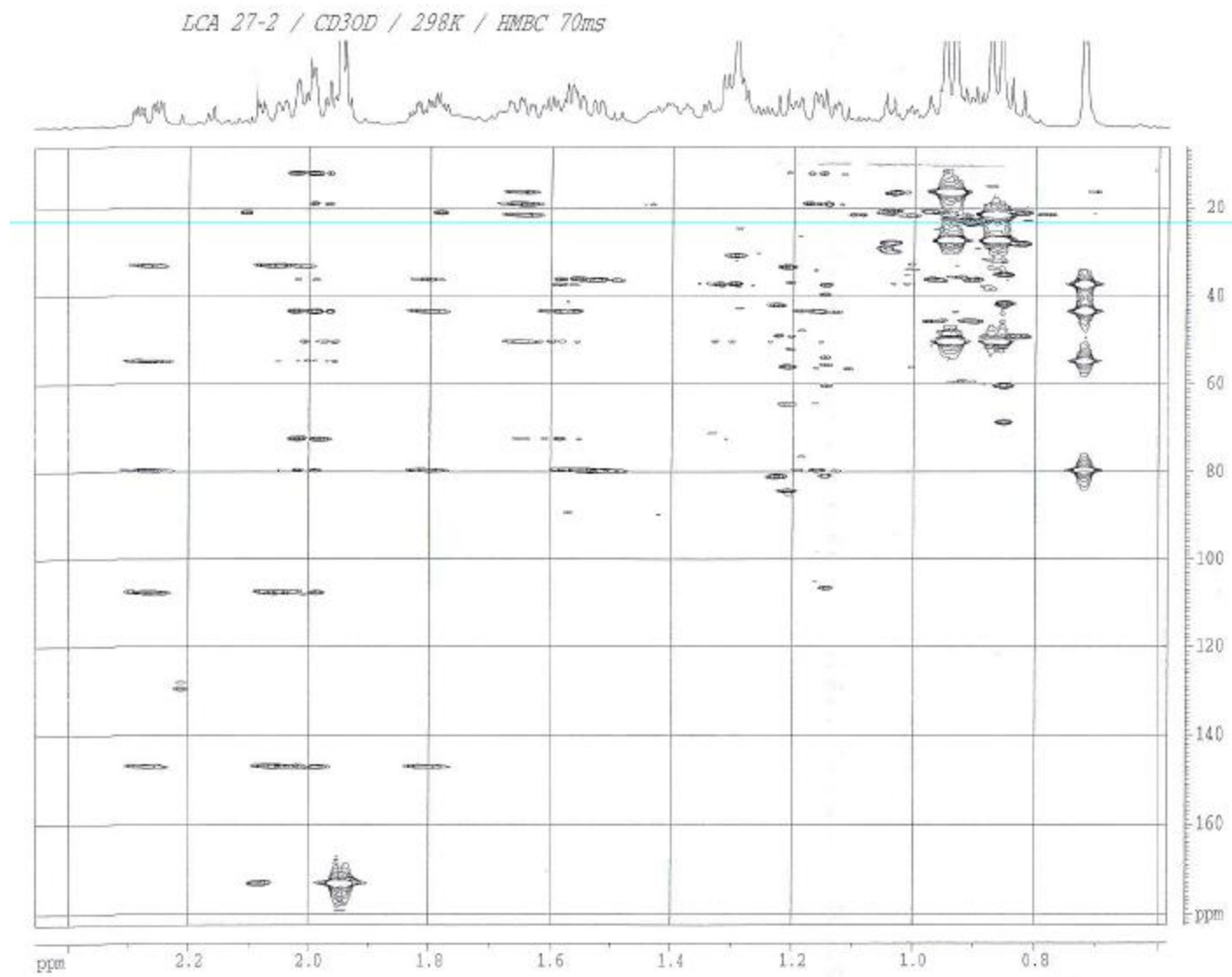


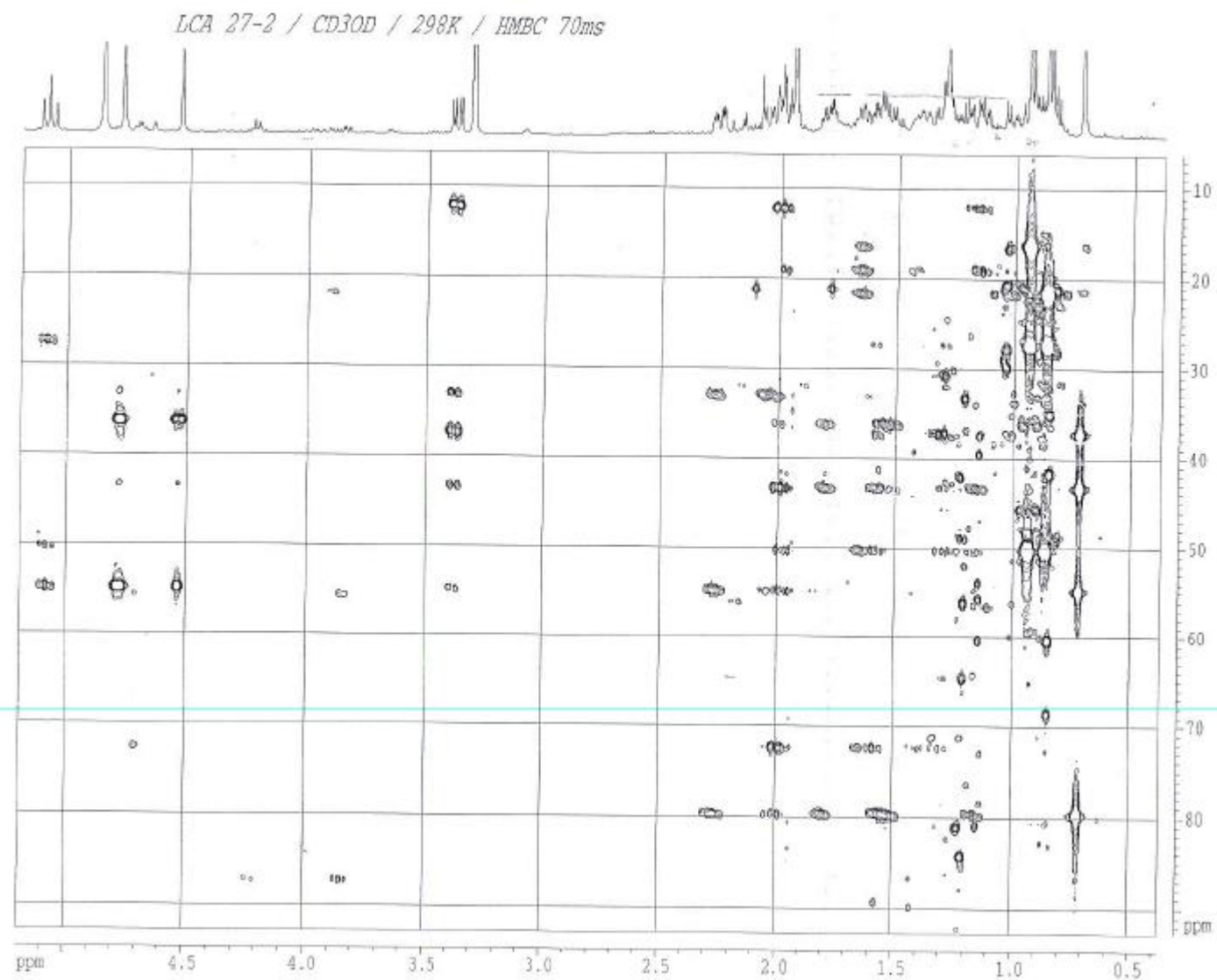




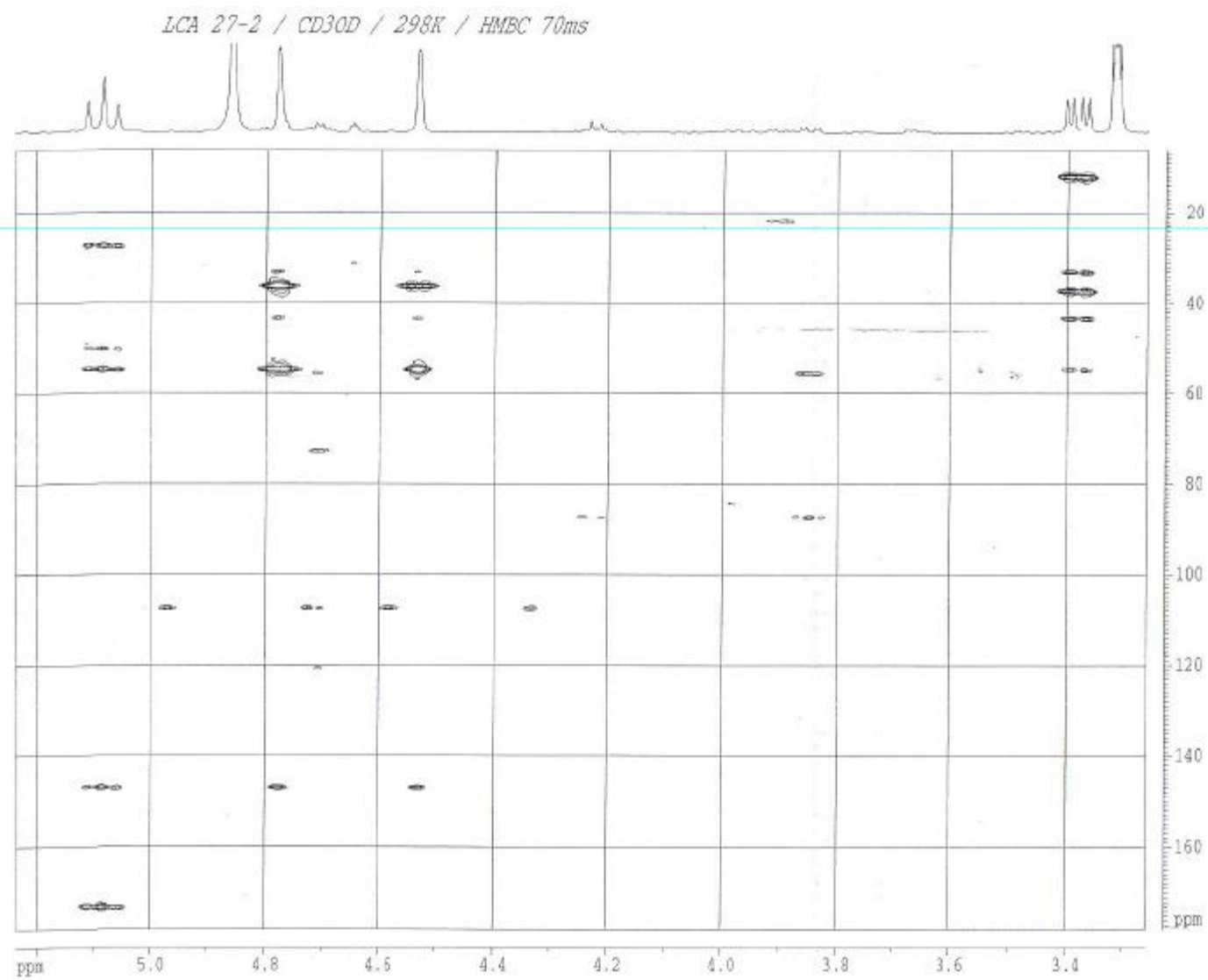








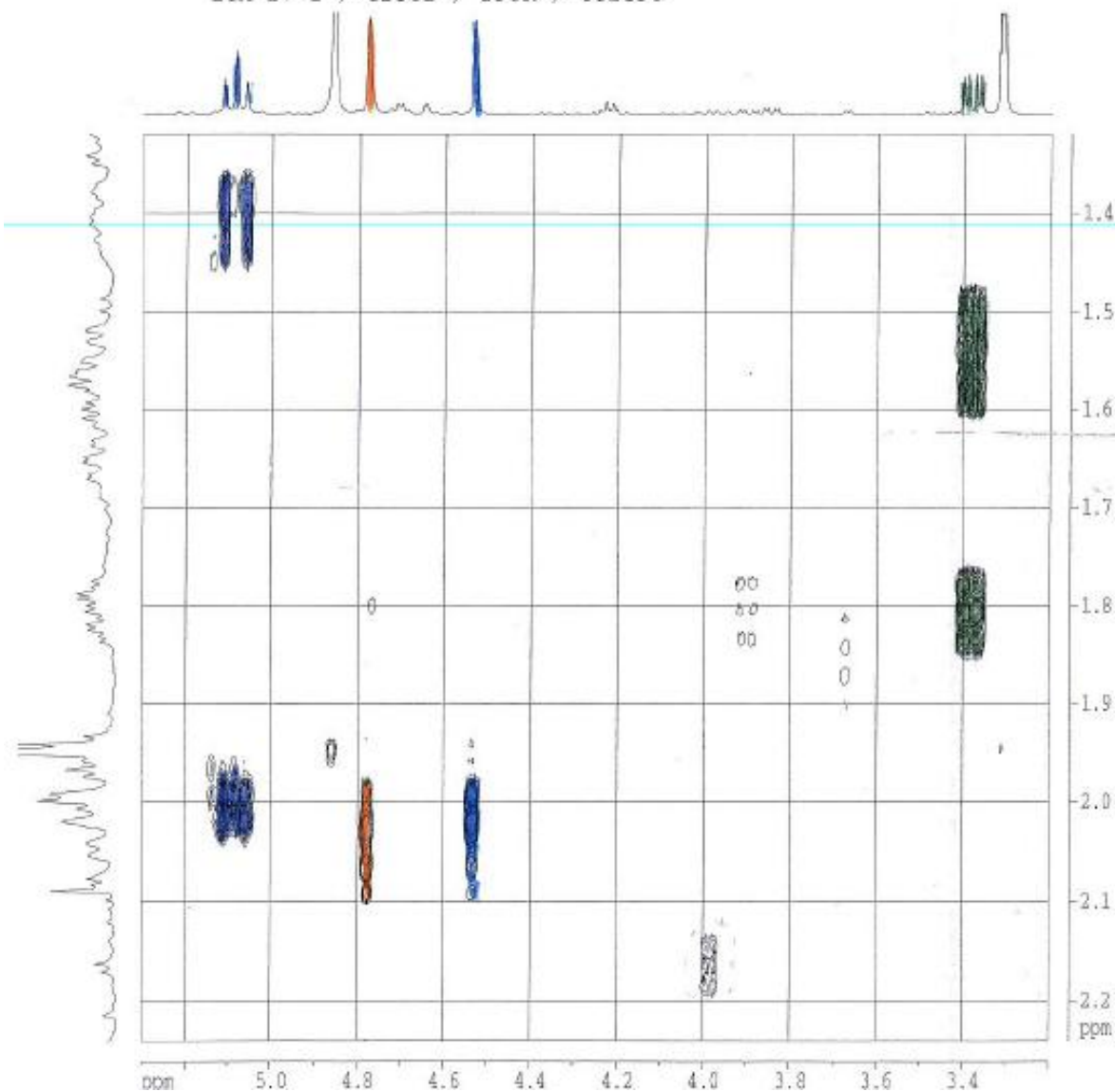








LCA 27-2 / CD3OD / 298K / COSY90



```

Current Data Parameters
NAME      20000000
EXPNO    2
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20051218
Time      8.51
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm BBI 1H-2H
PULPROG   zgpg30
TD         65536
SOLVENT   H2O
NS         16
DS         16
SWH        125.000 kHz
F2RES      1.52587% kHz
AQ         0.373896 sec
RG         256
DE         368.000 umsec
TE         4.10 0000
TE2        298.1 K
EO         0.8180018 sec
E1         1.5180018 sec
E2         0.8180018 sec
E3         0.8180018 sec
E4         0.8180018 sec
===== CHANNEL f1 =====
NUC1       1H
P1         18.00 nsec
PL1        0.00 dB
PL2        19.00 nsec
PL3        19.00 dB
===== CHANNEL f2 =====
GPROG1     zgpg30
NUC2        13C
P2         12.00 nsec
PL2        0.00 dB
===== CHANNEL f3 =====
GPROG3     zgpg30
NUC3        13C
P3         12.00 nsec
PL3        0.00 dB
===== CHANNEL f4 =====
GPROG4     zgpg30
NUC4        13C
P4         12.00 nsec
PL4        0.00 dB

F1 - Acquisition parameters
NUC1       1H
P1         18.00 nsec
PL1        0.00 dB
PL2        19.00 nsec
PL3        19.00 dB

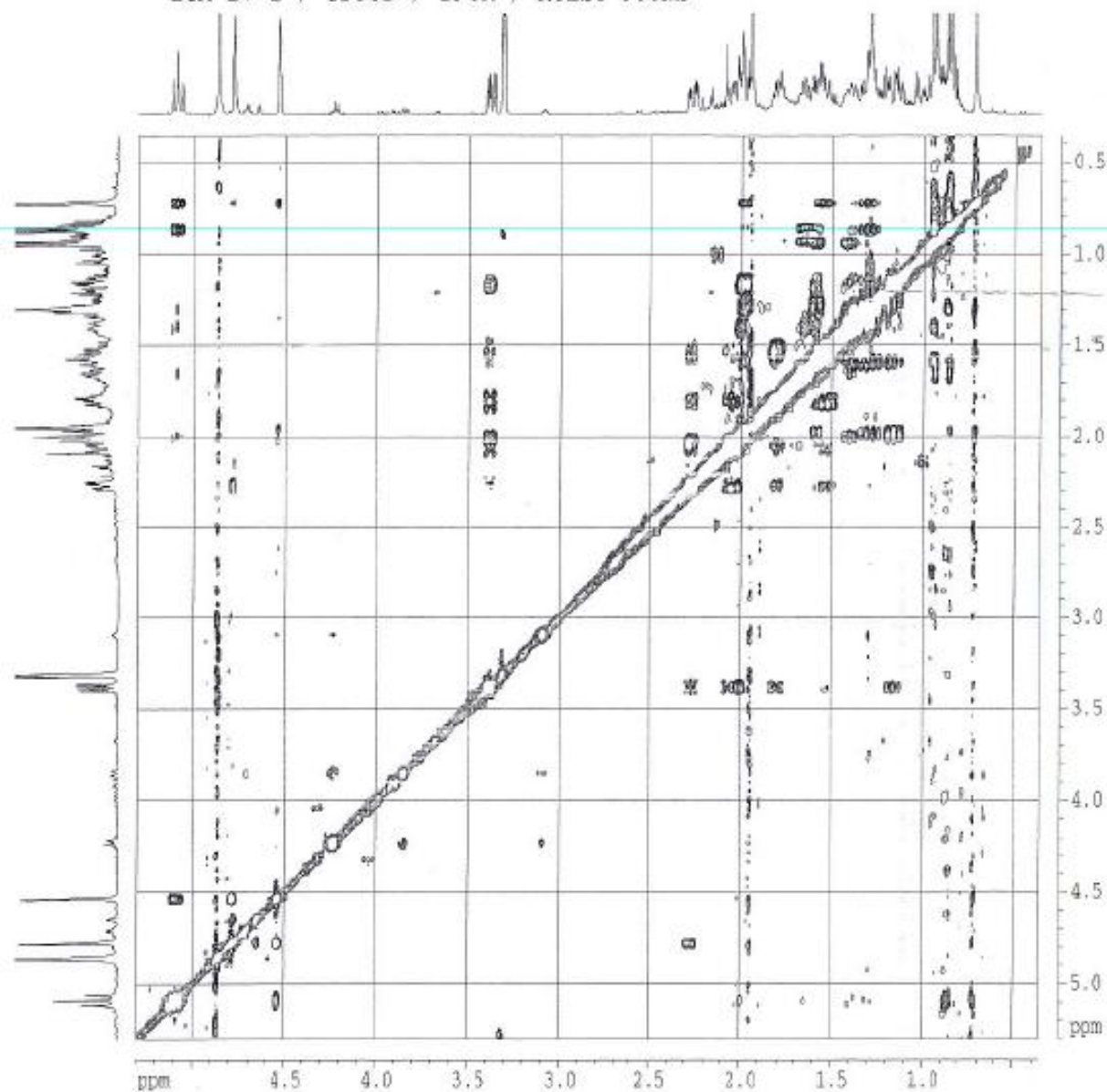
F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         400.146000 MHz
WDW         EM
SSB         0
GB         0.00 Hz
PC         1.00

F3 - Processing parameters
SI         32768
SF         400.146000 MHz
WDW         EM
SSB         0
GB         0.00 Hz
PC         1.00

3D 90deg gpc parameters
CQ1        22.00 sec
CQ2        32.00 sec
P1P1A     0.200 ppm
P1P1B     0.128 00 00
P1P1C     1.200 ppm
P1A1       1208.42 Hz
P1A2       1.240 ppm
P1B1       806.39 Hz
P1B2       1.320 ppm
P1C1       328.17 Hz
P1P1P1A   0.49045 ppm/Hz
P1P1P1B   18.15431 Hz/Hz
P1P1P1C   0.44181 ppm/Hz
P1P1P1D   16.13131 Hz/Hz

```

LCA 27-2 / CD3OD / 298K / NOESY 500ms



```

Current Data Parameters
NAME      06062005
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20050521
Time     18:47
PULPROG  zgpg30
PROBHD   5 mm BBO 1H-2D
MAGPROG  noesygpg30
TD       65536
SOLVENT  CDCl3
SI       32
DS       32
GB       0
GB1      1125.000 Hz
FIDRES   1.115677 Hz
AQ       0.378000 sec
RG        480
AQ1      140.000 sec
SF       500.136 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0.800000 Hz
GB2      3.500000 Hz
GB3      0.500000 Hz
GB4      0.800000 Hz
GB5      0.218000 Hz
GB6      0.800000 Hz

***** CHANNEL f1 *****
NUC1      1H
P1        12.00 nsec
PC        30.00 nsec
PL        3.00 dB
SFO1     499.132360 MHz

***** CHANNEL CHANNEL *****
CPDPRG1  zgpg100
ORNAME1  06062005
GEO1     0.00 V
PFG1     0.00 A
SFO1     500.136 MHz
GZ1      18.00 A
GZ2      -12.00 A
PL1      1000.00 nsec

F1 - Acquisition Parameters
SI       32
DS       32
GB       0
GB1      480.13236 MHz
FIDRES   6.120000 Hz
AQ       1.830 sec
PROBHD   spect
SI       32
DS       32
GB       0
GB1      480.13236 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0.800000 Hz
GB2      3.500000 Hz
GB3      0.500000 Hz
GB4      0.800000 Hz
GB5      0.218000 Hz
GB6      0.800000 Hz

F2 - Processing parameters
SI       32
SF       499.132360 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0.800000 Hz
GB       0
GB1      1.00

F1 - Processing parameters
SI       32768
SF       499.132360 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0.800000 Hz
GB       0

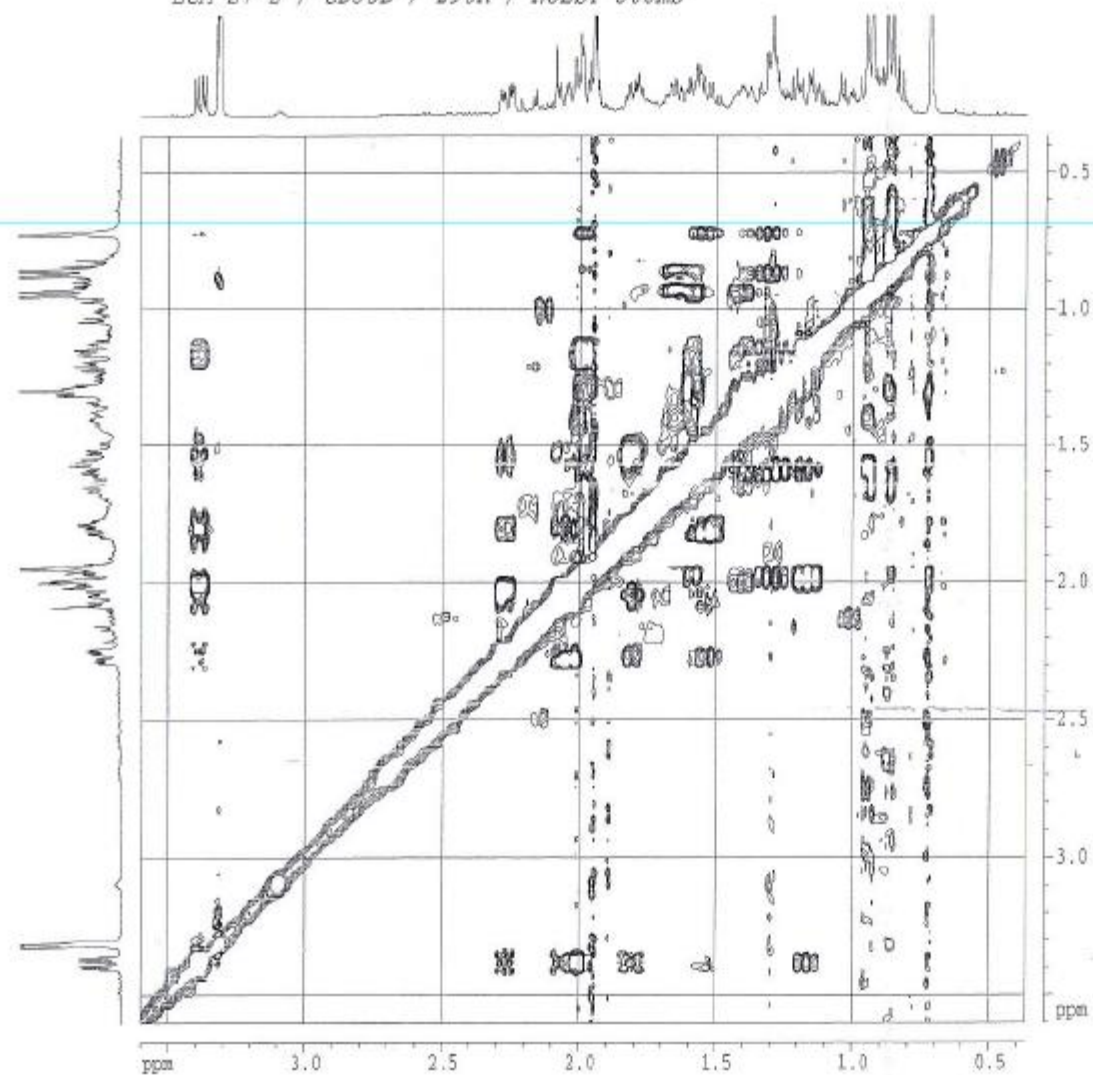
3D MR plot parameters
CE1      21.00 cm
CE2      21.00 cm
F2P1D1   5.300 ppm
F2P1D2   210.00 Hz
F2P1D3   5.300 ppm
F2P2D1   140.00 Hz
F2P2D2   5.300 ppm
F2P2D3   210.00 Hz
F2P3D1   5.300 ppm
F2P3D2   140.00 Hz
F2P3D3   5.300 ppm
F2P4D1   5.300 ppm
F2P4D2   5.300 ppm/cm
F2P4D3   45.8679 Hz/cm
F2P5D1   5.2971 ppm/cm
F2P5D2   49.8655 Hz/cm

```





LCA 27-2 / CD3OD / 298K / NOESY 500ms



```

Current Data Dictionary
NAME      Alcoh04040
EXPNO    1
PROCNO   1
PROCPS   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20080316
Time      14:27
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm QNP 1H-13
PULPROG   zgpg30
TD         65536
SOLVENT   H2O
NS         32
DS         4
SWH        5125.810 Hz
FIDRES     0.32479 Hz
AQ         0.32795 sec
RG         504
AQ1        350.918 sec
TE         300.2 K
DE         1.50 sec
LB         2.000000 sec
GB         1.000000 sec
GB1        1.000000 sec
GB2        1.000000 sec
GB3        1.000000 sec
GB4        1.000000 sec
GB5        1.000000 sec
GB6        1.000000 sec
GB7        1.000000 sec
GB8        1.000000 sec
GB9        1.000000 sec
GB10       1.000000 sec
GB11       1.000000 sec
GB12       1.000000 sec
GB13       1.000000 sec
GB14       1.000000 sec
GB15       1.000000 sec
GB16       1.000000 sec
GB17       1.000000 sec
GB18       1.000000 sec
GB19       1.000000 sec
GB20       1.000000 sec
GB21       1.000000 sec
GB22       1.000000 sec
GB23       1.000000 sec
GB24       1.000000 sec
GB25       1.000000 sec
GB26       1.000000 sec
GB27       1.000000 sec
GB28       1.000000 sec
GB29       1.000000 sec
GB30       1.000000 sec
GB31       1.000000 sec
GB32       1.000000 sec
GB33       1.000000 sec
GB34       1.000000 sec
GB35       1.000000 sec
GB36       1.000000 sec
GB37       1.000000 sec
GB38       1.000000 sec
GB39       1.000000 sec
GB40       1.000000 sec
GB41       1.000000 sec
GB42       1.000000 sec
GB43       1.000000 sec
GB44       1.000000 sec
GB45       1.000000 sec
GB46       1.000000 sec
GB47       1.000000 sec
GB48       1.000000 sec
GB49       1.000000 sec
GB50       1.000000 sec
GB51       1.000000 sec
GB52       1.000000 sec
GB53       1.000000 sec
GB54       1.000000 sec
GB55       1.000000 sec
GB56       1.000000 sec
GB57       1.000000 sec
GB58       1.000000 sec
GB59       1.000000 sec
GB60       1.000000 sec
GB61       1.000000 sec
GB62       1.000000 sec
GB63       1.000000 sec
GB64       1.000000 sec
GB65       1.000000 sec
GB66       1.000000 sec
GB67       1.000000 sec
GB68       1.000000 sec
GB69       1.000000 sec
GB70       1.000000 sec
GB71       1.000000 sec
GB72       1.000000 sec
GB73       1.000000 sec
GB74       1.000000 sec
GB75       1.000000 sec
GB76       1.000000 sec
GB77       1.000000 sec
GB78       1.000000 sec
GB79       1.000000 sec
GB80       1.000000 sec
GB81       1.000000 sec
GB82       1.000000 sec
GB83       1.000000 sec
GB84       1.000000 sec
GB85       1.000000 sec
GB86       1.000000 sec
GB87       1.000000 sec
GB88       1.000000 sec
GB89       1.000000 sec
GB90       1.000000 sec
GB91       1.000000 sec
GB92       1.000000 sec
GB93       1.000000 sec
GB94       1.000000 sec
GB95       1.000000 sec
GB96       1.000000 sec
GB97       1.000000 sec
GB98       1.000000 sec
GB99       1.000000 sec
GB100      1.000000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1      13C
PC1       10.00 usec
PC2       30.00 usec
PC3       1.00 usec
PC4       400.131400 MHz

===== CHANNEL c130001 =====
CPDPRG2   zgpg30
NUC2      13C
PC2PRG2   zgpg30
PC2       10.00 usec
PC3       30.00 usec
PC4       1.00 usec
PC5       400.131400 MHz
PC6       1800.80 usec

F1 - Acquisition parameters
SI         2
SF         500.130400 MHz
RG         504
AQ         0.32795 sec
AQ1        350.918 sec
SOLVENT    H2O
F2 - Processing parameters
SI         2
SF         499.999999 MHz
RG         504
AQ         0.32795 sec
AQ1        350.918 sec
SOLVENT    H2O

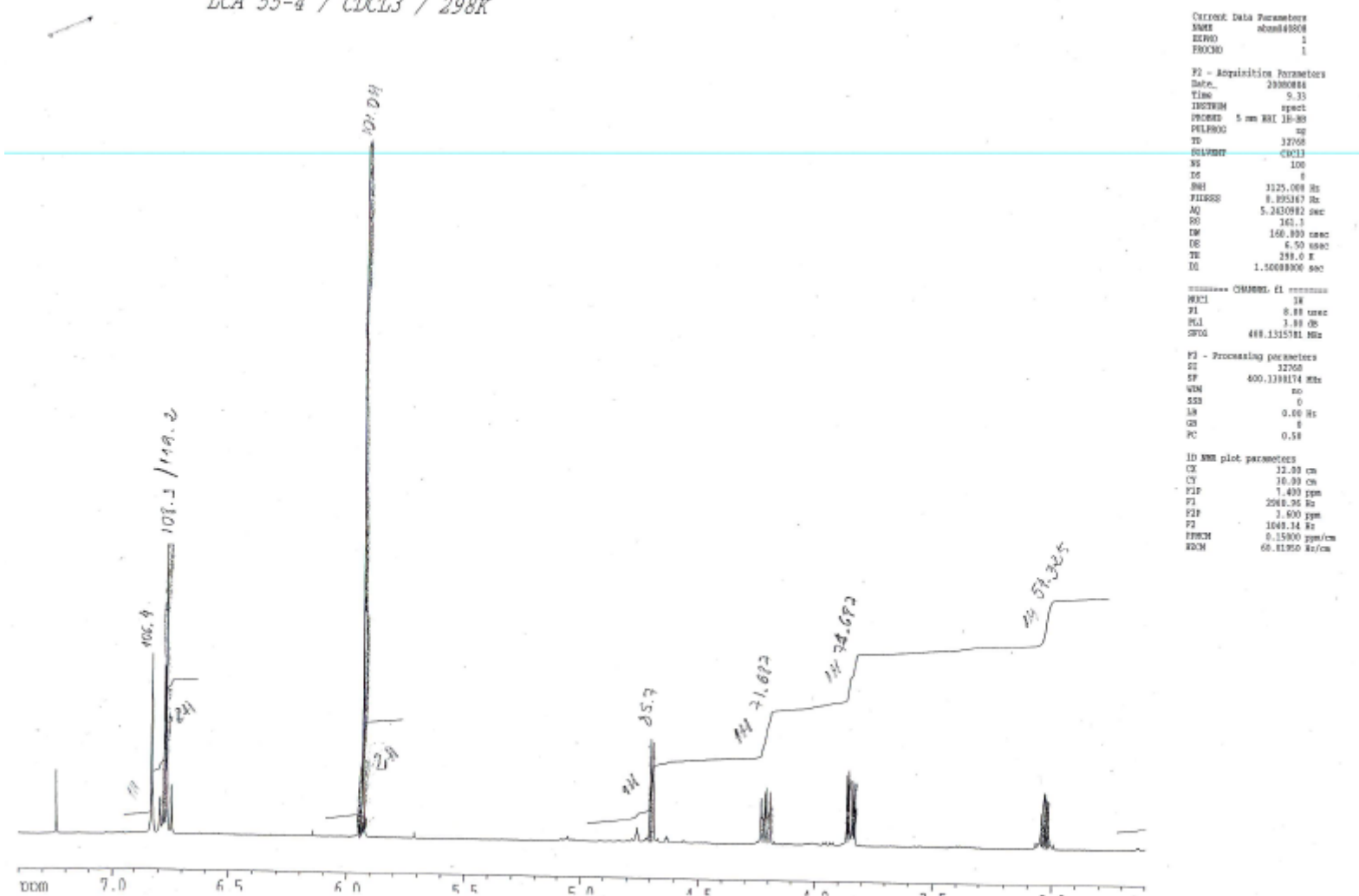
F1 - Processing parameters
SI         2
SF         500.130400 MHz
RG         504
AQ         0.32795 sec
AQ1        350.918 sec
SOLVENT    H2O

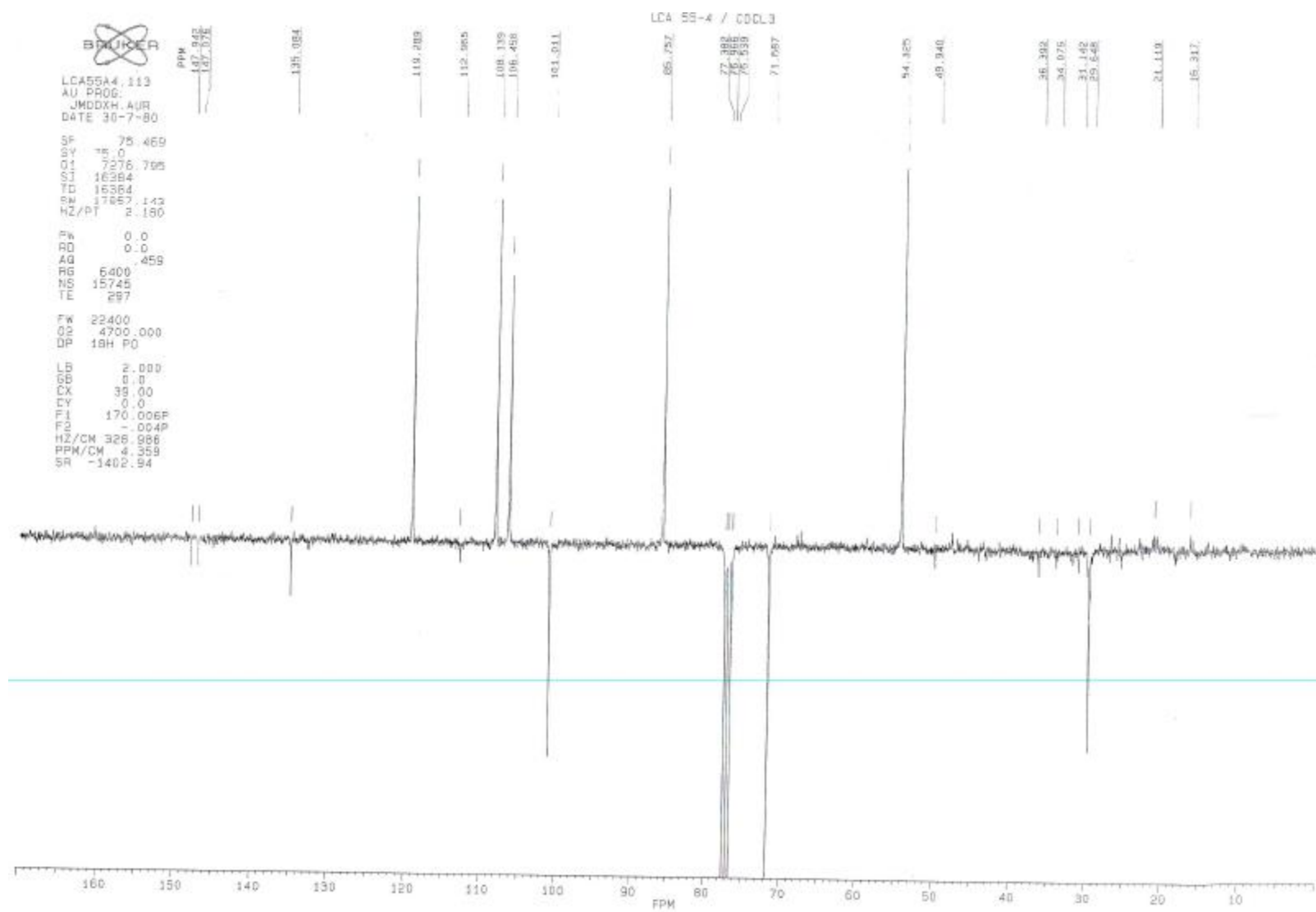
2D NMR list parameters
SI         2
SF         500.130400 MHz
RG         504
AQ         0.32795 sec
AQ1        350.918 sec
SOLVENT    H2O
F2PRG2    zgpg30
F2PC2     10.00 usec
F2PC3     30.00 usec
F2PC4     1.00 usec
F2PC5     400.131400 MHz
F2PC6     1800.80 usec

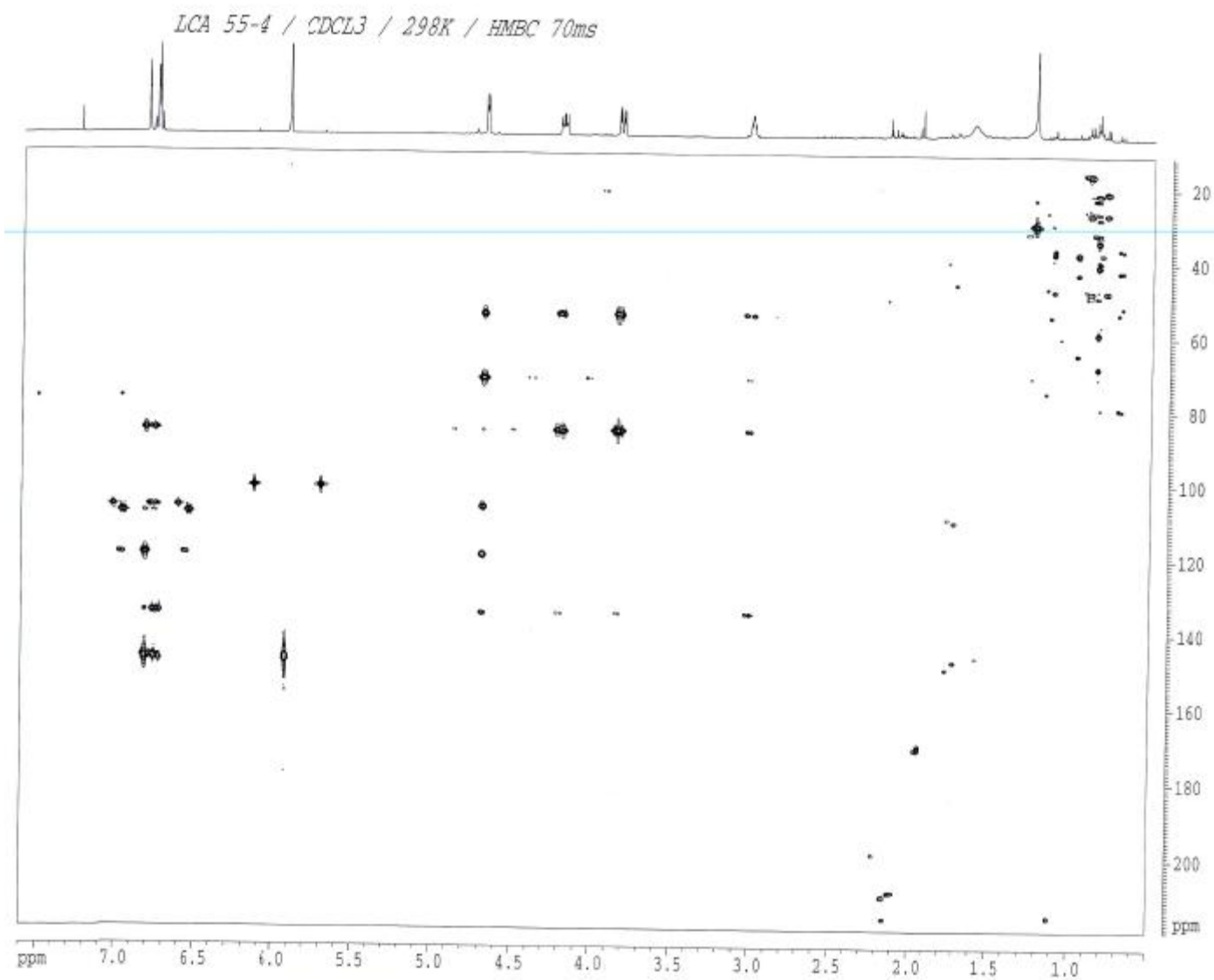
```

## **Anexo 2: Espectros RMN de LC-2**

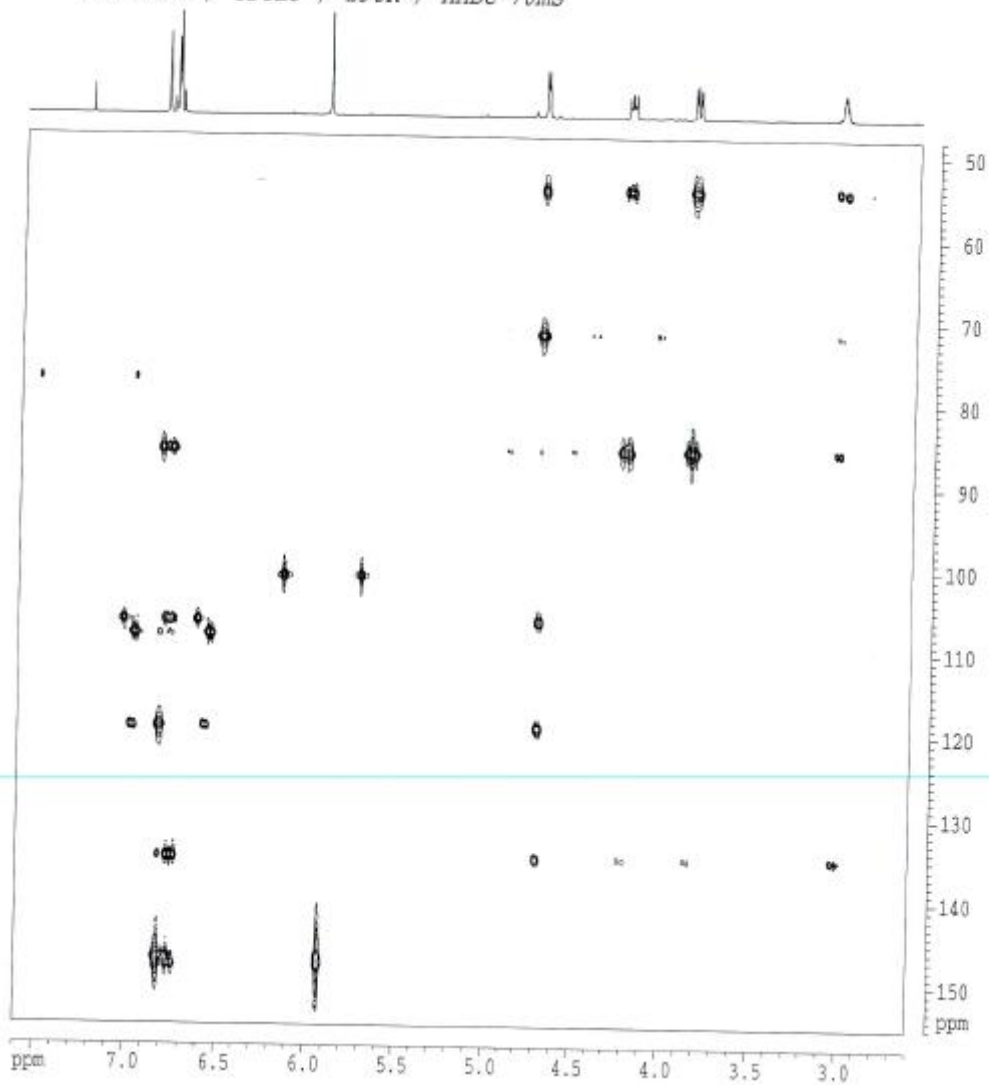
LCA 55-4 / CDCL3 / 298K







LCA 55-4 / CDCL3 / 298K / HMBC 70ms



```

Current Data Parameters
NAME      lca04030
EXPNO    1
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20040804
Time      11.55
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm BBI 1H-13
PULPROG   zgpg30
SI         2048
SOLVENT   CDCl3
NS         40
DS         2
SWH        3121.860 Hz
FIDRES     0.122979 Hz
AQ         0.127108 sec
RG          613
DA         249.200 sec
DE         0.150 cm
TE         296.2 K
DQ         0.1800000 sec
EC         0.0210000 sec
ED         0.0210000 sec
E2         0.0700000 sec
CE1        0.0000000 sec
CE2        0.0000000 sec
SFO        0.1000000 sec

***** CHANNEL f1 *****
PC1        8.75 sec
PO1        10.70 sec
PL1        2.00 dB
PR1        400.131786 MHz

***** CHANNEL f2 *****
PC2        13.10 sec
PO2        6.00 dB
PR2        100.625000 MHz

***** CHANNEL f3 *****
CPDPRG2   gpg30
ENPRG2    gpg30
SFO2       125.761
PCPD2      3.00 Hz
POPD2      3.00 Hz
PLPD2      0.00 Hz
PRPD2      0.00 Hz
SFO3       400.131786 MHz
PCPD3      34.00 Hz
POPD3      0.00 Hz
PRPD3      0.00 Hz
SFO4       200.131786 MHz

F1 - Acquisition Parameters
SI         2048
DS         2
SWH        3121.860 Hz
FIDRES     0.122979 Hz
AQ         0.127108 sec
RG          613
DA         249.200 sec
DE         0.150 cm
TE         296.2 K

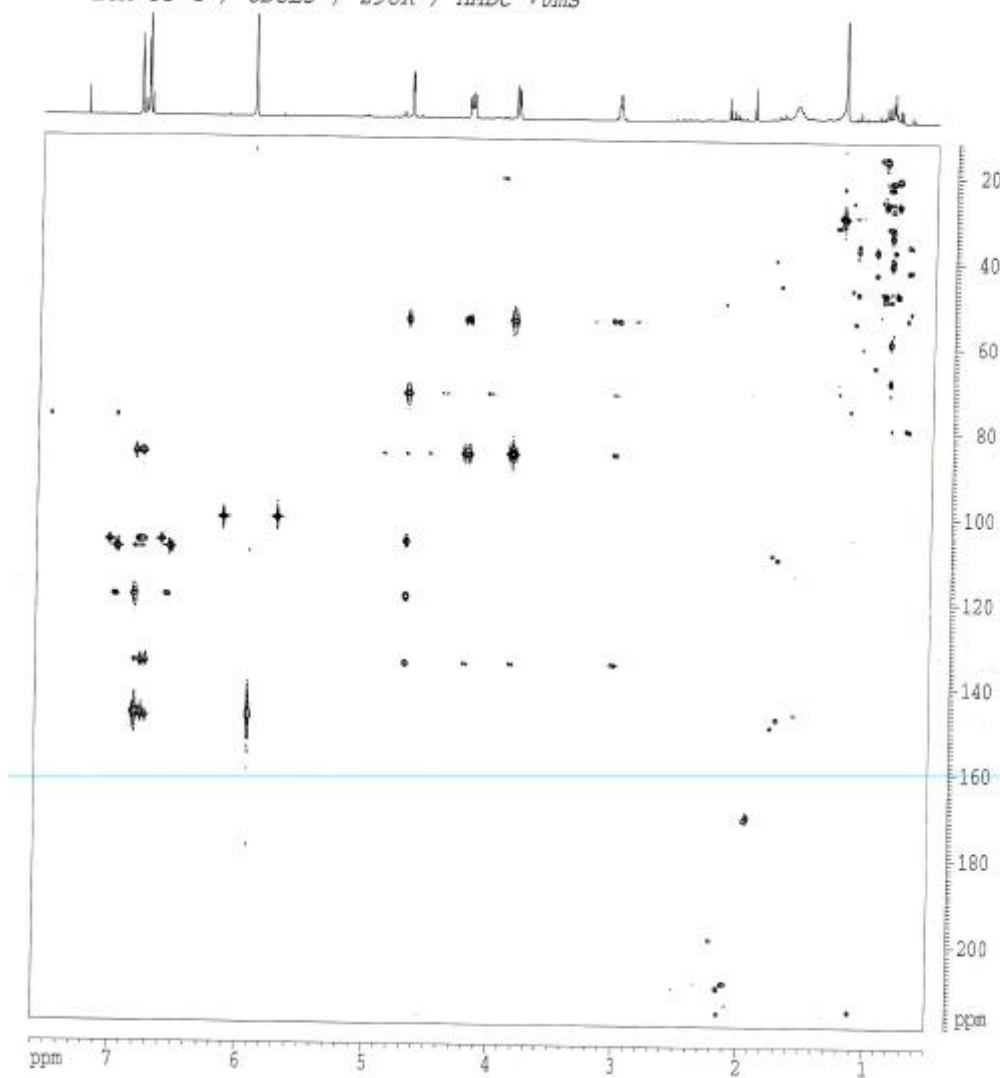
F2 - Processing parameters
SI         2048
SF         400.131786 MHz
WDW        EM
SSB         0
LB          0.00 Hz
GB          0
PC         1.00

F3 - Processing parameters
SI         1024
SF         100.625000 MHz
WDW        EM
SSB         0
LB          0.00 Hz
GB          0
PC         1.00

2D 90M sifft parameters
SI         2048
SF         400.131786 MHz
WDW        EM
SSB         0
LB          0.00 Hz
GB          0
PC         1.00
F1F2PRG   zgpg30
SI1        2048
SI2        2048
SI3        2048
SI4        2048
SI5        2048
SI6        2048
SI7        2048
SI8        2048
SI9        2048
SI10       2048
SI11       2048
SI12       2048
SI13       2048
SI14       2048
SI15       2048
SI16       2048
SI17       2048
SI18       2048
SI19       2048
SI20       2048
SI21       2048
SI22       2048
SI23       2048
SI24       2048
SI25       2048
SI26       2048
SI27       2048
SI28       2048
SI29       2048
SI30       2048
SI31       2048
SI32       2048
SI33       2048
SI34       2048
SI35       2048
SI36       2048
SI37       2048
SI38       2048
SI39       2048
SI40       2048
SI41       2048
SI42       2048
SI43       2048
SI44       2048
SI45       2048
SI46       2048
SI47       2048
SI48       2048
SI49       2048
SI50       2048
SI51       2048
SI52       2048
SI53       2048
SI54       2048
SI55       2048
SI56       2048
SI57       2048
SI58       2048
SI59       2048
SI60       2048
SI61       2048
SI62       2048
SI63       2048
SI64       2048
SI65       2048
SI66       2048
SI67       2048
SI68       2048
SI69       2048
SI70       2048
SI71       2048
SI72       2048
SI73       2048
SI74       2048
SI75       2048
SI76       2048
SI77       2048
SI78       2048
SI79       2048
SI80       2048
SI81       2048
SI82       2048
SI83       2048
SI84       2048
SI85       2048
SI86       2048
SI87       2048
SI88       2048
SI89       2048
SI90       2048
SI91       2048
SI92       2048
SI93       2048
SI94       2048
SI95       2048
SI96       2048
SI97       2048
SI98       2048
SI99       2048
SI100      2048
SI101      2048
SI102      2048
SI103      2048
SI104      2048
SI105      2048
SI106      2048
SI107      2048
SI108      2048
SI109      2048
SI110      2048
SI111      2048
SI112      2048
SI113      2048
SI114      2048
SI115      2048
SI116      2048
SI117      2048
SI118      2048
SI119      2048
SI120      2048
SI121      2048
SI122      2048
SI123      2048
SI124      2048
SI125      2048
SI126      2048
SI127      2048
SI128      2048
SI129      2048
SI130      2048
SI131      2048
SI132      2048
SI133      2048
SI134      2048
SI135      2048
SI136      2048
SI137      2048
SI138      2048
SI139      2048
SI140      2048
SI141      2048
SI142      2048
SI143      2048
SI144      2048
SI145      2048
SI146      2048
SI147      2048
SI148      2048
SI149      2048
SI150      2048
SI151      2048
SI152      2048
SI153      2048
SI154      2048
SI155      2048
SI156      2048
SI157      2048
SI158      2048
SI159      2048
SI160      2048
SI161      2048
SI162      2048
SI163      2048
SI164      2048
SI165      2048
SI166      2048
SI167      2048
SI168      2048
SI169      2048
SI170      2048
SI171      2048
SI172      2048
SI173      2048
SI174      2048
SI175      2048
SI176      2048
SI177      2048
SI178      2048
SI179      2048
SI180      2048
SI181      2048
SI182      2048
SI183      2048
SI184      2048
SI185      2048
SI186      2048
SI187      2048
SI188      2048
SI189      2048
SI190      2048
SI191      2048
SI192      2048
SI193      2048
SI194      2048
SI195      2048
SI196      2048
SI197      2048
SI198      2048
SI199      2048
SI200      2048
SI201      2048
SI202      2048
SI203      2048
SI204      2048
SI205      2048
SI206      2048
SI207      2048
SI208      2048
SI209      2048
SI210      2048
SI211      2048
SI212      2048
SI213      2048
SI214      2048
SI215      2048
SI216      2048
SI217      2048
SI218      2048
SI219      2048
SI220      2048
SI221      2048
SI222      2048
SI223      2048
SI224      2048
SI225      2048
SI226      2048
SI227      2048
SI228      2048
SI229      2048
SI230      2048
SI231      2048
SI232      2048
SI233      2048
SI234      2048
SI235      2048
SI236      2048
SI237      2048
SI238      2048
SI239      2048
SI240      2048
SI241      2048
SI242      2048
SI243      2048
SI244      2048
SI245      2048
SI246      2048
SI247      2048
SI248      2048
SI249      2048
SI250      2048
SI251      2048
SI252      2048
SI253      2048
SI254      2048
SI255      2048
SI256      2048
SI257      2048
SI258      2048
SI259      2048
SI260      2048
SI261      2048
SI262      2048
SI263      2048
SI264      2048
SI265      2048
SI266      2048
SI267      2048
SI268      2048
SI269      2048
SI270      2048
SI271      2048
SI272      2048
SI273      2048
SI274      2048
SI275      2048
SI276      2048
SI277      2048
SI278      2048
SI279      2048
SI280      2048
SI281      2048
SI282      2048
SI283      2048
SI284      2048
SI285      2048
SI286      2048
SI287      2048
SI288      2048
SI289      2048
SI290      2048
SI291      2048
SI292      2048
SI293      2048
SI294      2048
SI295      2048
SI296      2048
SI297      2048
SI298      2048
SI299      2048
SI300      2048
SI301      2048
SI302      2048
SI303      2048
SI304      2048
SI305      2048
SI306      2048
SI307      2048
SI308      2048
SI309      2048
SI310      2048
SI311      2048
SI312      2048
SI313      2048
SI314      2048
SI315      2048
SI316      2048
SI317      2048
SI318      2048
SI319      2048
SI320      2048
SI321      2048
SI322      2048
SI323      2048
SI324      2048
SI325      2048
SI326      2048
SI327      2048
SI328      2048
SI329      2048
SI330      2048
SI331      2048
SI332      2048
SI333      2048
SI334      2048
SI335      2048
SI336      2048
SI337      2048
SI338      2048
SI339      2048
SI340      2048
SI341      2048
SI342      2048
SI343      2048
SI344      2048
SI345      2048
SI346      2048
SI347      2048
SI348      2048
SI349      2048
SI350      2048
SI351      2048
SI352      2048
SI353      2048
SI354      2048
SI355      2048
SI356      2048
SI357      2048
SI358      2048
SI359      2048
SI360      2048
SI361      2048
SI362      2048
SI363      2048
SI364      2048
SI365      2048
SI366      2048
SI367      2048
SI368      2048
SI369      2048
SI370      2048
SI371      2048
SI372      2048
SI373      2048
SI374      2048
SI375      2048
SI376      2048
SI377      2048
SI378      2048
SI379      2048
SI380      2048
SI381      2048
SI382      2048
SI383      2048
SI384      2048
SI385      2048
SI386      2048
SI387      2048
SI388      2048
SI389      2048
SI390      2048
SI391      2048
SI392      2048
SI393      2048
SI394      2048
SI395      2048
SI396      2048
SI397      2048
SI398      2048
SI399      2048
SI400      2048
SI401      2048
SI402      2048
SI403      2048
SI404      2048
SI405      2048
SI406      2048
SI407      2048
SI408      2048
SI409      2048
SI410      2048
SI411      2048
SI412      2048
SI413      2048
SI414      2048
SI415      2048
SI416      2048
SI417      2048
SI418      2048
SI419      2048
SI420      2048
SI421      2048
SI422      2048
SI423      2048
SI424      2048
SI425      2048
SI426      2048
SI427      2048
SI428      2048
SI429      2048
SI430      2048
SI431      2048
SI432      2048
SI433      2048
SI434      2048
SI435      2048
SI436      2048
SI437      2048
SI438      2048
SI439      2048
SI440      2048
SI441      2048
SI442      2048
SI443      2048
SI444      2048
SI445      2048
SI446      2048
SI447      2048
SI448      2048
SI449      2048
SI450      2048
SI451      2048
SI452      2048
SI453      2048
SI454      2048
SI455      2048
SI456      2048
SI457      2048
SI458      2048
SI459      2048
SI460      2048
SI461      2048
SI462      2048
SI463      2048
SI464      2048
SI465      2048
SI466      2048
SI467      2048
SI468      2048
SI469      2048
SI470      2048
SI471      2048
SI472      2048
SI473      2048
SI474      2048
SI475      2048
SI476      2048
SI477      2048
SI478      2048
SI479      2048
SI480      2048
SI481      2048
SI482      2048
SI483      2048
SI484      2048
SI485      2048
SI486      2048
SI487      2048
SI488      2048
SI489      2048
SI490      2048
SI491      2048
SI492      2048
SI493      2048
SI494      2048
SI495      2048
SI496      2048
SI497      2048
SI498      2048
SI499      2048
SI500      2048
SI501      2048
SI502      2048
SI503      2048
SI504      2048
SI505      2048
SI506      2048
SI507      2048
SI508      2048
SI509      2048
SI510      2048
SI511      2048
SI512      2048
SI513      2048
SI514      2048
SI515      2048
SI516      2048
SI517      2048
SI518      2048
SI519      2048
SI520      2048
SI521      2048
SI522      2048
SI523      2048
SI524      2048
SI525      2048
SI526      2048
SI527      2048
SI528      2048
SI529      2048
SI530      2048
SI531      2048
SI532      2048
SI533      2048
SI534      2048
SI535      2048
SI536      2048
SI537      2048
SI538      2048
SI539      2048
SI540      2048
SI541      2048
SI542      2048
SI543      2048
SI544      2048
SI545      2048
SI546      2048
SI547      2048
SI548      2048
SI549      2048
SI550      2048
SI551      2048
SI552      2048
SI553      2048
SI554      2048
SI555      2048
SI556      2048
SI557      2048
SI558      2048
SI559      2048
SI560      2048
SI561      2048
SI562      2048
SI563      2048
SI564      2048
SI565      2048
SI566      2048
SI567      2048
SI568      2048
SI569      2048
SI570      2048
SI571      2048
SI572      2048
SI573      2048
SI574      2048
SI575      2048
SI576      2048
SI577      2048
SI578      2048
SI579      2048
SI580      2048
SI581      2048
SI582      2048
SI583      2048
SI584      2048
SI585      2048
SI586      2048
SI587      2048
SI588      2048
SI589      2048
SI590      2048
SI591      2048
SI592      2048
SI593      2048
SI594      2048
SI595      2048
SI596      2048
SI597      2048
SI598      2048
SI599      2048
SI600      2048
SI601      2048
SI602      2048
SI603      2048
SI604      2048
SI605      2048
SI606      2048
SI607      2048
SI608      2048
SI609      2048
SI610      2048
SI611      2048
SI612      2048
SI613      2048
SI614      2048
SI615      2048
SI616      2048
SI617      2048
SI618      2048
SI619      2048
SI620      2048
SI621      2048
SI622      2048
SI623      2048
SI624      2048
SI625      2048
SI626      2048
SI627      2048
SI628      2048
SI629      2048
SI630      2048
SI631      2048
SI632      2048
SI633      2048
SI634      2048
SI635      2048
SI636      2048
SI637      2048
SI638      2048
SI639      2048
SI640      2048
SI641      2048
SI642      2048
SI643      2048
SI644      2048
SI645      2048
SI646      2048
SI647      2048
SI648      2048
SI649      2048
SI650      2048
SI651      2048
SI652      2048
SI653      2048
SI654      2048
SI655      2048
SI656      2048
SI657      2048
SI658      2048
SI659      2048
SI660      2048
SI661      2048
SI662      2048
SI663      2048
SI664      2048
SI665      2048
SI666      2048
SI667      2048
SI668      2048
SI669      2048
SI670      2048
SI671      2048
SI672      2048
SI673      2048
SI674      2048
SI675      2048
SI676      2048
SI677      2048
SI678      2048
SI679      2048
SI680      2048
SI681      2048
SI682      2048
SI683      2048
SI684      2048
SI685      2048
SI686      2048
SI687      2048
SI688      2048
SI689      2048
SI690      2048
SI691      2048
SI692      2048
SI693      2048
SI694      2048
SI695      2048
SI696      2048
SI697      2048
SI698      2048
SI699      2048
SI700      2048
SI701      2048
SI702      2048
SI703      2048
SI704      2048
SI705      2048
SI706      2048
SI707      2048
SI708      2048
SI709      2048
SI710      2048
SI711      2048
SI712      2048
SI713      2048
SI714      2048
SI715      2048
SI716      2048
SI717      2048
SI718      2048
SI719      2048
SI720      2048
SI721      2048
SI722      2048
SI723      2048
SI724      2048
SI725      2048
SI726      2048
SI727      2048
SI728      2048
SI729      2048
SI730      2048
SI731      2048
SI732      2048
SI733      2048
SI734      2048
SI735      2048
SI736      2048
SI737      2048
SI738      2048
SI739      2048
SI740      2048
SI741      2048
SI742      2048
SI743      2048
SI744      2048
SI745      2048
SI746      2048
SI747      2048
SI748      2048
SI749      2048
SI750      2048
SI751      2048
SI752      2048
SI753      2048
SI754      2048
SI755      2048
SI756      2048
SI757      2048
SI758      2048
SI759      2048
SI760      2048
SI761      2048
SI762      2048
SI763      2048
SI764      2048
SI765      2048
SI766      2048
SI767      2048
SI768      2048
SI769      2048
SI770      2048
SI771      2048
SI772      2048
SI773      2048
SI774      2048
SI775      2048
SI776      2048
SI777      2048
SI778      2048
SI779      2048
SI780      2048
SI781      2048
SI782      2048
SI783      2048
SI784      2048
SI785      2048
SI786      2048
SI787      2048
SI788      2048
SI789      2048
SI790      2048
SI791      2048
SI792      2048
SI793      2048
SI794      2048
SI795      2048
SI796      2048
SI797      2048
SI798      2048
SI799      2048
SI800      2048
SI801      2048
SI802      2048
SI803      2048
SI804      2048
SI805      2048
SI806      2048
SI807      2048
SI808      2048
SI809      2048
SI810      2048
SI811      2048
SI812      2048
SI813      2048
SI814      2048
SI815      2048
SI816      2048
SI817      2048
SI818      2048
SI819      2048
SI820      2048
SI821      2048
SI822      2048
SI823      2048
SI824      2048
SI825      2048
SI826      2048
SI827      2048
SI828      2048
SI829      2048
SI830      2048
SI831      2048
SI832      2048
SI833      2048
SI834      2048
SI835      2048
SI836      2048
SI837      2048
SI838      2048
SI839      2048
SI840      2048
SI841      2048
SI842      2048
SI843      2048
SI844      2048
SI845      2048
SI846      2048
SI847      2048
SI848      2048
SI849      2048
SI850      2048
SI851      2048
SI852      2048
SI853      2048
SI854      2048
SI855      2048
SI856      2048
SI857      2048
SI858      2048
SI859      2048
SI860      2048
SI861      2048
SI862      2048
SI863      2048
SI864      2048
SI865      2048
SI866      2048
SI867      2048
SI868      2048
SI869      2048
SI870      2048
SI871      2048
SI872      2048
SI873      2048
SI874      2048
SI875      2048
SI876      2048
SI877      2048
SI878      2048
SI879      2048
SI880      2048
SI881      2048
SI882      2048
SI883      2048
SI884      2048
SI885      2048
SI886      2048
SI887      2048
SI888      2048
SI889      2048
SI890      2048
SI891      2048
SI892      2048
SI893      2048
SI894      2048
SI895      2048
SI896      2048
SI897      2048
SI898      2048
SI899      2048
SI900      2048
SI901      2048
SI902      2048
SI903      2048
SI904      2048
SI905      2048
SI906      2048
SI907      2048
SI908      2048
SI909      2048
SI910      2048
SI911      2048
SI912      2048
SI913      2048
SI914      2048
SI915      2048
SI916      2048
SI917      2048
SI918      2048
SI919      2048
SI920      2048
SI921      2048
SI922      2048
SI923      2048
SI924      2048
SI925      2048
SI926      2048
SI927      2048
SI928      2048
SI929      2048
SI930      2048
SI931      2048
SI932      2048
SI933      2048
SI934      2048
SI935      2048
SI936      2048
SI937      2048
SI938      2048
SI939      2048
SI940      2048
SI941      2048
SI942      2048
SI943      2048
SI944      2048
SI945      2048
SI946      2048
SI947      2048
SI948      2048
SI949      2048
SI950      2048
SI951      2048
SI952      2048
SI953      2048
SI954      2048
SI955      2048
SI956      2048
SI957      2048
SI958      2048
SI959      2048
SI960      2048
SI961      2048
SI962      2048
SI963      2048
SI964      2048
SI965      2048
SI966      2048
SI967      2048
SI968      2048
SI969      2048
SI970      2048
SI971      2048
SI972      2048
SI973      2048
SI974      2048
SI975      2048
SI976      2048
SI977      2048
SI978      2048
SI979      2048
SI980      2048
SI981      2048
SI982      2048
SI983      2048
SI984      2048
SI985      2048
SI986      2048
SI987      2048
SI988      2048
SI989      2048
SI990      2048
SI991      2048
SI992      2048
SI993      2048
SI994      2048
SI995      2048
SI996      2048
SI997      2048
SI998      2048
SI999      2048
SI1000     2048

```

LCA 55-4 / CDCL3 / 298K / HMBC 70ms



```

Current Data Parameters
NAME      alim44428
EXPNO    1
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20080814
Time      17.59
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm BBI 1H-13
PULPROG   zgpg30
PC        2048
SOLVENT   CDCL3
NS        18
DS        4
AQ        1121.000 Hz
F1FREQ    1.512479 MHz
NUC1      13
NUC2      1H
DE        6.50 usec
TE        298.15 K
TD        65536
SF        400.1464000 MHz
DQ        0.0021000 usec
DE        0.0021000 usec
DI        0.0021000 usec
DIL1      0.0021000 usec
DIL2      0.0021000 usec
DIL3      0.0021000 usec
DIL4      0.0021000 usec
DIL5      0.0021000 usec

----- CHANNEL f1 -----
NUC1      13C
P1        13.00 usec
PC        18.79 usec
SFO1      101.625385 MHz

----- CHANNEL f2 -----
NUC2      1H
P2        13.25 usec
SFO2      400.1464000 MHz

----- CHANNEL CHANNEL -----
CPDPRG2   alim_208
CPDPRG1   alim_200
CHPROG    alim_143
GPH1      0.00 Hz
GPH2      0.00 Hz
GPH3      0.00 Hz
GPT1      0.00 Hz
GPT2      0.00 Hz
GPT3      0.00 Hz
GPT4      58.26 Hz
GPT5      58.26 Hz
GPT6      48.24 Hz
GPT7      1800.00 usec

F1 - Acquisition Parameters
NUC1      13C
PC        18.79 usec
SFO1      101.625385 MHz
PULPROG   zgpg30
PC        2048
SOLVENT   CDCL3

F2 - Processing parameters
SI        2048
SF        400.1464000 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB        0.00 Hz
GB        0
PC        18.79

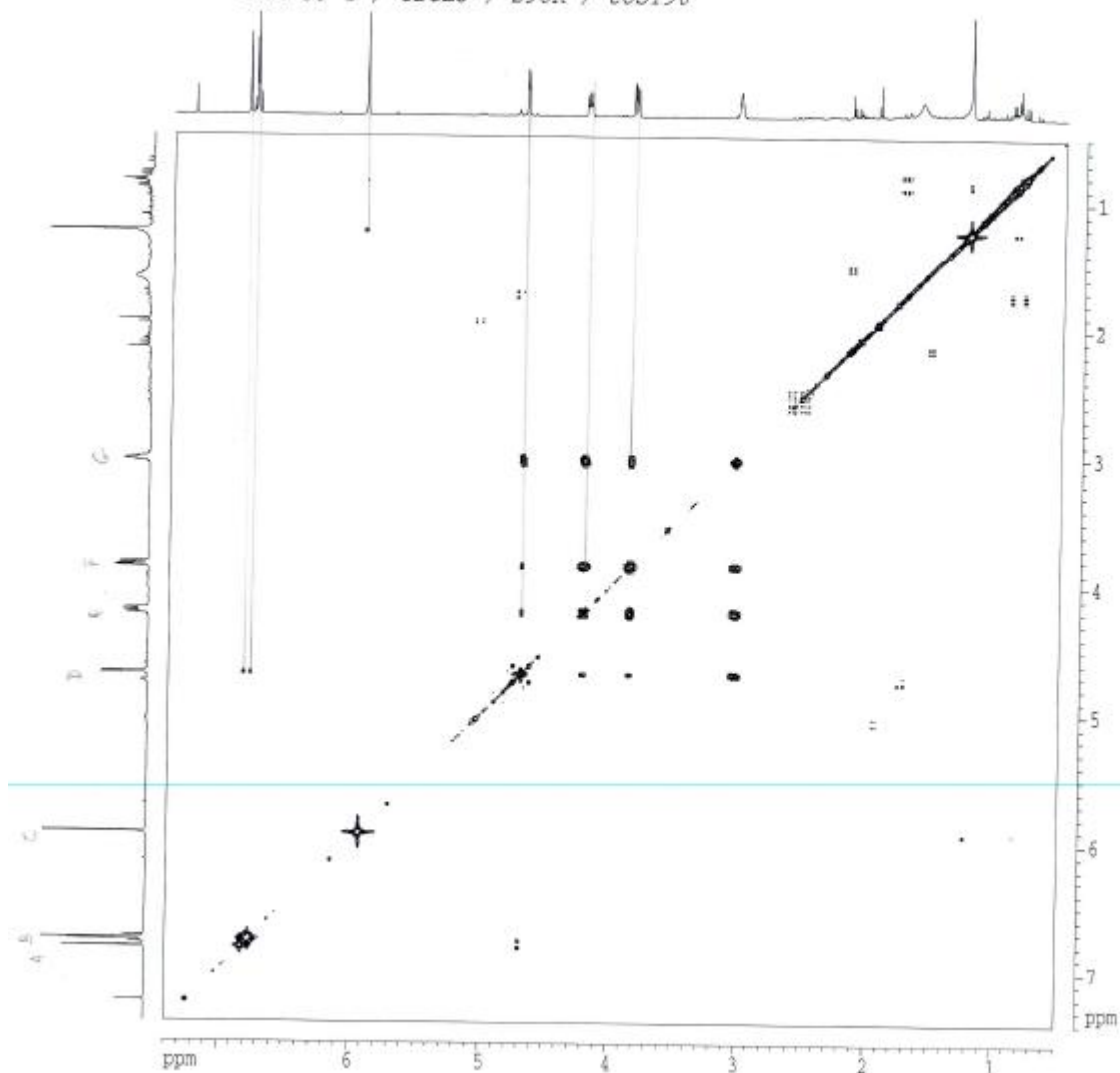
F1 - Processing parameters
SI        1024
SF        101.625385 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB        0.00 Hz
GB        0
PC        18.79

2D NMR plot parameters
CZ1      20.00 usec
CZ2      20.00 usec
PC1PR1   7.000 usec
PC1PR2   20.00 usec
PC1PR3   20.00 usec
PC1PR4   5.000 usec
PC1PR5   20.00 usec
PC1PR6   20.00 usec
PC1PR7   20.00 usec
PC1PR8   20.00 usec
PC1PR9   20.00 usec
PC1PR10  20.00 usec
PC1PR11  20.00 usec
PC1PR12  20.00 usec
PC1PR13  20.00 usec
PC1PR14  20.00 usec
PC1PR15  20.00 usec
PC1PR16  20.00 usec
PC1PR17  20.00 usec
PC1PR18  20.00 usec
PC1PR19  20.00 usec
PC1PR20  20.00 usec
PC1PR21  20.00 usec
PC1PR22  20.00 usec
PC1PR23  20.00 usec
PC1PR24  20.00 usec
PC1PR25  20.00 usec
PC1PR26  20.00 usec
PC1PR27  20.00 usec
PC1PR28  20.00 usec
PC1PR29  20.00 usec
PC1PR30  20.00 usec
PC1PR31  20.00 usec
PC1PR32  20.00 usec
PC1PR33  20.00 usec
PC1PR34  20.00 usec
PC1PR35  20.00 usec
PC1PR36  20.00 usec
PC1PR37  20.00 usec
PC1PR38  20.00 usec
PC1PR39  20.00 usec
PC1PR40  20.00 usec
PC1PR41  20.00 usec
PC1PR42  20.00 usec
PC1PR43  20.00 usec
PC1PR44  20.00 usec
PC1PR45  20.00 usec
PC1PR46  20.00 usec
PC1PR47  20.00 usec
PC1PR48  20.00 usec
PC1PR49  20.00 usec
PC1PR50  20.00 usec
PC1PR51  20.00 usec
PC1PR52  20.00 usec
PC1PR53  20.00 usec
PC1PR54  20.00 usec
PC1PR55  20.00 usec
PC1PR56  20.00 usec
PC1PR57  20.00 usec
PC1PR58  20.00 usec
PC1PR59  20.00 usec
PC1PR60  20.00 usec
PC1PR61  20.00 usec
PC1PR62  20.00 usec
PC1PR63  20.00 usec
PC1PR64  20.00 usec
PC1PR65  20.00 usec
PC1PR66  20.00 usec
PC1PR67  20.00 usec
PC1PR68  20.00 usec
PC1PR69  20.00 usec
PC1PR70  20.00 usec
PC1PR71  20.00 usec
PC1PR72  20.00 usec
PC1PR73  20.00 usec
PC1PR74  20.00 usec
PC1PR75  20.00 usec
PC1PR76  20.00 usec
PC1PR77  20.00 usec
PC1PR78  20.00 usec
PC1PR79  20.00 usec
PC1PR80  20.00 usec
PC1PR81  20.00 usec
PC1PR82  20.00 usec
PC1PR83  20.00 usec
PC1PR84  20.00 usec
PC1PR85  20.00 usec
PC1PR86  20.00 usec
PC1PR87  20.00 usec
PC1PR88  20.00 usec
PC1PR89  20.00 usec
PC1PR90  20.00 usec
PC1PR91  20.00 usec
PC1PR92  20.00 usec
PC1PR93  20.00 usec
PC1PR94  20.00 usec
PC1PR95  20.00 usec
PC1PR96  20.00 usec
PC1PR97  20.00 usec
PC1PR98  20.00 usec
PC1PR99  20.00 usec
PC1PR100 20.00 usec

```



LCA 55-4 / CDCL3 / 298K / COSY90



```

Current Data Parameters
NAME      alca041688
EXPNO    1
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20080904
Time     9.14
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm BBI 1H-90
PULPROG  zgpg30
TD        65536
SOLVENT  DMS-d6
NS        4
DS        16
SWH       1115.500 Hz
FIDRES    0.526879 Hz
AQ        0.327909 sec
RG         256
DM        190.000 mmsec
DE        8.19 mmsec
DC        298.0 K
RO        0.0000000 sec
SI        1.0000000 sec
SFO       400.1460000 MHz
SF        400.1460000 MHz
WDW       EM
SSB       0
GB        0
PC        1.00

===== CHANNEL f1 =====
NUC1      13C
PC        9.25 mmsec
PI        9.25 mmsec
PL        0.00 dB
SFO1      101.625300 MHz

===== CHANNEL CHANNEL =====
CPDPRG1   zmc100
CPDPRG2   zmc100
NUC2      13C
PC        0.40 mmsec
PI        0.40 mmsec
PL        0.00 dB
SFO2      101.625300 MHz
SFO12     101.625300 MHz
WDW1      EM
SSB1      0
GB1       0
PC1       1.00

F1 - Acquisition Parameters
EXPNO    1
PROCNO   1
PROBHD   5 mm BBI 1H-90
PULPROG  zgpg30
TD        65536
SOLVENT  DMS-d6
NS        4
DS        16
SWH       1115.500 Hz
FIDRES    0.526879 Hz
AQ        0.327909 sec
RG         256
DM        190.000 mmsec
DE        8.19 mmsec
DC        298.0 K
RO        0.0000000 sec
SI        1.0000000 sec
SFO       400.1460000 MHz
SF        400.1460000 MHz
WDW       EM
SSB       0
GB        0
PC        1.00

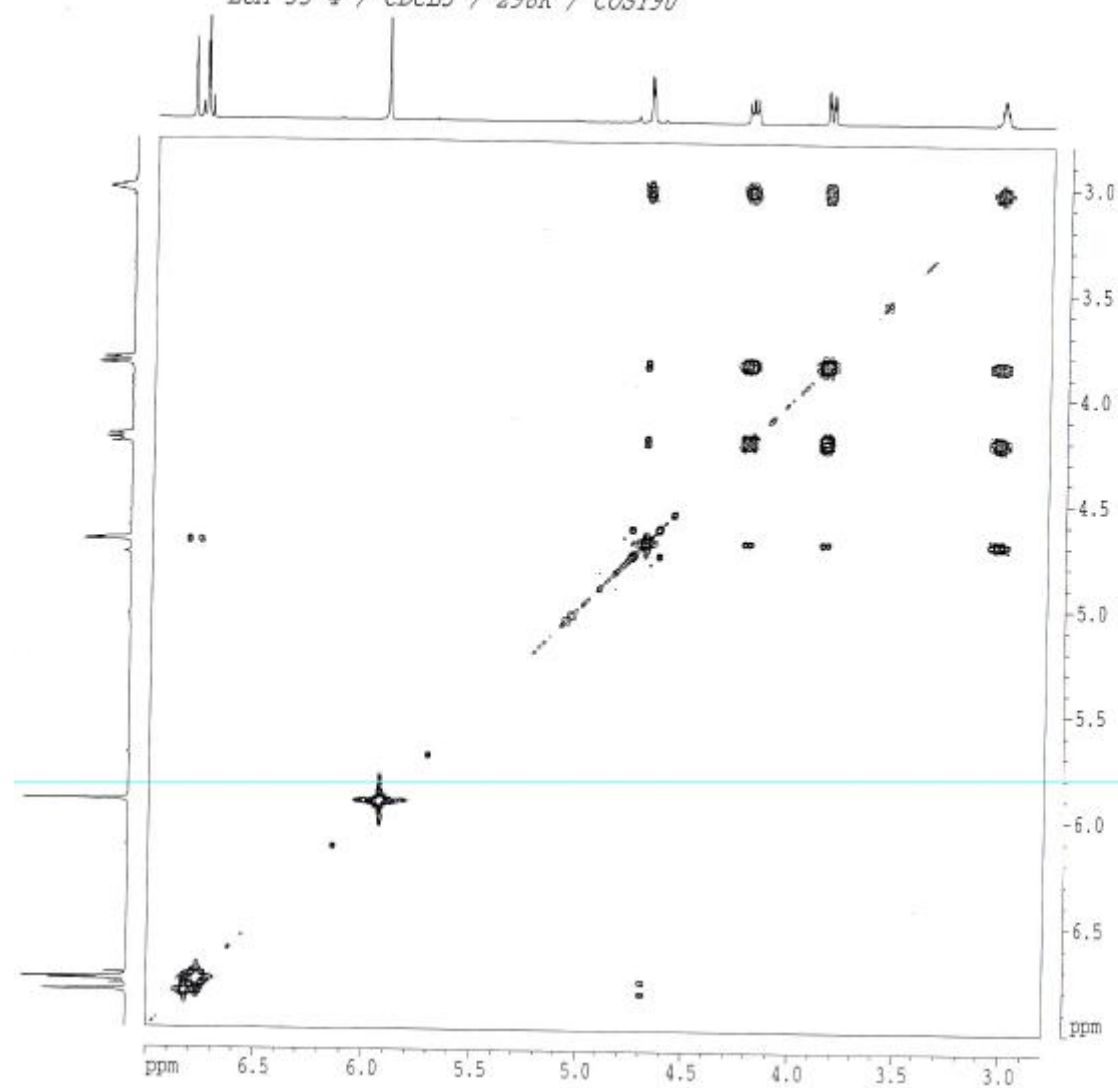
F2 - Processing parameters
SI        32768
SF        400.1460000 MHz
SFO1      101.625300 MHz
SFO2      101.625300 MHz
WDW1      EM
SSB1      0
GB1       0
PC1       1.00

F1 - Processing parameters
SI        131072
SF        400.1460000 MHz
SFO1      101.625300 MHz
SFO2      101.625300 MHz
WDW1      EM
SSB1      0
GB1       0
PC1       1.00

13 NMR plot parameters
F1       101.625300 MHz
F2       400.1460000 MHz
F2F1LO   7.480 ppm
F2F1HI   2961.96 Hz
F2F1F0   0.500 ppm
F2A1     180.00 Hz
F2FL0F  7.401 ppm
F2FL1A   2961.41 Hz
F2FL1F   0.409 ppm
F2FL1S   199.57 Hz
F2FL1SC  0.11544 ppm/cm
F2FL1SCX 125.48532 Hz/cm
F2FL1SCY 0.11374 ppm/cm
F2FL1SCZ 125.53623 Hz/cm

```

LCA 55-4 / CDCL3 / 298K / COSY90



```

Current Data Parameters
NAME      abn010008
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
DATE_    19980814
TIME     9.34
PROBHD   5 mm BBI 1H-13
PULPROG  zgpg30
TD        32768
SOLVENT  CDCL3
NS        6
DS        2
SWH       1221.000 Hz
FIDRES    1.515479 Hz
AQ        0.3278900 sec
RG         256
SR        149.100 cps
SC         4.52 kHz
TE        298.2 K
DE        0.3000000 sec
TE2       1.5000000 sec
DQ1       0.0000000 sec
DQ2       0.0000000 sec
DQ3       0.0000000 sec
DQ4       0.0000000 sec
DQ5       0.0000000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1      13
P1        9.15 usec
PL1       0.15 dB
PL12      3.10 dB
SFO1      400.111793 MHz

===== CHANNEL CHANNEL =====
GRAM1     sine,130
GRAM2     sine,130
GPH1      0.00 Hz
GPH2      0.00 Hz
GPH3      0.00 Hz
GPH4      0.00 Hz
GPH5      0.00 Hz
GPH6      0.00 Hz
GPH7      0.00 Hz
GPH8      0.00 Hz
GPH9      0.00 Hz
GPH10     0.00 Hz
GPH11     0.00 Hz
GPH12     0.00 Hz
GPH13     0.00 Hz
GPH14     0.00 Hz

F1 - Acquisition parameters
NUC1      1
TD         65536
SFO1      400.111793 MHz
FIDRES    6.310116 Hz
SR        7.812 cps
PULPROG   zgpg30

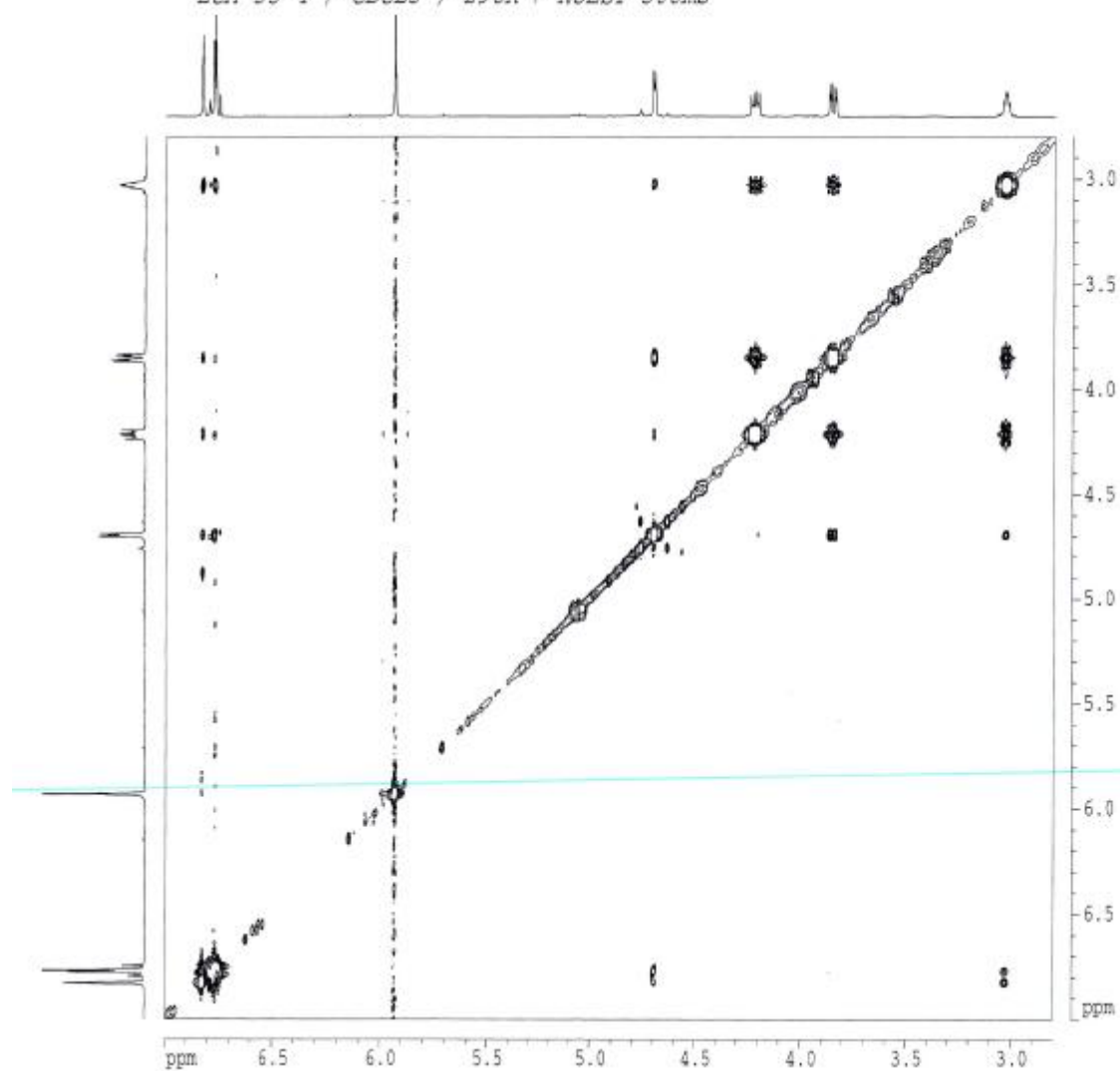
F1 - Processing parameters
SI         32768
SF         400.111793 MHz
WDW        EM
SSB         0
GB          0.00 Hz
GC          1.00
PC          1.00

F1 - Processing parameters
SI         32768
SF         400.111793 MHz
WDW        EM
SSB         0
GB          0.00 Hz
GC          1.00

20 MHz 13C NMR parameters
CZ1        22.00 cm
CZ2        22.00 cm
F2FREQ     7.800 ppm
F2CZ1      2000.31 Hz
F2CZ2      2.580 ppm
F2CZ3      1139.31 Hz
F2F2A1     7.000 ppm
F2F2A2     2000.31 Hz
F2F2A3     2.600 ppm
F2F2A4     1120.50 Hz
F2F2M1     0.10001 ppm/cm
F2F2M2     70.18145 Hz/cm
F2F2M3     0.14001 ppm/cm
F2F2M4     70.18845 Hz/cm

```

LCA 55-4 / CDCL3 / 298K / NOESY 500ms

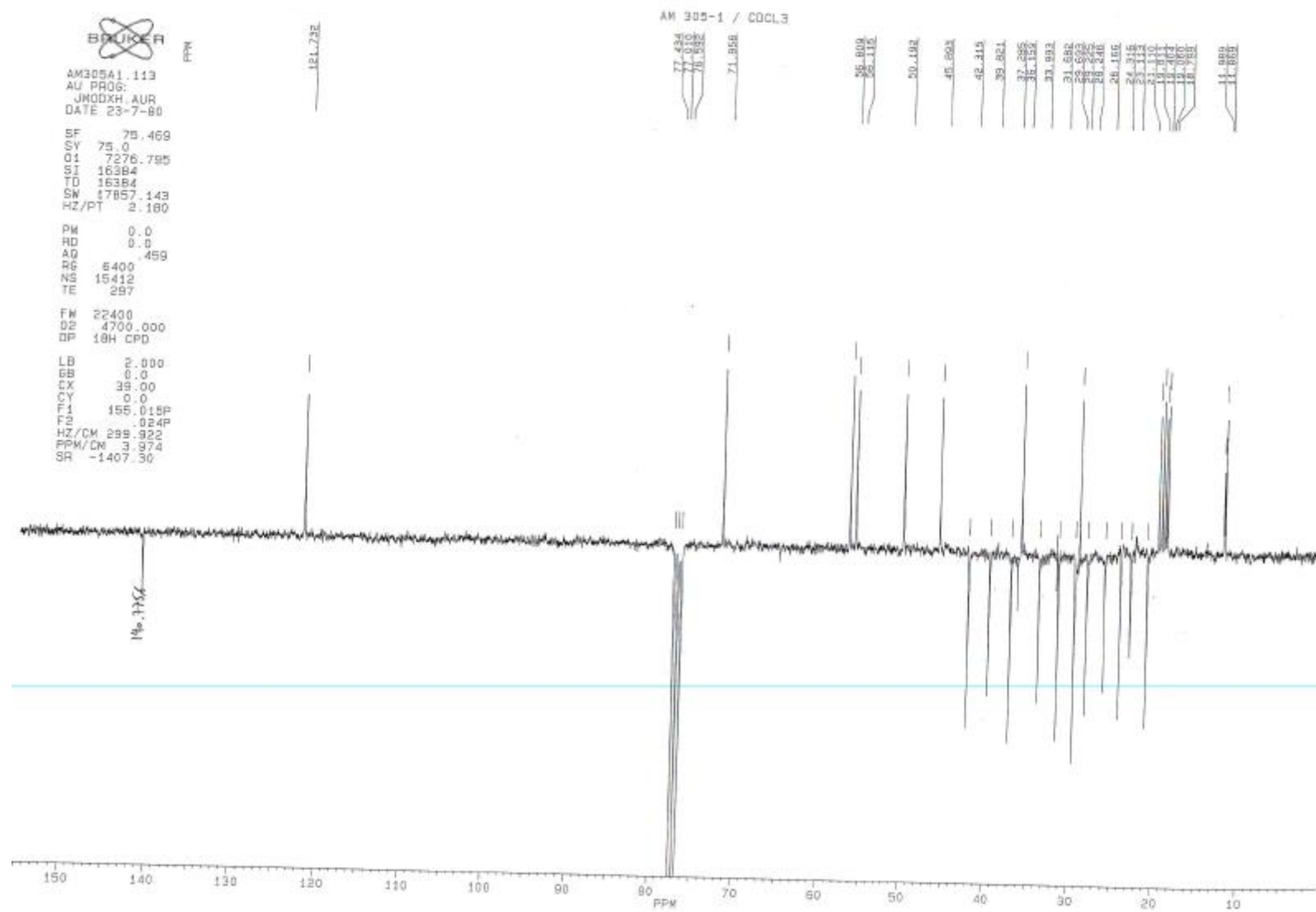


```

Current Data Parameters
NAME: 00000000
EXPNO: 1
PROCNO: 1
F2 - Acquisition Parameters
Date_: 19990804
Time: 11.24
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm BBI 1H-5Q
PULPROG: zgpg30
TD: 65536
SOLVENT: CDCl3
NS: 20
DS: 4
AQ: 3125.000 Hz
RG: 3.527890 Hz
AQ: 1.327890 sec
RG: 250
DS: 160.000
DE: 6.50 MHz
TE: 298.2 K
DQ: 0.800000 sec
C1: 1.500000 sec
DE: 0.500000 sec
d11: 0.800000 sec
d12: 0.100000 sec
d13: 0.800000 sec
----- CHANNEL f1 -----
NUC1: 13
P1: 8.50 MHz
P2: 22.70 MHz
PC1: 5.00
SFO1: 400.142680 MHz
----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2: sfg
NUC2: 13
P2: 101.626126 MHz
SFO2: 101.626126 MHz
P3: 101.626126 MHz
SFO3: 101.626126 MHz
F1 - Acquisition Parameters
EXPNO: 2
PROCNO: 1
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm BBI 1H-5Q
PULPROG: zgpg30
TD: 65536
SOLVENT: CDCl3
NS: 20
DS: 4
AQ: 3125.000 Hz
RG: 3.527890 Hz
AQ: 1.327890 sec
RG: 250
DS: 160.000
DE: 6.50 MHz
TE: 298.2 K
DQ: 0.800000 sec
C1: 1.500000 sec
DE: 0.500000 sec
d11: 0.800000 sec
d12: 0.100000 sec
d13: 0.800000 sec
----- CHANNEL f1 -----
NUC1: 13
P1: 8.50 MHz
P2: 22.70 MHz
PC1: 5.00
SFO1: 400.142680 MHz
----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2: sfg
NUC2: 13
P2: 101.626126 MHz
SFO2: 101.626126 MHz
P3: 101.626126 MHz
SFO3: 101.626126 MHz
F2 - Processing parameters
SI: 32768
SF: 400.142680 MHz
WDW: EM
SSB: 0
LB: 0.00 Hz
GB: 0
PC: 1.00
F1 - Processing parameters
SI: 32768
SF: 101.626126 MHz
WDW: EM
SSB: 0
LB: 0.00 Hz
GB: 0
PC: 1.00
2D NMR list parameters
C13: 22.84 cm
C13: 22.89 cm
F2P1: 7.000 ppm
F2L1: 202.81 Hz
F2S1: 2.050 ppm
F2T1: 1122.34 Hz
F1F1: 7.000 ppm
F1L1: 202.81 Hz
F1S1: 2.050 ppm
F1T1: 1122.34 Hz
F2F2: 0.13001 ppm/cm
F2S2: 15.18040 Hz/cm
F1F2: 0.13001 ppm/cm
F1S2: 15.18040 Hz/cm

```

## **Anexo 3: Espectros RMN de LC-3**



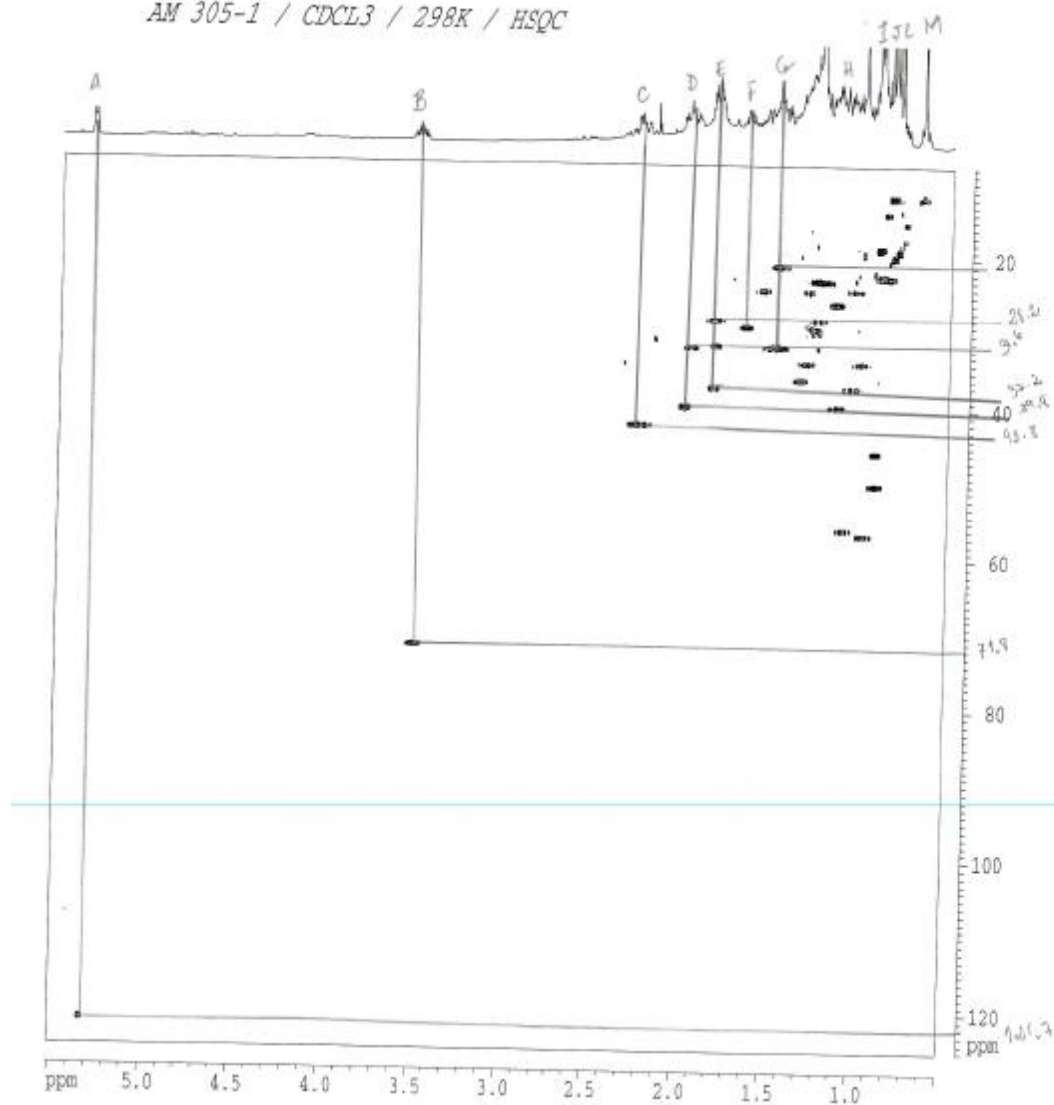








AM 305-1 / CDCL3 / 298K / HSQC

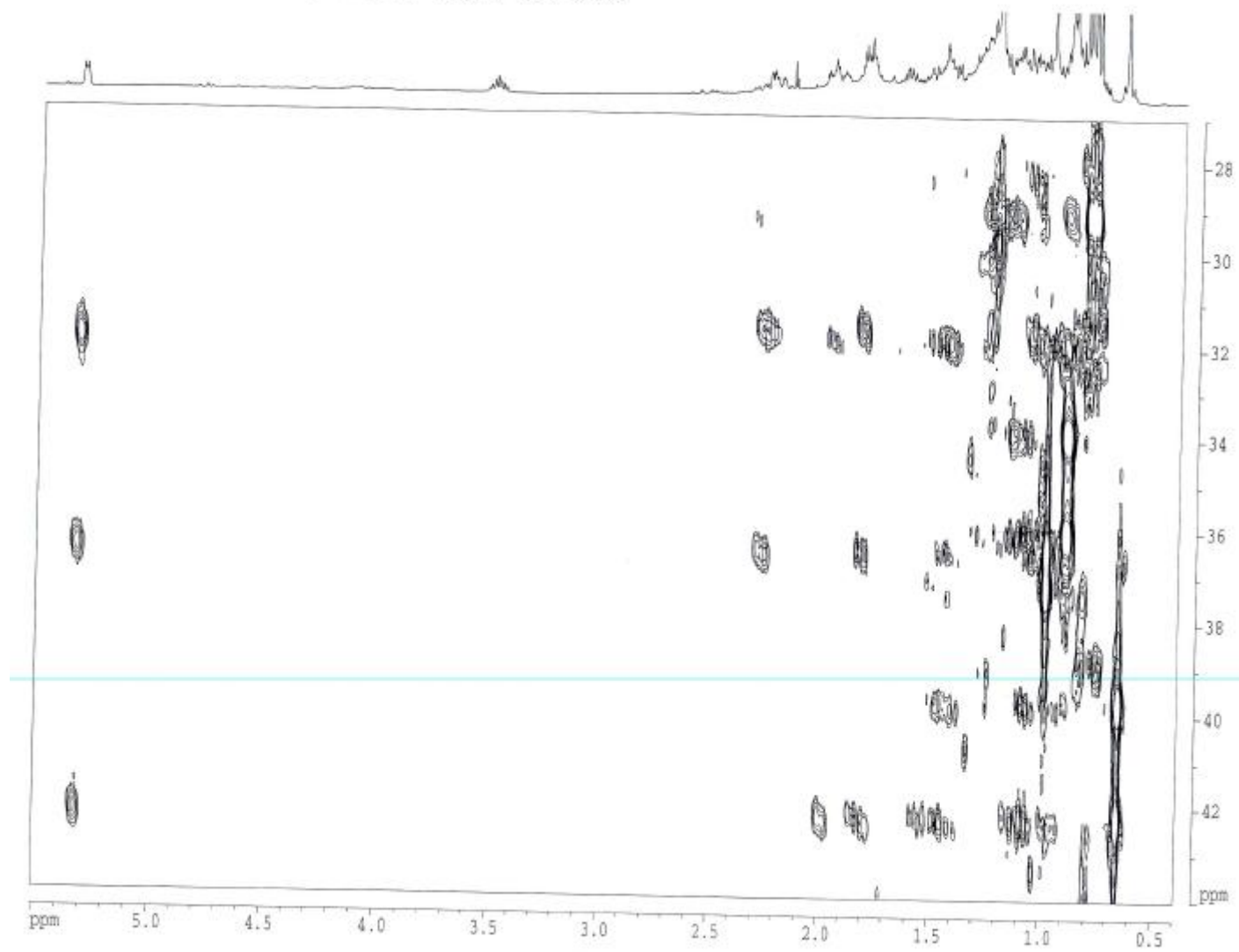


```

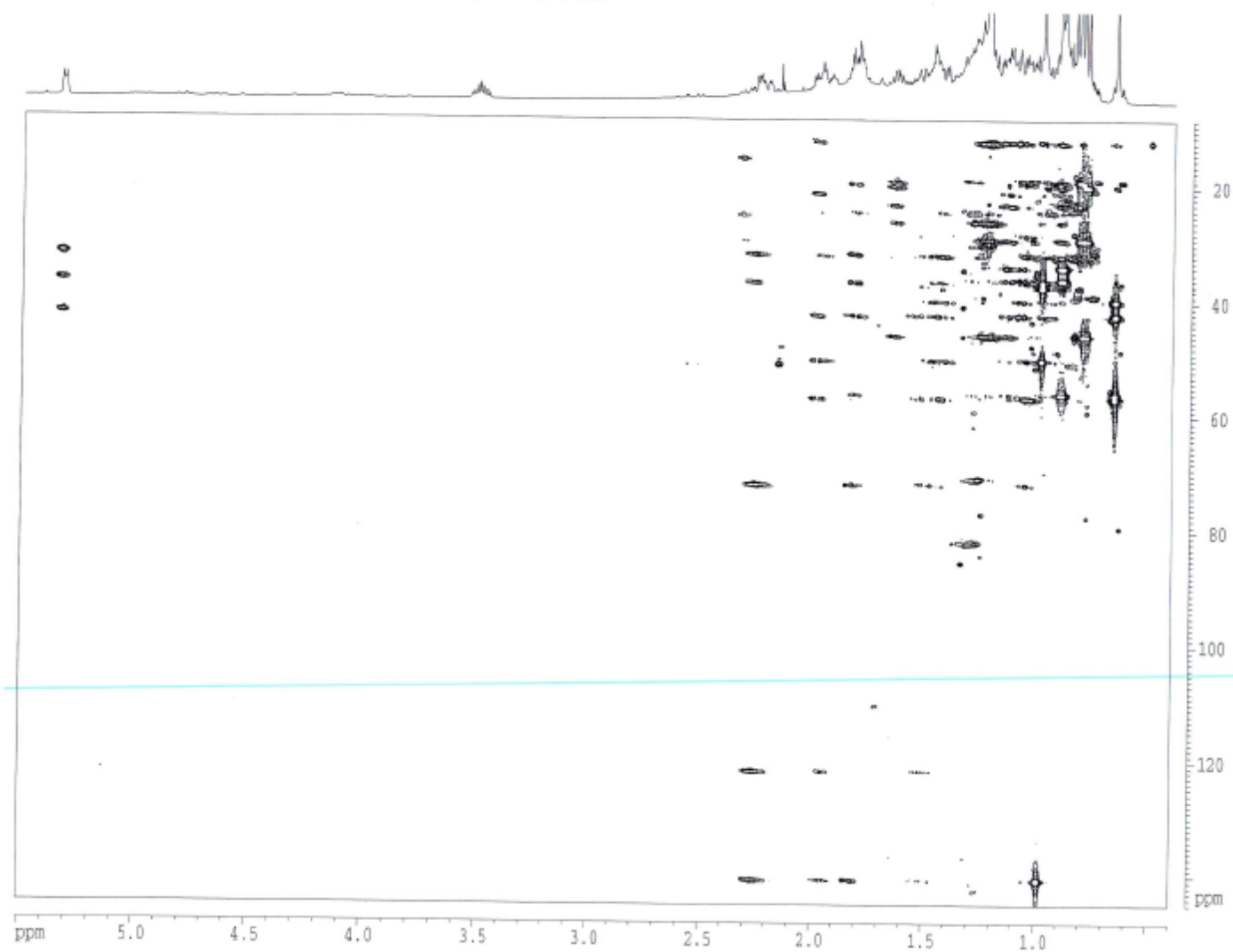
Current Data Parameters
NAME      am305078
PROCNO    1
PROBHD    5
----- Acquisition Parameters -----
Date_     20081111
Time      8.24
INSTRUM   spect
PULPROG   zgpg30
TD         65536
SOLVENT   CDCl3
NS         2048
DS         4
SWH        240.846 MHz
FIDRES     0.217761 Hz
AQ         0.002502 sec
RG         348.00
AQ         288.000 usec
DE         6.50 usec
TE         298.2 K
D1         0.0000000 sec
d11        0.0000000 sec
d12        0.0000000 sec
d13        0.0000000 sec
d14        0.0000000 sec
d15        0.0000000 sec
d16        0.0000000 sec
d17        0.0000000 sec
d18        0.0000000 sec
d19        0.0000000 sec
----- CHANNEL f1 -----
NUC1       13
P1         0.22 usec
PL1        0.00 dB
PC1        1.00 dB
SFO1      101.62539 MHz
----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2    zgpg30
NUC2       13C
P2         12.00 usec
PL2        0.00 dB
PC2        0.00 dB
SFO2      125.76118 MHz
----- CHANNEL f3 -----
CPDPRG3    zgpg30
NAME3      am305078
PROCNO3    1
PROBHD3    5
SOLVENT3   CDCl3
NS3         2048
DS3         4
SWH3        240.846 MHz
FIDRES3     0.217761 Hz
AQ3         0.002502 sec
RG3         348.00
AQ3         288.000 usec
DE3         6.50 usec
TE3         298.2 K
D13        0.0000000 sec
d131       0.0000000 sec
d132       0.0000000 sec
d133       0.0000000 sec
d134       0.0000000 sec
d135       0.0000000 sec
d136       0.0000000 sec
d137       0.0000000 sec
d138       0.0000000 sec
d139       0.0000000 sec
----- Acquisition parameters -----
SI         32768
SF         300.6350 MHz
NUC1PROB   13C
NUC2PROB   13C
NUC3PROB   13C
P1         0.22 usec
PL1        0.00 dB
PC1        1.00 dB
SFO1       101.62539 MHz
----- Processing parameters -----
SI         32768
SF         300.635000 MHz
WDW         EM
SSB         0
GB          0
PC          1.00
----- Processing parameters -----
SI         32768
SF         125.761180 MHz
WDW         EM
SSB         0
GB          0
PC          1.00
----- 2D 13C parameters -----
CQ         22.00 usec
CFL        22.00 usec
F2F2P3     5.495 ppm
F2F2P2     2180.17 Hz
F2F2P1     5.455 ppm
F2F2P0     198.00 Hz
F1F1P3     121.258 ppm
F1F1P2     120.781 Hz
F1F1P1     1.021 ppm
F1F1P0     91.21 Hz
F2F2P3CH2  3.22774 ppm/cm
F2F2P2CH2  81.2340 Hz/cm
F2F2P1CH2  3.33333 ppm/cm
F2F2P0CH2  530.5007 Hz/cm

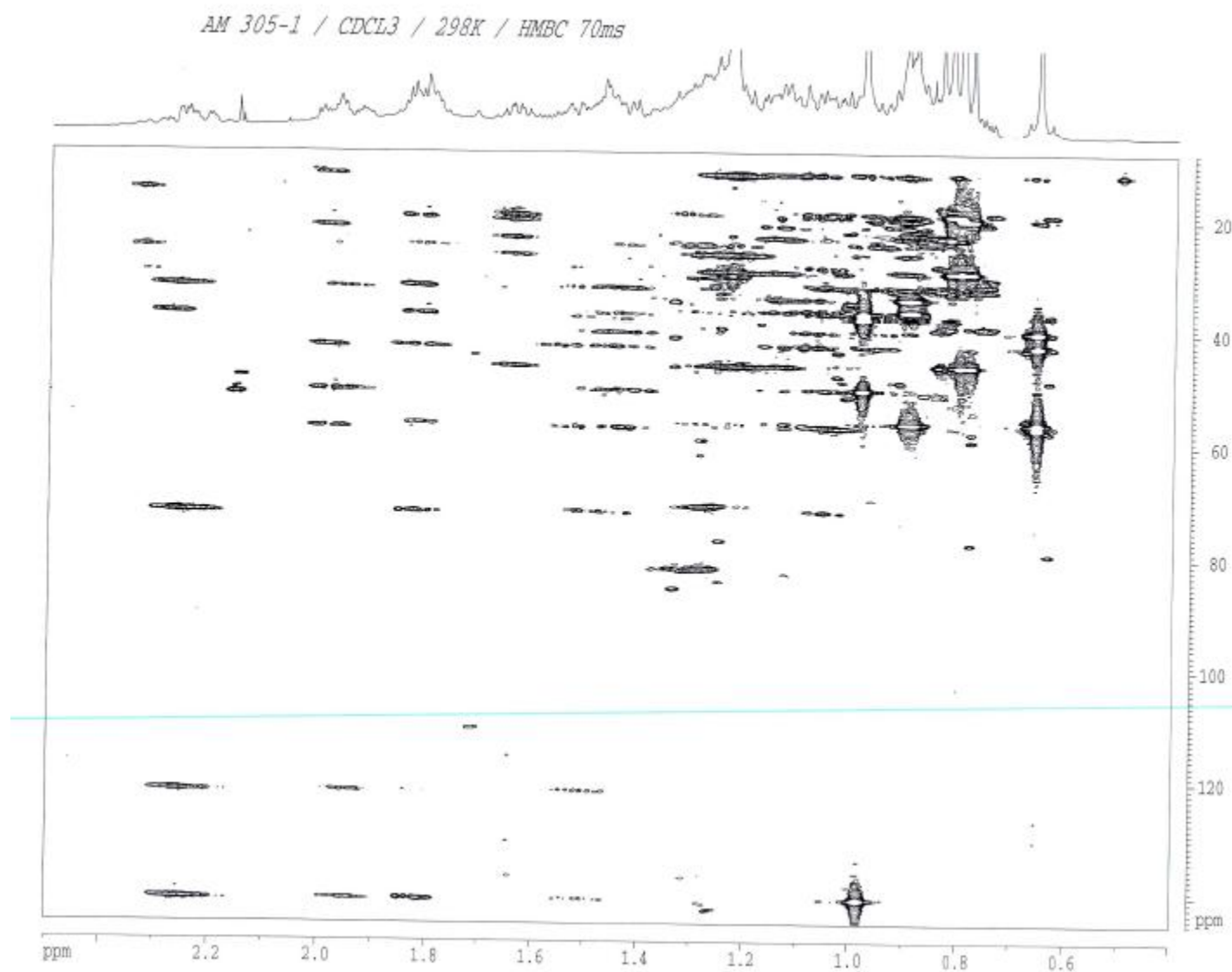
```

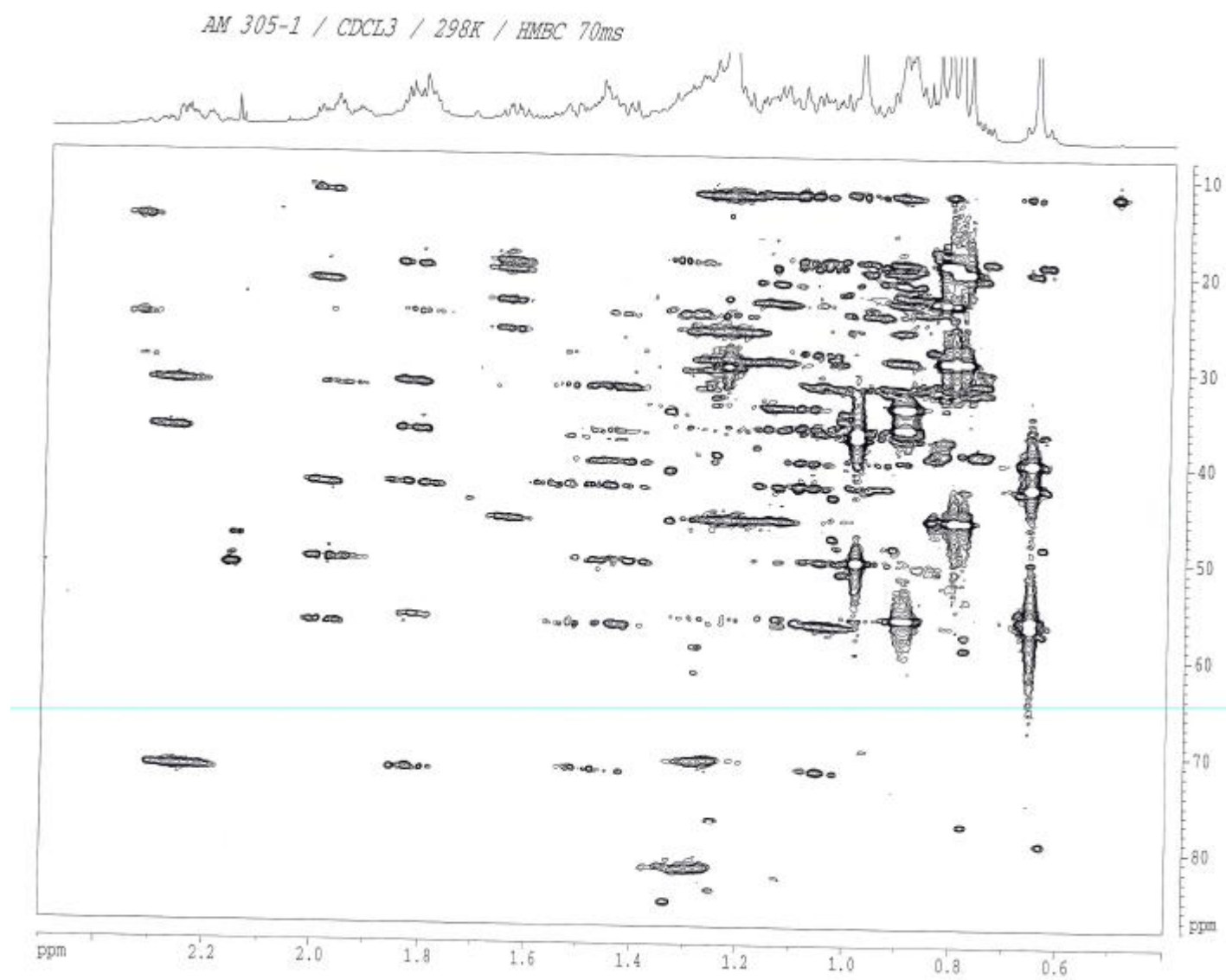
AM 305-1 / CDCL3 / 298K / HMBC 70ms



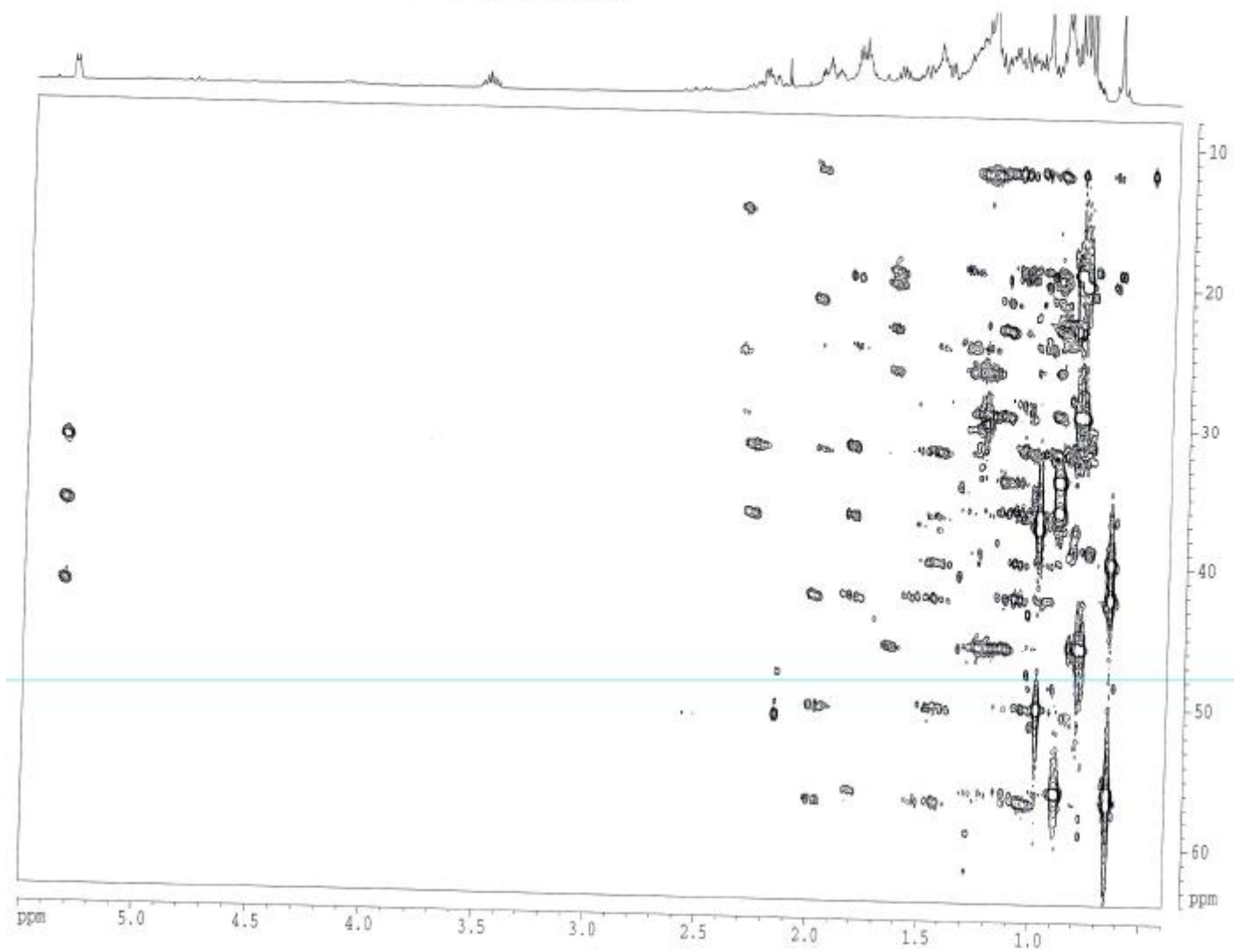
AM 305-1 / CDCL3 / 298K / HMBC 70ms





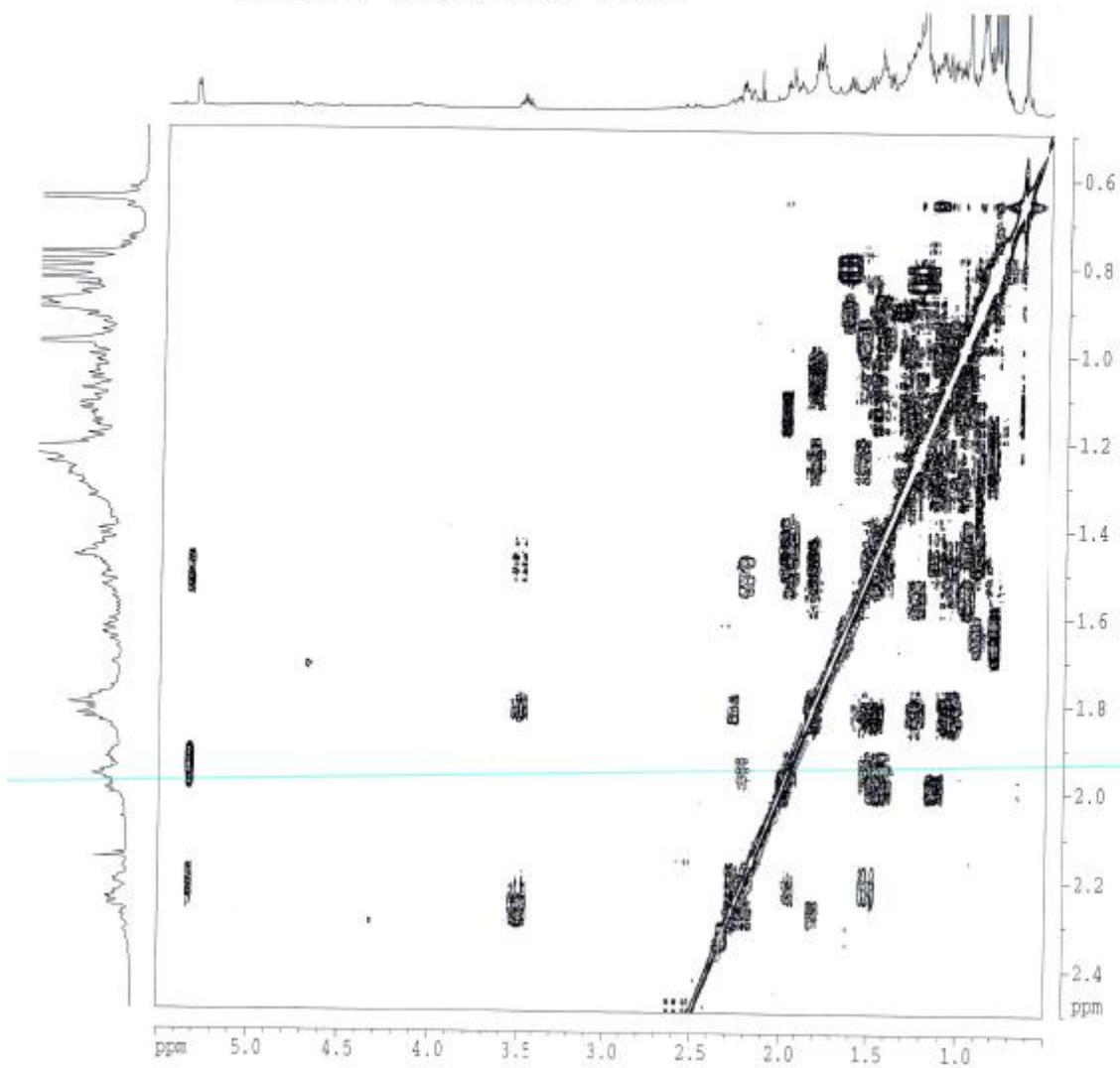


AM 305-1 / CDCL3 / 298K / HMBC 70ms





AM 305-1 / CDCL3 / 298K / COSY90



```

Current Data Parameters
NAME      am305004
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20081210
Time     9.21
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm BBI 2H-80
PULPROG  zgpg30
TE       298.2
SOLVENT  CDCL3
NS       4
DS       2
SWH      2481.844 Hz
FIDRES   1.11759 Hz
AQ       0.4202429 sec
RG        381.7
SQ       308.650 usec
DE       4.50 usec
TE       298.4 K
CP       0.0000000 sec
CL       1.5000000 sec
CFL      0.0000000 sec
DIF      0.0001000 sec
DM       0.0001000 sec

***** CHANNEL f2 *****
NUC1      1H
P1       9.20 usec
PT       9.20 usec
PL1      1.00 dB
SFO      400.132118 MHz

***** CHANNEL CDMXL *****
ORNAME    cdmxl100
NUC2      13C
P2       9.00 K
PT       9.00 K
PL2      0.00 K
SFO2     101.626181 MHz
PL12     10.00 K
DIF2     10.00 K
DM2      1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
SI       324
SF       400.132118 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       0.00 Hz
GB       0
PC       3.00

F1 - Processing parameters
SI       324
SF       400.132118 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       0.00 Hz
GB       0

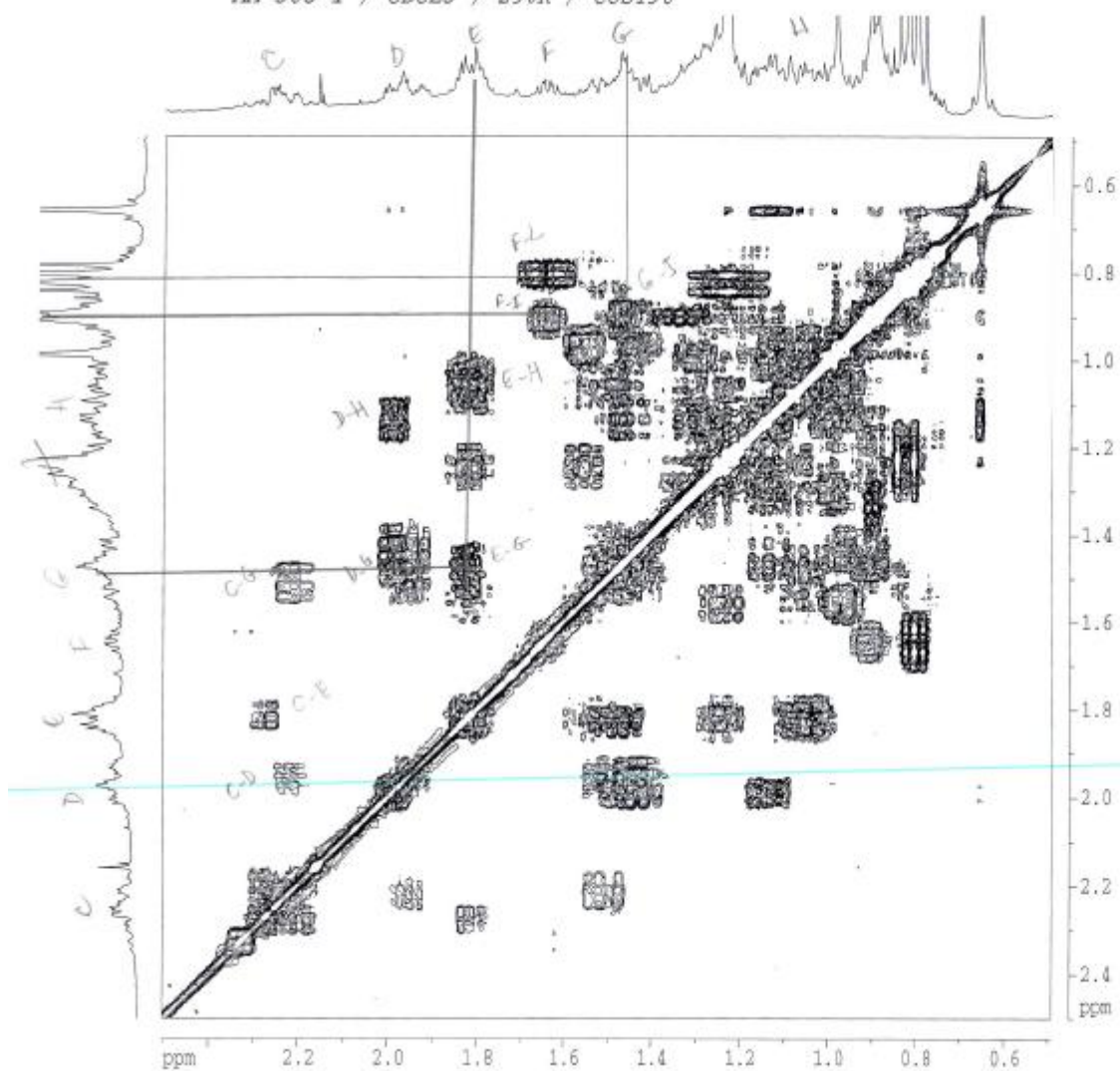
F2 - Processing parameters
SI       324
SF       400.132118 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       0.00 Hz
GB       0

2D 90M phs2 parameters
CQD      32.00 cm
CQ1      32.00 cm
P2PH2A   5.300 ppm
P2PH2B   201.80 Hz
P2PH2C   8.400 ppm
P2PH2D   199.18 Hz
P1PC2    2.500 ppm
P1L2     1000.12 Hz
P1PH2    0.400 ppm
P1RT     208.08 Hz
P1PH2CH  8.22747 ppm/Hz
P1PH2CS  92.02020 Hz/cm
P1PH2CK  8.55114 ppm/cm
P1PH2CM  16.48000 Hz/cm

```



AM 305-1 / CDCL3 / 298K / COSY90



```

Current Data Parameters
NAME      am30501a
EXPNO    2
PROCNO   1

F1 - Acquisition Parameters
Date_     20050108
Time      9.22
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm BBO 1H-13
PULPROG   zgpg30
TD         32768
SOLVENT   CDCl3
NS         8
DS         4
AQ         1.177500 sec
RG         0.426250 sec
FIDRES    0.141700 sec
AQRES     0.000000 sec
DE         200.000000 sec
TE         4.50 sec
TD0        204.80
SFO        500.136000 sec
SI         1.50000000 sec
SII        0.00000000 sec
SIII       0.00000000 sec
SIV        0.00000000 sec
SVM        0.00000000 sec

===== CHANNEL F1 =====
NUC1       13
PC         0.25 sec
PI         0.25 sec
PUL        7.00 dB
SFO1      500.131200 MHz

===== CHANNEL F2 =====
CHN1A1    acq 130
CHN1A2    acq 130
CP1A      0.00 kHz
CP2A      0.00 kHz
CP3A      0.00 kHz
CP4A      0.00 kHz
CP5A      10.00 kHz
CP6A      10.00 kHz
P3A       5000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
AQ         2
PC         0.25
PI         0.25
SFO1      480.111200 MHz
F2RES     4.000000 Hz
SFO2      4.000000 Hz
P3RES     undefined

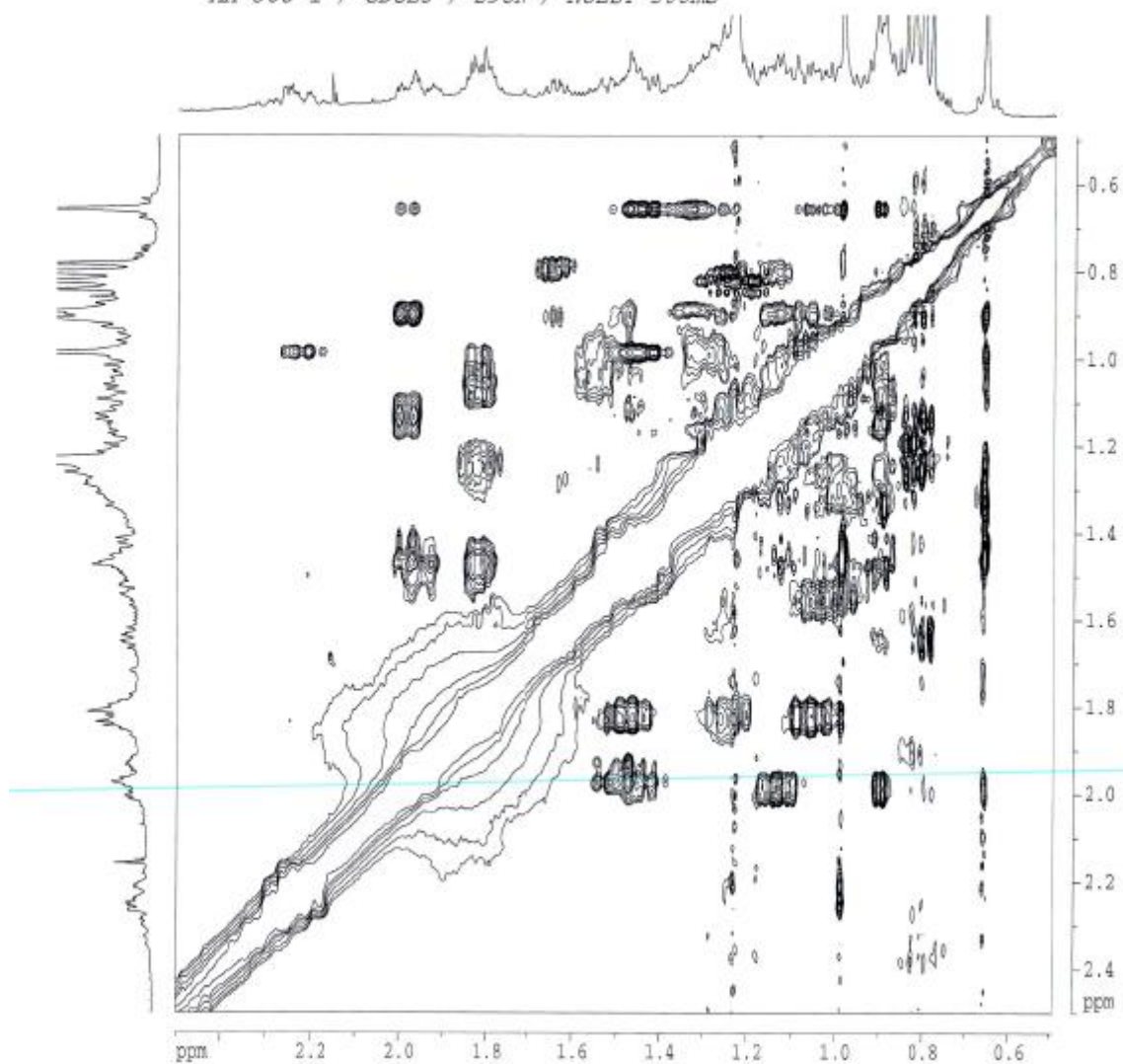
F1 - Processing parameters
SI         32768
SF         480.1180276 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.00 Hz
GB         0
CB         0
PC         1.00

F1 - Processing parameters
SI         32768
SF         480.1180276 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.00 Hz
GB         0
CB         0

2D NMR plot parameters
CQ1        21.00 cm
CQ2        21.00 cm
F2F1A     2.500 ppm
F2F1B     1006.35 Hz
F2F1C     0.400 ppm
F2F1D     1006.35 Hz
F2F1E     2.500 ppm
F2F1F     1006.35 Hz
F2F1G     0.400 ppm
F2F1H     1006.35 Hz
F2F1I     0.00114 ppm/cm
F2F1J     30.54619 Hz/cm
F2F1K     0.01441 ppm/cm
F2F1L     30.57500 Hz/cm

```

AM 305-1 / CDCL3 / 298K / NOESY 500ms



```

Current Data Structure
NAME      abn00019
EXPNO    1
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    2008111
Time     11.41
SYSTEM   spect
PROBHD   5 mm BBI 29-66
PULPROG  zgpg30
TD        3268
SOLVENT  cdcl3
NS        20
DS        4
SWH       2400.844 Hz
FIDRES    1.17071 Hz
AQ        0.432642 Hz
RG         167
SF        299.130 MHz
AQ        6.55 sec
TE        299.2 K
DQ        0.0000000 sec
DQ1       1.5000000 sec
DQ2       0.5000000 sec
DQ3       0.5000000 sec
DQ4       0.3400000 sec
DQ5       0.5000000 sec
DQ6       0.5000000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1      1H
PC        8.00 MHz
P2        18.70 MHz
PL1       0.00 dB
SFO1      499.1311218 MHz

===== CHANNEL CHANNEL =====
CPDPRG2  gpg30
CPDPRG1  zgpg30
SFO2      499.1311218 MHz
SFO1      499.1311218 MHz
SFO2      499.1311218 MHz
SFO1      499.1311218 MHz
SFO2      499.1311218 MHz
SFO1      499.1311218 MHz
SFO2      499.1311218 MHz
SFO1      499.1311218 MHz
SFO2      499.1311218 MHz

F1 - Acquisition parameters
WDW       2
SSB        0
GB         0
PC        1.00
RG         167
SF        299.130 MHz
SFO1      499.1311218 MHz
SFO2      499.1311218 MHz
SFO3      499.1311218 MHz
SFO4      499.1311218 MHz
SFO5      499.1311218 MHz
SFO6      499.1311218 MHz
SFO7      499.1311218 MHz
SFO8      499.1311218 MHz
SFO9      499.1311218 MHz
SFO10     499.1311218 MHz

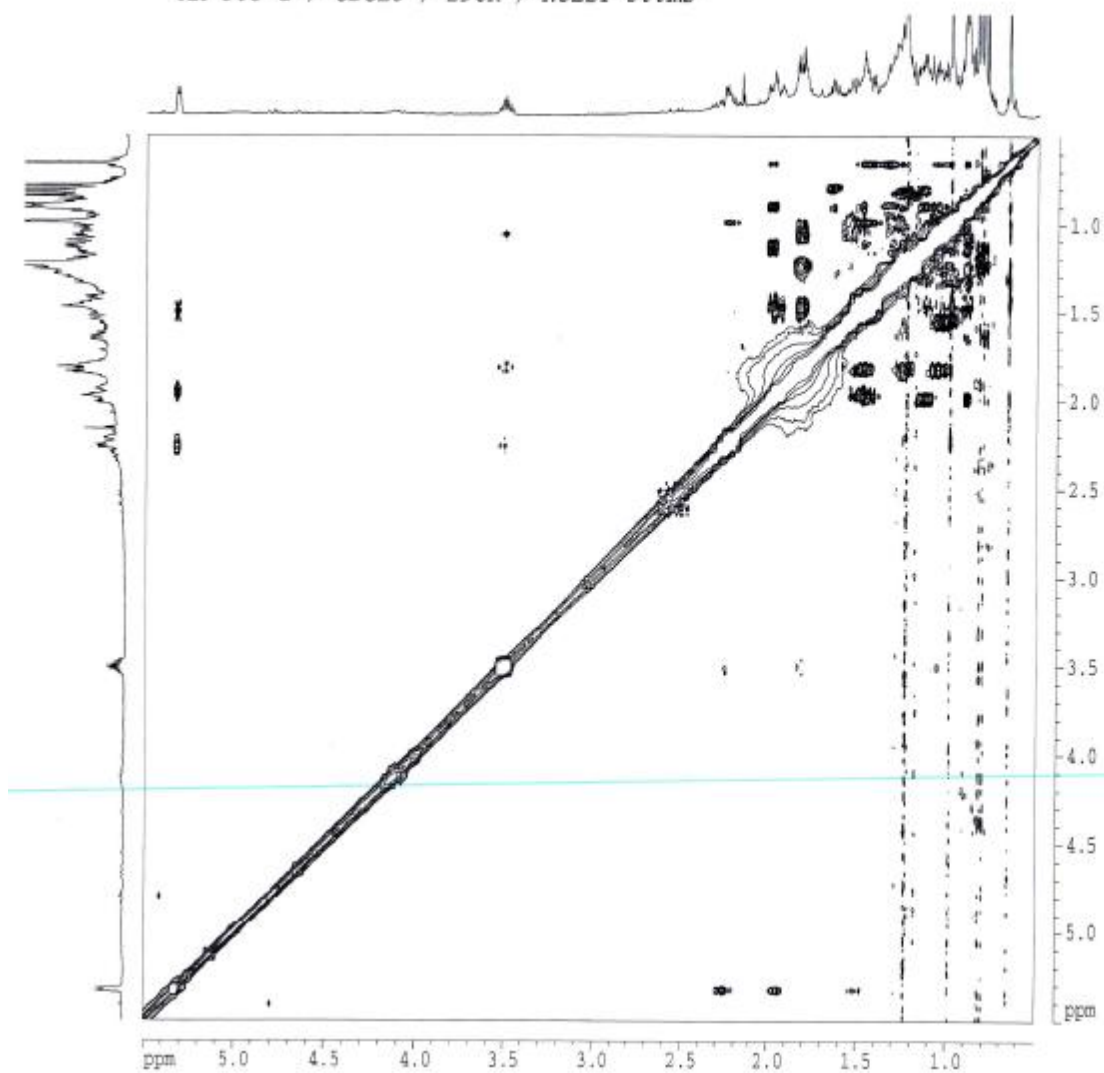
F2 - Processing parameters
SI        3268
SF        499.1301156 MHz
WDW       zg30
SSB        0
GB         0
PC        1.00
RG         167
SF        299.130 MHz
SFO1      499.1311218 MHz
SFO2      499.1311218 MHz
SFO3      499.1311218 MHz
SFO4      499.1311218 MHz
SFO5      499.1311218 MHz
SFO6      499.1311218 MHz
SFO7      499.1311218 MHz
SFO8      499.1311218 MHz
SFO9      499.1311218 MHz
SFO10     499.1311218 MHz

F1 - Processing parameters
SI        3268
SF        499.1301156 MHz
WDW       zg30
SSB        0
GB         0
PC        1.00
RG         167
SF        299.130 MHz
SFO1      499.1311218 MHz
SFO2      499.1311218 MHz
SFO3      499.1311218 MHz
SFO4      499.1311218 MHz
SFO5      499.1311218 MHz
SFO6      499.1311218 MHz
SFO7      499.1311218 MHz
SFO8      499.1311218 MHz
SFO9      499.1311218 MHz
SFO10     499.1311218 MHz

D0 NMR plot parameters
CXI       22.00 cm
CXD       22.00 cm
FQ10      1.0000000 MHz
FQ11      1800.00 Hz
FQ12      0.4000000 MHz
FQ13      150.00 Hz
FQ14      2.0000000 MHz
FQ15      1800.00 Hz
FQ16      0.4000000 MHz
FQ17      150.00 Hz
F2FINDM   0.0014 ppm/cm
F2FINDC   18.0428 Hz/cm
F2FINDH   0.0014 ppm/cm
F2FINDX   18.0428 Hz/cm

```

AM 305-1 / CDCL3 / 298K / NOESY 500ms



```

=====
Current Data Parameters
NAME: AM305176
EXPNO: 1
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_: 20080726
Time: 13:41
PULPROG: zgpg30
PROBHD: 5 mm BBO 1H-13
PULPROG: zgpg30
SI: 328
SOLVENT: CDCl3
NS: 25
DS: 4
SWH: 2461.644 Hz
FIDRES: 1.175153 Hz
AQ: 0.4262423 sec
RG: 102
SF: 280.000 MHz
WDW: EM
SSB: 0
LB: 0.8000000 Hz
GB: 0
PC: 1.8000000 sec
DE: 1.5000000 sec
TE: 1.0000000 sec
DQ: 1.2490000 sec
AQ: 1.0000000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1: 13
P1: 1.22 usec
PL1: 18.70 dB
PL12: 1.00 dB
SFO1: 400.111180 MHz

===== CHANNEL g2 =====
NUC2: 1H
P2: 1.00 usec
PL2: 19.00 dB
PL12: 1.00 dB
SFO2: 500.136450 MHz

F1 - Acquisition parameters
SI: 328
DS: 4
SWH: 400.111180 MHz
FIDRES: 4.895612 Hz
AQ: 0.4262423 sec
SOLVENT: undefined

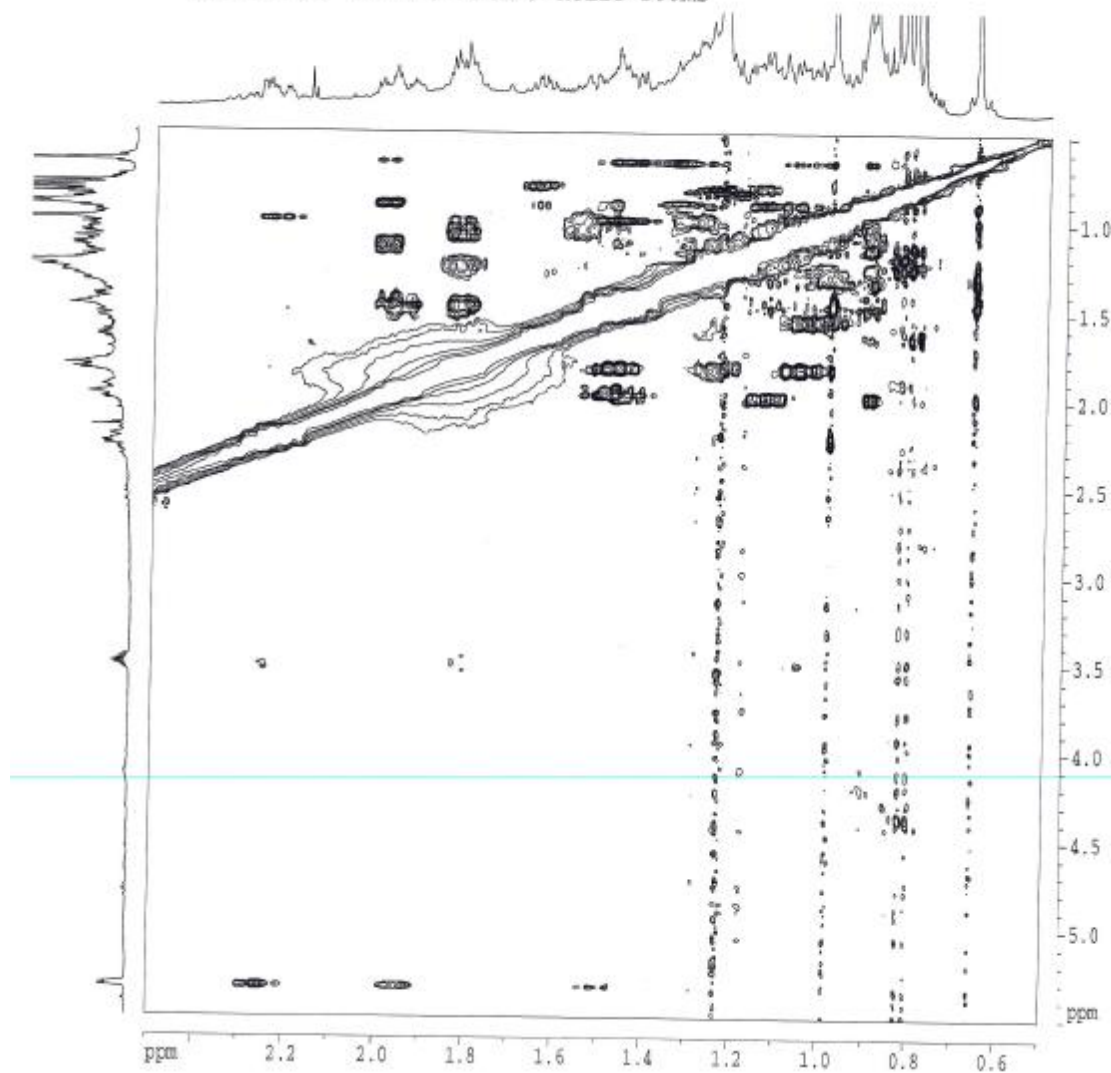
F2 - Processing parameters
SI: 328
SF: 400.111180 MHz
WDW: EM
SSB: 0
LB: 0.8000000 Hz
GB: 0
PC: 1.8000000 sec

F1 - Processing parameters
SI: 328
SF: 500.136450 MHz
WDW: EM
SSB: 0
LB: 0.8000000 Hz
GB: 0
PC: 1.8000000 sec

2D 2D plot parameters
SI: 328
SF: 500.136450 MHz
FIDRES: 4.895612 Hz
AQ: 0.4262423 sec
SOLVENT: undefined
F2 - Processing parameters
SI: 328
SF: 500.136450 MHz
WDW: EM
SSB: 0
LB: 0.8000000 Hz
GB: 0
PC: 1.8000000 sec
=====

```

AM 305-1 / CDCL3 / 298K / NOESY 500ms

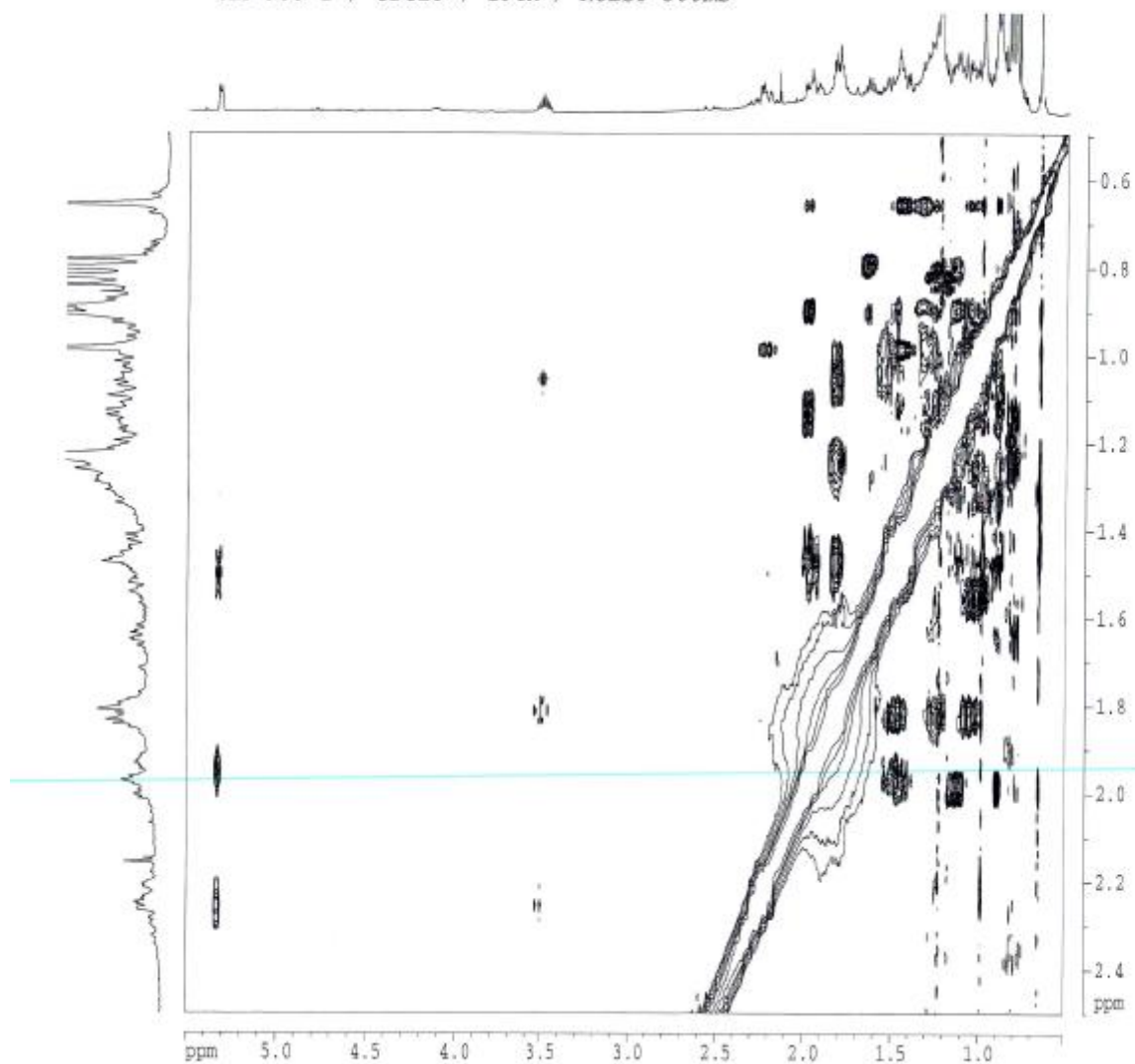


```

Current Data Parameters
NAME      am305010
EXPNO     1
PROCNO    1
-----
F2 - Acquisition Parameters
Date_     20050720
Time      11.45
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm BBI 1H-2D
PULPROG   zgpg30
TD        32768
SOLVENT   DMSO
NS        32
DS        4
SWH        2401.245 Hz
FIDRES    1.17179 Hz
AQ        1.452410 sec
RG         160
AQ        1.452410 sec
DE        6.50 umsec
TE        298.15 K
DQ        0.8000000 sec
DT        1.5000000 sec
DD        0.5000000 sec
SFO       400.125000 MHz
SI         32768
SF         400.125000 MHz
WDW        EM
SSB        0
GB         0
PC         1.00
----- CHANNEL f1 -----
NUC1       1H
SI         16
SF         400.125000 MHz
WDW        EM
SSB        0
GB         0
PC         1.00
----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2   gpg30
ORIGPROG  zgpg30
SI         16
SF         400.125000 MHz
WDW        EM
SSB        0
GB         0
PC         1.00
-----
F1 - Acquisition parameters
SI         16
SF         400.125000 MHz
WDW        EM
SSB        0
GB         0
PC         1.00
-----
F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         400.125000 MHz
WDW        EM
SSB        0
GB         0
PC         1.00
-----
F1 - Processing parameters
SI         16384
SF         400.125000 MHz
WDW        EM
SSB        0
GB         0
PC         1.00
-----
F2 90 plot parameters
SI         32768
SF         400.125000 MHz
WDW        EM
SSB        0
GB         0
PC         1.00
-----
F1 90 plot parameters
SI         16384
SF         400.125000 MHz
WDW        EM
SSB        0
GB         0
PC         1.00
-----

```

AM 305-1 / CDCL3 / 298K / NOESY 500ms



```

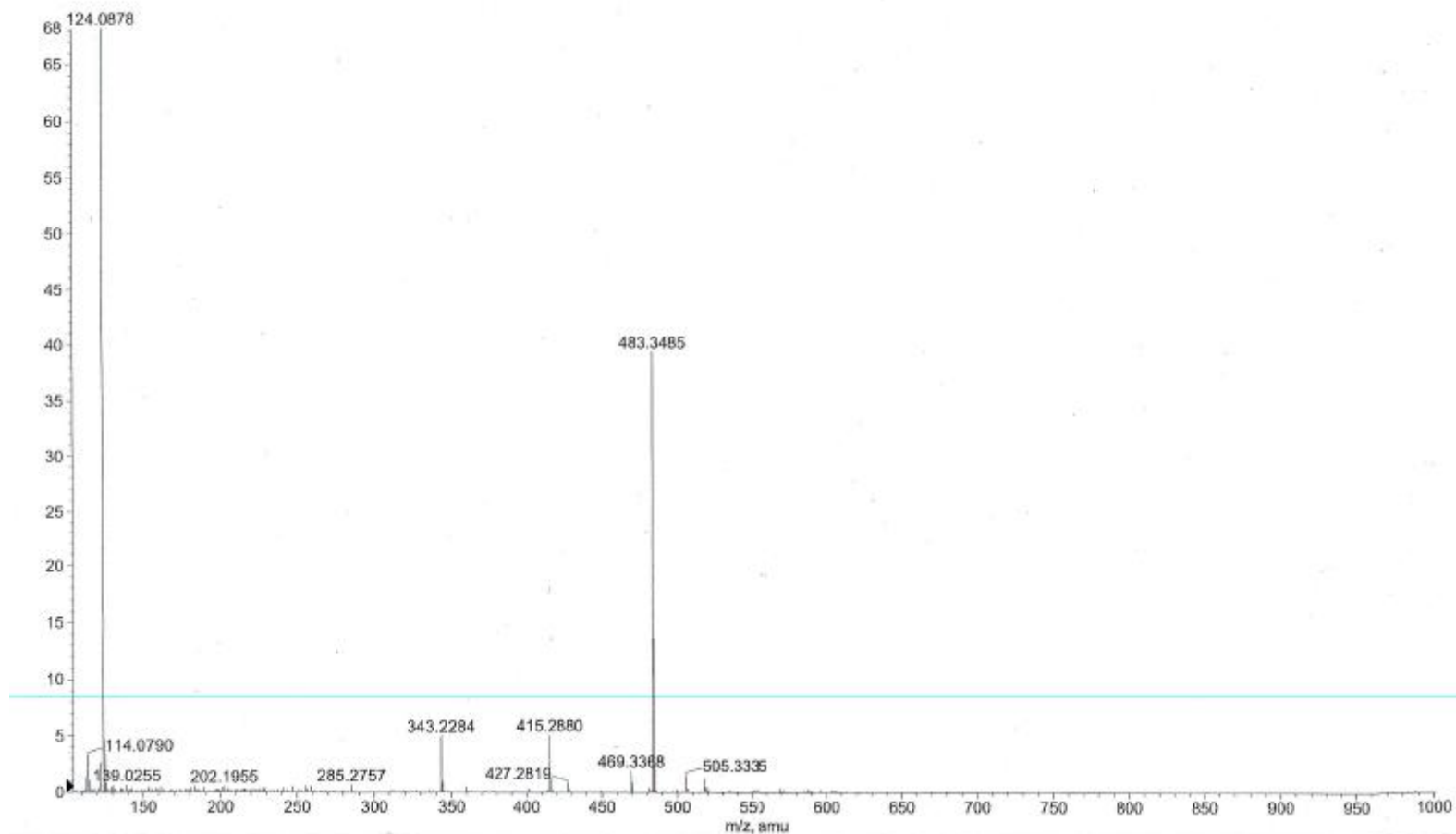
Current Data Parameters
NAME      am305-1
EXPNO    1
PROCNO   1
PROCPS   1
F2 - Acquisition Parameters
Date_     20080710
Time      13.41
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm BBO 1H-13
PULPROG  zgpg30
TD        32768
SOLVENT  CDCl3
NS        20
DS        2
SWH       245.246 Hz
FIDRES    2.27252 Hz
AQ        0.425242 sec
RG         180
DA        180.000 sec
DE        1.500000
TE        298.15 K
DQ        8.000000 sec
DECI      1.000000 sec
SFO       5.000150 sec
SFL1      1.000000 sec
SFL2      1.000000 sec
SFL3      1.000000 sec
SFL4      1.000000 sec
===== CHANNEL f1 =====
NUC1      13
P1        6.31 sec
PC        18.70 usec
PL1       1.50 dB
SFO1      400.131280 MHz
===== MAGNET CHANNEL =====
CPDPRG2  gnm2
CPDPRG1  gnm1
CP2       1.00 Hz
CP1       1.00 Hz
CP3       1.00 Hz
CP4       1.00 Hz
CP5       1.00 Hz
CP6       1.00 Hz
CP7       1.00 Hz
CP8       1.00 Hz
CP9       1.00 Hz
CP10      1.00 Hz
F2 - Acquisition parameters
SI        2
SF        513
SFO1      400.131280 MHz
F2RES     0.425242 Hz
SWH        245.246 Hz
FREQZ     298.150000 MHz
F2 - Processing parameters
SI        32768
SF        400.131280 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.50 Hz
GB         0
PC        1.80
F1 - Processing parameters
SI        32768
SF        500.136196 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.50 Hz
GB         0
PC        1.80
F0 MHz plot parameters
SI        32768
SF        22.00 MHz
FIDRES    5.500 ppm
F1F0      2081.46 Hz
F2F0      1.498 ppm
F3F0      158.150 Hz
F4F0      2.500 ppm
F5F0      1000.21 Hz
F6F0      0.485 ppm
F7F0      298.150 Hz
F8F0F0    0.22747 ppm/Hz
F9F0F0    11.00190 Hz/Hz
F10F0F0   0.08124 ppm/Hz
F11F0F0   35.48150 Hz/Hz

```

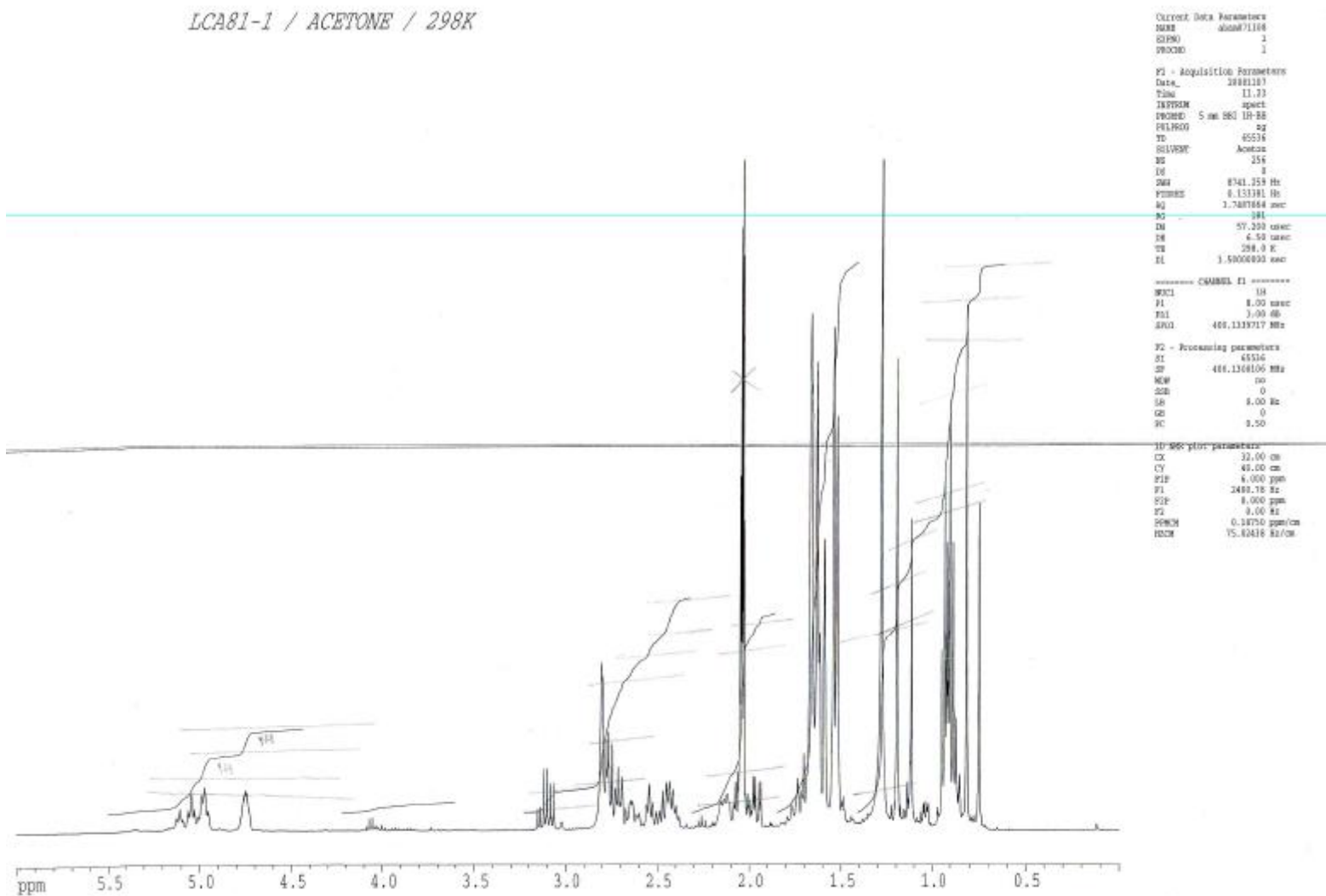
## **Anexo 4: Espectros RMN de LC-4**

+10> MS: 2.533 to 2.966 min from 20081106\_LIONEL\_LORENA\_LCA\_81\_1.wiff  
a=3.56522506786887860e-004, tD=6.16191385504956410e+001, Subtracted < +TOF MS: 0.083 to 0.383 min from 20081106\_LIONEL\_LO...  
a=3.56522506786887860e-004, tD=6.16191385504956410e+001>, Subtracted < +TOF MS: 0.017 to 0.350 min from 20081106\_LIONEL\_L...  
a=3.56522506786887860e-004, tD=6.16191385504956410e+001>

Max. 68.2 counts.

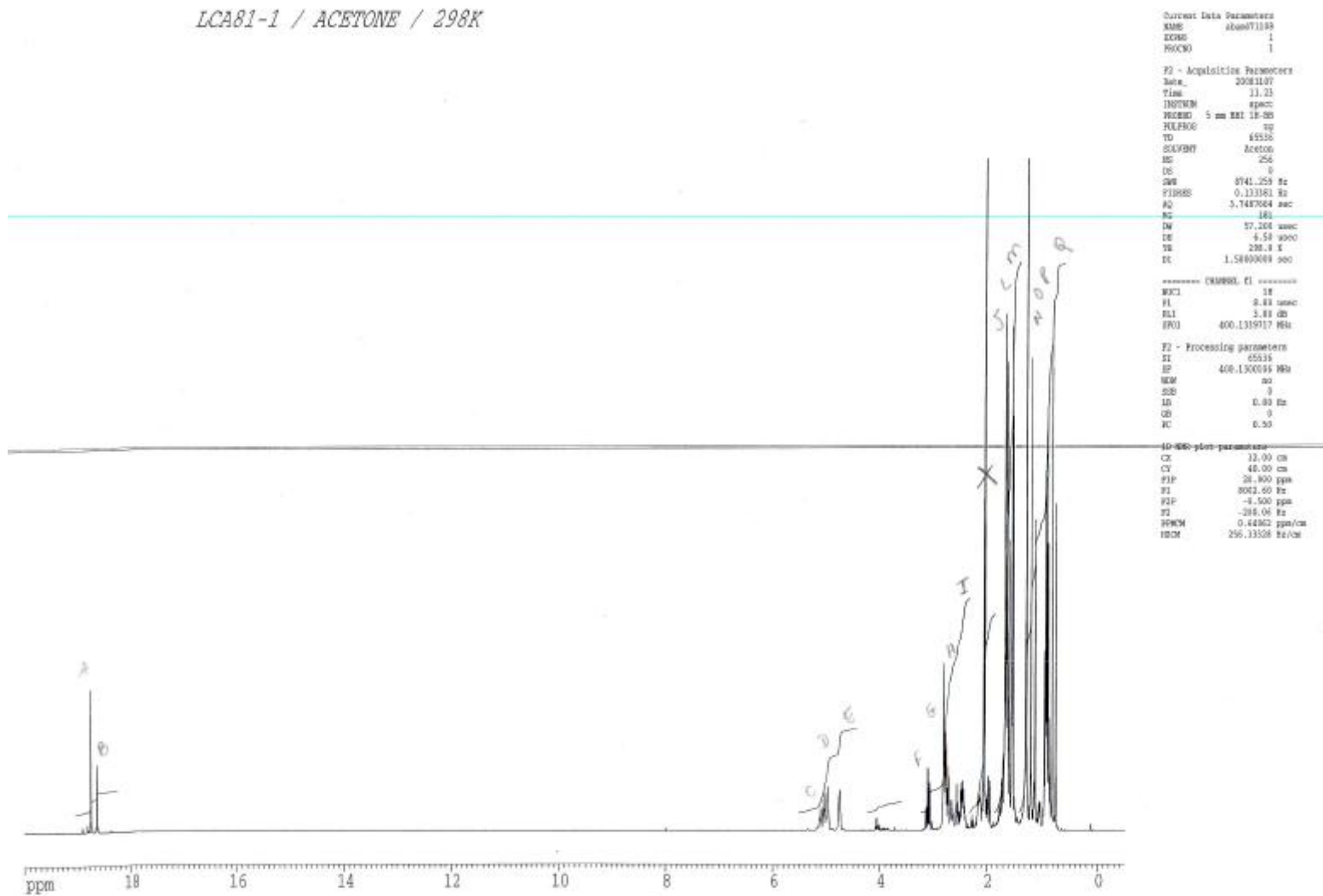


LCA81-1 / ACETONE / 298K



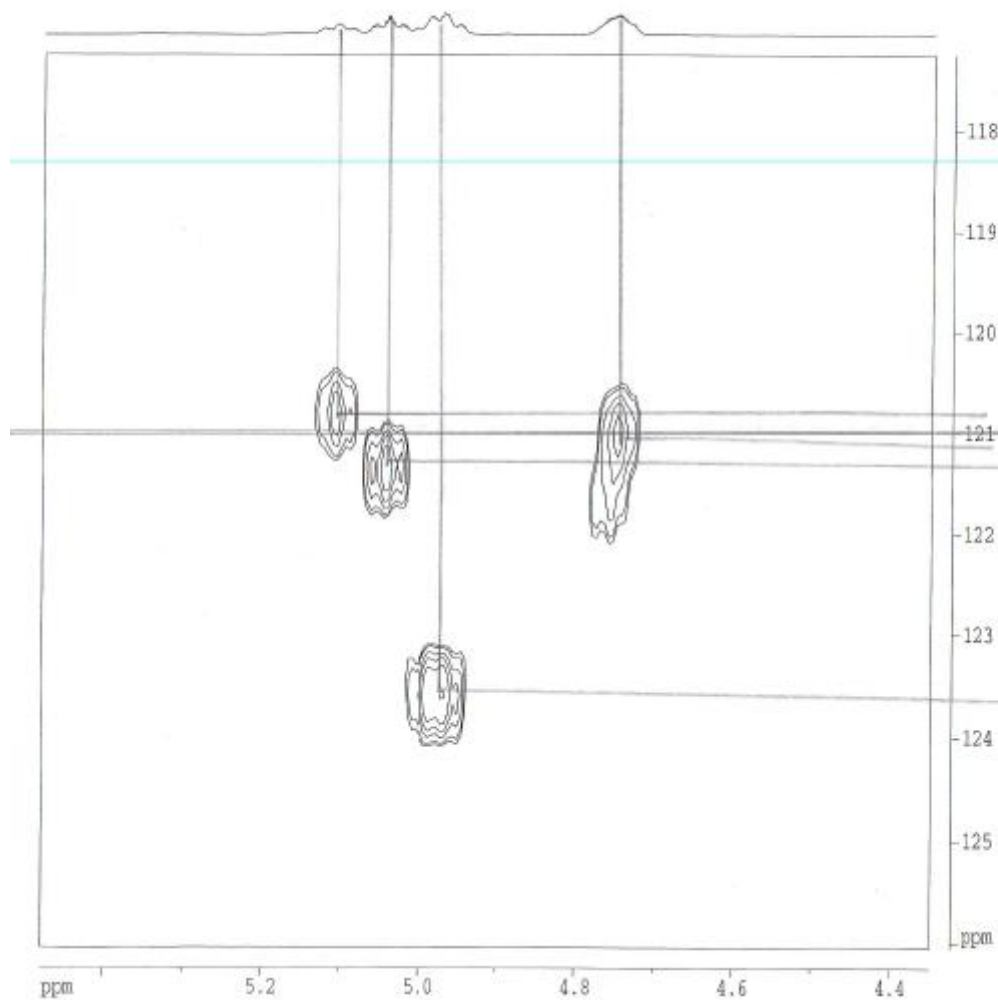


LCA81-1 / ACETONE / 298K





LCA81-1 / ACETONE / 298K / HSQC



General Data Parameters  
 NAME LCA81-1  
 SMO 5  
 HXSM 1

F1 - Acquisition Parameters

Date\_ 20011109  
 Time 15.58  
 INSTRUM spect  
 PROBRW 5 cm 100 15.00  
 HSIAPRO 1sig30p  
 NS 4000  
 SOLVENT acetone  
 NS 80  
 DS 16  
 SAS 8700.150 Hz  
 F2AHD 1.14199 Hz  
 LG 0.124194 sec  
 NS 4000  
 NS 17.100 sec  
 TR 2.01 0.0  
 TR 0.8000000 sec  
 DS 1.5000000 sec  
 DS 0.8000000 sec  
 DS 0.8000000 sec  
 DS 0.8000000 sec  
 DS 0.8000000 sec  
 DS 0.8000000 sec  
 DS 0.8000000 sec  
 DS 0.8000000 sec

===== CHANNEL f1 =====

NUC1 13C  
 P1 9.13 usec  
 P2 16.36 usec  
 PL1 1.00 dB  
 PL2 400.120717 dB

===== CHANNEL f2 =====

PROBHD 1H  
 NS 16  
 P1 13.18 usec  
 P2 24.36 usec  
 PCPD 00.00 usec  
 PL1 0.00 dB  
 PL2 12.18 dB  
 PL3 100.011718 dB

===== CHANNEL f3 =====

CPDPR 400.200  
 GPRDC 400.200  
 GPRSD 400.200  
 WDC 0.00 Hz  
 WFD 0.00 Hz  
 WCL 0.00 Hz  
 WVL 0.00 Hz  
 WVD 0.00 Hz  
 WVF 0.00 Hz  
 WVI 0.00 Hz  
 WVS 0.00 Hz  
 WVT 0.00 Hz  
 WVD 100.00 usec

F1 - Acquisition parameters

NS 4  
 DS 16  
 SAS 8700.150 Hz  
 F2AHD 1.14199 Hz  
 NS 4000  
 FWHM undefined

F1 - Processing parameters

SI 800  
 SF 400.110016 MHz  
 OS 0.0000  
 LB 8.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

F1 - Processing parameters

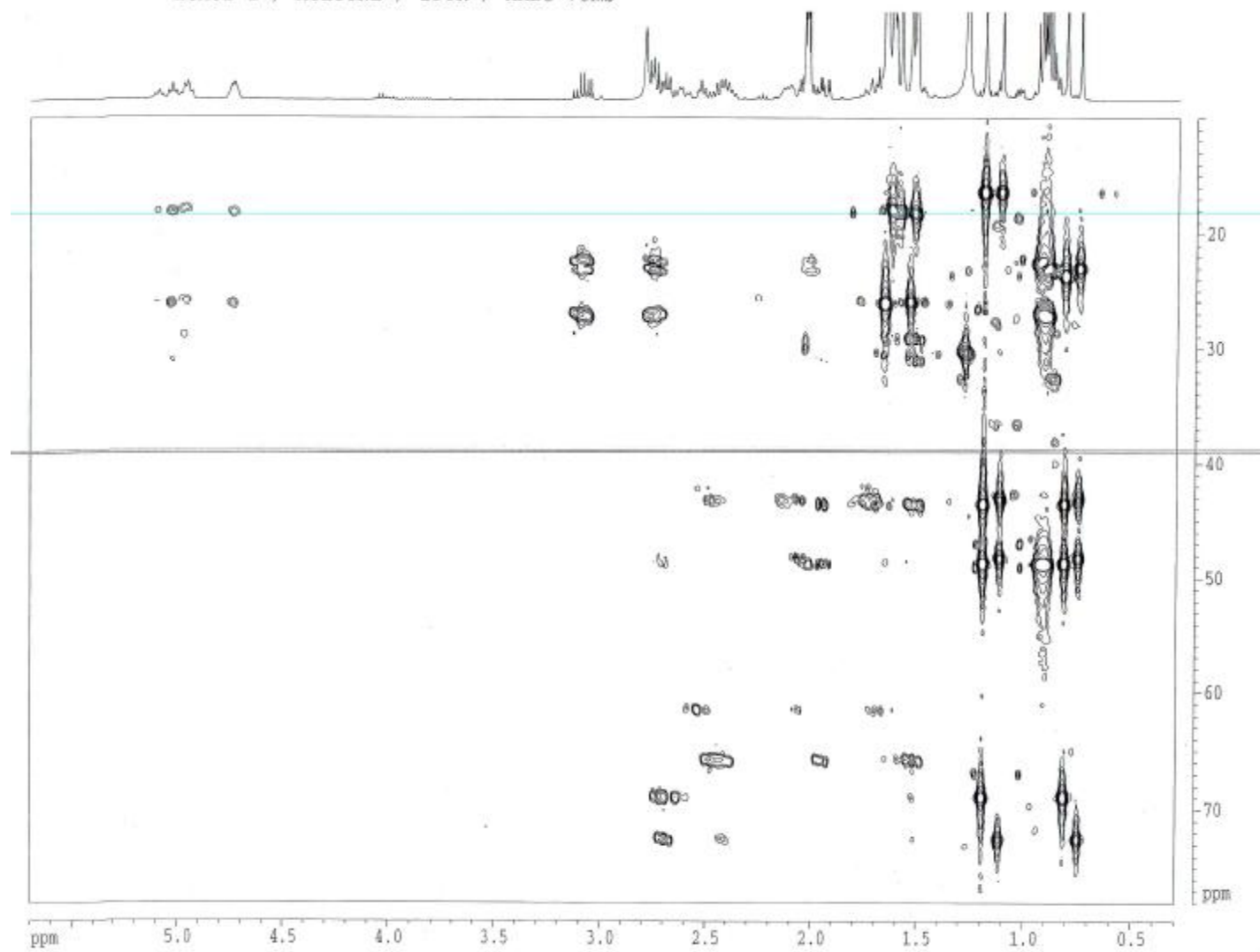
SI 160  
 SF 160.511420 MHz  
 OS 0.0000  
 LB 8.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

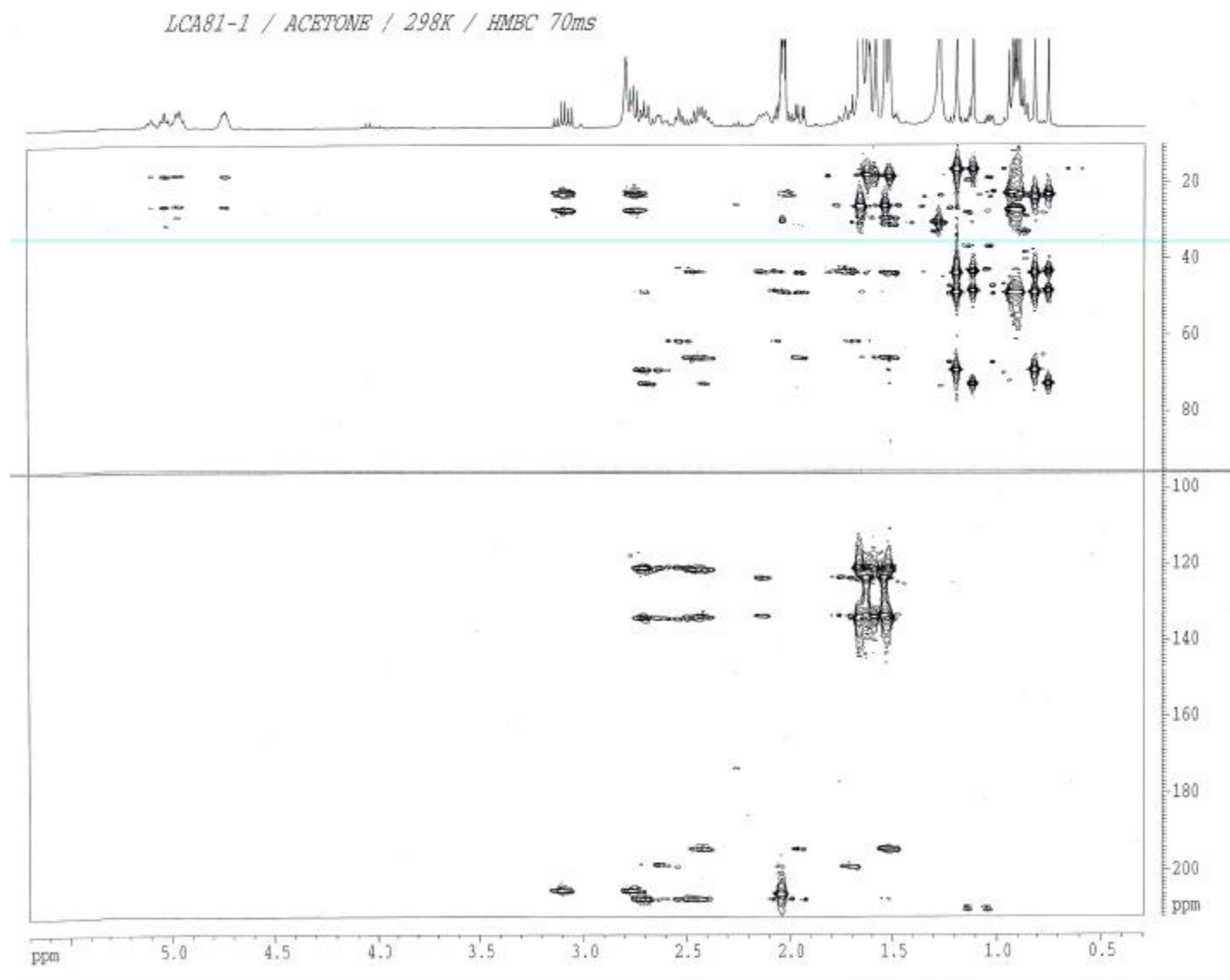
2D 90F plot parameters

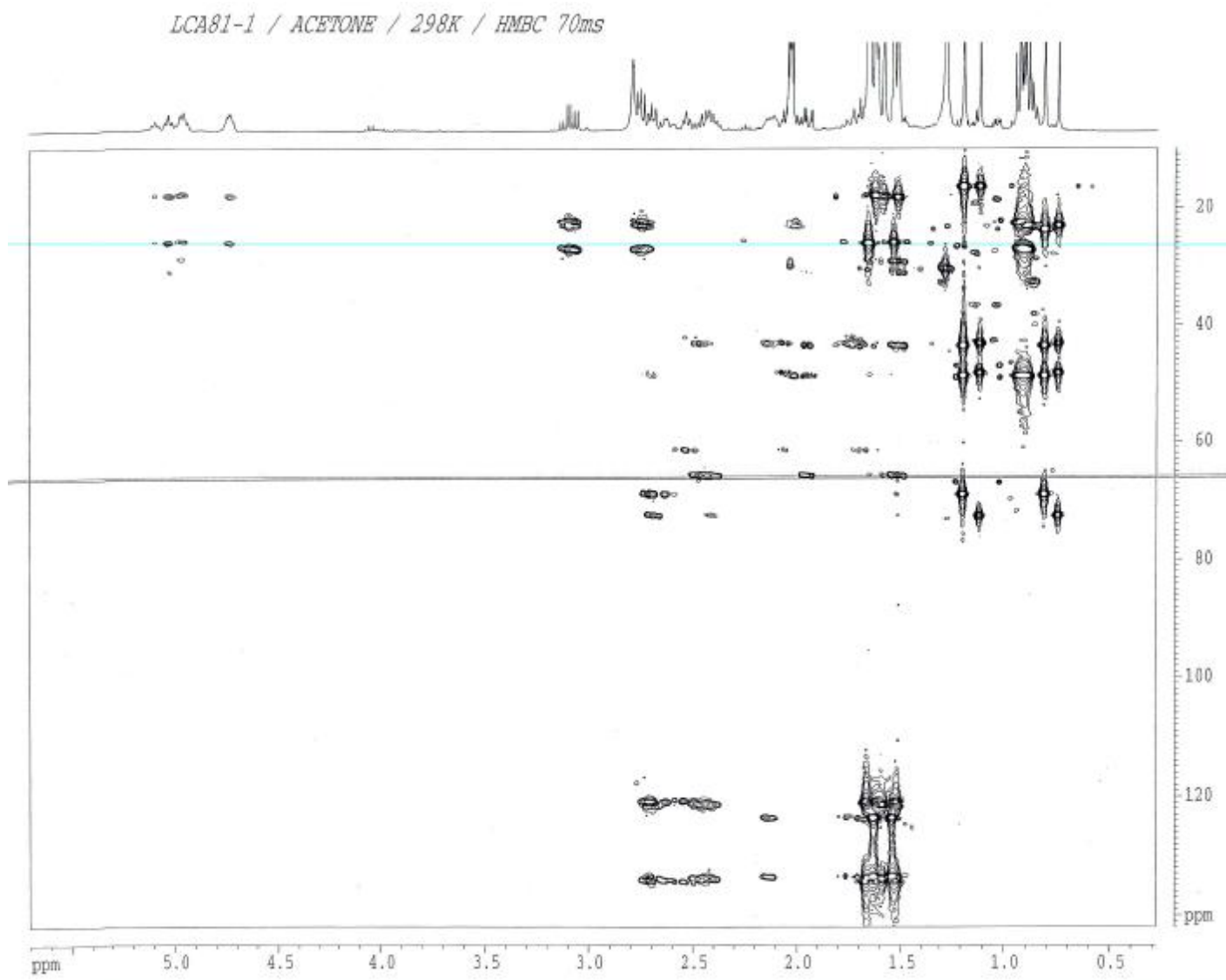
SI 160 Hz  
 SI 160 Hz  
 FWHM 1.670 ppm  
 FWHM 1.670 ppm  
 FWHM 4.167 ppm  
 FWHM 179.16 Hz  
 FWHM 120.000 ppm  
 FWHM 1580.00 Hz  
 FWHM 117.114 ppm  
 FWHM 1179.16 Hz  
 FWHM 4.1670 ppm/cm  
 FWHM 20.5440 Hz/cm  
 FWHM 0.2040 ppm/cm  
 FWHM 20.5440 Hz/cm

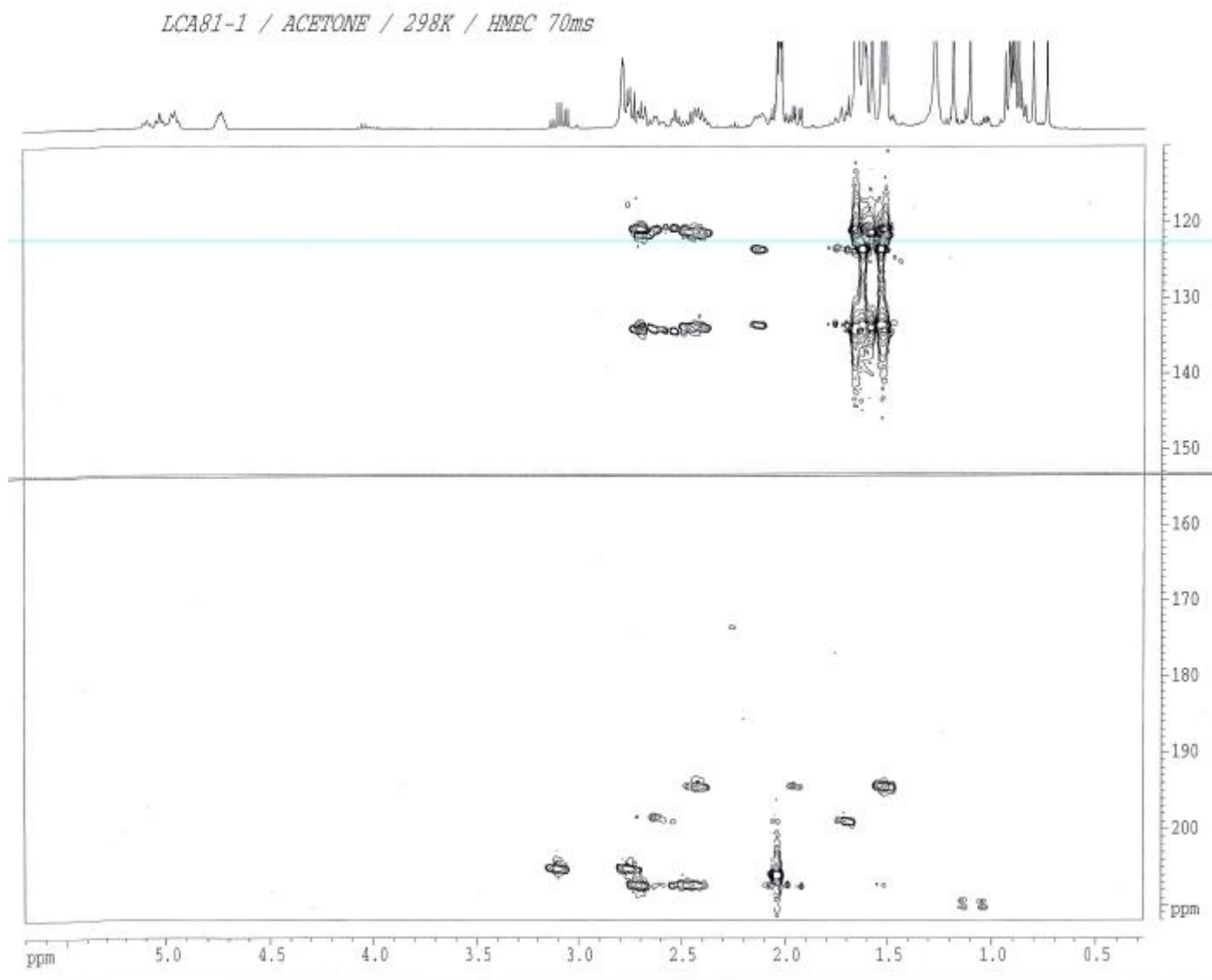


LCA81-1 / ACETONE / 298K / HMBC 70ms

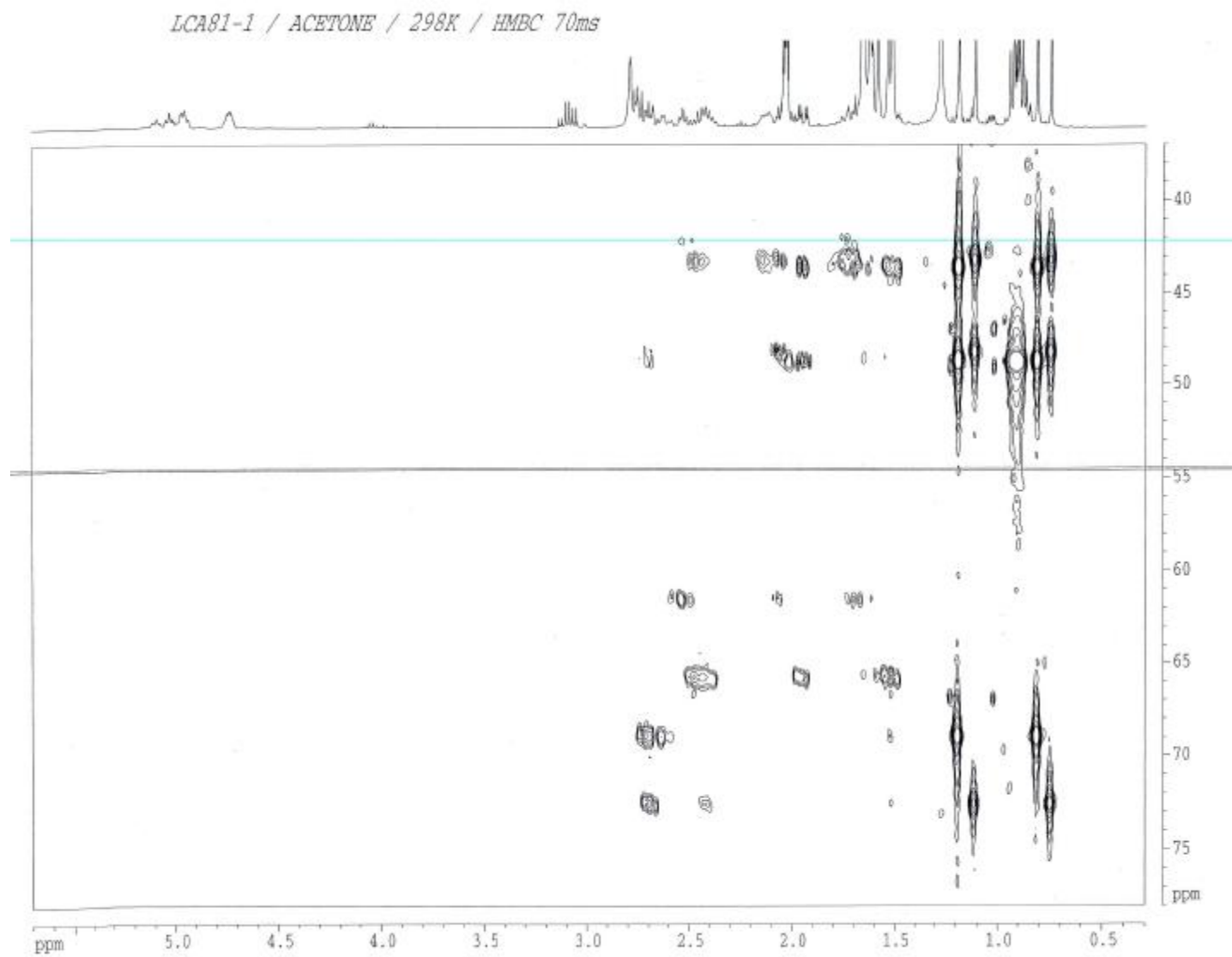




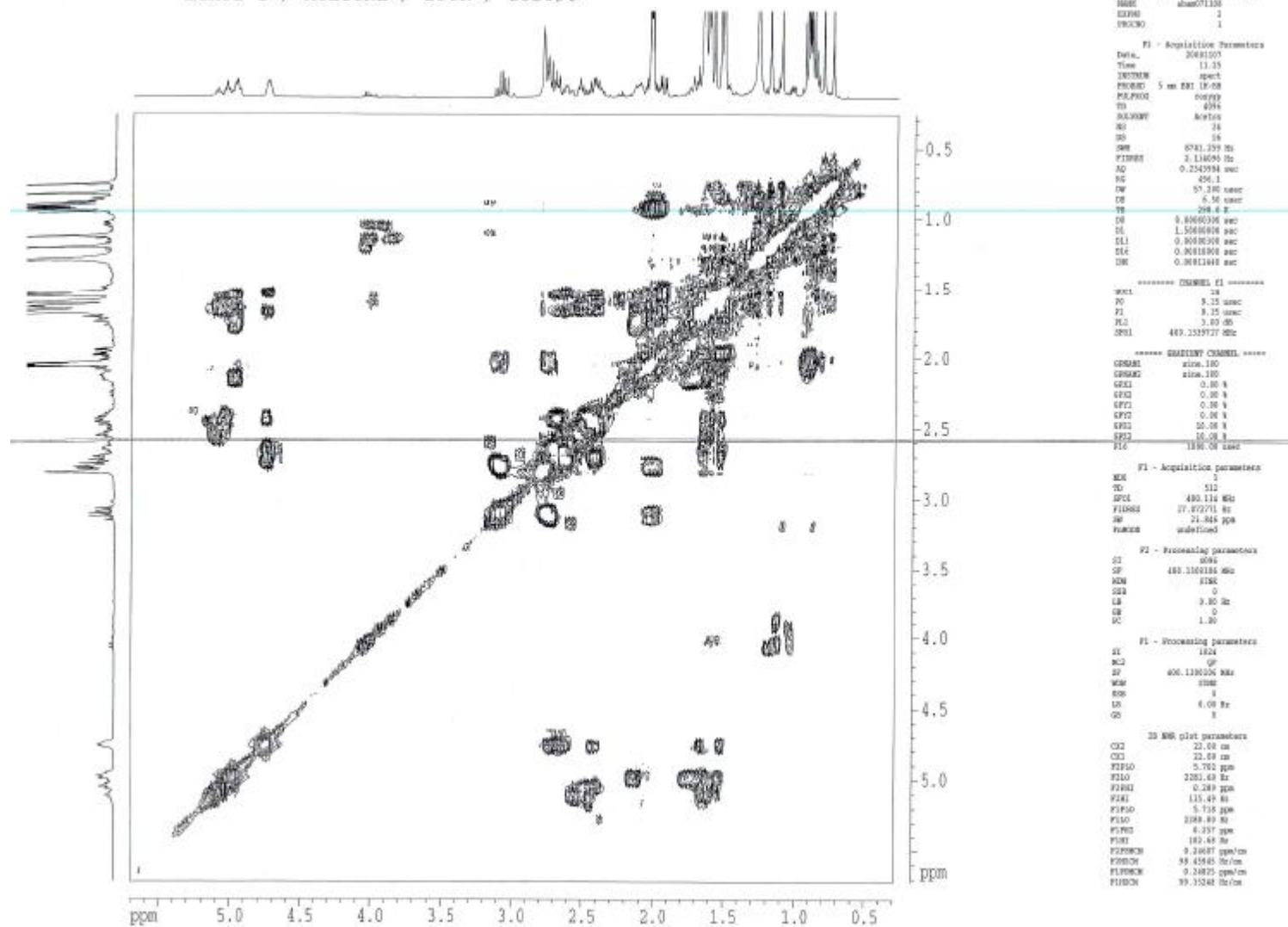






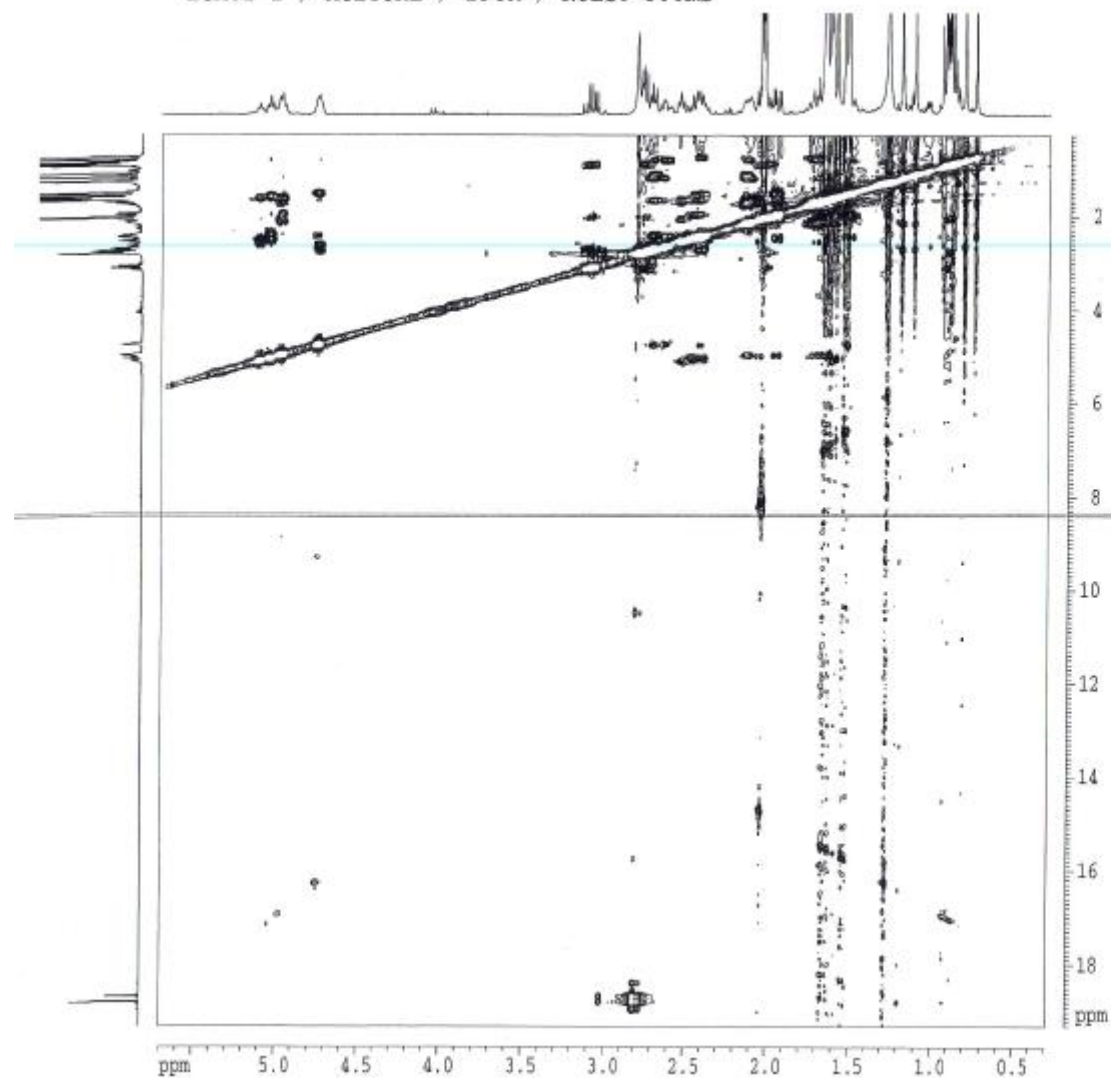


LCA81-1 / ACETONE / 298K / COSY90





LC81-1 / ACETONE / 298K / NOESY 500ms



```

Current Data Blockname
NAME 060971128
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20081107
Time 17.29
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBO 1H-BO
PULPROG zgpg30
SI 4096
SOLVENT Acetone
SS 42
DS 16
AQ 0.061250 Hz
FIDRES 2.114090 Hz
RG 655.000 Hz
SC 495.0
SD 51.500 sec
SE 6.50 sec
TE 298.2 K
AQ 0.0600000 sec
DS 1.5000000 sec
RG 655.000 Hz
SC 495.000 Hz
SD 51.500000 sec
SE 6.5000000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13
P1 8.25 sec
PC 18.30 sec
PL 1.80 dB
RG1 400.121875 Hz

===== CHANNEL CHANNEL =====
CPDPRG2 sfcw_130
CPDPRG1 sfcw_130
NUC2 13
NUC1 13
AQ2 0.08 Hz
AQ1 0.08 Hz
PC2 40.00 Hz
PC1 40.00 Hz
PL2 0.00 Hz
PL1 0.00 Hz

F1 - Acquisition parameters
SI 2
SF 400.1363180 MHz
WDW EM
SSB 0
GB 0
PC 1.00

F2 - Processing parameters
SI 4096
SF 400.1363180 MHz
WDW EM
SSB 0
GB 0
PC 1.00

F1 - Processing parameters
SI 130
SF 400.1363180 MHz
WDW EM
SSB 0
GB 0
PC 1.00

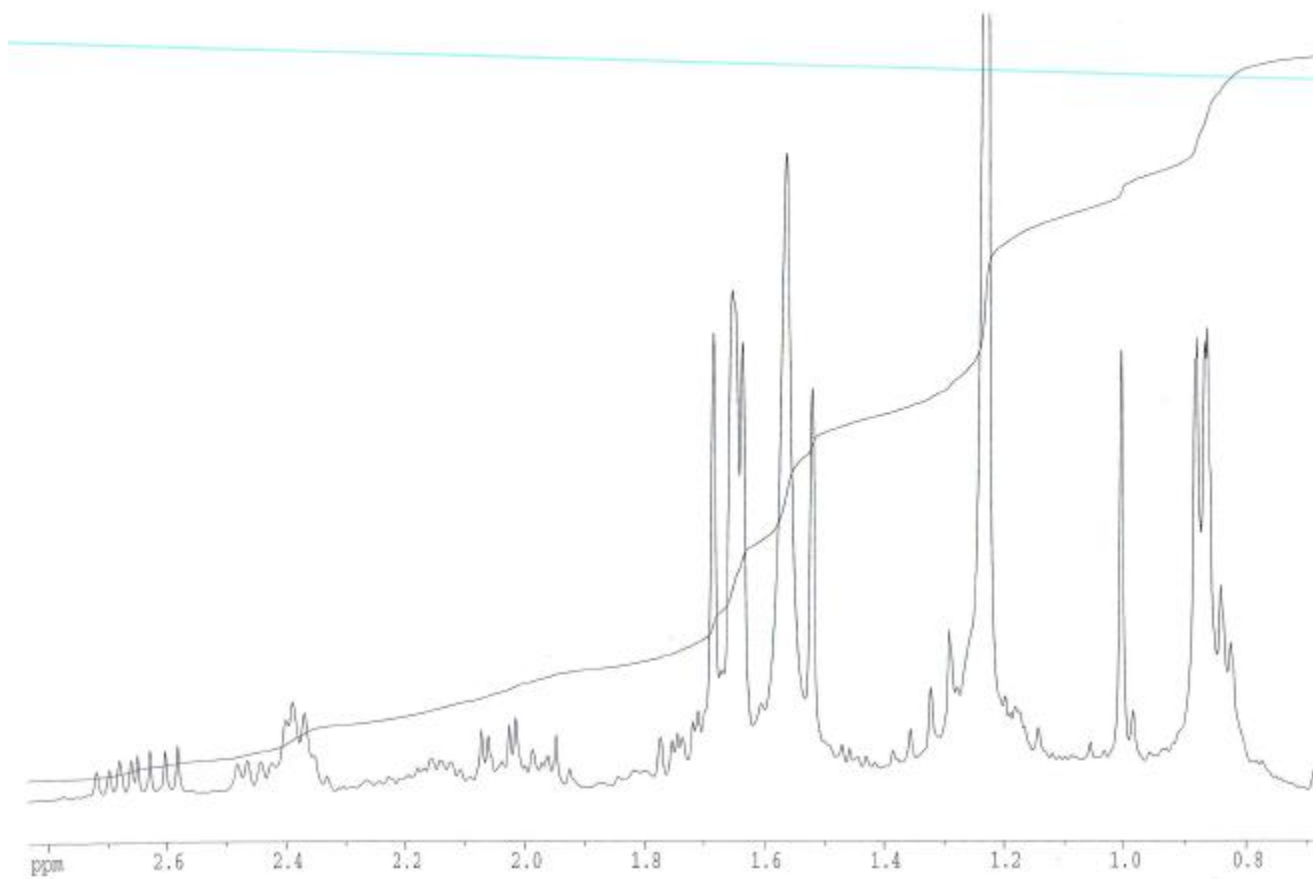
2D 2D plot parameters
SI 22.50 cm
SD 22.50 cm
FID0 3.780 cm
F2D0 2280.74 Hz
F1F1 8.254 cm
F2F1 107.50 Hz
F1F0 18.300 cm
F2F0 7702.50 Hz
F1F2 8.278 cm
F2F2 111.52 Hz
F2F3R 8.24572 cm/cm
F2F3I 38.52358 Hz/cm
F1F3R 1.88464 cm/cm
F1F3I 145.46768 Hz/cm

```

## **Anexo 5: Espectros RMN de LC-5**



LC 85-1 / CDCL3 / 298K



```

CURRENT DATA PARAMETERS
NAME: LC851128
EXPNO: 1
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_: 20081128
Time: 10.31
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm BBI 1H-85
PULPROG: zgpg30
TD: 131068
SOLVENT: CDCL3
NS: 512
DS: 4
SWH: 4601.439 Hz
FIDRES: 0.114120 Hz
AQ: 1.720485 sec
RG: 512
DM: 111.600 usec
DE: 6.50 usec
TE: 298.0 K
D1: 1.5000000 sec

***** CHANNEL f1 *****
NUC1: 1H
P1: 8.00 usec
PL1: 0.00 dB
SFO1: 400.130474 MHz

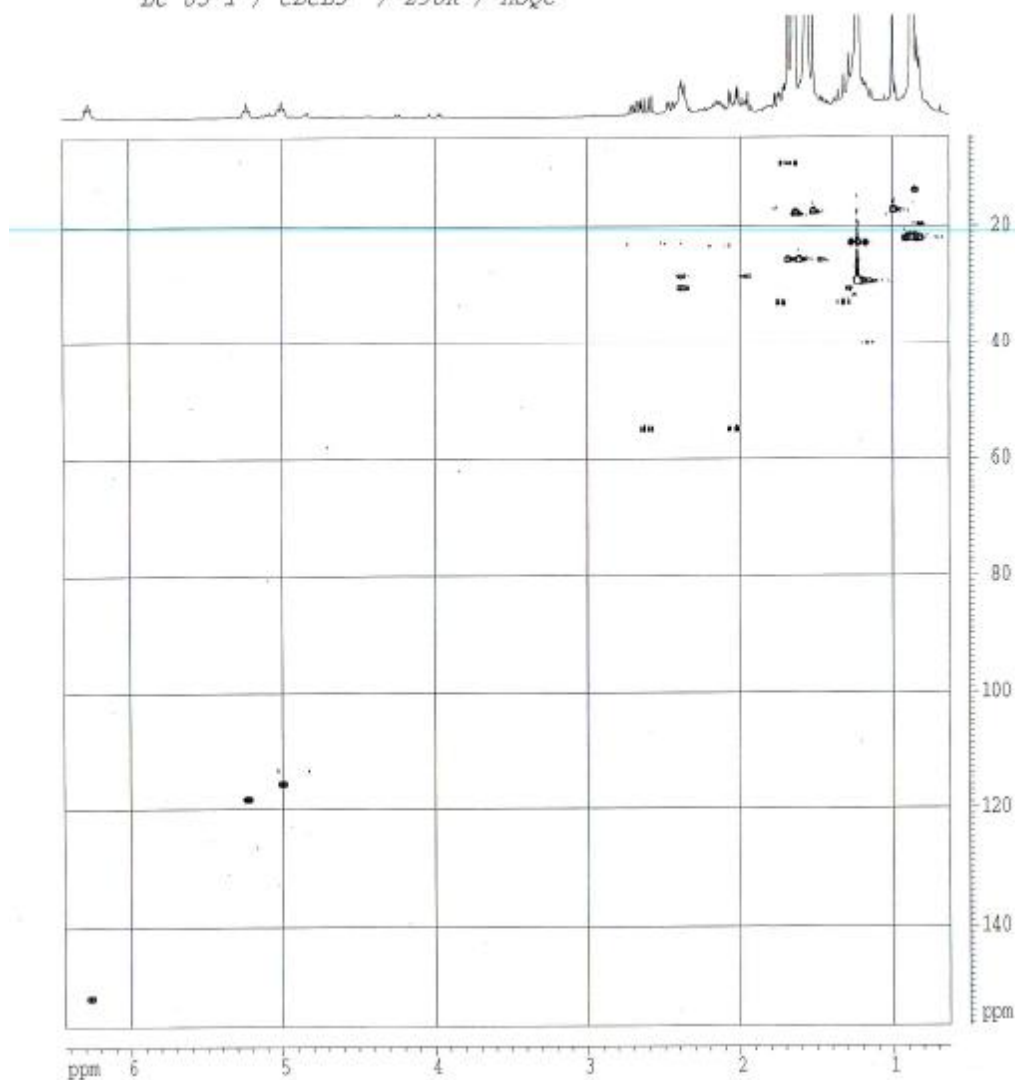
F1 - Processing parameters
SI: 32768
SF: 400.130475 MHz
WDW: EM
SSB: 0
LA: 0.00 Hz
GB: 0
PC: 8.50

ID: 000 plot parameters
CX: 12.00 cm
CY: 52.50 cm
RFP: 1.811 ppm
FI: 1112.94 Hz
RFP: 8.477 ppm
FI: 278.93 Hz
FREQH: 0.06752 ppm/cm
SFOH: 26.1770 Hz/cm
  
```





LC 85-1 / CDCL3 / 298K / HSQC



```

Current Data Parameters
NAME      Sample100
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     180812P
Time      13:31
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm BBO 1H-2
PULPROG   zgpg30
TD         65536
SOLVENT   CDCl3
NS         18
DS         4
SWH        4601.400 Hz
FIDRES     1.070440 Hz
AQ         0.4674872 sec
RG         43122
DM         311.450 mm
DE         6.10 mm
TE         300.2 K
DQ         0.1800000 sec
DELTA     2.1800000 sec
DZ         0.1811500 sec
CLL        0.1800000 sec
CCT        0.1800000 sec
DLE        0.1811500 sec
SLS        0.1811500 sec
SLL        0.1800000 sec
SFR        0.1800000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1       13
PC         6.10 mm
PD         18.00 mm
PULPROG   zgpg30
RG         400.1329474 Hz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2    waltz16
NUC2        1H
PC          12.25 mm
PD          24.00 mm
PULPROG    zgpg30
RG          4.00 mm
AL12       13.00 mm
AP12       300.0238178 MHz

===== CHANNEL CHANNEL =====
CH1NAME    swh 130
CH1FREQ    125.130
CH1P1      0.00 A
CH1P2      0.00 A
CH1P3      0.00 A
CH1P4      0.00 A
CH1P5      0.00 A
CH1P6      0.00 A
CH1P7      0.00 A
CH1P8      0.00 A
CH1P9      0.00 A
CH1P10     80.00 A
CH1P11     80.00 A
CH1P12     20.00 A
CH1P13     20.00 A
CH1P14     180.00 mm

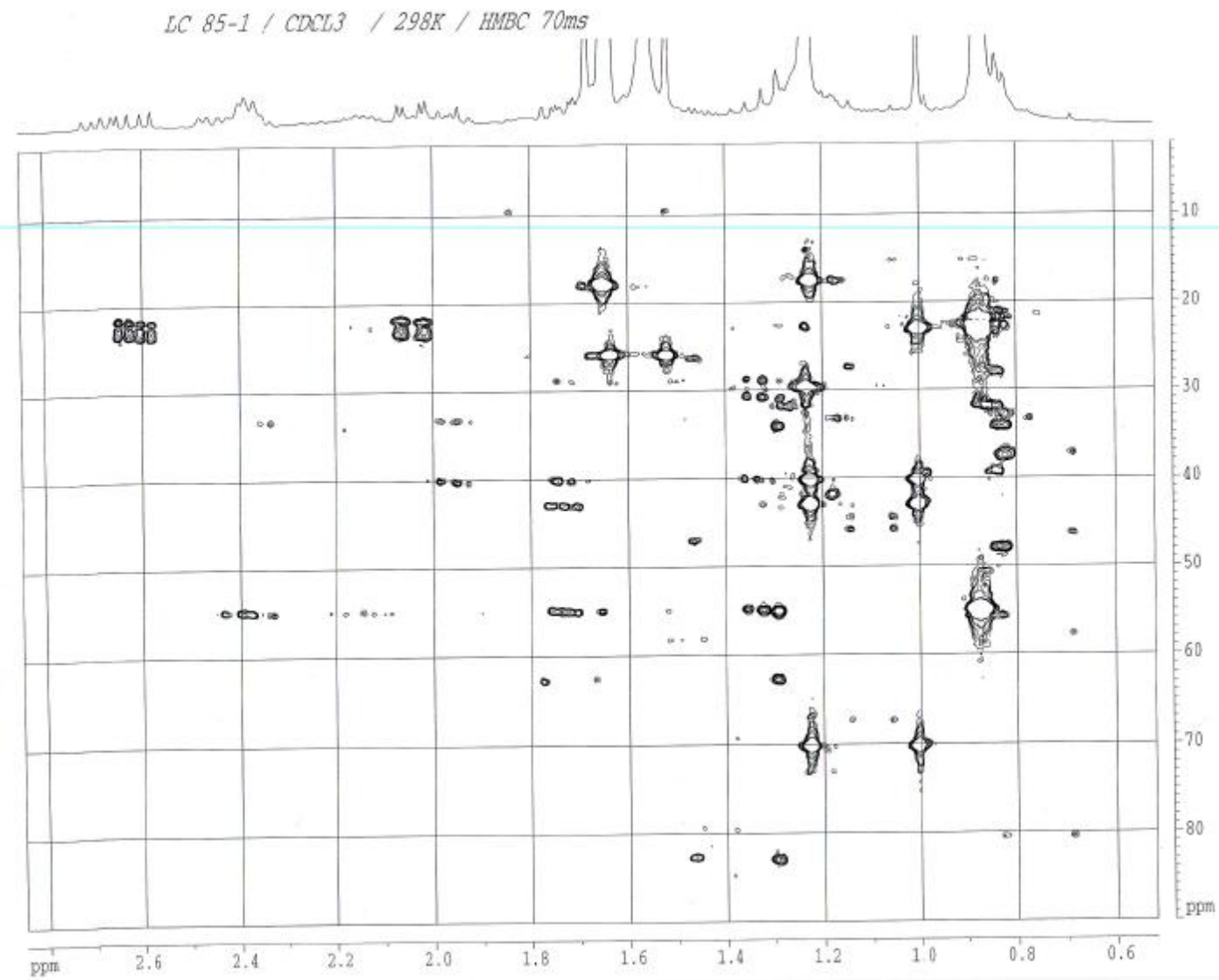
F1 - Acquisition parameters
NUC1       13
PC         6.10 mm
PD         18.00 mm
PULPROG    zgpg30
RG         400.1329474 Hz

F2 - Processing parameters
SI         65536
SF         100.628175 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.00 Hz
GB         0
PC         1.00

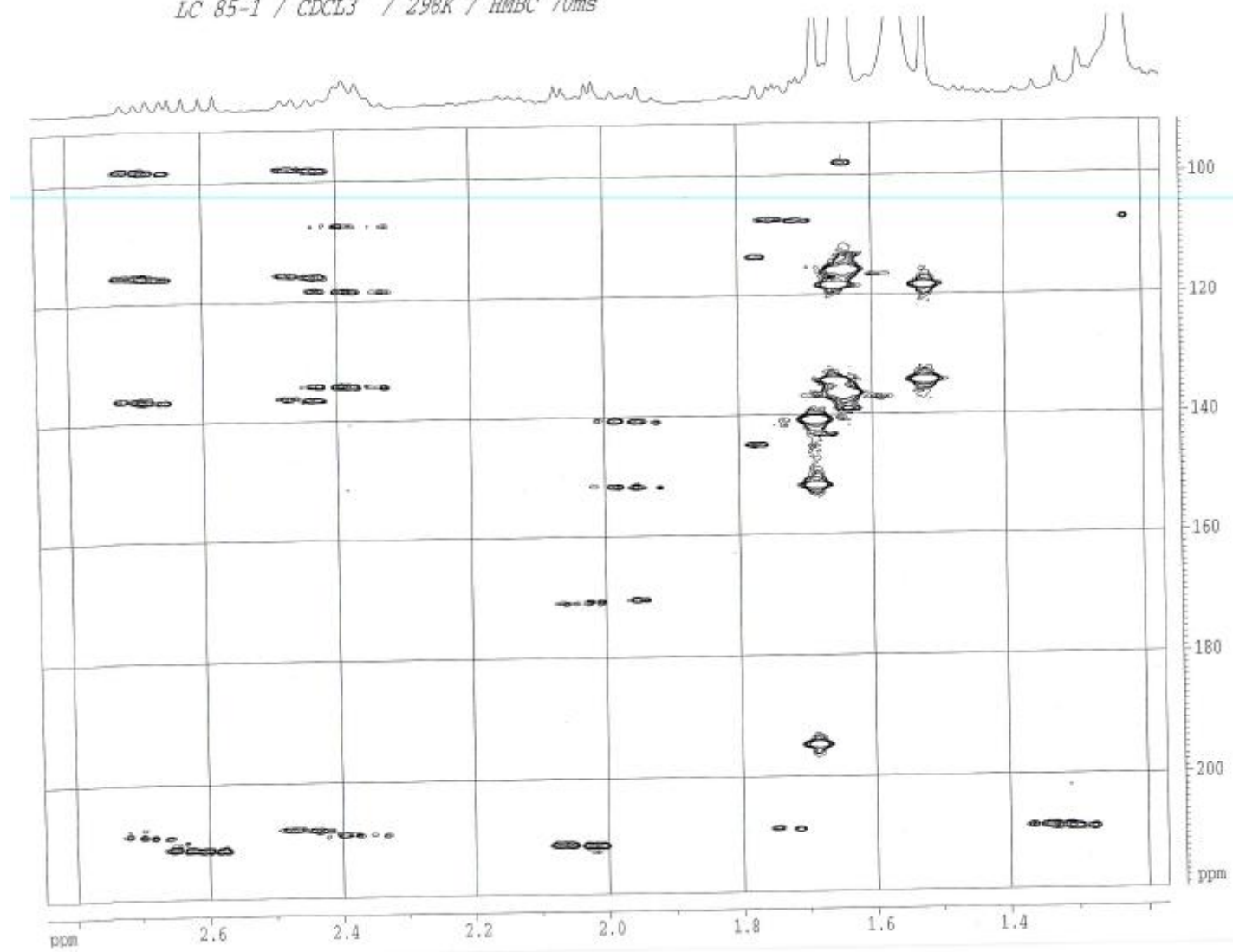
F1 - Processing parameters
SI         65536
SF         100.628175 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.00 Hz
GB         0

2D 900 plot parameters
CSI        22.00 cm
CPI        24.00 cm
F2FID0     6.429 ppm
F2FID1     2570.24 Hz
F2FID2     8.628 ppm
F2F11       151.49 Hz
F2F12       150.551 ppm
F2F13       2570.01 Hz
F2F14       4.714 ppm
F2F15       890.01 Hz
F2F16      0.36287 ppm/cm
F2F17      105.50251 kHz
F2F18      6.92887 ppm/cm
F2F19      476.11767 kHz

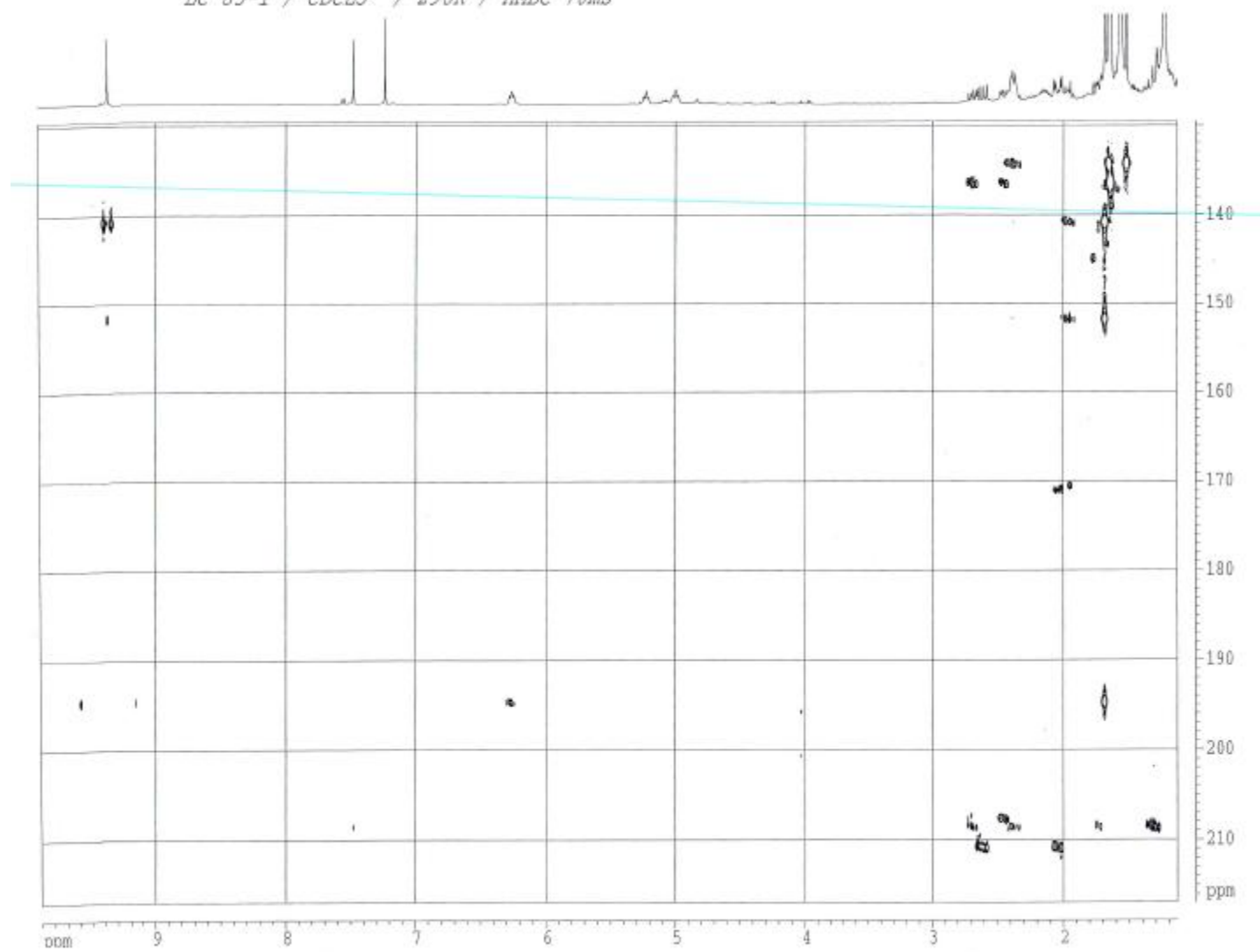
```



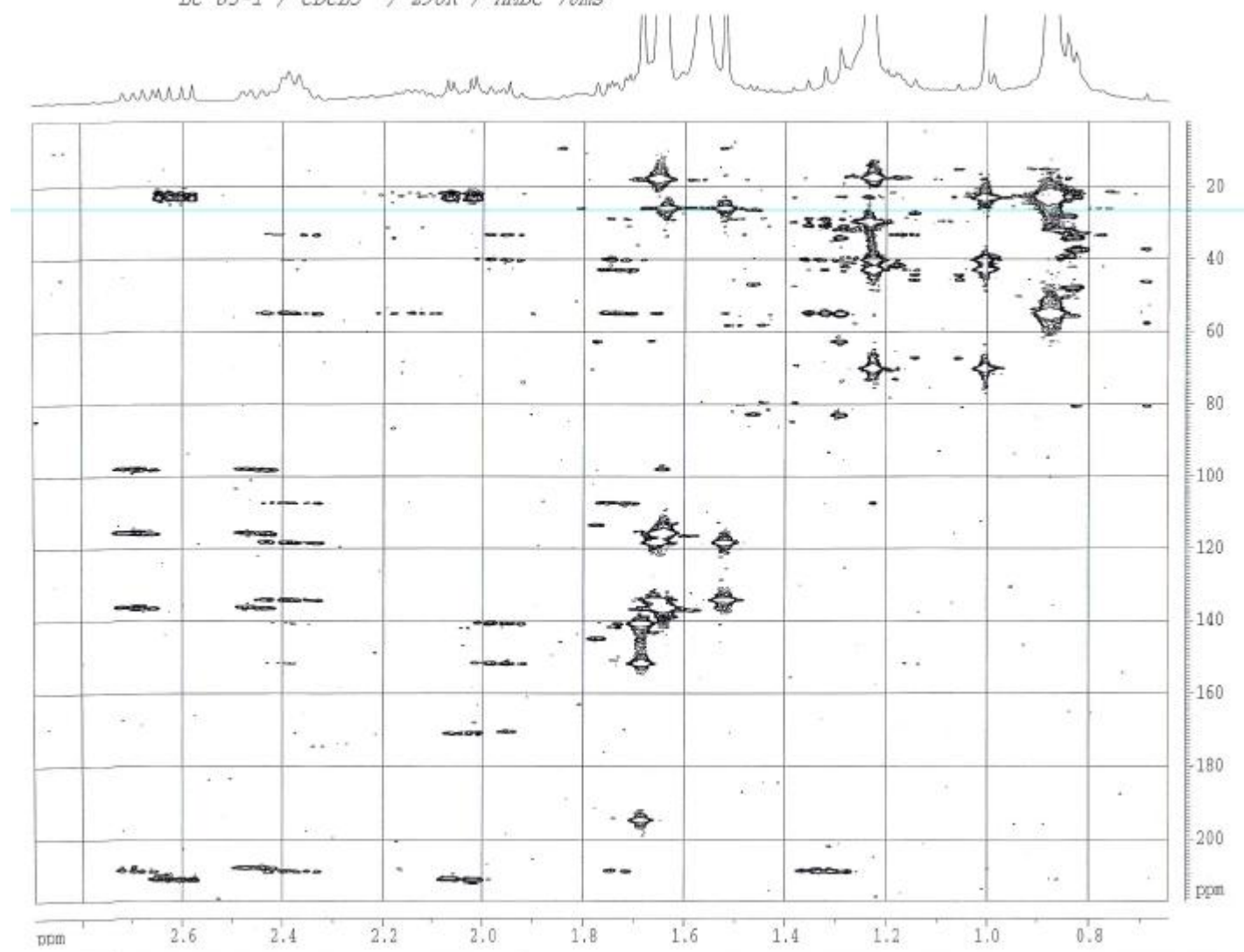
LC 85-1 / CDCL<sub>3</sub> / 298K / HMBC 70ms



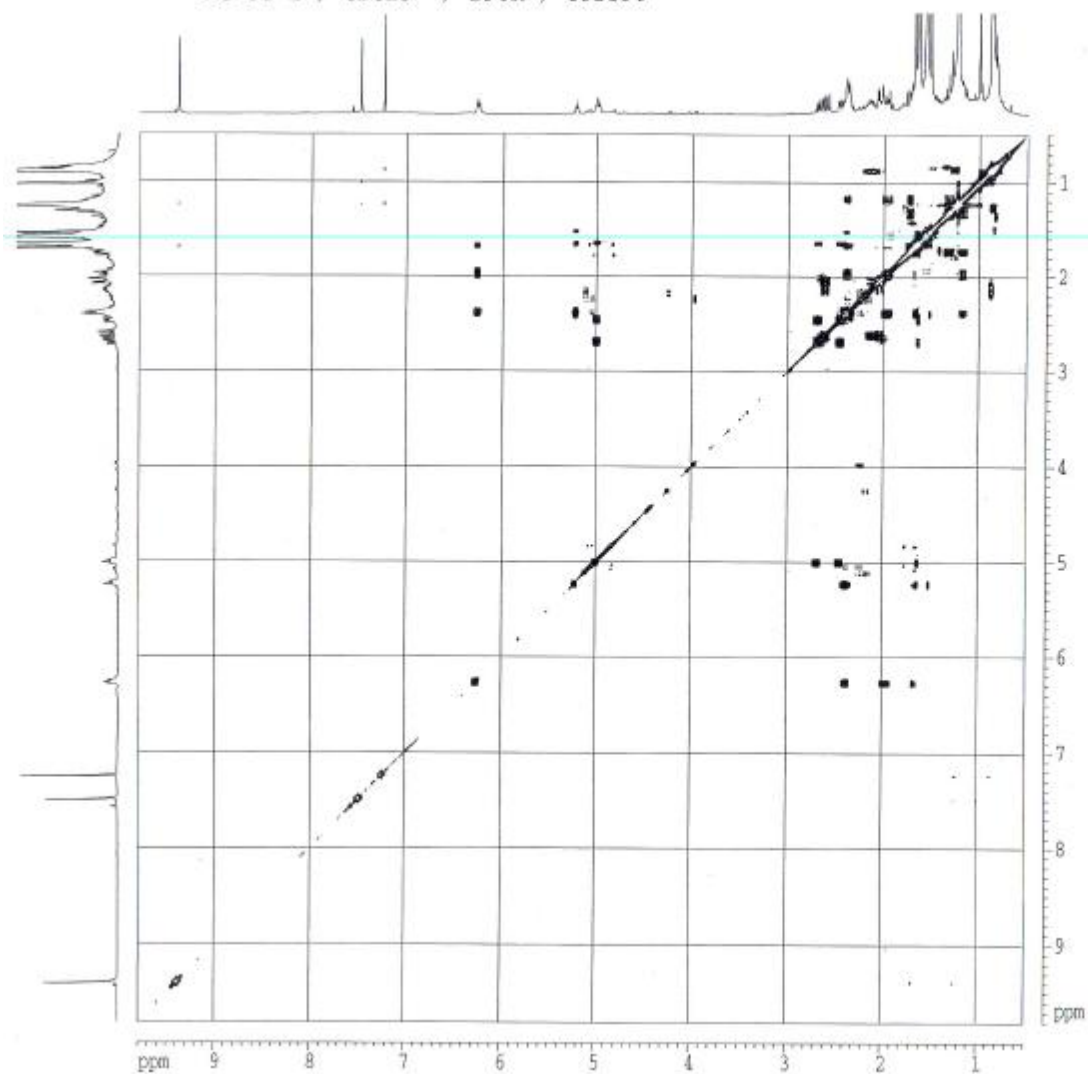
LC 85-1 / CDCL3 / 298K / HMBC 70ms



LC 85-1 / CDCL3 / 298K / HMBC 70ms



LC 85-1 / CDCL3 / 298K / COSY90



```

Current Data Parameters
NAME      chem01108
EXPNO    2
PROCNO   1

F1 - Acquisition Parameters
Date_     20081118
Time      15.11
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm BBI 1H-2H
PULPROG   zgpg30
TD         4096
SOLVENT   CDCL3
NS         16
DS         16
AQ         4401.489 Hz
FIDRES    1.074545 Hz
RG         0.4004882 sec
RO         480
RM         113.690 umax
DE         4.50 umax
TE         298.0 K
DQ         0.0060336 sec
O1         1.5080496 sec
O2         0.0040168 sec
O3         0.0041068 sec
LBO         0.00423728 sec

***** CHANNEL F1 *****
NUC1       1H
P1         5.18 umax
PC         5.18 umax
PL1        2.00 dB
SFO1      400.1520476 MHz

***** CHANNEL CHANNEL *****
GPMRG1    gpmc-180
GPMRG2    gpmc-180
GPR1       8.80 kHz
GPR2       8.80 kHz
GPR3       8.80 kHz
GPR4       8.80 kHz
GPR5       10.80 kHz
GPR6       10.80 kHz
P18        180.00 umax

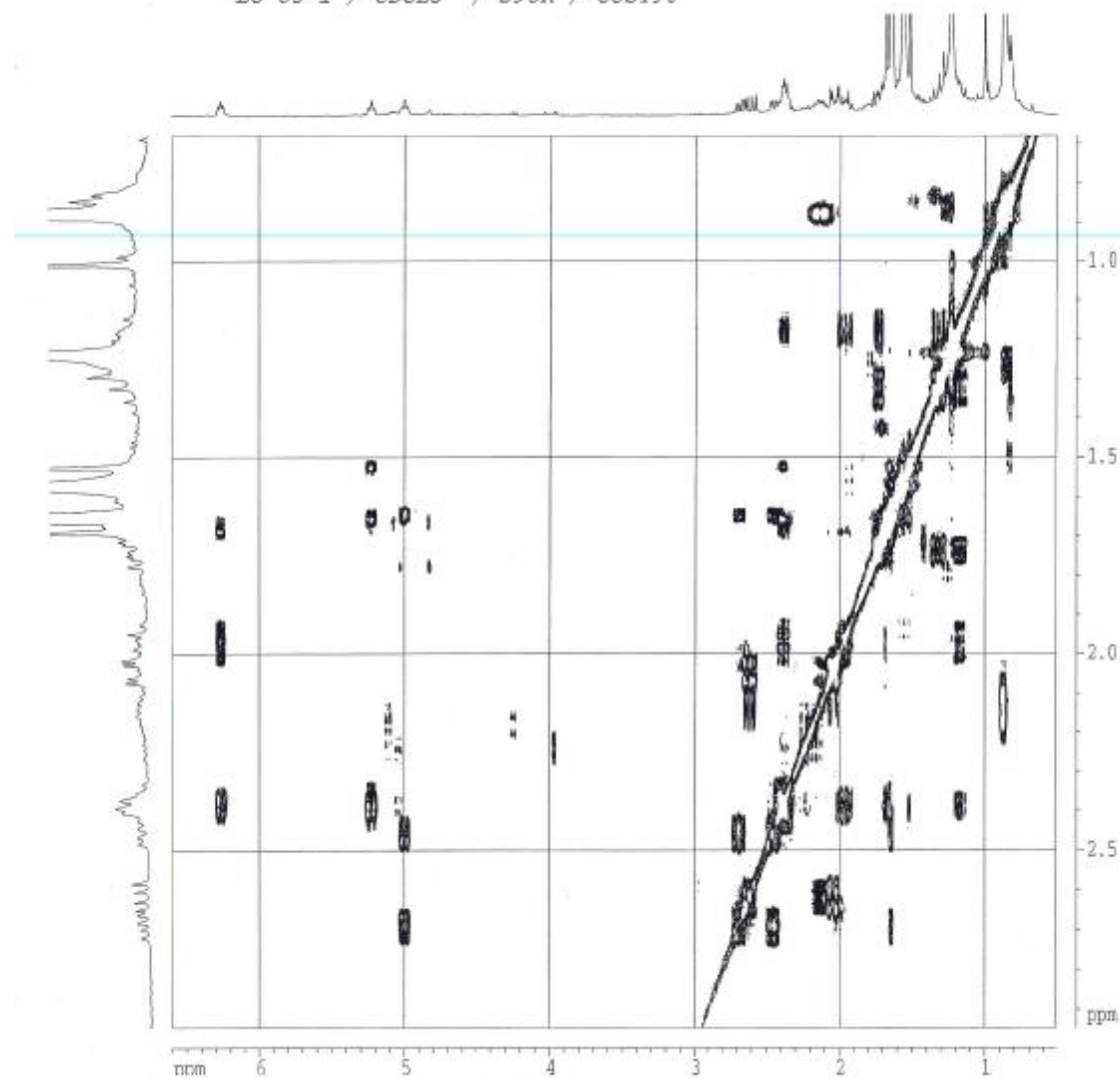
F1 - Acquisition parameters
RG          512
TD          400.152 MHz
SFO1        400.1520476 MHz
PULPROG     zgpg30
F2 - Processing parameters
SI           4096
SF           400.1520476 MHz
WDW          EM
SSB          0
LB           8.89 Hz
GB           0
PC           1.83

F1 - Processing parameters
SI           1024
SF           400.1520476 MHz
WDW          EM
SSB          0
LB           0.80 Hz
GB           0

3D 900 plot parameters
CX1         11.90 cm
CY1         11.90 cm
PZ1         9.800 ppm
FZ1         1921.27 Hz
F21         0.500 ppm
FZ2         200.07 Hz
F31         9.800 ppm
FZ3         1921.27 Hz
F41         0.500 ppm
FZ4         200.07 Hz
P2P2CH     6.42373 ppm/cm
P2D2CH     169.14587 Hz/cm
P1P2CH     6.42373 ppm/cm
P1D2CH     169.14587 Hz/cm

```

LC 85-1 / CDCL3 / 298K / COSY90



```

Current Data Parameters
NAME      chem81108
EXPNO    2
PROCNO    1

F1 - Acquisition Parameters
Date_     20051124
Time      16.11
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm BBI 1H-4H
PULPROG   zgpg30
TD         4096
SOLVENT   CDCl3
NS         16
DS         4
SWH        1481.628 Hz
FIDRES     1.274563 Hz
AQ         0.465492 sec
RG         618
DA         111.563 sec
DE         6.52 mm
TE         298.2 K
DQ         0.0000189 sec
SI         1.5000000 sec
SFI        0.0000189 sec
SFL        0.0001000 sec
SFR        0.0001720 sec

***** CHANNEL f1 *****
NUC1       1H
P1         9.30 nsec
PC1        9.30 nsec
RG1        3.00 dB
SFO1       499.132474 MHz

***** CHANNEL CDCL3 *****
SFO2       125.130 MHz
SFO3       125.130 MHz
SFO4       125.130 MHz
SFO5       125.130 MHz
SFO6       125.130 MHz
SFO7       125.130 MHz
SFO8       125.130 MHz
SFO9       125.130 MHz
SFO10      125.130 MHz
SFO11      125.130 MHz
SFO12      125.130 MHz
SFO13      125.130 MHz
SFO14      125.130 MHz
SFO15      125.130 MHz
SFO16      125.130 MHz
SFO17      125.130 MHz
SFO18      125.130 MHz
SFO19      125.130 MHz
SFO20      125.130 MHz
SFO21      125.130 MHz
SFO22      125.130 MHz
SFO23      125.130 MHz
SFO24      125.130 MHz
SFO25      125.130 MHz
SFO26      125.130 MHz
SFO27      125.130 MHz
SFO28      125.130 MHz
SFO29      125.130 MHz
SFO30      125.130 MHz
SFO31      125.130 MHz
SFO32      125.130 MHz
SFO33      125.130 MHz
SFO34      125.130 MHz
SFO35      125.130 MHz
SFO36      125.130 MHz
SFO37      125.130 MHz
SFO38      125.130 MHz
SFO39      125.130 MHz
SFO40      125.130 MHz
SFO41      125.130 MHz
SFO42      125.130 MHz
SFO43      125.130 MHz
SFO44      125.130 MHz
SFO45      125.130 MHz
SFO46      125.130 MHz
SFO47      125.130 MHz
SFO48      125.130 MHz
SFO49      125.130 MHz
SFO50      125.130 MHz

F1 - Acquisition Parameters
SI         1
SF         512
SFO1       499.132 MHz
FIDRES     0.51001 Hz
AQ         11.490 sec
RG         undetected

F2 - Processing parameters
SI         65536
SF         499.130175 MHz
WDW        SINC
SSB        0
LB         0.00 Hz
GB         0
PC         1.00

F1 - Processing parameters
SI         1634
SF         512
SFO1       499.130175 MHz
WDW        SINC
SSB        0
LB         0.00 Hz
GB         0
PC         0

2D 1H-1H plot parameters
CX1        22.00 cm
CY1        22.00 cm
CX2LD      0.494 ppm
CY2LD      2642.25 Hz
F2DHF1     0.516 ppm
F2DHF2     28.26 Hz
F2DHF3     2.946 ppm
F2DHF4     1178.84 Hz
F2DHF5     0.490 ppm
F2DHF6     271.81 Hz
F2DHF7     0.27673 ppm/cm
F2DHF8     118.12879 Hz/cm
F2DHF9     0.10181 ppm/cm
F2DHF10    41.22413 Hz/cm

```





LC 85-1 / CDCL3 / 298K / NOESY 500ms



```

Current Data Parameters
NAME      00000120
EXPNO    2
PROCNO   1

F1 - Acquisition Parameters
Date_    2003120
Time     15.11
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm QNP 1H-BB
PULPROG  zgpg30
TD        65536
SOLVENT  CDCl3
NS        512
DS        4
AQ        0.01428571 sec
FIDRES   1.074953 Hz
AQ       8.4154000 sec
RG        512
IN        115.800 MHz
DE        6.19 MHz
TE        298.2 K
RO        6.0000000 sec
F1       2.5000000 sec
SC        4.0000000 sec
SFO       500.136000 MHz
SFO2      125.761500 MHz
SFO3      101.623500 MHz

===== CHANNEL f1 =====
NUC1      1H
P1        9.10 sec
PR1       10.00 MHz
PL1       1.00 dB
SFO1      400.1424074 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2  zgpg30
NUC2      13C
PCPD2     8100.180
PCPD2     8.00 MHz
PCPD2     8.00 MHz
PCPD2     1.00 MHz
PCPD2     1.00 MHz
PCPD2     40.00 MHz
PCPD2     -40.00 MHz
SFO2      100.623500 MHz

F1 - Acquisition parameters
SI        32768
SF        400.1424074 MHz
FIDRES   0.194561 Hz
SI        11.800 MHz
PROCNO   1

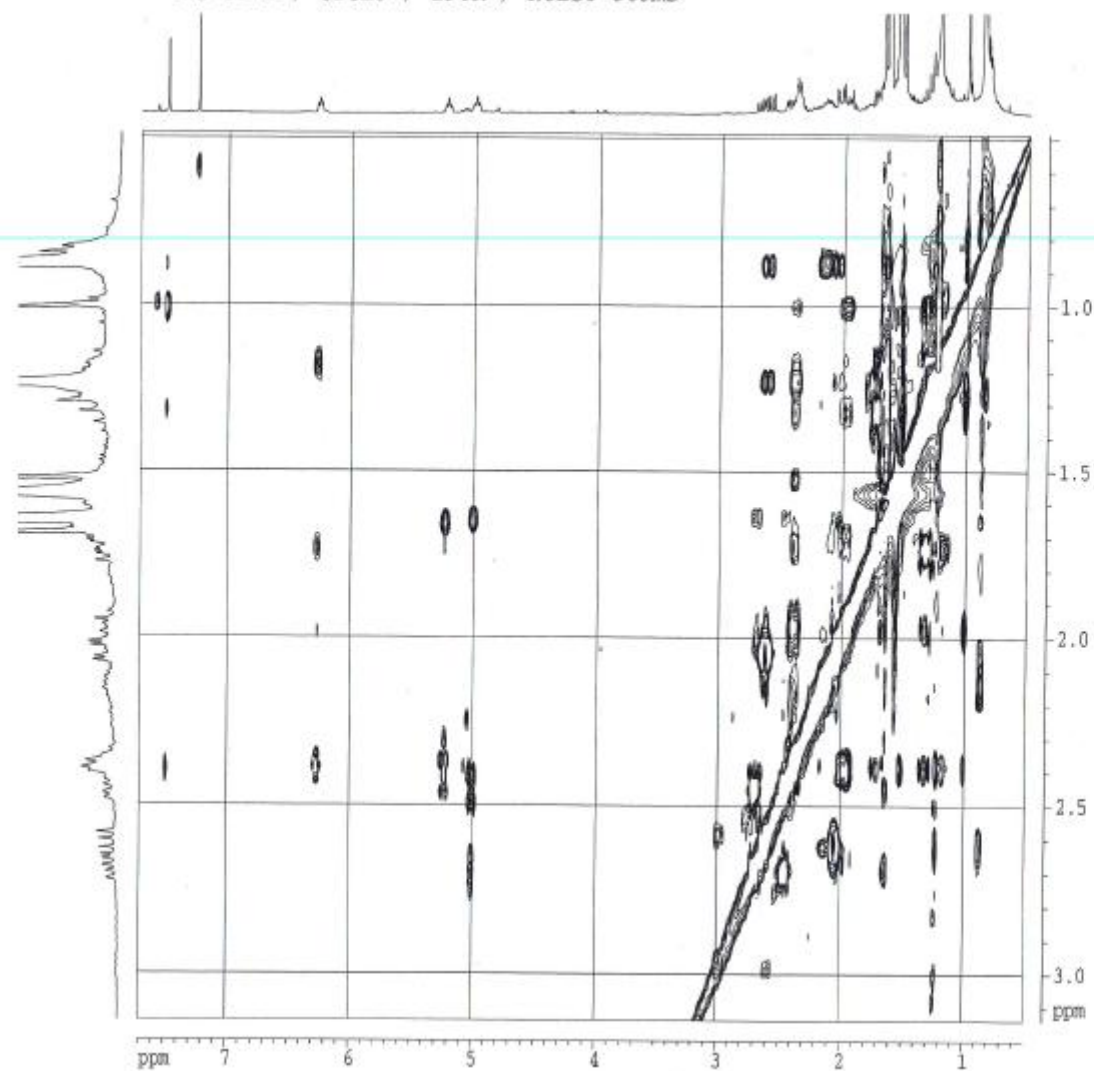
F2 - Processing parameters
SI        32768
SF        400.1424074 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0.30 Hz
GB        0
DC        1.00

F1 - Processing parameters
SI        32768
SF        100.623500 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0.30 Hz
GB        0

2D NMR plot parameters
CE2       22.00 cm
CX1       22.00 cm
F2P1O    1.100 ppm
F2P1S    100.00 Hz
F2P1SI   1.500 ppm
F2P1SI   100.00 Hz
F1P1O    1.100 ppm
F1P1S    100.00 Hz
F1P1SI   0.400 ppm
F1P1SI   100.00 Hz
F1P1SI   0.10000000 ppm/cm
F1P1SI   0.10000000 ppm/cm
F1P1SI   0.10000000 ppm/cm

```

LC 85-1 / CDCL3 / 298K / NOESY 500ms



```

Current Data Parameters
NAME      Beam01100
CFW0      1
PROC0     1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     2001128
Time      25.12
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm BBO 500
PULPROG   zgpg30
TD         4916
SOLVENT   CDCL3
NS         12
DS         16
SWH        4181.800 Hz
FIDRES    1.872621 Hz
AQ         0.4450000 sec
RG         320
DSW        113.600 Hz
DE         6.50 0000
TE         298.2 K
DQ         0.0000000 sec
DE         1.5000000 sec
DQ         0.5000000 sec
DE         0.0000000 sec
DE         0.7000000 sec
DE         0.0000000 sec

----- CHANNEL f1 -----
NUC1       13
P1         9.20 usec
PL         19.00 usec
PL1        1.00 dB
SFO1       400.132974 MHz

----- SPECTRO CHANNEL -----
ORIG0     atca.301
OPRG0     atca.320
SFO2       0.00 MHz
SFO1       0.00 MHz
SFO2       0.00 MHz
SFO1       40.00 MHz
SFO2       40.00 MHz
P1         1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
NUC1       13
TD         512
SFO1       400.132974 MHz
FIDRES    0.500001 Hz
SWH        11.000 ppm
PULPROG   zgpg30

F2 - Processing parameters
SI         16384
SF         400.132974 MHz
WDW        Q0318
SSB        2
LB         0.00 Hz
GB         0
PC         1.00

F1 - Processing parameters
SI         1024
SC2        5091
SF         400.132974 MHz
WDW        Q0318
SSB        2
LB         0.00 Hz
GB         0

10 900 plot parameters
CQ1        22.00 cm
CQ2        20.00 cm
PFL0       7.500 ppm
PFL1       3000.00 Hz
PFL2       0.500 ppm
PFL3       200.00 Hz
PFL4       1.100 ppm
PFL5       1250.00 Hz
PFL6       0.400 ppm
PFL7       104.54 Hz
PFL8       0.12115 ppm/cm
PFL9       100.00000 ppm/cm
PFL10      0.12000 ppm/cm
PFL11      48.25103 Hz/cm

```

