

**Raquel Cosmo de Lima**

**Limonóide de *Guarea kunthiana*  
com potencial leishmanicida**

Brasília, DF  
2006

**Raquel Cosmo de Lima**

**Limonóide de *Guarea kunthiana*  
com potencial leishmanicida**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como requisito para a obtenção de grau de Mestre em Ciências da Saúde, área de concentração: *Farmacognosia*.

**Orientadora:**  
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Laila Salmen Espíndola**

Brasília, DF  
2006

Ao Senhor Jesus, o Mestre dos mestres.  
Aos meus amados pais, que sempre me apoiaram em todas as  
etapas da vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, o Autor e Senhor da minha vida, fonte de força e sabedoria. Sem Ele nada teria sido possível. “*Porque dele, e por dele, e para ele são todas as coisas. A ele, pois, a glória eternamente. Amém*”. (Rm 11:36)

À orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Laila Salmen Espíndola, pelo seu caráter, pela maneira como conduziu a orientação, por ser exemplo de pesquisadora, por tirar recursos de onde não existem recursos e, principalmente, pelo grande testemunho de que “*o mundo é dos corajosos*”.

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia da UnB: Mariana, pelo auxílio no fracionamento do extrato; Karla e Everton, pelo auxílio com os testes biológicos; Alice, Lorena, Nashira, Ellen, Thiago André, Jair, Daniella e Clarice pelo trabalho em equipe, amizade e companheirismo de todos.

Ao Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães, pela cooperação e acolhimento do nosso grupo de estudo em um dos momentos mais cruciais para o desenvolvimento deste trabalho e por aceitar compor a banca examinadora deste.

Ao Prof. Dr. José Elias de Paula, pela coleta e identificação da espécie *Guarea kunthiana*, pelo exemplo humano e por aceitar compor a banca examinadora deste trabalho.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Angèle Mambu, do Laboratório de Química e Bioquímica de Produtos Naturais do Museu Nacional de História Natural de Paris, pela elucidação da molécula isolada.

Ao Prof. Dr. Jaime Santana por sua constante colaboração científica com o nosso laboratório e por aceitar compor a banca examinadora deste trabalho.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília e a todos os professores que contribuíram na construção do meu conhecimento.

Aos meus pais, Raimundo e Mirian, exemplos de lutadores, pelo amor e dedicação, apoio emocional e financeiro, por acreditarem na minha capacidade e por tornarem possível a realização de mais esta etapa.

Aos meus irmãos, Raimundo, Luiza, Edson e Luis Carlos, e ao meu noivo, Josué Júnior, pelo apoio e incentivo, tornando mais fácil o desenvolvimento deste trabalho, e por compreenderem as minhas muitas ausências.

Às amigas Fanny e Paula, pelo companheirismo, dentro e fora da Universidade, pelas palavras de ânimo e por me apresentarem a pessoa mais importante da minha vida, o Senhor Jesus.

Aos amigos: Patrícia, Carlos, Simone, César, Pr. Josué, Ir. Ilza, Camila, Tiago, Carol, Samuel, Sandra Barbosa, Sandra Helena, Elenilda, Rose e Neula, por compartilharem alegrias e tristezas durante este período.

Aos meus queridos sobrinhos: Alexandre, Camyla, Eduardo, Gabriel, Gisele, Luiz Felipe e Rafael, pelo carinho e por deixarem a "Tita" terminar de escrever.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho.

**Muito obrigada.**

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	II
AGRADECIMENTOS	III
SUMÁRIO	V
LISTA DE ABRVIATURAS	VI
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	34
MATERIAIS E MÉTODOS	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
CONCLUSÃO	54
PERSPECTIVAS	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	67

**LISTA DE ABREVIATURAS**

µg	– micrograma
µg/mL	– micrograma por mililitro
µL	– microlitro
1 D	– unidimensional
2 D	– bidimensional
A	– água
AAc	– ácido acético
AE	– acetato de etila
Am	– amastigotas
C	– caule
CC	– casca do caule
CCD	– cromatografia em camada delgada
Cf	– clorofórmio
Ch	– ciclohexano
COSY	– espectroscopia de correlação ( <i>correlated spectroscopy</i> )
D	– diclorometano
D	– diclorometano
DMSO	– dimetilsulfóxido
E	– etanol
EA	– extrato de alcalóides totais
EB	– extrato bruto
Ef	– fração clorofórmica do extrato bruto etanólico
EM-EM	– espectrometria de massa Tandem
EP	– éter de petróleo
F	– folha
Fl	– flor
FM	– faculdade de medicina
Fr	– fruto
FS	– faculdade de ciências da saúde
g	– grama
GQ	– grupamento químico
H	– hexano
h	– hora
HC	– hidrodestilação (Clevenger)
HIV	– vírus da imunodeficiência humana
HMBC	– <i>heteronuclear multiple bond coherence</i>
HSQC	– <i>heteronuclear single-quantum coherence</i>
IAm	– inativo sobre amastigotas
IC <sub>100</sub>	– concentração inibitória de 100% da população
IC <sub>50</sub>	– concentração inibitória de 50% da população
IC <sub>90</sub>	– concentração inibitória de 90% da população
If	– inflorescência
IPm	– inativo sobre promastigotas
kg	– quilograma
M	– metanol
m	– metro

---

MC	– madeira do caule
mg	– miligrama
mg/kg	– miligrama por quilograma
mL	– mililitro
mm	– milímetro
nM	– nanomolar
NOESY	– espectroscopia do efeito nuclear Overhauser ( <i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i> )
OE	– óleo essencial
P	– toda planta
PAr	– partes aéreas
Pm	– promastigota
Rf	– fator de retenção
RMN	– ressonância magnética nuclear
S	– sementes
SI	– substância isolada
UB	– Herbário da Universidade de Brasília
UnB	– Universidade de Brasília



## RESUMO

A leishmaniose é uma doença negligenciada endêmica em vários países, considerada um severo problema de saúde pública. O número de casos tem aumentado por diversos fatores, sobretudo, a co-infecção com HIV. As formas de manifestações clínicas são: tegumentar (cutânea, cutânea difusa e mucocutânea), que atinge pele e mucosas, e visceral (calazar), que atinge órgãos internos. O tratamento atualmente disponível inclui antimônio, pentamidina e anfotericina B, sendo que esses causam sérios efeitos adversos, além dos casos de resistência. O interesse em se investigar moléculas eficazes e com menor toxicidade inclui o potencial biológico de compostos extraídos de espécies vegetais. Diante disso, foi realizada uma triagem do Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado do Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. O extrato hexânico da madeira da raiz de *Guarea kunthiana* da família Meliaceae apresentou atividade com IC<sub>100</sub> de 125 µg/mL. O fracionamento químico biomonitorado do extrato ativo em coluna cromatográfica aberta de sílica resultou na obtenção de 19 grupos (G). Os mais ativos foram G1 (IC<sub>100</sub> = 75 µg/mL), G5 (IC<sub>100</sub> = 18,75 µg/mL), G8 (IC<sub>100</sub> = 75 µg/mL) e G17 (IC<sub>100</sub> = 37,5 µg/mL), dos quais, até o momento, temos resultados promissores para G17. O G17 permitiu o isolamento do triterpeno limonóide 22,24-diepoxitirucall-7-en-3-ona, com potencial leishmanicida, elucidado por meio de técnicas espectrométricas de ressonância magnética nuclear (RMN) de uma dimensão (1D) (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) e bidimensional (2D) (COSY, HSQC, HMBC, NOESY), incluindo espectrometria de massa Tandem (EM-EM). Até onde conhecemos, o limonóide 22,24-diepoxitirucall-7-en-3-ona é inédito na espécie *Guarea* e na família Meliaceae; além de não terem sido reportados dados sobre a atividade anti-*Leishmania* para limonóides. O triterpenóide isolado neste trabalho é promissor para novos estudos e permitirá prosseguir na busca de opções terapêuticas para o controle da leishmaniose.

Palavras-chave: leishmaniose, triagem, Cerrado, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Guarea kunthiana*.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected disease that affects many countries and is a severe public health problem. The number of cases has been increasing mainly due to *Leishmania*-HIV co-infection. The clinic forms include tegumentar (cutaneous, diffuse cutaneous and muco-cutaneous leishmaniasis), which affects skin and mucous membrane, and visceral (kala-azar), which affects internal organs. The available therapies include antimony, pentamidine and amphotericin B, which cause serious side effects, as well as resistance cases. Interest in investigating new active molecules with lower toxicity include compounds extracted from vegetal species. Towards this end, we performed a Bank Extract screening against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. The hexanic extract of Meliaceae family *Guarea kunthiana* root wood showed  $IC_{100}$  of 125  $\mu\text{g/mL}$ . The active extract bioguided fractionating in the open silica chromatographic column produced 19 groups (G). The most active were G1 ( $IC_{100} = 75 \mu\text{g/mL}$ ), G5 ( $IC_{100} = 18,75 \mu\text{g/mL}$ ), G8 ( $IC_{100} = 75 \mu\text{g/mL}$ ) and G17 ( $IC_{100} = 37.5 \mu\text{g/mL}$ ). Until now, we have promising results for G17. G17 fractionating allowed 22,24-diepoxitirucall-7-en-3-one limonoid triterpene isolation, with leishmanicidal potential. This compound was elucidated by spectrometric methods of NMR ( $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, COSY, HSQC, HMBC, NOESY), including Tandem mass spectrometry (EM-EM). To the best of our knowledge, 22,24-diepoxitirucall-7-en-3-one limonoid is unpublished in *Guarea* spp. and Meliaceae family, nor is there information regarding limonoids action against *Leishmania*. Thus, 22,24-diepoxitirucall-7-en-3-one limonoid is promising for new studies, towards the identification alternative options for leishmaniasis control.

Key-words: leishmaniasis, screening, Cerrado, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Guarea kunthiana*.

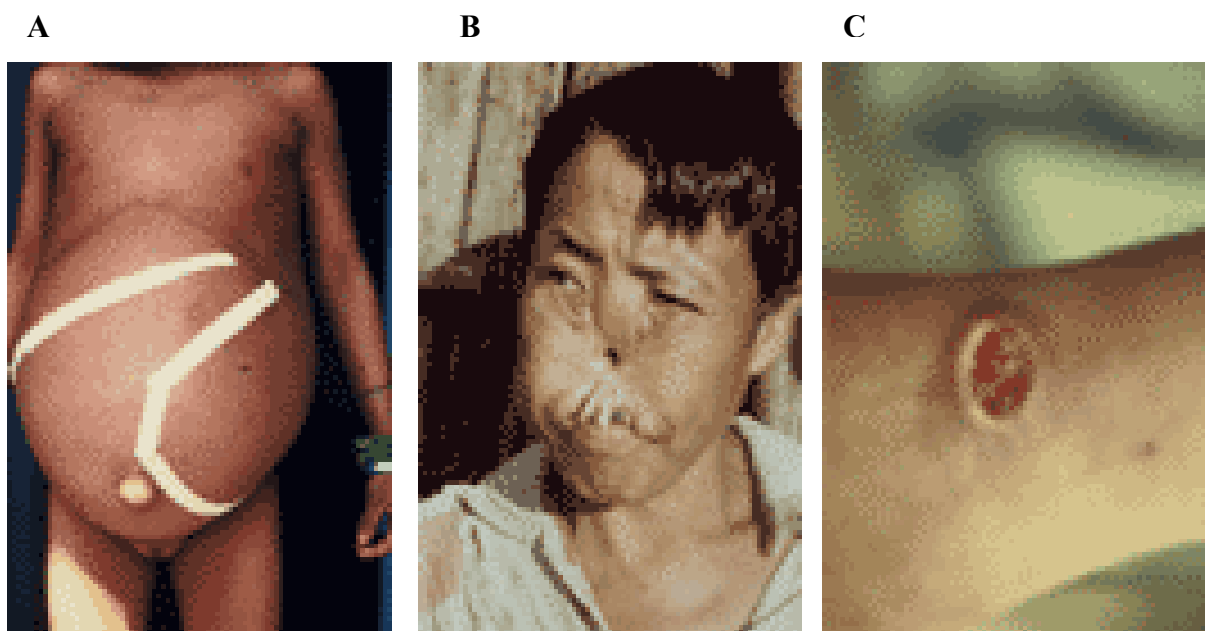
## INTRODUÇÃO

Algumas doenças infecciosas que acometem, principalmente, países em desenvolvimento são negligenciadas por diversos fatores e, sobretudo, pela falta de retorno financeiro na investigação de novos medicamentos para o seu tratamento (Desjeux, 2001). Nesse contexto, podemos inserir a leishmaniose, que é endêmica em 88 países, apresenta prevalência mundial estimada em 12 milhões e por volta de 350 milhões de pessoas estão em áreas de risco de contágio. Portanto, a leishmaniose é um severo problema de saúde pública, que tende a aumentar devido a fatores de risco ambiental como migrações em massa, urbanização e desmatamento e, também, a fatores de risco individual como HIV, desnutrição e genética (Desjeux, 2001). No Brasil, estudos demonstram a ocorrência de, aproximadamente, 20.000 novos casos anuais da doença (Carvalho e Ferreira, 2001).

Suas formas clínicas (**Figura 1**), são particularmente diversas representando um quadro complexo de doenças: a leishmaniose visceral; a leishmaniose mucocutânea e a leishmaniose cutânea difusa (Desjeux, 2004). A leishmaniose cutânea apresenta lesões em forma de pápulas que progridem para nódulos ou úlceras abertas. Essas lesões costumam persistir por vários meses ou anos. A forma mucocutânea atinge não só a pele, mas também as membranas mucosas faciais (Arevalo *et al.*, 2001). Ambas são endêmicas na América do Sul, particularmente nas áreas sub-andinas (Fournet *et al.*, 1993). A forma visceral (calazar) se caracteriza pela presença de parasitas no baço, fígado, medula óssea e sistema reticuloendotelial. Os pacientes apresentam hepatoesplenomegalia e pancitopenia. Normalmente, a morte pode ocorrer no indivíduo não tratado entre dois e três anos, porém, em muitas formas agudas da doença, a morte pode ocorrer entre 6 e 12 meses (Cunningham, 2002). Esta forma é considerada uma doença oportunista importante em pessoas infectadas pelo HIV (Jha *et al.*, 1999).

A doença é causada por um parasita do gênero *Leishmania* e transmitida por flebótomos fêmeas dos gêneros *Lutzomia* (novo mundo) e *Phlebotomus* (velho mundo; **Figura 2**). É no intestino do vetor que o parasita se multiplica e se torna infectante entre 8 e 20 dias. Sua epidemiologia também é extremamente diversa: aproximadamente 20 espécies de *Leishmania* são patogênicas para humanos e 30 espécies de flebótomos são possíveis vetores (Desjeux, 2004).

Afeta, principalmente, pessoas de países em desenvolvimento e, nesse caso, as pessoas das classes sócio-econômicas mais baixas. A leishmaniose, também, apresenta uma grande diversidade de manifestações clínicas: lesões ulcerativas na pele, inflamação destrutiva da mucosa e infecção visceral disseminada, conhecida como calazar. A imunopatologia e a evolução da doença são, igualmente, diversas, pois a infecção ocorre em várias regiões endêmicas, em adultos e crianças (Desjeux, 2004).



**Figura 1.** Formas clínicas de leishmaniose: visceral (A), muco-cutânea (B) e cutânea (C).

(Fonte: [http://www.who.int/leishmaniasis/disease\\_epidemiology/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/index.html).)

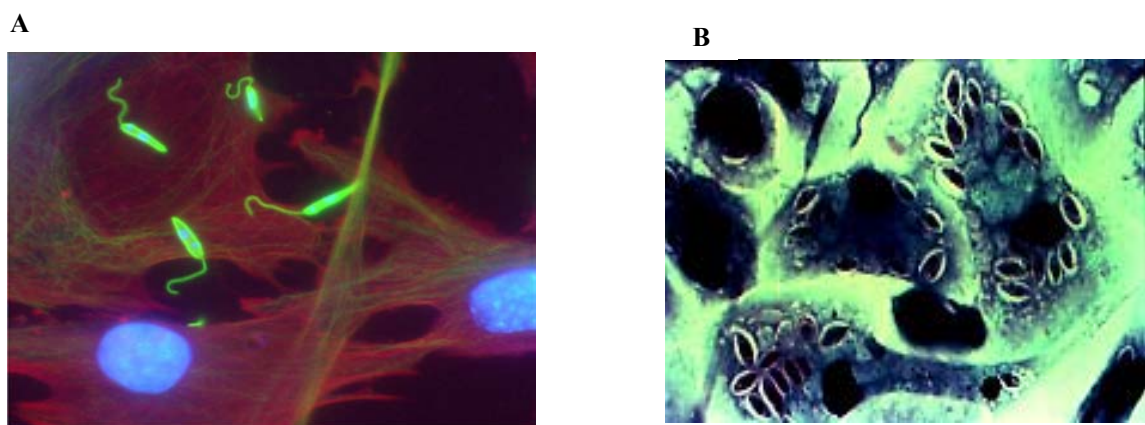


**Figura 2.** Flebotomíneo, vetor da leishmaniose.

(Fonte<sub>A</sub>: [http://www.who.int/leishmaniasis/disease\\_epidemiology/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/index.html)  
Fonte<sub>B</sub>: <http://www.icp.ucl.ac.be/~opperd/parasites/images/dia35.jpg>.)

Além disso, a leishmaniose acarreta a morte de 70.000 pessoas por ano. No Brasil, há ocorrência tanto da leishmaniose cutânea quanto da visceral (Desjeux, 2004). Os principais reservatórios para o parasita são roedores, cachorros, marsupiais, outras populações de animais selvagens e o homem (Rocha *et al.*, 2005).

O parasita existe em duas formas: a forma flagelada promastigota (**Figura 4A**) dentro do flebótomo fêmea, que é o vetor, e a forma amastigota (**Figura 4B**) dentro de um mamífero hospedeiro. As formas amastigotas são parasitas intracelulares de macrófagos, raramente de outras células, onde se multiplicam dentro de um vacúolo fagolisossômico (Guerin, 2002).



**Figura 4.** Formas de *Leishmania* spp. Forma promastigota (A) e forma amastigota visível nos fagolisossomos de macrófagos infectados (B).

(Fonte<sub>A</sub>: <http://outlook.wustl.edu/winter2004/picturepage.html>  
Fonte<sub>B</sub>: <http://www.icp.ucl.ac.be/~opperd/parasites/images/dia42.jpg>)

Os flebótomos, ao picar, inoculam na pele as formas promastigotas flageladas, que invadem ou são fagocitadas pelo recrutamento local e imediato das células hospedeiras, incluindo neutrófilos. Dentro do fagolisossomo do macrófago hospedeiro, as formas promastigotas sobreviventes se transformam em amastigotas e se replicam, infectando outros macrófagos, tanto localmente quanto em tecidos distantes, após a disseminação (**Figura 5**). Com períodos de incubação de semanas a meses, os eventos procedentes culminam na manifestação clínica da doença (Belkaid *et al.*, 2000). Entretanto, a leishmaniose visceral pode ser adquirida, também, diretamente pelas formas amastigotas por meio de agulhas contaminadas, transfusão de sangue, via placentária ou transplante de órgãos (Cruz *et al.*, 2002).

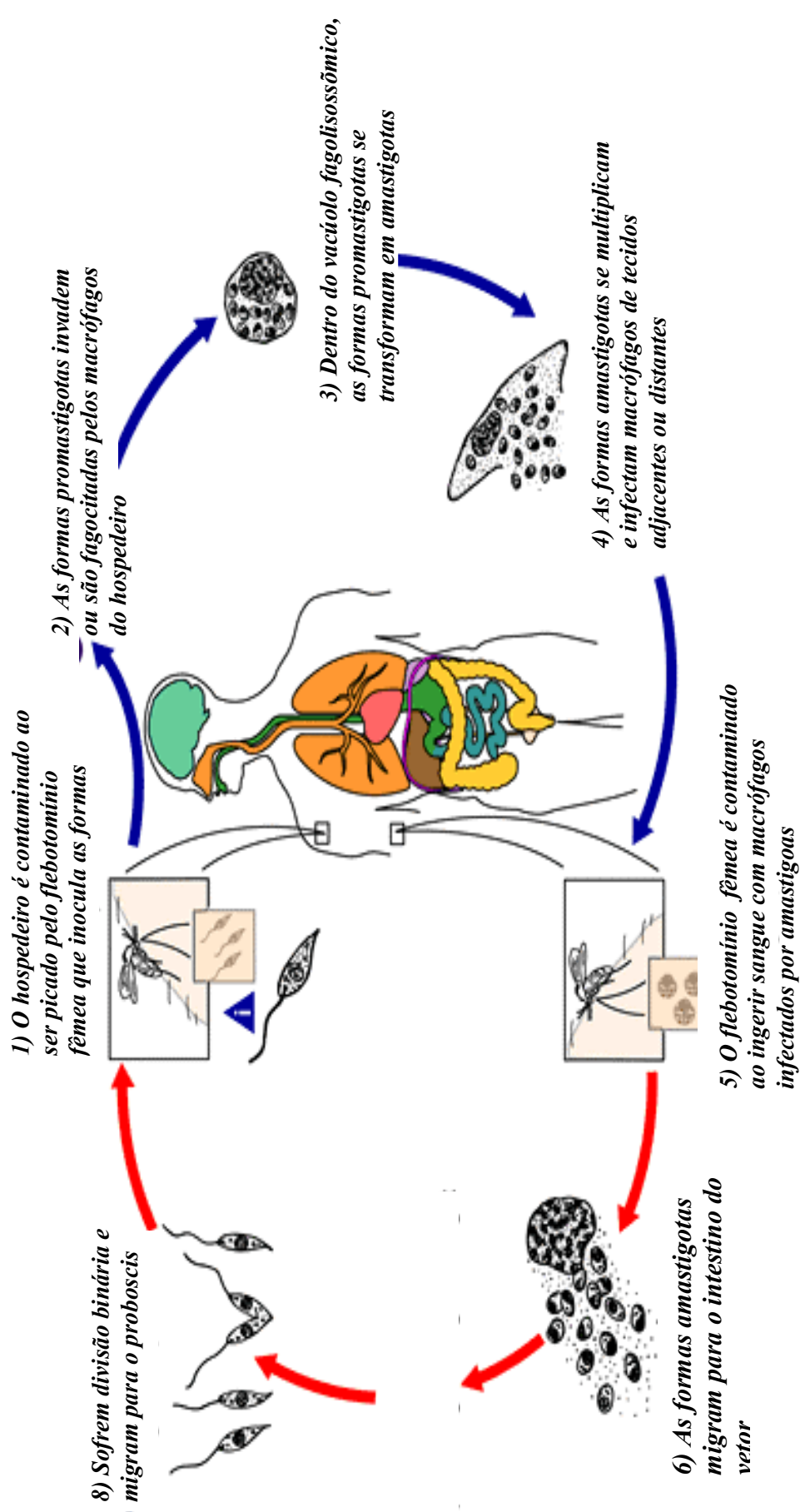
Em relação às formas de infecção, todas culminam em três características: os macrófagos dos tecidos são o principal alvo e suportam a replicação intracelular do parasita, a resposta imunoinflamatória regula a expressão e evolução da doença e ocorre uma infecção persistente do tecido (Murray *et al.*, 2005).

Pode-se dizer que várias espécies de *Leishmania* causam leishmaniose cutânea, principalmente *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, e *Leishmania (Leishmania) aethiopica* (leishmaniose cutânea do velho mundo); *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* (regiões próximas ao mar Mediterrâneo); *Leishmania mexicana*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania (Viania) panamensis*, *Leishmania (Viania) peruviana* e *Leishmania (Viania) guyanensis* (leishmaniose cutânea do novo mundo; Murray *et al.*, 2005). A *Leishmania amazonensis* é uma das principais espécies causadoras da leishmaniose cutânea difusa, que, normalmente, não responde ao tratamento atualmente conhecido (Fournet *et al.*, 1994). As áreas de países com alta endemia de leishmaniose cutânea podem ser observadas na **Figura 6**.

A leishmaniose visceral é causada pela *Leishmania donovani* na Índia, Ásia e África (em adultos e crianças), pela *Leishmania infantum* ou *Leishmania chagasi* na região mediterrânea, parte sul e central da Ásia e na América do Sul (principalmente em crianças) e outras espécies, como *Leishmania tropica* e *Leishmania amazonensis*, são, eventualmente, causadoras da leishmaniose visceral em áreas tropicais (Desjeux *et al.*, 2004). A espécie *Leishmania amazonensis* é muito comum no Brasil e tem sido associada a todas as formas da doença, principalmente a cutânea (Leon *et al.*, 1992). As áreas de países com alta endemia de leishmaniose visceral podem ser observadas na **Figura 7**.

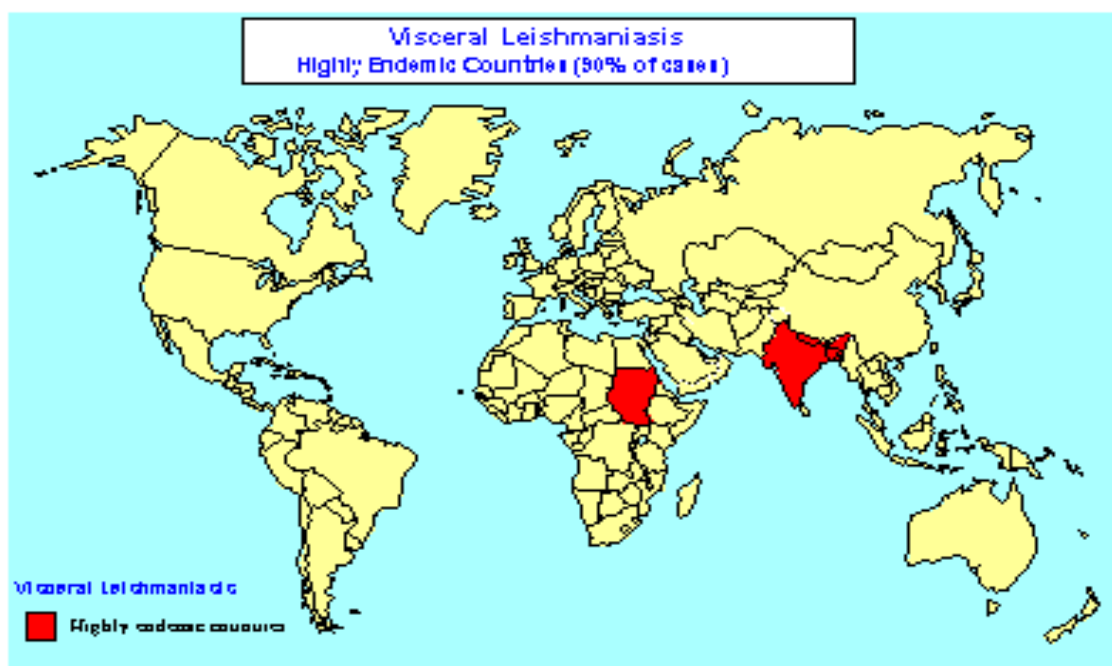
As manifestações de uma infecção recém adquirida variam de nenhuma (subclínica) a múltiplos sintomas, até está completamente estabelecida (calazar; Murray *et al.*, 2005). As manifestações subclínicas da doença, especialmente em casos de espécies tropicais causadoras da leishmaniose visceral, podem permanecer inteiramente assintomáticas (Desjeux, 2004), conforme a suscetibilidade do hospedeiro, a idade em que ocorreu a infecção, o estado nutricional e a eficácia das respostas imune inata e adquirida (Machado-Coelho *et al.*, 2005). A maioria das infecções por *Leishmania* clinicamente aparentes permanecem localizadas na pele ou em linfonodos adjacentes. Entretanto, certas espécies migram para a mucosa nasal e orofaríngea, múltiplos locais cutâneos, fígado, baço, medula óssea e linfonodos distantes (calazar; Murray *et al.*, 2005).

As características da leishmaniose cutânea e da visceral também variam substancialmente dentro de cada região endêmica, sugerindo uma interação entre as propriedades locais do parasita, a biologia do vetor e os fatores do hospedeiro. As variações regionais incluem: a população alvo (crianças versus adolescentes e adultos), achados clínicos particulares, possibilidade de tratamento e risco de recorrência. Os tratamentos e a resposta a esses também variam de acordo com a região (Desjeux, 2004).



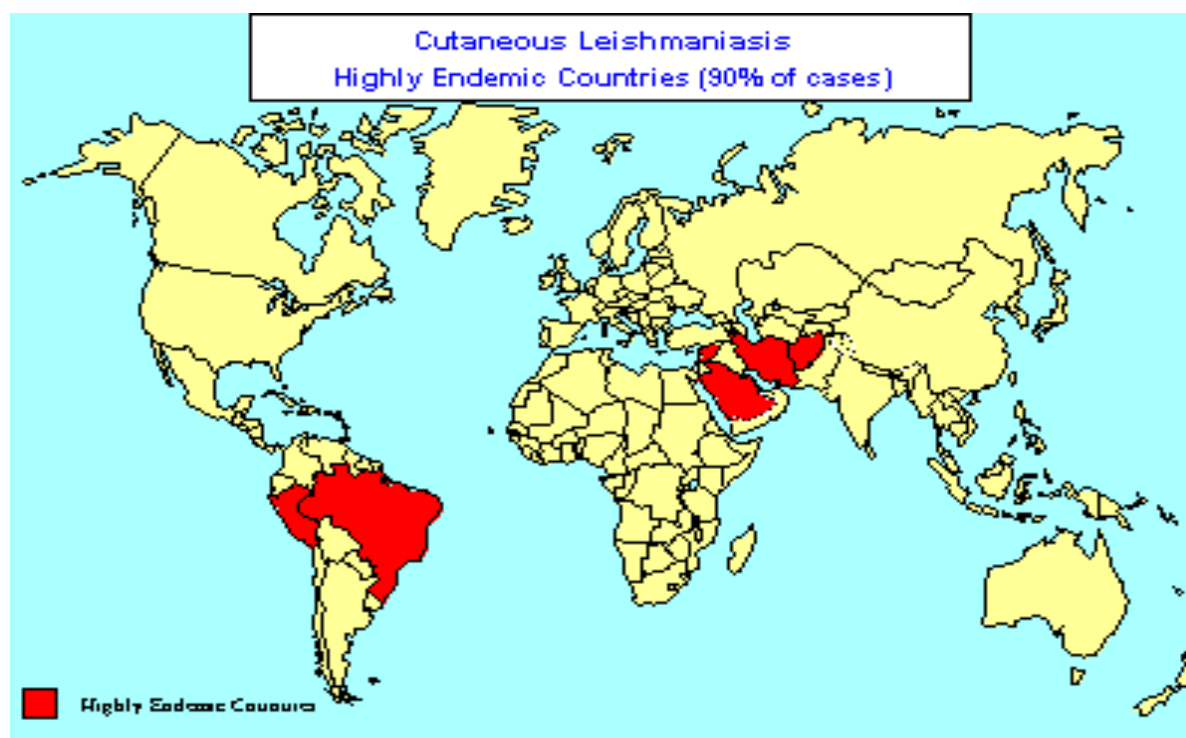
**Figura 5.** Ciclo de *Leishmania* spp.  
Fonte: [www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Search\\_Choices.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Search_Choices.htm)





**Figura 7.** Países de alta endemia de leishmaniose visceral.

(Fonte: [http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\\_maps/en/index2.html](http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index2.html).)



**Figura 6.** Países de alta endemia de leishmaniose cutânea (90% dos casos).

(Fonte: [http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\\_maps/en/index2.html](http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index2.html).)

Apesar do progresso feito no conhecimento biológico das espécies de *Leishmania* e das possibilidades clínicas apresentadas por alguns agentes quimioterápicos, por mais de 90 anos nenhum novo medicamento foi incluído no tratamento da leishmaniose desde a introdução dos agentes antimoniais por Gaspar Vianna (Vianna, 1914). Muitos novos compostos têm sido estudados (Delorenzi *et al.*, 2001); porém, para que esses viabilizassem o desenvolvimento de um novo medicamento seria necessário estabelecer um aprimoramento das relações entre a indústria farmacêutica e pesquisadores (Davis *et al.*, 2004).

Grande parte dos medicamentos em estudo para tratamento da leishmaniose são apenas novas formulações, ou novas formas farmacêuticas, de medicamentos já utilizados em infecções por *Leishmania* (Mendonça-Filho *et al.*, 2003). O tratamento atualmente disponível inclui a pentamidina e a anfotericina B, sendo que ambos causam sérios efeitos adversos. Além disso, o melhoramento de formulações, como a anfotericina B encapsulada em lipossomo, não é acessível a muitos países afligidos pela leishmaniose. Assim, é confirmada a necessidade urgente de desenvolvimento de novos medicamentos (Kayser *et al.*, 2003a).

#### ***Antimônios Pentavalentes:***

Os antimônios foram os primeiros a serem utilizados há quase um século. Inicialmente, foram utilizados os trivalentes (Sb III) e, em seguida, foram descobertos os antimônios pentavalentes, que demonstraram eficácia sobre a leishmaniose visceral e menor toxicidade. Até o momento, os agentes antimoniais continuam sendo os principais medicamentos utilizados exceto, talvez, em um estado da Índia denominado Bihar, onde a resistência é endêmica e não há opções de tratamento (Sundar, 2001). Seu mecanismo de

ação ainda não é bem definido, existindo a possibilidade de haver mais de um mecanismo responsável por sua ativação (Oullette *et al.*, 2004).

Para ser ativo, o antimônio pentavalente (Sb V) precisa entrar na célula do hospedeiro, cruzar a membrana fagolisossômica, e atuar sobre as formas amastigotas. Além disso, precisa ser convertido na forma trivalente (Sb III), que é a responsável pela atividade. Portanto Sb V é considerado um pró-fármaco (Oullette *et al.*, 2004). Casos em que não existe resposta eficaz ao tratamento com antimônio pentavalente já são conhecidos há algum tempo e o número desses casos têm aumentado desde a ocorrência da co-infecção de *Leishmania* e HIV (Leandro e Campino, 2003).

### ***Pentamidina:***

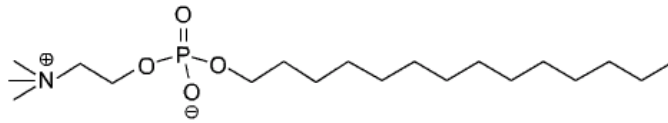
Os sais de pentamidina (**Figura 8**) têm sido utilizados como medicamentos de segunda escolha; entretanto, na Índia, está ocorrendo o declínio de sua eficácia, o que sugere que os parasitas estão se tornando resistentes (Sundar, 2001). A pentamidina é concentrada ativamente pela mitocôndria do parasita onde é capaz de inibir a topoisomerase II mitocondrial (Basselin *et al.*, 1996). É conhecido que atividade da enzima topoisomerase II é acentuadamente aumentada em células em proliferação e consiste em promover um giro em torno da forquilha de replicação do DNA para que a molécula-filha originada seja liberada no momento da segregação mitótica. A enzima promove o giro em torno do eixo, efetua um corte em ambos filamentos do DNA e, posteriormente, procede à reunião das rupturas (Rang e Dale, 2001).

A considerável toxicidade da pentamidina é associada à hipotensão, hipoglicemia, diabetes e neurotoxicidade, restringindo seu uso e causando o abandono do tratamento. Quando utilizada em associação, pode aumentar a atividade antileishmanial de outros medicamentos (Sundar, 2001).



**Miltefosina (hexadecilfosfocolina):**

A miltefosina (**Figura 10**) é um medicamento oral recentemente aprovado para o tratamento de infecções viscerais por *Leishmania* em humanos e, juntamente com o fluconazol, também administrado via oral, apresenta efetividade sobre leishmaniose cutânea (Oullette *et al.*, 2004). É um alquil-fosfolipídio, inicialmente, desenvolvido como um agente antitumoral. Foi o primeiro medicamento a apresentar atividade sobre *L. donovani in vitro*. Um estudo clínico de fase III demonstrou a atividade da miltefosina sobre leishmaniose visceral (Lux *et al.*, 2000). Devido a sua recente introdução, não se têm muitos dados em relação à resistência dos parasitas; porém, essa pode ser facilmente induzida *in vitro* (Perez-Victoria *et al.*, 2003).



**Figura 10.** Fórmula estrutural da miltefosina.

(Fonte: [http://www.avantilipids.com/CwgGif/850337\\_cwg.gif](http://www.avantilipids.com/CwgGif/850337_cwg.gif).)

**Medicamentos em estudo:**

Foram realizados estudos da *paromomicina* tanto sozinha quanto em combinação com agentes antimoniais para demonstrar sua efetividade no tratamento da leishmaniose visceral e foram obtidos bons resultados, sendo que, até dezembro de 2005, estava em andamento um estudo regulatório de fase III com uma nova formulação do medicamento (Olliaro *et al.*, 2005). A *sitamaquina* (uma 8-aminoquinolina) é um outro medicamento candidato para o tratamento oral, descoberto por Walter Reed Army Institute of

Research(Silver Spring, MD, EUA) e está em desenvolvimento por uma industria farmacêutica (Olliaro *et al.*, 2005).

***Outras formas de controle:***

Uma das formas não medicamentosas para o controle da disseminação da leishmaniose é a eliminação das possíveis fontes de transmissão. As medidas adotadas incluem o uso de inseticidas, principalmente piretróides, em residências e abrigos de animais, na impregnação das coleiras de cães ou o uso de repelentes na proteção individual (Alexander e Maroli, 2003).

A indisponibilidade da quimioterapia para infecções parasitárias e o alto custo do tratamento em regiões endêmicas, o aumento do número de pessoas que viajam para tais regiões fazendo que seja requerida uma profilaxia efetiva, e a resistência aos medicamentos convencionais são diretrizes para o desenvolvimento de novos compostos ativos (Anthony *et al.*, 2005). Uma alternativa tem sido o estudo dos medicamentos tradicionais como fonte de novos compostos quimioterápicos com possíveis melhor atividade e menores efeitos tóxicos (Araújo *et al.*, 1998).

Até os dias atuais, a base da pesquisa por novas moléculas anti-*Leishmania* tem sido desenvolvida com técnicas primárias, como a inibição do crescimento da forma promastigota *in vitro* (Davis *et al.*, 2004) e poucos estudos estão disponíveis para a forma amastigota (El Fakhry *et al.*, 2002; Acestor *et al.*, 2003). Não se pode deixar de observar que o mecanismo de ação e a interação de medicamentos em humanos são descobertos, freqüentemente, após a sua indicação e seu uso. Assim, durante a busca por novos medicamentos, compostos podem ter sido descartados por não apresentarem resultados *in vitro* ou serem possíveis pró-fármacos (Davis *et al.*, 2004).

A resistência de protozoários como a *Leishmania* aos medicamentos utilizados para o seu tratamento é crescente em países desenvolvidos. Em muitos casos, a resistência é devida à expressão da bomba de efluxo ABC (Leandro e Campino, 2003). Os transportadores ABC formam a maior superfamília de bombas de efluxo conhecida e estão presentes em muitos organismos, desde a arqueobactéria até os eucariotos superiores (Higgins, 1992). Nos parasitas *Leishmania* spp., existem várias classes de transportadores ABC resultando em diferentes fenótipos na resistência aos medicamentos (Leandro e Campino, 2003).

O interesse em se investigar novas moléculas eficazes no tratamento da leishmaniose inclui o potencial microbicida de compostos extraídos de plantas e o Brasil oferece diversas possibilidades, pois a grande variedade climática e de solos permite a existência de vários tipos de biomas: Floresta Amazônica, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal, Caatinga e Manguezal. O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil, com uma área de 2 milhões de Km<sup>2</sup> e 44 % da flora endêmica (Klink e Machado, 2005). Muitos dos medicamentos modernos são, direta ou indiretamente, oriundos de plantas superiores (Calixto, 2000) e 11% dos medicamentos essenciais da OMS originaram exclusivamente de plantas (Rates, 2001). Os impactos maiores são confirmados nos medicamentos antitumorais (taxol, vinblastina, vincristina, camptotecina, tenoposídeo, etoposídeo...). Recente prospecção revelou que 61% das 877 moléculas introduzidas como fármacos foram derivadas ou inspiradas em produtos naturais. Em certas áreas terapêuticas, esse valor sobe para 78% (antibacterianos) e 74% (anticâncer) (Rouhi e Washington, 2003).

Em várias regiões do mundo, muitas pessoas dependem de práticas tradicionais para cuidados primários de saúde e as plantas são a principal fonte de remédios (Napolitano *et al.*, 2005). A pesquisa de moléculas vegetais ativas em plantas pode

conduzir a novas estratégias para o controle da leishmaniose (Desjeux, 2004; Mendonça-Filho *et al.*, 2003).

Realizamos uma revisão dos artigos publicados entre os anos de 1995 e abril de 2006 relativos aos extratos de plantas testados *in vitro* sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Foram selecionadas publicações de revistas, indexadas internacionalmente, na base de dados do MEDLINE Ovid do portal da CAPES com as seguintes combinações como palavras-chave: “leishmania X amazonensis”, “plant X leishmania X amazonensis”, “extract X plant X leishmania X amazonensis”. De acordo com os dados encontrados, 32 espécies pertencentes a 24 famílias foram ativas sobre o parasita *L. amazonensis* (**Tabela 1**) e extratos brutos de 7 espécies avaliadas não apresentaram atividade.

Os extratos diclorometâmico e metanólico das folhas de *Campnosperma panamense* (Anacardiaceae) e o extrato metanólico das partes aéreas de *Guatteria amplifolia* (Annonaceae) não apresentaram atividade sobre promastigotas na concentração de 100 µg/mL (Weniger *et al.*, 2001). Ocorreu a mesma situação para o extrato metanólico das folhas de *Jacaranda caucana* (Bignoniaceae) e para o extrato metanólico do caule de *Huberodendron patinoi* (Bombacaceae) (Weniger *et al.*, 2001).

Os extratos aquoso e etanólico das partes aéreas de *Blutaparon portulacoides* (Amaranthaceae) não apresentaram atividade sobre amastigotas na concentração de 1000 µg/mL; porém, do extrato etanólico da raiz dessa espécie foi obtida uma mistura de glicosídeos que reduziu a viabilidade das formas amastigotas a 27,2; 26,4 e 24,9% nas concentrações de 100, 250 e 500 µg/mL, respectivamente (Salvador *et al.*, 2002).

A família Apocynacea apresentou o maior número de espécies, 3 representantes, com atividade sobre promastigotas e amastigotas (Ferreira *et al.*, 2004; Delorenzi *et al.*,



2001 e Weniger *et al.*, 2001). Para as famílias Asteraceae, Meliaceae, Myristicaceae e Rutaceae, foram encontradas duas espécies representantes. Porém, o extrato diclorometânico das sementes de *Guarea guidonia* (Meliaceae) não apresentou atividade sobre formas promastigotas na concentração de 100 µg/mL (Weniger *et al.*, 2001).

As sementes pulverizadas de *Annona glauca* (Annonaceae) foram maceradas com metanol e o extrato obtido foi diluído com 10% de água. A fase hidrometanólica foi extraída com diclorometano e concentrada. A partir do extrato diclorometânico, foram obtidas acetogeninas e testadas as atividades biológicas sobre *Leishmania* spp. Para promastigotas de *L. amazonensis*, o extrato diclorometânico e as substâncias isoladas glaucanisina, roliniastina-2, squamocina, glaucafilina e annonacina apresentaram IC<sub>100</sub> de 25 µg/mL. Já para as acetogeninas annonacina A e goniotalamicina, a IC<sub>100</sub> apresentada foi de 10 e 5 µg/mL, respectivamente (Whaechter *et al.*, 1998).

O extrato de alcalóides totais da espécie *Aspidosperma ramiflorum* (Apocynaceae) foi obtido pela extração da casca do caule com etanol 70%, sendo que o extrato bruto foi adicionado a uma solução de ácido acético 10%, que foi filtrada. A fase aquosa obtida foi extraída com clorofórmio e teve seu pH elevado a 10, tendo como resultado o extrato de alcalóides totais, com IC<sub>50</sub> menor que 47 µg/mL sobre promastigotas (Ferreira *et al.*, 2004).

Foram testadas a fração clorofórmica do extrato etanólico do caule de *Peschiera australis* (Apocynaceae) e a substância coronaridina, alcalóide indólico, sobre formas promastigotas e amastigotas. Para as promastigotas, na mesma concentração de 12,5 µg/mL, a coronaridina promoveu uma inibição do crescimento de 97%, enquanto a fração clorofórmica promoveu inibição 65%. Porém, para as amastigotas, a IC<sub>50</sub> do alcalóide foi de 12 µg/mL e da fração foi de 2,6 µg/mL (Delorenzi *et al.*, 2001).

Os extratos diclorometânicos e etanólicos das folhas e das flores de *Chromolaena hirsuta* (Asteraceae) apresentaram atividade considerável sobre promastigotas na concentração de 100 µg/mL. O alcalóide mais ativo apresentou IC<sub>50</sub> de 87,87 µg/mL (Taleb-Contini *et al.*, 2004).

As partes aéreas de *Tanacetum parthenium* (Asteraceae) foram submetidas à extração hidroalcolica e o extrato bruto foi testado sobre promastigotas, sendo obtida uma IC<sub>50</sub> de 29 µg/mL. O extrato bruto foi fracionado e cada fração obtida sua atividade testada. A fração diclorometânica, considerada mais ativa, foi recromatografada permitindo o isolamento do sesquiterpeno partenólideo, que apresentou IC<sub>50</sub> de 0,37 µg/mL sobre promastigotas e reduziu a internalização dos parasitas pelos macrófagos em 84,7% na concentração de 5 µg/mL (Tiuman *et al.*, 2005).

O óleo essencial da casca do caule de *Croton cajucara* (Euphorbiaceae), obtido por hidrodestilação, apresentou IC<sub>50</sub> de 8,3 ng/mL sobre formas promastigotas e de 22 ng/mL sobre amastigotas. Desse óleo, foi obtido o linalol, que apresentou IC<sub>50</sub> de 4,3 ng/mL sobre promastigotas e 15,5 ng/mL sobre amastigotas (Rosa *et al.*, 2003).

Foram obtidos os valores de IC<sub>50</sub> para 3 novos compostos isolados do extrato cloroformico da madeira do caule de *Centrolobium sclerophyllum* (Fabaceae). Para a isoflavona, temos IC<sub>50</sub> = 140 nM e para os 2 diarilheptanóides, temos IC<sub>50</sub> = 77 nM e 86 nM, respectivamente (Araújo *et al.*, 1998).

Diterpenos obtidos da casca do caule de *Laetia procera* (Flacourtiaceae) foram testados sobre formas amastigotas e os compostos mais ativos apresentaram IC<sub>50</sub> por volta de 10 µM (Julian *et al.*, 2005).

No estudo realizado com óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae) e seu principal constituinte eugenol, foi demonstrado que 100% das formas promastigotas foram destruídas quando expostas a concentração de 100 µg/mL tanto do óleo essencial quanto do eugenol (Ueda-Nakamura *et al.*, 2005).

A fração diclorometânica do extrato bruto metanólico de *Pourouma guianensis* (Moraceae), por apresentar boa atividade sobre promastigotas, foi submetida a uma recromatografia que permitiu o isolamento de 11 triterpenos. As frações que continham os compostos mais ativos apresentaram boa atividade a uma concentração de 100 µg/mL. Entretanto, somente o ácido ursólico e o ácido oleanólico, dentre os 11 compostos isolados, apresentaram alta atividade sobre amastigotas com valores de IC<sub>50</sub> de 27 µg/mL e 11 µg/mL, respectivamente (Torres-Santos *et al.*, 2004).

Foram isolados, do extrato diclorometânico das partes aéreas de *Oxallis erythrorhiza* (Oxalidaceae), a benzoquinona embelina 5 e os alquilfenóis 3 e 4. Tanto a embelina 5 quanto o alquilfenol 4 inibiram em menos de 70% o crescimento de promastigotas, enquanto o alquilfenol 3 inibiu em 100% o crescimento dessas formas, todos na concentração de 100 µg/mL (Feresin *et al.*, 2003).

O extrato aquoso obtido do fruto de *Cocos nucifera* (Palmae), rico em polifenóis, apresentou IC<sub>100</sub> de 20 µg/mL sobre promastigotas e, na mesma concentração, apresentou atividade sobre amastigotas aumentando em duas vezes a produção de nitrito (Mendonça-Filho *et al.*, 2003).

O extrato diclorometânico da inflorescência de *Piper aduncum* (Piperaceae) apresentou IC<sub>50</sub> de 2,2 µg/mL sobre promastigotas e foi submetido a um fracionamento,

em que pôde ser isolada a metilchalcona DMC, que apresentou atividade sobre promastigotas e amastigotas com IC<sub>50</sub> de 0,5 µg/mL e 24 µg/mL, respectivamente (Torres-Santos *et al.*, 1999).

Foram testados sobre formas promastigotas os extratos brutos e compostos isolados de *Dictyloma Peruviana* (Rutaceae). O extrato de alcalóides totais apresentou IC<sub>100</sub> de 50 µg/mL e foram isolados 2 alcalóides, dictyolomides 1 e 2, que apresentaram IC<sub>100</sub> de 50 e 100 µg/mL, respectivamente (Lavaud *et al.*, 1995).

O extrato etanólico das folhas de *Saracha punctata* (Solanaceae) apresentou IC<sub>100</sub> de 25 µg/mL e IC<sub>50</sub> de 12,5 µg/mL sobre promastigotas e não apresentou atividade sobre as formas amastigotas na concentração de 10 µg/mL. O aminoesteróide isolado, sarachina, apresentou IC<sub>100</sub> de 10 µg/mL e IC<sub>50</sub> de 5 µg/mL sobre as promastigotas (Moretti *et al.*, 1998).

Além disso, camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* foram submetidos ao tratamento oral com extrato aquoso liofilizado das folhas de *Bryophyllum pinnatum* Kurz (Crassulaceae). Quando o tratamento era iniciado em estádios iniciais de infecção, doses orais diárias de 8 mg preveniram o crescimento de lesões e seu efeito foi comparável ao medicamento Glucantime<sup>®</sup> (Whaechter *et al.*, 1998).

**Tabela 1.** Extratos brutos, grupos químicos e substâncias isoladas de plantas que tiveram sua atividade testada sobre *L. amazonensis*.

Família	Espécie	PARTES DA PLANTA <sup>2</sup>	SOLVENTE <sup>3</sup>	EB, GQ, OF, SI <sup>4</sup>	Atividade <sup>5</sup>	CONCENTRAÇÃO TESTE (µG/ML)#	Referência
<b>Acanthaceae</b>	<i>Hygrophila guineensis</i> Ness	PAR	D	EB	Pm	100	Weniger <i>et al.</i> (2001)
<b>Amaranthaceae</b>	<i>Blutaparon portulacoides</i> (St. Hil) Mears	PAR	A	EB	IAm	1000	Salvador <i>et al.</i> (2002)
			E	EB	IAm	1000	
		R	A	EB	Am	1000	
			E	EB	Am	1000	
				GQ	Am	500-14	
<b>Anacardiaceae</b>	<i>Camptosperma panamense</i> Standl.	F	D	EB	IPm	100	Weniger <i>et al.</i> (2001)
			M	EB	IPm	100	
<b>Annonaceae</b>	<i>Annona glauca</i> Thonn.	S	D	EB	Pm	25	Whaechter <i>et al.</i> (1998)
				SI	Pm	5-25	

Família	Espécie	PARTE DA PLANTA <sup>a</sup>	SOLVENTE <sup>b</sup>	EB, GQ, OF, SI <sup>c</sup>	Atividade <sup>d</sup>	CONCENTRAÇÃO TESTE (µG/ML)#	Referência
<b>Annonaceae</b>	<i>Guatteria boliviana</i> H. Winkl.	CC	E	EB	Pm	100	Mahiou <i>et al.</i> (2000)
	<i>Guatteria amplifolia</i> Triana & Planch.	PAR	M	EB	Ipm	100	Weniger <i>et al.</i> (2001)
<b>Apocynaceae</b>	<i>Aspidosperma ramiflorum</i> Muell. Arg.	CC	E AAC Cf	EBA	Pm	47	Ferreira <i>et al.</i> (2004)
	<i>Peschiera australis</i> (Mull. Arg.) Miers	C	E	Ef	Pm	12,5	Delorenzi <i>et al.</i> (2001)
					Am	2,6	
				SI	Pm	12,5	
					Am	12	
	<i>Tabernaemontana obliqua</i> (Miers) Leeuwenb	F	M	EB	Pm	100	Weniger <i>et al.</i> (2001)

<b>Família</b>	<b>Espécie</b>	<b>PARTE DA PLANTA<sup>a</sup></b>	<b>SOLVENTE<sup>b</sup></b>	<b>EB, GQ, OF, SI<sup>c</sup></b>	<b>Atividade<sup>d</sup></b>	<b>CONCENTRAÇÃO TESTE (µG/ML)#</b>	<b>Referência</b>
<b>Asteraceae</b>	<i>Chromolaena hirsuta</i> Hook. & Am.	F	E / D	EB	Pm	100	Taleb-Contini <i>et al.</i> (2004)
				GQ	Pm	87-174	
		Fl	E / D	EB	Pm	100	
	<i>Tanacetum parthenium</i> L. Schulz-Bip.	PAR	E / A	EB	Pm	29	Tiuman <i>et al.</i> (2005)
			D	SI	Pm	0,37	
					Am	5 – 0,5	
<b>Bignoniaceae</b>	<i>Jacaranda caucana</i> Pittier	F	M	EB	IPm	100	Weniger <i>et al.</i> (2001)
<b>Bombacaceae</b>	<i>Huberodendron patinoi</i> Cuatrec.	C	M	EB	IPm	100	Weniger <i>et al.</i> (2001)
<b>Burseraceae</b>	<i>Protium amplum</i> Cuatrec.	Fr	D	EB	Pm	100	Weniger <i>et al.</i> (2001)
					Am	8,2*	
<b>Clusiaceae</b>	<i>Marila laxiflora</i> Rusby	F	D	EB	Pm	100	Weniger <i>et al.</i> (2001)
					Am	11,0*	

Família	Espécie	PORTE DA PLANTA <sup>a</sup>	SOLVENTE <sup>b</sup>	EB, GQ, OF, SI <sup>c</sup>	#	Atividade <sup>d</sup>	CONCENTRAÇÃO TESTE (µG/ML)#	Referência
<b>Dilleniaceae</b>	<i>Doliocarpus dentatus</i>	C	Cl	#	#	#	#	Sauvain <i>et al.</i> (1996)
<b>Euphorbiaceae</b>	<i>Croton cajucara</i>	F	HC	OE	Pm	Pm	$8,3 \times 10^{-3}$	Rosa <i>et al.</i> (2003)
				SI	Pm	Am	$22 \times 10^{-3}$	
					Pm	Am	$4,3 \times 10^{-3}$	
					Am	Am	$15,5 \times 10^{-3}$	
<b>Fabaceae</b>	<i>Centrolobium sclerophyllum</i>	MC	Cf	SI	Pm	Pm	160 a 5	Araujo <i>et al.</i> (1998)
<b>Flacourtiaceae</b>	<i>Laetia procera</i> (Poepp.) Eichler.	CC	Ch	GQ	Pm	Pm	$\cong 10 \mu\text{M}^{**}$	Julian <i>et al.</i> (2005)
<b>Lamiaceae</b>	<i>Ocimum gratissimum</i> L.	F	EP	OE	Pm	Pm	135	Ueda-Nakamura <i>et al.</i> (2005)
					Am	Am	100	
				SI	Pm	Pm	80	



Família	Espécie	PARTE DA PLANTA <sup>a</sup>	SOLVENTE <sup>b</sup>	EB, GQ, OE, SI <sup>c</sup>	Atividade <sup>d</sup>	CONCENTRAÇÃO TESTE (µG/ML)#	Referência
<b>Meliaceae</b>	<i>Guarea guidonia</i> (L.) Sleumer	S	D	EB	IPm	100	Weniger <i>et al.</i> (2001)
	<i>Guarea polymera</i> Little	F	D	EB	Pm	100	Weniger <i>et al.</i> (2001)
					Am	4*	
			M	EB	Pm	100	
					Am	10*	
		C	D	EB	Pm	100	
					Am	4*	
<b>Moraceae</b>	<i>Pourouma guianensis</i> Aubl.	F	M	EB	Pm	100***	Torres-Santos <i>et al.</i> (2004)
				GQ	Pm	100	
					Am	27-11	
			H	EB	IPm	100	

Família	Espécie	PARTE DA PLANTA <sup>a</sup>	SOLVENTE <sup>b</sup>	EB, GQ, OF, SI <sup>c</sup>	Atividade <sup>d</sup>	CONCENTRAÇÃO TESTE (µG/ML)#	Referência
<b>Myristicaceae</b>	<i>Otoba novogranatensis</i> Moldenke	F	D	EB	Pm	100	Weniger <i>et al.</i> (2001)
					Am	177*	
			M	EB	Pm	100	
					Am	40*	
		Fr	D	EB	Pm	100	
					Am	6,5*	
			M	EB	Pm	100	
					Am	10,6*	
	<i>Otoba parviflora</i> (Markgr.) Gentry	C	D	EB	Pm	100	Weniger <i>et al.</i> (2001)
					Am	98*	

Família	Espécie	PORTE DA PLANTA <sup>a</sup>	SOLVENTE <sup>b</sup>	EB, GQ, OF, SI <sup>c</sup>	Atividade <sup>d</sup>	CONCENTRAÇÃO TESTE (µG/ML)#	Referência
<b>Oxalidaceae</b>	<i>Oxalis erythrorhiza</i> Gillies ex Hook. & Arn.	PAR	D	SI <sub>1</sub>	Pm	100	Feresin <i>et al.</i> (2003)
				SI <sub>2</sub>	Pm	100	
				SI <sub>3</sub>	Pm	100	
<b>Palmae (Arecaeae)</b>	<i>Cocos nucifera</i> Linn.	Fr	A	EB	Pm	20	Mendonça-Filho <i>et al.</i> (2003)
					Am	20	
<b>Piperaceae</b>	<i>Piper aduncum</i> L.	If	D	EB	Pm	2,2	Torres-Santos <i>et al.</i> (1999)
				SI	Pm	0,5	
					Am	24	
<b>Rutaceae</b>	<i>Dictyoloma peruviana</i> Planch.	CC	EP AE E	EB EA SI	Pm Pm Pm	100-50 100-25 100-25	Lavaud <i>et al.</i> (1995)

Família	Espécie	PARTE DA PLANTA <sup>a</sup>	SOLVENTE <sup>b</sup>	EB, GQ, OE, SI <sup>c</sup>	Atividade <sup>d</sup>	CONCENTRAÇÃO TESTE (µG/ML)#	Referência
<b>Rutaceae</b>	<i>Swinglea glutinosa</i> Merr.	C	D	EB	Pm	100	Weniger <i>et al.</i> (2001)
			M	EB	Pm	100	
<b>Scrophulariaceae</b>	<i>Conobea scoparioides</i> (Cham. & Schtldl.) Benth	F	D	EB	Pm	100	Weniger <i>et al.</i> (2001)
					Am	1,3*	
<b>Solanaceae</b>	<i>Saracha punctata</i> Ruiz & Pav.	F	E	EB	Pm	25-12,5	Moretti <i>et al.</i> (1998)
					IAm	10	
				SI	Pm	10-5	

<sup>a</sup>Parte da planta - PAr: partes aéreas; S: sementes; CC: casca do caule; C: caule; F: folha; MC: madeira do caule; Fl: flor; Fr: fruto; If: inflorescência; P: toda planta.

<sup>b</sup>Solvente - D: diclorometano; M: metanol; E: etanol;; A: água; Cf: clorofórmio; AAc: ácido acético; Ch: ciclohexano; EP: éter de petróleo; H: hexano; D: diclorometano; AE: acetato de etila; HC: hidrodestilação (Clevenger).

<sup>c</sup>EB, GQ, OE, SI - EB: extrato bruto; EA: extrato de alcalóides totais ; GQ: grupamento químico; Ef: fração clorofórmica do extrato bruto etanólico OE: óleo essencial; SI: substância isolada.

<sup>d</sup>Atividade - Pm: promastigota; IPm: inativo sobre promastigotas; Am: amastigotas; IAm: inativo sobre amastigotas.

# Alguns resultados com observações foram expressos em molaridade, não sendo possível a conversão em µg/mL pelo não conhecimento da massa molar.

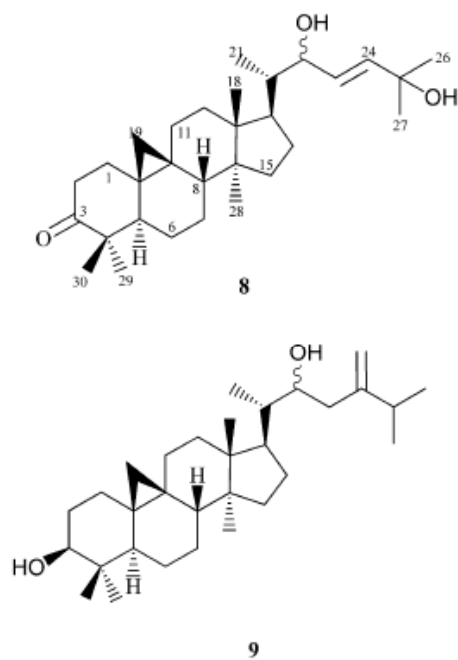
# # Informação obtida de Rocha *et al.*, 2005.

\*IC<sub>50</sub> após 96 h; \*\*IC<sub>50</sub> por volta de 10 µM; \*\*\*Inibição de 24 % do crescimento.

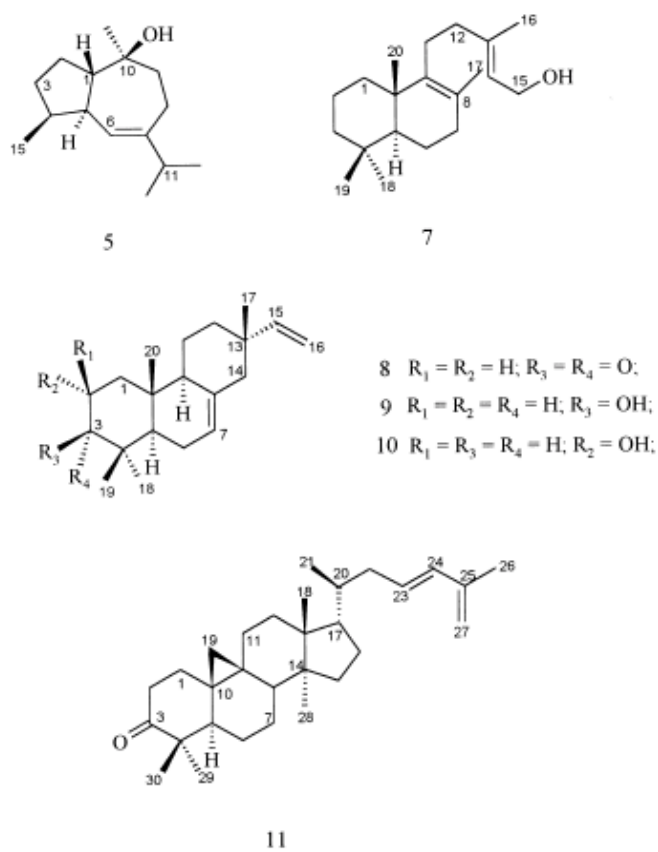
Em relação à família Meliaceae, a literatura reporta outras atividades, além de leishmanicida, para as suas espécies, como antifilarial para o extrato etanólico e extrato aquoso das flores de *Azadirachta indica* (Mishra *et al.*, 2005) e antimalarial em pacientes portadores de HIV para o extrato aceto-alcóolico das folhas dessa mesma espécie (Udeinya *et al.*, 2004). É reportada a atividade antihelmíntica para o extrato etanólico do caule de *Khaya senegalensis* (Ademola *et al.*, 2004) e antimalarial para extratos aquoso e metanólico do fruto e da folha de *Lansium domesticum* (Yapp e Yapp, 2003).

Um estudo realizado pela nossa equipe de colaboradores com 31 extratos de 15 plantas do Cerrado brasileiro, avaliou a atividade *in vitro* desses extratos sobre formas promastigotas de *L. donovani* e formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Dentre esses, 15 extratos foram ativos sobre formas promastigotas de *L. donovani*, com concentrações de inibição de 50% do crescimento do parasita (IC<sub>50</sub>) de 0,1-10 µg/mL, sendo que o extrato hexânico da raiz (madeira mais casca) de *Guarea kunthiana* (Meliaceae) apresentou IC<sub>50</sub> de 7,9 µg/mL (Mesquita *et al.*, 2005).

Em relação à fitoquímica das espécies de *Guarea*, foram descritas as presenças de 1 monoterpeno, 4 sesquiterpenos, 6 diterpenos e 1 triterpeno a partir do extrato diclorometânico (Lago *et al.*, 2000) e 9 triterpenos cicloartanos a partir das fases hexânica e diclorometânica do extrato etanólico (Lago e Roque, 2002) das folhas de *Guarea macrophylla* (**Figura 11** e **Figura 12**).

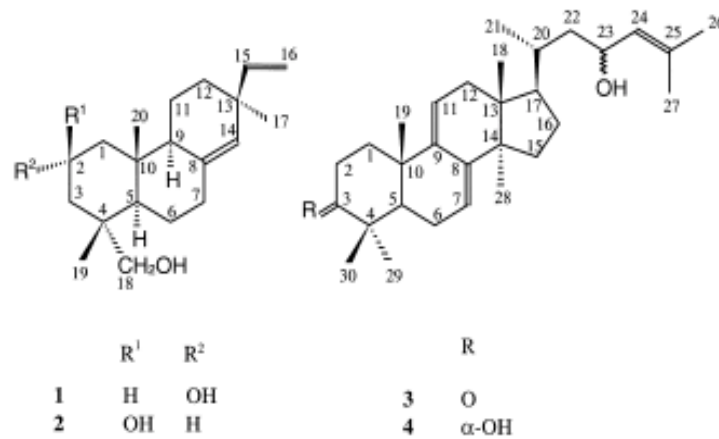


**Figura 11.** Triterpenóides cicloartanos de *Guarea macrophylla*.

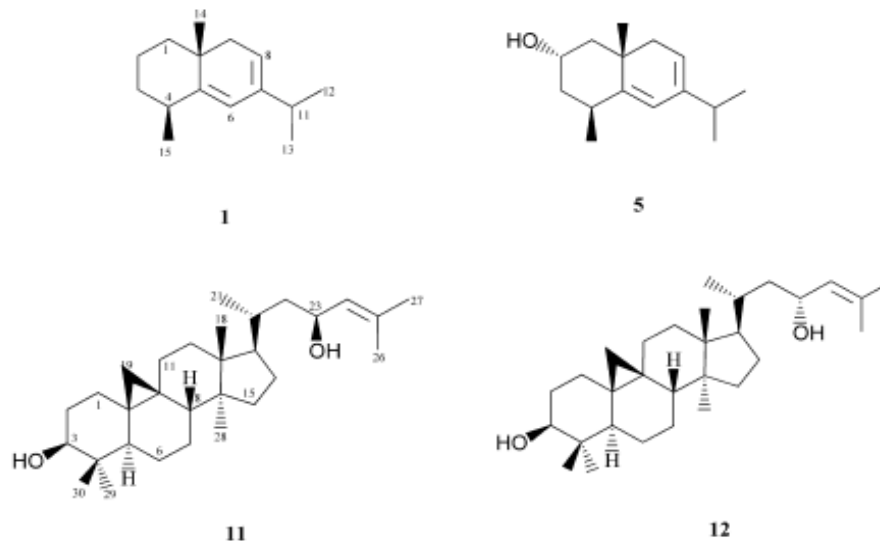


**Figura 12.** Terpenos das folhas de *Guarea macrophylla*.

Também foram identificados 2 compostos diterpenóides e 2 triterpenos lanostanos (**Figura 13**) partir do extrato metanólico das folhas de *Guarea rhopalocarpa* (Camacho *et al.*, 2001). A partir do óleo essencial de *Guarea guidonia*, foram identificados 7 sesquiterpenos e do extrato metanólico de suas folhas, 3 sesquiterpenos, 1 diterpeno, 4 triterpenos e 2 esteróides (**Figura 14**) (Lago *et al.*, 2001).

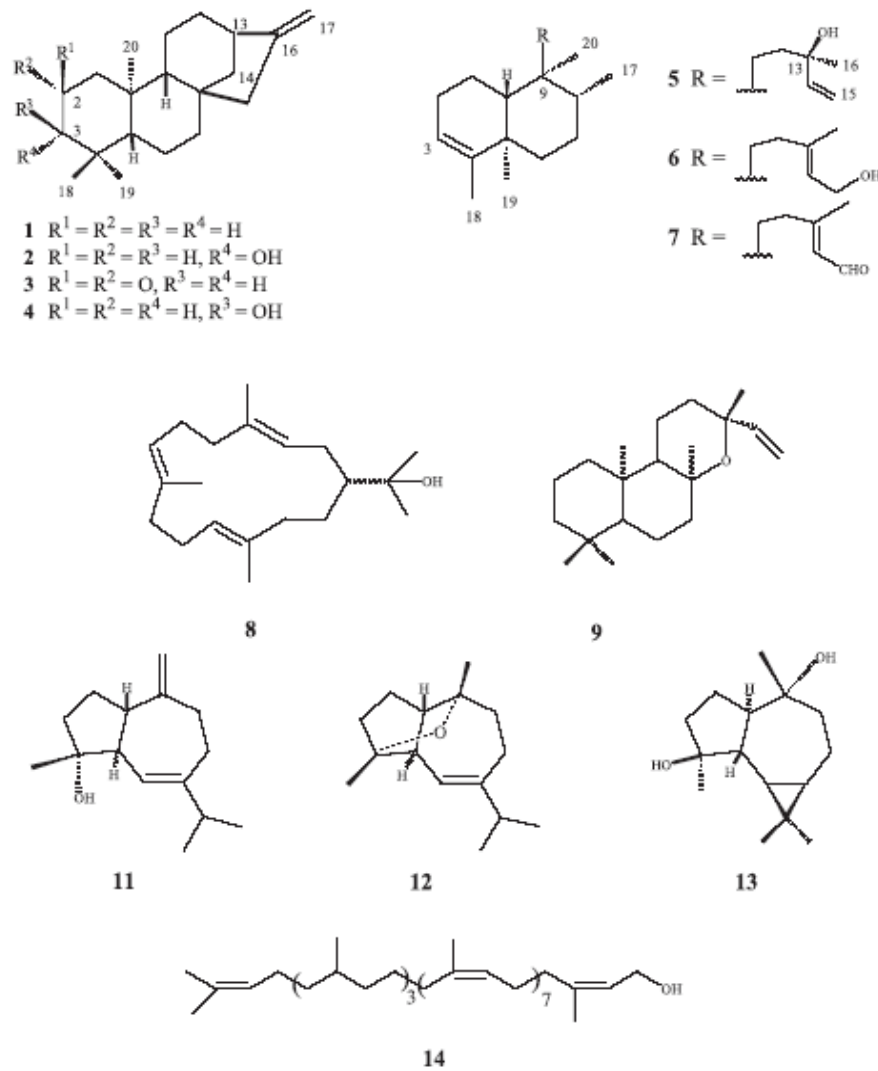


**Figura 13.** Terpenóides de *Guarea rhopalocarpa*.



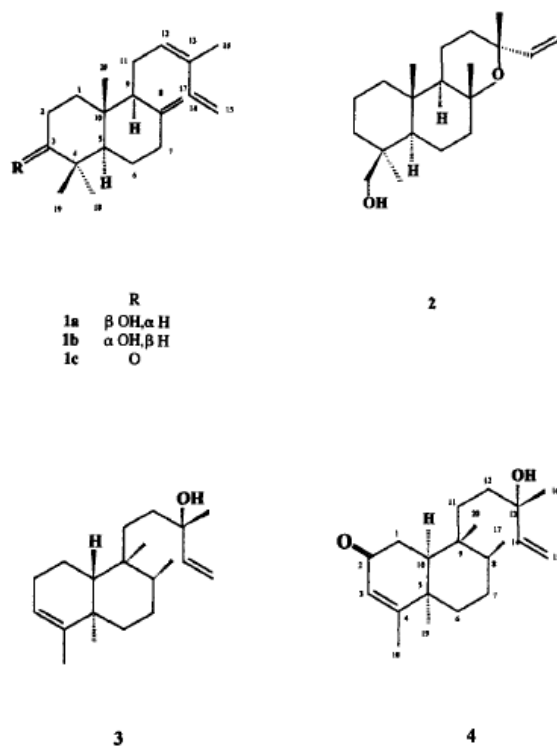
**Figura 14.** Terpenóides de *Guarea guidonia*.

Do extrato etanólico das folhas de *G. kunthiana*, foram identificados 1 diterpeno, 4 sesquiterpenos, poliprenol-12 e  $\alpha$ - e  $\delta$ -tocoferóis (**Figura 15**) (Garcez *et al.*, 2004). Do extrato de éter de petróleo das folhas de *Guarea trichiloides*, foram isolados 6 diterpenóides (**Figura 16**) (Furlan *et al.*, 1996).



**Figura 15.** Constituintes terpenóides de *Guarea kunthiana*.





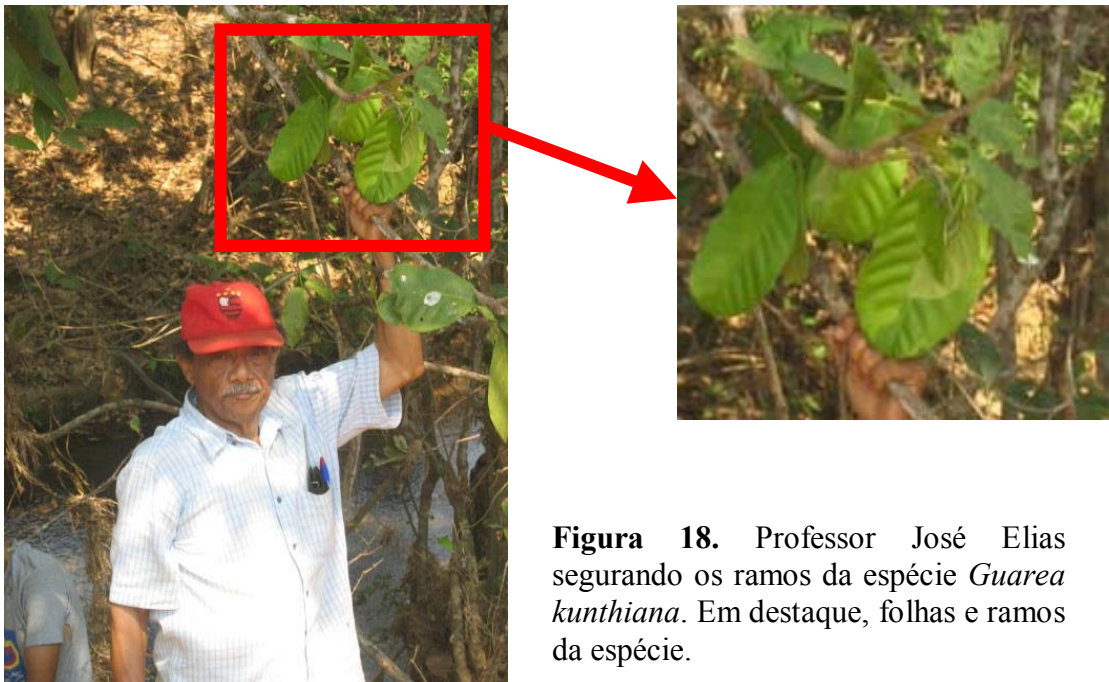
**Figura 16.** Diterpenos de *Guarea trichilioides*.

Uma revisão da literatura não mostrou dados a respeito da fitoquímica e atividade biológica da madeira da raiz da espécie *Guarea kunthiana* (**Figura 17**).



**Figura 17.** *Guarea kunthiana* A. Juss.

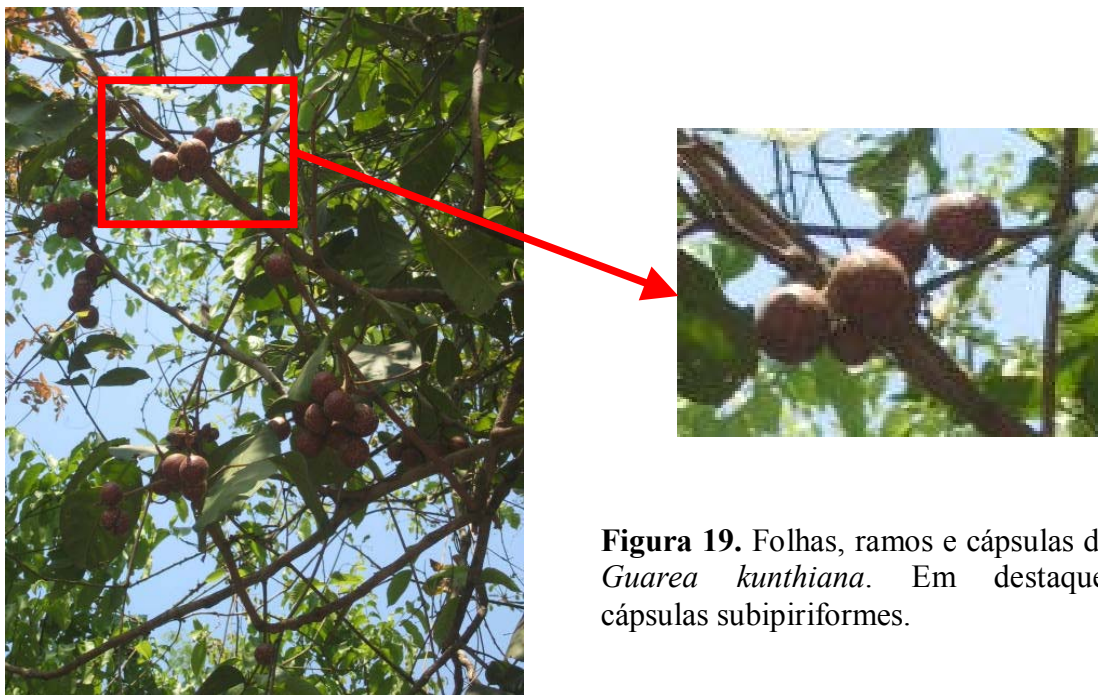
Assim, elegemos o extrato hexânico da madeira da raiz dessa espécie para o desenvolvimento deste trabalho. A *Guarea kunthiana* (Meliaceae), conhecida popularmente como jataúba ou jito, é uma árvore de, aproximadamente, 8 m de altura. Apresenta ramos glabros; folhas de 16 cm de comprimento, com 2-5 pares de folíolos; pecíolo de 5-6 cm de comprimento; folíolos opostos, curto-peciolados, subovalelíticos, ápice curto-acuminado e obtuso, glabros nas duas faces, de 13-16 cm de comprimento e 5-6 cm de largura, panícula menor que as folhas, piramidada, ramos achatados e angulosos, ferrugíneo-pilosos (**Figura 18**) (Pio Corrêa, v. IV).



**Figura 18.** Professor José Elias segurando os ramos da espécie *Guarea kunthiana*. Em destaque, folhas e ramos da espécie.

As flores são pediceladas, cálice externamente pubérulo, 4-denteado; pétalas 4-5 de 9 mm de comprimento e 3 mm de largura, valvar-oblongas, de ápice agudo, externamente seríceas; anteras 8-10, oblongas; ovário 4-locular, lóculos biovulados; estilete menor que o ovário. Apresenta cápsula subpiriforme, glabra, de 3 cm de

comprimento (**Figura 19**). Também encontrada na Guiana, no Peru e na Martinica (Pio Corrêa, v. IV).



**Figura 19.** Folhas, ramos e cápsulas de *Guarea kunthiana*. Em destaque, cápsulas subpiriformes.

A linha de pesquisa do nosso grupo de estudos (Laboratório de Farmacognosia/UnB) são desenvolvidos a partir de um banco de extratos de plantas do Bioma Cerrado. A ação biológica desses extratos brutos, suas frações e substâncias isoladas é verificada a fim de se obter novas moléculas ativas como opções de tratamento ou controle de vetores (atividade inseticida) de doenças negligenciadas como leishmaniose, doença de Chagas, malária e dengue. Além disso, também é verificada a ação sobre células cancerosas, bactérias e fungos.

## OBJETIVOS

### *Objetivo geral*

Após triagem de diversos extratos desse banco, o objetivo desse trabalho foi realizar o estudo biomonitorado *in vitro* do extrato hexânico da raiz de *Guarea kuntiana* (Meliaceae) sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

### *Objetivos específicos*

1. Obter o extrato hexânico da madeira da raiz de *Guarea kuntiana* (Meliaceae) para a realização dos estudos químicos e biológicos.
2. Identificar a IC<sub>100</sub> do extrato bruto sobre *L. (L.) amazonensis*.
3. Identificar, em testes *in vitro*, o(s) grupo(s) responsável(is) pela atividade anti-*Leishmania*.
4. Isolar e elucidar o(s) composto(s) com possível atividade anti-*Leishmania*.
5. Identificar a atividade de composto(s) puro(s).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *1. Material botânico*

A madeira da raiz de *Guarea kunthiana* A. Juss. (Meliaceae) foi coletada (**Figura 20**) na mata ciliar em galeria ao Córrego D'Ouro, um ecossistema do Bioma Cerrado, localidade denominada Pedreira do Córrego, Sobradinho, Distrito Federal, em setembro de 2004. Essa espécie foi identificada pelo botânico Prof. José Elias de Paula da Universidade de Brasília. Uma excicata foi incorporada ao acervo do Herbário da Universidade de Brasília (UB) sob o número: J. Elias de Paula 3.710. É conhecida pelo nome vernáculo “jitó”. Em 11/9/2004.



**Figura 20.** Coleta da raiz de *Guarea kunthiana* com auxílio de um mateiro.

### *2. Obtenção do extrato bruto*

O extrato bruto foi obtido a partir da madeira da raiz de *G. kunthiana* dessecada e pulverizada. Uma amostra de 3,029 kg foi submetida ao processo de extração por maceração, por múltiplos contatos, com hexano a temperatura ambiente. A solução

extrativa resultante foi concentrada em evaporador rotativo a temperatura de 40 °C, para a obtenção do extrato bruto.

### ***3. Preparação da coluna cromatográfica aberta***

Uma alíquota do extrato hexânico (15 g) foi submetida a um fracionamento sob gradiente de ciclohexano:diclorometano (Ch:D) em coluna aberta de sílica. Para montagem da coluna, foi necessário realizar um depósito a seco, uma vez que o extrato não era totalmente solúvel em ciclohexano:diclorometano (95:5), solvente de escolha devido ao melhor fator de retenção (Rf) obtido em cromatografia de camada delgada (CCD). O depósito a seco consiste em solubilizar totalmente o extrato bruto em solvente cuja polaridade permita essa ação, no caso o diclorometano, adicionar a sílica ao extrato solubilizado em um balão de fundo redondo e, em evaporador rotativo, fazer que o solvente seja totalmente evaporado. Assim, o extrato é incorporado à sílica e utilizado para a montagem da coluna.

Para montagem da coluna, 424 g da sílica gel para cromatografia em coluna (Ultra Chem, 400-200 mesh), foram suspensos em, aproximadamente, 1 L de ciclohexano:diclorometano (95:5). Essa suspensão foi vertida na coluna de vidro com a torneira fechada que, em seguida foi aberta permitindo que o excesso de solvente fosse escoado ao nível da camada de sílica. Logo após, o extrato que havia sido incorporado à sílica foi adicionado acima dessa camada e, por fim, foram acrescentados 500 mL do solvente já mencionado. Tal procedimento possibilitou o recolhimento das primeiras frações.

#### **4. Obtenção das frações**

Foi utilizado o seguinte gradiente de polaridade: ciclohexano:diclorometano (95:5), (90:10), (85:15), (80:20), (78,5:22,5), (75:25), (70:30), (50:50), diclorometano (100) e, finalmente, metanol (100) a fim de se retirar todas as substâncias restantes na coluna aberta de sílica. As frações obtidas foram submetidas à análise comparativa por cromatografia de camada delgada (CCD) (sílica gel 60F<sub>254</sub>, Merck) e, posteriormente, reunidas de acordo com suas semelhanças (Rf) para a obtenção de 19 grupos. Foi utilizado como revelador a vanilina sulfúrica que consiste em pulverização da placa de CCD com solução alcoólica de vanilina 10%, seguida de pulverização com solução aquosa de ácido sulfúrico 1% e aquecimento da placa a 100 °C.

#### **5. Isolamento do terpenóide**

Uma alíquota de 230 mg (98,71%) do grupo 17 foi recromatografada em coluna aberta de sílica (10 g), utilizando-se um gradiente de ciclohexano:acetato de etila (Ch:AE) (90:10) e (85:15). O sub-grupo 17-4, obtido da purificação do grupo 17, foi novamente recromatografado em coluna aberta de sephadex LH-20 para a obtenção do terpenóide puro. Foram utilizadas técnicas espectrométricas de ressonância magnética nuclear (RMN) de uma dimensão (1D) (1H e 13C) e bidimensional (2D) (COSY, HSQC, HMBC, NOESY), incluindo espectrometria de massa Tandem (EM-EM), para a elucidação da molécula.

#### **6. Cultura *in vitro* de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: forma promastigota**

As formas promastigotas utilizadas para os testes *in vitro* foram obtidas da cepa de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (L(L)a)-MHOM/BR/PH8, adaptada em patas de camundongos isogênicos da linhagem C57Bl/6 e mantida no Biotério da FM/FS-UnB. Os



parasitas foram coletados sob a forma amastigota das lesões da pata traseira dos camundongos com o auxílio de uma seringa de 1 mL contendo 100 µL de solução salina e gentamicina. Foi coletado 1 mL de exsudato inflamatório de cada camundongo. Esse volume foi dividido em 3 partes, e cada parte replicada em meio de McNeal, Novy e Nicolle (meio NNN), pH 7,2 a 22 °C por uma semana. Após este período, as formas promastigotas foram obtidas e transferidas para o meio de RPMI (Gibco®) contendo 20% de soro fetal bovino, gentamicina e bicarbonato a 7,5% (pH 7,2 a 22 °C). Após a replicação, a contagem do número de promastigotas foi realizada com auxílio de uma câmara de Neubauer e o valor de  $10^6$  promastigotas/mL foi utilizado para os testes *in vitro*.

#### **7. Avaliação da atividade anti-*Leishmania* dos extratos**

Os parasitas, em fase logarítmica de crescimento, foram depositados em placas de 96 poços na concentração de  $10^6$  promastigotas/mL. Cada poço continha uma concentração diferente do extrato bruto ou dos grupos, que foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO). Foi testada a atividade anti-*Leishmania* em concentrações decrescentes de 1000 a  $4,8 \times 10^{-1}$  µg/mL para o extrato bruto e em concentrações decrescentes de 150 a  $5,8 \times 10^{-1}$  µg/mL para os grupos obtidos. Finalizadas as diluições, as placas foram incubadas por 24 h em estufa com temperatura entre 22-24 °C. A atividade foi determinada pela avaliação dos movimentos dos parasitas, com o auxílio de um microscópio invertido, em comparação com os controles positivo e negativo.



### 7.1. *Leitura dos resultados*

Após 24 horas, foi observada a situação dos parasitas nos poços. Os movimentos dos parasitos foram estimados de acordo com uma adaptação da avaliação descrita por Weniger *et al.* (2001) e as estimativas foram registradas conforme se segue:

0 = quando 100% dos parasitas estavam em movimento (extrato considerado inativo).

+ = quando havia mais de 50% dos parasitas em movimento (extrato considerado pouco ativo).

++ = quando havia menos de 50% dos parasitas em movimento (extrato considerado ativo).

+++ = quando 100% dos parasitas não apresentaram movimento (extrato considerado muito ativo).

Foram utilizados como controle negativo parasitas em poços que continham apenas DMSO (5  $\mu$ L) e meio de cultura e como controle positivo foram utilizados poços com o medicamento isotinoato de pentamidina (Neo Química) nas concentrações decrescentes de 1000 a  $4,8 \times 10^{-1}$   $\mu$ g/mL, além do DMSO e meio de cultura. Os ensaios foram realizados em triplicata.

## CONCLUSÃO

Estudos de triagem do Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado (Farmacognosia/UnB) sobre *Leishmania (Leishmania) amazonensis* permitiram selecionar o extrato hexânico da madeira da raiz de *Guarea kunthiana*. Esse extrato apresentou excelente atividade nos testes *in vitro* sobre as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* com IC<sub>100</sub> de 125 µg/mL.

Foram obtidos 71 g de extrato bruto, com rendimento de 2,34%. O fracionamento químico biomonitorado possibilitou a obtenção de 19 grupos reunidos de acordo com sua semelhança identificada por cromatografia em camada delgada. Esses foram testados sobre formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e identificados os de maior atividade.

Os grupos mais ativos foram G1 (IC<sub>100</sub> = 75 µg/mL), G5 (IC<sub>100</sub> = 18,75 µg/mL), G8 (IC<sub>100</sub> = 75 µg/mL) e G17 (IC<sub>100</sub> = 37,5 µg/mL), dos quais, até o momento, temos resultados promissores para G17.

A purificação do sub-grupo G17-4 possibilitou o isolamento do triterpenóide 22,24–diepoxitirucall-7-en-3-ona (23 mg) com 0,15% de rendimento em relação ao extrato bruto e 0,00076% em relação à madeira da raiz utilizada. Esse composto foi isolado pela primeira vez de *Neochamaelea pulverulenta* (Vent.) Erolm. (Cneoraceae), sem dados de RMN para <sup>13</sup>C e apenas sua fórmula bruta foi publicada (Mondon *et al.*, 1982).

O triterpeno 22,24–diepoxitirucall-7-en-3-ona faz parte de uma complexa classe de terpenos limonóides, que são comuns em Meliaceae e apresentam dados na literatura de atividades inseticida, antibacteriana, antifúngica, antimalárica, anticancerígena, antiviral e não têm apresentado toxicidade sobre células de mamíferos.

Até onde conhecemos, o limonóide 22,24–diepoxitirucall-7-en-3-ona é inédito na espécie *Guarea* e na família Meliaceae; além de não terem sido reportados dados sobre a atividade anti-*Leishmania* para limonóides.

O limonóide isolado neste estudo é promissor para novos estudos a fim de se obter alternativas para o controle da leishmaniose.

## PERSPECTIVAS

- ✓ Obter IC<sub>100</sub> do limonóide 22,24–diepoxitirucall-7-en-3-ano sobre formas promastigotas de *Leishmania* spp.
- ✓ Prosseguir estudo químico de G1, G5, G8 e G17.
- ✓ Obter IC<sub>100</sub> para os compostos isolados sobre formas promastigotas de *Leishmania* spp.
- ✓ Identificar e/ou caracterizar as substâncias puras responsáveis pela atividade por meio de técnicas espectrométricas (IV, UV, RMN de <sup>1</sup>H, RMN de <sup>13</sup>C, EM).
- ✓ Testar a citotoxicidade do limonóide e dos outros compostos ativos sobre células de mamíferos.
- ✓ Avaliar a influência *in vitro* das substâncias ativas isoladas sobre amastigotas de *Leishmania* spp.
- ✓ Avaliar a influência das substâncias sobre a produção de óxido nítrico.
- ✓ Submissão de artigo sobre os compostos ativos de *Guarea kunthiana* sobre *Leishmania* spp.

## REFERÊNCIAS

- ABDELGALEIL, S.A.M.; HASHINAGA, F.; NAKATANI, M. Antifungal activity of limonoids from *Khaya ivorensis*. *Pest. Manag. Sci.*, v. 61, n. 2, p. 186-190, 2005.
- ABDELGALEIL, S.A.M.; IWAGAWA, T.; DOE, M.; NAKATANI, M. Antifungal limonoids from the fruits of *Khaya senegalensis*. *Fitoter.*, v. 75, n. 6, p. 566-572, 2004.
- ACESTOR, N.; MASINA, S.; WALKER, J.; SARAVIA, N.G.; FASEL, N.; QUADRONI, M. Establishing two-dimensional gels for the analysis of leishmania proteomes. *Proteomics*, v. 2, p. 877-879, 2003.
- ADEMOLA, I.O.; FAGBEMI, B.O.; IDOWU, S.O. Evaluation of the anthelmintic activity of *Khaya senegalensis* extract against gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. *Vet. Parasitol.*, v. 122, p. 151-164, 2004.
- ALEXANDER, B.; MAROLI, M. Control of phlebotomine sandflies. *Med. Vet. Entomol.*, v. 17, n. 1, p. 1-18, 2003.
- ANTHONY, J.P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? *Trends Parasitol.*, v. 21, n.10, p. 462-468, 2005.
- ARAUJO, C.A.C.; ALEGRIO, L.V.; LEON, L.L. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. *Phytochemistry*, v. 49, n. 3, p. 751-754, 1998.
- AREVALO I.; WARD, B.; MILLER, R.; MENG, T. C.; NAJAR, E.; ALVAREZ, E.; MATLASHEWSKI, G; LANOS, L.; CUENTAS, A.. Successful Treatment of Drug-Resistant Cutaneous Leishmaniasis in Humans by Use of Imiquimod, an Immunomodulator. *Clin. Infect. Dis.*, n. 33, p. 1847–1851, 2001.
- BAGGE, D. Pesticide to anticancer applications from secondary metabolites of the Rutaceae and Meliaceae. Disponível em [http://www.colostate.edu/Depts/Entomology/courses/en570/papers\\_1998/bagge.htm](http://www.colostate.edu/Depts/Entomology/courses/en570/papers_1998/bagge.htm) acessado em 8/5/06.

BASSELIN M.; LAWRENCE, F.; ROBERT-GERO, M. Pentamidine uptake in *Leishmania donovani* and *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. *Biochem. J.*, v. 315, p. 631-634, 1996.

BELKAID, Y.; MENDEZ, S.; LIRA, R.; KADAMBI, N.; MILON, G.; SACKS, D.A. Natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged “silent” phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J. Immunol.*, v. 165, p. 969-977, 2000.

BENTE, M.; HARDER, S.; WIESGIGL, M.; HEUKESHOVEN, J.; GELHAUS, C.; KRAUSE, F.; CLOS, J.; BRUCHHAUS, I. Developmentally induced changes of the proteome in the parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics*, v. 3, p. 1811-1829, 2003.

CALIXTO, J.B. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CAMACHO, M.R.; PHILLIPSON, J.D.; CROFT, S.L.; KIRBY, G.C.; WARHURST, D.C.; SOLIS, P.N. Terpenoids from *Guarea rhopalocarpa*. *Phytochemistry*, v. 56, p. 203-210, 2001.

CARVALHO, P.B.; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease – review. *Fitoter.*, v. 72, p. 599-618, 2001.

CORRÊA, P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro, RJ: Ministério da Agricultura, 1969 a 1978, v. IV, p. 510.

CRUZ, I.; MORALES, M.A.; RODRIGUEZ, A.; NOGUER, I.; ALVAR, J. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous users. *Lancet*, v. 359, p. 1124-1125, 2002.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic Adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp. Mol. Pathol.*, n. 72, p.131-141, 2002.

DA SILVA, S.A.G.; COSTA, S.S.; MENDONÇA, S.C.F.; SILVA, E.M.; MORAES, V.L.G.; ROSSI-BERGMANN, B. Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinata* leaf extract in murine leishmaniasis. *Acta Tropica*, v. 60, p. 201-201, 1995.

DAVIS, A.J.; MURRAY, H.W.; HANDMAN, E. Drugs against leishmaniasis: a synergy of technology and partnerships. *Trends Parasitol.*, v. 20, n. 2, p. 73-76, 2004.

DELORENZI, J.C.; ATIAS, M.; GATTASS, C.R.; ANDRADE, M.; REZENDE, C.; PINTO, A.C.; HENRIQUES, A.T.; BOU-HABIB, D.C.; SARAIVA, E.M.B. Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 45, n. 5, p. 1349-1354, 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immun. Microb. Infect Dis.*, v. 27, p. 305-318, 2004.

DESJEUX, P. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 95, p. 239-243, 2001.

EL FAKHRY, Y.; OUELLETTE, M.; PAPADOPOULOU, B. A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. *Proteomics*, v. 2, p. 1007-1017, 2002.

ENDO, T.; KITA, M.; SHIMADA, T.; MORIGUCHI, T.; HIKADA, T.; MATSUMOTO, R.; HASEGAWA, S.; OMURA, M. *Plant. Biotechnol.*, v. 19, p. 397-403, 2002.

FERESIN, G.E.; TAPIA, A.; SORTINO, M.; ZACCHINO, S.; ARIAS, A.R.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; RODRIGUEZ, J.; THEODULOZ, C.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Bioactive alkyl phenols and embelin from *Oxalis erythrorhiza*. *J. Ethnopharmacol.*, v. 88, p. 241-247, 2003.

FERREIRA, I.C.P.; LONARDONI, M.V.C.; MACHADO, G.M.C.; LEON, L.L.; GOBBI FILHO, L.; PINTO, L.H.B.; OLIVEIRA, A.J.B. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 3, p. 325-327, 2004.

FURLAN, M.; LOPES, M.N.; FERNANDES, J.B.; PIRANI, J.R. Diterpenes from *Guarea trichilioides*. *Phytochemistry*, v. 4, p. 1159-1161, 1996.

FOURNET, A.; ANGELO, A.; NUÑOZ, V.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. *J. Ethnopharmacol.*, v. 37, p.159-064, 1992.

FOURNET A.; BARRIOS, A.A.; MUNOZ, V.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A.; BRUNETON, J. 2-substituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.*, n. 37, p. 859-863, 1993.

FOURNET A.; BARRIOS, A.A.; MUNOZ, V. Leishmanicidal and trypanocidal activities of bolivian medical plants. *J. Ethnopharmacol.*, n. 41, p. 19-37, 1994.

GARCEZ, F.R.; GARCEZ, W.S.; DA SILVA, A.F.G.; BAZZO, R.C.; RESENDE U.M. Terpenoid constituents from leaves of *Guarea kunthiana*. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 15, n. 5, p. 767-772, 2004.

GUERIN, P.J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S.L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M.K.; BRYCESON, A.D.M. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect. Dis.*, v. 2, n. 8, p. 494-501, 2002.

GUTHRIE, N.; ELZEBIA MARIA, V.; CAROLL KENNETH KITCHENER, C.K. (Inventors); Compositions and methods of treatment of neoplastic diseases and hypercholesterolemia with citrus limonoids and flavonoids and tocotrienols; Patent Number: US6251400; Publication date: 2001-06-26.

HABTEMARIAM, S. *In vitro* antileishmanial effects of antibacterial es from two Ethiopian *Premna* species: *P. schimperi* e *P. oligotricha*. *BMC*, v. 3, n. 6, p. 1-6, 2003.

HIGGINS, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, v. 8, p. 67-113, 1992.

JARAMILLO, M.C.; ARANGO, G.J.; GONZÁLEZ, M.C.; ROBLEDO, S.M.; VÉLEZ, I.D. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. *Fitoter.*, v. 71, p. 183-186, 2000.

JHA, T.K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C.P.; BACHMANN, P.; KARBWANG, J.; FISCHER, C.; VOSS, A; BEMAN, J. Miltefosine, an Oral Agent for the Treatment of Indian Visceral Leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.*, n. 341, p. 1795-1800, 1999.

JULLIAN, V.; BONDUELLE, C.; VALENTIN, A.; ACEBEY, L.; DUIGOU, A.G.; PREVOST, M.F.; SAUVAIN, M. New diterpenoids from *Laetia procera* (Poepp.) Eichler



(Flacortiaceae), with antiplasmodial and antileishmanial activities. *Bioorganic & Med. Chem. Letters*, v.15, p. 5065-5070, 2005.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; CROFT, S.L. Antileishmanial activity of two  $\gamma$ -pyrones from *Podolepis hieracioides* (Asteraceae). *Acta Tropica.*, v. 86, p. 105-107, 2003a.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; CROFT, S.L. Natural products as antiparasitic drugs *Parasitol. Res.*, v. 90, p. 55-62, 2003b.

KLINK, C.A.; MACHADO, R.B.A. Conservação do Cerrado Brasileiro. Megadiversidade, 2005. Cap. 1, p. 147-155.

LAGO, J.H.G.; BROCHINI, C.B.; ROQUE, N.F. Terpenes from leaves of *Guarea macrophylla* (Meliaceae). *Phytochemistry*, v. 55, p. 727-731, 2000.

LAGO, J.H.G.; BROCHINI, C.B.; ROQUE, N.F. Terpenoids from *Guarea guidonia*. *Phytochemistry*, v. 60, p. 333-338, 2001.

LAGO, J.H.G.; ROQUE, N.F. Cycloartane triterpenoids from *Guarea macrophylla*. *Phytochemistry*, v. 60, p. 329-332, 2002.

LAVAUD, C.; MASSIOT, G.; VASQUEZ, C.; MORETTI, C.; SAUVAIN, M.; BALDERRAMA, L. 4-Quinolinone alkaloids from *Dictyoloma peruviana*. *Phytochemistry*, v. 40, p. 317-320, 1995.

LEANDRO, C.; CAMPINO, L. Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 22, p. 352-357, 2003.

LEON, L.L.; MACHADO, G.M.; BARRAL, A.; DE CARVALHO-PAES, L.E.; GRIMALDI JUNIOR, G. Antigenic differences among *Leishmania amazonensis* isolates and their relationship with distinct clinical forms of the disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 87, n. 2, p. 229-234, 1992.

LUX, H.; HEISE, N.; KLENNER, T.; HART, D.; OPPERDOES, F.R. Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 111, p. 1-14, 2000.

MACHADO-COELHO, G.L.L.; CAIAFFA, W.T.; GENARO, O.; MAGALHAES, P.A.; MAYRINK, W. Risk factors for mucosal manifestations of American cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 99, p. 55-61, 2005.

MAES, L.; BERGHE, D.V.; GERMONPREZ, N.; QUIRIJNEN, L.; COS, P.; DE KIMPE, N.; PUYVELDE, L.V. *In vitro* and *in vivo* activities of triterpenoid sapoin extract (PX-6518) from the plant *Maesa balansae* against visceral *Leishmania* species. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 48, n. 1, p. 130-136, 2004.

MAHIOU, V.; ROBLOT, F.; FOURNET, A.; HOCQUEMILLER, R. Bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Guatteria boliviana*. *Phytochemistry*, v. 54, p. 709-716, 2000.

MENDONÇA-FILHO, R.R.; RODRIGUES, I.A.; ALVIANO, D.S.; SANTOS, L.S.; SOARES, R.M.A.; ALVIANO, C.S.; LOPES, A.H.C.S.; ROSA, M.S.S. Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). *Res. Microbiol.*, v. 155, p. 136-143, 2003.

MESQUITA, M.L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; DE PAULA, J.E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L.S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Mem.Inst. Oswaldo Cruz*, v.100, n. 7, p. 783-787, 2005.

MISHRA, V.; PARVEEN, N.; SINGHAL, K.C.; KHAN, N.U. Antifilarial activity of *Azadirachta indica* on cattle filarial parasite *Setaria cervi*. *Fitoter.*, v. 76, p. 54-61, 2005.

MOOTOO, B.S.; JÁTIVA, C.; TINTO, W.F.; REYNOLDS, W.F.; MCLEAN, S. Ecuadorin, a novel tetranortriterpenoid of *Guarea kunthiana*. *Can. J. Chem.*, v. 70, p. 1260-1264, 1992.

MORETTI, C.; SAUVAIN, M.; LAVAUD, C.; MASSIOT, G.; BRAVO, J.A.; MUNOZ, V. A novel antiprotozoal aminosteroid from *Saracha punctata*. *J. Nat. Prod.*, v. 61, p. 1390-1393, 1998.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G., Advances in leishmaniasis. *Lancet*, v. 366, p. 1561-1577, 2005.

NAPOLITANO, D.R.; MINEO, J.R.; DE SOUZA, M.A.; DE PAULA, J.E., ESPÍNDOLA, L.S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. *J. Ethnopharmacol.*, v. 99, p. 37-41, 2005.

OLLIARO, P.L.; GUERIN, P.J.; KAASKJOLD, A.A.; ROTTINGEN, J.A.; SUNDAR, S. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. *Lancet*, v. 5, p. 763-773, 2005.

OKAMURA, H.; YAMAUCHI, K.; IWAGAWA, T.; NAKATANI, M. Synthesis and biological activities of degraded limonoids, ( $\pm$ )-fraxinellonone and its related compounds. *Tetrahedron Lett.*, v. 38, n. 2, p. 263-266, 1997.

ORISADIPE, A.T.; ADESOMOJU, A.A.; D'AMBROSIO, M.; GUERRIERO, A.; OKOGUN, J.I. Tirucallane triterpenes from the leaf extract of *Entandrophragma angolense*. *Phytochemistry*, v. 66, p. 2343-2328, 2005.

OULLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis : drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist. Updat.*, v. 7, p. 257-266, 2004.

PEREZ-VICTORIA, F.J.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 47, p. 2397-2403, 2003.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603-613, 2001.

RANG, H.P. ; DALE, M.M., RITTER, J.M. *Farmacologia*. 4<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2001, 703 p.

ROCHA, L.G.; ALMEIDA, J.R.G.S.; MACEDO, J.M.; BARBOSA-FILHO, J.M. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*, v. 12, p. 514-535, 2005.

ROSA, M.S.S.; MENDONÇA-FILHO, R.R.; BIZZO, H.R.; RODRIGUES, I.A.; SOARES, R.M.A.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C.S.; LOPES, A.H.C.S. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 47, n. 6, p. 1895-1901, 2003.

ROUHI, A.M.; WASHINGTON, C. Rediscovering natural products. *Chem. & Engineer News*, v. 81, n. 41, p. 77-91, 2003.

SAUVAIN, M.; KUNESCH, N.; POISSON, J.; GANTIER, J.C.; GAYRAL, P.; DEDET, J.P. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from the amazonian liana *Doliocarpus dentatus* (Dilleniaceae). *Phytother. Res.*, v. 10, p. 1-4, 1996. *Apud* ROCHA, L.G.; ALMEIDA, J.R.G.S.; MACEDO, J.M.; BARBOSA-FILHO, J.M. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*, v. 12, p. 514-535, 2005.

SALVADOR, M.J.; FERREIRA, E.O.; PRAL, E.M.F.; ALFIERI, S.C.; ALBUQUERQUE, S.; ITO, I.Y.; DIAS, D.A. Bioactivity of crude extracts and some constituents of *Blutaparou portulacoides* (Amaranthaceae). *Phytomedicine*, v. 9, p. 566-571, 2002.

SAXENA, S.; PANT, N.; JAIN, D.C.; BHAKUNI, R.S. Antimalarial agents from plant sources. *Curr. Sci.*, v. 85, n. 10, p. 1314-1329, 2003.

SUAREZ, L.E.C.; MENTCHINI, F.; MONACHE, F.D. Tetranortriterpenoids and Dihydrocinnamic Acid Derivatives from *Hortia colombiana*. *J. Braz. Chem. Soc.*, n. 13, n. 3, p. 339-344, 2002.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniose. *Trop. Med. Int. Health*, v. 6, p. 849-854, 2001.

SUNDAR, S.; MEHTA, H.; SURESH, A.V.; SINGH, S.P.; RAI, M.; MURRAY, H.W. Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: conventional versus lipid formulations. *Clin. Infect. Dis.*, v. 38, p. 377-383, 2004.

TALEB-CONTINI, S.H.; SALVADOR, M.J.; BALANCO, J.M.F.; ALBUQUERQUE, S.; OLIVEIRA, D.C.R. Antiprotozoal effect of crude extracts and flavonoids isolated from *Chromolaena hirsuta* (Asteraceae). *Phytother. Res.*, 2004, n. 18, p. 250-254.

TADA, K.; TAKIDO, M.; KITANAKA, S. Limonoids from fruit of *Melia toosendan* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry*, n. 51, n. 6, p. 787-791, 1999.

TIUMAN, T.S.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; SOUZA, W.; NAKAMURA, C.V. Antileishmanial activity of

parthenolid, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 49, n. 1, p. 176-182, 2005.

TORRES-SANTOS, E.C.S.; MOREIRA, D.L.; KAPLAN, A.M.C.; MEIRELLES, M.N.; ROSSI-BERGMANN, B. Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 43, p. 1234-1241, 1999.

TORRES-SANTOS, E.C.; LOPES, D.; OLIVEIRA, R.R.; CARAUTA, J.P.P.; FALCAO, C.A.B., KAPLAN, M.A.C. Rossi-Bergmann, Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytomedicine*, v. 111, p. 114-120, 2004.

UDEINYA, I.J.; MBAH, A.U.; CHIJIJOKE, C.P.; SHU, E.N. An antimalarial extract from neem leaves is antiretroviral. *Trans. of the Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg*, v. 98, p. 435-437, 2004.

UEDA-NAKAMURA, T.; MENDONÇA-FILHO, R.R.; MORGADO-DIAZ, J.A.; MAZA, P.K.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; ALVIANO, D.S.; ROSA, M.S.S.; LOPES, A.H.C.S.; ALVIANO, C.S.; NAKAMURA, C.V. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. *Parasitol. Int.*, article in press, 2005.

VIANNA, G. Sobre o tratamento de leishmaniose tegumentar. *Rev. Paulista Med. Cir.*, v. 2, p. 167-169, 1914.

WATERMAN, P.G. Evolution of secondary plant metabolism. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, 2001, Disponível em: [www.els.net](http://www.els.net).

WENIGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G.J.; DEHARO, E.; ARAGON, R.; MUÑOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. *J. Ethnopharmacol.*, v. 78, p. 193-200, 2001.

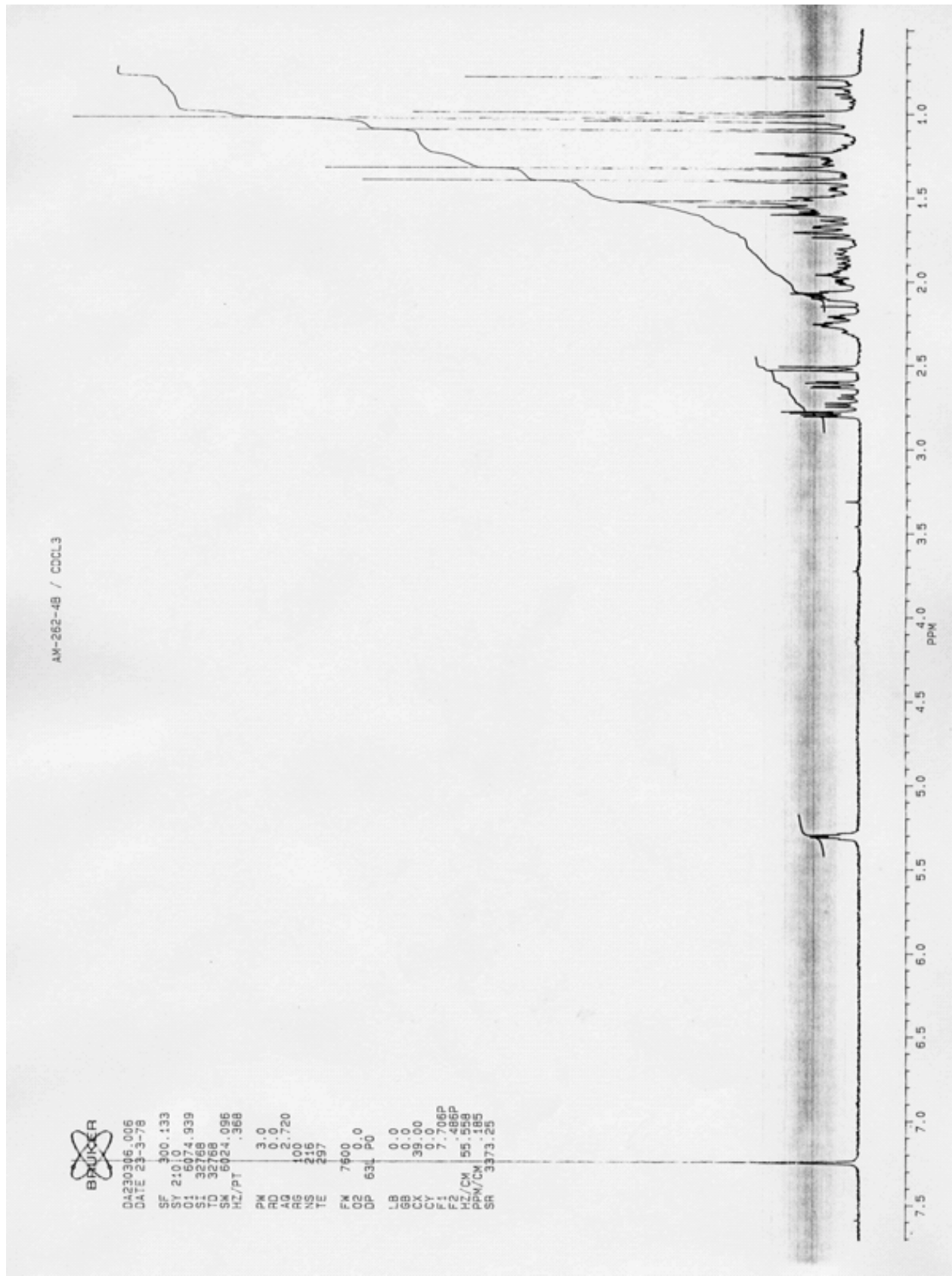
WHAECHTER, A.I.; YALUFF, G.; INCHEUSTI, A.; ARIAS, A.R.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÊ, A.; FOURNET, A. Leishmanicidal and trypanocidal activities of acetogenins isolated from *Annona glauca*. *Phytother. Res.*, v. 12, p. 541-544, 1998.

YAPP, D.T.T.; YAPP, S.Y. *Lansium domesticum*: skin and leaf extracts of this fruit tree interrupt the lifecycle of *Plamodium falciparum*, and are active towards a chloroquine-resistant strain of the parasite (T9) in vitro. *J. Ethnopharmacol.*, v. 85, p. 154-150, 2003.

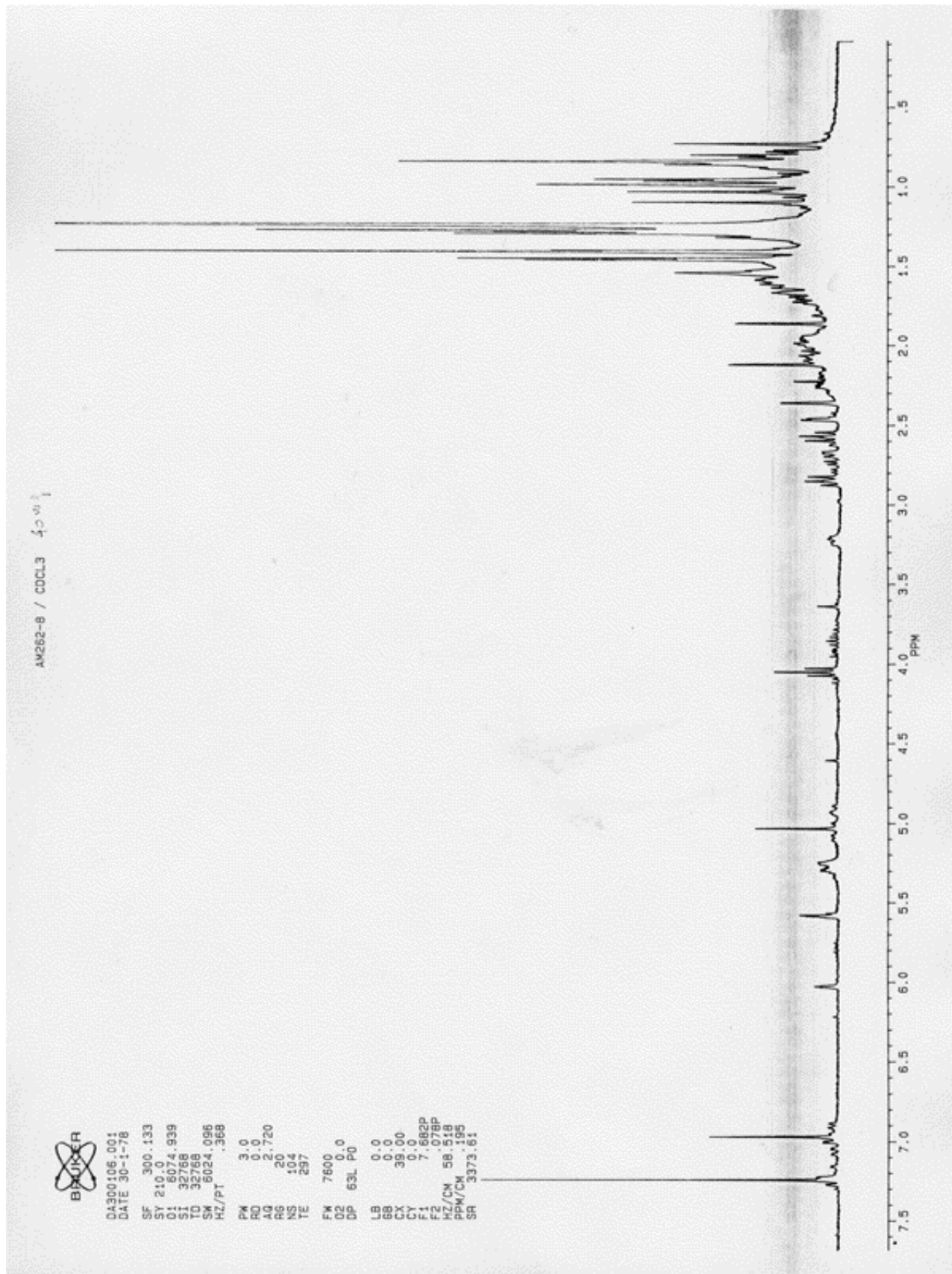
**Referências citadas conforme normas da Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT).**

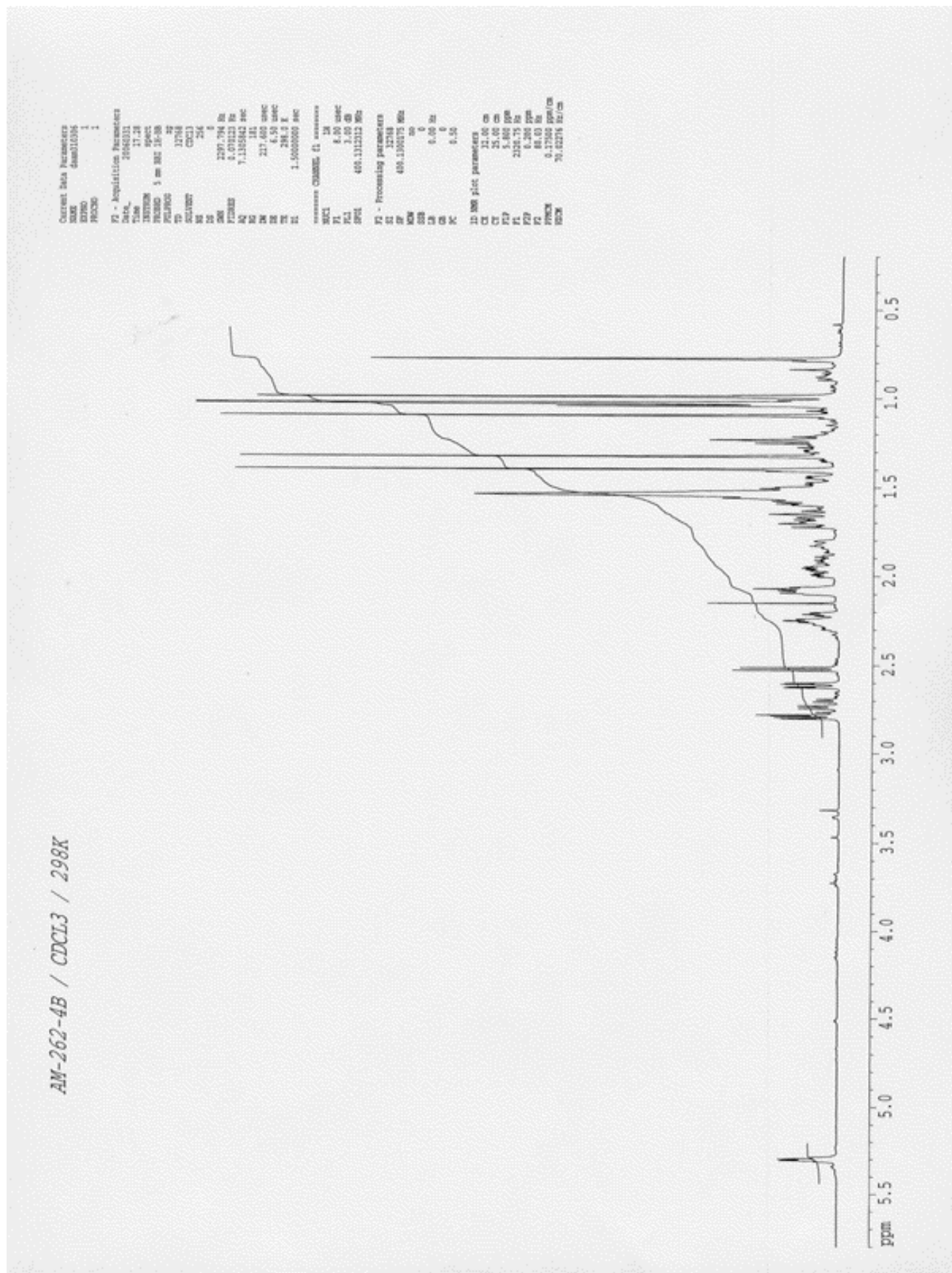
## **ANEXOS**

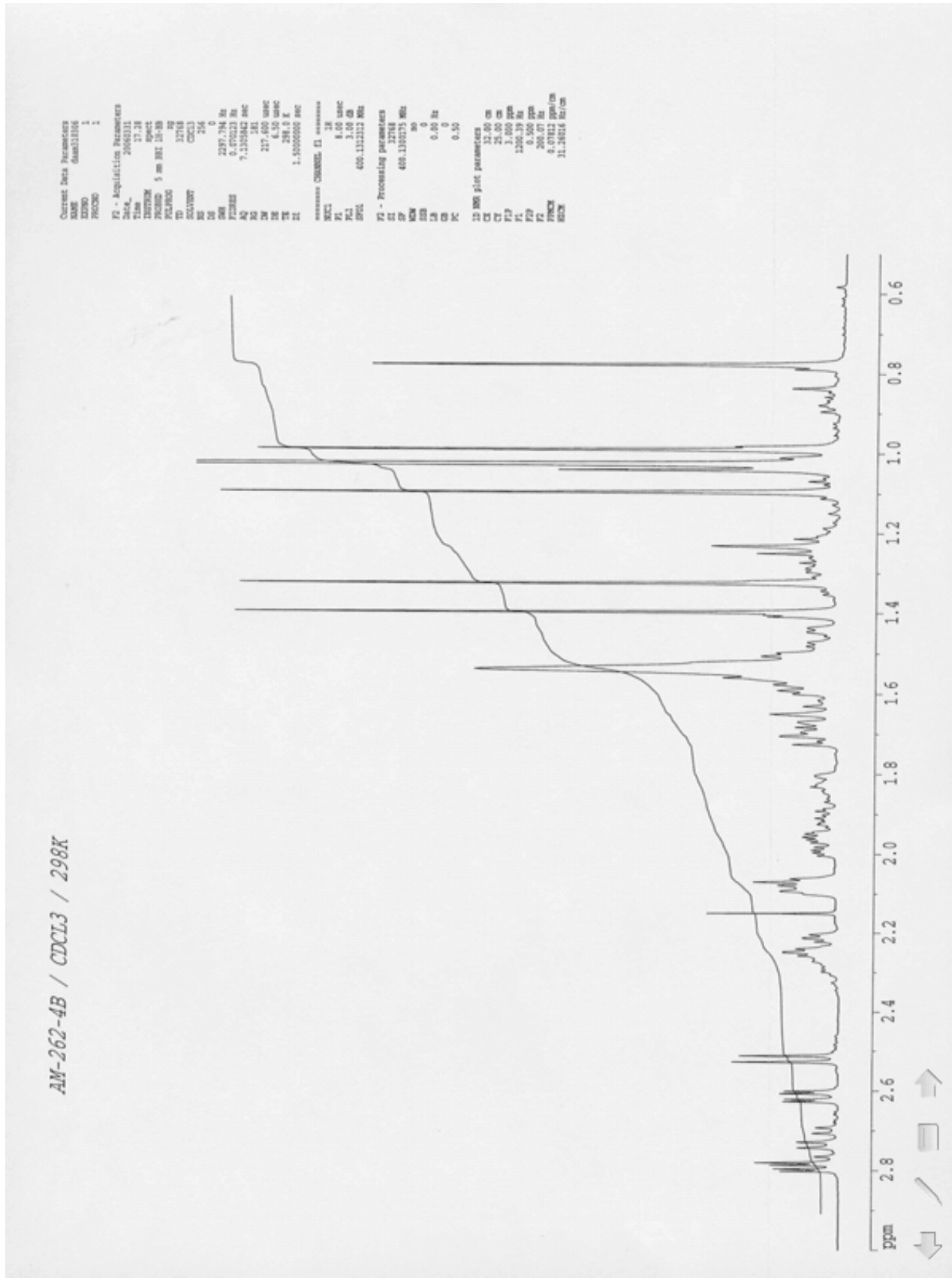
### **ESPECTROS E TABELA DE RMN**



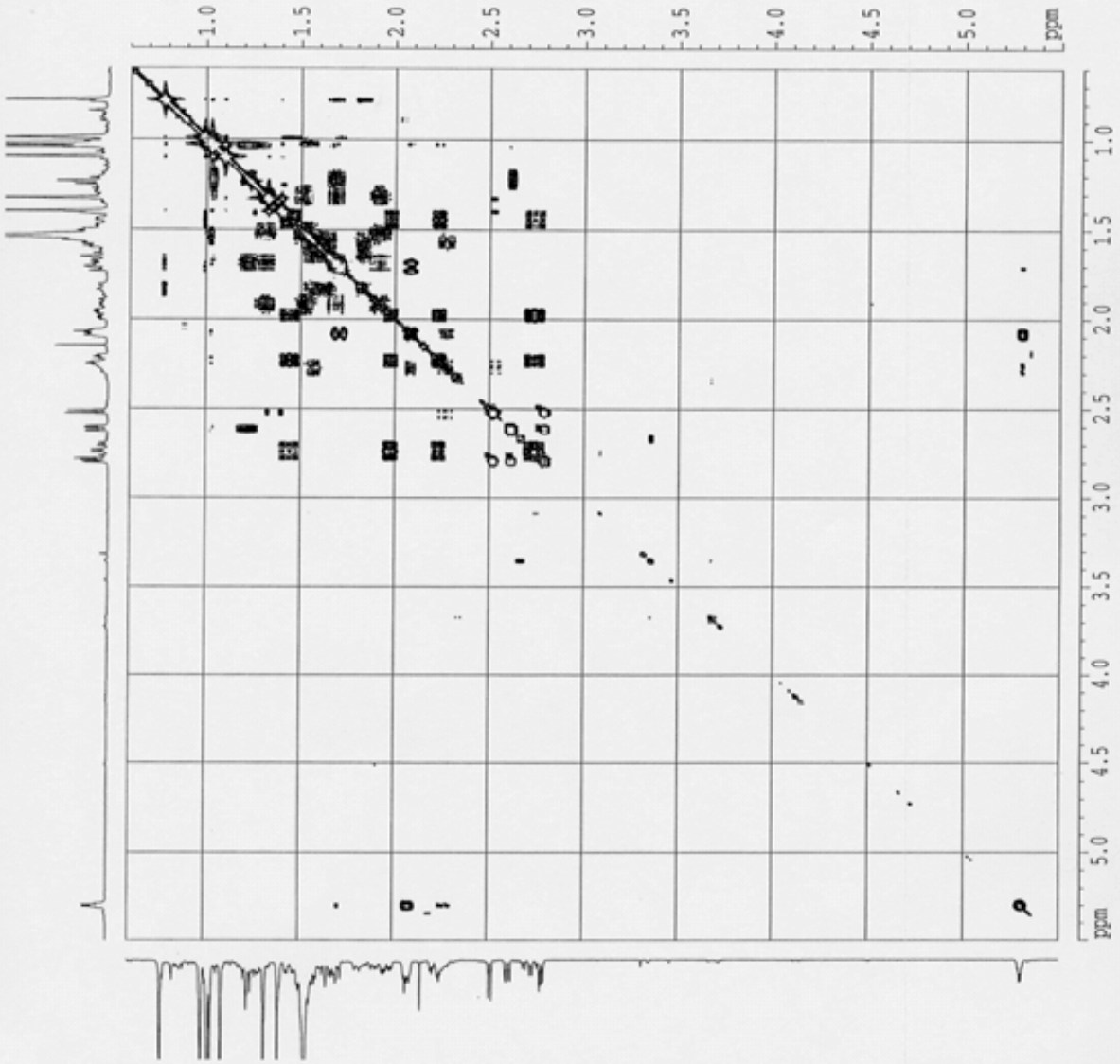








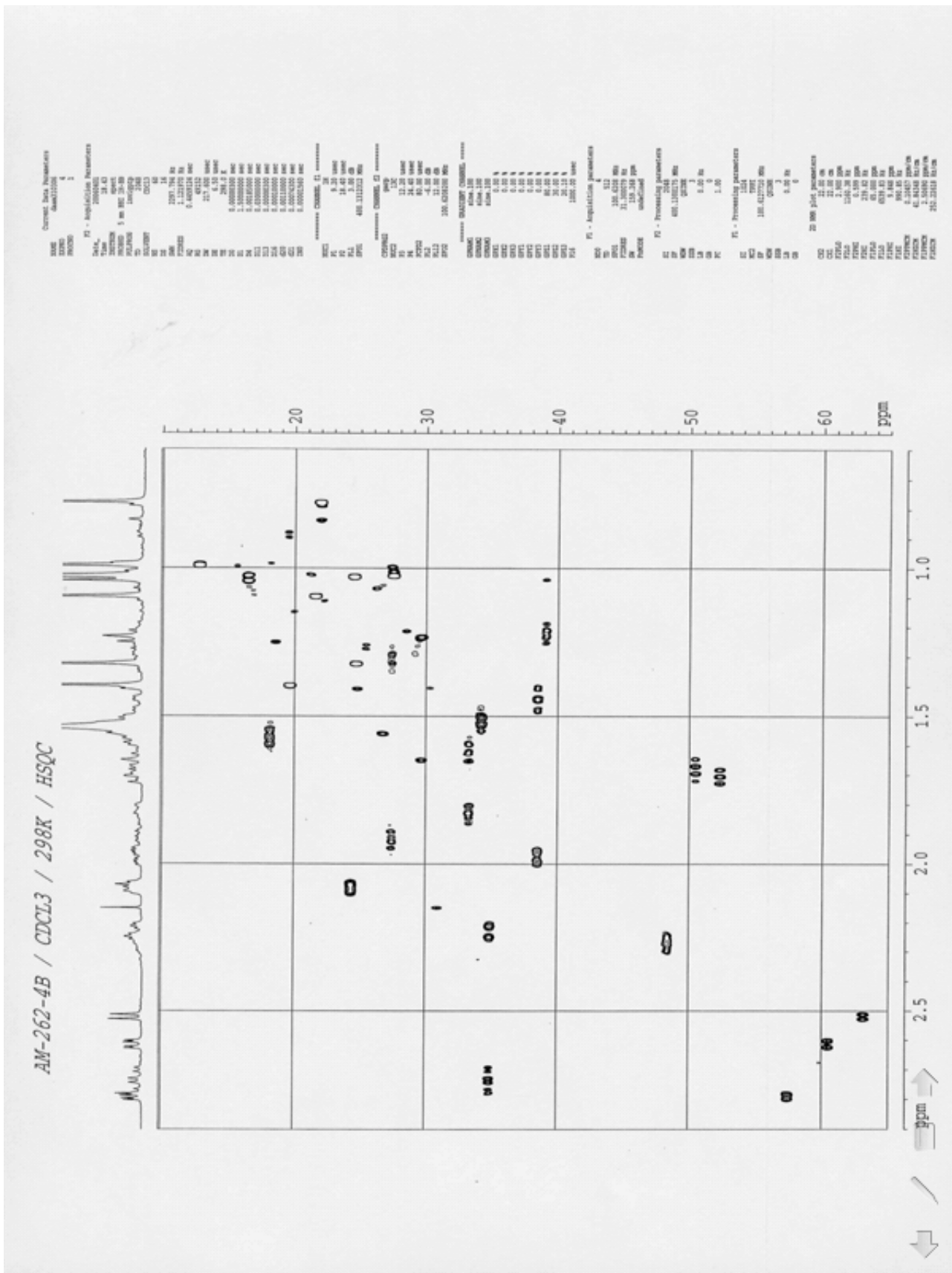
AM-262-4B / CDCL3 / 298K / COSY90

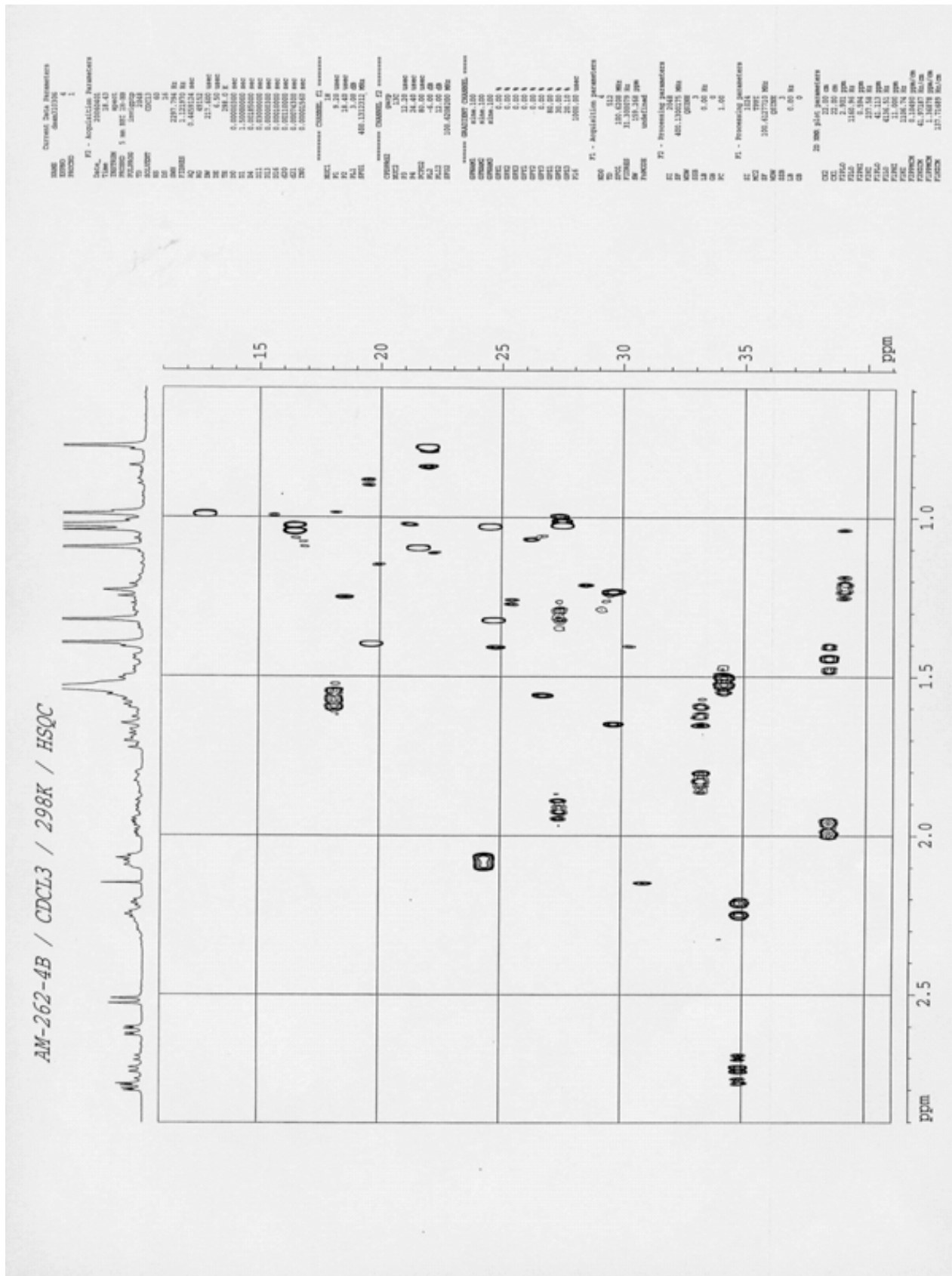


Current Data Parameters  
 NAME: AM-262-4B  
 PROCNO: 1  
 F2 - Acquisition Parameters  
 DATE\_: 20060312  
 TIME: 17.29  
 TIME2: 17.30  
 INSTRUM: spect  
 PULPROG: zgpg30  
 PRGNO: 5  
 SOLVENT: CDCL3  
 NS: 256  
 DS: 4  
 SWH: 2397.764 Hz  
 F2: 121.625 MHz  
 AQ: 0.4458124 sec  
 RG: 256  
 SF: 217.882 MHz  
 TD: 65536  
 SFO: 200.131312 MHz  
 DE: 0.00000100 sec  
 TE: 298.2 K  
 SE: 1.50000000 sec  
 SI: 0.00000100 sec  
 SC: 0.00000100 sec  
 SS: 0.00000100 sec  
 ST: 0.00000100 sec  
 SU: 0.00000100 sec  
 SV: 0.00000100 sec  
 ===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1: 13C  
 P1: 9.20 usec  
 PL1: 0.00 dB  
 PR1: 1.10 usec  
 SFO1: 101.625 MHz  
 ===== CHANNEL CHANNEL =====  
 NUC2: 1H  
 P2: 12.00 usec  
 PL2: 0.00 dB  
 PR2: 1.10 usec  
 SFO2: 400.131312 MHz  
 ===== CHANNEL CHANNEL =====  
 NUC3: 13C  
 P3: 9.20 usec  
 PL3: 0.00 dB  
 PR3: 1.10 usec  
 SFO3: 101.625 MHz  
 ===== CHANNEL CHANNEL =====  
 NUC4: 1H  
 P4: 12.00 usec  
 PL4: 0.00 dB  
 PR4: 1.10 usec  
 SFO4: 400.131312 MHz  
 ===== CHANNEL CHANNEL =====  
 NUC5: 13C  
 P5: 9.20 usec  
 PL5: 0.00 dB  
 PR5: 1.10 usec  
 SFO5: 101.625 MHz  
 ===== CHANNEL CHANNEL =====  
 NUC6: 1H  
 P6: 12.00 usec  
 PL6: 0.00 dB  
 PR6: 1.10 usec  
 SFO6: 400.131312 MHz  
 ===== CHANNEL CHANNEL =====  
 NUC7: 13C  
 P7: 9.20 usec  
 PL7: 0.00 dB  
 PR7: 1.10 usec  
 SFO7: 101.625 MHz  
 ===== CHANNEL CHANNEL =====  
 NUC8: 1H  
 P8: 12.00 usec  
 PL8: 0.00 dB  
 PR8: 1.10 usec  
 SFO8: 400.131312 MHz  
 ===== CHANNEL CHANNEL =====  
 NUC9: 13C  
 P9: 9.20 usec  
 PL9: 0.00 dB  
 PR9: 1.10 usec  
 SFO9: 101.625 MHz  
 ===== CHANNEL CHANNEL =====  
 NUC10: 1H  
 P10: 12.00 usec  
 PL10: 0.00 dB  
 PR10: 1.10 usec  
 SFO10: 400.131312 MHz  
 ===== CHANNEL CHANNEL =====  
 NUC11: 13C  
 P11: 9.20 usec  
 PL11: 0.00 dB  
 PR11: 1.10 usec  
 SFO11: 101.625 MHz  
 ===== CHANNEL CHANNEL =====  
 NUC12: 1H  
 P12: 12.00 usec  
 PL12: 0.00 dB  
 PR12: 1.10 usec  
 SFO12: 400.131312 MHz  
 ===== CHANNEL CHANNEL =====  
 NUC13: 13C  
 P13: 9.20 usec  
 PL13: 0.00 dB  
 PR13: 1.10 usec  
 SFO13: 101.625 MHz  
 ===== CHANNEL CHANNEL =====  
 NUC14: 1H  
 P14: 12.00 usec  
 PL14: 0.00 dB  
 PR14: 1.10 usec  
 SFO14: 400.131312 MHz  
 ===== CHANNEL CHANNEL =====  
 NUC15: 13C  
 P15: 9.20 usec  
 PL15: 0.00 dB  
 PR15: 1.10 usec  
 SFO15: 101.625 MHz  
 ===== CHANNEL CHANNEL =====  
 NUC16: 1H  
 P16: 12.00 usec  
 PL16: 0.00 dB  
 PR16: 1.10 usec  
 SFO16: 400.131312 MHz  
 ===== CHANNEL CHANNEL =====  
 NUC17: 13C  
 P17: 9.20 usec  
 PL17: 0.00 dB  
 PR17: 1.10 usec  
 SFO17: 101.625 MHz  
 ===== CHANNEL CHANNEL =====  
 NUC18: 1H  
 P18: 12.00 usec  
 PL18: 0.00 dB  
 PR18: 1.10 usec  
 SFO18: 400.131312 MHz  
 ===== CHANNEL CHANNEL =====  
 NUC19: 13C  
 P19: 9.20 usec  
 PL19: 0.00 dB  
 PR19: 1.10 usec  
 SFO19: 101.625 MHz  
 ===== CHANNEL CHANNEL =====  
 NUC20: 1H  
 P20: 12.00 usec  
 PL20: 0.00 dB  
 PR20: 1.10 usec  
 SFO20: 400.131312 MHz















## Dados preliminares de RMN.

N°	$\delta C$	$\delta H$ , mult., J(Hz)	COSY	HMBC (H→C)
1	38.5	1.44, dd, (3.6, 14.0) 1.95, dddd ou m ?	2	3, 5, 10, 18
2	34.9	2.20, td, (3.6, 14.2) 2.69, ddd, (3.6, 5.6, 14.2)	1	1, 3, 4, 10
3	216,x	3		
4	47.9	4		
5	52.3	1.71, d, (8.4)	6	4, 6, , 9, 10, 19, 29
6	24.37	2.06, ddd ou m ??, (3.4, 6.8, 12.5)	5, 7, 9	4, 5, 7, 8, 10, ..
7	118.2	5.29, q, (3.4)	6, 9	6, 9, 14, 28
8	145.4			
9	48.4	2.29, m	6, 7, 11	----
10	35.0			
11	18.5	1.54, m	9	8, 12
12	33.3	1.54, m 1.80, m		9, 13, 17, 18
13	43.9			
14	50.8			
15	34.2	1.54, m	16	14, 16, 17
16	27.46	1.31, m 1.89, m	15, 17	13, 14, 17
17	50.5	1.61, m	16, 20	
18	21.9	0.78, s		12, 13, 14, 17
19	12.8	0.99, s		1, 5, 9, 10
20	39.1	1.19, m	17, 21, 22	22
21	16.5	1.031, d, (6.2)	20	17, 20, 22
22	60.5	2.6, dd, (2.3, 8.1)	20, 23	20
23	57.5	2.78, dd, (2.3, 6.1)	22, 24	22, 24
24	63.1	2.51, d, (6.1)	23	23, 25, 27
25	58.0			
26	19.7	1.40, s		24, 25, 27
27	24.71	1.32, s		24, 25, 26
28	27.53	1.03, s		8, 13, 14, 15
29	21.6	1.10, s		3, 4, 5, 30
30	24.54	1.03, s		3, 4, 5, 29