

## ISOLEMENT ET SYNTHÈSE DE L'ESPINTANOL, NOUVEAU MONOTERPÈNE ANTIPARASITAIRE

R. HOCQUEMILLER,\* D. CORTES,<sup>1</sup> G.J. ARANGO,<sup>2</sup> S.H. MYINT, A. CAVÉ,

Laboratoire de Pharmacognosie, URA 496 CNRS, Faculté de Pharmacie, Université Paris XI.  
92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

A. ANGELO, V. MUÑOZ, et A. FOURNET

Laboratoire de Pharmacognosie, ORSTOM-IBBA, CP 9214, La Paz, Bolivie

**ABSTRACT.**—The *in vitro* leishmanicidal and trypanocidal activities of a petroleum ether extract of *Oxandra espintana* have been investigated. Four aromatic monoterpenes were isolated, of which two are novel: espintanol [3a], responsible for the antiparasite activity, and *O*-methylespintanol [4]. Espintanol was tested *in vitro* on 20 strains of *Trypanosoma cruzi* and 12 strains of *Leishmania* spp. Its structure was determined by spectroscopic methods and confirmed by its preparation starting from carvacrol.

Parmi les 26 espèces du genre *Oxandra*, seul *Oxandra xylopioides* Diels a fait l'objet d'une étude chimique; deux types d'alcaloïdes originaux ont ainsi été isolés: les azafluorénones (1,2) et les bis-7,7' déhydroaporphines (3).

Ayant mis en évidence une activité *in vitro* d'un extrait éthéropétrolique d'écorces d'*Oxandra espintana* (Spruce) Baill. (Annonaceae) sur les parasites responsables d'une part de certains types de leishmanioses, d'autre part de la maladie de Chagas, il nous a semblé intéressant d'étudier la composition chimique de cet extrait. En effet, les leishmanioses et la maladie de Chagas font parties des problèmes majeurs de santé du continent sud-américain, notamment de la Bolivie. Le peu de moyens thérapeutiques existant sur le marché nous a amené à développer une recherche basée sur les informations ethnopharmacologiques récoltées dans les régions d'endémie de ces maladies. Cette approche s'est avérée infructueuse en ce qui concerne la maladie de Chagas par manque d'information. Cependant, le fait que le responsable de la maladie de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, et les leishmanies appartiennent au même groupe, les protozoaires, nous a conduit à étendre notre champ d'investigation à cette parasitose qui touche 25 millions de personnes sur le continent sud-américain.

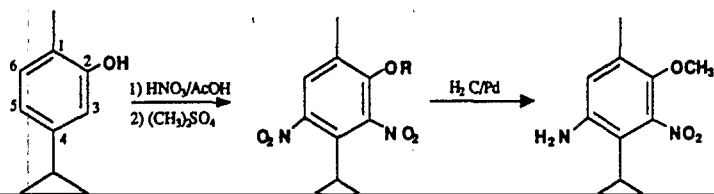
### RÉSULTATS ET DISCUSSION

La recherche des produits responsables de l'activité de l'extrait éthéropétrolique, guidée par triage biologique, a conduit notamment à l'isolement de quatre monoterpènes aromatiques. Les deux premiers sont des produits connus; il s'agit du *O*-méthyl carvacrol [1] et du thymoquinol diméthyl éther [2]. Leur structure postulée après analyse de leurs données spectrales a été confirmée pour le premier, par comparaison à un échantillon authentique. Quant au second, il présente des données identiques à celles publiées dans la littérature (4).

Le troisième monoterpène aromatique est un produit nouveau isolé sous forme d'une huile de couleur jaune-brunâtre. Nous l'avons nommé espintanol. Sa masse moléculaire est de 210 et il répond à la formule brute  $C_{12}H_{18}O_3$ . Son spectre de masse

<sup>1</sup>Adresse permanente: Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Rouen, 76800 Saint Etienne de Rouvray, France.

<sup>2</sup>Adresse permanente: Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, Colombie.



5

6 R=H  
7 R=Me

8

1) NaNO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
2) H<sub>2</sub>/Pd

TABLEAU 1. Inhibition de la Croissance des Promastigotes de *Leishmania* après 48 h de Contact avec l'Espintanol [3a], la Lomidine<sup>®</sup> (pentamidine), et le Glucantime<sup>®</sup>.

Souches	Espintanol IC <sub>90</sub>	Pentamidine IC <sub>90</sub>	Glucantime <sup>®</sup> IC <sub>90</sub>
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> (2904)	10 µg	1 µg	>100 µg
<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (M 4147)	25 µg	5 µg	>100 µg
<i>Leishmania (Viannia) peruviana</i> (PERU)	25 µg	5 µg	>100 µg
<i>Leishmania mexicana mexicana</i> (BEL 21)	25 µg	1 µg	>100 µg
<i>Leishmania mexicana amazonensis</i> (PH 8)	25 µg	1 µg	>100 µg
<i>Leishmania mexicana pifanoi</i> (LL1)	25 µg	1 µg	>100 µg
<i>Leishmania mexicana aristidesi</i> (6331)	25 µg	1 µg	>100 µg
<i>Leishmania mexicana garnhami</i> (JAP 78)	25 µg	1 µg	>100 µg
<i>Leishmania mexicana venezuelensis</i> (PM H3)	50 µg	5 µg	>100 µg
<i>Leishmania donovani donovani</i> (HS 70)	50 µg	1 µg	>100 µg
<i>Leishmania donovani infantum</i> (LEM 209)	25 µg	1 µg	>100 µg
<i>Leishmania donovani chagasi</i> (LEM 379)	25 µg	1 µg	>100 µg

hôtes employées, les macrophages intrapéritonéaux de souris Balb/c et sur une lignée cellulaire U 927.

L'espintanol, injecté en sous-cutané à la concentration de 200 mg/kg pendant 14 jours consécutifs 48 heures après l'inoculation de 1.000.000 d'amastigotes de *L. mexicana amazonensis* dans le coussinet d'une patte arrière de souris Balb/c, présente comme le Glucantime<sup>®</sup> un effet leishmanicide notable jusqu'à la 7<sup>ème</sup> semaine (Figure 2). L'espintanol n'est pas toxique sur les souris Balb/c, la DL<sub>50</sub> à 72 h est supérieure à 800 mg/kg par voie intrapéritonéale.

Les essais d'inhibition de croissance des épimastigotes de *T. cruzi* réalisés in vitro après 48 h de contact avec l'espintanol sur 20 souches typifiées de *T. cruzi*, montrent des variations importantes d'activité selon la souche (Tableau 2). Ces différences sont également notées avec les deux seuls médicaments commercialisés, le benznidazole et le nifurtimox. L'espintanol est aussi actif in vitro que les deux produits de référence. Ces

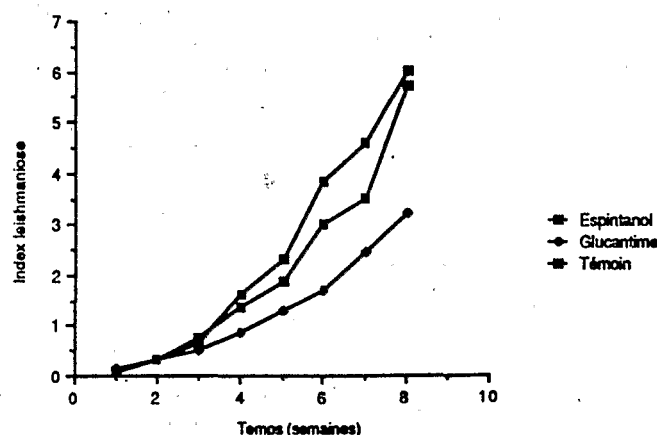


FIGURE 2. Activité de l'espintanol [3a] (200 mg/kg par jour) et du Glucantime<sup>®</sup> (200 mg/kg par jour) pendant 14 jours consécutifs sur le développement de *L. mexicana amazonensis* sur souris Balb/C, traitement commençant 2 jours après l'inoculation des parasites.

TABLEAU 2. Inhibition de la Croissance des Épimastigotes de *Trypanosoma cruzi* après 48 h de Contact avec l'Espintanol (3a), le Benznidazole, et le Nifurtimox.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

**GÉNÉRALITÉS.**—Les points de fusion ont été déterminés sur microscope Reichert. Les spectres ont été enregistrés sur les appareils suivants: uv, Unicam SP 1800; ir, Perkin-Elmer 257; rnm  $^1\text{H}$ , Varian T 60 à 60 MHz, Varian EM 390 à 90 MHz et Bruker à 250 MHz; rnm  $^{13}\text{C}$ , Varian CFT-20 à 20 MHz; sm, spectromètre Nermag-sidar. Les chromatographies sur colonne ont été réalisées sur gel de silice 60 (Merck 7734) ou 60 H (Merck 7736); les chromatographies en couche mince (ccm) analytiques sur gel de silice 60 F 254 (Merck 5554) et les CCM préparatives sur gel de silice 60 GF 254 (Merck 7730).

**MATÉRIEL VÉGÉTAL.**—Les écorces de tronc d'*O. spintana* ont été récoltées à l'Alto Beni, près de la rivière Tuichi (altitude 400 m), département de La Paz, Bolivie, en août 1984. Un échantillon d'herbier est déposé sous la référence A.F. 481 à l'Institut de Botanique Systématique de l'Université d'Utrecht.

**ISOLEMENT DES TERPENES.**—Les écorces séchées et pulvérisées (450 g) ont été extraites par l'éther de pétrole (8 litres) dans un appareil de type Soxhlet. L'extrait organique obtenu est ensuite évaporé (rendement 4%) et le résidu est soumis à des chromatographies répétées sur colonne de silice [ $n\text{-C}_6\text{H}_{14}\text{-CH}_2\text{Cl}_2\text{-AcOEt}$  (85:10:5)] et préparatives sur couche mince [cyclohexane- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (75:25)] permettant d'isoler quatre monoterpènes aromatiques: *O*-méthyl carvacrol [1] (7% de l'extrait éthéropétrolique), thymoquinol diméthyl éther [2] (3%), espintanol [3a] (15%), et *O*-méthyl espintanol [4] (2%).

**ESPINTANOL [3a].**—Huile de couleur jaune-brunâtre;  $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_3$ , 210, 12; uv  $\lambda$  max (EtOH) nm (log  $\epsilon$ ) 224 ép. (3,90), 288 (3,68); (EtOH + NaOH 0, 1M) 221 (3,86), 244 ép. (3,74), 295 (3,66); ir (film)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$  3405, 2920, 1450, 1405, 1345; sm  $m/z$  (%) 210 (85), 195 (100), 180 (28), 167 (2), 91 (12); rnm  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  voir Figure 1.

***O*-ACÉTYLATION DE L'ESPINTANOL.**—L'espintanol [3a] (20 mg, 0,095 mmol) est dissous dans 0,4 ml de pyridine et traité par 0,7 ml  $\text{Ac}_2\text{O}$ . Après 48 h de contact et 2 h de reflux, le produit de réaction est lavé, réextrait par  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , et le solvant évaporé; 22 mg (0,087 mmol) de *O*-acétyl espintanol [3c] sont obtenus. Rnm  $^1\text{H}$  (90 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,28 [d, 6H,  $J = 7,3$  Hz,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ], 2,10 (s, 3H, OAc), 2,30 (s, 3H, 1-Me), 3,40 (sepr, 1H,  $J = 7,3$  Hz,  $\text{CHMe}_2$ ), 3,68 (s, 3H, 3-OMe), 3,37 (s, 3H, 5-OMe), 6,43 (s, 1H, H-6).

***O*-MÉTHYLATION DE L'ESPINTANOL.**—L'espintanol [3a] (22,5 mg, 0,11 mmol) en solution dans 2 ml de MeOH, est traité par 3 ml (0,21 mmol) de  $\text{CH}_2\text{N}_2$  en solution  $\text{Et}_2\text{O}$ . Le mélange est laissé 18 h en contact à température ambiante; l'excès de  $\text{CH}_2\text{N}_2$  est évaporé sous pression réduite; 17,5 mg (0,078 mmol) de *O*-méthyl espintanol, identique au produit naturel 4 (co-ccm, ir, rnm, sm), sont obtenus.

***O*-MÉTHYL ESPINTANOL [4].**—Huile jaune-brunâtre;  $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3$ , 224, 14; ir (film)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$  2950, 1450, 1400, 1225; sm  $m/z$  (%) 224 (67), 209 (100), 194 (40), 179 (8), 91 (19); rnm  $^1\text{H}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,32 [d, 6H,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ], 2,27 (s, 3H, 1-Me), 3,50 (sepr, 1H,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{CHMe}_2$ ), 3,80 (s, 3H, MeO), 3,82 (s, 3H, MeO), 3,86 (s, 3H, MeO), 6,45 (s, 1H, H-6).

**SYNTHÈSE DU 2,5-DIMÉTHOXY 3-HYDROXY *p*-CYMÈNE OU ISOESPINTANOL [3b] ET DU 3,5-DIMÉTHOXY 2-HYDROXY *p*-CYMÈNE OU ESPINTANOL [3a].**—*3,5-Dinitro 2-hydroxy p-cymène* [6].—Leurvacrol [5] (5,00 g, 33,3 mmol) dissous dans 50 ml AcOH ( $d = 1,05$ ) à basse température (0 à 5°), est traité par une solution de 10 ml  $\text{HNO}_3$  ( $d = 1,40$ ) et 25 ml AcOH ( $d = 1,05$ ). Le mélange réactionnel est ensuite ramené à température ambiante. Après 1 h d'agitation, la solution est versée sur 500 ml de glace pilée puis laissée une nuit à +4°. Après filtration, le produit récupéré est lavé à l'eau froide et recristallisé 2 fois dans le cyclohexane; 6, 10 g de cristaux jaune clair de 6 sont obtenus (rdt 76%).  $F = 115^\circ$  (cyclohexane); microanalyse  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$  (calculé C 50,00, H 5,01, N 11,66, O 33,33; trouvé C 50,30, H 4,90, N 11,50, O 33,31); uv  $\lambda$  max (EtOH) nm (log  $\epsilon$ ) 236 ép. (3,91), 268 (3,69), 406 (3,61); (EtOH + NaOH 0, 1M) 236 (3,91), 262 (3,79), 406 (4,08); sm  $m/z$  (%) 240 (3), 223 (100), 135 (13), 91 (38); rnm  $^1\text{H}$  (60 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,39 (d, 6H,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 2,33 (s, 3H, 1-Me), 3,25 (sepr, 1H,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{CHMe}_2$ ), 7,52 (s, 1H, H-6).

*3,5-Dinitro 2-méthoxy p-cymène* [7].—Le composé 6 (3,00 g, 12,50 mmol) est mis en solution dans 30 ml  $\text{Me}_2\text{CO}$ ; 8,0 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , puis 1,2 ml (12,70 mmol) de  $\text{Me}_2\text{SO}_4$  sont ajoutés sous agitation énergique. Le milieu réactionnel est mis à reflux pendant 3 h; après refroidissement, il est filtré, noyé à l'eau, et extrait par  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . L'extrait brut est chromatographié sur colonne de silice "flash" [solvant d'élution cyclohexane- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (75:25)]; 3,00 g de produit pur 7 sont obtenus (rdt 94%). Microanalyse (amorphe)  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$  (calculé C 51,96, H 5,51, N 11,02, O 31,51; trouvé C 51,74, H 5,70, N 10,82, O 31,38); uv  $\lambda$  max (EtOH) nm (log  $\epsilon$ ) 250 ép. (3,88); sm  $m/z$  (%) 254 (7), 237 (100), 223 (4), 195 (38), 165 (30), 150 (26), 135 (35), 91 (62); rnm  $^1\text{H}$  (90 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,33 [d, 6H,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ], 2,38 (s, 3H, 1-Me), 3,08 (sepr, 1H,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{CHMe}_2$ ), 3,87 (s, 3H, 2-OMe), 7,53 (s, 1H, H-6).

*5-Amino 2-méthoxy 3-nitro p-cymène* [8].—Le composé 7 (2,07 g, 8,15 mmol) dissous, dans 100 ml

de MeOH contenant le catalyseur (C/Pd à 5%), est mis en contact avec de l'hydrogène sous pression atmosphérique, sous forte agitation et à température ambiante. Hydrogène (640 ml) sont consommés; après filtration et évaporation sous pression réduite, 1,738 g de **8** sont obtenus (rdt 95%): uv  $\lambda$  max (EtOH) nm (log  $\epsilon$ ) 242 (4,00), 296 (3,47); ir (film)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$  3470, 3380; sm  $m/z$  (%) 224 (100), 209 (40), 192 (31), 177 (17), 148 (48), 136 (56), 91 (11); rmn  $^1\text{H}$  (90 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,33 [d, 6H,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ], 2,20 (s, 3H, 1-Me), 2,86 (sepr, 1H,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{CHMe}_2$ ), 3,73 (s, 3H, 2-OMe), 6,53 (s, 1H, H-6).

**5-Hydroxy 2-méthoxy 3-nitro p-cymène [9].**—Le composé **8** (1,36 g, 6,08 mmol) est mélangé avec 15 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (20%) sous agitation forte et à froid (0 à 5°).  $\text{NaNO}_2$  (0,42 g, 6,08 mmol) dissous dans 1 ml d'eau froide est ajouté goutte à goutte en maintenant la température en dessous de +5°, et l'agitation est maintenue pendant 10 min. Le milieu réactionnel est laissé au repos et la solution est versée sur 13,5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (60%); on laisse ensuite remonter la température et on termine à 160° pendant 10 min. Après refroidissement, le milieu réactionnel est dilué à l'eau, neutralisé par  $\text{NH}_4\text{OH}$  et extrait par  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La phase organique, lavée à l'eau, séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre et évaporée sous pression réduite, livre un résidu de 1,06 g. Le composé **9** est purifié par cristallisation dans l'hexane (rdt 46%):  $f = 105-107^\circ$  (hexane); microanalyse  $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_4$  (calculé C 58,66, H 6,66, N 6,22, O 28,46; trouvé C 58,64, H 6,66, N 6,24, O 28,42); uv  $\lambda$  max (EtOH) nm (log  $\epsilon$ ) 217 ép. (3,98), 280 (3,49); (EtOH + NaOH 0,1M) 245 (4,01), 301 (3,62); sm  $m/z$  (%) 225 (100), 208 (57), 193 (43), 149 (29), 91 (48); rmn  $^1\text{H}$  (90 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,33 [d, 6H,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ], 2,22 (s, 3H, 1-Me), 2,80 (sepr, 1H,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{CHMe}_2$ ), 3,74 (s, 3H, 2-OMe), 5,52 (s, 1H, OH), 6,62 (s, 1H, H-6).

**2,5-Diméthoxy 3-nitro p-cymène [10].**—Le composé **9** (0,5 g, 2,22 mmol) en solution dans 10 ml  $\text{Me}_2\text{CO}$ , est O-méthylé dans les conditions indiquées ci-dessus; **10** est obtenu avec un rendement de 90%: sm  $m/z$  (%) 239 (100), 222 (43), 207 (31), 194 (27), 164 (28), 148 (50), 91 (57); rmn  $^1\text{H}$  (90 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,30 [d, 6H,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ], 2,30 (s, 3H, 1-Me), 2,80 (sepr, 1H,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{CHMe}_2$ ), 3,75 (s, 3H, 2-OMe), 3,83 (s, 3H, 5-OMe), 6,78 (s, 1H, H-6).

l'IBBA et ont toutes été typifiées par les techniques isoenzymatiques. Z1, Z2, Z2 CL4, 13379 CL3, 13379 CL5, 13379 CL6, 13379 CL8, C8 CL1, 31R 16 CL1, A98 CL5, MIL4 CL10, M 6241 CL6, 9280 CL1, CL27 R 27 CL1, Y, Tulahuen, A97 CL7, A 99 CL7, R 107, TeC12.

*Conditions de culture.*—Les épimastigotes sont cultivés à 28° et maintenus en culture in vitro par repiquages successifs (chaque semaine) en milieu LIT complet (Yaeger's Liver Infusion Tryptose) pH 7,2 auquel on ajoute 1% de sérum de veau foetal décomplémenté et une solution d'antibiotiques contenant 0,25 mg/ml de streptomycine et 250 U/ml de pénicilline. Les épimastigotes sont employés pour les essais en phase de croissance exponentielle à la concentration de  $3 \text{ à } 6 \times 10^6/\text{ml}$ .

*Méthodologie.*—Les composés sont dissous dans le DMSO puis dans le milieu de culture, la concentration finale de DMSO n'excédant pas 0,5%. La solution est ensuite filtrée (Millipore, 0,22  $\mu\text{m}$ ). A 1 ml de solution contenant les parasites, on ajoute 1 ml d'une solution contenant le produit à tester, la concentration finale du produit étant de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , et 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Les essais sont réalisés en microplaques stériles (Falcon) de 96 puits de 0,35 ml en triplicate. Après 48 h d'incubation à 28° des parasites avec ou sans produit, on effectue une observation microscopique directe pour évaluer l'effet antiparasitaire en comparant avec les puits témoins. Les résultats sont exprimés par la concentration théorique inhibant 90% des parasites (IC 90).

Le Glucantime<sup>®</sup> et la Lomidine<sup>®</sup>, médicaments de référence pour les essais avec les *Leishmania* d'une part, le nifurtimox et le benznidazole pour les essais avec *T. cruzi* d'autre part, sont employés aux mêmes concentrations que le produit à tester.

*Essai in vivo sur Leishmania.*—Des souris Balb/C mâles pesant 18–22 g sont infectées par *L. mexicana amazonensis* (PH8) par inoculation sous-cutanée de  $10^6$  amastigotes sous la surface ventrale du coussinet de la patte arrière droite, l'autre patte arrière servant de témoin. Chaque groupe expérimental comprend 10 souris. Le médicament de référence utilisé est le Glucantime<sup>®</sup>. Le diamètre des lésions est mesuré chaque semaine en lecture directe, avec un vernier calibré, en commençant les lectures une semaine avant l'inoculation et en continuant pendant 9 semaines. Le diamètre de la lésion est la différence d'épaisseur entre la patte témoin et celle infectée, ce qui correspond à l'Indice Leishmaniose (IL). Le traitement commence 24 h après l'inoculation des parasites et se fait en sous-cutanée par voie générale pendant 14 jours consécutifs. L'espintanol est dissous dans 250  $\mu\text{l}$  de Tween 80. Le groupe témoin reçoit 0,5 ml d'une solution de PBS (Phosphate Buffer Saline) et 250  $\mu\text{l}$  de Tween 80, le groupe Glucantime<sup>®</sup> (200 mg/kg par jour) et le groupe espintanol (200 mg/kg par jour). DL 50 de l'espintanol sur souris Balb/C:  $>800 \text{ mg}/\text{kg}$  à 72 h.

#### REMERCIEMENTS

Les auteurs expriment leur gratitude aux Dr. F. Brénière et P. Desjeux (IBBA) pour les typifications des souches de *Trypanosoma* et de *Leishmania* ssp.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. J. Zhang, A.R.O. El-Shabrawy, M.A. El-Shanawany, P.L. Schiff Jr., et D.J. Slatkin, *J. Nat. Prod.*, **50**, 800 (1987).
2. G.J. Arango, D. Cortes, B.K. Cassels, A. Cavé, et C. Mérienne, *Phytochemistry*, **26**, 2093 (1987).
3. G. Arango, D. Cortes, et A. Cavé, *Phytochemistry*, **26**, 1227 (1987).
4. W.L. Lasswell Jr. et C.D. Hufford, *Phytochemistry*, **16**, 1439 (1977).
5. S.L. Croft, *Parasitol. Today*, **2**, 64 (1986).
6. J.D. Berman, *Rev. Infect. Dis.*, **10**, 560 (1988).
7. M. Tibayrenc, M. Ward, P. Moya, et F.J. Ayala, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **83**, 115 (1986).
8. B. Cover et W.E. Gutteridge, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **75**, 274 (1981).