



Universidade de Brasília
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Renata Machado Marchese

Atividade de constituintes micromoleculares de
***Renealmia alpinia* (Rottb.) Maas (Zingiberaceae) sobre**
Leishmania (Leishmania) chagasi

Brasília, DF

2009

Renata Machado Marchese

**Atividade de constituintes micromoleculares de
Renealmia alpinia (Rottb.) Maas (Zingiberaceae) sobre
*Leishmania (Leishmania) chagasi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Laila Salmen Espíndola

Brasília, DF

2009

TERMO DE APROVAÇÃO

RENATA MACHADO MARCHESE

Atividade de constituintes micromoleculares de *Renalmia alpinia* (Rottb.)
Maas (Zingiberaceae) sobre *Leishmania (Leishmania) chagasi*

Dissertação aprovada pela seguinte banca examinadora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília:

Profª. Dra. Laila Salmen Espíndola – Universidade de Brasília
Presidente

Prof. Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos – Universidade Federal do Paraná
Examinador

Prof. Dr. Gustavo Adolfo Sierra Romero – Universidade de Brasília
Examinador

Brasília, 27 de fevereiro de 2009.

Aos meus pais, Rejane e Itamar, meus maiores exemplos, por sonharem comigo os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por me fazer uma pessoa capaz de buscar e lutar pelos meus sonhos e por me dar a oportunidade de realizá-los. Por ser minha força e meu amparo. Por colocar em minha vida pessoas especiais, fundamentais para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje. Por todas as bênçãos!

À Laila, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Aos meus pais, Rejane e Itamar, meus exemplos de vida, por sonharem comigo os meus sonhos. Por acreditarem em mim e por investirem tudo, sempre e em primeiro lugar, no futuro de suas filhas. Sem dúvida, vocês foram mais do que essenciais pra que eu chegasse até aqui e conquistasse a realização de mais este sonho. Obrigada por serem tão especiais e por se fazerem sempre presentes, independente da ocasião, situação ou condição. É por vocês e pra vocês!

Às minhas irmãs Alessandra e Juliane, por serem as minhas companheiras de todas as horas. Por torcerem por mim, por me ouvirem, por me aconselharem e, acima de tudo, por agüentarem o meu estresse e as minhas preocupações. Vocês também foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Obrigada pelas conversas, pelos conselhos, pelo apoio.

Ao João Paulo, que acompanhou grande parte deste estudo comigo e que mais do que todos teve que conviver com meus momentos de ausência, aprendendo a ser paciente. Obrigada pelo companheirismo dedicado a mim nestes meses e também pela compreensão. Obrigada por estar sempre presente, quer fosse no laboratório, fazendo colunas, cromatografias e testes, quer fosse em casa, procurando artigos ou corrigindo meus textos. Sem seu apoio teria sido mais difícil concretizar este sonho. Obrigada por toda a atenção dispensada à concretização deste meu sonho e pela disposição em me ajudar, em todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho.

À minha prima Aline, cujo apoio foi também de fundamental importância para a finalização deste estudo. Obrigada por tantas vezes estar disposta a ir comigo ao laboratório, depois de um dia de trabalho, saindo de lá altas horas da noite, após coletar centenas de frações da coluna, de lavar diversas vidrarias e de testar inúmeros eluentes para as cromatografias. Ufa... Chegamos ao fim! Foi muito importante poder contar com sua ajuda e incentivo nos momentos de cansaço.

Aos meus cunhados, Reginaldo e Gustavo, por torcerem por mim e por estarem sempre dispostos a ajudar no que pudessem. Acreditem, gestos simples como me acompanhar à UnB ou somente me levar até lá tiveram grande importância durante estes dois anos. Obrigada pelo apoio e torcida!

Ao João Paulo, Aline, Juliane e Gustavo um obrigada especial, pois a ajuda de vocês foi muito mais do que essencial. Obrigada por terem se tornado um “pouco farmacêuticos” apenas para me ajudar. Isso me deu ânimo para chegar até o fim e sem vocês eu não teria conseguido.

Ao Everton, por ter “adotado” as minhas substâncias e, como ele mesmo diz, por ter se “afeiçoado” a elas. Obrigada pelo seu apoio e ajuda, tão essenciais para a realização deste trabalho e pela disposição que sempre demonstrou em ajudar.

À minha madrinha, Adriana, por sempre ter torcido por mim e para que eu finalizasse, com êxito, este trabalho. Nossas conversas, sua opinião, seus conselhos, foram fundamentais para que eu estivesse hoje aqui, concluindo esta dissertação.

À Maria Olinda, por me ajudar com a revisão final do texto e pelas palavras de incentivo. Obrigada pelo apoio e pela torcida!

A todos os amigos do laboratório de Farmacognosia, em especial à Ellen, Nashira e Dani, por terem me acolhido no grupo de trabalho e também à Aline, por sempre ter

demonstrado torcer por mim e pelo sucesso deste trabalho. A todos, um obrigada especial. Obrigada pelo companheirismo! Adorei fazer parte deste grupo de amigos.

Aos amigos da União Química Emanuelle, Paula, Carolina, Ana Carolina, Patrícia, Juliana, Cínara, Júlio, José Eduardo, Guilherme, Danilo, Gustavo, Amanda, Fabiana, Eliana e Josimar, pelo apoio e por sempre se mostrarem torcendo pelo êxito deste trabalho. É muito bom poder contar com o carinho e torcida de vocês. Vocês também fazem parte desta conquista!

Ao professor Dr. José Elias de Paula, pela ajuda na coleta e identificação da espécie vegetal objeto deste trabalho e pela atenção e generosidade dispensados à nossa equipe e ao nosso laboratório.

Ao professor Gustavo Sierra Romero, por nos acolher em seu laboratório, cedendo suas instalações para que pudéssemos trabalhar e por aceitar compor a banca. Sua colaboração junto ao Laboratório de Farmacognosia foi fundamental para a realização e conclusão deste trabalho.

Ao professor Dr. Edilberto Rocha Silveira e à professora Dra. Renata Mendonça, por terem gentilmente cedido as instalações do Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear- CENAUREMN para a realização de parte deste trabalho e por terem disposto de seu precioso tempo para me auxiliarem na finalização deste.

Ao professor Cid Aimbiré e ao Dr. Thales Lima Rocha, por terem aceitado o convite para compor a banca.

A todos, familiares e amigos, que me ajudaram a chegar até aqui, obrigada pela torcida e incentivo. Tenham certeza, lembro-me, com muito carinho do apoio de cada um. Essa conquista não é somente minha, é de todos que, de alguma forma, me ajudaram nesta jornada!

“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É esta a emoção fundamental que está na raiz de toda a ciência e arte”.

Albert Einstein

RESUMO

As leishmanioses correspondem a um complexo de doenças tropicais causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* e encontram-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo. Suas manifestações clínicas podem variar de lesões cutâneas benignas a lesões mucocutâneas desfigurantes e destrutivas ou à forma visceral, fatal se não tratada. Sua incidência tem aumentado por diversos fatores, dentre eles a co-infecção com o HIV, que dificulta o êxito da farmacoterapia. O tratamento atualmente disponível inclui os antimoniais pentavalentes como medicamentos de primeira escolha e a pentamidina e a anfotericina B, como segunda escolha, além da miltefosina, já registrada em alguns países. Entretanto, problemas de toxicidade e alto custo associados ao uso destes medicamentos, além de casos de resistência, limitam sua utilização. Existe, portanto, uma necessidade urgente de se buscar novos compostos que possibilitem opções terapêuticas para o tratamento das leishmanioses. Extratos ou compostos de origem vegetal podem constituir-se em um valioso início pela busca de novos agentes terapêuticos. Uma triagem *in vitro* previamente realizada em nosso laboratório sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, identificou a atividade do extrato hexânico das folhas de *Renalmia alpinia*, com IC₅₀ de 40,58 µg/mL. O extrato hexânico de folhas e pseudocaulis de *Renalmia alpinia* (Rottb.) Maas (Zingiberaceae) foi então testado e apresentou atividade sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*, com IC₅₀ de 22,81 µg/mL. O fracionamento químico biomonitorado do extrato ativo sobre *Leishmania (Leishmania) chagasi* em coluna cromatográfica resultou na obtenção de 24 grupos, reunidos segundo atividade anti-*Leishmania* e perfil cromatográfico em CCD. O grupo D₃, com um IC₅₀ de 19,41 µg/mL, foi obtido em maior quantidade a partir de nova coluna e então fracionado. Seu fracionamento resultou na obtenção de 26 sub-grupos, reunidos segundo perfil cromatográfico. Destes, o sub-grupo D₃-9 permitiu o isolamento do 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila e do 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila, elucidados por meio de técnicas espectrométricas de ressonância magnética nuclear (RMN) de uma dimensão (1D) (¹H e ¹³C) e bidimensional (2D) (COSY, HSQC e HMBC) e de infra-vermelho (IV). Até onde conhecemos, o 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila é inédito na espécie *Renalmia alpinia*, na família Zingiberaceae e como composto natural tendo sido obtido previamente apenas por síntese. Seus dados de RMN de ¹³C, COSY, HSQC e HMBC são inéditos. Já o composto 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila é inédito na espécie *Renalmia alpinia*, entretanto, foi previamente isolado dos rizomas de *Boesenbergia rotunda* (Zingiberaceae) e também obtido por síntese. Seus dados de RMN de ¹³C, COSY, HSQC e HMBC são inéditos. Quanto à atividade anti-*Leishmania*, estes dois compostos apresentaram IC₅₀ >100 µg/mL não sendo, portanto, os compostos responsáveis pelo potencial anti-*Leishmania* observado para o sub-grupo D₃-9 e para a espécie. Entretanto, são substâncias inéditas na espécie *Renalmia alpinia*, cuja composição química é pouco conhecida. Quanto à atividade anti-*Leishmania* da planta, esta apresenta, em sua composição, outros grupos e sub-grupos provenientes do fracionamento cromatográfico do extrato que, em triagem, apresentaram-se ativos sobre *Leishmania (Leishmania) chagasi*, como AcOEt₂, com IC₅₀ de 7,12 µg/mL, D₄, com IC₅₀ de 3,08 µg/mL e D₃-11 e D₃-16, com IC₅₀ de 12,23 e 15,25 µg/mL, respectivamente. Tais grupos e/ou sub-grupos permanecem como promissores para novos estudos na busca de opções terapêuticas para o controle das leishmanioses. Estão sendo obtidos em maiores quantidades para prosseguimento dos estudos.

Palavras-chave: leishmaniose, tratamento, triagem, Cerrado, *Renalmia alpinia*, *Leishmania (Leishmania) chagasi*, Zingiberaceae

ABSTRACT

Leishmaniasis is a complex of tropical disease caused by protozoa belonging to the genus *Leishmania* and it is among the six most important endemic diseases in the world. Its clinical manifestations can vary from benign cutaneous injuries to the disfiguring and destructive mucosal lesions or to the visceral form, fatal if not treated. Its incidence has increased for several factors, including co-infection with the HIV which hampers the success of the pharmacotherapy. The currently available treatment includes pentavalent antimony as first choice and the pentamidine and the amphotericin B, as second-line drugs, in addition to the miltefosine, already registered in some countries. However, problems of toxicities and high cost associated to the use of these medicines, beyond resistance cases, limit their use. So, there is an urgent need to find new compounds that provide therapeutics options for the treatment of leishmaniasis. Extracts or compounds from plants can consist in a valuable beginning on search for new therapeutics agents. An *in vitro* screening previously carried out in our laboratory against promastigotes forms of *Leishmania amazonensis* identified activity for the hexane extract of *Renealmia alpinia* leaves, with an IC₅₀ of 40,58 µg/mL. The hexane crude extract of *Renealmia alpinia* (Rottb.) Maas (Zingiberaceae) leaves and pseudostems was then tested and showed activity against promastigotes forms of *Leishmania (Leishmania) chagasi*, with IC₅₀ of 22,81 µg/mL. The chemical bioguided fractionation of the crude extract active against *Leishmania (Leishmania) chagasi* in chromatographic column produced 24 groups, congregated according to anti-*Leishmania* activity and chromatographic profile in TLC. The D₃ group, with IC₅₀ of 19,41 µg/mL, was gotten in greater quantify from a new column and then fractionated. Its fractionation resulted in 26 sub-groups, congregated according to chromatographic profile. Of these, the D₃-9 sub-group allowed the isolation of 2,4-dihydroxy-6-(phenylethene)-methyl benzoate and of 2,4-dihydroxy-6-(phenylethane)-methyl benzoate, elucidated by spectrometric techniques of nuclear magnetic resonance (NMR) (1D) (¹H, ¹³C) e (2D) (COSY, HSQC, HMBC) and infra-red spectroscopy (IR). To the best of our knowledge, 2,4-dihydroxy-6-(phenylethene)-methyl benzoate is unpublished in *Renealmia alpinia*, in Zingiberaceae family and as natural compound and it was previously gotten by synthesis. Your NMR ¹³C, COSY, HSQC e HMBC data are unpublished. The compound 2,4-dihydroxy-6-(phenylethane)-methyl benzoate is unpublished in *Renealmia alpinia* specie, however, it was previously isolated from *Boesenbergia rotunda* rhizomes (Zingiberaceae) and it was also obtained by synthesis. Your NMR ¹³C, COSY, HSQC e HMBC data are unpublished. Against *Leishmania (Leishmania) chagasi*, both compounds showed IC₅₀ > 100 µg/mL and, therefore, are not the antileishmanial compounds from the D₃-9 sub-group and *Renealmia alpinia* specie. However, are unpublished in *Renealmia alpinia* specie, which chemical composition is almost unknown. Other groups and sub-groups proceeding from the crude extract and that had showed activity against *Leishmania (Leishmania) chagasi* during the study, as AcOEt₂, with IC₅₀ of 7,12 µg/mL, D₄, with IC₅₀ of 3,08 µg/mL and D₃-11 and D₃-16, with IC₅₀ of 12,23 and 15,25 µg/mL remain as promising for new studies in the search for therapeutics options for leishmaniasis control. They are being obtained in larger quantities for further studies.

Keywords: leishmaniasis, treatment, screening, Cerrado, *Renealmia alpinia*, *Leishmania (Leishmania) chagasi*, Zingiberaceae

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

µg/mL - micrograma por mililitro

µL - microlitro

µM – micromolar

kJ/mol – quilojoule/mol

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*)

Atm - atmosfera

ATP - adenosina trifosfato

CBM - concentração bactericida mínima

CCD - cromatografia em camada delgada

CENAUREMN - Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear

CIM - Concentração Inibitória Mínima

COSY - espectroscopia de correlação (*correlated spectroscopy*)

COX - ciclooxigenase

COX-2 - ciclooxigenase 2

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucléico (*desoxiribonucleic acid*)

EC₅₀ - concentração que produz 50% da resposta máxima

FT-IV - espectroscopia de infra-vermelho (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

g - grama

G - grupo

GSH - glutationa

GST - glutationa- ômega- transferases

GTP - guanosina trifosfato

h - hora(s)

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

HMBC - *Heteronuclear Multiple Bond Coherence*

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)

HSQC - *Heteronuclear Single-Quantum Coherence*

IC₁₂ - concentração necessária (μ/mL) para fornecer uma zona de inibição de 12 milímetros de diâmetro ao redor de um poço de 100μL em ágar de 4 milímetros de altura semeado com *Saccharomyces cerevisiae* (Sc-7)

IC₁₀₀ - concentração capaz de inibir 100% da atividade do parasita

IC₅₀ - concentração capaz de inibir 50% da atividade do parasita

IFN γ - interferon gama

IM - intramuscular

NOS - enzima óxido nítrico sintetase

Intervalo QRS - despolarização ventricular sinalizada no eletrocardiograma

IV - intravenosa

KBr - brometo de potássio

kDNA - DNA do cinetoplasto

Kg - quilograma

LC - leishmaniose cutânea

LCD - leishmaniose cutânea difusa

LCL - leishmaniose cutânea localizada

LD₅₀ - dose letal para 50% da população em teste ou dose letal mediana

LdMT - aminofosfolípideo transferase

LMC - leishmaniose mucocutânea

LT - leishmaniose tegumentar

LV - leishmaniose visceral

MBCL - cloreto de metilbenzetônio

mg - miligrama(s)

mL - mililitro(s)

mm - milímetro(s)

mRNA - RNA mensageiro

ms - milisegundo(s)

MTT - sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)- 2,5- difenil- 2-H brometo de tetrazolium

NNN - meio ágar-sangue de Novye e McNeal modificado por Nicolle

nm - nanômetro(s)

NOESY - espectroscopia do efeito nuclear overhauser (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*)

OMS - Organização Mundial de Saúde

Onda T - repolarização ventricular sinalizada no eletrocardiograma

PBS - tampão fosfato salino (*phosphate buffered saline*)

PGE₂ - prostaglandina E₂

pKa – medida logarítmica da constante de dissociação do ácido

PKADL - leishmaniose dérmica pós-calazar (*post kala-azar dermal leishmaniasis*)

q.s.p. - quantidade suficiente para

QTC - intervalo de tempo corrigido

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

Sb(III) - antimônio trivalente

Sb(V) - antimônio pentavalente

SDS - dodecil sulfato de sódio

Segmento ST - espaço que compreende o fim do intervalo QRS e início da onda T

TDR1 - Reductase 1 de *Leishmania major* dependente de tiol

Th1 - T-auxiliar-1

TNF- α - fator de necrose tumoral-alfa

UB/UnB – Herbário da Universidade de Brasília

UFC - Universidade Federal do Ceará

LISTA DE ANEXOS

Anexo I - Espectros e Tabelas de RMN e IV de 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila.....	125
Anexo II - Espectros e Tabelas de RMN e IV de 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila.....	138

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de distribuição da leishmaniose cutânea – países endêmicos (90% dos casos).....	2
Figura 2: Mapa de distribuição da leishmaniose visceral – países endêmicos (90% dos casos).....	3
Figura 3: Formas promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania</i> ssp.....	7
Figura 4: Principais reservatórios das leishmanioses (ciclos zoonótico e antropozoonótico)...	8
Figura 5: Flebotomíneo vetor da leishmaniose.....	9
Figura 6: Fêmea do flebotomíneo, adulta, ingurgitada	9
Figura 7: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> ssp.....	11
Figura 8: Leishmaniose cutânea localizada; lesão única.....	16
Figura 9: Leishmaniose cutânea localizada; lesões múltiplas.....	16
Figura 10: Leishmaniose cutânea difusa.....	16
Figura 11: Leishmaniose mucocutânea.....	16
Figura 12: Leishmaniose visceral.....	16
Figura 13: Leishmaniose visceral; estado final.....	16
Figura 14: Mapa com distribuição global dos casos de leishmaniose e dos casos reportados de co-infecção <i>Leishmania</i> -HIV.....	17
Figura 15: Área de distribuição do Cerrado no Brasil.....	43
Figura 16: Paisagem típica do Cerrado.....	44
Figura 17: <i>Renealmia alpinia</i> (Rottb.) Maas (Zingiberaceae).....	47
Figura 18: Folha de <i>Renealmia alpinia</i> (Rottb.) Maas (Zingiberaceae).....	48
Figura 19: Seqüência de obtenção do extrato hexânico.....	54
Figura 20: Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico de folhas e pseudocaulis de <i>Renealmia alpinia</i> e de seu grupo ativo sobre <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> para obtenção de frações cujo perfil cromatográfico, monitorado em CCD, permite a reunião em grupos	55

Figura 21: Etapas do fracionamento químico do extrato hexânico das folhas e pseudocaules de <i>Renalmia alpinia</i>	55
Figura 22: <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> em meio ágar sangue (NNN) e em meio líquido (Schneider®)	60
Figura 23: Câmara de Neubauer e um quadrante da câmara de Neubauer	61
Figura 24: Metodologia para o teste referente ao cálculo do IC50.....	63
Figura 25: Leitura dos resultados obtidos para o extrato hexânico de folhas e pseudocaules de <i>Renalmia alpinia</i> , seus grupos e sub-grupos, utilizando-se a metodologia do MTT.....	64
Figura 26: Primeira coluna cromatográfica do extrato hexânico de folhas e pseudocaules de <i>Renalmia alpinia</i>	78
Figura 27: Segunda coluna filtrante: Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico de folhas e pseudocaules de <i>Renalmia alpinia</i>	81
Figura 28: Terceira coluna filtrante: Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico de folhas e pseudocaules de <i>Renalmia alpinia</i>	86
Figura 29a: Cromatograma do sub-grupo ativo D ₃ -9, oriundo do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico das folhas e pseudocaules de <i>Renalmia alpinia</i> , obtido em HPLC operando no modo normal, eluente hexano:acetato de etila (80:20), fluxo 4,72 mL/min.....	87
Figura 29b: Cromatograma do sub-grupo D ₃ -9, oriundo do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico das folhas e pseudocaules de <i>Renalmia alpinia</i> , evidenciando os picos dos compostos 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila (D ₃ -9-P ₂) e 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila (D ₃ -9-P ₃) isolados em HPLC, em coluna X-Terra, operando no modo normal, eluente hexano:acetato de etila (80:20), fluxo 4,72 mL/min.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Medicamentos disponíveis para tratamento da leishmaniose.....	21
Tabela 2: Atividades medicinais de plantas da família <i>Zingiberaceae</i>	51
Tabela 3: Atividade do extrato hexânico de folhas e pseudocaulis de <i>Renealmia alpinia</i> sobre formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>	65
Tabela 4: Grupos obtidos a partir da primeira coluna cromatográfica do extrato hexânico de folhas e pseudocaulis de <i>Renealmia alpinia</i>	75
Tabela 5: Atividade dos grupos G ₁ a G ₂₄ , obtidos na primeira coluna cromatográfica, sobre formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> a 100 µg/mL. Testes realizados em triplicata.....	76
Tabela 6: Reunião dos grupos G ₁ a G ₂₄ , obtidos da primeira coluna cromatográfica do extrato hexânico das folhas e pseudocaulis de <i>Renealmia alpinia</i> , após triagem para atividade anti- <i>Leishmania</i> e segundo o perfil em cromatografia em camada delgada.....	77
Tabela 7: Atividade dos grupos D ₃ , D ₄ e AcOEt ₂ , obtidos a partir da reunião dos grupos ativos oriundos do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico das folhas e pseudocaulis de <i>Renealmia alpinia</i> sobre <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> . Testes realizados em triplicata.....	78
Tabela 8: Atividade dos grupos diclorometânicos obtidos da segunda coluna cromatográfica do extrato hexânico das folhas e pseudocaulis de <i>Renealmia alpinia</i> sobre promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> a 100 µg/mL.....	80
Tabela 9: Sub-grupos oriundos da terceira coluna cromatográfica, referente ao fracionamento do grupo ativo D ₃	82
Tabela 10: Atividade dos 26 sub-grupos provenientes da terceira coluna cromatográfica referente ao fracionamento do grupo ativo D ₃ sobre promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> a 100 µg/mL.....	83
Tabela 11: Atividade dos sub-grupos mais ativos, provenientes da terceira coluna cromatográfica, referente ao fracionamento do grupo ativo D ₃ , sobre formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> . Testes em triplicata.....	84
Tabela 12: Rendimento dos sub-grupos mais ativos, provenientes da terceira coluna cromatográfica, referente ao fracionamento do grupo ativo D ₃	84

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1. Agente Etiológico.....	7
2.2. Reservatórios.....	8
2.3. Vetores.....	8
2.4. Manifestações Clínicas.....	12
2.5. Tratamento.....	18
2.5.1. Antimoniais pentavalentes.....	21
2.5.1.1. Mecanismo de Ação e Redução do Metal.....	21
2.5.1.2. Formulações e Efeitos Colaterais.....	23
2.5.1.3. Eficácia e Resistência.....	25
2.5.2. Anfotericina B.....	27
2.5.2.1. Mecanismo de Ação.....	27
2.5.2.2. Formulações e Efeitos Colaterais.....	28
2.5.2.3. Eficácia e Resistência.....	30
2.5.3. Pentamidina.....	31
2.5.3.1. Mecanismo de ação.....	31
2.5.3.2. Formulações e Efeitos Colaterais.....	31
2.5.3.3. Eficácia e Resistência.....	32
2.5.4. Miltefosina (hexadecilfosfocolina).....	33
2.5.4.1. Mecanismo de Ação.....	34
2.5.4.2. Efeitos Colaterais.....	35
2.5.4.3. Eficácia e Resistência	36

2.6. Quimioterapias em Desenvolvimento.....	37
2.6.1. Sitamaquina.....	37
2.6.2. Paromomicina.....	39
2.7. A Pesquisa por Novos Medicamentos.....	41
2.8. Cerrado.....	42
2.9. <i>Renalmia alpinia</i> (Rottb.) Maas.....	46
3. OBJETIVOS.....	52
3.1. Objetivo Geral.....	52
3.2. Objetivos Específicos.....	52
4. METODOLOGIA.....	53
4.1. Identificação e Coleta.....	53
4.2. Obtenção dos extratos brutos.....	53
4.3. Fracionamento Químico.....	54
4.3.1. Primeira coluna filtrante.....	55
4.3.2. Segunda coluna filtrante.....	57
4.3.3. Terceira coluna filtrante.....	58
4.3.4. Isolamento de substâncias.....	59
4.4. Identificação e Elucidação Estrutural.....	59
4.5. Cultura <i>in vitro</i> de <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>	60
4.6. Avaliação da atividade anti- <i>Leishmania</i> do extrato hexânico, grupos e sub-grupos de <i>Renalmia alpinia</i>	61
4.7. Análise estatística.....	64
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
6. CONCLUSÕES.....	99
7. PERSPECTIVAS.....	101

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 102

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses correspondem a um complexo de doenças tropicais causadas por mais de vinte diferentes espécies de protozoários intracelulares pertencentes ao gênero *Leishmania* e atualmente encontram-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (WHO/TDR, 2008; Pinheiro e Rossi-Bergmann, 2007; Croft *et al.*, 2006; El-Safi *et al.*, 2006; Ministério da Saúde, 2006).

Os principais reservatórios para os parasitos são animais domésticos e selvagens e a doença é transmitida pela picada de flebotomíneos, durante seu repasto sanguíneo, quando os parasitos são injetados na epiderme e derme dos seus hospedeiros vertebrados, inclusive o homem (Croft *et al.*, 2006; El-Safi *et al.*, 2006; Chan-Bacab e Pena-Rodríguez, 2001). No inseto, os parasitos apresentam-se sob sua forma promastigota, infectante, ao passo que nos hospedeiros vertebrados são encontrados sob a forma amastigota (Marques *et al.*, 2007).

As infecções causadas por *Leishmania* podem conduzir a diversas manifestações clínicas, que podem variar desde lesões cutâneas benignas que tendem à cura espontânea, mesmo quando não tratadas, a lesões mucocutâneas desfigurantes e destrutivas, em geral secundárias às lesões cutâneas. Há ainda a forma visceral da doença que acomete órgãos como fígado e baço e pode ser fatal se não tratada (Wanasen *et al.*, 2008).

Essas diferentes formas clínicas da doença resultam da infecção por diferentes espécies do parasito. No entanto, o desfecho clínico depende, não apenas da espécie envolvida na transmissão da doença, mas também do estado imunológico do indivíduo infectado (Wanasen *et al.*, 2008; Ministério da Saúde, 2007; Selvapandiyan *et al.*, 2006).

As leishmanioses são endêmicas em oitenta e oito países, setenta e sete dos quais são países em desenvolvimento, distribuídos por quatro continentes (WHO/TDR, 2008; Ahua *et al.*, 2007; Singh, 2006). Cerca de 350 milhões de pessoas vivem sob risco de contaminação (Vieira *et al.*, 2008; Brenzan *et al.*, 2007; Croft *et al.*, 2006) e são focos importantes de

infecção as Américas Central e do Sul, a Europa Meridional, o Norte e Leste africanos, o Oriente Médio e o subcontinente indiano (Croft *et al.*, 2006).

Estima-se que há 12 milhões de pessoas infectadas por *Leishmania* no mundo (Vieira *et al.*, 2008; Brenzan *et al.*, 2007), com uma incidência anual de 500 mil casos da forma visceral da doença e 1,5 a 2,0 milhões de casos da forma cutânea (Machado *et al.*, 2007; Croft *et al.*, 2006; Singh, 2006) e uma taxa de morte de 50.000 pessoas/ano (Selvapandiayan *et al.*, 2006). No Brasil, estudos apontam para a ocorrência de cerca de 20.000 novos casos anuais da doença (Rocha *et al.*, 2005).

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), atualmente, mais de 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru (figura 1) (WHO/TDR, 2008; Khamesipour *et al.*, 2006; Singh, 2006) e mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Sudão, Etiópia e Nepal (figura 2) (Chappuis *et al.*, 2007). No entanto, o número de casos de leishmanioses está, provavelmente, subestimado, tendo-se em vista que a doença é de notificação compulsória em apenas quarenta dos oitenta e oito países endêmicos (Croft *et al.*, 2006).

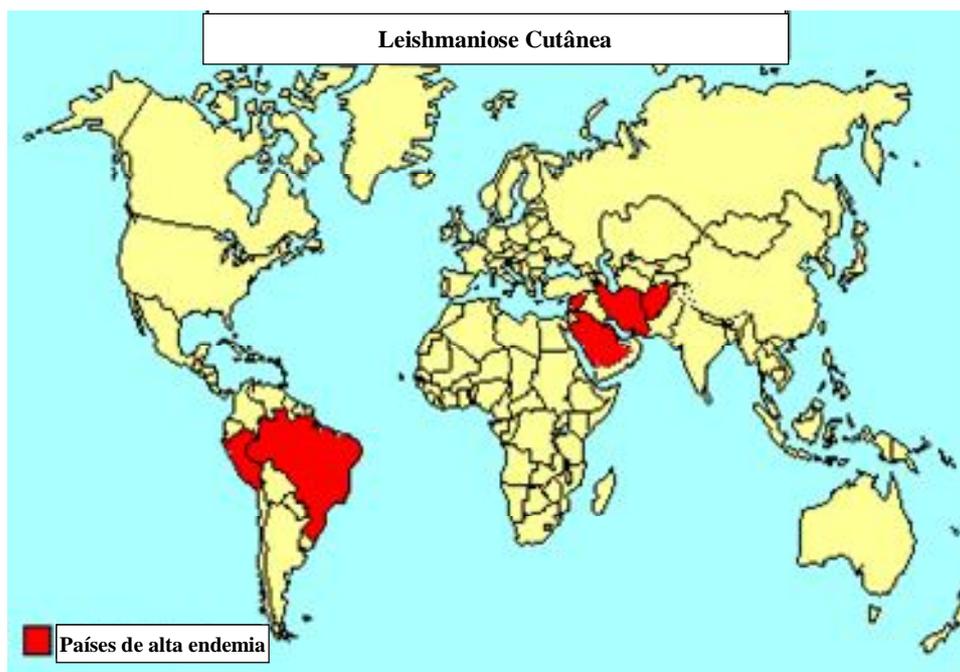


Figura 1: Mapa de distribuição da leishmaniose cutânea – países endêmicos (90% dos casos)
Fonte: WHO, disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index2.html>



Figura 2: Mapa de distribuição da leishmaniose visceral – países endêmicos (90% dos casos)
 Fonte: Chappuis *et al.*, 2007

A incidência da leishmaniose tegumentar americana vem aumentando na América Latina, principalmente no Brasil, que registrou 605.062 casos, no período de 1980 a 2005 (Monteiro *et al.*, 2008). No mesmo período, o Brasil registrou 59.129 casos de leishmaniose visceral, com uma média anual de 2.274 novos casos, distribuídos em dezenove Estados da Federação, atingindo quatro das cinco regiões brasileiras (Boraschi *et al.*, 2008; Dantas-Torres e Brandão-Filho, 2006; Ministério da Saúde, 2005), sendo 82,5% provenientes da Região Nordeste (Carranza-Tamayo *et al.*, 2009; Maia-Elkhoury *et al.*, 2008). Porém, gradativamente, a leishmaniose visceral expandiu-se para as regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste, passando de 15% dos casos em 1998 para 44% em 2005. Ainda entre 1998 e 2005 foram registrados casos autóctones de leishmaniose visceral em 1.904 diferentes municípios brasileiros (Maia-Elkhoury *et al.*, 2008).

Nos últimos doze anos a média de incidência da leishmaniose visceral foi de 2,0 casos por 100 mil habitantes, com um coeficiente de letalidade de 5,5% (Maia-Elkhoury *et al.*, 2008), correspondendo a um aumento de 117% entre 1994 e 2005 (Maia-Elkhoury *et al.*, 2008).

Embora a doença tenha permanecido estável por muitos anos, fatores como o desenvolvimento urbano, a devastação florestal, as mudanças ambientais, a migração da população para áreas onde a doença é endêmica, a má nutrição, a susceptibilidade genética e os fatores de risco individuais, como o HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), têm contribuído de forma significativa para o conseqüente aumento na sua incidência (Croft *et al.*, 2006; Rocha *et al.*, 2005). No Brasil, a expansão dos casos de leishmaniose visceral nas regiões centro-oeste e sudeste é decorrente principalmente dos ciclos urbanos (Boraschi *et al.*, 2008).

E, dentre esses, um dos maiores problemas emergentes na atualidade é a co-infecção *Leishmania* com o vírus HIV, especialmente porque não há tratamento efetivo para esses pacientes (Ueda-Nakamura *et al.*, 2006).

A associação leishmaniose-HIV foi relatada em trinta e três países, sendo a maioria dos casos provenientes da Europa Meridional. Nessa região, cerca de 25-70% dos pacientes adultos portadores de leishmaniose visceral estão co-infectados pelo HIV e estima-se que 1,5-9% dos pacientes com AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) irão desenvolver leishmaniose (Ashutosh *et al.*, 2007).

Quanto ao tratamento para as leishmanioses, este é difícil, uma vez que, no homem, o protozoário *Leishmania*, na sua forma amastigota, é parasito intracelular obrigatório de macrófagos (Marques *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2005). Não há vacinas disponíveis para a doença e os medicamentos de primeira escolha, os antimoniais pentavalentes, desenvolvidos antes da década de 60, são tóxicos e administrados exclusivamente por via parenteral (Rocha *et al.*, 2005). Além disso, existem relatos de resistência a esses medicamentos, sendo esse um fenômeno crescente em todas as formas de leishmaniose (Brendle *et al.*, 2002), em especial em áreas endêmicas para a doença.

Na região de Bihar, na Índia, onde a prevalência de leishmanioses é elevada, foram relatadas taxas superiores a 65% de não responsividade ao tratamento com antimoniais

pentavalentes e, atualmente, esses medicamentos não são mais utilizados nesses locais (Seifert e Croft, 2006).

Como segunda linha de tratamento, em casos de resistência ou intolerância aos antimoniais, são utilizadas a anfotericina B, na forma liofilizada de desoxicolato sódico de anfotericina, e a pentamidina. Devido aos inúmeros e freqüentes efeitos colaterais da anfotericina sob a forma de desoxicolato, novas formulações foram desenvolvidas e encontram-se atualmente disponíveis comercialmente. Uma dessas formulações é a anfotericina B lipossomal (AmBisome®). Entretanto, seu elevado custo não permite seu uso rotineiro nos serviços de saúde de países em desenvolvimento (Ministério da Saúde, 2006; Valderrama *et al.*, 2005). Quanto à pentamidina, sua eficácia é inferior a dos antimoniais pentavalentes e anfotericina B e suas reações adversas são maiores (Ministério da Saúde, 2006).

Em 2002, a miltefosina, inicialmente desenvolvida como uma substância anticancerígena, foi registrada na Índia para tratamento da leishmaniose visceral, constituindo-se no primeiro tratamento por via oral. Foi o último medicamento leishmanicida a ser lançado no mercado (Ahua *et al.*, 2007; Croft *et al.*, 2006) e em 2005 foi registrado também na Colômbia para tratamento da leishmaniose cutânea (Croft *et al.*, 2006).

Desde que foi introduzido para uso clínico, nenhum caso de resistência à terapia das leishmanioses com miltefosina foi relatado. Entretanto, estudos apontam para a facilidade com que esta resistência pode vir a ocorrer, principalmente quando o uso do medicamento se tornar freqüente (Choudhury *et al.*, 2008).

Diante desse cenário, existe uma necessidade urgente de se buscar novos compostos que possibilitem opções terapêuticas para o tratamento das leishmanioses. Nesse contexto, extratos ou compostos de origem vegetal podem constituir-se em um valioso início pela busca de novos agentes terapêuticos (Rocha *et al.*, 2005), pois os produtos naturais e seus derivados

são as fontes mais comuns de medicamentos e representam mais de 30% do mercado farmacêutico mundial (Basso *et al.*, 2005).

A ampla biodiversidade brasileira coloca o país em uma posição estratégica para o desenvolvimento da exploração racional e sustentada de novos metabólitos, com valor terapêutico (Basso *et al.*, 2005). Nesse contexto, se destaca o Cerrado, que engloba uma rica e característica flora que cobre quase 2 milhões de km² do país. Muitas das plantas são utilizadas pela medicina tradicional do Cerrado para tratamento de algumas doenças tropicais como esquistossomose, malária, leishmanioses, infecções fúngicas e bacterianas, dentre outras (Alves *et al.*, 2000).

O grupo de pesquisas do Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília, através da triagem biológica, associada à medicina tradicional e à quimiotaxonomia vem detectando extratos e substâncias de origem vegetal promissoras para o tratamento de várias doenças, inclusive leishmanioses (Vieira *et al.*, 2008; Mesquita *et al.*, 2005). E é nesse intuito que se insere este trabalho de pesquisa.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Agente Etiológico

Os agentes etiológicos das leishmanioses são protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania* (ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae), parasitos intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear (Ministério da Saúde, 2007). Estes protozoários podem infectar animais, seres humanos e insetos e existem sob uma forma flagelada ou promastigota (figura 3), encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, ou ainda sob uma forma aflagelada ou amastigota (figura 3), encontrada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (Toledo *et al.*, 2008; Ministério da Saúde, 2007; Piscopo e Mallia, 2006).

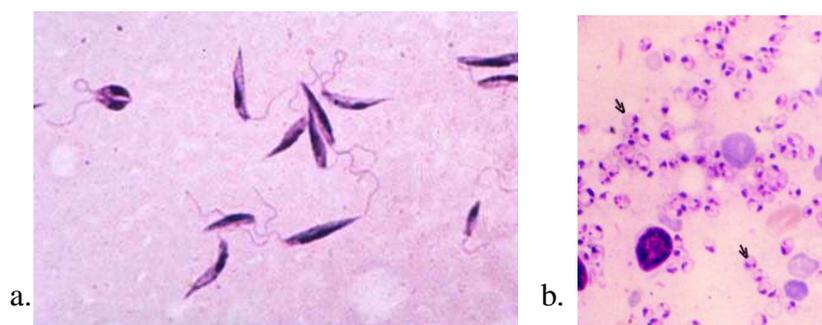


Figura 3: Formas promastigotas (a) e amastigotas (b) de *Leishmania* ssp.

Fonte: <http://www.colegiosaofrancisco.com.br/alfa/leishmaniose/leishmaniose.php>; Gontijo e Carvalho, 2003

Existem ao menos vinte espécies de *Leishmania* (Singh *et al.*, 2006) e cada uma delas causa manifestações clínicas específicas, também relacionadas à resposta imunológica do paciente. A distribuição geográfica dessas espécies é variada, caracterizando diferentemente a doença em cada localização (Piscopo e Mallia, 2006).

De acordo com as características genéticas, bioquímicas e imunológicas das espécies de *Leishmania*, essas foram agrupadas em diferentes complexos (Chan-Bacab e Penarodríguez, 2001).

2.2. Reservatórios

Os reservatórios para a doença são animais como cães e roedores (ciclo zoonótico), além de seres humanos (ciclo antroponótico) (figura 4) (Piscopo e Mallia, 2006). Na área urbana, o cão é a principal fonte de infecção e, no ambiente silvestre, são as raposas e os marsupiais (Ministério da Saúde, 2006; Piscopo e Mallia, 2006).

Como hospedeiro doméstico o cão é, provavelmente, o mais importante reservatório natural relacionado com os casos humanos da doença, representando também uma fonte de infecção para o vetor e constituindo-se em um importante elo na transmissão das leishmanioses para o homem (Monteiro *et al.*, 2005).

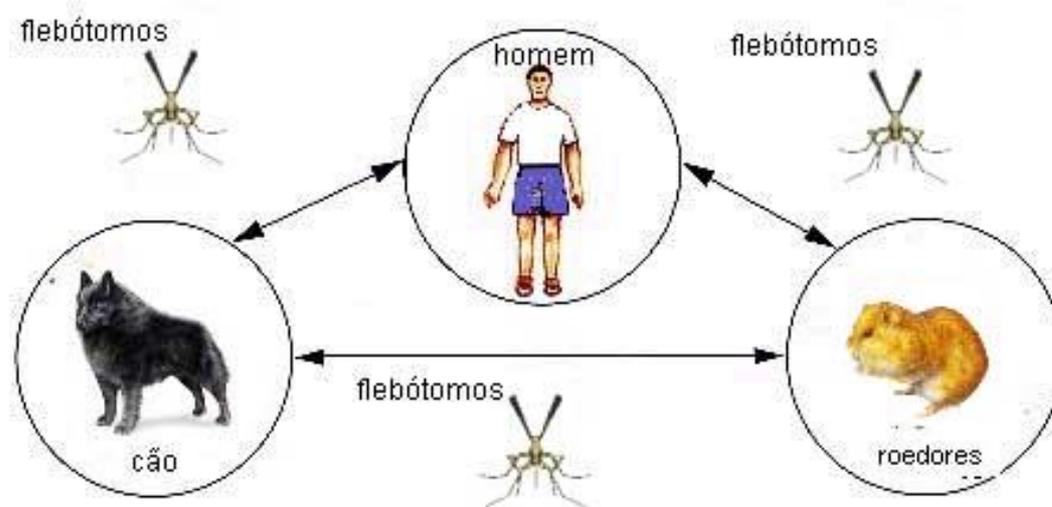


Figura 4: Principais reservatórios das leishmanioses (ciclos zoonótico e antroponótico)

Fonte: <http://www.saudeanimal.com.br/leishmaniose>

2.3. Vetores

Os vetores das leishmanioses são insetos denominados flebotomíneos, pertencentes à Ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo, com cerca de setenta espécies podendo transmitir a doença (De Marcos *et al.*, 2007; Ministério da Saúde, 2007; Piscopo e Mallia, 2006).

Os flebotomíneos (figuras 5 e 6) são insetos pequenos, medindo de 1 a 3 mm de comprimento, apresentam o corpo revestido por pêlos e são de coloração clara. Apresentam comportamento característico com vôos em pequenos saltos e pouso com as asas entreabertas. Alimentam-se ao entardecer e tendem a permanecer próximos às áreas de procriação, não muito acima do solo. Ambos os sexos necessitam de carboidratos como fonte energética e as fêmeas são, ainda, hematófagas, alimentando-se também de sangue para o desenvolvimento dos ovos (Ministério da Saúde, 2006; Piscopo e Mallia, 2006). Popularmente são conhecidos como mosquito palha, tatuquira, birigui, dentre outros (Ministério da Saúde, 2007).



Figura 5: Flebotomíneo vetor da leishmaniose

Fonte: http://www2.portoalegre.rs.gov.br/sms/default.php?p_secao=652



Figura 6: Fêmea do flebotomíneo, adulta, ingurgitada (foto ampliada)

Fonte: Ministério da Saúde, 2006

A infecção do vetor ocorre quando a fêmea do flebotomíneo, durante o repasto sanguíneo, ao sugar o sangue de mamíferos contaminados com *Leishmania*, ingere macrófagos infectados por protozoários em sua forma amastigota (figura 7) (De Oliveira *et al.*, 2004). No trato digestivo anterior do inseto, esses macrófagos se rompem liberando as formas amastigotas de *Leishmania*, que se reproduzem por divisão binária, diferenciando-se rapidamente em formas flageladas promastigotas, que também se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária (figura 7) (Ashutosh *et al.*, 2007; Murray *et al.*, 2005).

As formas promastigotas se desenvolvem em formas paramastigotas no trato digestivo anterior dos insetos (esôfago e faringe) e permanecem aderidas ao seu epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam então em formas promastigotas metacíclicas, as formas infectantes do parasito (Piscopo e Mallia, 2006).

O ciclo de vida, no inseto, se completa em 72 horas e, após esse período, as fêmeas, contendo em seu trato digestivo as formas infectantes do parasito, ao realizarem novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, liberam as formas promastigotas metacíclicas junto com a saliva (figura 7) (Ministério da Saúde, 2006).

Essas formas, na epiderme do hospedeiro vertebrado, são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário e, no interior dos macrófagos, se diferenciam em amastigotas (figura 7) (De Oliveira *et al.*, 2004). Os protozoários *Leishmania* utilizam estratégias sofisticadas para subverter a função normal dos macrófagos, como prevenção da ativação do óxido nítrico e inibição de muitas funções dos macrófagos iniciadas por citocinas. Esses métodos permitem ao parasito escapar da resposta imune inata do hospedeiro e se multiplicar intensamente dentro dos macrófagos contaminados até seu rompimento (Antinori *et al.*, 2008).

Com o rompimento dos macrófagos, formas amastigotas são liberadas e fagocitadas por novos macrófagos. Ocorre, então, a disseminação hematogênica dos parasitos para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário (linfonodos, fígado, baço e medula óssea). A doença então se espalha e se instala no organismo do hospedeiro vertebrado (Ashutosh *et al.*, 2007) e sua manifestação clínica é uma consequência da multiplicação das formas amastigotas no interior dos macrófagos (Chan-Bacab e Pena-Rodríguez, 2001).

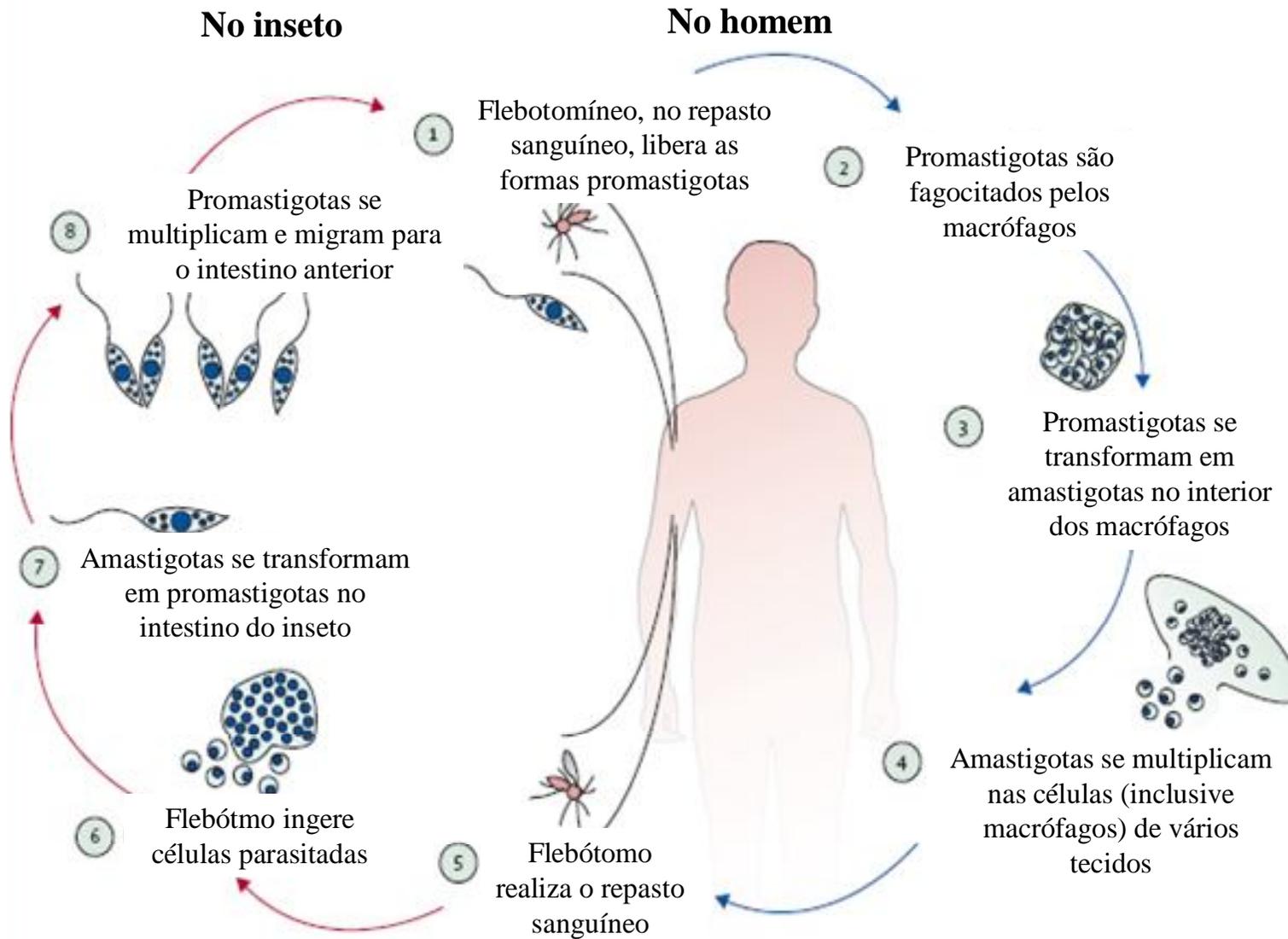


Figura 7: Ciclo de vida de *Leishmania* ssp.
Fonte: Reithinger *et al.*, 2007

2.4. Manifestações Clínicas

Nos seres humanos os protozoários *Leishmania* causam uma variedade de manifestações clínicas, de acordo com sua habilidade de proliferar em tecidos profundos (37 °C) ou próximos à superfície da pele, em temperaturas mais baixas (25 °C) (TDR, 2005; Chan-Bacab e Pena-Rodríguez, 2001).

As várias manifestações da doença têm sido utilizadas como base para classificar as leishmanioses em três formas clínicas: a leishmaniose cutânea (LC), que pode apresentar-se sob a forma localizada (LCL) ou difusa (LCD), a leishmaniose mucocutânea (LMC) e a leishmaniose visceral (LV). As duas primeiras são consideradas ainda dentro de uma classificação única (leishmaniose tegumentar) (Rabelo *et al.*, 2003). Cada uma destas manifestações está geralmente associada a certas espécies do protozoário causador da leishmaniose e é característica de alguns ambientes geográficos (De Marcos, *et al.*, 2007).

As espécies associadas com a manifestação da leishmaniose tegumentar (LT) são, no Velho Mundo, *Leishmania tropica*, *Leishmania killicki*, *Leishmania major* e *Leishmania aethiopica*, além de *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani*. E, no Novo Mundo, espécies do complexo *Leishmania mexicana* (*Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania pifanoi*, *Leishmania garnhami* e *Leishmania venezuelensis*) e do subgênero *Viannia* (*Leishmania* (V.) *braziliensis*, *Leishmania* (V.) *panamensis*, *Leishmania* (V.) *guyanensis*, *Leishmania* (V.) *colombiensis*, *Leishmania* (V.) *lainsoni* e *Leishmania* (V.) *peruviana*), além de *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Com relação à LV, as espécies são pertencentes ao complexo *Leishmania donovani* (*Leishmania infantum* e *Leishmania donovani* no Velho Mundo e *Leishmania (Leishmania) chagasi* no Novo Mundo, além da *Leishmania tropica* (Velho Mundo) e *Leishmania amazonensis* (Novo Mundo) (Reithinger *et al.*, 2007; Bacellar e Carvalho, 2005; Herwaldt, 1999).

A forma cutânea da doença é a mais comum, representando 50 a 75% dos novos casos. A forma visceral, se não tratada, é fatal, particularmente em casos de co-infecção com outras doenças, como a AIDS (Desjeux, 1999).

A leishmaniose cutânea caracteriza-se por lesões em forma de pápulas que progridem para nódulos ou úlceras abertas (Reithinger *et al.*, 2007; Ministério da Saúde, 2007) e pode apresentar-se sob duas formas clínicas: a leishmaniose cutânea localizada (figuras 8 e 9) e a leishmaniose cutânea difusa (figura 10) (Ministério da Saúde, 2007). A forma cutânea localizada representa o acometimento primário da pele. A lesão é geralmente do tipo úlcera, bem delimitada, com tendência à cura espontânea em pacientes imunocompetentes, ou é responsiva ao tratamento. As lesões podem ser únicas (figura 8) ou múltiplas (figura 9), com até vinte lesões que, em geral desenvolvem-se no local da picada do inseto (Ministério da Saúde, 2007; El Safi *et al.*, 2006; Piscopo e Malia, 2006); estas lesões podem persistir por meses ou anos e, ao evoluir para cura, costumam deixar cicatrizes atróficas (Arevalo *et al.*, 2001). Após a cura, no entanto, os parasitos permanecem presentes no organismo do hospedeiro, em pequenas quantidades, durante toda a sua vida (Liese *et al.*, 2008).

A forma cutânea difusa constitui uma forma clínica rara que inicia de maneira insidiosa, com lesão única, e evolui de forma lenta, com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrimo grandes extensões cutâneas (De Oliveira, 2004). Essas lesões são parecidas com lepra, não apresentam cura espontânea e contêm alto número de parasitos. A resposta ao tratamento é baixa ou ausente e em geral, há uma deficiência de resposta imune celular pelo hospedeiro (Amato *et al.*, 2008; Ministério da Saúde, 2007; Pinheiro, 2004; Desjeux, 1999).

A leishmaniose mucocutânea (figura 11) caracteriza-se pela habilidade do parasito de metastatizar para tecidos mucosos pela disseminação hematogênica ou linfática (Amato *et al.*, 2008). Tipicamente tem início como uma inflamação nasal, seguida por ulceração destrutiva e

desfigurante da mucosa nasal e perfuração de septo, atingindo, algumas vezes, lábios, bochechas, palato mole, faringe, laringe e garganta (Reithinger *et al.*, 2007). Seu acometimento pode, por vezes, conduzir a problemas respiratórios. Não apresenta cura espontânea, sendo muito difícil de tratar e, em geral, está associada a infecções bacterianas secundárias, podendo ser potencialmente fatal (Reithinger *et al.*, 2007; Desjeux, 1999).

A forma clássica da leishmaniose mucocutânea é secundária à lesão cutânea e, na maioria dos casos resulta de leishmaniose cutânea de evolução crônica e curada sem tratamento ou com tratamento inadequado. Em geral, ocorre meses ou até mesmo anos após o início da lesão cutânea primária e estima-se que 3 a 5% dos casos de LC desenvolvam lesão mucosa (Amato *et al.*, 2008; Ministério da Saúde, 2007; De Oliveira *et al.*, 2004).

A leishmaniose visceral (figuras 12 e 13), também conhecida como calazar, é a forma mais severa da doença e, potencialmente fatal se não tratada (Ferreira *et al.*, 2008). Caracteriza-se pelo seu efeito nos órgãos internos, devido à presença dos parasitos, particularmente fígado, baço, medula óssea e sistema reticuloendotelial (Desjeux, 2004; Chan-Bacab e Pena-Rodríguez, 2001).

Os sintomas da doença incluem febre irregular, suores noturnos, anorexia, perda de peso considerável, fraqueza, hepatoesplenomegalia, pancitopenia e anemia (Murray *et al.*, 2005; Desjeux, 1999). As crianças podem apresentar diarreia e retardo no crescimento (Murray *et al.*, 2005). Além disso, hipergamaglobulinemia e leucopenia ou trombocitopenia são também características da doença (Murray *et al.*, 2005). Com o tempo, a doença, quando não tratada, pode produzir caquexia profunda, sangramento e susceptibilidade a infecções secundárias (Murray *et al.*, 2005). O paciente pode vir a óbito em 2 ou 3 anos, ou ainda entre 6 e 12 meses, em casos de formas agudas da doença (Murray *et al.*, 2005; Desjeux, 2004; Cunningham, 2002).

Após recuperação, os pacientes portadores de leishmaniose visceral, algumas vezes, desenvolvem ainda um tipo de leishmaniose cutânea crônica, denominada leishmaniose dérmica pós-calazar (PKADL) (Desjeux, 1999), que é uma variação da LV (WHO, 2007a). Essa forma caracteriza-se clinicamente por uma erupção assintomática com manchas hipocrômicas bem como pápulas eritematosas, nódulos e placas (Ansari *et al.*, 2008), que se manifestam inicialmente na face (bochechas, queixo, orelhas) e se estendem ao antebraço, nádegas e pernas (Grevelink e Lerner, 1996). É uma manifestação que pode estar associada à recidiva da forma visceral da doença e ocorre em aproximadamente 5% dos pacientes curados para LV na África e em 20% destes pacientes na Índia, aproximadamente 1 a 2 anos após a cura clínica (Grevelink e Lerner, 1996).

Os casos de PKADL são mais resistentes ao tratamento convencional e, em geral, requerem doses mais altas da medicação sistêmica. As áreas hipo-pigmentadas da pele quase nunca sofrem repigmentação completa após a cura (Grevelink e Lerner, 1996) e, além disso, pacientes portadores de PKADL crônica podem servir como hospedeiros reservatórios da doença (Herwaldt, 1999). Essa manifestação é comum na Índia e na África, principalmente no Sudão e Quênia (TDR, 2005).



Figura 8: Leishmaniose cutânea localizada; lesão única
Fonte: Ministério da Saúde, 2006



Figura 9: Leishmaniose cutânea localizada; lesões múltiplas
Fonte: Ministério da Saúde, 2006



Figura 10: Leishmaniose cutânea difusa
Fonte: Ministério da Saúde, 2006



Figura 11: Leishmaniose mucocutânea
Fonte: Ministério da Saúde, 2004



Figura 12: Leishmaniose visceral
Fonte: Ministério da Saúde, 2006



Figura 13: Leishmaniose visceral; estado final
Fonte: Ministério da Saúde, 2006

A forma visceral da leishmaniose é também considerada uma importante doença oportunista em pessoas infectadas pelo HIV (Pourahmad *et al.*, 2009; Murray *et al.*, 2005; Desjeux, 2004; Jha *et al.*, 1999). Atualmente, a leishmaniose tem emergido como a terceira infecção oportunista mais freqüente em pacientes infectados com o vírus HIV em várias partes do mundo e em especial em locais endêmicos para a leishmaniose, onde cerca de 25-70% dos adultos com LV visceral estão co-infectados pelo HIV (Pourahmad *et al.*, 2009; Pandey *et al.*, 2008). A maioria dos relatos de casos de co-infecção à OMS advém do sudeste europeu. Em 2001, 90% de mais de dois mil casos notificados aconteceram na França, Itália, Portugal e Espanha (WHO, 2007a).

Os casos de leishmaniose no mundo e os casos reportados de co-infecção *Leishmania*-HIV são demonstrados no mapa da figura 14.

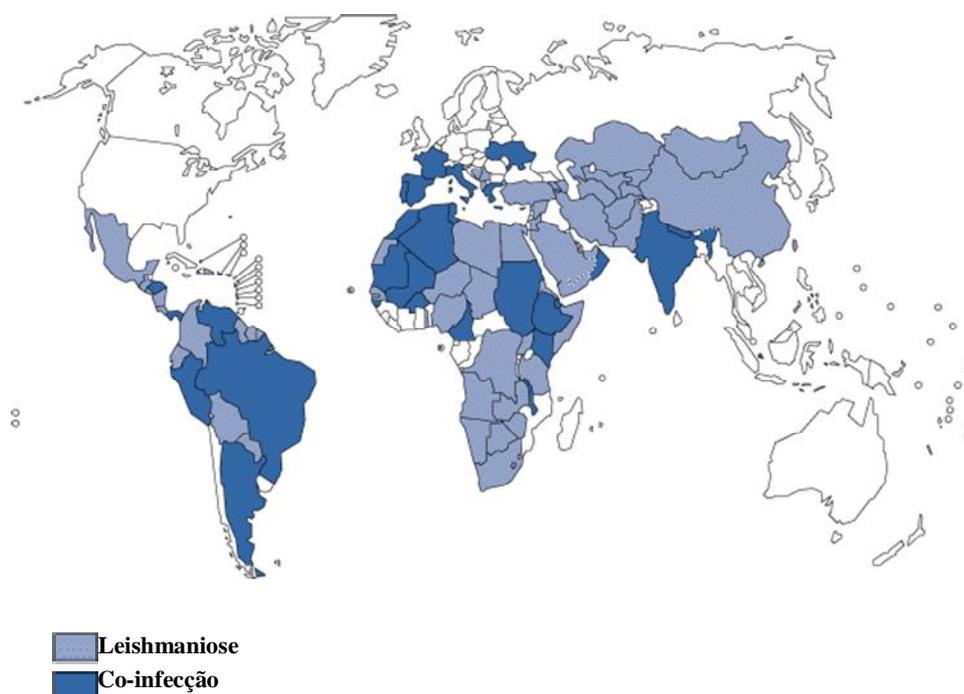


Figura 14: Mapa com distribuição global dos casos de leishmaniose e dos casos reportados de co-infecção *Leishmania*-HIV

Fonte: http://www.who.int/csr/resources/publications/CSR_ISR_2000_1leish/en/index.html

A imunossupressão, característica dos pacientes portadores de HIV pode reativar infecções latentes por *Leishmania*. Entre pacientes infectados por HIV/AIDS o risco de haver manifestação clínica da leishmaniose visceral aumenta em 100 – 1000 vezes, em comparação aos pacientes imunocompetentes (Antinori *et al.*, 2008; Marques *et al.*, 2007).

Como tanto o HIV quanto a *Leishmania* são capazes de infectar e se multiplicar no interior de macrófagos e monócitos, após uma infecção primária, ambos os patógenos podem estabelecer uma infecção latente. Uma infecção por dois patógenos intracelulares, em uma mesma célula alvo, tem importantes efeitos na resposta imune do hospedeiro, influenciando na expressão e multiplicação de um ou ambos os patógenos (Pourahmad *et al.*, 2009; Wolday *et al.*, 1999). A resposta ao tratamento não é satisfatória e a taxa de letalidade é alta (De Queiroz, 2002). No melhor dos casos, a expectativa de vida é de apenas doze meses e apenas 16% dos pacientes sobrevivem mais de três anos (De Queiroz, 2002).

2.5. Tratamento

O controle das leishmanioses conta quase que exclusivamente com a quimioterapia uma vez que vacinas ainda estão em desenvolvimento e o controle do inseto vetor é inadequado (Choudhury *et al.*, 2008; Verma *et al.*, 2007; Soares-Bezerra *et al.*, 2004).

Os antimoniais pentavalentes são, há mais de 60 anos, os medicamentos de primeira escolha para todas as formas de leishmaniose. Medicamentos como a anfotericina B e a pentamidina constituem a segunda linha de tratamento da doença. Além disso, a miltefosina e novas formulações de medicamentos já utilizados, como a anfotericina B lipossomal, foram desenvolvidos e registrados e estão disponíveis para uso em alguns países (Ashutosh *et al.*, 2007; Croft *et al.*, 2006). No entanto, um sério problema associado ao tratamento das leishmanioses refere-se ao surgimento de cepas resistentes aos medicamentos tradicionalmente utilizados (Ashutosh *et al.*, 2007).

Em Bihar, no norte da Índia, região altamente endêmica para a leishmaniose visceral, os níveis de resistência aos antimoniais pentavalentes, manifestados por não responsividade ao tratamento ou reincidência da doença após tratamento, alcançam mais de 60% (Choudhury *et al.*, 2008).

Os mecanismos de resistência a um medicamento podem, de forma geral, estar associados à sua conversão à forma inativa por ação de enzimas específicas, à modificação de sua sensibilidade no seu sítio de ação ou ao aumento do seu efluxo ou diminuição do seu influxo. O fenômeno da resistência pode ainda estar ligado ao desenvolvimento de rotas alternativas pelo parasito para execução de determinadas reações, ao aumento da quantidade de substrato de uma dada enzima para competir com o medicamento no seu sítio de ação, à redução da necessidade de um produto de determinada reação, que desempenharia papel biológico importante na sobrevivência do parasito, entretanto, seria alvo do medicamento, ou ainda à falha na ativação do fármaco (Singh, 2006).

A resistência da *Leishmania* a um dado medicamento pode ser natural ou adquirida, esta última acontecendo quando os parasitos são expostos a doses sub-ótimas do fármaco. Adaptações fisiológicas sofridas pelo parasito, seleção de parasitos resistentes, mutações espontâneas seguidas de seleção ou ainda modificação na expressão de determinados genes são fatores que podem conduzir à resistência (Singh, 2006).

Quanto à resistência aos antimoniais pentavalentes, estudos realizados sugerem que os mecanismos envolvidos neste fenômeno incluem amplificação gênica, perda da redução do metal e acumulação reduzida do fármaco no interior do parasito (Singh, 2006). A baixa adesão dos pacientes ao tratamento devido à sua administração dolorosa é um fator importante no surgimento da resistência a esta farmacoterapia (Mosleh *et al.*, 2008).

Entretanto, os efeitos colaterais, muitas vezes tóxicos, não se restringem apenas aos medicamentos de primeira escolha, estendendo-se também aos medicamentos de segunda

escolha, para os quais há ainda o problema do alto custo que restringe a sua utilização na prática clínica (Mosleh *et al.*, 2008). Um exemplo claro é o desenvolvimento das formas lipídicas de anfotericina B. A anfotericina B lipossomal, menos tóxica que a anfotericina B na forma de sal é uma excelente alternativa ao tratamento das leishmanioses. Entretanto, apresenta um custo elevado que limita sua utilização nos serviços públicos de saúde de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, onde muitas vezes a doença é endêmica (Jha, 2006; Ministério da Saúde, 2006; Singh *et al.*, 2006).

Alguns outros fármacos como a sitamaquina e a paromomicina estão em fase de ensaios clínicos para tratamento da forma visceral e cutânea da leishmaniose (Ashutosh, *et al.*, 2007; Croft *et al.*, 2006). Entretanto, o desenvolvimento de novos medicamentos para a doença deve considerar fatores específicos das diferentes formas de leishmaniose. Os sítios de infecção das formas cutânea e visceral impõem diferentes farmacocinéticas aos medicamentos e existe uma variação intrínseca das espécies de *Leishmania* na sensibilidade aos fármacos (Croft *et al.*, 2006).

Além desses fatores, precisa-se considerar também a resistência adquirida aos antimoniais, bem como a co-infecção com o HIV, onde é comum a exacerbação da doença ou emergência da infecção latente e onde a quimioterapia padrão é, em geral, ineficaz (Croft *et al.*, 2006).

A tabela 1 resume os principais medicamentos atualmente disponíveis no mercado para o tratamento das diferentes formas de leishmaniose.

Tabela 1: Medicamentos disponíveis para tratamento da leishmaniose

Manifestação Clínica	Medicamento
Leishmaniose Visceral	Anfotericina B
	Anfotericina B lipossomal
	Pentamidina
	Miltefosina (oral, fase IV)
	Paromomicina (fase IV)
	Sitamaquina (oral, fase II)
Leishmaniose Cutânea	Antimoniais pentavalentes
	Anfotericina B
	Pentamidina
	Paromomicina
	Miltefosina (oral, fase III - registro na Colômbia em 2005)
	Imiquimod (imunomodulador tópico, fase II)
	Antifúngicos azólicos
Leishmaniose Mucocutânea	Antimoniais pentavalentes
	Anfotericina B

Adaptada de Jhingran *et al.*, 2009; Croft *et al.*, 2006; Piscopo e Malia, 2006

2.5.1. Antimoniais pentavalentes

No Brasil, os antimoniais sob a forma de sais trivalentes foram utilizados pela primeira vez no tratamento da leishmaniose tegumentar em 1913 por Gaspar Vianna. Dois anos mais tarde foram utilizados na Itália para o tratamento da leishmaniose visceral. Seus derivados pentavalentes, por sua vez, só foram introduzidos no mercado na década de 40 e, desde então, são os medicamentos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses (Amato *et al.*, 2008; Frézard *et al.*, 2008; Ministério da Saúde, 2006).

2.5.1.1. Mecanismo de Ação e Redução do Metal

Embora estejam no mercado há mais de 60 anos o mecanismo de ação dos antimoniais ainda não está completamente elucidado (Frézard *et al.*, 2008). Para exercer atividade farmacológica, acredita-se que o antimonial pentavalente - Sb(V) - deva ser convertido à sua forma trivalente - Sb(III). O Sb(III) é altamente ativo sobre as formas promastigotas e amastigotas do parasito ao passo que o Sb(V) apresenta-se mais ativo sobre as formas

intracelulares amastigotas. O antimônio pentavalente é, portanto, considerado um pró-fármaco (Kothari *et al.*, 2007; Ouellette *et al.*, 2004; Rath *et al.*, 2003; Ephros *et al.*, 1999).

O medicamento, ao entrar em contato com a forma amastigota do parasito, penetra em seu interior e, subseqüentemente, diretamente ou após redução à sua forma trivalente, exerce seu efeito leishmanicida (Amato *et al.*, 2008; Ashutosh *et al.*, 2007; Ministério da Saúde, 2006; Chan-Bacab e Peña-Rodríguez, 2001; Ephros *et al.*, 1999).

Um dos mecanismos de ação inicialmente proposto foi que o antimônio interferiria nas atividades bioenergéticas do parasito, inibindo sua atividade glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos, conduzindo-o, conseqüentemente, à morte por depleção de adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP) (Amato *et al.*, 2008; Ministério da Saúde, 2006; Chan-Bacab e Peña-Rodríguez, 2001; Ephros *et al.*, 1999).

Outros mecanismos de ação recentemente considerados demonstram que o antimônio mata o parasito por um processo de apoptose envolvendo fragmentação do DNA e externalização da fosfatidilcolina na superfície externa da membrana celular (Ashutosh *et al.*, 2007; Singh, 2006). Outros estudos mostram que os antimônios comprometem o potencial redox da célula (parasito) por indução da perda de tióis intracelulares associado ao acúmulo de dissulfuretos ou ainda por inibição da tripanotona redutase (Ashutosh *et al.*, 2007).

Quanto à redução do medicamento a sua forma trivalente, o local exato (amastigota ou macrófago) e o seu mecanismo (enzimático ou não enzimático) ainda não são totalmente conhecidos (Croft *et al.*, 2006). Alguns estudos sugerem que essa redução ocorre preferencialmente no macrófago, e não no parasito em si, embora seja possível que ocorra tanto no parasito quanto no hospedeiro (Ouellette *et al.*, 2004).

Quanto ao mecanismo da redução, há evidências de que tióis específicos do parasito, como a tripanotona, ou tióis específicos do hospedeiro, como a glicilcisteína, podem reduzir o antimônio por mecanismos não enzimáticos (Ouellette *et al.*, 2004). As condições

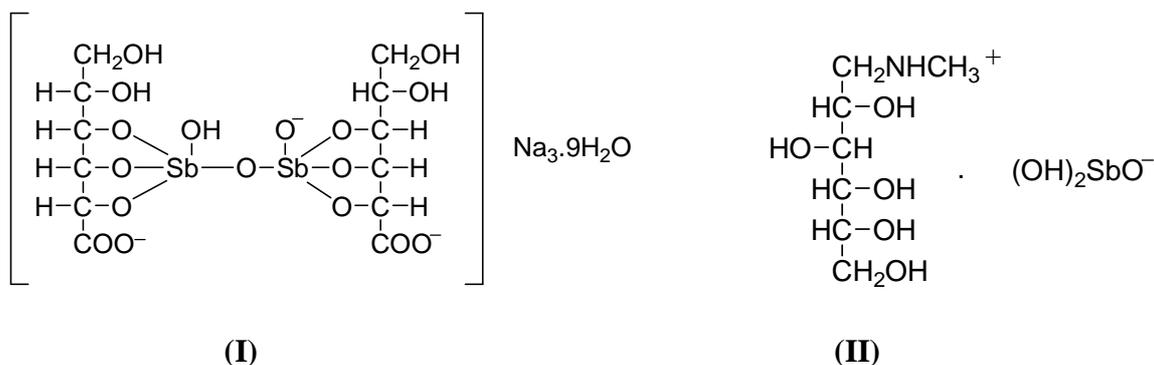
observadas dentro do fagolisossoma, onde “reside” a *Leishmania* (pH ácido - 5 - e temperatura elevada - 37 °C) favorecem esta conversão (Ashutosh *et al.*, 2007).

Entretanto, a redução do Sb(V) a Sb(III) na *Leishmania* pode ainda ser mediada por enzimas, a exemplo da redução de metais observada em bactérias e leveduras. A enzima TDR1 (Reductase 1 de *Leishmania major* dependente de tiol), uma proteína tetrâmera com domínios semelhantes às GST (glutationa- ômega- transferases) e específica do parasito, demonstrou catalisar a conversão do Sb(V) ao Sb(III) de forma enzimática, utilizando GSH (glutationa) como redutor (Croft *et al.*, 2006; Singh, 2006; Ouellette *et al.*, 2004).

É possível que mais de um mecanismo esteja associado à ativação do antimônio e uma redução ou perda de algum desses mecanismos de ativação pode ser a razão pela qual o parasito venha a se tornar resistente ao medicamento (Ouellette *et al.*, 2004).

2.5.1.2. Formulações e Efeitos Colaterais

Existem no mercado duas formulações de Sb(V) disponíveis: o estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) (I), mais freqüentemente utilizado em países de língua inglesa, e o antimoniato-*N*-metil glucamina (Glucantime[®]) (II), utilizado especialmente no Brasil e países de língua francesa (Amato *et al.*, 2008; Ministério da Saúde, 2006). Estudos realizados indicam que parece não haver diferenças quanto à eficácia terapêutica dessas formulações (Amato *et al.*, 2008; Ministério da Saúde, 2006).



A Organização Mundial de Saúde preconiza a administração intramuscular (IM) ou intravenosa (IV) do antimonial pentavalente em doses que não devem ultrapassar 20 mg/ kg/ dia durante 30 dias (WHO, 2007a), respeitando o limite de 850 mg de antimônio, devido à sua elevada toxicidade (Rath *et al.*, 2003). Porém, o protocolo de tratamento pode ser diferente para cada área geográfica, pois a eficácia terapêutica pode variar dependendo do país (Santos *et al.*, 2008).

Uma grande vantagem desses agentes é o seu baixo custo. Um tratamento de 30 dias, na dose de 20 mg/kg diariamente, custa US\$ 100 para o Glucantime[®] e US\$ 150 para o Pentostam[®] (Kafétzis *et al.*, 2005). Entretanto, esses medicamentos são administrados exclusivamente por via parenteral causando dor no local da aplicação da injeção e exigindo acompanhamento médico durante a terapia. Seus efeitos colaterais incluem febre, artralgia, mialgia e problemas gastrintestinais como náusea e vômito. Problemas mais sérios incluem cardiotoxicidade e, em alguns casos, insuficiência hepática e renal, além de pancreatite e pneumonia (De Moura *et al.*, 2008; Kafétzis *et al.*, 2005; Chan-Bacab e Peña-Rodríguez, 2001; Saldanha *et al.*, 2000).

A cardiotoxicidade, que se manifesta sob a forma de alterações no eletrocardiograma, é um distúrbio dose-dependente, sendo o principal efeito colateral da farmacoterapia com os antimoniais (Ministério da Saúde, 2006). A partir do 20º dia de tratamento deve-se monitorar a função cardíaca por eletrocardiograma semanal, em especial nos pacientes acima de 50 anos (Ministério da Saúde, 2006).

A nefrotoxicidade do medicamento, por sua vez, parece estar associada à produção de TNF- α (fator de necrose tumoral-alfa) pelas células renais. Esta citocina provoca vasoconstrição, aumento do stress oxidativo, redução do fluxo sanguíneo e da taxa de filtração glomerular, contribuindo para o prejuízo à função renal. Além disso, o TNF- α é responsável pela indução da síntese de outras citocinas pró-inflamatórias, cuja formação resulta em

disfunção tubular, apoptose celular e morte celular, afetando a função renal do paciente em tratamento com os antimoniais (De Moura *et al.*, 2008).

Devido a esses importantes efeitos colaterais, os antimoniais pentavalentes são contraindicados para o tratamento das leishmanioses em pacientes que fazem uso de beta-bloqueadores e anti-arrítmicos, naqueles com insuficiência renal e hepática, em mulheres grávidas nos seis primeiros meses da gestação e nos casos que apresentam no eletrocardiograma intervalo QTC (intervalo de tempo corrigido) superior a 400 ms (milisegundos) (homens) e 450 ms (mulheres) (Ministério da Saúde, 2006).

2.5.1.3. Eficácia e Resistência

Quanto à eficácia dos antimoniais pentavalentes, vale ressaltar que, na maior parte do mundo, cerca de 95% dos pacientes nunca antes tratados para LV respondem de forma satisfatória à terapia com esses medicamentos (Kothari *et al.*, 2007; Croft *et al.*, 2006).

Entretanto, o seu valor clínico está ameaçado em alguns países em virtude da emergência de resistência a esses medicamentos, cujas taxas chegam a 65-70% em algumas regiões do mundo, como em Bihar, na Índia. Nesses locais seu uso já foi quase que completamente abandonado na prática clínica e vem sendo substituído pela anfotericina B e pela miltefosina (Kothari *et al.*, 2007; Croft *et al.*, 2006).

Uma das razões para o desenvolvimento de resistência aos antimoniais na Índia está vinculada ao seu freqüente uso impróprio, decorrente da venda livre do medicamento e do despreparo dos profissionais. Tem-se ainda a prática comum de se iniciar o tratamento com doses menores do medicamento e aumentá-la gradualmente, semana a semana, ou dispor de intervalos em que o medicamento não é administrado acreditando-se reduzir a toxicidade renal associada ao seu uso (Croft, *et al.*, 2006).

A falência no tratamento pode, entretanto, ter múltiplas origens, e estas podem estar relacionadas não só ao medicamento, mas também ao hospedeiro e/ou ao parasito em si (Rijal *et al.*, 2007). A emergência de parasitos resistentes aos antimoniais pentavalentes é favorecida pelo contato freqüente destes com o medicamento e pelo tratamento, muitas vezes sub-ótimo, associado à variação na qualidade do medicamento disponível e a problemas de adesão e acessibilidade ao medicamento (Rijal *et al.*, 2007).

Existem ainda os problemas relacionados à variação da sensibilidade das diferentes espécies de *Leishmania* ao medicamento, interferindo na sua farmacocinética (sítio de ação, metabolismo e excreção), além da interação medicamento-resposta imune no hospedeiro (Croft *et al.*, 2006).

O controle das infecções por *Leishmania* é dependente de células T e requer uma resposta imunológica Th1 (T-auxiliar-1), mediada por células. Para os casos de co-infecção HIV – leishmaniose, principalmente leishmaniose visceral, o tratamento com os antimoniais pentavalentes é menos satisfatório quando comparado ao observado para pacientes imunocompetentes. Apenas 50-60% dos pacientes imunocomprometidos mostram melhora para a doença e cerca de 90% sofrem recaídas quanto à leishmaniose após doze meses da finalização do tratamento, mesmo que este tenha sido corretamente administrado (Savoia *et al.*, 2005; Rashid *et al.*, 2002). Nesses casos, em que há falha terapêutica ao tratamento de primeira escolha, parte-se para a utilização de medicamentos de segunda escolha como a anfotericina B e a pentamidina (Savoia *et al.*, 2005; Rashid *et al.*, 2002).

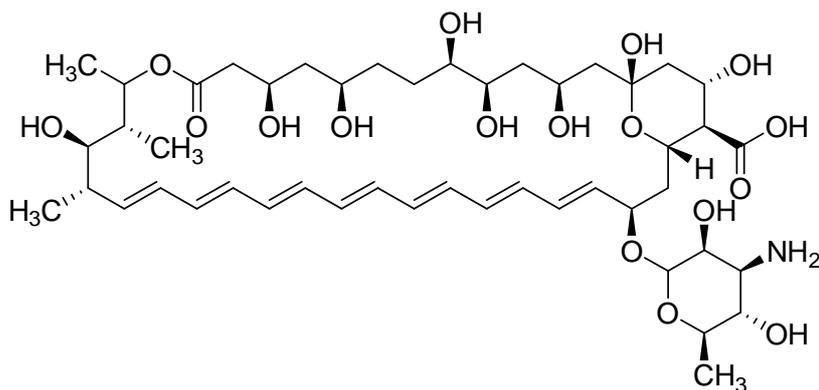
2.5.2. Anfotericina B

2.5.2.1. Mecanismo de Ação

A anfotericina B (III) é um antibiótico poliênico produzido naturalmente pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus* e é um fármaco padrão utilizado para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. Seu mecanismo de ação está relacionado à sua ligação aos esteróis da membrana fúngica, em especial o ergosterol. Uma vez que a *Leishmania* apresenta, do mesmo modo que os fungos, o ergosterol como principal esteroide de sua membrana, a anfotericina B é também eficaz no tratamento das leishmanioses (Ordóñez-Gutiérrez *et al.*, 2007; Filippin e Souza, 2006; Cohen, 1998).

A anfotericina B (III) interage especificamente com o ergosterol presente na membrana do parasito, levando à formação de poros através das membranas lipídicas e alterando, conseqüentemente, a permeabilidade da célula. O poro formado permite o extravasamento de íons e macromoléculas intracelulares, em especial íons potássio, o que, por conseguinte, leva à morte celular (Ordóñez-Gutiérrez *et al.*, 2007; Filippin e Souza, 2006; Baginski *et al.*, 2002; Cohen, 1998).

Por apresentar essa atividade contra *Leishmania*, a anfotericina B constitui-se no tratamento de segunda escolha para a leishmaniose, sendo utilizada desde a década de 60, em casos de intolerância aos antimoniais pentavalentes ou em casos onde ocorre falha terapêutica ao tratamento com esses medicamentos (Croft *et al.*, 2006). É o fármaco leishmanicida mais potente disponível comercialmente, atuando nas formas promastigotas e amastigotas do parasito, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Ministério da Saúde, 2006).



(III)

2.5.2.2. Formulações e Efeitos Colaterais

A anfotericina B (III) está disponível comercialmente na forma de sal (desoxicolato sódico de anfotericina B) e de formulações lipídicas (anfotericina B lipossomal- Ambisome®, anfotericina B complexo lipídico- Abelcet® e anfotericina B dispersão coloidal- Amphocil®), que foram desenvolvidas como alternativa à toxicidade e aos longos tratamentos associados ao desoxicolato de anfotericina B (Amato *et al.*, 2008; Ministério da Saúde, 2006).

O medicamento, na forma de sal, é administrado por via intravenosa e a dose recomendada, embora ainda não seja bem estabelecida, é de 3-5 mg/ kg/ dia ou de dez doses administradas de maneira intermitente (dose total de 40 mg/ kg), com muita hidratação (WHO, 2007a).

Embora a aplicação terapêutica da anfotericina B se baseie na sua afinidade pelo ergosterol não é desprezível a sua afinidade pelo colesterol. Muitos dos efeitos tóxicos que lhe são atribuídos são resultados da sua capacidade em ligar-se ao colesterol e a outros constituintes da membrana celular de mamíferos. Tais efeitos incluem toxicidade aguda e crônica e, por vezes, limitam sua utilização na prática clínica (Ordóñez-Gutiérrez *et al.*, 2007; Baginski *et al.*, 2002).

A toxicidade aguda é caracterizada por febre alta, calafrios, indisposição, dores generalizadas, náusea, vômito, dor de cabeça, tromboflebite, associada à sua toxicidade às

células do endotélio vascular, arritmias cardíacas e infiltrados pulmonares. Estas reações estão provavelmente associadas à indução de citocinas pró-inflamatórias pela anfotericina B e liberação de TNF- α pelos macrófagos (Filippin e Souza, 2006; Ministério da Saúde, 2006; Sundar e Chatterjee, 2006; Antoniadou e Dupont, 2005). Podem ser aliviadas ao diminuir-se a velocidade da infusão do medicamento ou ao reduzir-se sua dose diária. A pré-medicação com antipiréticos, anti-histamínicos, meperidina ou corticosteróides também pode ser útil (Katzung, 2003).

A toxicidade crônica associada ao seu uso afeta mais frequentemente os rins podendo levar o paciente à morte. Graus variados de comprometimento renal ocorrem em praticamente todos os pacientes ao longo do tratamento, variando segundo a dose total do medicamento. Esta nefrotoxicidade, em geral, está associada a uma duplicação dos níveis basais de creatinina e é reversível se o medicamento é utilizado nas doses recomendadas (Filippin e Souza, 2006; Ministério da Saúde, 2006; Sundar e Chatterjee, 2006; Antoniadou e Dupont, 2005).

As maiores desvantagens associadas ao uso do medicamento na sua forma farmacêutica convencional estão na necessidade de hospitalização por prolongados períodos (Singh *et al.*, 2006), pois o medicamento é de uso restrito hospitalar, ou na necessidade de acompanhamento clínico laboratorial (WHO, 2007a) e de equipamentos para monitoramento das doses administradas, bem como na alta incidência de sérios efeitos colaterais. Tais questões contribuíram para o desenvolvimento das formulações lipídicas de anfotericina B (Singh *et al.*, 2006).

As formulações lipídicas de anfotericina B são altamente ativas e apresentam baixa toxicidade (Lima, 2006), pois os lipossomas carregadores da anfotericina B são bem absorvidos pelo sistema reticuloendotelial e pouco capturados pelos rins. Além disso, sob a

forma lipossomal é possível a administração da dose total do medicamento necessária ao tratamento, em uma única infusão (Jha, 2006).

Entretanto, essas formulações são de alto custo, o que reduz sua utilização na prática clínica, em especial na rotina dos serviços públicos de saúde de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (Ministério da Saúde, 2006).

2.5.2.3. Eficácia e Resistência

A anfotericina B tem sido amplamente utilizada para o tratamento da leishmaniose com índices de cura de cerca de 97% entre os pacientes que a utilizam. Na Índia, já tem sido recomendada como medicamento de primeira escolha, em regiões com casos de resistência ao tratamento com os antimoniais pentavalentes (Singh *et al.*, 2006; Sundar e Chatterjee, 2006).

Quando se fala em resistência à anfotericina B, esta não tem emergido rapidamente (Sundar *et al.*, 2004). No entanto, estudos *in vitro* demonstram que a resistência pode estar relacionada ao comprometimento na ligação do medicamento ao esterol. Isso ocorre através da diminuição da concentração de ergosterol da membrana ou através da modificação da molécula-alvo de esterol, reduzindo sua afinidade pelo fármaco (Ouellette *et al.*, 2004; Katzung, 2003).

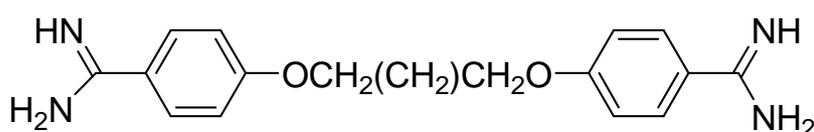
E muito embora a resistência à anfotericina B no tratamento da leishmaniose não pareça ser ainda um problema, recidivas da doença foram observadas, em especial em pacientes HIV-positivos. As sucessivas recidivas podem contribuir para o aumento de cepas de *Leishmania* resistentes à anfotericina B (Ouellette *et al.*, 2004).

2.5.3. Pentamidina

2.5.3.1. Mecanismo de ação

A pentamidina (IV), uma diamidina aromática, é usada como segunda linha no tratamento de pacientes refratários ou hipersensíveis aos antimoniais pentavalentes (Ouellette *et al.*, 2004; Berman, 1998). Parece ter sido empregada pela primeira vez para tratamento da leishmaniose em 1940, por Kirt e MacDonald (Amato *et al.*, 2008; Coelho *et al.*, 2008; Soares-Bezerra *et al.*, 2004; De Paula *et al.*, 2003).

Para ação, penetra tanto nas formas promastigotas quanto nas formas amastigotas das células de *Leishmania* por um processo mediado por transportadores. As mitocôndrias são um importante alvo da pentamidina e o medicamento interfere com a síntese de kDNA (DNA do cinetoplasto), provavelmente modificando a morfologia do cinetoplasto e fragmentando a membrana mitocondrial do parasito, levando-o à morte (Amato *et al.*, 2008; Coelho *et al.*, 2008). Além disso, interfere com o transporte de aminoácidos e compete com poliaminas pelos ácidos nucleicos (De Paula *et al.*, 2003).



(IV)

2.5.3.2. Formulações e Efeitos Colaterais

Há dois sais de pentamidina disponíveis comercialmente, o isotionato de pentamidina (Pentamidina[®]), disponível no Brasil, Estados Unidos e Europa, e o mesilato de pentamidina (Lomidine[®]), disponível apenas na Europa (De Paula *et al.*, 2003).

A dose recomendada do medicamento é de 4 mg/ kg/ dia por via intramuscular profunda, de dois em dois dias, não ultrapassando a dose total de 2 g (Ministério da Saúde,

2000). A pentamidina foi usada com sucesso em séries de doze a quinze doses para tratamento da leishmaniose visceral. Após intervalos de uma a duas semanas pode ser necessário administrar uma segunda série, em áreas onde se sabe que a infecção responde de modo insatisfatório ao tratamento (Rath *et al.*, 2003).

Seus efeitos colaterais mais comuns são náusea e vômito, dores de cabeça, hipoglicemia, hipotensão durante a infusão, síncope, aumento da creatinina e uréia, diabetes, leucopenia, pancreatite e alterações no segmento ST (espaço que compreende o fim do intervalo QRS- despolarização ventricular- e início da onda T- repolarização ventricular- do eletrocardiograma) e ondas T do eletrocardiograma (Amato *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2006). A hipoglicemia pode ocorrer, seguida por hiperglicemia, em decorrência da destruição de células pancreáticas provocada pelo medicamento (Amato *et al.*, 2008). Seu uso está contraindicado durante a gestação, para pacientes diabéticos e em casos de falência renal, hepática ou cardíaca (Amato *et al.*, 2008).

2.5.3.3. Eficácia e Resistência

Para ajudar a combater os problemas de resistência clínica aos antimoniais na Índia, a pentamidina foi testada para o tratamento da leishmaniose visceral e apresentou-se eficaz, sendo o primeiro medicamento a ser utilizado em pacientes refratários ao tratamento com os antimoniais pentavalentes (Singh *et al.*, 2006; Leandro e Campino, 2003). Inicialmente, altas taxas de cura foram relatadas para o medicamento, mas sua eficácia foi diminuindo gradativamente ao longo dos anos, curando, em média, apenas 70% dos pacientes tratados (Singh *et al.*, 2006; Leandro e Campino, 2003).

Basselin e colaboradores (1997) descreveram que a pentamidina, utilizada na clínica contra casos de leishmanioses resistentes aos antimoniais pentavalentes, apresenta bons resultados em pacientes imunodeprimidos.

A resistência *in vitro* à pentamidina foi induzida em várias espécies de *Leishmania*, tanto em promastigotas como em amastigotas axênicos. O declínio da eficácia do medicamento na Índia sugere que os parasitos estão se tornando resistentes (Ouellette *et al.*, 2004).

Os sérios efeitos adversos/tóxicos associados ao declínio da sua eficácia e ao surgimento de resistência tornaram sua utilização inadequada como medicamento alternativo aos antimoniais pentavalentes (Singh, *et al.*, 2006) A OMS alerta que, devido aos seus efeitos adversos severos, a pentamidina só deve ser usada quando não há outras opções disponíveis (WHO, 2007a).

2.5.4. Miltefosina (hexadecilfosfocolina)

Tratamentos orais para a leishmaniose têm um apelo óbvio em especial devido à fácil administração e à possibilidade de tratamento domiciliar com ausência de custos hospitalares e desconfortos associados à administração por via parenteral (Sundar *et al.*, 2006).

A miltefosina (V), um alquil-fosfolipídio e análogo da fosfocolina, que foi originalmente desenvolvida como medicamento anticancerígeno, se demonstrou altamente ativo contra a leishmaniose, tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo*, sendo o primeiro medicamento a apresentar atividade sobre *Leishmania donovani* (Palumbo, 2008; Ouellette *et al.*, 2004). A miltefosina é o primeiro tratamento oral efetivo para a leishmaniose visceral, inclusive para infecções resistentes aos antimoniais pentavalentes (Murray *et al.*, 2005), e para a leishmaniose cutânea (Choudhury *et al.*, 2008).

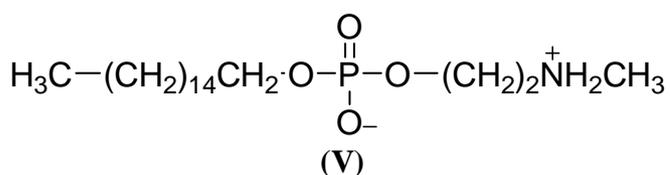
A atividade leishmanicida demonstrada pela miltefosina oral em modelos animais contribuiu para o início de estudos de eficácia contra a leishmaniose visceral humana. Entre 1996 e 2004 estudos clínicos de fase I/II a estudos de fase IV foram realizados e a miltefosina mostrou-se altamente eficaz contra a leishmaniose visceral humana (Palumbo, 2008; Sundar

et al., 2006). Índices de cura de 95% foram alcançados nesses estudos (Choudhury *et al.*, 2008).

Este medicamento foi aprovado e registrado para o tratamento da leishmaniose visceral na Índia (2002) e na Alemanha (2004) (Friedrich, 2008) e para o tratamento da leishmaniose cutânea na Colômbia (2005) (Seifert *et al.*, 2007; Croft *et al.*, 2005; Murray *et al.*, 2005) e é atualmente comercializado com o nome de Impavido[®] (Choudhury *et al.*, 2008). Foi testado no Nepal e no leste africano, onde estudos estão em processo (Seifert *et al.*, 2007; Murray *et al.*, 2005).

A dose administrada oralmente é de 2-3 mg/ kg/ dia ou 100 mg/ dia para pacientes com peso inferior a 25 kg, por 28 dias. Doses diárias de 150 mg têm sido sugeridas por alguns especialistas para o tratamento de pacientes adultos HIV - positivos (WHO, 2007a).

O custo do tratamento é de US\$ 125-200 no setor privado. Entretanto, o medicamento pode ser comprado pela OMS por cerca de US\$ 75 o tratamento, dependendo do número de comprimidos comprados (Chappuis *et al.*, 2007).



2.5.4.1. Mecanismo de Ação

O mecanismo de ação da miltefosina sobre *Leishmania* ainda é bastante controverso (Soares-Bezerra *et al.*, 2004). Diversos estudos, em especial sobre células de tumor e sobre tripanossomatídeos foram realizados, com o objetivo de identificar o mecanismo de ação do medicamento (Choudhury *et al.*, 2008).

A perturbação do metabolismo lipídico da célula, a biossíntese de glicosilfosfatidilinositol e a inibição da enzima acil-CoA-alkil-específica aciltransferase

foram mecanismos de ação descritos para a miltefosina em promastigostas de *Leishmania mexicana* (Choudhury *et al.*, 2008).

Estudos *in vitro* evidenciaram que a miltefosina estimula as células T e os macrófagos a secretarem interferon gama (IFN γ) e aumenta a produção de intermediários reativos de nitrogênio e oxigênio pelos macrófagos (Palumbo, 2008). Choudhury e colaboradores (2008) demonstraram que a miltefosina induz a morte celular das formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* com muitas características da morte celular programada, sendo também a apoptose um de seus possíveis mecanismos de ação. Essa hipótese corrobora o que já foi descrito por Verma e Dey (2004) e Paris e colaboradores (2004).

Do mesmo modo, este derivado alquilfosfolípido pode agir por mecanismos relacionados à transdução de sinais, mais especificamente à sinalização celular mediada por lipídeos (Croft *et al.*, 2006; Soares-Bezerra *et al.*, 2004).

2.5.4.2. Efeitos Colaterais

A miltefosina pode ser utilizada tanto em pacientes adultos quanto em crianças (Murray *et al.*, 2005). Quanto à toxicidade e efeitos colaterais, o trato gastrointestinal apresenta-se como principal órgão alvo, enquanto as funções pulmonares, neurológicas, hematológicas e vegetativas são pouco ou não são afetadas. Sua utilização pode causar náuseas, vômitos e diarreia, que são manifestações transientes (Murray *et al.*, 2005; Soares-Bezerra *et al.*, 2004) e pode aumentar os níveis sanguíneos de transaminases, bem como elevar a uremia e creatinemia (Soares-Bezerra *et al.*, 2004).

A miltefosina possui potencial teratogênico, o que pode limitar seu uso na prática clínica (Seifert *et al.*, 2007). É um medicamento contra-indicado durante a gravidez e lactação e mulheres em idade fértil devem usar métodos de contracepção durante o tratamento e até três meses após o término deste (WHO, 2007a; Sundar, 2001)

2.5.4.3. Eficácia e Resistência

Desde que foi introduzido para uso clínico, nenhum caso de resistência à terapia das leishmanioses com miltefosina foi relatado. Entretanto, a facilidade com que uma cepa de *Leishmania* resistente à miltefosina foi selecionada *in vitro* e a longa meia vida plasmática desse medicamento sugerem que há grandes riscos de que o parasito venha a desenvolver resistência, especialmente quando sua utilização se tornar freqüente (Choudhury *et al.*, 2008).

Estudos realizados *in vitro* identificaram a presença de um transportador tipo-P na membrana da *Leishmania*, pertencente à subfamília aminofosfolípídeo transferase (LdMT), que seria responsável pela captação de miltefosina e glicerolfosfolípídeos para o interior da célula. Mutações em dois alelos nesse transportador (LdMT) parecem induzir a redução da captação do medicamento para o interior da célula, sendo este um possível mecanismo de resistência da *Leishmania* à miltefosina (Croft *et al.*, 2006).

Associado à facilidade de seleção *in vitro* de uma cepa de *Leishmania* resistente a miltefosina, este medicamento alcança o estado de equilíbrio somente após 26 dias de administração contínua. Esta condição pode conduzir a um nível sub-terapêutico do fármaco no sangue por algumas semanas após o início da terapia, favorecendo o surgimento de resistência (Berman *et al.*, 2006). O desenvolvimento de resistência, em especial nos pacientes imunossuprimidos, pode ser favorecido pelo grande número de parasitos viáveis expostos a um nível sub-terapêutico do fármaco (Berman *et al.*, 2006).

Outros possíveis mecanismos de resistência envolvem alterações na permeabilidade da membrana plasmática, metabolização mais rápida do medicamento e efluxo do composto (Ouellette *et al.*, 2004).

O uso disseminado da miltefosina em monoterapia para o tratamento da leishmaniose é outro fator que pode conduzir à rápida emergência de resistência, sobretudo em países como a Índia. A resistência foi desenvolvida aos antimoniais pentavalentes e a pentamidina em

muitas regiões da Índia, onde estes medicamentos eram utilizados em monoterapia (Berman *et al.*, 2006).

O uso de dois medicamentos com diferentes modos de ação e que não compartilham do mesmo mecanismo de resistência pode reduzir a seleção de mutantes resistentes do parasito levando, conseqüentemente, a um sucesso maior na terapia da doença (Berman *et al.*, 2006). Estudos realizados demonstram que a miltefosina não apresenta mecanismo de resistência cruzada com outros medicamentos leishmanicidas (Berman *et al.*, 2006). Assim, no intuito de retardar o surgimento de resistência à miltefosina e diminuir a duração do tratamento, estudos *in vitro* e *in vivo* com associação de miltefosina a outros fármacos leishmanicidas vêm sendo realizados, a fim de não comprometer o potencial farmacológico desse medicamento oral (Seifert e Croft, 2006).

2.6. Quimioterapias em Desenvolvimento

São poucos os novos medicamentos em desenvolvimento para o tratamento de doenças parasitárias. Para o tratamento das leishmanioses, dois compostos em desenvolvimento são a sitamaquina e a paromomicina.

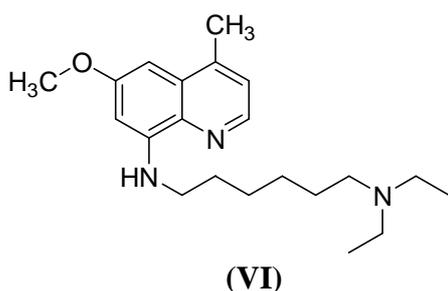
2.6.1. Sitamaquina

A sitamaquina (VI), uma 4-metil-6-metoxi-8-aminoquinoleína, previamente identificada como WR6026, está em estudo clínico para o tratamento da leishmaniose visceral, inclusive sob formulação oral (Bories *et al.*, 2008; Dueñas-Romero *et al.*, 2007; Croft *et al.*, 2006). O composto apresenta atividade antiprotozoária de amplo espectro, sem relatos de resistência, entretanto com uso clínico limitado (Croft *et al.*, 2006).

Estudos de fase II foram conduzidos no Brasil, Quênia e Índia e as taxas de cura evidenciadas variaram de 27 a 87% (Chappuis *et al.*, 2007). Na Índia e Quênia, os estudos de

fase II foram encorajadores (Bories *et al.*, 2008; Dueñas-Romero *et al.*, 2007). No Quênia, as taxas de cura foram superiores a 80% para pacientes com leishmaniose tratados com doses entre 1,75 e 3 mg/ kg/ dia por 28 dias (Wasunna *et al.*, 2005). Na Índia, os percentuais de cura para 120 pacientes diagnosticados com leishmaniose visceral foram de 81%, 89%, 100% e 80% nas doses de 1,5; 1,75; 2,0 ou 2,5 mg/ kg, respectivamente, administradas por 28 dias (Jha *et al.*, 2005). Em estudos conduzidos no Brasil, entretanto, os resultados foram desanimadores (Dietze *et al.*, 2001). De 22 pacientes tratados com doses de 1 a 3,25 mg/ kg/ dia as taxas de cura foram inferiores a 20%, à exceção do grupo tratado com 2,0 mg/ kg/ dia, cuja taxa de cura alcançou 67% (Dietze *et al.*, 2001).

O composto parece atuar na alteração morfológica do parasito e recentemente as mitocôndrias foram identificadas como alvos intracelulares para o medicamento (Bories *et al.*, 2008; Dueñas-Romero *et al.*, 2007). Sabe-se, entretanto que, independente do mecanismo de ação, a sitamaquina deve cruzar a membrana do parasito para alcançar seus alvos biológicos, o que pode ser facilitado por suas características de molécula catiônica e anfifílica, que facilitam sua interação com as membranas lipídicas (Bories *et al.*, 2008; Dueñas-Romero *et al.*, 2007).



Estudos de fase IIb e III estão, respectivamente, em andamento e planejamento na Índia (Chappuis *et al.*, 2007). Nos estudos já realizados, efeitos adversos como vômito, dispepsia (Jha *et al.*, 2005) e nefrotoxicidade foram observados (Chappuis *et al.*, 2007; Jha *et al.*, 2005; Wasunna *et al.*, 2005; Rashid *et al.*, 2002; Dietze *et al.*, 2001).

2.6.2. Paromomicina

A paromomicina ou aminosidina (VII) é um antibiótico aminoglicosídeo extraído de *Streptomyces rimosus*, licenciado na Europa para o tratamento parenteral de infecções bacterianas. Possui atividade anti-bacteriana e anti-protozoária (Sundar e Chatterje, 2006; Ouellette *et al.*, 2004; Soares-Bezerra *et al.*, 2004) e é utilizada contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, e no tratamento de giardíase e amebíase (Jhingran *et al.*, 2009). Está atualmente em estudos clínicos de fase IV para tratamento da leishmaniose (Jhingran *et al.*, 2009).

Quanto ao mecanismo de ação, o fármaco tem como alvo primário os ribossomos da *Leishmania*. Age inibindo a síntese protéica através da ligação às subunidades ribossômicas induzindo, assim, a leitura equivocada do mRNA (RNA mensageiro) (Jhingran *et al.*, 2009; Ouellette *et al.*, 2004; Soares-Bezerra *et al.*, 2004). Interfere no complexo de formação de peptídeos, causando ruptura dos polissomos em monossomos não funcionais. Age também alterando a fluidez da membrana e o metabolismo lipídico (Ouellette *et al.*, 2004).

O custo do tratamento é de US\$ 10-15. Sua vantagem em relação aos outros medicamentos é a duração do tratamento de 21 dias, menor quando comparado à anfotericina B (30 dias) (WHO, 2007a; Rath *et al.*, 2003), à miltefosina (28 dias) (WHO, 2007a) e aos antimoniais pentavalentes (28 dias) (Rath *et al.*, 2003).

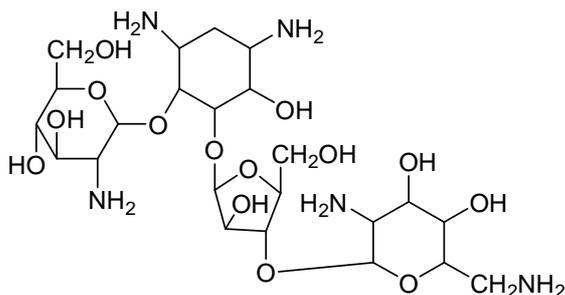
A baixa absorção do medicamento por via oral (Davidson *et al.*, 2008; Croft *et al.*, 2002) conduziu ao desenvolvimento de formulações tópicas para o tratamento da leishmaniose cutânea e de formulações parenterais para o tratamento da leishmaniose visceral (Jhingran *et al.*, 2009; Croft *et al.*, 2002) e cutânea (Jhingran *et al.*, 2009). Uma pomada de paromomicina em cloreto de metilbenzetônio (MBCL) é utilizada como tratamento tópico para leishmaniose cutânea causada por *Leishmania major* em Israel (Davidson *et al.*, 2008).

Uma formulação parenteral do fármaco foi aprovada recentemente para tratamento da leishmaniose, na Índia, onde está em fase IV de pesquisa clínica (Jhingran *et al.*, 2009).

Interessantemente, a paromomicina pode ser utilizada em combinação com os antimoniais pentavalentes (Ouellette *et al.*, 2004). Em um estudo desenhado para verificar a segurança e eficácia da terapia combinada da paromomicina com estibogluconato de sódio, as taxas finais de cura foram superiores a 90% para os grupos tratados com a associação paromomicina e estibogluconato de sódio e de 53,1% para o grupo tratado apenas com estibogluconato de sódio (Thakur *et al.*, 2000b).

Quanto à toxicidade, a paromomicina pode apresentar nefro e ototoxicidade, afetando o oitavo par de nervos cranianos, o que pode levar também a problemas de controle motor e do equilíbrio (Soares-Bezzerra *et al.*, 2004). A incidência de ototoxicidade é transiente e reversível (WHO, 2007a). A frequência das reações tóxicas associadas ao seu uso é baixa quando doses terapêuticas do medicamento são administradas a pacientes portadores de leishmaniose visceral com funções renais e auditivas normais (Davidson *et al.*, 2008).

Como a paromomicina não é utilizada extensivamente, a resistência não é um problema comumente associado ao fármaco (Ouellette *et al.*, 2004). Entretanto, resistência *in vitro* foi induzida (Davidson *et al.*, 2008; Croft *et al.*, 2006) e pelo menos três mecanismos de resistência foram identificados em procariotos: diminuição da recaptação ou da permeabilidade celular ao fármaco, alteração nos sítios de ligação ribossomais ou produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeo (Jhingran *et al.*, 2009).



(VII)

Segundo pesquisadores, este medicamento poderá ser uma alternativa à anfotericina B, na Índia, e aos antimoniais, em volta do mundo, para o tratamento da leishmaniose visceral (Jha, 2006; Murray et al., 2005).

2.7. A Pesquisa por Novos Medicamentos

As opções de tratamento para leishmaniose consistem essencialmente de medicamentos cuja administração é por via parenteral, necessitando muitas vezes de hospitalização (Shimony e Jaffe, 2008; Vieira *et al.*, 2008; WHO, 2007a ; Sundar *et al.*, 2006). Além disso, são inúmeros os relatos de resistência (Jhingran *et al.*, 2009; Choudhury *et al.*, 2008; Davidson *et al.*, 2008; Shimony e Jaffe, 2008; Ashutosh *et al.*, 2007; Rijal *et al.*, 2007; Piscopo e Malia, 2006), a ocorrência de importantes efeitos colaterais (Shimony e Jaffe, 2008; Vieira *et al.*, 2008; Braga *et al.*, 2007; Ordóñez-Gutiérrez *et al.*, 2007; Piscopo e Malia, 2006) e o alto custo associados a algumas de suas formulações (Shimony e Jaffe, 2008; Vieira *et al.*, 2008; Reithinger *et al.*, 2007; Piscopo e Malia, 2006; Sundar *et al.*, 2006). O seu tratamento é um problema crescente e justifica a busca por novos medicamentos, que possam substituir ou complementar os tratamentos atualmente disponíveis (Shimony e Jaffe, 2008).

Os produtos naturais são estruturas químicas privilegiadas, selecionadas na natureza por pressões exercidas no processo evolutivo. Suas estruturas apresentam grande diversidade química, especificidade bioquímica e outras propriedades moleculares que as tornam favoráveis como compostos líderes para a pesquisa de medicamentos (Vieira, 2008; Koehn e Carter, 2005).

De 1983 a 1994, cerca de 40% dos novos compostos aprovados na América do Norte foram derivados de compostos naturais e aproximadamente 70% das novas entidades químicas relatadas entre 1981 e início de 2006 resultaram de estudos com produtos naturais (Liu e Wang, 2008).

As plantas são importante fonte de compostos biologicamente ativos e conseqüente arsenal profilático ou terapêutico para restabelecer e manter a saúde (Santos *et al.*, 2008; Andrade *et al.*, 2007). Muitos dos medicamentos modernos são direta ou indiretamente oriundos de plantas superiores sendo que 11% dos medicamentos essenciais da OMS originaram-se exclusivamente de plantas (Lima, 2006). Novas alternativas terapêuticas para o tratamento das leishmanioses têm sido buscadas na natureza (Santos *et al.*, 2008).

Nesse contexto, o Brasil oferece diversas possibilidades de estudo. Sua grande variedade climática e de solos permite a existência de diversos biomas (Lima, 2006), dentre eles o Cerrado, detentor de uma flora riquíssima (De Souza *et al.*, 2008; Bezerra *et al.*, 2007; Becerra e Alvalá, 2006), ainda pouco conhecida e estudada, em especial no que diz respeito aos seus constituintes químicos e ao seu potencial uso farmacológico (Lima, 2006).

2.8. Cerrado

O Cerrado brasileiro é uma das maiores regiões biogeográficas do mundo com mais de 7.000 espécies nativas de plantas vasculares, muitas das quais comumente utilizadas como medicamentos pelas pessoas que habitam sua região, para o tratamento de diversas doenças (Hiruma-Lima *et al.*, 2006).

Constitui-se no segundo maior bioma brasileiro (Becerra e Alvalá, 2006; Klin e Machado, 2005) ocupando cerca de 21% do território e concentrando-se na região do Planalto Central (figura 15) (Coutinho, 2008; Leite *et al.*, 2006). Estima-se que conte com uma área de aproximadamente 2 milhões de km² (Klin e Machado, 2005), sendo superado em extensão apenas pela Amazônia, que conta com 3,5 milhões de km² (Coutinho, 2008; Pivelo, 2008; Machado *et al.*, 2004).

O clima típico do Cerrado é quente, semi-úmido e notadamente sazonal, com verão chuvoso e inverno seco (Pivelo, 2008). Os solos são característicos, apresentando baixo pH, por serem ricos em íons alumínio, ferro e manganês (Coutinho, 2008; Oliveira *et al.*, 2008).

Devido ao seu relevo predominantemente plano ou suavemente ondulado, a pecuária intensiva e a agricultura mecanizada são favorecidas e pastagens e culturas vêm rapidamente substituindo o Cerrado (Pivelo, 2008). Apenas 20% de sua área é considerada original ou de baixa perturbação, o que significa que 80% do Cerrado brasileiro já foi convertido a áreas de utilização humana (Leite *et al.*, 2006). É o mais ameaçado bioma da América do Sul, devido à diminuição da sua biodiversidade (De Souza *et al.*, 2008). Estima-se que cerca de 40% da flora nativa tenha sido substituída por monoculturas, principalmente soja e outras formas de agricultura emergentes no país (Machado *et al.*, 2004). A porcentagem do Cerrado que é protegida por lei corresponde a apenas 4,4% da sua área (Leite *et al.*, 2006).



Figura 15: Área de distribuição do Cerrado no Brasil

Fonte: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia16/AG01/arvore/AG01_2_111200610412.html

O bioma Cerrado apresenta diferentes ecossistemas, como o Cerradão, mais populoso, constituído por árvores de grande porte que chegam a alcançar 20 m de altura, o Cerrado *stricto sensu*, que engloba arbustos e árvores de 8 a 10 m de altura (Silva, 2008; Leite *et al.*, 2006), matas ciliares e matas de galeria, presentes junto aos rios e córregos, além de outras formas fisionômicas (Silva, 2008). A figura 16 evidencia uma paisagem típica do Cerrado.



Figura 16: Paisagem típica do Cerrado

Fonte: <http://www.ecocentro.org/pdc/imagens/cerrado.jpg>

A grande variabilidade dos ecossistemas do Cerrado contempla uma enorme diversidade de espécies de plantas e animais. São mais de 10.000 espécies de plantas, sendo 4.400 dessas endêmicas e várias utilizadas tradicionalmente no tratamento de doenças (Antunes, 2008).

Essas espécies, por serem submetidas a diferentes características climáticas, aos regimes de queimada, às condições do solo e aos ataques de patógenos reagem morfológicamente e biologicamente a esses estímulos por meio da produção de metabólitos secundários de sobrevivência (Antunes, 2008; Diniz-Filho *et al.*, 2008; Espindola, 2007). As condições ambientais e estímulos externos causados às plantas geram um conjunto magnífico de diversidade química no Cerrado (Diniz-Filho *et al.*, 2008). A seca prolongada, exigindo um maior esforço para a captação de água, as condições do solo ácido e com poucos

nutrientes, as taxas elevadas de alumínio, a temperatura, a altitude, os ataques de patógenos e a necessidade de resistência ao fogo estimulam a produção desses metabólitos secundários (alcalóides, terpenóides, esteróis, flavonóides, etc) (Silva, 2008; Espindola, 2007). E, praticamente todas as classes desses compostos secundários sofrem variações sazonais de acordo com a época do ano e oscilações circadianas que ocorrem devido às mudanças climáticas e à composição atmosférica durante o dia e a noite. Há grupos de compostos beneficiados por baixas temperaturas e outros que, contrariamente, necessitam do aumento da temperatura para otimização da biossíntese. A variação da presença ou não de certos compostos é observada também em exemplares de plantas da mesma espécie que se desenvolvem em regiões de diferentes altitudes (Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

Entretanto, mesmo diante de tamanha diversidade, o Cerrado está sendo destruído a uma velocidade maior que a capacidade da comunidade científica para produzir o conhecimento necessário à sua proteção e conservação (Leite *et al.*, 2006). Estima-se que, caso a sua taxa de desmatamento anual permaneça em 2,2 milhões de hectares, até 2030 teremos seu completo desaparecimento (Machado *et al.*, 2004).

O conhecimento científico a respeito do Cerrado é ainda incipiente e sua diversidade ainda pouco estudada para avaliar a eficácia e os efeitos terapêuticos de seus extratos brutos e compostos isolados de plantas (Leite *et al.*, 2006; Mesquita *et al.*, 2005; Espindola *et al.*, 2004).

O Cerrado se apresenta como uma fonte promissora de novas moléculas com potencial farmacológico e biotecnológico. O grande número de metabólitos secundários produzidos pelas plantas e a utilização tradicional de alguns destes para tratamento de doenças apenas demonstra sua possível aplicação tecno-científica e a possibilidade de estudo de sua diversidade (Antunes, 2008; Espindola, 2007).

Diante desse potencial terapêutico oferecido pelo Cerrado, o Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília criou um banco de extratos de plantas do bioma Cerrado (Processo nº 02000.002272/2006-73 / Conselho de Gestão do Patrimônio Genético do Ministério do Meio Ambiente). Os extratos de plantas desse banco são estudados quanto ao potencial biológico sobre microorganismos patogênicos, câncer e como inibidores de α -amilases humana e de insetos (Silva *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2008; Espindola, 2007; Mesquita *et al.*, 2007; Coelho *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2006; Mesquita *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2005; Espindola *et al.*, 2004).

Um dos objetivos a ser alcançado com esses estudos é a identificação de constituintes micromoleculares inéditos e promissores, com a perspectiva da utilização dessas moléculas como modelos em estudos que possam conduzir à criação de possíveis novos medicamentos.

Nesse contexto, uma triagem previamente realizada pelo Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília, a partir de seu Banco de Extratos, identificou, dentre sessenta e três extratos testados, a espécie *Renealmia alpinia* (Rottb.) Maas, da família Zingiberaceae, como potencial fonte de moléculas ativas sobre *Leishmania*. O extrato hexânico das folhas desta planta apresentou um IC₅₀ de 40,58 µg/mL quando testado *in vitro* sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (Vieira, 2008).

2.9. *Renealmia alpinia* (Rottb.) Maas

As plantas da família Zingiberaceae são caracterizadas por seus rizomas tuberosos e não tuberosos os quais possuem fortes propriedades medicinais e aromáticas. São popularmente conhecidas como condimentos e existem mundialmente cerca de 50 gêneros e 1.300 espécies, distribuídas principalmente no sul e sudeste da Ásia (Chen *et al.*, 2008).

Temperos oriundos de plantas desta família, quando em pó, são amplamente utilizados como aditivos alimentares em muitos países asiáticos. O uso dessas plantas para tratamento de

diarréia, coriza, doenças de pele e reumatismo é amplamente mencionado em medicamentos tradicionais (Chen *et al.*, 2008).

O gênero *Renealmia* (Zingiberaceae) distribui-se pelas regiões tropicais das Américas e África e conta com aproximadamente oitenta e cinco espécies, das quais sessenta e duas encontram-se no trópico americano (Maas *et al.*, 2001).

A planta *Renealmia alpinia* (Rottb.) Maas (figura 17), pertencente à família Zingiberaceae (Maas *et al.*, 2001) é uma espécie rizomatosa aromática de 2-6 m de altura (Maas, 1979) encontrada no bioma Cerrado, ecossistema Mata Ciliar. Na América Tropical, *Renealmia alpinia* é utilizada como estomáquica, febrífuga, carminativa, estimulante e anticancerígena (Macia, 2003; Corrêa, 1984). É conhecida também como *Amomum alpinia* (Rottb.) (GBIF, 2009; IPNI, 2009), *Alpinia exaltata* (L.f.) Roemer & J. A. e *Renealmia exaltata* (L.f.) (GBIF, 2009).



Figura 17: *Renealmia alpinia* (Rottb.) Maas (Zingiberaceae)

Na medicina tradicional, as folhas de *Renealmia alpinia* (figura 18) são utilizadas como febrífugo. A decocção das folhas é utilizada para banho quente, em mulheres parturientes, por três meses após o parto (Zhou *et al.*, 1997) e a decocção das folhas frescas, com folhas de limão (*Citrus* sp.) e de *Annona* sp. é utilizada em banhos quentes, contra febre e fadiga (Zhou *et al.*, 1997).



Figura 18: Folha de *Renealmia alpinia* (Rottb.) Maas (Zingiberaceae)

Fonte: http://www.acguanacaste.ac.cr/paginas_especie/plantae_online/magnoliophyta/zingiberaceae/renealmia_alpinia/r_alpinia24may1998/r_alpinia24may98.html

Um estudo realizado por Coe (2008) demonstrou que na obstetrícia praticada por parteiras na ilha de Rama Cay, no oriente da Nicarágua, os pseudocaulos ou raízes de *Renealmia alpinia* ou ainda a planta inteira são utilizados para alívio de sintomas estomacais, como flatulência, azia e dores de estômago e também para infecções vaginais em gestantes, parturientes e recém nascidos.

Quanto ao uso medicinal das espécies dessa família, diversos extratos de plantas têm apresentado distintas atividades antimicrobianas (Santos, 2005), e também anticancerígena, anti-protozoária, anti-alérgica, dentre outras, descritas abaixo (tabela 2).

Ali e colaboradores (2001) demonstraram atividade antiproliferativa sobre células HT-1080 de fibrosarcoma humano para diarilheptanóides isolados de extratos etanólicos das sementes de *Alpinia blepharocalyx*. O zerumbone, um sesquiterpeno presente em plantas como *Zingiber aromaticum* e *Curcuma longa* (Kirana *et al*, 2003), teve sua atividade anticancerígena demonstrada e descrita na literatura. Além disso, um composto isolado de sementes e rizoma de *Languas galanga* demonstrou atividade anticancerígena, supressora do crescimento de células leucêmicas via indução de apoptose (Ito *et al*, 2004).

Há, ainda, vários relatos de efeitos antialérgicos de algumas plantas tailandesas da família Zingiberaceae, como *Curcuma longa*, *Curcuma zedoaria* e *Alpinia galanga*. O rizoma

de *Curcuma longa* é amplamente utilizado na medicina tradicional tailandesa para tratamento de coceira e outras doenças de pele. *Curcuma zedoaria* tem sido utilizada como um substituto da *Curcuma longa* e recentemente demonstrou ter atividade antialérgica. *Kaempferia galanga* tem sido utilizada para o tratamento de urticária e alergia e *Kaempferia parviflora* para o tratamento de alergia, distúrbios gastrointestinais e como afrodisíaca. *Zingiber cassumunar*, por sua vez, é utilizada para o tratamento de inflamações e doenças da pele, *Zingiber officinale* como antiasmático e *Zingiber zerumbet* como anti-flatulento e agente anti-inflamatório (Tewtrakul e Subhadhirasakul, 2007).

Quanto à atividade anti-protozoária de plantas da família Zingiberaceae, um estudo realizado por Tchuendem e colaboradores (1999), identificou a planta *Reinealmia cincinnata* como um potencial tratamento anti-malárico. Os sesquiterpenos 5E,10(14)-germacradieno-1b,4-β-diol e 1(10)E,5E-germacradien-4α-ol, isolados do extrato diclorometânico dos frutos desta planta, apresentaram importante atividade anti-*Plasmodium* com IC₅₀ de 1,63 e 1,54 µg/mL, respectivamente, sobre clones Indochina W-2 de *Plasmodium falciparum* e 31,90 e 1,90 µg/mL sobre clones Sierra Leone D-6 do parasito.

Okpekon e colaboradores (2004) estudaram a espécie *Aframomum sceptrum* (Zingiberaceae), utilizada tradicionalmente para disenteria amebiana e helmintíase intestinal e esta apresentou-se ativa sobre *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei brucei* e sobre *Leishmania donovani*. Os extratos diclorometânico das folhas e metanólico dos rizomas de *Aframomum sceptrum* apresentaram um EC₅₀ de 12,5 µg/mL sobre *Leishmania donovani*. Dentre os dezessete extratos de plantas testados sobre *Leishmania donovani*, essa espécie apresentou-se entre as três mais ativas (Okpekon *et al.*, 2004). Labdanos diterpenóides previamente isolados desta espécie, em outros estudos, apresentaram também atividade anti-malárica *in vitro* (Duker-Eshun *et al.*, 2002).

Um estudo conduzido por Desrivot e colaboradores (2007), buscando demonstrar a atividade antiparasitária *in vitro* de algumas plantas medicinais da Nova Caledônia evidenciou que o extrato metanólico das folhas da espécie *Curcuma longa*, comumente utilizada como condimento, apresentou um $EC_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$ quando testada sobre *Leishmania donovani* e *Trypanosoma brucei brucei* e um $EC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ quando testado sobre *Trichomonas vaginalis*.

Para *Renealmia alpinia* estudos demonstraram (tabela 2) que o extrato etanólico do seu rizoma apresentou atividade de neutralização da fosfolipase A2 do veneno de *Bothrops asper*, assim como neutralização parcial de mionecrose causada por este (Núñez *et al.*, 2000). Zhou *et al.* (1997) isolaram dois diterpenos labdanos inéditos do extrato acetato de etila de folhas de *Renealmia alpinia*, os quais apresentaram atividade antimicrobiana sobre *Saccharomyces cerevisiae*.

Um estudo desenvolvido pelo Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília testou o potencial antifúngico de extratos de *Renealmia alpinia*. Os extratos hexânico, diclorometânico e hidroalcolico do rizoma formaram halos de 17, 16 e 11 mm, respectivamente sobre *Trichophyton rubrum*, no teste de difusão em ágar. O extrato mais ativo sobre *Trichophyton rubrum* foi o hexânico da folha, que inibiu completamente o crescimento desse fungo tanto na concentração de 20 mg/mL como na de 10 mg/mL. A concentração inibitória mínima (CIM) do extrato hexânico da folha de *Renealmia alpinia* foi a menor dentre sessenta e seis extratos testados, sendo capaz de inibir o crescimento desse fungo filamentosos a uma concentração de 19,53 $\mu\text{g/mL}$ (Silva *et al.*, 2009).

Quanto à atividade anti-*Leishmania*, não há relatos na literatura para a espécie em foco neste estudo, a *Renealmia alpinia*. Este trabalho propõe-se a realizar o estudo químico do extrato hexânico das folhas e pseudocaules de *Renealmia alpinia* ativo sobre *Leishmania (Leishmania) chagasi*, a fim de isolar os metabólitos secundários responsáveis pela atividade

e determinar os compostos promissores para prosseguir com o estudo de busca de novos medicamentos.

Tabela 2: Atividades medicinais de plantas da família Zingiberaceae.

Planta	Composto / extrato	Atividade	Autor
<i>Alpinia blepharocalyx</i>	Diarilheptanóides	Antiproliferativa	Ali <i>et al.</i> , 2001
<i>Zingiber aromaticum</i>	Zerumbone	Anticancerígena	Kirana <i>et al.</i> , 2003
<i>Curcuma longa</i>	Zerumbone	Anticancerígena	Kirana <i>et al.</i> , 2003
<i>Languas galanga</i>	-	Anticancerígena	Ito <i>et al.</i> , 2004
<i>Renealmia cincinnata</i>	Sesquiterpenos	Anti- <i>Plasmodium falciparum</i>	Tchuendem <i>et al.</i> , 1999
<i>Aframomum sceptrum</i>	Extrato diclorometânico folhas e metanólico rizomas	Anti- <i>Leishmania donovani</i>	Okpekon <i>et al.</i> , 2004
<i>Aframomum sceptrum</i>	Labdanos diterpenóides	Anti- <i>Plasmodium falciparum</i>	Duker-Eshun <i>et al.</i> , 2002
<i>Curcuma longa</i>	Extrato metanólico folhas	Anti- <i>Leishmania donovani</i> Anti- <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	Desrivot <i>et al.</i> , 2007
<i>Renealmia alpinia</i>	Extrato metanólico rizomas	Neutralização fosfolipase A ₂ do veneno <i>Bothrops asper</i>	Núñez <i>et al.</i> , 2000
<i>Renealmia alpinia</i>	Extrato acetato de etila folhas / labdanos diterpenos	Anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Zhou <i>et al.</i> , 1997
<i>Renealmia alpinia</i>	Extrato hexânico folhas	Anti- <i>Leishmania amazonensis</i>	Vieira, 2008
<i>Renealmia alpinia</i>	Extrato hexânico folhas	Anti- <i>Trichophyton rubrum</i>	Silva <i>et al.</i> , 2009

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Realizar o estudo químico do extrato hexânico das folhas e pseudocaule de *Renealmia alpinia* monitorado pela atividade sobre as formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar o IC₅₀ do extrato
- Isolar e elucidar a estrutura do(s) composto(s) anti-*Leishmania*
- Determinar o IC₅₀ do(s) composto(s) ativos(s)

4. METODOLOGIA

4.1. Identificação e Coleta

As folhas e pseudocaulas de *Renealmia alpinia* (Rottb.) Maas, família Zingiberaceae, foram coletadas em maio de 2007, no bioma Cerrado, ecossistema Mata Ciliar, no entorno de Brasília-DF. A espécie foi identificada pelo botânico Prof. Dr. José Elias de Paula, do Departamento de Botânica da Universidade de Brasília (UnB), e uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade de Brasília (UB/UnB), sob o número J. Elias de Paula (UB) 3719, para garantir a autenticidade da espécie coletada.

4.2. Obtenção dos extratos brutos

Após coleta, as folhas e pseudocaulas de *Renealmia alpinia* (Rottb.) Maas foram dessecados e estabilizados no Laboratório Prof. José Elias de Paula - Anexo Farmacognosia/UnB, à temperatura ambiente, ao abrigo da umidade e luz solar .

Em seguida esses órgãos vegetais foram pulverizados em moinho de facas e submetidos ao processo de extração por maceração por múltiplos contatos (4x1 semana) com hexano. As soluções extrativas foram sucessivamente recuperadas por filtração e então concentradas em rota-evaporador a 40 °C e pressão reduzida, para eliminação do solvente.

O solvente remanescente foi eliminado com auxílio de um soprador térmico e, ao final do processo, obteve-se o extrato hexânico de folhas e pseudocaulas de *Renealmia alpinia*, que foi mantido em freezer a -20 °C até utilização.

A figura 19 demonstra as etapas de obtenção deste extrato.



Figura 19: Sequência de obtenção do extrato hexânico

4.3. Fracionamento Químico

Considerando a atividade anti-*Leishmania* sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* observada para o extrato hexânico de folhas e pseudocaules de *Renealmia alpinia*, partiu-se para o seu fracionamento químico biomonitorado em coluna cromatográfica aberta de sílica.

Inicialmente, foi realizada coluna filtrante a partir do extrato hexânico. As frações obtidas foram reunidas em grupos, por cor, e testadas *in vitro* quanto à sua atividade anti-*Leishmania*. O perfil cromatográfico destes grupos foi então determinado, por cromatografia em camada delgada (CCD), a fim de se reunir aqueles com atividade anti-*Leishmania* e perfis cromatográficos semelhantes. Uma segunda coluna foi realizada para obtenção de uma maior quantidade do grupo ativo e então uma nova coluna cromatográfica foi realizada a partir desse grupo ativo (figuras 20 e 21).

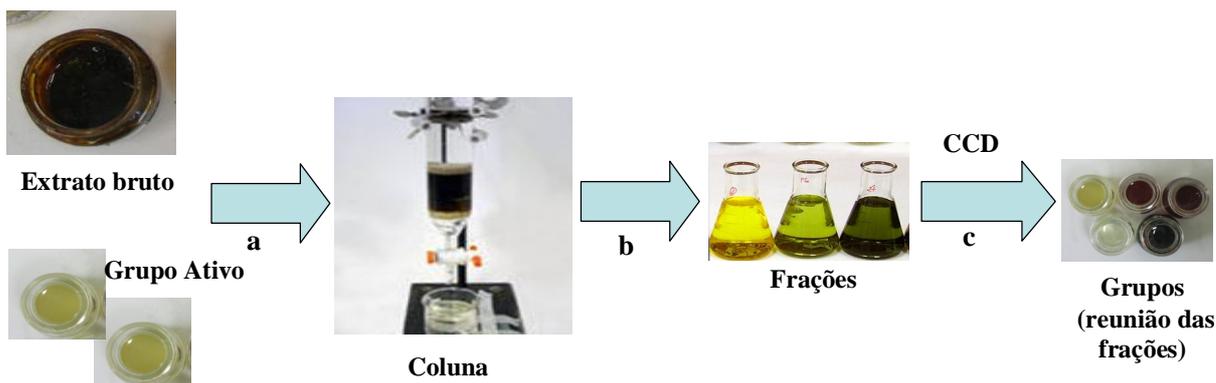


Figura 20: Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico de folhas e pseudocaules de *Renealmia alpinia* e de seu grupo ativo sobre *Leishmania (Leishmania) chagasi* (a) para obtenção de frações (b) cujo perfil cromatográfico, monitorado em CCD, permite a reunião em grupos (c).

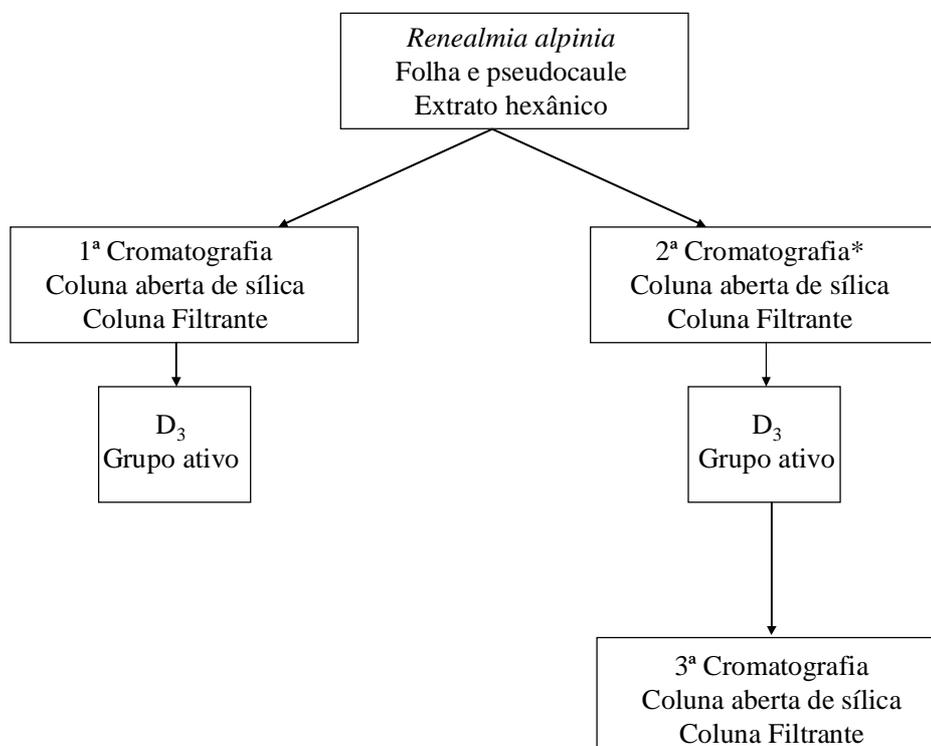


Figura 21: Etapas do fracionamento químico do extrato hexânico das folhas e pseudocaules de *Renealmia alpinia*.

*: coluna realizada para obtenção de maior quantidade do grupo ativo, D₃

4.3.1. Primeira coluna filtrante

Para a primeira coluna filtrante utilizou-se sílica gel (Ultra Chem, 400-200 Mesh) como fase estacionária e hexano, seguido de diclorometano, acetato de etila e metanol como fase móvel. A sílica gel (24 g) previamente ressuspensa em hexano, o primeiro eluente da

coluna, foi adicionada à coluna de vidro, com a torneira semi-aberta, fixada na posição vertical. Algodão foi utilizado na parte inferior da coluna para impedir a passagem de partículas de sílica para as frações que seriam coletadas. Após adição do adsorvente a coluna foi mantida fechada para o empacotamento da sílica.

O extrato foi incorporado à coluna na forma de depósito a seco. A preparação do extrato para o depósito a seco consiste em solubilizar totalmente o extrato hexânico em solvente cuja polaridade permita essa ação e então adicionar sílica ao extrato solubilizado, mantendo-os sob agitação até que o solvente utilizado seja completamente evaporado, obtendo-se, ao final, apenas o extrato incorporado à sílica.

Para a preparação do depósito a seco do extrato hexânico de folhas e pseudocaules de *Renealmia alpinia*, 3 g do extrato hexânico foram completamente solubilizados em diclorometano, em um béquer de vidro. Ao extrato solubilizado foi adicionado sílica gel (proporção 1:5 – extrato: sílica) e a mistura extrato/sílica foi mantida sob agitação, com ajuda de um bastão de vidro, até completa evaporação do diclorometano.

Em seguida, o extrato preparado foi adicionado à coluna com o auxílio de um funil para sua distribuição uniforme sobre a camada de sílica. Após, foi adicionada areia de Fontainebleau sobre o anel formado pelo extrato a fim de evitar perfuração deste e da sílica no momento da adição dos eluentes à coluna.

Os eluentes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol foram adicionados cuidadosamente e continuamente à coluna permitindo a separação das diferentes substâncias contidas no extrato, de acordo com sua polaridade. Por se tratar de um extrato cujas frações apresentaram-se coloridas no momento da coleta, estas foram reunidas em grupos não só de acordo com o eluente que as arrastou, mas também de acordo com a cor apresentada no momento da coleta.

O momento da troca do eluente foi baseado na intensidade da coloração da fração recolhida e também no peso dessa fração. No momento em que a fração correspondente a um determinado eluente tornava-se incolor, esta era colocada em balão, previamente tarado em balança semi-analítica, e então concentrada em rota-evaporador até completa evaporação do solvente. Em seguida, o balão contendo a fração era novamente pesado. Não havendo diferença entre o peso do balão antes e após a adição da fração, considerava-se que não existia mais nenhuma substância em quantidade significativa sendo arrastada por aquele eluente. Procedia-se, então, à troca deste para dar continuidade à coluna.

Ao final, foram recolhidas setenta e sete frações de 125 mL cada. Estas frações foram reunidas inicialmente em vinte e quatro grupos, utilizando como critério para reunião sua cor. Cada grupo foi adicionado separadamente a um balão e levado à rota-evaporador para evaporação do solvente. Posteriormente, os grupos foram transferidos para frascos identificados e levados ao soprador, para eliminação do solvente remanescente. Ao final foram acondicionados em freezer, a -20 °C, até utilização.

Os grupos tiveram sua atividade anti-*Leishmania* testada *in vitro* sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Após, tiveram seu perfil cromatográfico determinado em cromatografia em camada delgada. Os vinte e quatro grupos inicialmente obtidos foram reorganizados em dezesseis novos grupos, de acordo com seu perfil cromatográfico e sua atividade.

4.3.2. Segunda coluna filtrante

Como o rendimento do grupo mais ativo (D₃), proveniente da primeira coluna filtrante, foi de apenas 0,8% (24 mg) em relação ao extrato hexânico, uma segunda coluna foi realizada com o objetivo de obter maior quantidade deste grupo.

O extrato hexânico (12 g) foi incorporado a uma coluna de vidro contendo aproximadamente 65 g de sílica gel (Ultra Chem, 400-200 Mesh) como fase estacionária, na forma de depósito a seco. Como fase móvel foi utilizado hexano, seguido de diclorometano, acetato de etila e metanol.

O princípio para reunião, em grupos, das frações coletadas e para a troca de eluentes foi o mesmo utilizado na primeira coluna (cor das frações/peso). As frações de interesse nesta coluna foram as diclorometânicas.

Os grupos diclorometânicos obtidos a partir da reunião das frações desta segunda coluna foram comparados quanto à atividade e perfil cromatográfico com os grupos da primeira coluna. Para determinação da atividade, os grupos foram testados *in vitro* sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

4.3.3. Terceira coluna filtrante

Para a terceira coluna filtrante utilizou-se sílica gel (Ultra Chem, 400-200 Mesh) como fase estacionária (50 g) e os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, respectivamente, como fase móvel.

O grupo ativo (D₃) foi adicionado à coluna na forma de depósito a seco, preparado a partir de 1,3 g de D₃ (correspondente a 11% do extrato hexânico inicialmente fracionado) solubilizado em diclorometano e incorporado em 6,5 g de sílica gel, com posterior evaporação do solvente. Uma pequena quantidade de areia de Fontainebleau foi adicionada à coluna, sobre o anel formado pelo grupo D₃.

Os eluentes foram adicionados continuamente à coluna, permitindo a separação do grupo D₃ em sub-frações. Estas tiveram seu perfil cromatográfico monitorado por CCD (placas de sílica gel 60 F₂₅₄) a fim de determinar sua reunião em sub-grupos. Os sistemas eluentes utilizados nas CCD foram diclorometano:acetato de etila (90:10),

ciclohexano:clorofórmio:acetato de etila (5:80:15) e diclorometano:metanol (80:20). O revelador utilizado foi vanilina etanólica/solução sulfúrica.

Foram recolhidas quinhentas e noventa e seis sub-frações de 50 mL, reunidas em vinte e seis sub-grupos. Cada sub-grupo foi adicionado separadamente a um balão e levado à rota- evaporador para evaporação do solvente. Posteriormente, os sub-grupos foram transferidos para frascos devidamente identificados, e levados ao soprador, para eliminação do solvente remanescente. Ao final, foram acondicionados em freezer, a -20 °C.

Os sub-grupos tiveram sua atividade anti-*Leishmania* testada *in vitro* sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

4.3.4. Isolamento de substâncias

O sub-grupo D₃-9, obtido a partir do fracionamento químico em coluna cromatográfica aberta do grupo diclorometânico D₃, foi aplicado em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), em coluna X-Terra, operando no modo normal (coluna cromatográfica cuja fase estacionária é polar e a fase móvel é apolar), para isolamento e purificação de seus componentes. Foi utilizado como eluente hexano:acetato de etila (80:20) e fluxo 4,72 mL/min.

4.4. Identificação e Elucidação Estrutural

A etapa de identificação e elucidação estrutural das substâncias isoladas a partir da aplicação do sub-grupo D₃-9 em HPLC foi realizada na Universidade Federal do Ceará (UFC), no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear- CENAUREMN.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) unidimensionais (¹H e ¹³C) e bidimensionais (HSQC, HMBC e COSY) foram obtidos em espectrômetro Bruker 300 e 500

MHz, utilizando piridina para solubilização das amostras. Os espectros de infra-vermelho (FT-IV) foram obtidos em espectrofotômetro com amostras em pellets de KBr.

4.5. Cultura *in vitro* de *Leishmania (Leishmania) chagasi*

As formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* (cepa MCER/BR/79/M6445) utilizadas no estudo foram cedidas ao Laboratório de Farmacognosia da UnB pelo professor Dr. Gustavo Romero, do Laboratório de Leishmanioses, do Núcleo de Medicina Tropical da UnB e conservadas criopreservadas. A cepa é originalmente proveniente da Coleção do Instituto Evandro Chagas, em Belém-PA.

Para utilização, as formas foram descongeladas, colocadas em meio ágar-sangue de Novye e McNeal modificado por Nicolle (NNN) (figura 22) onde foram mantidas por dois a três dias, à temperatura de 22-24 °C. Após esse período, foram transferidas para meio líquido Schneider suplementado com soro fetal bovino a 10%. A cultura líquida (figura 22) foi ainda mantida em estufa a 22–24 °C por cerca de dois dias para replicação das formas promastigotas.

Após replicação em meio líquido, a contagem do número de formas promastigotas foi realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer (figuras 23) e o valor de 5×10^5 ou 10^6 parasitos foi utilizado para realização dos testes *in vitro*.

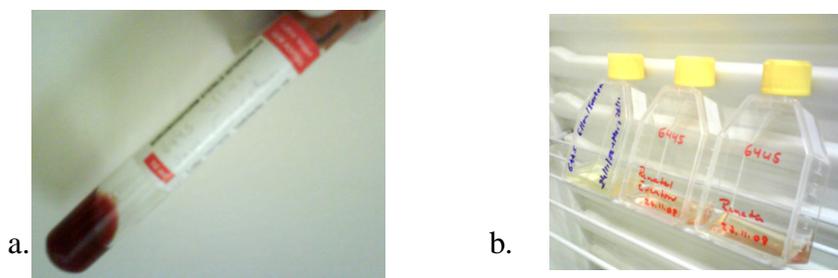


Figura 22: *Leishmania (Leishmania) chagasi* em meio ágar sangue (NNN) (a) e em meio líquido (Schneider[®]) (b)



Figura 23: Câmara de Neubauer (a) e um quadrante da câmara de Neubauer (b)

4.6. Avaliação da atividade anti-*Leishmania* do extrato hexânico, grupos e sub-grupos de *Renealmia alpinia*

O extrato hexânico e os grupos e sub-grupos foram ressuspensos em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de 10 mg/mL. Em seguida, para os testes de triagem de atividade essa solução foi diluída em meio de cultura estéril na proporção de 1:3 (solução em DMSO: meio), obtendo-se uma concentração final de 2,5 mg/mL. Para os testes onde foi feita a diluição seriada para determinação do IC₅₀, a solução a 10 mg/mL foi diluída em meio na proporção de 1:1 (solução em DMSO:meio), obtendo-se uma concentração final de 5 mg/mL. Os testes foram realizados em placas de 96 poços, em triplicata.

A triagem da atividade biológica foi analisada à concentração de 100 µg/mL. Para tal, a cada poço foram adicionados 100 µL de meio de cultura Schneider estéril, 8 µL da solução das amostras a 2,5 mg/mL, 10⁶ formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* em fase logarítmica de crescimento e, por fim, meio de cultura Schneider estéril em quantidade suficiente para (*q.s.p.*) 200 µL, sendo este o volume final de cada poço.

O controle positivo foi miltefosina a 25 µg/mL e o controle negativo *Leishmania (Leishmania) chagasi* em meio de cultura, além de DMSO, a fim de se avaliar se este estava exercendo alguma atividade sobre os parasitos.

As placas foram incubadas por 48 h em estufa com temperatura entre 22-24 °C. A leitura dos resultados foi feita em microscópio óptico invertido. Os movimentos dos parasitos foram estimados de acordo com uma adaptação da avaliação descrita por Weniger e

colaboradores (2001) obtendo-se um resultado expresso em “cruzes”, em função da motilidade dos parasitos, para indicação da intensidade de atividade:

0: quando 100% dos parasitos estavam em movimento (amostra considerada inativa);

(+): quando havia mais de 50% dos parasitos em movimento (amostra considerada pouco ativa);

(++): quando havia menos de 50% dos parasitos em movimento (amostra considerada ativa);

(+++): quando 100% dos parasitos não apresentavam movimento (amostra considerada muito ativa).

Para os cálculos de IC₅₀ a amostra foi avaliada à concentração inicial de 100 µg/mL e em diluição seriada, a partir desta concentração (figura 24). Para tal, a cada poço da fileira A, correspondente à triplicata, foram adicionados 192 µL de meio de cultura Schneider estéril e 8 µL da solução da amostra a 5 mg/mL. Às fileiras seguintes, de B a G, foram adicionados 100 µL de meio de cultura Schneider estéril. Utilizando-se 100 µL do conteúdo de cada poço da triplicata, realizou-se a diluição seriada da amostra partindo-se da fileira A em direção à fileira G. Os 100 µL residuais foram descartados e cada poço ficou com 100 µL ao final da diluição seriada. Aos poços, foram adicionadas 5×10^5 formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* e meio de cultura Schneider estéril em *q.s.p.* 200 µL.

As placas foram incubadas por 48 h em estufa com temperatura entre 22-24 °C. Após esse período, foram lidas inicialmente em microscópio óptico invertido. Em seguida foram adicionados a todos os poços da placa 30 µL de uma solução do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H brometo de tetrazolium (MTT) a 20 mg/mL. As placas foram então incubadas por 4 h em estufa com temperatura entre 22-24 °C e, ao final deste período, foram adicionados a todos os poços 100 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% para liberação dos cristais de formazan formados (figura 25).

A utilização do MTT para avaliação da atividade biológica baseia-se na bio-redução do sal de tetrazolium (MTT) à sua forma solúvel, formazan, por enzimas desidrogenases mitocondriais, expressas apenas por células metabolicamente ativas e, conseqüentemente, viáveis. A quantidade de formazan produzida é, por conseguinte, diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes em cada poço, ao qual foi adicionado o MTT (De Moura, 2008). A leitura das placas para avaliação da atividade foi feita em espectrofotômetro a 570-690 nm.

À última fileira da placa (fileira H) foram adicionados os controles de cor, em sextuplicata. Como controle positivo foi utilizado *Leishmania (Leishmania) chagasi* em meio de cultura e como controle negativo foi utilizado meio de cultura Schneider estéril.

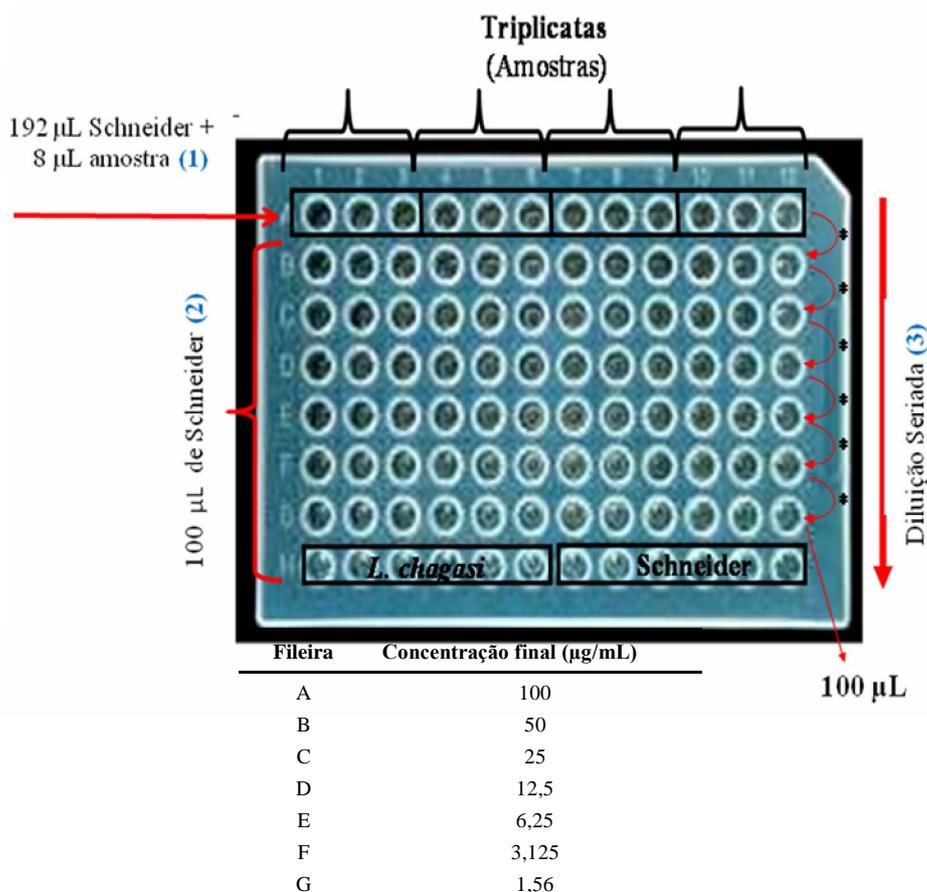


Figura 24: Metodologia para o teste referente ao cálculo de IC₅₀. As amostras são aplicadas em triplicata às placas, à concentração inicial de 100 µg/mL (1 e 2). Em seguida, é feita diluição seriada das substâncias (3) e 5x10⁵ formas promastigotas são adicionadas a cada poço.

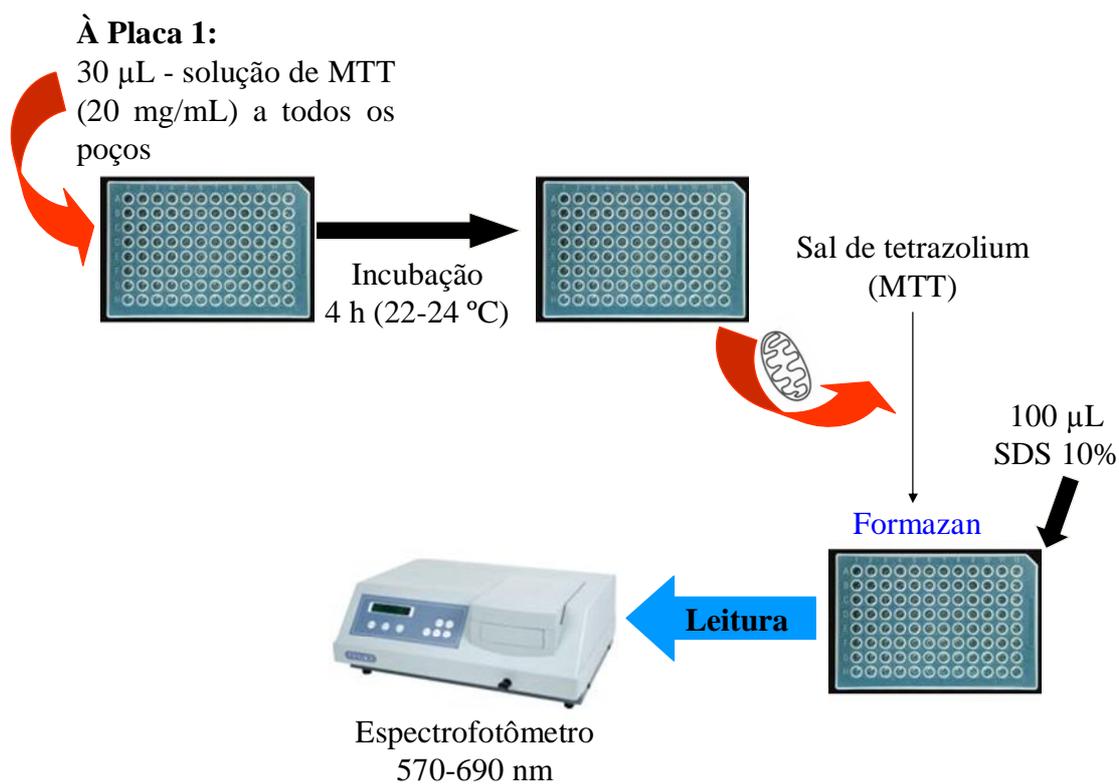


Figura 25: Leitura dos resultados obtidos para o extrato hexânico de folhas e pseudocaules de *Renealmia alpinia*, seus grupos e sub-grupos, utilizando-se a metodologia do MTT.

4.7. Análise estatística

O cálculo de IC_{50} foi feito a partir de gráficos relacionando a atividade inibitória à concentração das substâncias, utilizando os dados das triplicatas de cada teste para realizar a análise de regressão não-linear no programa ICEstimator.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato hexânico das folhas e pseudocaulis de *Renealmia alpinia* (Rottb.) Maas (Zingiberaceae) (28,14 g) foi obtido pelo processo de extração dos órgãos vegetais (3,052 kg) por maceração com rendimento de 0,92%. O extrato foi testado sobre as formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* a 100 µg/mL, apresentando 100% de atividade (tabela 3). O DMSO foi inativo sendo, portanto, um bom eluente para o extrato.

Tabela 3: Atividade do extrato hexânico de folhas e pseudocaulis de *Renealmia alpinia* sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

Atividade	Poço 1	Poço 2	Poço 3
Extrato hexânico			
(100 µg/mL)	+++	+++	+++
DMSO (1%)	0	0	0
Miltefosina (25 µg/mL)	+++	+++	+++

(0): inativo; (+++): muito ativo

Quase não há, na literatura, dados que evidenciem o potencial anti-*Leishmania* da espécie *Renealmia alpinia*. O que se conhece, até o momento, é uma triagem *in vitro* previamente realizada pelo Laboratório de Farmacognosia de UnB, sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, que identificou atividade do extrato hexânico das folhas da planta, com IC₅₀ de 40,58 µg/mL (Vieira, 2008).

Sobre a espécie o que se encontra na literatura são estudos que demonstram sua utilização para neutralizar venenos de serpentes (Núñez *et al.*, 2000) ou ainda que evidenciam seu potencial antimicrobiano, já corroborado pela atividade do extrato hexânico da folha sobre *Trichophyton rubrum* com CIM de 19,53 µg/mL (Silva *et al.*, 2009) e pela ação antimicrobiana do extrato acetato de etila da folha sobre *Saccharomyces cerevisiae*, que

formou um halo de inibição de 12 mm, a 590 µg/mL, no teste de perfuração em ágar (Zhou *et al.*, 1997).

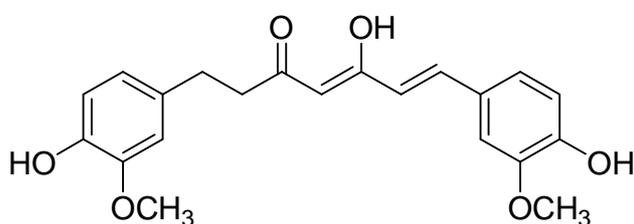
Tradicionalmente a espécie *Renealmia alpinia* é utilizada como febrífugo e a decoção de suas folhas frescas, com folhas de *Citrus* sp. e *Annona* sp. é utilizada em banhos quentes, em casos de febre e fadiga (Zhou *et al.*, 1997). Sua decoção é utilizada ainda em banhos quentes, por parturientes, por até três meses após o parto (Zhou *et al.*, 1997). Avaliando sua composição química o que se conhece são lipídeos e terpenos isolados do óleo de suas sementes, bem como labdanos diterpenos isolados de suas folhas (Yang *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 1997).

Quanto à composição, as plantas da família Zingiberaceae contêm muitos óleos essenciais, além de terpenos, álcoois, cetonas, flavonóides, carotenóides e fitoestrógenos (Chen *et al.*, 2008). Em geral, os óleos essenciais das espécies de Zingiberaceae, utilizadas como temperos, apresentam propriedades antimicrobianas marcantes contra microorganismos presentes nos alimentos, e contêm grande quantidade de compostos fenólicos, os quais, por sua vez, exibem amplo espectro de efeitos biológicos, incluindo propriedades anti-oxidantes (Mayachiew e Devahastin, 2008).

Os rizomas de algumas espécies desta família, como *Zingiber officinale* (gengibre) (Aggarwal *et al.*, 2008; Ali *et al.*, 2008; Surh, 1999), *Curcuma longa* (açafão da Índia) (Itokawa *et al.*, 2008; Hatcher *et al.*, 2008; Jagetia e Aggarwal, 2007; Ringman *et al.*, 2005; Surh, 1999), *Curcuma amada* (Jatoi *et al.*, 2007), *Alpinia conchigera* (Ibrahim *et al.*, 2009), *Zingiber zerumbet* (Chien *et al.*, 2008) e *Alpinia officinarum* (Lee *et al.*, 2008) são tradicionalmente utilizados na culinária como temperos, flavorizantes e condimentos (Chen *et al.*, 2008).

Alguns constituintes das plantas da família Zingiberaceae são também úteis nas indústrias de cosméticos e de medicamentos, por suas propriedades anti-oxidantes e antiinflamatórias (Chen *et al.*, 2008).

A curcumina (VIII), um derivado polifenol isolado dos rizomas da planta *Curcuma longa*, exibe atividades anti-oxidantes e antiinflamatórias (Hatcher *et al.*, 2008; Strimpakos e Sharma, 2008; Surh, 1999), bem como anti-bacteriana e cicatrizante (Khan *et al.*, 2008) e, atualmente, vem sendo estudada quanto aos seus efeitos cardioprotetores e antiproliferativos/anticancerígenos (Khan *et al.*, 2008; Strimpakos e Sharma, 2008). Na medicina tradicional é utilizada na forma de emplastro para tratar infecções oculares; é usada também para tratar feridas, acne, queimaduras, tosse, disenterias, desordens digestivas (indigestão, flatulência, úlcera, acidez) e no alívio de efeitos alucinatórios causados pelo haxixe e outras drogas psicotrópicas (Hatcher *et al.*, 2008), além de ser comumente utilizada na perfumaria (Hatcher *et al.*, 2008).



VIII

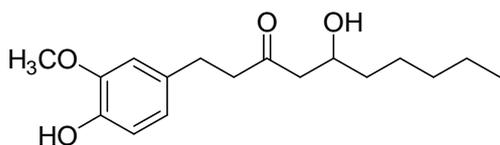
Araújo e colaboradores (1998) relataram atividade anti-*Leishmania* para curcumina e alguns de seus derivados semi-sintéticos, sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*. A curcumina apresentou excelente atividade sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (LD₅₀ de 9 mg/mL), entretanto foi seu derivado semi-sintético, a metilcurcumina, que evidenciou a melhor atividade (LD₅₀ <5 mg/mL). Além disso, a metilcurcumina demonstrou, *in vivo*, boa atividade contra leishmaniose cutânea, inibindo em 65,5% o tamanho da lesão na pata dos animais, quando comparada com o grupo

controle (sem tratamento). Durante o estudo não foi observada nenhuma reação inflamatória no local de aplicação das amostras, talvez devido à potente ação antiinflamatória dos curcuminóides (Jayaprakasha *et al.*, 2005).

A curcumina teve ainda seu potencial leishmanicida demonstrado por Saleheen e colaboradores (2002). Neste estudo, apresentou atividade sobre promastigotas de *Leishmania major*, *Leishmania tropica* e *Leishmania infantum* e contra amastigotas axênicos de *Leishmania major*. A curcumina foi significativamente mais ativa que a pentamidina, tanto sobre as formas promastigotas das diferentes espécies de *Leishmania* testadas, quanto sobre os amastigotas axênicos de *Leishmania major*. Essa atividade foi corroborada também por Koiede e colaboradores (2002), que demonstraram que a curcumina apresentou atividade sobre formas promastigotas de *Leishmania major*, com IC₅₀ de 12 µM, IC₁₀₀ de 21 µM e LD₅₀ de 37,6 µM.

O *Zingiber officinale*, conhecido como gengibre, é utilizado na medicina tradicional oriental para tratamento de resfriados leves (Surh, 1999), desordens digestivas (Ali *et al.*, 2008; Zick *et al.*, 2008; Surh, 1999), reumatismo, cólica (Ali *et al.*, 2008; Surh, 1999), doenças infecciosas, êmese (Ali *et al.*, 2008; Zick *et al.*, 2008) e doenças motoras (Surh, 1999). Os estudos demonstram que seus constituintes químicos apresentam atividades antiinflamatória, antioxidante, anticancerígena, anti-agregação plaquetária, bem como efeito inotrópico e de redução dos níveis de colesterol e glucose (Nicolle e Henein, 2009). O [6]-gingerol (IX), composto fenólico presente em seus rizomas, é um de seus constituintes majoritários, junto com o [6]-shogaol, derivado desidratado do gingerol. Tais compostos parecem ser os que conferem a maioria das propriedades medicinais aos rizomas de gengibre (Zick *et al.*, 2008) e, associados ao paradol, são os possíveis responsáveis pelas atividades antiinflamatória, anticancerígena, analgésica e antioxidante demonstradas pela planta (Habib *et al.*, 2008; Surh, 1999). Sua atividade antiinflamatória é exercida pelo [6]-gingerol e seu

derivado shogaol, via inibição da síntese de prostaglandinas e leucotrienos por inibição do metabolismo do ácido araquidônico pela ciclooxigenase (COX) e inibição da enzima 5-lipoxigenase, respectivamente (Grzanna *et al.*, 2005; Surh, 2002). [6]-gingerol é também o composto possivelmente responsável pelos efeitos cardiotônicos do gengibre (Surh, 1999).



IX

Há grande número de estudos publicados para plantas da família Zingiberaceae associados à atividade antibacteriana, antiinflamatória e anticancerígena de suas espécies e seus constituintes. Entretanto, um número bem menor de estudos evidencia seu potencial anti-*Leishmania* ou anti-protozoário.

Estudos realizados por Mayachiew e Devahastin (2008), Norajit e colaboradores (2007) e Subramanian e colaboradores (2008) confirmam o potencial antibacteriano de plantas da família Zingiberaceae.

O extrato etanólico do rizoma de *Alpinia galanga* demonstrou atividade sobre *Staphylococcus aureus*, apresentando um halo de inibição de 29 mm no teste de difusão em ágar, concentração inibitória mínima (CIM) de 0,78 mg/ml e concentração bactericida mínima (CBM) de 2,34 mg/ml (Mayachiew e Devahastin, 2008). O óleo essencial de *Zingiber officinale*, obtido por hidrodestilação, demonstrou uma concentração inibitória mínima de 6,25 mg/mL sobre *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* no teste de difusão em ágar, em estudo conduzido por Norajit e colaboradores (2007), sendo a mais ativa das cinco plantas da família Zingiberaceae (*Boesenbergia penduratan*, *Zingiber officinale*, *Alpinia galanga*, *Curcuma longa* e *Amomum xanthioides*) avaliadas no estudo (Norajit *et al.*, 2007). Subramanian e colaboradores (2008) isolaram de *Alpinia officinarum* o diarialheptanóide [5-

hidroxi-7-(4''-hidroxi-3-metoxifenil)], um composto fenólico com excelentes propriedades antiinflamatórias, e comprovaram também a atividade inibitória e bactericida deste sobre *Escherichia coli* enteropatogênica.

O potencial anticancerígeno de plantas da família Zingiberaceae é confirmado por estudos como os conduzidos por Yang e colaboradores (2008), que demonstraram o valioso potencial anticancerígeno do extrato hidroetanólico (70%) dos rizomas de *Alpinia pricei* via mecanismos apoptóticos. Ou por Lee e colaboradores (2008) que demonstraram que o [6]-gingerol, isolado dos rizomas de *Zingiber officinale*, apresenta capacidade de inibir a adesão celular e a motilidade de células cancerígenas, bem como a atividade de enzimas metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9), capazes de dissolver a matriz extracelular e permitir a metástase do tumor, em uma linhagem celular de câncer de mama.

Tewtrakul e colaboradores (2008) e Sulaiman e colaboradores (2008), por sua vez, corroboram a aplicação como antiinflamatório de plantas da família Zingiberaceae. As plantas *Kaempferia parviflora* e *Boesenbergia pandurata*, que, além de serem utilizadas como ingredientes culinários, são utilizadas na medicina tradicional para tratamento de diversas doenças associadas a processos inflamatórios, como gota, alergia e úlcera péptica, tiveram os compostos responsáveis por suas propriedades antiinflamatórias elucidados (Tewtrakul *et al.*, 2008). Os pesquisadores identificaram o composto 5-hidroxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona, isolado do extrato etanólico dos rizomas de *Kaempferia parviflora*, como o responsável pela atividade antiinflamatória da planta com IC₅₀ de 16,1 µM sobre a produção do óxido nítrico e de 16,3 µM sobre a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂). Identificaram também as chalconas preniladas, panduratina A e hidroxipanduratina A, como os compostos responsáveis pela atividade antiinflamatória de *Boesenbergia pandurata*, com IC₅₀ de 5,3 µM e 13,3 µM, respectivamente, para inibição do óxido nítrico e de 10,5 µM e 12,3 µM sobre a produção de PGE₂.

Em estudo conduzido *in vivo*, por Sulaiman e colaboradores (2008), o extrato aquoso das folhas de *Kaempferia galanga* demonstrou atividade antiinflamatória e anti-nociceptiva dose-dependente. A intensidade destas atividades foi confirmada pelos testes de contorção abdominal, da placa quente (“hot-plate” a 52 °C), da formalina e do edema da pata induzido por carragenina, realizados em fêmeas de camundongos Balb-c ou em ratos Sprague-Dawley. Os resultados obtidos para este extrato foram avaliados em relação ao controle negativo (água destilada) e aos medicamentos utilizados para o tratamento da dor ou inflamação, como ácido acetilsalicílico, morfina e naloxona (controles positivos) (Sulaiman *et al.*, 2008).

Diarilheptanóides como yakuchinona A (1-[4'-hidroxi-3'-metoxifenil]-7-fenil-3-heptanona) e yakuchinona B (1-[4'-hidroxi-3'-metoxifenil]-7-fenilhept-1-en-3-ona), isolados de *Alpinia oxyphylla* já demonstraram potente atividade antiinflamatória e anti-tumoral (Lee *et al.*, 2006; Surh, 1999), possivelmente relacionada à capacidade de inibição da ciclooxigenase 2 (COX-2) e da expressão da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) (Lee *et al.*, 2006) por estes compostos.

Dados da literatura demonstram que compostos diarilheptanóides apresentaram também atividade contra infecções causadas por *Leishmania* (Subramanian *et al.*, 2008). Alves e colaboradores (2003) avaliaram a atividade de diversos derivados diarilheptanóides (curcuminóides) sobre *Leishmania amazonensis*. Os pesquisadores identificaram que o composto [1-(4-metoxi-fenil)-7-(3,4-metoxi-4-hidroxi-fenil)-1,6-heptadien-3, 5-diona], obtido sinteticamente, apresentou atividade *in vivo*, quando administrado sob esquemas de uma a três doses a camundongos Balb-c infectados por *Leishmania amazonensis*. O resultado apresentado foi melhor que o do isotionato de pentamidina utilizado como controle positivo.

O mesmo grupo de pesquisadores (Alves *et al.*, 2003) demonstrou a atividade leishmanicida de outros derivados diarilheptanóides sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania chagasi*. Sete derivados

diarilheptanóides (5-hidroxi-7-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1-4-metoxifenil)-1,4,6-heptatrien-3-ona; 5-hidroxi-7-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1-fenil-1,4,6-heptatrien-3-ona; 5-hidroxi-1,7-di(4-hidroxifenil)-1,4,6-heptatrien-3-ona; 5-hidroxi-7-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1-(4-hidroxifenil)-1,4,6-heptatrien-3-ona; 5-hidroxi-7-(4-acetoxi-3-metoxifenil)-1-fenil-1,4,6-heptatrien-3-ona; 5-hidroxi-1,7-difenil-1,4,6-heptatrien-3-ona e 3-hidroxi-1,7-difenil-2,4,6-heptatrien-3-ona) apresentaram atividade sobre as formas promastigotas das três diferentes espécies de *Leishmania* utilizadas. A melhor atividade, entretanto, foi observada sobre os promastigotas de *Leishmania braziliensis*, com o IC₅₀ destes compostos variando entre 2 e 78 µM. Quando testados sobre *Leishmania chagasi* tais valores variaram de 6 a 331 µM e, para *Leishmania amazonensis*, variaram de 1 a 373 µM. Em geral, os compostos foram também ativos sobre amastigotas axênicos de *Leishmania amazonensis*.

Araújo e colaboradores (1998) isolaram da leguminosa *Centrolobium sclerophyllum* os diarilheptanóides 2-[β-(*p*-hidroxifenil)-etil]-6-(*p*-hidroxifenil)-tetrahidroxipirano e 3-hidroxi-1,7-bis-(4',4''-di-hidroxifenil)-heptano e avaliaram sua atividade sobre promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Tais compostos foram ativos, quando comparados ao Glucantime[®], com LD₅₀ de 77 nM e 86 nM, respectivamente. Entretanto, foram menos ativos que a pentamidina.

Compostos diarilheptanóides já foram isolados de diferentes espécies de plantas da família Zingiberaceae, dentre elas *Alpinia conchigera* (rizomas), *Alpinia ojjicinarum*, *Curcuma xanthorriza* (Araújo *et al.*, 1998), *Curcuma comosa* (Suksamrarn *et al.*, 2008), *Alpinia officinarum* (Sun *et al.*, 2008) e *Zingiber officinale* (Tao *et al.*, 2008). Entretanto, não há estudos que correlacionem a presença de compostos diarilheptanóides em plantas da família Zingiberaceae à atividade leishmanicida. Atividade leishmanicida de plantas da família Zingiberaceae já foi demonstrada por Okpekon e colaboradores (2004) para o extrato diclorometânico das folhas de *Aframomum sceptrum* e para o extrato metanólico de seus

rizomas. Ambos apresentaram um EC₅₀ de 12,5 µg/mL quando testados sobre *Leishmania donovani*. Desrivot e colaboradores (2007), por sua vez, demonstraram a atividade anti-parasitária *in vitro* de plantas medicinais da Nova Caledônia, e o extrato metanólico das folhas da espécie *Curcuma longa*, neste estudo, apresentou EC₅₀ >50 µg/mL sobre *Leishmania donovani* e *Trypanosoma brucei brucei* e EC₅₀ >100 µg/mL sobre *Trichomonas vaginalis*. Em nenhum dos dois estudos foi elucidado o composto responsável pela atividade leishmanicida e antiprotozoária das plantas estudadas. Em nosso estudo, o IC₅₀ para o extrato hexânico das folhas e pseudocaules de *Renealmia alpinia* sobre *Leishmania (Leishmania) chagasi* foi de 22,81 µg/mL. A miltefosina, registrada em alguns países para tratamento da leishmaniose visceral, apresentou, em nosso estudo, IC₅₀ < 10µg/mL.

A leishmaniose visceral é uma zoonose caracterizada por sua evolução crônica e comprometimento sistêmico que, se não tratada, resulta em morte em 90% dos casos (Maia-Elkhoury, 2008), enquanto a leishmaniose cutânea tende à cura espontânea em pacientes imunocompetentes, ou é responsiva ao tratamento (Ministério da Saúde, 2007). A forma visceral da doença é causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania* e, na América, *Leishmania (Leishmania) chagasi* é o agente etiológico da doença (Maia-Elkhoury, 2008). A leishmaniose visceral é endêmica em sessenta e cinco países, com 500.000 novos casos relatados anualmente (Maia-Elkhoury, 2008), 90% dos quais concentrados em países como Índia, Nepal, Sudão, Bangladesh, Etiópia e Brasil (Chappuis *et al.*, 2007). O Brasil, por sua vez, é responsável por cerca de 95% dos casos ocorrentes nas Américas (Maia-Elkhoury, 2008).

Considerando-se, portanto, a atividade anti-*Leishmania* do extrato de *Renealmia alpinia*, a atividade anti-parasitária descrita na literatura para plantas da mesma família e considerando-se que ainda há pouca informação a respeito dessa espécie vegetal, em especial

para o extrato hexânico, partiu-se para o seu fracionamento cromatográfico biomonitorado a fim de isolar os compostos responsáveis pela atividade anti-*Leishmania*.

A primeira coluna cromatográfica realizada resultou em setenta e sete frações de 125 mL, reunidas em vinte e quatro grupos (vide tabela 4 e figura 26). Os grupos obtidos tiveram sua atividade anti-*Leishmania* testada sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* (tabela 5). A avaliação qualitativa da atividade foi verificada utilizando-se microscópio óptico para a leitura dos resultados, o que permitiu a identificação dos grupos ativos (tabela 5), então eleitos para o prosseguimento dos estudos químicos.

O grupo G₂ não foi testado, pois não foi obtido em quantidade suficiente. Os grupos G₁, G₃-G₄, G₆-G₇, G₁₈-G₁₉ e G₂₃ não apresentaram atividade a 100 µg/mL. Os grupos G₈, G₁₇, G₂₂ e G₂₄ apresentaram-se pouco ativos, enquanto G₅, G₉, G₁₂-G₁₅ e G₂₀ apresentaram-se ativos e G₁₀-G₁₁, G₁₆ e G₂₁ apresentaram-se muito ativos a 100 µg/mL (tabela 5).

O DMSO, veículo mais utilizado pelos pesquisadores de produtos naturais para ressuspender os extratos vegetais insolúveis em água (Fabri et al., 2009; Costa et al., 2007; Estevez et al., 2007; Billo et al., 2005), não apresentou atividade anti-*Leishmania* a 1% (tabela 5), permitindo, portanto, avaliar a ação dos grupos sobre as formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Dentre os grupos que apresentaram excelente atividade G₁₀-G₁₁ correspondem ao grupo diclorometânico, G₁₆ ao grupo acetato de etila e G₂₁ ao grupo metanólico da coluna (tabela 4).

Após avaliação da atividade, o perfil dos vinte e quatro grupos foi analisado em cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se como sistemas de eluentes hexano:acetato de etila (90:10), hexano:acetato de etila (60:40) e hexano:acetato de etila (20:80) e como soluções reveladoras vanilina etanólica/solução sulfúrica. Os grupos foram reunidos conforme a semelhança em CCD e a atividade anti-*Leishmania* (tabela 6 e figura 26)

Tabela 4: Grupos obtidos a partir da primeira coluna cromatográfica do extrato hexânico de folhas e pseudocaules de *Renealmia alpinia*.

Grupo (G)	Frações	Eluente^a
G₁	1-2	H
G₂	3	H
G₃	4-6	H
G₄	7-9	H
G₅	10	H
G₆	11-13	H
G₇	14-18	H
G₈	19	D
G₉	20-22	D
G₁₀	23-24	D
G₁₁	25-30	D
G₁₂	31-33	D
G₁₃	34-36	D
G₁₄	37-49	D
G₁₅	50	AcOEt
G₁₆	51	AcOEt
G₁₇	52-53	AcOEt
G₁₈	54-59	AcOEt
G₁₉	60	AcOEt
G₂₀	61-65	AcOEt
G₂₁	66	M
G₂₂	67	M
G₂₃	68-70	M
G₂₄	71-77	M

^a Eluente- H (hexano), D (diclorometano), AcOEt (acetato de etila), M (metanol)

Tabela 5: Atividade dos grupos G₁ a G₂₄, obtidos na primeira coluna cromatográfica, sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* a 100 µg/mL. Testes realizados em triplicata.

Grupo (G)	Poço 1	Poço 2	Poço 3
G₁	0	0	0
G₂	NT	NT	NT
G₃	0	0	0
G₄	0	0	0
G₅	++	++	++
G₆	0	0	0
G₇	0	0	0
G₈	+	+	+
G₉	++	++	++
G₁₀	+++	+++	+++
G₁₁	+++	+++	+++
G₁₂	++	++	++
G₁₃	++	++	++
G₁₄	++	++	++
G₁₅	++	++	++
G₁₆	+++	+++	+++
G₁₇	+	+	+
G₁₈	0	0	0
G₁₉	0	0	0
G₂₀	++	++	++
G₂₁	+++	+++	+++
G₂₂	+	+	+
G₂₃	0	0	0
G₂₄	+	+	+
Controles			
Miltefosina*	+++	+++	+++
DMSO (1%)	0	0	0

(0): inativo; (+): pouco ativo; (++) : ativo; (+++) : muito ativo

NT: não testado

* A miltefosina foi testada à concentração de 25 µg/mL

Tabela 6: Reunião dos grupos G₁ a G₂₄, obtidos da primeira coluna cromatográfica do extrato hexânico das folhas e pseudocaules de *Renealmia alpinia*, após triagem para atividade anti-*Leishmania* e segundo o perfil em cromatografia em camada delgada.

Grupo (G)	Grupos Reunidos	Eluente Coluna	Eluente CCD
G ₁	H ₁	H	H:AcOEt (90:10)
G ₃ + G ₄	H ₂	H	H:AcOEt (90:10)
G ₅ + G ₆	H ₃	H	H:AcOEt (90:10)
G ₇	H ₄	H	H:AcOEt (90:10)
G ₈	D ₁	D	H:AcOEt (90:10)
G ₉	D ₂	D	H:AcOEt (60:40)
G ₁₀ +G ₁₁ +G ₁₂	D ₃	D	H:AcOEt (60:40)
G ₁₃	D ₄	D	H:AcOEt (60:40)
G ₁₄	D ₅	D	H:AcOEt (60:40)
G ₁₅	AcOEt ₁	AcOEt	H:AcOEt (20:80)
G ₁₆	AcOEt ₂	AcOEt	H:AcOEt (20:80)
G ₁₇ + G ₁₈	AcOEt ₃	AcOEt	H:AcOEt (20:80)
G ₁₉	AcOEt ₄	AcOEt	H:AcOEt (20:80)
G ₂₀	AcOEt ₅	AcOEt	H:AcOEt (20:80)
G ₂₁ +G ₂₂	M ₁	M	H:AcOEt (20:80)
G ₂₃ +G ₂₄	M ₂	M	H:AcOEt (20:80)

Eluente: H (hexano), D (diclorometano), AcOEt (acetato de etila), M (metanol)

Após reunião dos grupos, a atividade anti-*Leishmania* de D₃, D₄ e AcOEt₂, provenientes da união dos grupos mais ativos, conforme tabela 6, foi reavaliada *in vitro* sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Diferentes concentrações destes grupos foram avaliadas, a partir da sua diluição seriada em placas de 96 poços, para cálculo do IC₅₀. A concentração avaliada variou de 100 µg/mL a 1,56 µg/mL e utilizou-se a metodologia do MTT para leitura dos resultados (tabela 7).

O grupo AcOEt₂ apresentou a melhor atividade dentre os grupos testados, com IC₅₀ menor que o obtido para o extrato hexânico das folhas e pseudocaules de *Renealmia alpinia*, do qual foi isolado (tabela 7). Entretanto, o rendimento de D₃ foi maior que AcOEt₂ (oito

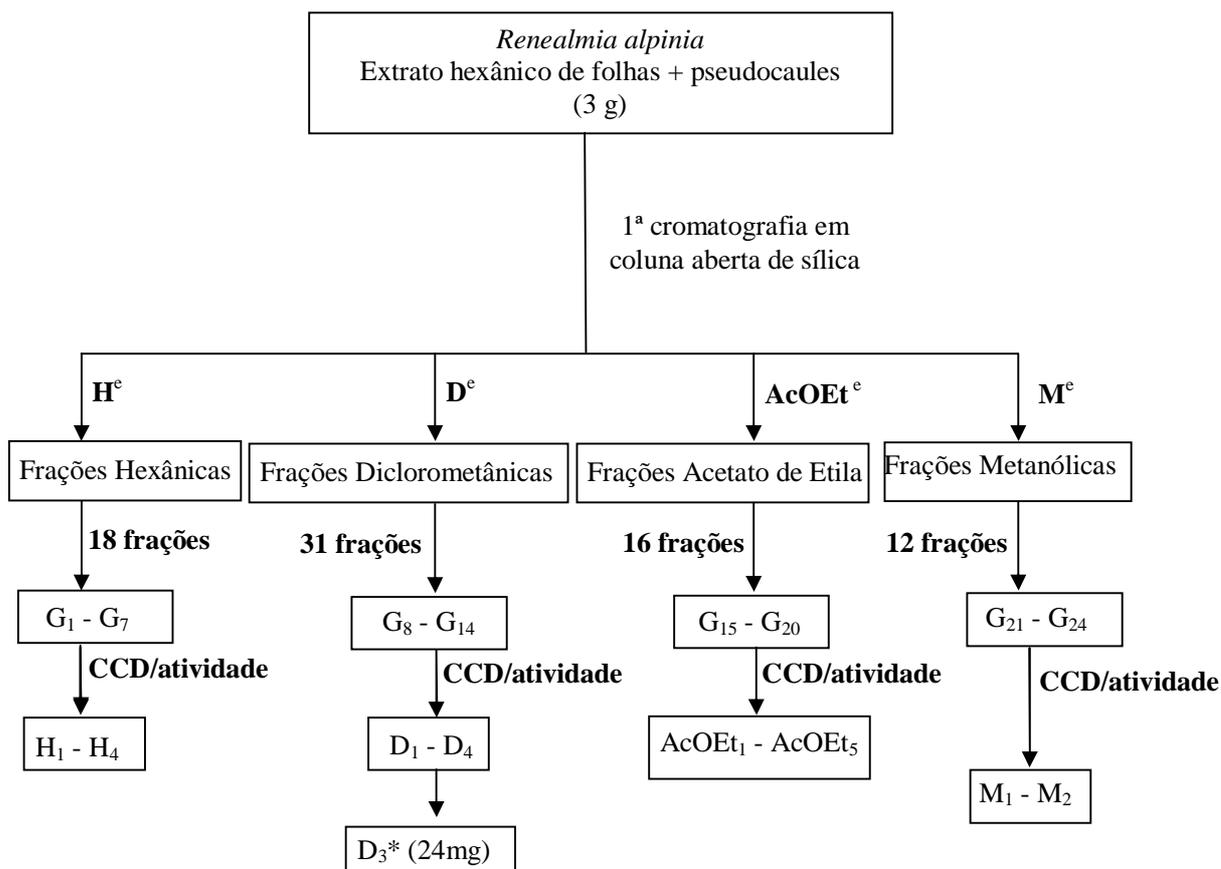
vezes maior) e D₄ (doze vezes maior) e seu IC₅₀ (19,41 µg/mL) foi menor que o IC₅₀ obtido para o extrato hexânico (22,81 µg/mL). Optou-se por prosseguir os estudos com D₃.

Tabela 7: Atividade dos grupos D₃, D₄ e AcOEt₂, obtidos a partir da reunião dos grupos ativos oriundos do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico das folhas e pseudocaules de *Renealmia alpinia* sobre *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Testes realizados em triplicata.

	D ₃	D ₄	AcOEt ₂
IC ₅₀ (µg/mL)	19,41	11,23	7,12
Rendimento em mg (%)*	24 (0,8%)	2 (0,066%)	3 (0,1%)

* em relação ao extrato total hexânico

Figura 26: Primeira coluna cromatográfica do extrato hexânico de folhas e pseudocaules de *Renealmia alpinia*.



* Acompanhamento da atividade anti-*Leishmania*

^e H (hexano); D (diclorometano); AcOEt (acetato de etila); M (metanol)

As plantas produzem os metabólitos secundários em concentrações bem menores que os metabólitos primários (carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos etc), pois os metabólitos

primários são essenciais ao seu desenvolvimento e estão envolvidos na manutenção de suas funções vitais (Edreva *et al.*, 2008; Lourenço, 2003; Tolonen, 2003), enquanto os metabólitos secundários são produzidos a partir dos metabólitos primários e estão associados à sobrevivência do vegetal no ambiente (Edreva *et al.*, 2008; Namdeo, 2007; Schijlen *et al.*, 2004; Lourenço, 2003; Tolonen, 2003; Alves, 2001). Muitas vezes, os metabólitos secundários podem ser ativados somente durante uma determinada fase do crescimento ou um estágio do desenvolvimento vegetal, ou ainda em estações específicas do ano, sob condições de estresse ou de disponibilidade de nutrientes (Namdeo, 2007; Lourenço, 2003; Alves, 2001).

Muitos metabólitos secundários das plantas, dentre eles a quinina, isolada das cascas do caule e das raízes de *Cinchona* sp. e a artemisinina, isolada das partes aéreas de *Artemisia annua*, bem como seus análogos cloroquina, primaquina e mefloquina; arteméter, arteéter e artesunato de sódio, já foram desenvolvidos como medicamentos antiparasitários, sendo utilizados no tratamento da malária (Kumar *et al.*, 2009).

Além destes, outros medicamentos clássicos são também oriundos de metabólitos secundários das plantas ou seus derivados, dentre eles morfina, codeína, taxol, digoxina (Namdeo, 2007), entre outros.

Assim, um segundo fracionamento cromatográfico foi realizado a fim de se obter maior quantidade do grupo ativo D₃, para prosseguimento do estudo. Nesta segunda coluna cromatográfica 12 g do extrato total hexânico foram incorporados a uma coluna aberta de vidro contendo 65 g de sílica gel; hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol foram os eluentes utilizados na coluna. Foram recolhidas noventa e oito frações diclorometânicas (125 mL), que foram reunidas em cinco grupos (D₁, D₂, D₃, D₄ e D₅), utilizando como critério para reunião a cor de cada fração. Para os demais eluentes (hexano, acetato de etila e metanol) foram obtidos três grupos correspondentes.

Os grupos diclorometânicos obtidos desta segunda coluna (figura 27) tiveram sua atividade sobre *Leishmania (Leishmania) chagasi* monitorada (tabela 8). O controle positivo, miltefosina, foi testado a 25 µg/mL.

Tabela 8: Atividade dos grupos diclorometânicos obtidos da segunda coluna cromatográfica do extrato hexânico das folhas e pseudocaulis de *Renealmia alpinia* sobre promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* a 100 µg/mL.

Grupo	Poço 1	Poço 2	Poço 3
D₁	+	+	+
D₂	+	+	+
D₃	+++	+++	+++
D₄	+++	+++	+++
D₅	+++	+++	+++
Controles			
Miltefosina*	+++	+++	+++
DMSO (1%)	0	0	0

(0): inativo; (+): pouco ativo; (+++): muito ativo

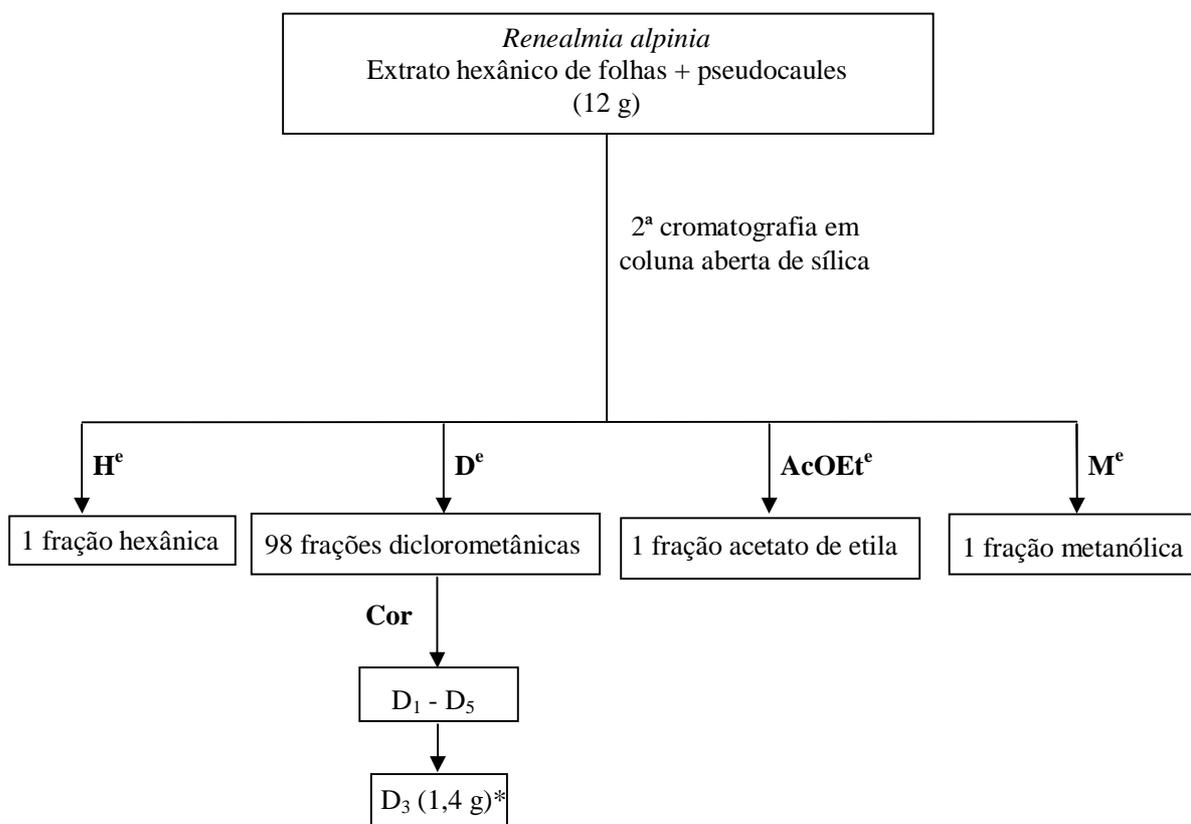
* A miltefosina foi testada à concentração de 25 µg/mL

O perfil cromatográfico em CCD confirmou a semelhança entre os grupos D₃ obtidos das duas colunas. Tal semelhança foi confirmada também pela atividade apresentada por estes dois grupos, já que a atividade demonstrada pelo grupo D₃ foi mantida na segunda coluna. O rendimento do grupo D₃ foi de 11,67%, pois foram obtidos 1,4 g do grupo a partir de 12 g do extrato hexânico.

Embora D₄, com IC₅₀ de 3,08 µg/mL tenha se mostrado mais ativo que D₃, seu rendimento foi muito pequeno (70 mg), sendo cerca de 20 vezes menor que o rendimento de D₃. Seria necessária a realização de um novo fracionamento cromatográfico, a partir de uma quantidade significativamente maior do extrato hexânico, a fim de se obter quantidade

suficiente do grupo D₄ para ser fracionado. Neste momento do estudo, optou-se por prosseguir com D₃. D₅, por sua vez, apresentou IC₅₀ de 17,81 µg/mL. Uma terceira coluna cromatográfica foi então realizada para o fracionamento do grupo D₃, ativo sobre *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

Figura 27: Segunda coluna filtrante: Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico de folhas e pseudocaules de *Renalmia alpinia*.



* Acompanhamento da atividade anti-*Leishmania*

^e H (hexano); D (diclorometano); AcOEt (acetato de etila); M (metanol)

Na terceira coluna, 1,3 g do grupo D₃ foram incorporados a uma coluna aberta contendo 50 g de sílica gel. Foram recolhidas quinhentas e noventa e seis frações de 50 mL cada, a partir da utilização dos eluentes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Essas frações foram reunidas em vinte e seis sub-grupos de acordo com o perfil cromatográfico em CCD sendo sete hexânicos, treze diclorometânicos, cinco acetato de etila e um metanólico (tabela 9). Os sub-grupos obtidos do fracionamento do grupo D₃ foram

avaliados *in vitro* sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* (tabela 10).

Tabela 9: Sub-grupos oriundos da terceira coluna cromatográfica, referente ao fracionamento do grupo ativo D₃.

Sub-Grupo	Frações	Eluente Coluna ^a	Eluente CCD ^a
D ₃ -1	1-15	H	D:AcOEt (90:10)
D ₃ -2	16-19	H	D:AcOEt (90:10)
D ₃ -3	20-60	H	D:AcOEt (90:10)
D ₃ -4	61-69	H	D:AcOEt (90:10)
D ₃ -5	70-79	H	D:AcOEt (90:10)
D ₃ -6	80-120	H	D:AcOEt (90:10)
D ₃ -7	121-163	H	D:AcOEt (90:10)
D ₃ -8	164-169	D	D:AcOEt (90:10)
D ₃ -9	170-185	D	D:AcOEt (90:10)
D ₃ -10	186-189	D	D:AcOEt (90:10)
D ₃ -11	190-200	D	D:AcOEt (90:10)
D ₃ -12	201-229	D	D:AcOEt (90:10)
D ₃ -13	230	D	D:AcOEt (90:10)
D ₃ -14	231-259	D	D:AcOEt (90:10)
D ₃ -15	260-300	D	D:AcOEt (90:10)
D ₃ -16	301-309	D	D:AcOEt (90:10)
D ₃ -17	310-340	D	D:AcOEt (90:10)
D ₃ -18	341-349	D	D:AcOEt (90:10)
D ₃ -19	350-369	D	D:AcOEt (90:10)
D ₃ -20	370-401	D	D:AcOEt (90:10)
D ₃ -21	402-409	AcOEt	Ch:Clo:AcOEt (5:80:15)
D ₃ -22	410-420	AcOEt	Ch:Clo:AcOEt (5:80:15)
D ₃ -23	421-439	AcOEt	Ch:Clo:AcOEt (5:80:15)
D ₃ -24	440-460	AcOEt	Ch:Clo:AcOEt (5:80:15)
D ₃ -25	461-553	AcOEt	D:M (80:20)
D ₃ -26	554-596	M	-

^a Eluente: H (hexano), Ch (ciclohexano), Clo (clorofórmio), D (diclorometano), AcOEt (Acetato de Etila), M (metanol)
 -: perfil cromatográfico em CCD não avaliado.

Tabela 10: Atividade dos 26 sub-grupos provenientes da terceira coluna cromatográfica referente ao fracionamento do grupo ativo D₃ sobre promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* a 100 µg/mL.

Sub-Grupo	Poço 1	Poço 2	Poço 3
D ₃ -1	NT	NT	NT
D ₃ -2	NT	NT	NT
D ₃ -3	NT	NT	NT
D ₃ -4	NT	NT	NT
D ₃ -5	NT	NT	NT
D ₃ -6	NT	NT	NT
D ₃ -7	NT	NT	NT
D ₃ -8	+++	+++	+++
D ₃ -9	+++	+++	+++
D ₃ -10	+++	+++	+++
D ₃ -11	+++	+++	+++
D ₃ -12	++	++	++
D ₃ -13	++	++	++
D ₃ -14	++	++	++
D ₃ -15	++	++	++
D ₃ -16	+++	+++	+++
D ₃ -17	++	++	++
D ₃ -18	++	++	++
D ₃ -19	++	++	++
D ₃ -20	++	++	++
D ₃ -21	++	++	++
D ₃ -22	++	++	++
D ₃ -23	NT	NT	NT
D ₃ -24	+	+	+
D ₃ -25	++	++	++
D ₃ -26	++	++	++
Controles			
Miltefosina*	+++	+++	+++
DMSO (1%)	0	0	0

NT (não testado); (0): inativo; (+): pouco ativo; (++): ativo; (+++): muito ativo

* A miltefosina foi testada à concentração de 25 µg/mL

Considerando-se o baixo rendimento dos sub-grupos hexânicos, D₃-1 a D₃-7, e do sub-grupo acetato de etila D₃-23, provenientes da terceira coluna, estes não foram avaliados quanto à sua atividade sobre os parasitos (tabela 10).

Os sub-grupos que apresentaram 100% de atividade a 100 µg/mL foram D₃-8 - D₃-11 e D₃-16. Os demais sub-grupos apresentaram-se ativos (D₃-12 - D₃-15, D₃-17 - D₃-22, D₃-25 - D₃-26) ou pouco ativos (D₃-24) (tabela 10).

Os sub-grupos que apresentaram 100% de atividade a 100 µg/mL foram avaliados em diluição seriada, a uma concentração inicial de 100 µg/mL, a fim de eleger o sub-grupo mais ativo para dar continuidade aos estudos (tabela 11).

Tabela 11: Atividade dos sub-grupos mais ativos, provenientes da terceira coluna cromatográfica, referente ao fracionamento do grupo ativo D₃, sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Testes em triplicata.

C (µg/mL)	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,56
Sub-Grupo							
D₃-8	+++	+++	++	0	0	0	0
D₃-9	+++	+++	+++	++	++	0	0
D₃-10	+++	+++	+++	++	++	+	0
D₃-11	+++	+++	+++	++	++	0	0
D₃-16	+++	+++	+++	++	++	0	0

(0): inativo; (+): pouco ativo; (++) : ativo; (+++): muito ativo

Tabela 12: Rendimento dos sub-grupos mais ativos, provenientes da terceira coluna cromatográfica, referente ao fracionamento do grupo ativo D₃

Sub-Grupo	D ₃ -8	D ₃ -9	D ₃ -10	D ₃ -11	D ₃ -16
Rendimento mg (%)*	40 (3,07)	320 (24,61)	50 (3,84)	110 (8,46)	20 (1,54)

*Rendimento em relação ao grupo ativo D₃ (1,3 g)

O rendimento de cada sub-grupo, descrito na tabela 12, demonstra que D₃-9 foi obtido em maior quantidade, com rendimento de 24,61% em relação ao grupo ativo D₃ (1,3 g) e

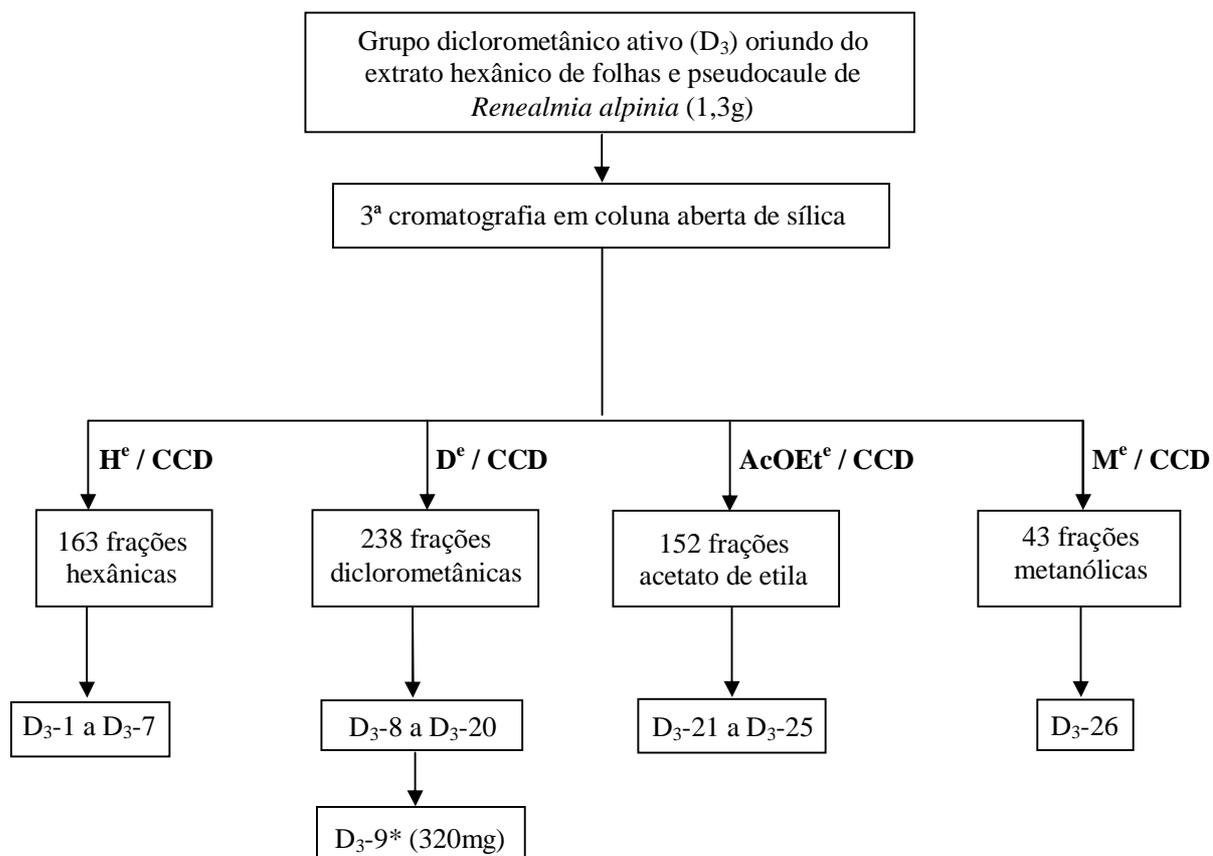
2,22% em relação ao extrato total hexânico hexânico de folhas e pseudocaule de *Renealmia alpinia* fracionado (12 g).

O sub-grupo D₃-8 foi ativo a 25 µg/mL, apresentando um IC₅₀ de 60,79 µg/mL. Os sub-grupos D₃-9, D₃-11 e D₃-16 foram ativos a 6,25 µg/mL e o sub-grupo D₃-10 apresentou atividade ainda à 3,125 µg/mL. Entretanto, embora D₃-10 tenha apresentado alguma atividade a 3,125 µg/mL, seu IC₅₀ foi 49,94 µg/mL, estando acima dos valores encontrados para D₃-11 e D₃-16, cujos IC₅₀ foram, respectivamente, 12,23 µg/mL e 15,05 µg/mL.

Os valores de IC₅₀ dos grupos foram calculados apenas no final do estudo. Desta forma, o sub-grupo D₃-9 foi eleito para prosseguimento das etapas de purificação em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com o objetivo de identificar os constituintes responsáveis pela atividade anti-*Leishmania* (figura 28), pois, dentre os grupo acima avaliados, como D₃-11 e D₃-16, apresentou alguma atividade até a concentração de 6,25 µg/mL (tabela 11) e foi também o grupo com melhor rendimento (cerca de oito vezes maior que D₃-10, sub-grupo que apresentou alguma atividade até menor concentração) (tabela 12).

O sub-grupo selecionado, D₃-9, foi analisado em HPLC, em coluna X-Terra, operando em modo normal, utilizando como fase móvel hexano:acetato de etila (80:20), em fluxo de 4,72 mL/min. O procedimento permitiu o isolamento dos compostos 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila (14,3 mg) e 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila (8,2 mg), representados no cromatograma (figuras 29a e 29b) pelos picos D₃-9-P₂ e D₃-9-P₃, respectivamente. Os compostos foram identificados por técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear de uma dimensão (1D) (¹H e ¹³C) e bisimensional (2D) (HSQC, HMBC e COSY) e de infra-vermelho (IV) (anexos 1 e 2, respectivamente). Ambos os compostos apresentam semelhança estrutural com o estilbeno (XIII) e o resorcinol (XIV).

Figura 28: Terceira coluna filtrante: Fracionamento químico do extrato hexânico de folhas e pseudocaules de *Renealmia alpinia*.



* Acompanhamento da atividade anti-*Leishmania*

^eH (hexano); D (diclorometano); AcOEt (acetato de etila); M (metanol)

Figura 29a: Cromatograma do sub-grupo ativo D₃-9, oriundo do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico das folhas e pseudocaules de *Renealmia alpinia*, obtido em HPLC operando no modo normal, eluente hexano:acetato de etila (80:20), fluxo 4,72 mL/min. O círculo destaca o pico D₃-9-P₂, correspondente à substância 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila e o pico D₃-9-P₃, correspondente à substância 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila, ambas isoladas em coluna X-Terra.

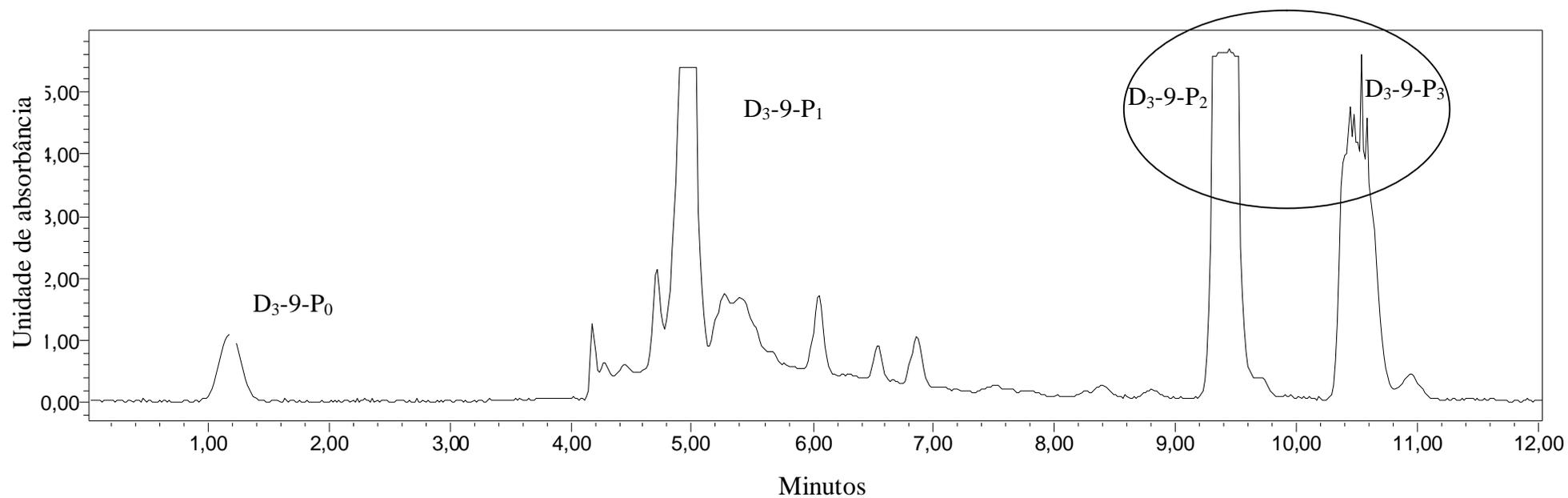
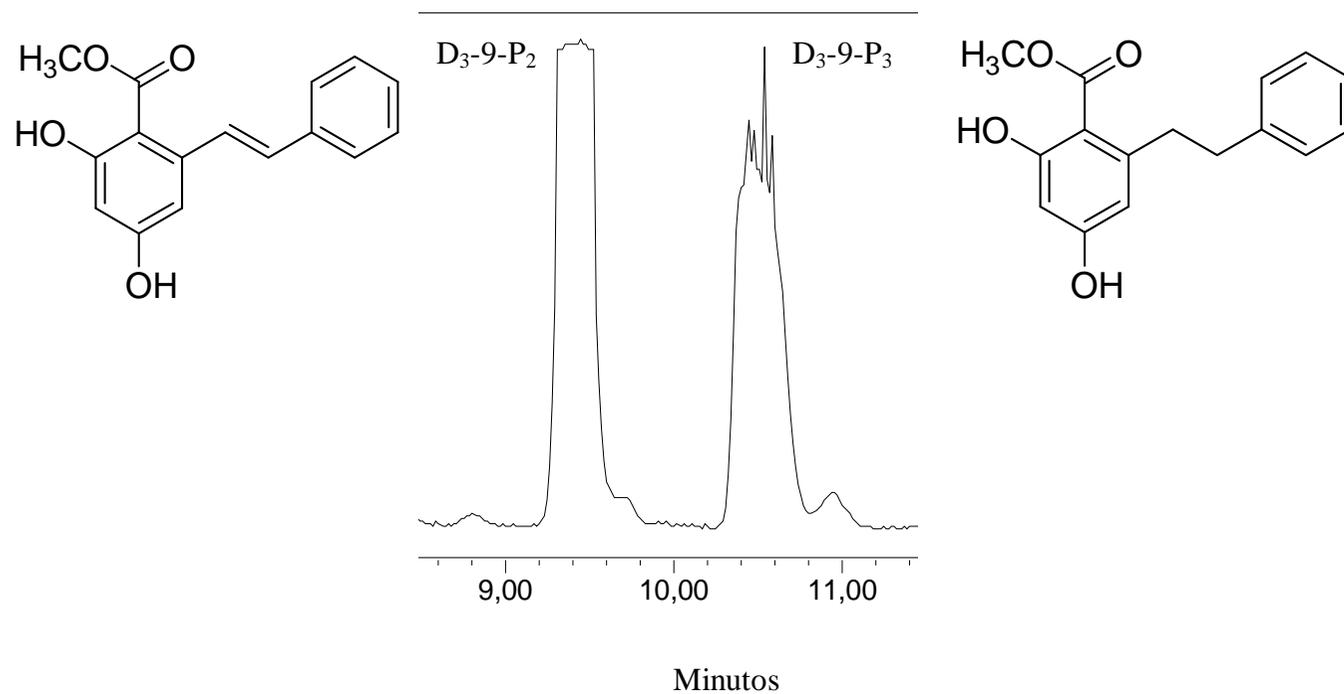


Figura 29b: Cromatograma do sub-grupo D₃-9, oriundo do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico das folhas e pseudocaules de *Renalmia alpinia*, evidenciando os picos dos compostos 2,4-di-hidroxi-6-(fenileteno)-benzoato de metila (D₃-9-P₂) e 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila (D₃-9-P₃) isolados em HPLC, em coluna X-Terra, operando no modo normal, eluente hexano:acetato de etila (80:20), fluxo 4,72 mL/min.



A análise em HPLC do grupo ativo D₃-9 forneceu ainda dois picos majoritários, D₃-9-P₀ (1,5 mg) e D₃-9-P₁ (51,1 mg) (figura 29a). Para P₀ não foi feita análise de RMN, já que este foi obtido em pequena quantidade. Já o espectro de ¹H obtido para P₁ demonstrou que o pico isolado correspondia ainda a uma mistura de diferentes substâncias. A presença de pelo menos duas substâncias diferentes neste pico pôde ser observada em cromatografia em camada delgada, corrida em dois sistemas eluentes diferentes (diclorometano:acetato de etila 90:10 e clorofórmio:acetato de etila 90:10).

O pico 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila recuperado no HPLC (D₃-9-P₂) apresenta fórmula molecular C₁₆H₁₄O₄ e peso molecular de 270,28. Tal composto foi previamente obtido por síntese, por Douglas e Money, em 1967, como um sólido incolor. Esta descrição é condizente com a observada neste estudo.

De acordo com a literatura, a substância 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila (D₃-9-P₂) apresenta ponto de fusão de 480,9 ± 45 °C e densidade de 1,303 ± 0,06 g/cm³ à temperatura de 20 °C e pressão de 1 atm. Sua entalpia de vaporização é de 77,39 ± 3 kJ/mol à pressão de 1 atm e seu pKa 8,04 ± 0,23 à 25 °C (Scifinder Scholar, 2008).

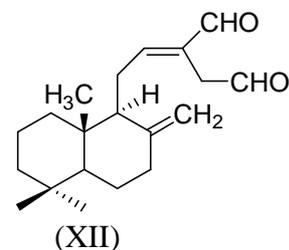
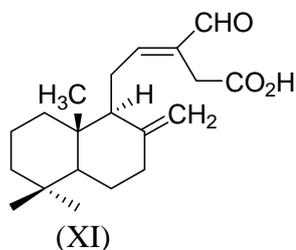
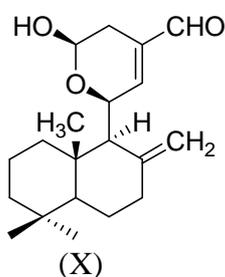
O pico 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila recuperado no HPLC (D₃-9-P₃) apresenta fórmula molecular C₁₆H₁₆O₄ peso molecular de 272,30. Tal composto foi previamente obtido por síntese, por Douglas e Money, em 1967, como um sólido amarelo escuro. Esta descrição é condizente com a observada neste estudo.

De acordo com a literatura, a substância 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila (D₃-9-P₃) apresenta ponto de fusão de 443,6 ± 45 °C e densidade de 1,250 ± 0,06 g/cm³ à temperatura de 20 °C e pressão de 1 atm. Sua entalpia de vaporização é de 72,83 ± 3 kJ/mol à pressão de 1 atm e seu pKa 8,17 ± 0,23 à 25 °C (Scifinder Scholar, 2008).

Até onde conhecemos, os compostos 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila (D₃-9-P₂) e 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila (D₃-9-P₃) são inéditos na espécie

Renealmia alpinia, sendo o primeiro um composto inédito também na família Zingiberaceae e como produto natural.

Quanto a compostos isolados da planta *Renealmia alpinia*, a literatura descreve a obtenção, em 1997, por Zhou e colaboradores, de dois diterpenos labdanos inéditos, 11-hidroxi-8(17),12(E)-labdadieno-15,16-dial 11,15-hemiacetal (X) e ácido 16-oxo-8(17),12(E)-labdadieno-15-óico (XI) e de um diterpeno conhecido, 8(17),12(E)-labdadieno-15,16-dial (XII). Entretanto, a composição química da espécie *Renealmia alpinia* é ainda pouco conhecida.



Dados da literatura demonstram que o composto isolado do extrato hexânico de *Renealmia alpinia*, 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila (D₃-9-P₂) foi obtido previamente, porém, apenas sinteticamente (Douglas e Money, 1967; Harrys e Carney, 1967), não havendo relatos de sua ocorrência como produto natural, tampouco estudos de atividade biológica para este. Já o composto 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila (D₃-9-P₃) foi obtido sinteticamente algumas vezes (Yamagushi et al., 1988; Douglas e Money, 1967) e foi também isolado da natureza (Morikawa et al., 2008).

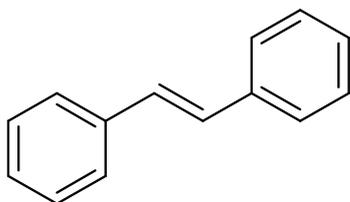
O composto 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila (D₃-9-P₃) foi isolado pela primeira vez de *Boesenbergia rotunda* (Morikawa et al., 2008), planta pertencente à família Zingiberaceae, assim como a espécie *Renealmia alpinia*, estudada neste trabalho. A ocorrência de um mesmo composto em duas espécies diferentes de uma mesma família é justificada pela quimiotaxonomia, pois devido às semelhanças genéticas e enzimáticas, as

plantas da mesma família utilizam as mesmas vias e reações metabólicas para a produção de substâncias. A abordagem quimiotaxônomica é uma ferramenta útil para os pesquisadores de produtos naturais e para a indústria farmacêutica, na busca de moléculas com atividade biológica (Espindola, 2007).

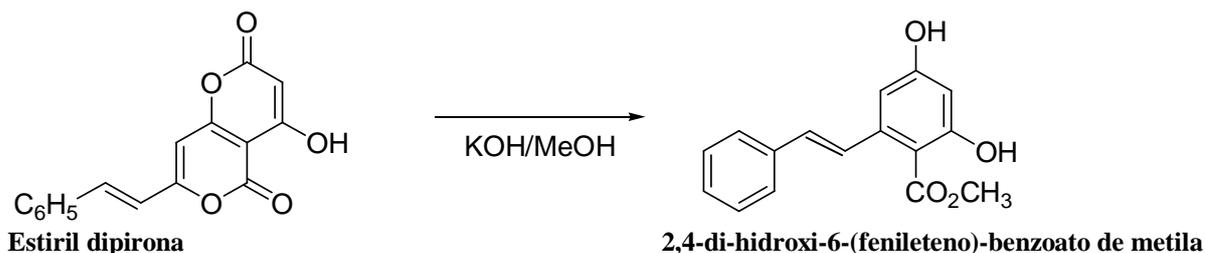
Quando isolado como produto natural, esse composto, 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila, teve sua atividade avaliada sobre aminopeptidases e TNF- α (Morikawa *et al.*, 2008). Não existem, entretanto, referências na literatura que reportem atividade antiprotozoária ou especificamente atividade anti-*Leishmania* para esta substância.

Embora sejam compostos conhecidos, obtidos sinteticamente (D₃-9-P₂ e D₃-9-P₃) ou isolados como produto natural (D₃-9-P₃) os dados de ressonância magnética nuclear de ¹³C, bem como os dados de ressonância magnética nuclear de HSQC, HMBC e COSY são inéditos para ambas as substâncias.

O 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila (D₃-9-P₂) foi sintetizado por Douglas e Money (1967), utilizando como precursor a estiril dipirona que, na ocasião foi também obtida sinteticamente através de uma série de reações. A partir de uma reação da estiril dipirona com hidróxido de potássio dissolvido em metanol, foram obtidos três derivados estilbenos, dentre eles o 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila (esquema 1).



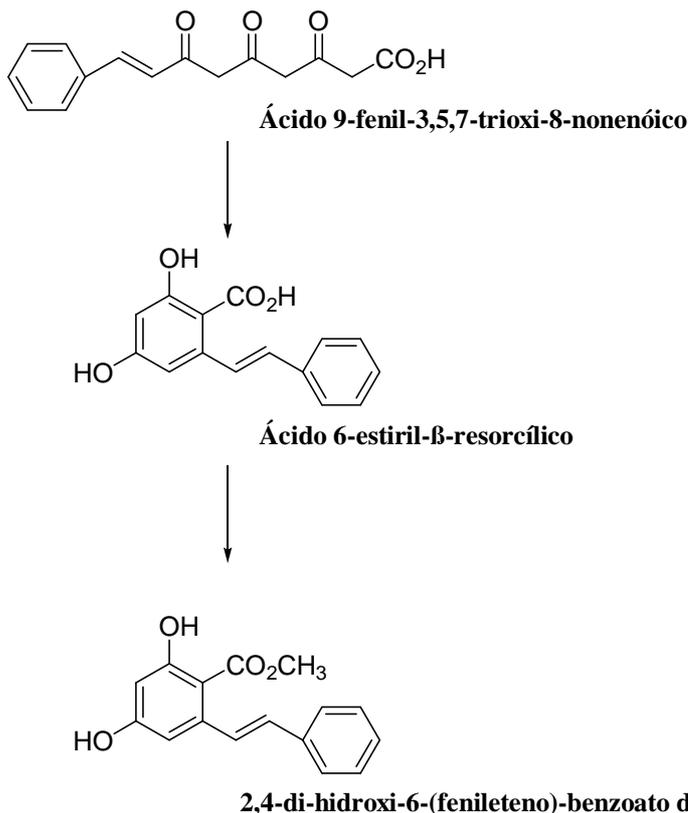
(XIII)



Esquema 1: Obtenção, por síntese, do 2,4-di-hidroxi-6-(fenileteno)-benzoato de metila a partir da estiril dipirona (Douglas e Money, 1967).

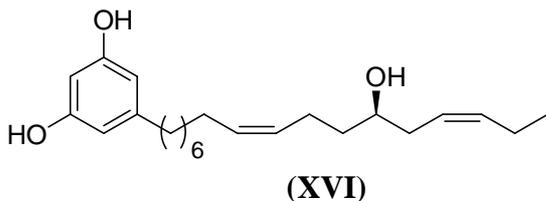
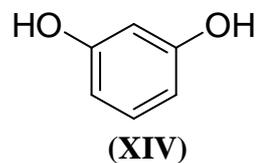
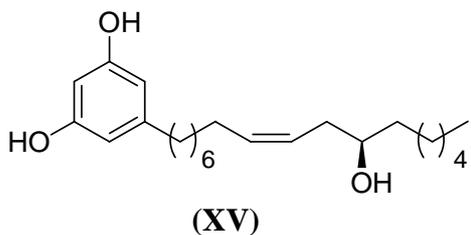
A literatura não relata nenhuma atividade anti-*Leishmania* ou anti-protozoária para o precursor da reação sintética, a estiril dipirona (esquema 1). Entretanto, os derivados estilbenos, como o resveratrol e seus análogos hidroxilados foram descritos por sua atividade sobre as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania major* (Kedzierski *et al.*, 2007). O resveratrol (3,4',5'-trihidroxiestilbeno), uma fitoalexina natural comumente encontrada em frutas e no vinho tinto, possui atividades anti-câncer, anti-oxidante, cardioprotetora, bem como atividade sobre fungos, incluindo dermatófitos, e sobre vírus, podendo atuar também aumentando a resistência ao stress (Kedzierski *et al.*, 2007). Os estilbenos, em geral, apresentam atividade estrogênica e alguns de seus derivados, como por exemplo o dietilestibestrol, é considerado um hormônio não esteroideal (Nascimento, 2002). Kedzierski e colaboradores (2007) observaram atividade leishmanicida de maneira dose-dependente para o resveratrol. As concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ reduziram a viabilidade dos parasitos em 32, 55,8 e 65,5% respectivamente, após 48 h de incubação, resultando em IC_{50} de 45 $\mu\text{g/mL}$. O composto demonstrou ainda uma redução significativa no número de macrófagos infectados por formas amastigotas do parasito nas concentrações de 40 e 45 $\mu\text{g/mL}$ e de 20 $\mu\text{g/mL}$. Seu análogo hidroxilado 3,4,4',5'-tetrahidroxi-*trans*-estilbeno demonstrou melhor atividade *in vitro*, inibindo 43% das formas promastigotas a 10 $\mu\text{g/mL}$, após 48 h de incubação. Essa atividade foi aumentada para 71% após um período maior de incubação (cerca de 10 h). Porém, o análogo não demonstrou atividade sobre formas amastigotas de *Leishmania major* (Kedzierski *et al.*, 2007).

Em 1967, o 2,4-di-hidroxi-6-(fenileteno)-benzoato de metila (D₃-9-P₂) foi novamente sintetizado, por Harrys e Carney, em um estudo de síntese de ácidos e ésteres 3,5,7-tricetos e suas ciclizações a resorcinóis e floroglucinóis. O ácido 6-estiril-β-resorcílico, obtido pela ciclização aldol do ácido triceto 9-fenil-3,5,7-trioxi-8-nonenóico, em presença de diazometano, deu origem ao 2,4-di-hidroxi-6-(fenileteno)-benzoato de metila (esquema 2).

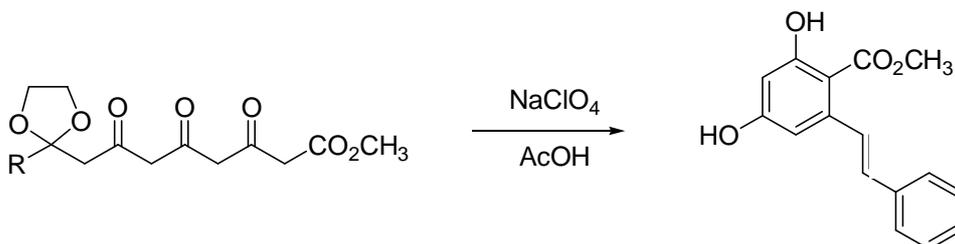


Esquema 2: Obtenção, por síntese, do 2,4-di-hidroxi-6-(fenileteno)-benzoato de metila a partir do ácido 6-estiril-β-resorcílico (Harrys e Carney, 1967).

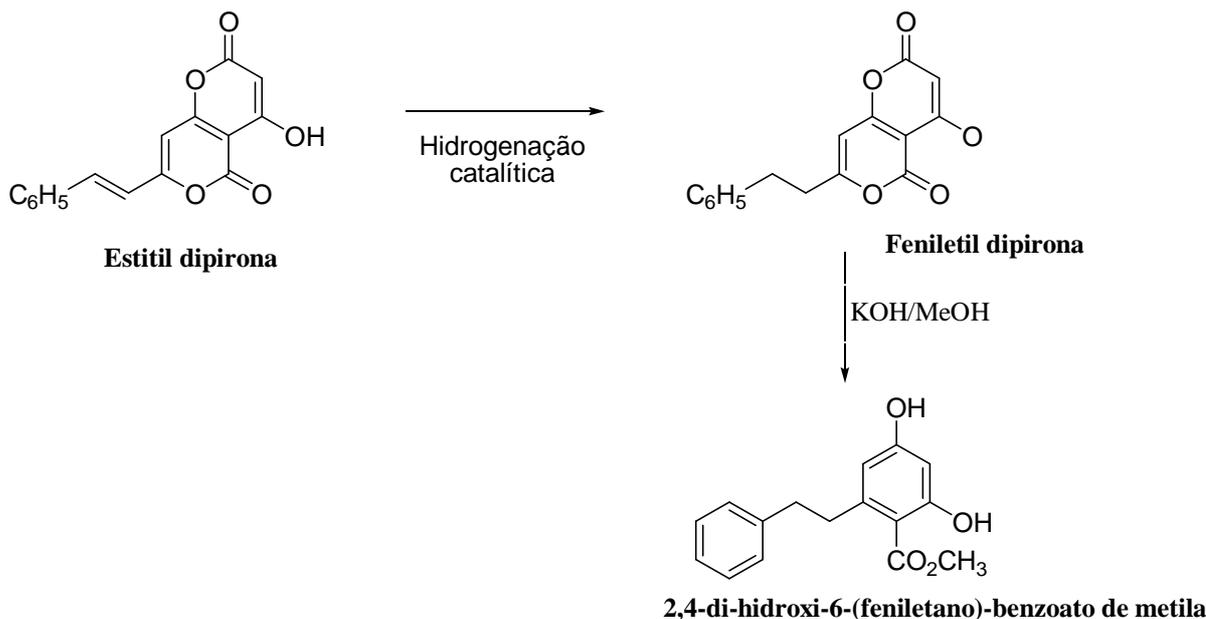
Em 2007, Jiménez-Romero e colaboradores identificaram dois novos compostos, derivados do resorcinol (XIV), a saber o 5-(11'(S)-hidroxi-8'-heptadecenil) resorcinol (XV) e o 5-(12'(S)-hidroxi-8',14'-heptadecadienil) (XVI), isolados da folha de *Stylogyne turbacensis* (Mirsinaceae). Os compostos apresentaram atividade leishmanicida a 7 e 3 μM, respectivamente. O composto 5-(12'(S)-hidroxi-8',14'-heptadecadienil) (XVI) apresentou ainda atividade sobre cepa resistente de *Trypanossoma cruzi*, com um IC₅₀ de 22 μM.



Yamagushi e colaboradores (1988) sintetizaram o 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila (D₃-9-P₃) a partir de dioxiacetais, na presença de perclorato de sódio e ácido acético (esquema 3). O composto foi ainda obtido sinteticamente por Douglas e Money em 1967, no mesmo estudo em que foi obtido o 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila (D₃-9-P₂). A hidrogenação catalítica da estilil dipirona conduziu à obtenção de seu derivado di-hidro - a feniletil dipirona. Esta, em reação com o hidróxido de potássio metanólico, deu origem a três compostos di-hidro- estilbenos, dentre eles o 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila (esquema 4).



Esquema 3: Obtenção, por síntese, do 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila a partir de dioxiacetais (Yamagushi *et al.*, 1988).



Esquema 4: Obtenção, por síntese, do 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila a partir da estiril dipirona (Douglas e Money, 1967).

Não foram encontrados relatos relacionados à atividade leishmanicida de dioxiacetais e seus derivados ou à feniletil dipirona. Tampouco foram encontrados, na literatura, relatos quanto à avaliação da atividade anti-*Leishmania* de dihidro-estilbenos. Entretanto, foi identificado um estudo em que dois di-hidro-estilbenos naturais, (3-(2-(7-metoxibenzo [d] [1,3] dioxol-5-il) etil) fenol e 6-(3-hidroxfeniletil) benzo [d] [1,3]dioxol-4-ol, isolados de *Bulbophyllum odoratissimum* (Orchidaceae) e com significativa toxicidade sobre linhagens celulares de câncer humanos, foram obtidos por via totalmente sintética (Zhang *et al.*, 2007).

A mesma observação quanto à obtenção de composto por via natural ou por síntese foi observado com o composto natural 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila, isolado previamente da planta *Boesenbergia rotunda*, pertencente à família Zingiberaceae e, neste estudo, isolado de *Renealmia alpinia*. Os rizomas de *Boesenbergia rotunda* são utilizados popularmente como condimento na Tailândia e também para tratamento de boca seca, desconfortos estomacais, dores de estômago, corrimento vaginal, disenterias, inflamações ou como diurético. Seus constituintes, dentre eles a pinocembrina, demonstraram efeitos

gastroprotetores contra lesões gástricas de mucosa induzidas por etanol ou indometacina, em estudos realizados com ratos (Morikawa *et al.*, 2008).

Morikawa e colaboradores (2008) demonstraram que o extrato metanólico dos rizomas de *Boesenbergia rotunda* inibe a citotoxicidade induzida por TNF- α em células L929, uma linhagem celular sensível à ação do TNF- α que, por sua vez é capaz de mediar numerosas formas de injúrias aos órgãos, em especial ao fígado, via indução de apoptose celular. Desse extrato os autores isolaram oito substâncias inéditas ((+)-krachaizina A, (-)-krachaizina A, (+)-krachaizina B, (-)-krachaizina B e rotundaflavonas Ia, Ib, IIa e IIb), além de outros dezoito constituintes conhecidos, dentre eles o 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila (Morikawa *et al.*, 2008).

Enquanto o extrato metanólico inibiu a citotoxicidade induzida por TNF- α nas células L929 em 24% a 3 $\mu\text{g/mL}$ e em 83% a 10 $\mu\text{g/mL}$, apresentando IC₅₀ de 6,1 g/mL , o 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila isolado inibiu em apenas 2% a 3 $\mu\text{g/mL}$ a citotoxicidade induzida por TNF- α . Assim, o 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila não foi considerado ativo e, portanto, não refere-se ao constituinte da planta responsável por sua atividade anti-inflamatória (Morikawa *et al.*, 2008).

A atividade desse mesmo extrato metanólico de *Boesenbergia rotunda* e de seus constituintes foi avaliada sobre a aminopeptidase N APN, uma metaloprotease dependente de Zn⁺ que desempenha importante papel na invasão tumoral, na degradação da matriz extracelular pelas células tumorais e na metástase tumoral e está também envolvida na angiogênese tumoral, constituindo-se como importante alvo terapêutico. Todos os constituintes do rizoma da planta demonstraram inibir significativamente a atividade da aminopeptidase entre 10-30 μM , sendo que os constituintes com melhor atividade mostraram inibição >50% a 30 μM . O 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila demonstrou

inibição de 19,9% a 10 μ M e de 22,8 % a 30 μ M. A curcumina, utilizada como composto de referência apresentou 13,3 % de inibição a 10 μ M e 31,9 % a 30 μ M (Morikawa *et al.*, 2008).

Quanto à atividade anti-*Leishmania*, os compostos 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila (D₃-9-P₂) e 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila (D₃-9-P₃) isolados de *Renealmia alpinia* neste estudo apresentaram-se menos ativos sobre as formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* que o extrato hexânico das folhas e pseudocaules da planta, apresentando um IC₅₀ >100 μ g/mL. Não são, portanto, os compostos responsáveis pela atividade anti-*Leishmania* da planta. Entretanto, como descrito, são compostos inéditos na espécie *Renealmia alpinia*.

O sub-grupo D₃-9, do qual foram isolados estes compostos, foi reavaliado quanto à atividade anti-*Leishmania*, após o isolamento das substâncias 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila (D₃-9-P₂) e 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila (D₃-9-P₃). Demonstrou alguma atividade até a concentração de 1,56 μ g/mL, com IC₅₀ de 25,23 μ g/mL apresentando, portanto, melhor atividade que quando continha D₃-9-P₂ e D₃-9-P₃, quando apresentou atividade até 6,25 μ g/mL.

O sub-grupo D₃-9-P₀ não teve sua atividade anti-*Leishmania* avaliada. O sub-grupo D₃-9-P₁, por sua vez, apresentou IC₅₀ de 23,7 μ g/mL.

Embora os compostos isolados não tenham demonstrado atividade sobre promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*, a espécie *Renealmia alpinia* apresenta outros grupos e sub-grupos com importante atividade, dentre eles AcOEt₂, com IC₅₀ de 7,12 μ g/mL, proveniente da primeira coluna, D₄, com IC₅₀ de 3,08 μ g/mL e D₅, com IC₅₀ de 17,81 μ g/mL, provenientes da segunda coluna e D₃-10, D₃-11 e D₃-16, com IC₅₀ de 49,94, 12,23 e 15,25 μ g/mL, respectivamente, provenientes da terceira coluna. Desta forma, permanece como promissora na busca por constituintes micromoleculares com atividade anti-*Leishmania*.

O extrato hexânico de folhas e pseudocaules de *Renealmia alpinia* foi novamente preparado, com obtenção de maior quantidade deste. Com isso, novos fracionamentos cromatográficos estão sendo realizados e permitirão a obtenção de maior quantidade dos grupos ativos. Estes grupos serão também fracionados a fim de se isolar e identificar os compostos responsáveis pela atividade anti-*Leishmania*. Tais estudos permitirão também conhecer melhor a composição química da espécie *Renealmia alpinia*, ainda pouco estudada.

As substâncias isoladas neste estudo (2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila e 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila), por sua vez, serão testadas em nosso próprio laboratório sobre outros modelos biológicos e irão compor o banco de substâncias puras do Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília, que são disponibilizados para testes biológicos variados após acordos de cooperação.

6. CONCLUSÕES

Uma triagem *in vitro* previamente realizada por nosso grupo de pesquisa identificou a atividade do extrato hexânico de folhas de *Renealmia alpinia* sobre *Leishmania amazonensis*, com um IC₅₀ de 40,58 µg/mL. Neste estudo, o extrato hexânico de folhas e pseudocaulis de *Renealmia alpinia* (Rottb.) Maas apresentou atividade sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*, com IC₅₀ de 22,81 µg/mL.

Considerando-se a atividade anti-*Leishmania* do extrato hexânico de folhas e pseudocaulis de *Renealmia alpinia*, a atividade anti-parasitária descrita na literatura para plantas da mesma família e considerando-se que ainda há pouca informação a respeito dessa espécie vegetal, em especial para o extrato hexânico, partiu-se para o seu fracionamento cromatográfico biomonitorado a fim de isolar os compostos responsáveis pela atividade anti-*Leishmania*.

O fracionamento químico biomonitorado, realizado com 3 g do extrato hexânico, possibilitou a obtenção de vinte e quatro grupos reunidos segundo a coloração das frações, que foram reorganizados em dezesseis novos grupos de acordo com o perfil cromatográfico e atividade anti-*Leishmania*. Os grupos D₃, D₄ e AcOEt₂ foram testados *in vitro* sobre *Leishmania (Leishmania) chagasi*. O grupo D₃, com IC₅₀ de 19,41 µg/mL, embora não tenha demonstrado a melhor atividade apresentou o melhor rendimento (0,8%) dentre os três, sendo eleito para prosseguimento do estudo. Um segundo fracionamento cromatográfico para obtenção de maior quantidade de D₃ foi realizado a partir do extrato hexânico das folhas e pseudocaulis de *Renealmia alpinia*.

O grupo ativo D₃ (1,3 g) obtido a partir da segunda coluna foi fracionado em coluna aberta de sílica gel. Deste fracionamento foram obtidos vinte e seis sub-grupos dentre os quais os mais ativos a 100 µg/mL foram D₃-8 – D₃-11 e D₃-16. O grupo D₃-9, com maior rendimento e alguma atividade anti-*Leishmania* até 6,25 µg/mL foi eleito, neste momento do

estudo, para ser analisado em HPLC. Foram obtidos quatro picos cromatográficos majoritários (D₃-9-P₀, D₃-9-P₁, D₃-9-P₂ e D₃-9-P₃). Destes, D₃-9-P₂ e D₃-9-P₃, correspondem às substâncias 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila e 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila, respectivamente, identificadas por técnicas de espectroscopia de RMN de uma dimensão (¹H e ¹³C) e bidimensionais (HSQC, HMBC e COSY) e de infravermelho (FT-IV). Tais substâncias não foram ativas sobre *Leishmania (Leishmania) chagasi*, apresentando um IC₅₀ >100 µg/mL. Entretanto, até onde conhecemos, ambas são inéditas na espécie *Renealmia alpinia*, cuja composição química é pouco conhecida e seus dados de RMN de 1D (¹³C) e 2D (HSQC, HMBC e COSY) são também inéditos.

Dados da literatura demonstram que a substância 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila já foi obtida previamente, porém apenas sinteticamente. A substância 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila, por sua vez, foi isolada previamente, como produto natural, dos rizomas de *Boesenbergia rotunda* (Zingiberaceae) e foi obtida também por síntese.

Após isolamento das substâncias acima, o sub-grupo D₃-9 apresentou-se ativo até a concentração de 1,56 µg/mL. O IC₅₀ calculado para o sub-grupo D₃-9 sem os quatro picos isolados foi de 25,23 µg/mL e, desta forma, este sub-grupo permanece promissor na busca de substâncias com atividade anti-*Leishmania* que possam constituir-se em alternativas ao tratamento das leishmanioses.

Da mesma forma, o grupo D₄, com IC₅₀ de 3,08 µg/mL, entretanto obtido em pequena quantidade neste estudo e os sub-grupos D₃-11 e D₃-16, com IC₅₀ 12,23 µg/mL e 15,05 µg/mL, são promissores para estudos futuros que possam conduzir ao isolamento e identificação de substâncias com atividade anti-*Leishmania*. Estudos com os sub-grupos D₅, que apresentou IC₅₀ de 17,81 µg/mL, D₃-10, com IC₅₀ de 49,94 µg/mL e D₃-9-P₁, com IC₅₀ de 23,7 µg/mL também podem conduzir a resultados interessantes.

7. PERSPECTIVAS

- Prosseguir o fracionamento químico do subgrupo D₃-9 (obtido a partir do fracionamento do grupo ativo D₃), após isolamento dos compostos 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila e 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila, a fim de isolar os compostos responsáveis pela atividade anti-*Leishmania*.
- Prosseguir o estudo químico com D₄, obtido a partir do fracionamento do extrato hexânico de folhas e pseudocaules de *Renealmia alpinia*, bem como com D₃-11 e D₃-16, obtidos a partir do fracionamento do grupo ativo D₃, a fim de isolar os compostos responsáveis pela atividade anti-*Leishmania*.
- Prosseguir o fracionamento químico do subgrupo D₃-9-P₁, obtido a partir da análise em HPLC do sub-grupo D₃-9, a fim de isolar os compostos responsáveis pela atividade anti-*Leishmania*.
- Elucidar a estrutura do(s) composto(s) anti-*Leishmania* por técnicas espectrométricas de ressonância magnética nuclear (RMN) de uma dimensão (1D) (¹H e ¹³C) e bidimensional (COSY, HSQC, HMBC, NOESY), infra-vermelho, ultra-violeta e espectrometria de massa
- Obter o IC₅₀ dos compostos ativos
- Avaliar os compostos ativos sobre outras espécies de *Leishmania*, a fim de verificar a sensibilidade intrínseca das espécies aos constituintes micromoleculares de *Renealmia alpinia* com atividade anti-*Leishmania*
- Avaliar a atividade dos compostos ativos sobre promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* sobre amastigotas axênicos de *Leishmania (Leishmania) chagasi* e de outras espécies causadoras de leishmaniose
- Determinar a citotoxicidade dos compostos ativos

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: diagnóstico clínico e diferencial**. 1. ed. Brasília- DF: Editora MS, 2006. 136 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. Brasília-DF: Editora MS, 2007. 181 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1. ed. Brasília-DF: Editora MS, 2006. 120 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose Visceral Grave – Normas e Condutas**. Brasília-DF: Editora MS, 2005. 52 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Manual de Recomendações para Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento da Co-infecção Leishmania-HIV**. Brasília-DF: Editora MS, 2004. 72 p.

_____. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 5. ed. Brasília-DF: Editora MS, 2000. 62p.

AGGARWAL, B. B.; KUNNUMAKKARA, A. B.; HARIKUMAR, K. B.; THARAKAN, S. T.; SUNG, B.; ANAND, P. Potencial of spice-derived phytochemicals for cancer prevention. **Plant Medicine**, v. 74, n. 13, p. 1560-1569, 2008.

AHUA, K. M.; IOSET, J. R.; IOSET, K. N.; DIALLO, D.; MAUËL, J.; HOSTETTMANN, K. Antileishmanial activities associated with plants used in the Malian traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 99-104, 2007.

ALI, B. H.; BLUNDEN, G.; TANIRA, M. O.; NEMMAR, A. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 409-420, 2008.

ALI, M. S.; BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Antiproliferative activity of diarylheptanoids from the seeds of *Alpinia blepharocalyx*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 5, p. 525-528, 2001.

ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 3, p. 10-15, 2001.

ALVES, L.V.; TEMPORAL, R.M.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.. LEON, L.L. Efficacy of a diarylheptanoid derivative against *Leishmania amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 553-555, 2003.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F.; JÚNIOR, A. S.; ZANI, C. L. Biological screening of brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.

AMATO, V. S.; TUON, F. F.; BACHA, H. A.; NETO, V. A., NICODEMO, A. C. Mucosal leishmaniasis: current scenario prospects for treatment. **Acta Tropica**, v. 105, p. 1-9, 2008.

ANDRADE, S. F.; CARDOSO, L. G. V.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 464-471, 2007.

ANSARI, N. A.; RAMESH, V.; SALOTRA, P. Case Report: Immune response following miltefosine therapy in a patient with post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. In press. doi:10.1016/j.trstmh.2008.05.015, 2008.

ANTINORI, S.; CASCIO, A.; PARRAVICINI, C.; BIANCHI, R.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, p. 191-199, 2008.

ANTONIADOU, A.; DUPONT, B. Lipid formulations of amphotericin B: where are we today? **Journal de Mycologie Medicale**, v. 15, p. 230-238, 2005.

ANTUNES, A. F. **Atividade inibitória de extratos vegetais do Cerrado sobre alfa-amilases**. Dissertação de Mestrado. Brasília, 2008. 96p.

ARAÚJO, 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.; CUENTAS, A. L. Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of Imiquimod, an immunomodulator. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p.1847-1851, 2001.

ASHUTOSH; SUNDAR, S.; GOYAL, N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 143-153, 2007.

BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Imunopatogênese da leishmaniose visceral. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, p. 24-34,2005.

BAGINSKI, M.; RESAT, H.; BOROWSKI, E. Comparative molecular dynamics simulations of amphotericin B–cholesterol/ergosterol membrane channels. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1567, p. 63-78, 2002.

BASSELIN, M.; BADET-DENISOT, M. A.; LAWRENCE, F.; ROBERT-GERO, M. Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild-type pentamidine treated and pentamidine-resistant *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v. 85, p. 274-282, 1997.

BASSO, L. A.; SILVA, L. H. P.; FETT-NETO, A. G.; JUNIOR, W. F. A.; MOREIRA, I. S.; PALMA, M. S.; CALIXTO, J. B.; FILHO, S. A.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, D. S. 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**, v. 100, n. 6, p. 575-606, 2005.

BECERRA, J. A. B.; ALVALÁ, R. C. S. Detection of tropical savannah (Cerrado) physiognomies in the legal Amazon by the application of the vegetation and moisture indices with modis time series data. **Proceedings of 8 ICSHMO**, p. 861-868, 2006.

BERMAN, J.; BRYCESON, A. D. M.; CROFT, S.; ENGEL, J.; GUTTERIDGE, W.; KARBWANG, J.; SINDERMAN, H. SOTO, J.; SUNDAR, S.; URBINA, J. A. Miltefosine: issues to be addressed in the future. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100S, p. S41-S44, 2006.

BERMAN, J.D. Chemotherapy of leishmaniasis: recent advances in the treatment of visceral disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 11, p. 707-710,1998.

BEZERRA, A. M. R.; SILVA JR., N. J.; MARINHO-FILHO, J. The amazon bamboo rat *Dactylomys dactylinus*(Rodentia: Echimydae: Dactylomyinae) in the cerrado of central Brazil. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 1, p. 235-237, 2007.

BILLO, M.; FOURNET, A.; CABALION, P.; WAIKEDRE, J.; BORIES, C. ; LOISEAU, P.; PRINA, E.; ROJAS, DE ARIAS, A.; YALUFF, G.; FOURNEAU, C.; HOCQUEMILLER, R. Screening of New Caledonian and Vanuatu medicinal plants for antiprotozoal activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 569-575, 2005.

BORASCHI, C. S. S.; PERRI, S. H. V.; NUNES, C. M. Leishmaniose visceral: o que a população de Três Lagoas, MS, Brasil, sabe sobre esta enfermidade? **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 3, p. 478-485, 2008.

BORIES, C.; COJEAN, S.; HUTEAU, F.; LOISEAU, P. M. Selection and phenotype characterisation of sitamaquine-resistant promastigotes of *Leishmania donovani*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, p. 164-167, 2008.

BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; MATOS, O. M.; MOREIRA, FRANCIS, O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p.396-402, 2007.

BRENDLE, J.; OUTLAW, A.; KUMAR, A.; BOYKIN, D. W.; PATRICK, D. A.; TIDWELL, R. R.; WERBOVETZ, K. A. Activities of several classes of aromatic dications. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 797-807, 2002.

BRENZAN, M. A.; NAKAMURA, C. V. ; FILHO, B. P. D.; UEDA-NAKAMURA, T.; YOUNG, M. C.; CORTEZ, D. A. G. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, v. 101, p. 715-722, 2007.

CARRANZA-TAMAYO, C. O.; ASSIS, T. S. M.; NERI, A. T. B.; CUPOLILLO, E.; RABELLO, A.; ROMERO, G. A. S. Prevalence of *Leishmania* infection in adult HIV/AIDS patients treated in a tertiary-level care center in Brasilia, Federal District, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. In press. doi: 10.1016/j.trstmh.2009.01.014, 2009.

CHAN-BACAB, M. J.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 674-688, 2001.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. S7-S16, 2007.

CHEN, I.; CHANG, C.; NG, C.; WANG, C.; SHYU, Y.; CHANG, T. Antioxidant and antimicrobial activity of Zingiberaceae plants in Taiwan. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 63, p. 15-20, 2008.

CHIEN, T. Y.; CHEN, L. G.; LEE, C. J.; LEE, F. Y.; WANG, C. C. Anti-inflammatory constituents of *Zingiber zerumbet*. **Food Chemistry**, v. 110, p. 584-589, 2008.

CHOUDHURY, K.; ZANDER, D.; KUBE, M.; REINHARDT, R.; CLOS, J. Identification of a *Leishmania infantum* gene mediating resistance to miltefosine and Sb^{III}. **International Journal for Parasitology**. In press. doi:10.1016/j.ijpara.2008.03.005, 2008.

COE, F. G. Rama midwifery in eastern Nicaragua. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 136-157, 2008.

COELHO A. A. M.; DE PAULA J. E.; ESPINDOLA, L. S. Insecticidal activity of Cerrado plant extracts on *Rhodnius milesi* Carcavallo, Rocha, Galvão & Jurberg (Hemiptera: Reduviidae), under laboratory conditions. **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 1, p.133-138, 2006.

COELHO, A. C.; GENTIL, L. G.; DA SILVEIRA, J. F.; COTRIM, P. C. Characterization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine. **Experimental Parasitology**, v. 120, p. 98-102, 2008.

COHEN, B. E. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 162, p. 95-106, 1998.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro. **Imprensa Nacional**, v. 5, 1984. 626p.

COSTA, J. F. O.; KIPERSTOK, A. C.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L. P.; DOS SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. Anti-leishmanial and immunomodulatory activities of extracts from *Portulaca hirsutissima* and *Portulaca werdermannii*. **Fitoterapia**, v. 78, p. 510-514, 2007.

COUTINHO, L. M. **Aspectos do Cerrado**. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Ecologia. Disponível em <http://eco.ib.usp.br/cerrado/aspectos_bioma.htm>. Acesso em 02 nov. 2008.

CROFT, S. L.; BARRET, M. P.; URBINA, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 508-512, 2005.

CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 123, p. 399-410, 2006.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

CROFT, S. L.; YARDLEY, V.; KENDRICK, H. Drug sensitivity of *Leishmania* species: some unresolved problems. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 1, p. S1/127-S1/129, 2002.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, p. 131-141, 2002.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 352-356, 2006.

DAVIDSON, R. N.; DEN BOER, M.; RITMEIJER, K. Paromomycin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. In press. doi:10.1016/j.trstmh.2008.09.008, 2008.

DE MARCOS, J. A. G.; FERRER, A. D.; GRANADOS, F. A.; MASERA, J. J. R.; RODRÍGUEZ, B. C.; JIMÉNEZ, A. V.; LAINEZ, A. G.; RODRÍGUEZ-MANCHEÑO, A. L. Localized leishmaniasis of the oral mucosa. A report of three cases. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v.12, p. E281-286, 2007.

DE MOURA, F. J. D.; LEAL, P. P.; FURTADO, R. S.; MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I.; VEIGA, J. P. R. Pentoxifylline prevents the meglumine antimonate-induced renal toxicity in rats, but not that induced by the inorganic antimony pentachloride. **Toxicology**, v. 243, p. 66-74, 2008.

DE MOURA, M. A. B. F. **Atividade antitumoral de nitroquinona derivada da nor-β-lapachona. Contribuição da farmacoeletroquímica na pesquisa do mecanismo de ação de novos fármacos.** Maceió, 2008. 189p.

DE OLIVEIRA, C. I.; TEIXEIRA, M. J.; GOMES, R.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C. Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. **Drug Discovery Today: Disease Models/Infectious Diseases**, v. 1, n. 1, p. 81-86, 2004.

DE PAULA, C. D. R.; SAMPAIO, J. H. D.; CARDOSO, D. R.; SAMPAIO, R. N. R. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mgSbV/kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 365-371, 2003.

DE QUEIROZ, M. J. A. **Fatores prognósticos associados ao óbito por leishmaniose visceral (Calazar) em crianças internadas no Instituto Materno Infantil de Pernambuco.** Dissertação de Mestrado. Recife, 2002. 130p.

DESJEUX, P. Global control and *Leishmania*-HIV co-infection. **Clinics in Dermatology**, v. 17, p. 317-325, 1999.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, p. 305-318, 2004.

DE SOUZA, L. S.; MELO, M. R. S.; CHAMON, C. C. A new species of *Hermiancistrus* from the rio Araguaia basin, Goiás state, Brazil (siluriformes: Loricariidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 6, n. 3, p. 419-424, 2008.

DESRIVOT, J.; WAIKEDRE, J.; CABALION, P.; HERRENKNECHT, C.; BORIES, C.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. Antiparasitic activity of some New Caledonian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 1, p. 7-12, 2007.

DIETZE, R.; CARVALHO, S. F. G.; WALLI, C.; BERMAN, J.; BREWER, T.; MILHOUS, W.; SANCHEZ, J.; SCHUSTER, B.; GROGL, M. Phase 2 trial of Wr6026, an orally administered 8-aminoquinoline, in the treatment of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, p. 685-689, 2001.

DINIZ-FILHO, J. A. F.; BINI, L. M.; VIEIRA, C. M.; BLAMIRE, D.; TERRIBILE, L. C. BASTOS, R. P.; DE OLIVEIRA, G.; DE SOUZA, B. Spatial patterns of terrestrial vertebrate species richness in the Brazilian Cerrado. **Zoological Studies**, v. 47, n 2, p. 146-157, 2008.

DOUGLAS, J. L.; MONEY, T. Pyrone Studies – II. Bioenergetic-type synthesis of phenolic compounds. **Tetrahedron**, v. 23, p. 3545-3555, 1967.

DUEÑAS-ROMERO, A. M.; LOISEAU, P. M.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M. Interaction of sitamaquine with membrane lipids of *Leishmania donovani* promastigotes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 246-252, 2007.

DUKER-ESHUN, G.; JAROSZEWSKI, J. W.; ASOMANING, W. A.; OPPONG-BOACHIE, F.; OLSEN, C. E.; CHRISTENSEN, S. B. Antiplasmodial activity of labdanes from *Aframomum latifolium* and *Aframomum sceptrum*. **Planta Medica**, v. 68, p. 642-644, 2002.

EDREVA, A.; VELIKOVA, V.; TSONEZ, T.; DAGNON, S.; GÜREL, A.; AKTAŞ, L.; GESHEVA, E. Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. **General and Applied Plant Physiology**, Special Issue, v. 34, n. 1-2, p. 67-78, 2008.

EL-SAFI, S.; KHEIR, M. M.; BUCHETON, B.; ARGIRO, L.; ABEL, L.; DEREURE, J.; DEDET, J. P.; DESSEIN, A. Genes and environment in susceptibility to visceral leishmaniasis. **Comptes Rendus Biologies**, v. 329, p. 863-870, 2006.

EPHROS, M.; BITNUN, A.; SHAKED, P.; WALDMAN, E.; ZILBERSTEIN, D. Stage specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 43, p. 278-282, 1999.

ESPINDOLA, L. S. Cerrado: Fonte de descoberta de novos medicamentos. **Brasília Médica**, v. 44, p. 193-198, 2007.

ESPINDOLA, L. S.; VASCONCELOS JUNIOR, J. R.; MESQUITA, M. L.; MARQUIÉ, P.; DE PAULA, J. E.; MAMBU, L.; SANTANA, J. M. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. **Planta Medica**, v. 70, p. 1093-1095, 2004.

ESTEVEZ, Y.; CASTILLO, D.; PISANGO TANGO, M.; AREVALO, J.; ROJAS, R.; ALBAN, J.; DEHARO, E.; BOURDY, G.; SAUVAIN, M. Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita ethnic group. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 2, p. 254-259, 2007.

FABRI, R. L.; NOGUEIRA, M. S.; BRAGA, F. G.; COIMBRA, E. S.; SCIO, E. *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial and antioxidant effects. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 428-433, 2009.

FERREIRA, J. H. L.; GENTIL, L. G.; DIAS, S. S.; FEDELI, C. E. C.; KATZ, S.; BARBIÉRI, C. L. Immunization with the cysteine proteinase Ldcccys1 gene from *Leishmania (Leishmania) chagasi* and the recombinant Ldcccys1 protein elicits protective immune responses in a murine model of visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 26, p. 677-685, 2008.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 167-194, 2006.

FRÉZARD, F.; MARTINS, P. S.; BARBOSA, M. C. M.; PIMENTA, A. M. C. P. New insights into the chemical structure and composition of the pentavalent antimonial drugs, meglumine antimonite and sodium stibogluconate. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, p. 656-665, 2008.

FRIEDRICH, K. **Estudos da cinética do antimônio e alterações de citocromos P450 hepáticos em primatas e ratos tratados com antimoníato de meglumina**. Tese de Doutorado em Saúde Pública. Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

GBIF – Global Biodiversity Information Facility, **Sinónímias para *Renealmia alpinia* (Rottb.) Maas**. Disponível em < <http://data.gbif.org/species/13761908/>>. Acesso em 5 mar. 2009.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GREVELINK, S. A.; LERNER, E. A. Leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 34, n. 2, p. 257-272, 1996.

GRZANNA, R.; LINDMARK, L.; FRONDOZA, C.G. Ginger-an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, n. 2. p. 125-132, 2005.

HABIB, S. H. M.; MAKPOL, S.; HAMID, N. A. A.; DAS, S.; NGAH, W. Z. W.; YUSOF, Y. A. M. Gingerextract (*Zingiber officinale*) has anti-cancer and anti-inflammatory effects on ethionine-induced hepatoma rats. **Clinics**, v. 63, n. 6, p. 807-813, 2008.

HARRIS, T. M.; CARNEY, R. L. Synthesis of 3,5,7-triketo acids and esters and their cyclizations to resorcinol and phloroglucinol derivatives. Models of biosynthesis of phenolic compounds. **Journal of the American Chemical Society**, v. 89, n. 25, p. 6734-6741, 1967.

HATCHER, H.; PLANALP, R.; TORTI, F. M.; TORTI, S. V. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 1631-1652, 2008.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 354, p. 1191-1198, 1999.

HIRUMA-LIMA, C. A.; SANTOS, L. C.; KUSHIMA, H.; PELLIZZON, C. H.; SILVEIRA, G. G.; VASCONCELOS, P. C. P.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A. R. M. *Qualea grandiflora*, a Brazilian “Cerrado” medicinal plant presents an important antiulcer activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 207-214, 2006.

IBRAHIM, H.; AZIZ, A. N.; SYAMSIR, D. R.; ALI, N. A. M.; MOHTAR, M.; ALI, R. M.; AWANG, K. Essential oils of *Alpinia conchigera* Griff. and their antimicrobial activities. **Food Chemistry**, v.113, n.2, p. 575-577, 2009.

IPNI- The International Plant Names Index, **Plant Name Details**. Disponível em < http://www.ipni.org/ipni/idPlantNameSearch.do?id=218583-2&back_page=%2Fipni%2FeditSimplePlantNameSearch.do%3Ffind_wholeName%3DRenealmia%2Balpinia%26output_format%3Dnormal <http://data.gbif.org/species/13761908/>>. Acesso em 5 mar. 2009.

ITOKAWA, H.; SHI, Q.; AKIYAMA, T.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; LEE, K. Recent advances in the investigation of curcuminoids. **Chinese Medicine**, v. 3, n. 11, p. 1-13, 2008.

ITO, K.; NAKAZATO, T.; MURAKAMI, A.; YAMATO, K.; MIYAKAWA, Y.; YAMADA, T.; HOZUMI, N.; OHIGASHI, H.; IKEDA, Y.; KIZAKI, M. Induction of apoptosis in human myeloid leukemic cells by 1-acetoxychavicol acetate through a mitochondrial and Fas-mediated dual mechanism. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 2120-2130, 2004.

JAGETIA, G. C.; AGGARWAL, B. B. “Spicing Up” of the immune system by curcumin. **Journal of Clinical Immunology**, v. 27, n. 1, p. 19-35, 2007.

JATOI, S. A.; KIKUCHI, A.; GILANI, S. A.; WATANABE, K. N. Phytochemical, pharmacological and ethnobotanical studies in mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.; Zingiberaceae). **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 6, p. 507-516, 2007.

JAYAPRAKASHA, G. K.; RAO, L. J. M.; SAKARIAH, K.K. Chemistry and biological activities of *C. longa*. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 533-548, 2005.

JHA, T. K. Drug unresponsiveness & combination therapy for kala-azar. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 123, p. 389-398, 2006.

JHA, T. K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C. P.; BACHMANN, P.; KARBWANG, J.; FISHER, C.; VOSS, A.; BEMAN, J. Miltefosine, an oral agent for the treatment of Indian Visceral Leishmaniasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 1795-1800, 1999.

JHA, T. K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C. P.; FELTON, J. M.; SABIN, A. J.; HORTON, J. A. phase II dose-ranging study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in India. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, p. 1005-1011, 2005.

JHINGRAN, A.; CHAWLA, B.; SAXENA, S.; BARRETT, M. P.; MADHUBALA, R. Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. **Molecular & Biochemical Parasitology**. In press. doi:10.1016/j.molbiopara.2008.12.007, 2009.

JIMÉNEZ-ROMERO, C.; TORRES-MENDOZA, D.; UREÑA GONZÁLEZ, L. D.; ORTEGA-BARRÍA, E.; MCPHAIL, K. L.; GERWICK, W. H.; CUBILLA-RIOS, L. Hydroxyalkenylresorcinols from *Stylogyne turbacensis*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 8, p. 1249-1252, 2007.

KAFÉTZIS, D. A.; VELISSARIOUA, I. M.; STABOULIA, S.; MAVRIKIOUB, M.; DELISB, D.; LIAPIA, G. Treatment of paediatric visceral leishmaniasis: amphotericin B or pentavalent antimony compounds? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, p. 26-30, 2005.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro-RJ: Editora Guanabara Koogan, 2003. 1054p.

KEDZIERSKI, L; CURTIS, J. M.; KAMINSKA, M.; JODYNIS-LIEBERT, J.; MURIAS, M. In vitro antileishmanial activity of resveratrol and its hydroxylated analogues against *Leishmania major* promastigotes and amastigotes. **Parasitology Research**, v. 102, p. 91-97, 2007.

KHAMESIPOUR, A.; DAVOUDI, N.; MABOUDI, F.; MODABBER, F. Leishmaniasis vaccine candidates for development: A global overview. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 123, p. 423-438, 2006.

KHAN, N.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 3, p. 476-513, 2008.

KIRANA, C.; McINTOSH, G. H.; RECORD, I. R.; JONES, G. P. Antitumor activity of extract of *Zingiber aromaticum* and its bioactive sesquiterpenoid zerumbone. **Nutrition and Cancer**, v. 45, n. 2, p. 218-225, 2003.

KLIN, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, p. 147-155, 2005.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v. 4, p. 206-220, 2005.

KOIDE, T.; NOSE, M.; OGIHARA, Y.; YABU, Y.; OHTA, N. Leishmanicidal effect of curcumin *in vitro*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 1, p. 131-133, 2002.

KOTHARI, H.; KUMAR, P.; SUNDAR, S.; SINGH, N. Possibility of membrane modification as a mechanism of antimony resistance in *Leishmania donovani*. **Parasitology International**, v. 56, p. 77-80, 2007.

KUMAR, V.; MAHAJAN, A.; CHIBALE, K. Synthetic medicinal chemistry of selected antimalarial natural products. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. In press. doi:10.1016/j.bmc.2008.10.072, 2009.

LEANDRO, C.; CAMPINO, L. Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, p. 352-357, 2003.

LEE, H. J.; KIM, J. S.; RYU, J. H. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression by diarylheptanoids from *Alpinia officinarum*. **Planta Medica**, v. 72, n. 1, p. 68-71, 2006.

LEE, H. S.; SEO, E. Y.; KANG, N. E.; KIM, W. K. [6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, p. 313-319, 2008.

LEE, Y.; KANG, O.; CHOI, J.; OH, Y.; CHAE, H.; KIM, J. H.; PARK, H.; SOHN, D. H.; WANG, Z.; KWON, D. Synergistic effects of the combination of galangin with gentamicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 283-288, 2008.

LEITE, G. L. D.; VELOSO, R. V. S.; ZANUNCIO, J. C.; FERNANDES, L. A.; ALMEIDA, C. I. M. Phenology of *Caryocar brasiliense* in the Brazilian cerrado region. **Forest Ecology and Management**, v. 236, p. 286-294, 2006.

LIESE, J.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. **Immunobiology**, v. 213, p. 377-387, 2008.

LIMA, R. C. **Limonóide de *Guarea kunthiana* com potencial leishmanicida**. Dissertação de Mestrado. Brasília, 2006. 77p.

LIU, Y.; WANG, M. W. Botanical drugs: challenges and opportunities. Contributions to Linnaeus Memorial Symposium 2007. **Life Sciences**, v. 82, p. 445-449, 2008.

LOURENÇO, M. V. Biotecnologia de plantas medicinais: produção de biomoléculas. **Biológico**, v. 65, n. 1/2, p. 63-65, 2003.

MAAS, P. J. M.; MAAS-VAN DE KAMER, H. Zingiberaceae Lindl. In: W.D. Stevens, C. Ulloa-Ulloa, A. Pool & O.M. Montiel (eds.), Flora de Nicarágua. **Monographs in Systematic Botany from The Missouri Botanical Garden**, v. 85, n. 3, p. 2549-2554, 2001.

MAAS, P. J. M. Zingiberaceae. In: R.A. Howard (ed.), **Flora of the Lesser Antilles**, v. 3, p. 524-539, 1979.

MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; DE CASTRO, S. L. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 73-77, 2007.

MACHADO, R. B.; NETO, M. B. R.; PEREIRA, P. G. P.; CALDAS, E. F.; GONÇALVES, D. A.; SANTOS, N. S.; TABOR, K.; STEININGER, M. Estimativas da perda da área do Cerrado Brasileiro. **Relatório Conservação Internacional**, p. 1-23, 2004.

MACIA, M. J. *Renalmia alpinia* (Rottb.) Maas (Zingiberaceae): planta comestible de la sierra norte de Puebla (México). **Anales Jardín Botánico de Madrid**, v. 60, n. 1, p. 183-187, 2003.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALVES, W. A.; SOUZA-GOMES, M. L.; SENA, J. M.; LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Caderno Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 24, n. 12, 2008.

MARQUES, N.; CABRAL, S.; SÁ, R.; COELHO, F.; OLIVEIRA, J.; SARAIVA DA CUNHA, J. G.; MELIÇO SILVESTRE, A. Leishmaniose visceral e infecção por vírus da imunodeficiência humana: Na era da terapêutica anti-retrovírica de alta eficácia. **Acta Médica Portuguesa**, v. 20, p. 291-298, 2007.

MAYACHIEW, P.; DEVAHASTIN, S. Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 1153-1159, 2008.

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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 783-787, 2005.

MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; BLOND, A.; BROUARD, J.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S.; MAMBU, L. New ether diglycosides from *Matayba guianensis* with antiplasmodial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.13, p. 4499-4506, 2005.

MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. *In vitro* antiplasmodial activity of brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p. 165-170, 2007.

MONTEIRO, E. M.; DA SILVA, J. C. F.; DA COSTA, R. T.; COSTA, D. C.; BARATA, R. A.; DE PAULA, E. V.; LINS, G. L.; COELHO, G. M.; ROCHA, M. F.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n.2, p.147-152, 2005.

MONTEIRO, W. M.; NEITZKE, H. C.; LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V.; FERREIRA, M. E. M. C.; TEODORO, U. Distribuição geográfica e características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em áreas de colonização antiga do Estado do Paraná, Sul do Brasil. **Caderno Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 24, n. 6, p. 1291-1303, 2008.

MORIKAWA, T.; FUNAKOSHI, K.; NINOMIYA, K.; YASUDA, D.; MIYAGAWA, K.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M. Structures of new phenylchalcones and prenylflavones with TNF- α and aminopeptidase N inhibitory activities from *Boesenbergia rotunda*. **Medicinal Foodstuffs. XXXIV**, v. 56, n.7, p. 956-962, 2008.

MOSLEH, I. M.; GEITH, E.; NATSHEH, L.; ABDUL-DAYEM, M.; ABOTTEEN, N. Cutaneous leishmaniasis in the Jordanian side of the Jordan Valley: severe under-reporting and consequences on public health management. **Tropical Medicine & International Health**, v. 13, n.6, p. 855-860, 2008.

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

NAMDEO A. G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, n. 1, p. 69-80, 2007.

NASCIMENTO, W. G. **Efeito da somatotropina bovina recombinante (rBST) no desempenho, digitabilidade e aspectos hematológicos e metabólicos do sangue de novilhas (1/2 Nelore x 1/2 Red Angus) em confinamento**. Dissertação de Mestrado. Maringá, 2002. 58 p.

NICOLL, R.; HENEIN, M. Y. Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A hot remedy for cardiovascular disease? **International Journal of Cardiology**, v. 131, n. 3, p. 408-409, 2009.

NORAJIT, K.; LAOHAKUNJIT, N.; KERDCHOECHUEN, O. Antibacterial effect of five Zingiberaceae essential oils. **Molecules**, v. 12, n. 8, p. 2047-2060, 2007.

NÚÑEZ, V.; OTERO, R.; BARONA, J.; SALDARRIAGA, M.; OSÓRIO, R. G.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S. L.; DÍAZ, A.; QUINTANA, J. C. Neutralization of the edema-forming, defibrinating and coagulant effects of *Bothrops asper* venom by extracts of plants used by healers in Colombia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 7, p. 969-977, 2000.

OKPEKON, T.; YOLOU, S.; GLEYE, C.; ROBLLOT, F.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; GRELLIER, P.; FRAPPIER, F.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. Antiparasitic activities of medicinal plants used in Ivory Coast. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 1, p. 91-97, 2004.

OLIVEIRA, C. A.; ALVES, V. M. C.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; SCOTTI, M. R.; CARNEIRO, N. P.; GUIMARÃES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; SÁ, N. M. H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, p. 1-6, 2008.

ORDÓÑEZ-GUTIÉRREZ, L.; ESPADA-FERNÁNDEZ, R.; DEA-AYUELA, M. A.; TORRADO, J. J.; BOLÁS-FERNANDEZ, F.; ALUNDA, J. M. In vitro effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 325-329, 2007.

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

PALUMBO, E. Oral miltefosine treatment in children with visceral leishmaniasis: a brief review. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 2-4, 2008.

PANDEY, K.; SINHA, P. K.; RABIDAS, P.; KUMAR, N.; BIMAL, S.; VERMA, N.; LAL, C.; DAS, P. HIV, visceral leishmaniasis and Parkinsonism combined with diabetes mellitus and hyperuricaemia: A case report. **Cases Journal**, v. 1, n. 1, p. 183, 2008.

PARIS, C.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; BRÉARD, J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 852-859, 2004.

PINHEIRO, R. O. Leishmaniose tegumentar americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. **Infarma**, v. 16, n. 7-8, p. 79-82, 2004.

PINHEIRO, R. O.; ROSSI-BERGMANN, B. Interferon-gamma is required for the late but not early control of *Leishmania amazonensis* infection in C57Bl/6 mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 79-82, 2007.

PISCOPO, T. V.; MALLIA, A. C. Leishmaniasis. **Postgraduate Medical Journal**, v.82, p. 649-657, 2006.

PIVELO, V. R. **Invasões biológicas no Cerrado brasileiro: efeitos da introdução de espécies exóticas sobre a biodiversidade**. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Ecologia Geral. Disponível em <<http://www.ecologia.info/cerrado.htm>>. Acesso em 02 nov. 2008.

POURAHMAD, M.; HOOSHMANN, F.; RAHIMINEJAD, M. Cutaneous leishmaniasis associated with visceral leishmaniasis in a case of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **International Journal of Dermatology**, v. 48, p. 59-61, 2009.

RABELO, A.; ORSINI, M.; DISCH, J. Leishmania/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 97, n.1, p. 17-28, 2003.

RASHID, J. R.; NYAKUNDI, P. M.; KIRIGI, G.; KINOTI, D.; WASUNNA, M. K. Compassionate use of sitamaquine in an HIV-positive patient with visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p.533-534, 2002.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; DE JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n.4, p. 550-555, 2003.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C., LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, p. 581-596, 2007.

RIJAL, S.; YARDLEY, V.; CHAPPUIS, F.; DECUYPERE, S.; KHANAL, B.; SINGH, R.; BOELAERT, M.; DE DONCKER, S.; CROFT, S.; DUJARDIN, J. C. Antimonial treatment of visceral leishmaniasis: are current in vitro susceptibility assays adequate for prognosis of in vivo therapy outcome? **Microbes and Infection**, v. 9, p. 529-535, 2007.

RINGMAN, J. M.; FRAUTSCHY, S. A.; COLE, G. M.; MASTERMAN, D. L.; CUMMINGS, J. L. A potential role of the curry spice curcumin in Alzheimer's. **Current Alzheimer Research**, v. 2, n. 2, p. 131-136, 2005.

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

RODRIGUES, A. M. S.; DE PAULA, J. E.; DEGALLIER, N.; MOLEZ, J.; ESPINDOLA, L. S. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, n. 2, p. 314-317, 2006.

RODRIGUES, A. M. S.; DE PAULA, J. E.; ROBLLOT, F.; FOURNET, A.; ESPINDOLA, L. S. Larvicidal activity of *Cybistax antisyphilitica* against *Aedes aegypti* larvae. **Fitoterapia**, v. 76, p. 755-757, 2005.

SALDANHA, A. C. R.; ROMERO, G. A. S.; GUERRA, C.; MERCHAN-HAMANN, E.; MACEDO, V. O. Estudo comparativo entre estibogluconato de sódio BP 88[®] e antimoniato de meglumina no tratamento da leishmaniose cutânea II. Toxicidade bioquímica e cardíaca. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 4, p. 383-388, 2000.

SALEHEEN, D.; ALI, S.A.; ASHFAQ, K.; SIDDIQUI, A. A.; AGHA, A.; YASINZAI, M. M. Latent activity of curcumin against leishmaniasis *in vitro*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 3, p. 386-389, 2002.

SANTOS, A. G. **A família Zingiberaceae no Estado do Pará: estágio atual do conhecimento sobre ocorrência, usos e óleos essenciais**. 13^o Seminário de Iniciação Científica (PIBIC): O saber como estratégia de vida e o desenvolvimento da Amazônia. Livro de resumos, 2005.

SANTOS, D. O.; COUTINHO, C. E. R.; MADEIRA, M. F.; BOTTINO, C. G.; VIEIRA, R. T.; NASCIMENTO, S. B.; BERNARDINO, A.; BOURGUIGNON, S. C.; CORTE-REAL, S.; PINHO, R. T.; RODRIGUES C. R.; CASTRO, H. C. Leishmaniasis treatment - a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, v. 103, p. 1-10, 2008.

SAVOIA, D.; ALLICE, T.; TOVO, P.A. Antileishmanial activity of HIV protease inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 1, p. 92-94, 2005.

SCIFINDER SCHOLAR. **Structure task**. Acesso em 25 out. 2008.

SCHIJLEN, E. G. W. M.; RIC DE VOS, C. H.; TUNEN, A. J.; BOVY, A. G. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2631-2648, 2004.

SEIFERT, K.; CROFT, S. L. In vitro and in vivo interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 73-79, 2006.

SEIFERT, K.; PÉREZ-VICTORIA, F. J.; STETTLER, M.; SÁNCHEZ-CAÑETE, M. P.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F.; CROFT, S. L. Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists *in vivo*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 229-235, 2007.

SELVAPANDIYAN, A.; DUCAN, R.; DEBRABANT, A.; LEE, N.; SREENIVAS, G.; SALOTRA, P.; NAKHASI. Genetically modified live attenuated parasites as vaccines for leishmaniasis. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 123, p. 455-466, 2006.

SHIMONY, O.; JAFFE, C. L. Rapid fluorescent assay for screening drugs on *Leishmania* amastigotes. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, n. 2, p. 196-200, 2008.

SILVA, E. M. **Ação inibitória de extratos de plantas do Cerrado sobre alfa-amilases com ênfase em *Kielmeyera coriacea***. Dissertação de Mestrado. Brasília, 2008. 127p.

SILVA, F. M.; DE PAULA, J. E.; ESPÍNDOLA, L. S. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. In press. doi:10.1111/j.1439-0507.2008.01647.x., 2009.

SINGH, N. Drug resistance mechanisms in clinical isolates of *Leishmania donovani*. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 123, p. 411-422, 2006.

SINGH, R. K.; PANDEY, H. P.; SUNDAR, S. Visceral leishmaniasis (Kala-azar): challenges ahead. **The Indian Journal of Medical Research**, v.123, p. 331-344, 2006.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 139-149, 2004.

STRIMPAKOS, A. S.; SHARMA, R. A. Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 3, p. 511-545, 2008.

SUBRAMANIAN, K.; SELVAKKUMAR, C.; VINAYKUMAR, S. K.; GOSWAMI, N.; MEENAKSHISUNDARAM, S.; BALAKRISHNAN, A.; LAKSHMI, B. S. Tackling multiple antibiotic resistance in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) clinical isolates: a diarylheptanoid from *Alpinia officinarum* shows promising antibacterial and immunomodulatory activity against EPEC and its lipopolysaccharide-induced inflammation. **International Journal of Antimicrobial Agents**. In press. doi10.1016/j.ijantimicag.2008.08.032, 2008.

SUKSAMRARN, A.; PONGLIKITMONGKOL, M.; WONGKRAJANG, K.; CHINDADUANG, A.; KITTIDANAIRAK, S.; JANKAM, A.; YINGYONGNARONGKUL, B. E.; KITTIPANUMAT, N.; CHOKCHAISIRI, R.; KHETKAM, P.; PIYACHATURAWAT, P. Diarylheptanoids, new phytoestrogens from the rhizomes of *Curcuma comosa*: Isolation, chemical modification and estrogenic activity evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 14, p. 6891-6902, 2008.

SULAIMAN, M. R.; ZAKARIA, Z. A.; DAUD, I. A.; NG, F. N.; NG, Y. C.; HIDAYAT, M. T. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of *Kaempferia galanga* leaves in animal models. **Journal of the National Medical**, v. 62, p. 221-227, 2008.

SUNDAR, S.; CHATTERJEE, M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 123, p. 345-352, 2006.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 6, p. 849-854, 2001.

SUNDAR, S.; JHA, T. K.; THAKUR, C. P.; BHATTACHARYA, S. K.; RAI, M. Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100S, p. S26-S33, 2006.

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. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, p. 377-383, 2004.

SUN, Y.; TABATA, K.; MATSUBARA, H.; KITANAKA, S.; SUZUKI, T.; YASUKAWA, K. New cytotoxic diarylheptanoids from the rhizomes of *Alpinia officinarum*. **Planta Medica**, v. 74, n. 4, p. 427-431, 2008.

SURH, Y. J. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, p. 1091-1097, 2002.

SURH, Y. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. **Mutation Research**, v. 428, p. 305-327, 1999.

TAO, Q.F.; XU, Y.; LAM, R.Y.; SCHNEIDER, B.; DOU, H.; LEUNG, P.S.; SHI, S.Y.; ZHOU, C.X.; YANG, L. X.; ZHANG, R. P.; XIAO, Y.C.; WU, X.; STÖCKIGT, J.; ZENG, S.; CHENG, C. H.; ZHAO, Y. Diarylheptanoids and a monoterpenoid from the rhizomes of *Zingiber officinale*: antioxidant and cytoprotective properties. **Journal of Natural Product**, v. 71, n. 1, p.12-17, 2008.

TCHUENDEM, M. H. K.; MBAH, J. A.; TSOPMO, A.; AYAFOR, J. F.; STERNER, O.; OKUNJIC, C. C.; IWU, M. M.; SCHUSTER, B. M. Anti-plasmodial sesquiterpenoids from the African *Reineckia cinnamomata*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 6, p. 1095-1099, 1999.

TDR, **Leishmaniasis – Seventeenth Programme Report / Progress 2003-2004**, p. 19-23, 2005.

TEWTRAKUL, S.; SUBHADHIRASAKUL, S. Anti-allergic activity of some selected plants in the Zingiberaceae family. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 535-538, 2007.

TEWTRAKUL, S.; SUBHADHIRASAKUL, S.; KARALAI, C.; PONGLIMAMONT, S. C. Anti-inflammatory effects of compounds from *Kaempferia parviflora* and *Boesenbergia pandurata*. **Food Chemistry**. In press. doi:10.1016/j.foodchem.2008.12.12.057, 2008.

THAKUR, C. P.; KANYOK, T. P.; PANDEY, A. K.; SIUHA, G. P.; ZANIEWSKI, A. E.; HOULIHAN, H. .H; OUIARO, P. A prospective randomized, comparative, open-label trial of the safety and efficacy of paromomycin (aminosidine) plus sodium stibogluconate versus sodium stibogluconate alone for the treatment of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. 429-431, 2000b.

TOLEDO, J. S., JUNQUEIRA DOS SANTOS, A. F.; DE MOURA, T. R.; ANTONIAZI, S. A.; BRODSKYN, C.; DE OLIVEIRA, C. I.; BARRAL, A.; CRUZ, A. K. *Leishmania (Viannia) braziliensis* transfectants overexpressing the miniexon gene lose virulence in vivo. **Parasitology International**. In press. doi:10.1016/j.parint.2008.09.006, 2008.

TOLONEN, A. **Analysis of secondary metabolites in plant and cell culture tissue of *Hypericum perforatum* L and *Rhodiola rosea* L**. Academic Dissertation. University of Oulu, 2003. 67p.

UEDA-NAKAMURA, T.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; MAZA, P. K.; FILHO, B. P. D.; 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*. **Parasitology International**, v. 55, p. 99-105, 2006.

VALDERRAMA, J. A.; ZAMORANO, C.; GONZÁLES, M. F.; PRINAB, E.; FOURNET, A. Studies on quinones part 39: Synthesis and leishmanicidal activity of acylchloroquinones and hydroquinones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 4153-4159, 2005.

VERMA, N. K.; DEY, C. S. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 3010-3015, 2004.

VERMA, N. K.; SINGH, G.; DEY, S. Miltefosine induces apoptosis in arsenite-resistant *Leishmania donovani* promastigotes through mitochondrial dysfunction. **Experimental Parasitology**, v. 116, p. 1-13, 2007.

VIEIRA, N. C.; ESPINDOLA, L. S.; SANTANA, J. M.; VERAS, M. L.; PESSOA, O. D.; PINHEIRO, S. M.; DE ARAÚJO, R. M.; LIMA, M. A.; SILVEIRA, E. R. Trypanocidal activity of a new pterocarpan and other secondary metabolites of plants from Northeastern Brazil flora. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 4, p. 1676-1682, 2008.

VIEIRA, N. C.; HERRENKNECHT, C.; VACUS, J.; FOURNET, A.; BORIES, C.; FIGADÈRE, B.; ESPINDOLA, L. S.; LOISEAU, P. M. Selection of the most promising 2-substituted quinoline as antileishmanial candidate for clinical trials. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, p. 684-689, 2008.

VIEIRA, N. C. **Quinoléínas substituídas na posição 2 com potencial leishmanicida: seleção de um composto promissor para o desenvolvimento clínico.** Tese de Doutorado. Brasília / Paris, 2008. 177p.

WANASEN, N.; XIN, L.; SOONG, L. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 417-429, 2008.

WASUNNA, M. K.; RASHID, J. R.; MBUI, J.; KIRIGI, G.; KINOTI, D.; LONDENYO, H.; FELTON, J. M.; SABIN, A. J.; HORTON, J. A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, p. 871-876, 2005.

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

WHO, **Essential Leishmaniasis Maps**. Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html>. Acesso em 10 ago. 2008.

WHO, **Report of the fifth consultative meeting on *Leishmania*/HIV co-infection-** Addis Ababa, Ethiopia, march, 2007a.

WHO/TDR, **Leishmaniasis**. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/disease_info.htm>. Acesso em 23 fev. 2008.

WOLDAY, D.; BERHE, N.; AKUFFO, H.; BRITTON, S. *Leishmania*-HIV interaction: immunopathogenic mechanisms. **Parasitology Today**, v. 15, n. 5, p. 182-187, 1999.

YAMAGUSHI, M.; SHIBATO, K.; NAKASHIMA, H.; MINAMI, T. Synthesis of phenols by the intramolecular condensation of β , β' , δ , δ' -tetraoxoalkanedioates a novel BF_3 -promoted Claisen condensation of acetoacetate dianion with esters and amides. **Tetrahedron**, v. 44, n. 15, p. 4767-4775, 1988.

YANG, H. L.; CHEN, S. C.; CHEN, C. S.; WANG, S. Y.; HSEU, Y. C. *Alpinia pricei* rhizome extracts induce apoptosis of human carcinoma KB cells via a mitochondria-dependent apoptotic pathway. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 10, p. 3318-3324, 2008.

YANG, S. W.; ZHOU, B. N.; MALONE, S.; WERKHOVEN, M. C. M.; VAN TROON, F.; WISSE, J. H.; KINGSTON, D. G. I. A new labdane diterpenoid from *Renalmia alpinia* collected in the Suriname rainforest. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 1173-1174, 1999.

ZANGH, W. G.; ZHAO, R.; REN, J.; REN, L. X.; LIN, J. G.; LIU, D. L.; WU, Y. L.; YAO, X. S. Synthesis and anti-proliferative *in-vitro* activity of two natural dyhydrostilbenes and their analogues. **Archiv der Pharmazie (Weinheim)**, v. 340, n. 5, p. 244-250, 2007.

ZHOU, B. N.; BAJ, N. J.; GLASS, T. E.; MALONE, S.; WERKHOVEN, M. C. M.; VAN TROON, F.; WISSE, J. H.; KINGSTON, D. G. I. Bioactive labdane diterpenoids from *Renalmia alpinia* collected in the Suriname rainforest. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 1287-1293, 1997.

ZICK, S. M.; RUFFIN, M. T.; LEE, J.; NORMOLLE, D. P.; SIDEN, R.; ALRAWI, S.; BRENNER, D. E. Phase II trial of encapsulated ginger as a treatment for chemotherapy-induced nausea and vomiting. **Support Care Cancer**. In press. doi10.1007/s00520-008-0528-8, 2008.

Área de distribuição do Cerrado no Brasil. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia16/AG01/arvore/AG01_2_111200610412.html>. Acesso em 10 ago. 2008.

Flebotômíneo, vetor da leishmaniose. Disponível em <http://www2.portoalegre.rs.gov.br/sms/default.php?p_secao=652>. Acesso em: 10 ago. 2008.

Folha de *Renealmia alpinia* (Rottb.) Maas (Zingiberaceae). Disponível em <http://www.acguanacaste.ac.cr/paginas_especie/plantae_online/magnoliophyta/zingiberaceae/renealmia_alpinia/r_alpinia24may1998/r_alpinia24may98.html>. Acesso em 10 ago. 2008.

Formas promastigotas de *Leishmania* ssp. Disponível em <<http://www.colegiosao francisco.com.br/alfa/leishmaniose/leishmaniose.php>>. Acesso em 10 ago. 2008.

Mapa com distribuição global dos casos de leishmaniose e dos casos reportados de co-infecção *Leishmania*-HIV. Disponível em <http://www.who.int/csr/resouces/publications/CSR_ISR_2000_1leish/en/index.html>. Acesso em 5 jan. 2009.

Paisagem típica do Cerrado. Disponível em <<http://www.ecocentro.org/pdc/imagens/cerrado.jpg>>. Acesso em 10 ago. 2008.

Principais reservatórios da leishmaniose (ciclos zoonótico e antroponozoonótico). Disponível em <<http://www.saudeanimal.com.br/leishmaniose>>. Acesso em 10 ago. 2008.

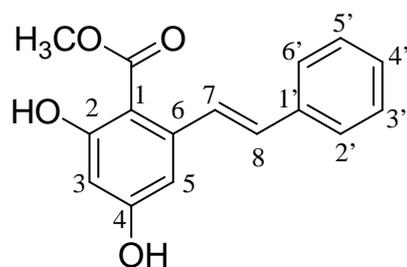
Anexo I

Espectros e Tabelas de RMN e IV

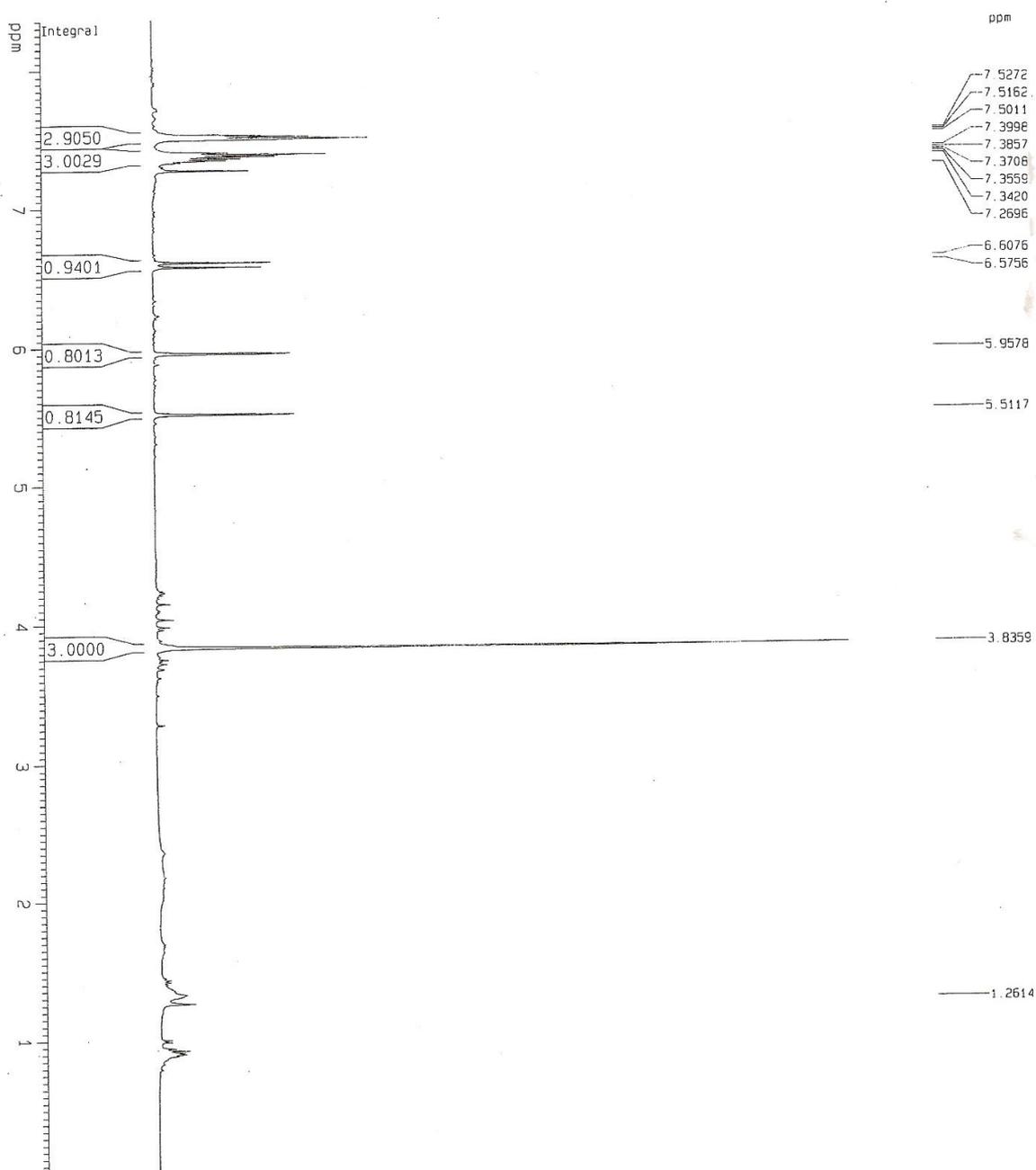
2,4-di-hidroxi-6-(fenileteno)-benzoato de metila

Dados de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ^{13}C e ^1H (HSQC)
2,4-di-hidroxi-6-(fenileteno)-benzoato de metila

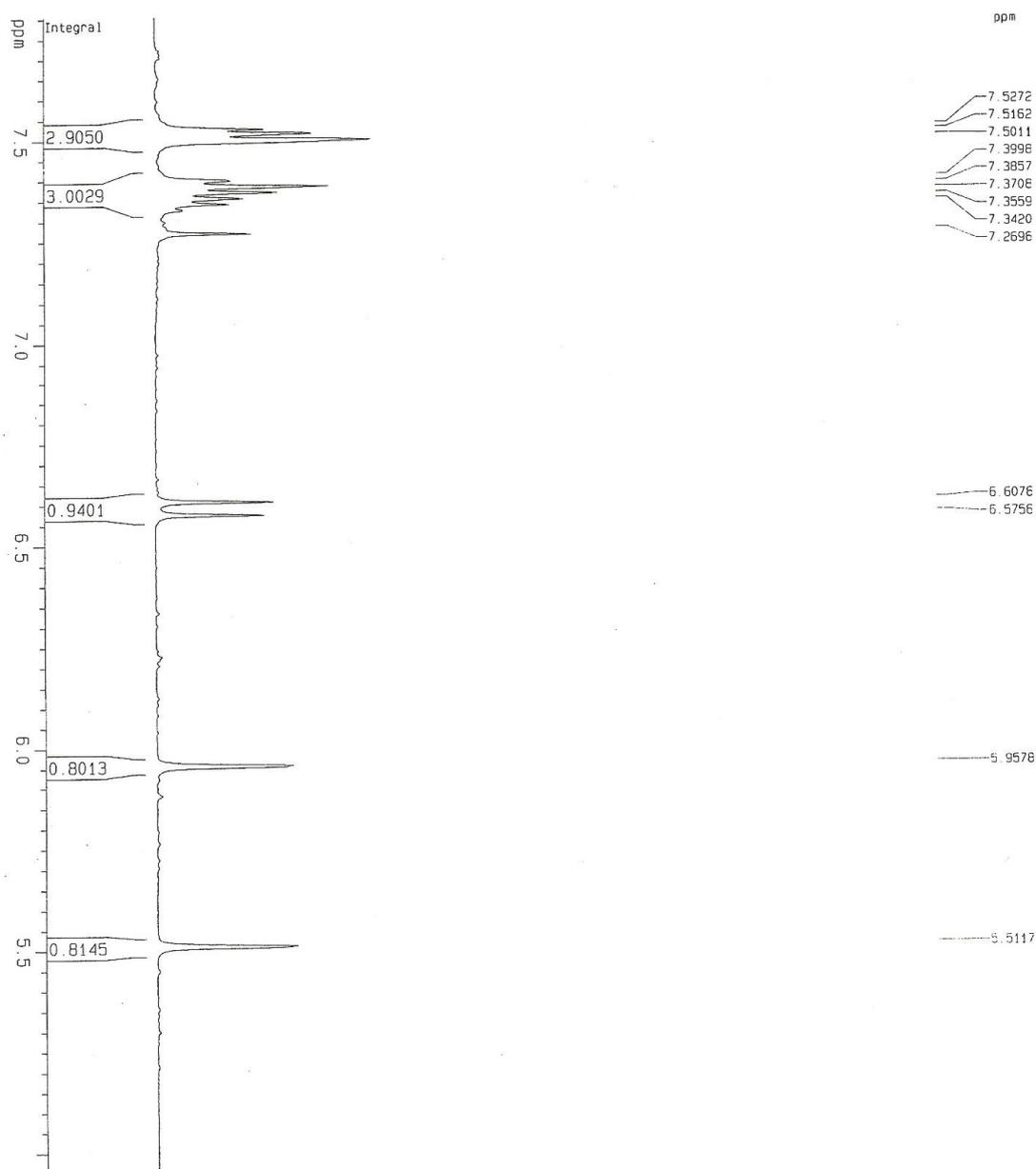
C	RMN ^{13}C δ_{C} (ppm)	RMN ^1H , ^{13}C -HSQC δ_{H} (ppm)(int.,multip, $J_{\text{H,H}}$)
1	135,45	
2	164,27	
3	89,08	5,51 (1H, d, $J = 1,0$ Hz)
4	158,87	
5	101,55	5,96 (1H, d, $J = 1,0$ Hz)
6	132,00	
7	118,84	6,60 (1H, d, $J = 16,0$ Hz)
8	136,05	7,51 (1H, d, $J = 16,0$ Hz)
1'	129,01	
2'6'	129,66	7,38 (1H, m)
3'5'	127,66	7,51 (1H, m)
4'	129,12	7,39 (1H, s)
O-CH ₃	56,16	3,84 (1H, s)
C=O	171,32	



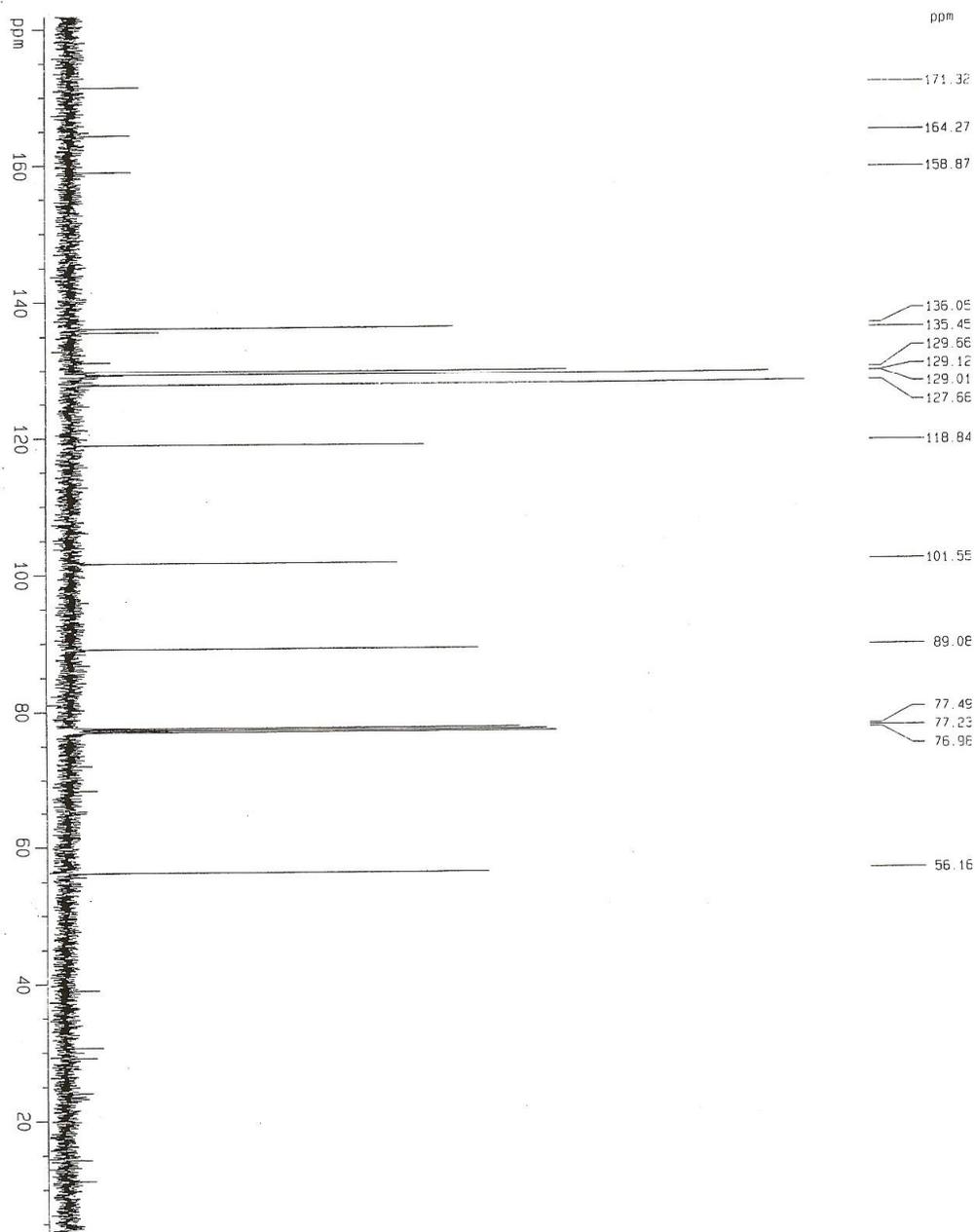
RMN ^1H , piridina, 2,4-di-hidroxi-6-(fenileteno)-benzoato de metila



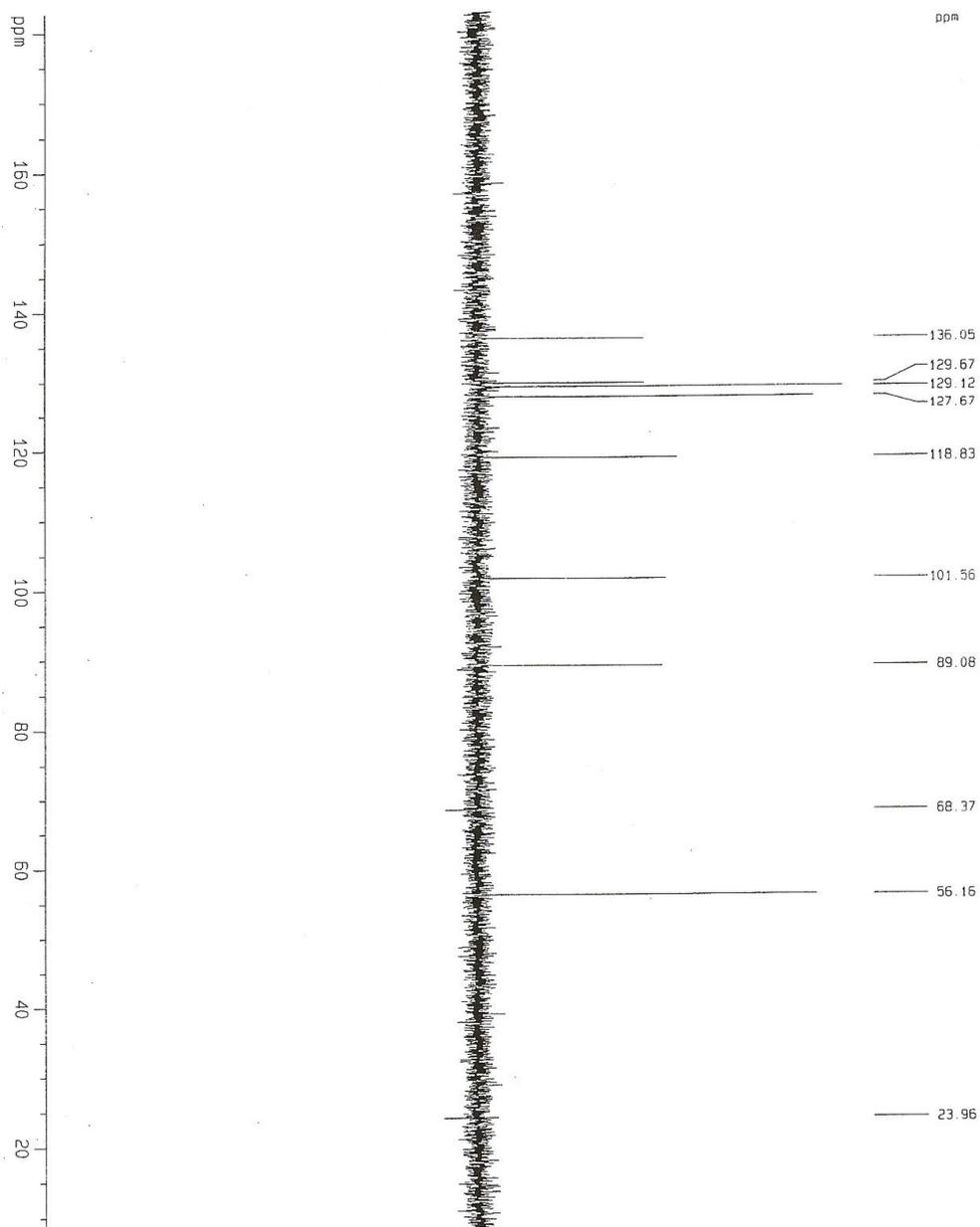
RMN ^1H , piridina, 2,4-di-hidroxi-6-(fenileteno)-benzoato de metila



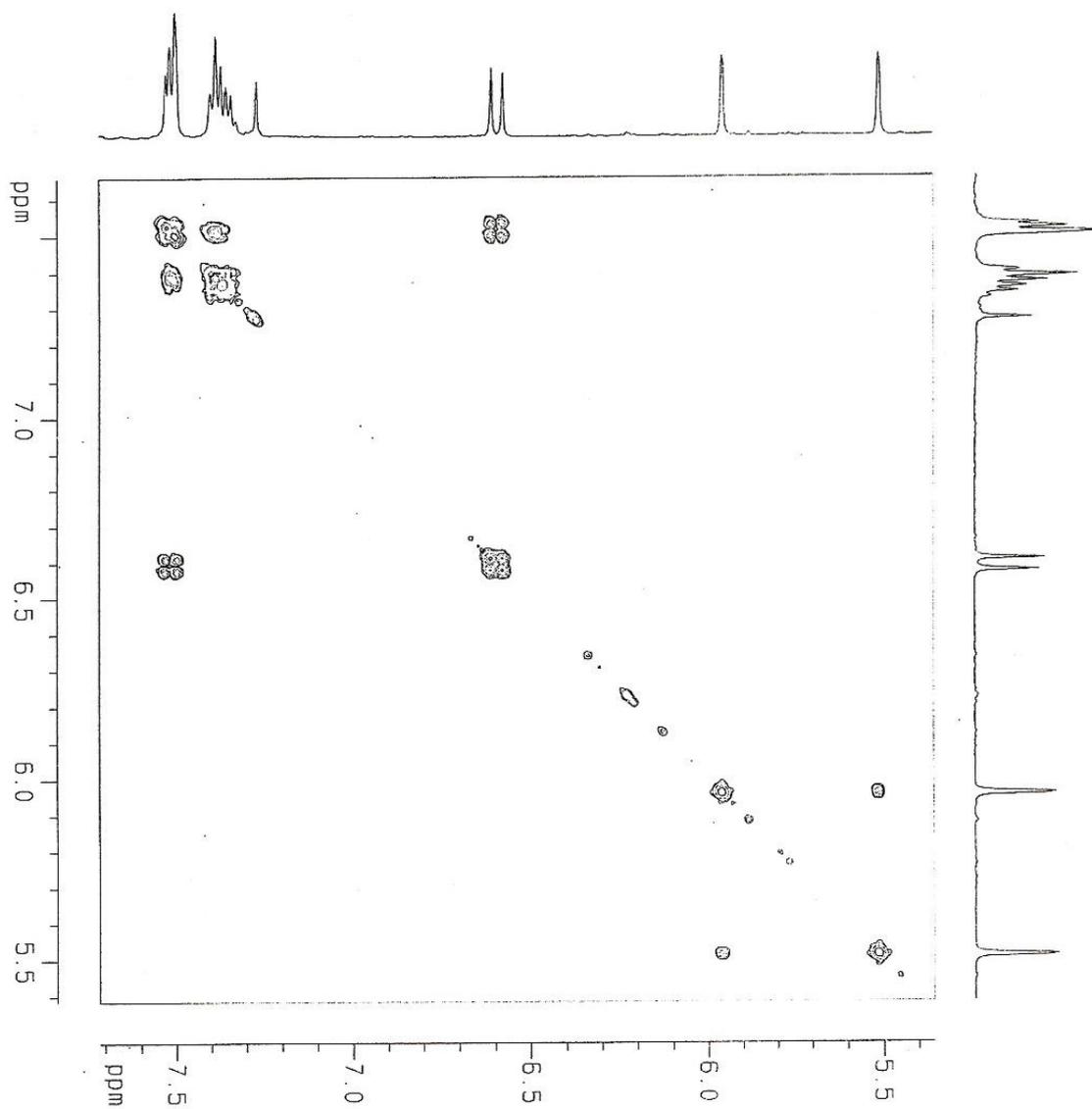
RMN ^{13}C , piridina, 2,4-di-hidroxi-6-(fenileteno)-benzoato de metila



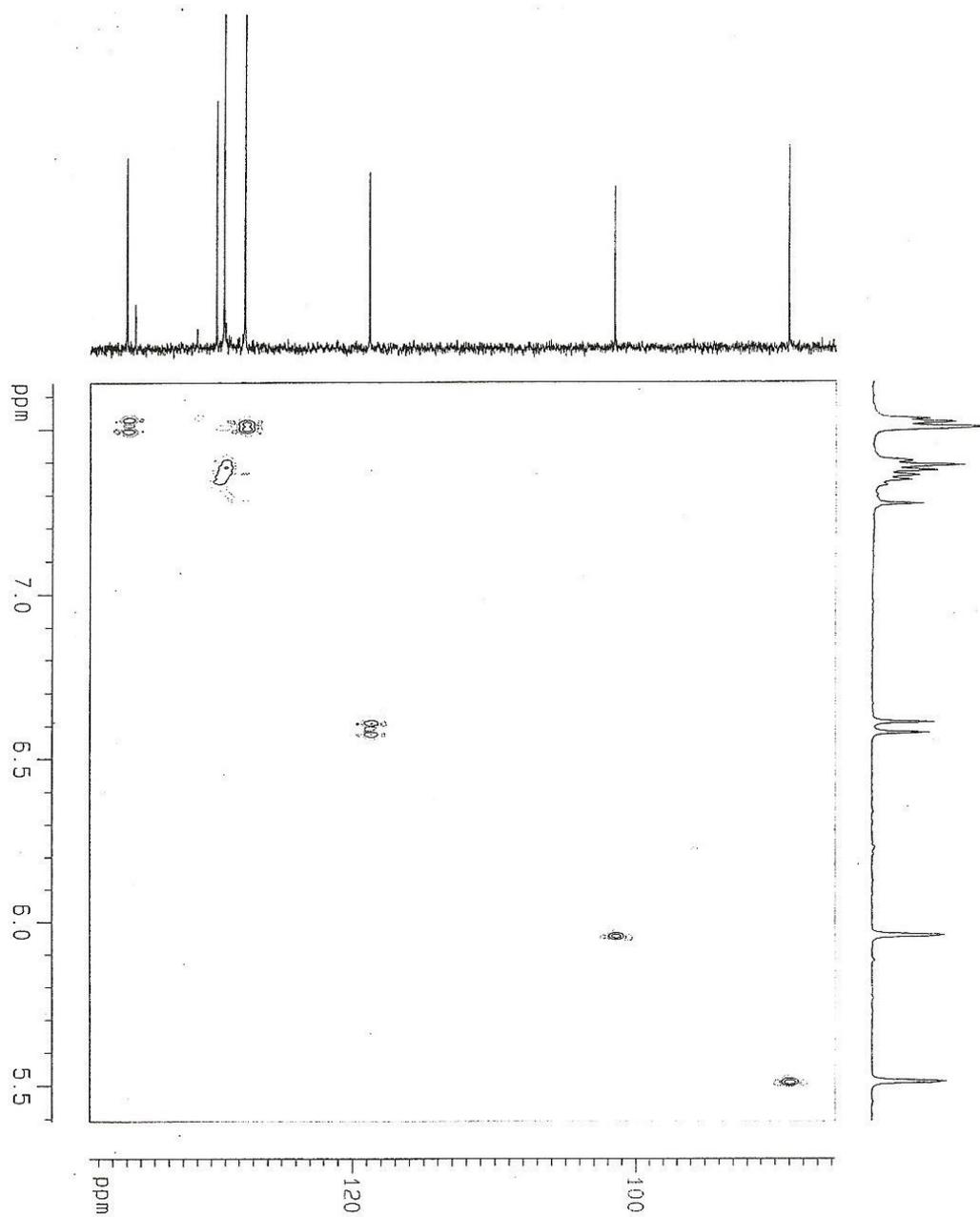
RMN ^{13}C - DEPT 135, piridina, 2,4-di-hidroxi-6-(fenileteno)-benzoato de metila



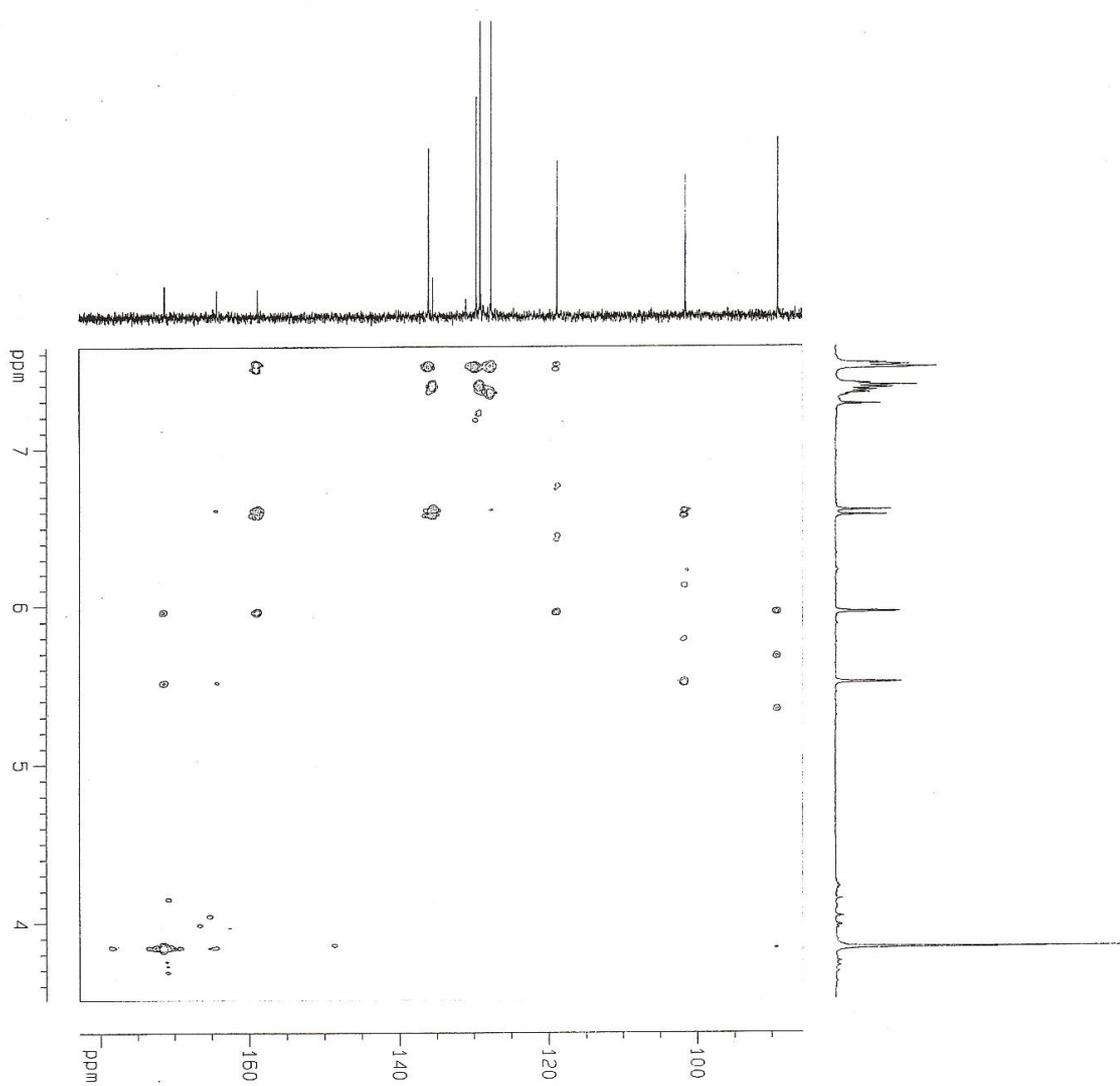
RMN COSY, piridina, 2,4-di-hidroxi-6-(fenileteno)-benzoato de metila



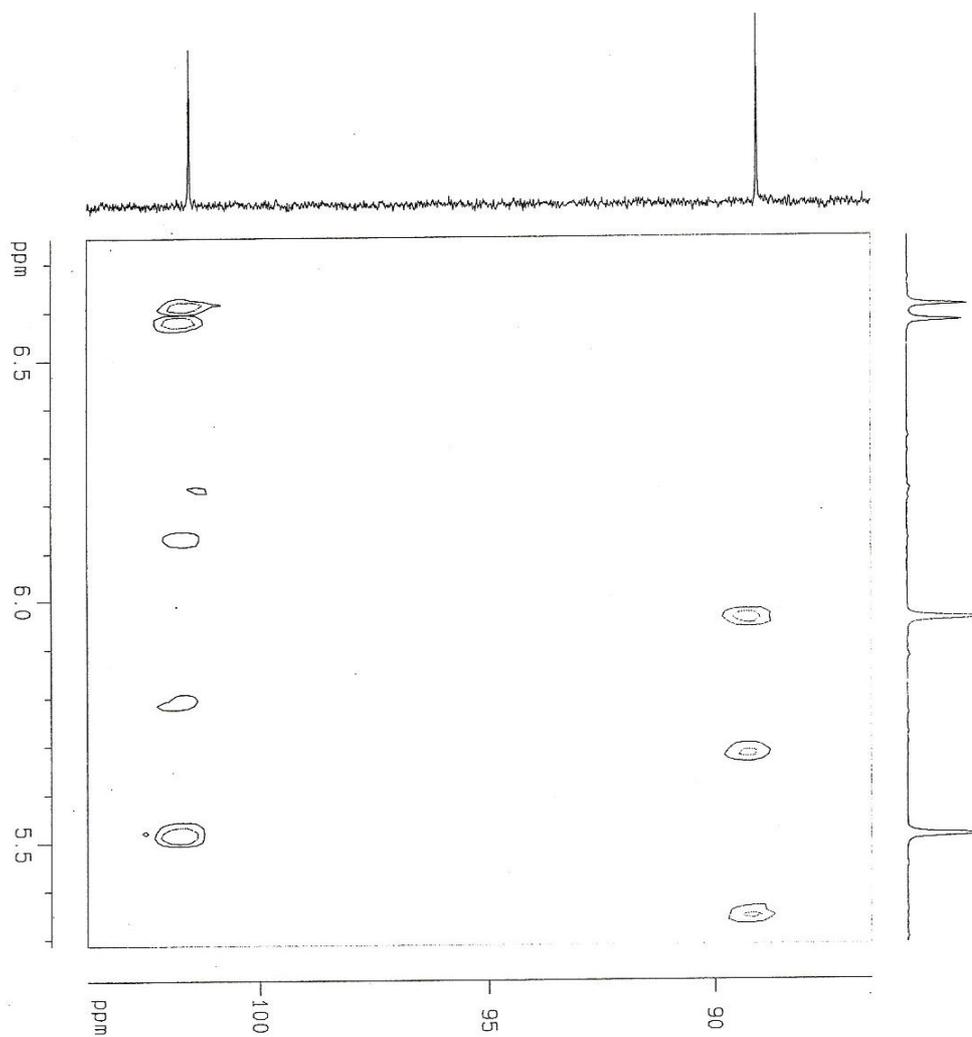
RMN HSQC, piridina, 2,4-di-hidroxi-6-(fenileteno)-benzoato de metila



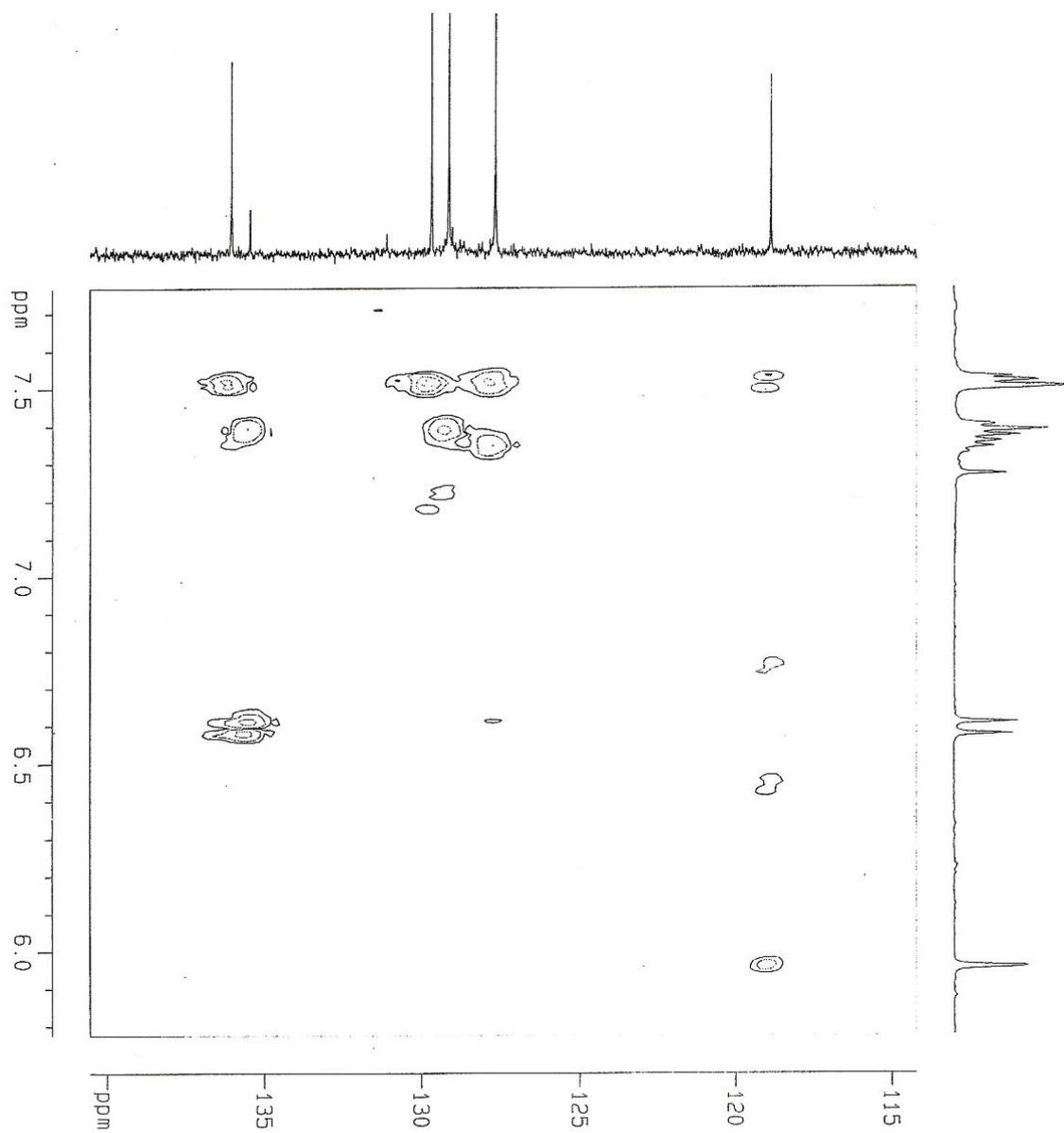
RMN HMBC, piridina, 2,4-di-hidroxi-6-(fenileteno)-benzoato de metila



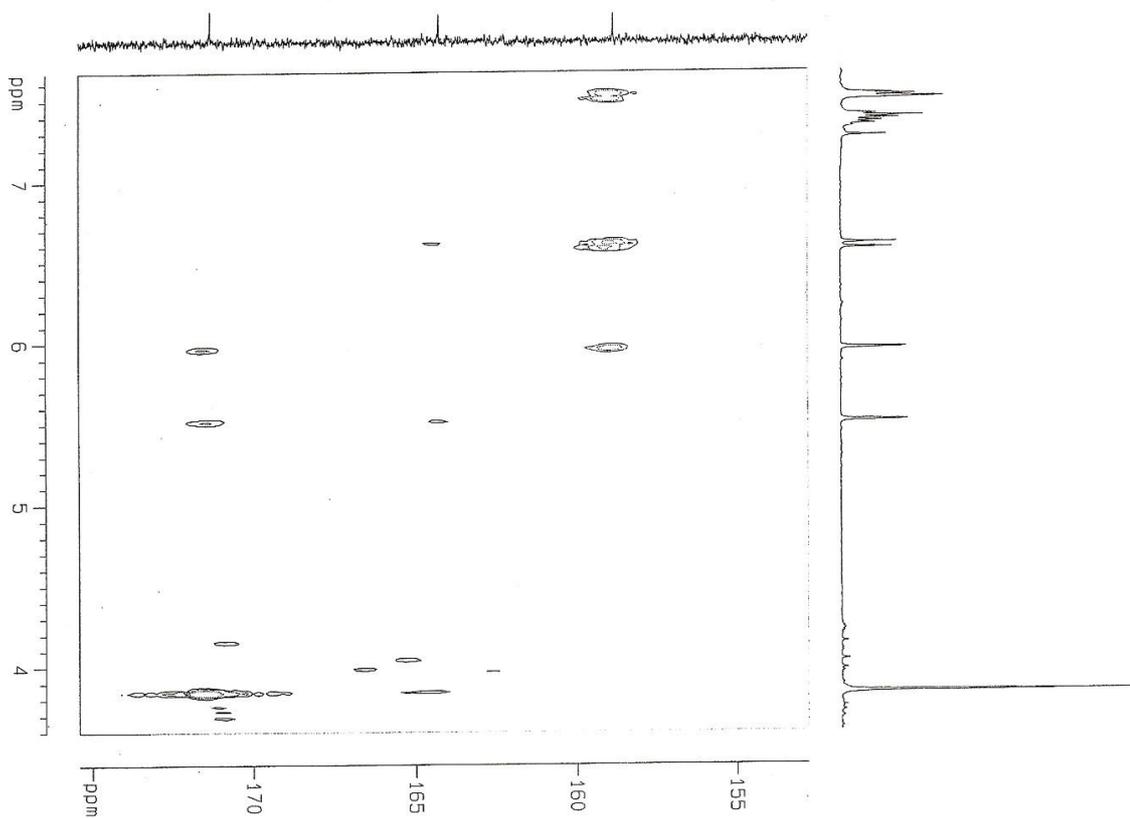
RMN HMBC, piridina, 2,4-di-hidroxi-6-(fenileteno)-benzoato de metila



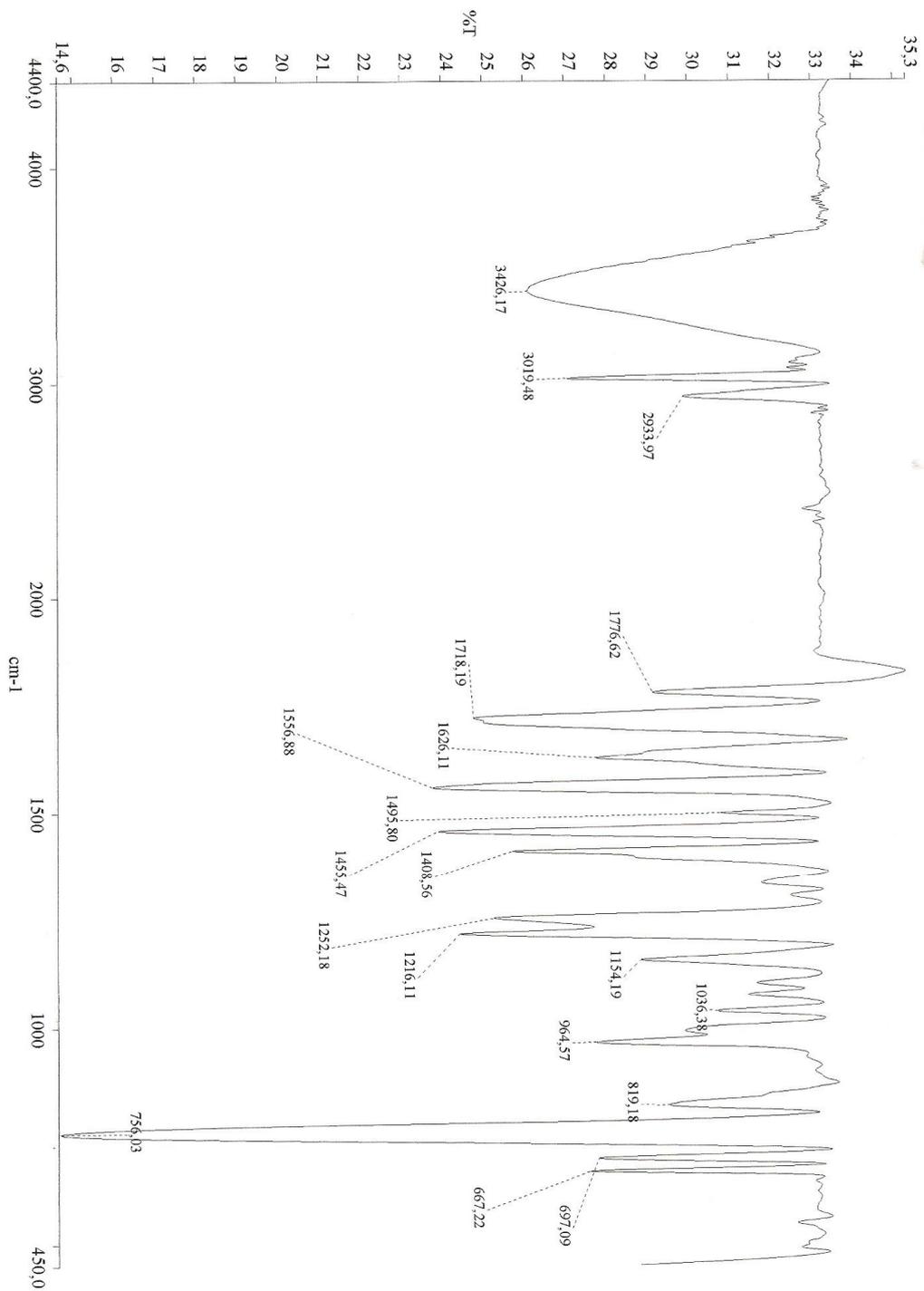
RMN HMBC, piridina, 2,4-di-hidroxi-6-(fenileteno)-benzoato de metila



RMN HMBC, piridina, 2,4-di-hidroxi-6-(fenileteno)-benzoato de metila



Espectro de Infra-Vermelho, 2,4-di-hidroxi-6-(fenileteno)-benzoato de metila



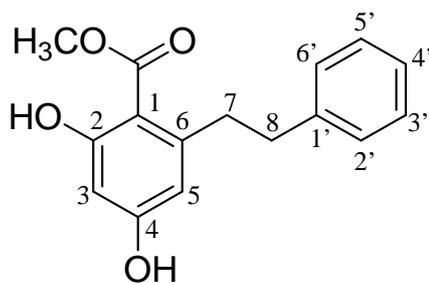
Anexo II

Espectros e Tabelas de RMN e IV

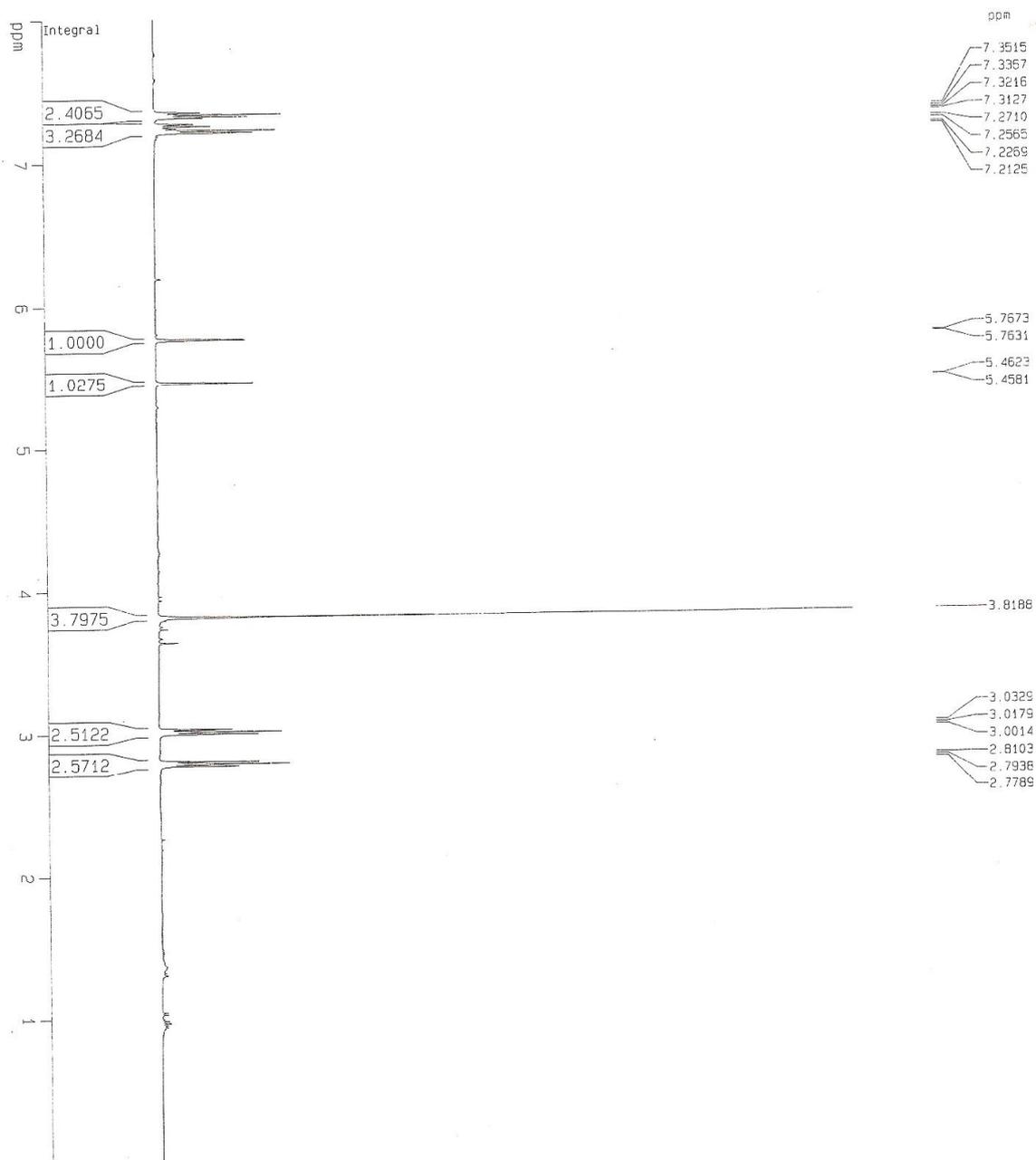
2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila

Dados de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ^{13}C e ^1H (HSQC)
2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila

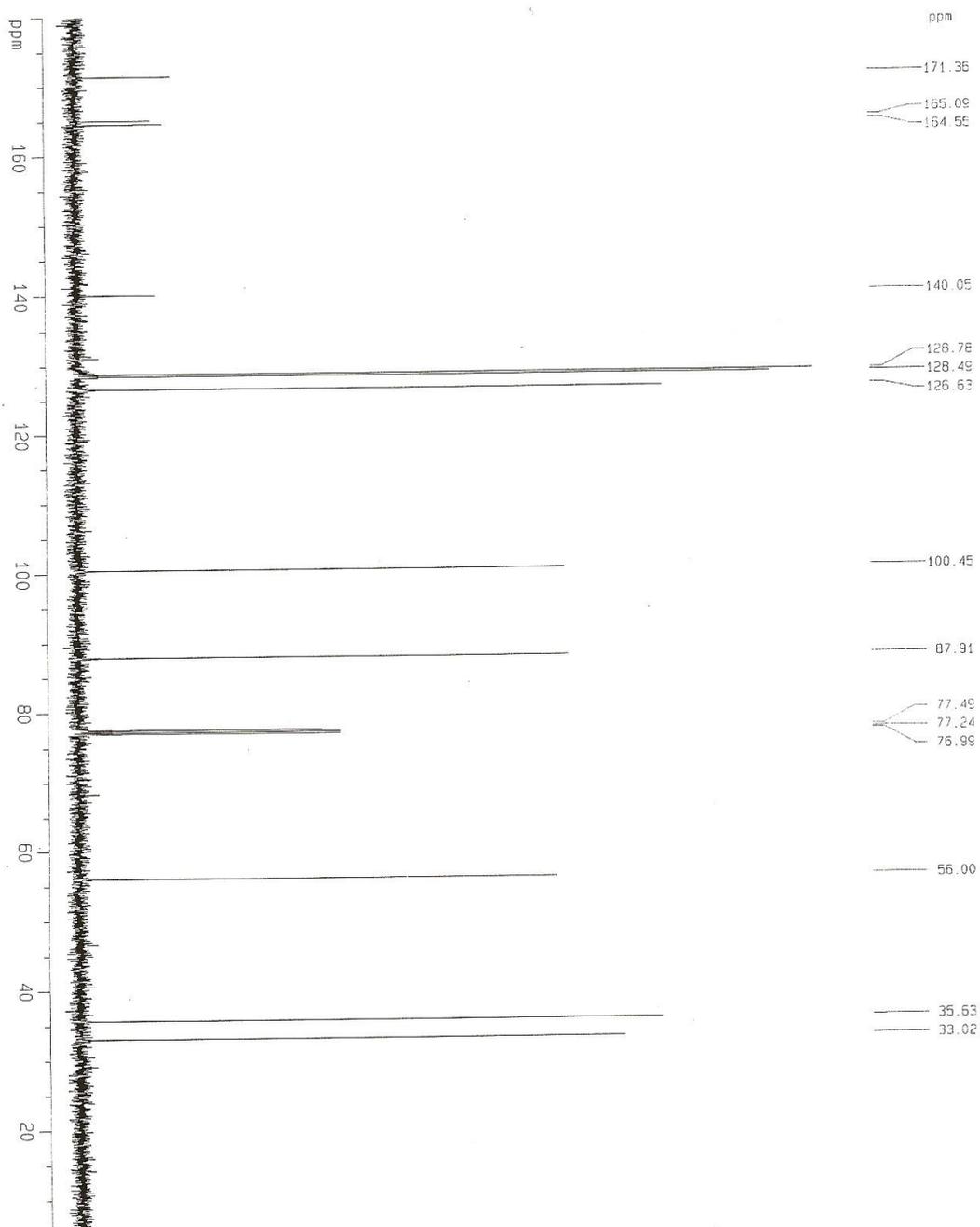
C	RMN ^{13}C δ_{C} (ppm)	RMN $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC δ_{H} (ppm)(int.,multip, $J_{\text{H,H}}$)
1	140,05	
2	164,55	
3	87,91	5,46 (1H, d, $J = 2,1$ Hz)
4	165,09	
5	100,45	5,76 (1H, d, $J = 2,1$ Hz)
6	128,49	
7	35,63	2,79 (1H, t, $J = 16,0$ Hz)
8	33,02	3,01 (1H, t, $J = 16,0$ Hz)
1'	128,78	
2'	128,49	7,22 (1H, m)
3'	128,78	7,36 (1H, m)
4'	126,63	7,26 (1H, m)
O-CH ₃	56,00	3,82 (1H, s)
C=O	171,36	



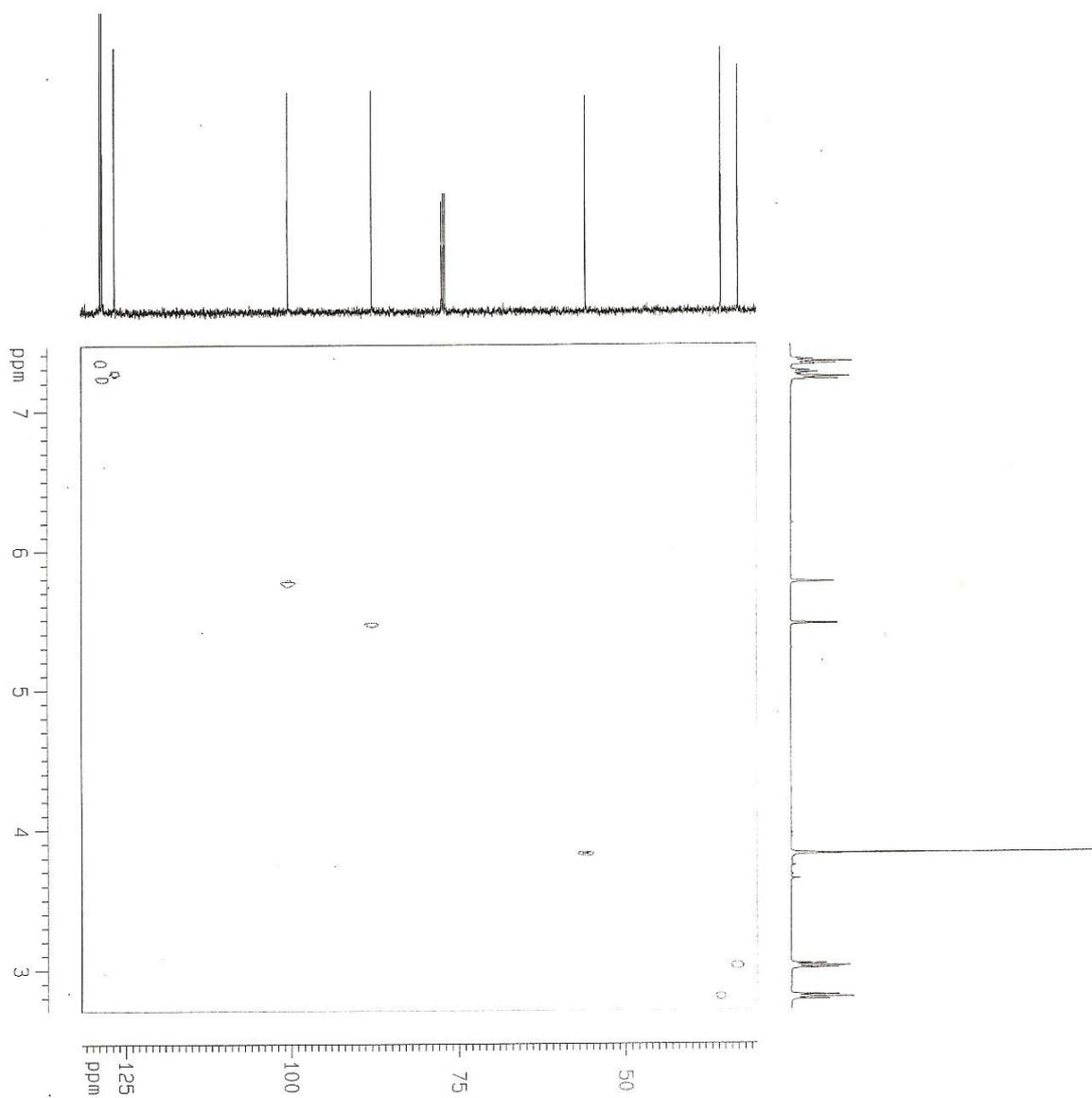
RMN ^1H , piridina, 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila



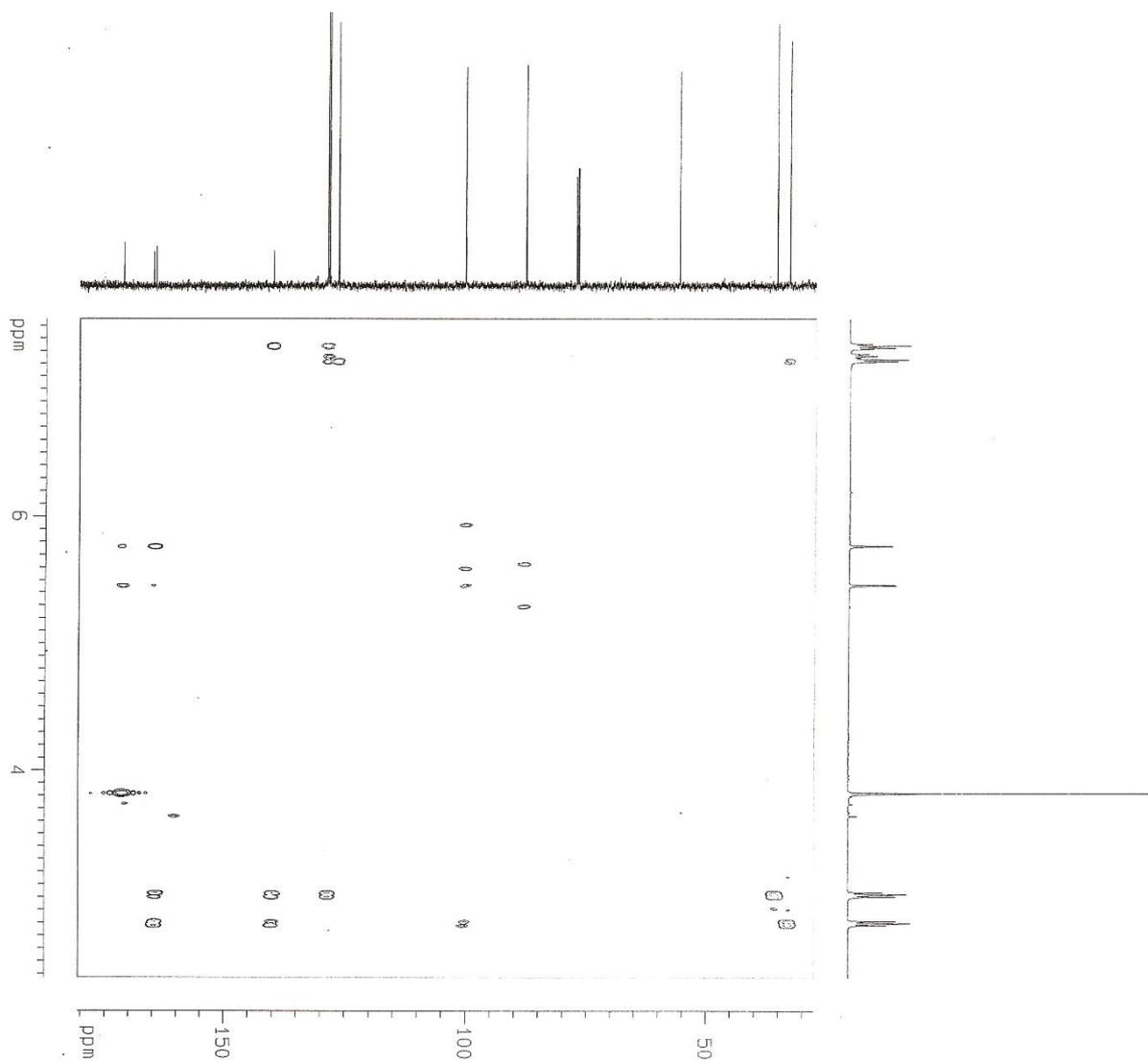
RMN ^{13}C , piridina, 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila



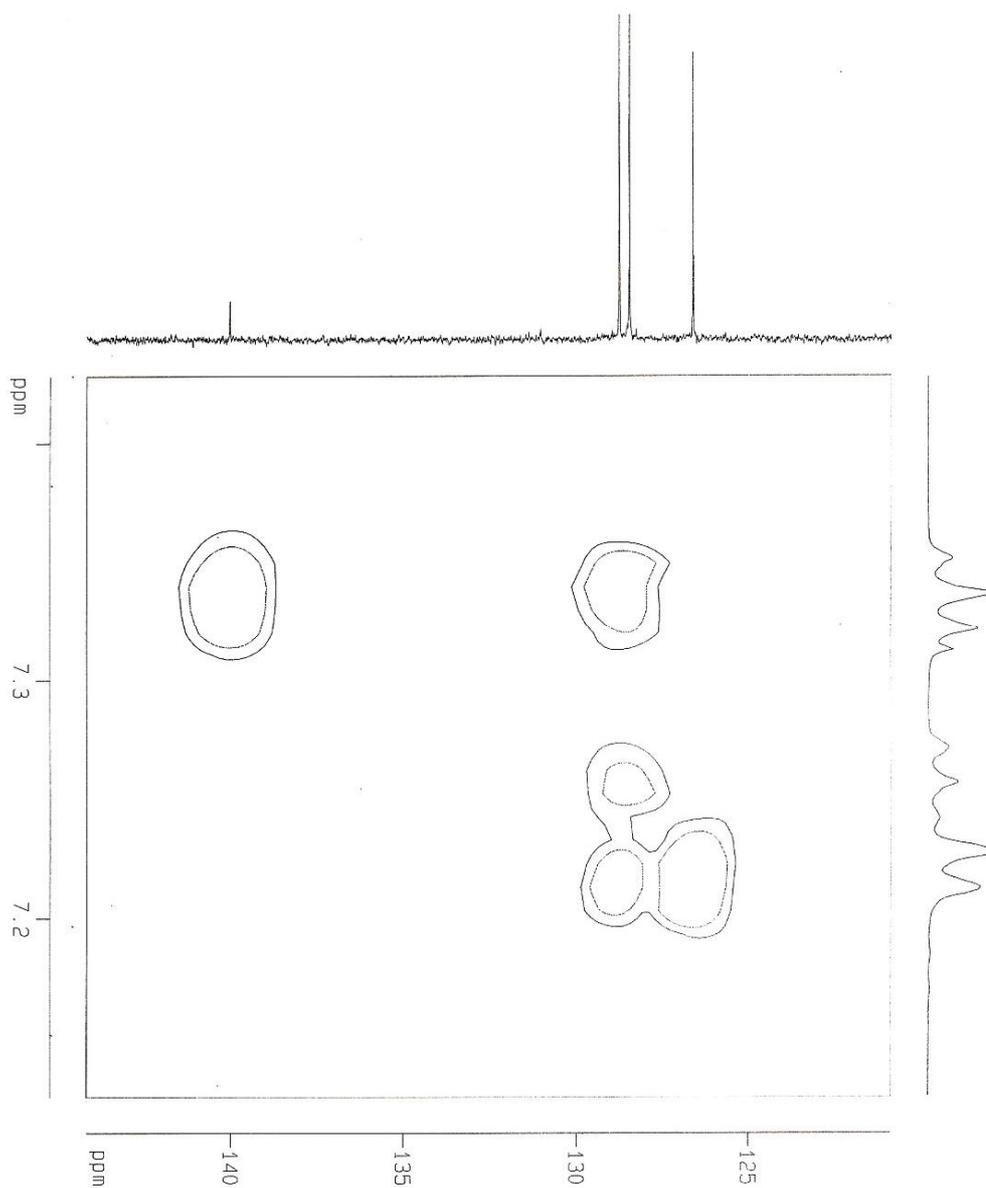
RMN HSQC, piridina, 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila



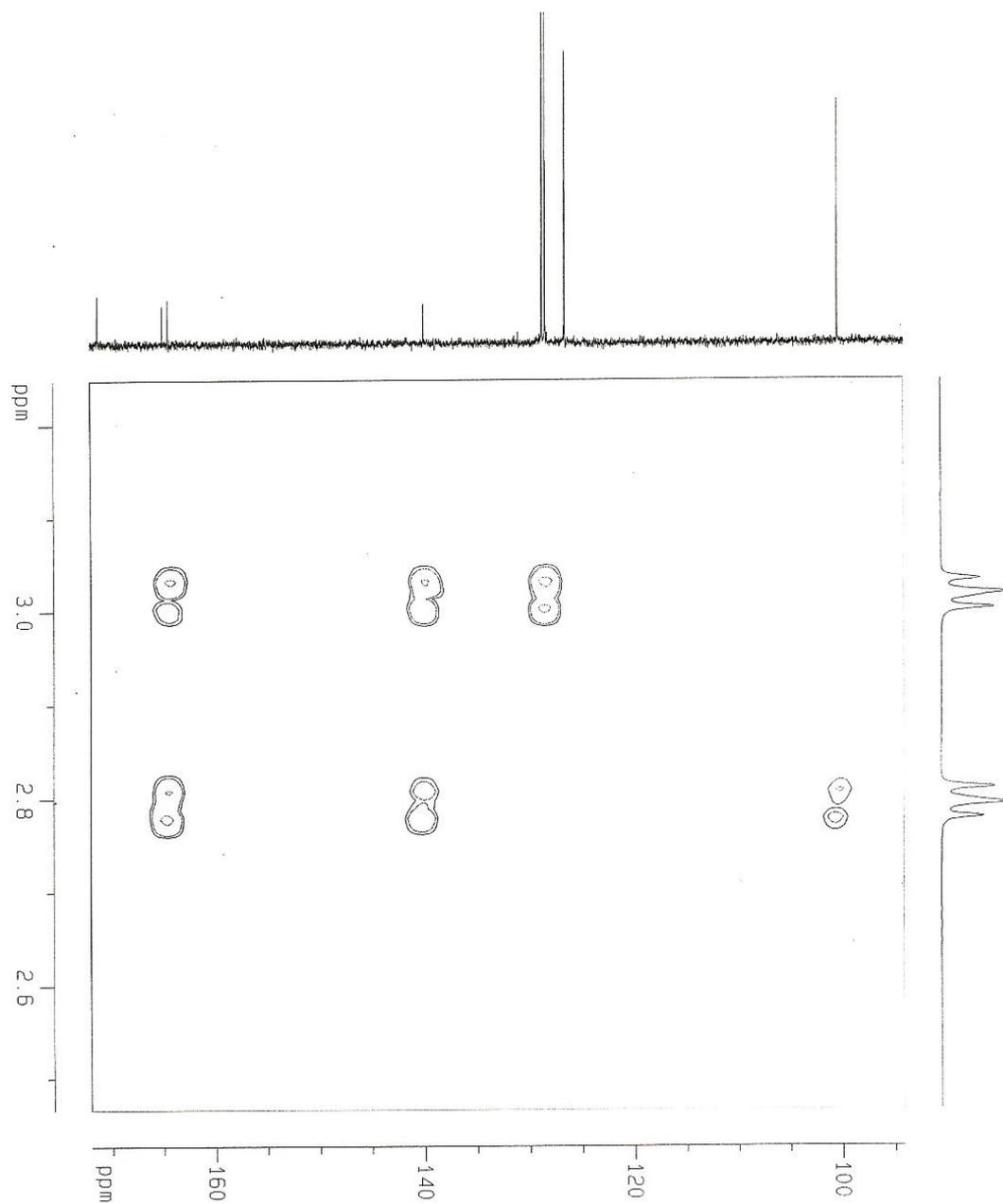
RMN HMBC, piridina, 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila



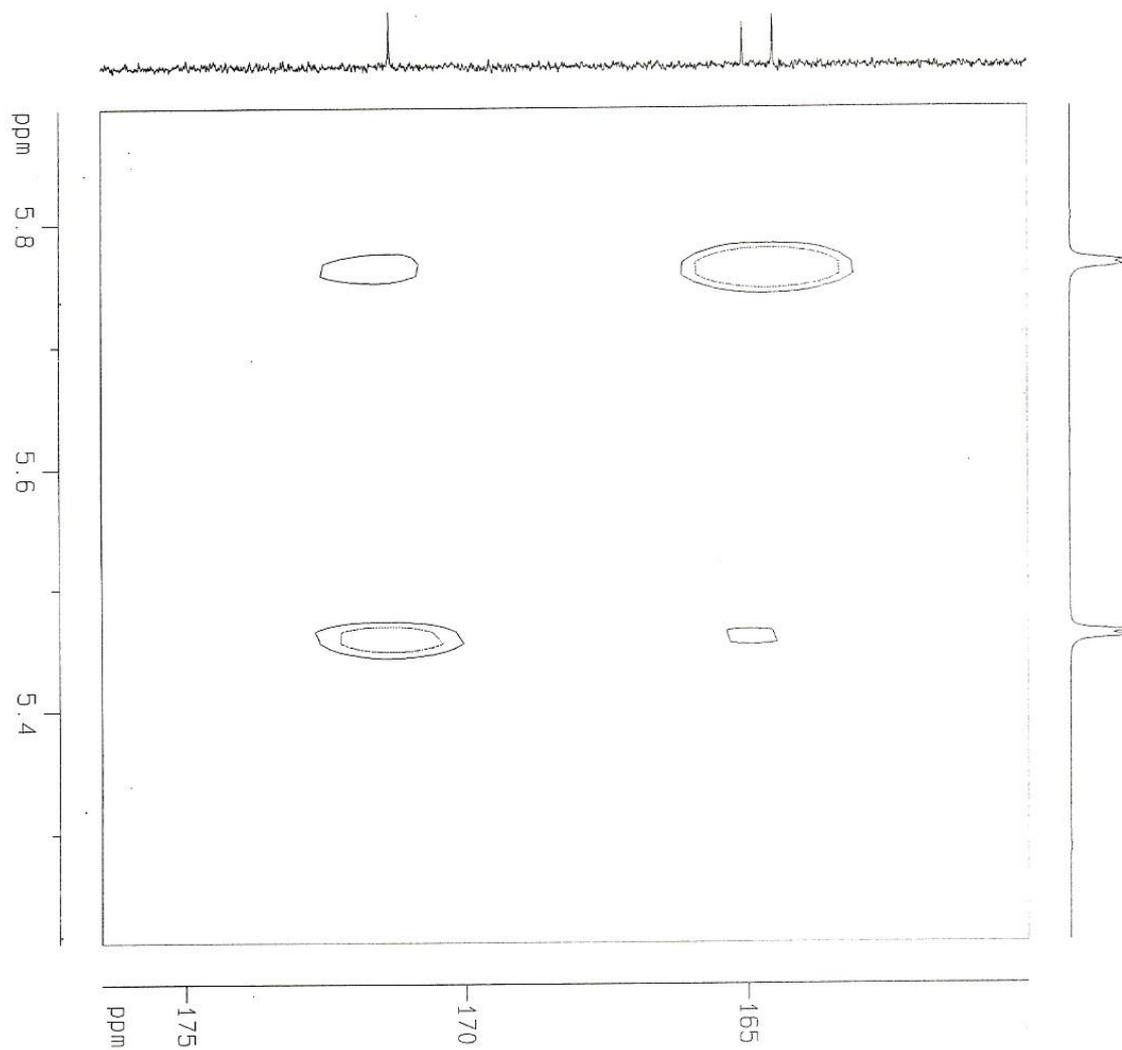
RMN HMBC, piridina, 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila



RMN HMBC, piridina, 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila



RMN HMBC, piridina, 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila



Espectro de Infra-Vermelho, 2,4-di-hidroxi-6-(feniletano)-benzoato de metila

