

Piperina, seus análogos e derivados: potencial como antiparasitários

Ferreira, W. S., Franklim, T. N., Lopes, N. D., e de Lima, M. E. F. *

Resumo

Neste artigo encontram-se descritas a importância e a potencialidade da amida natural piperina, como precursora de novas moléculas com aplicação na modulação de fenômenos biológicos. A principal fonte de obtenção da piperina são os frutos da pimenta do reino (*Piper nigrum*, Piperaceae). Foi focalizado neste trabalho o potencial antiparasitário do produto natural, seus análogos e derivados frente a dois protozoários da família dos tripanossomatídeos, o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas; e a *Leishmania* sp., que envolve um complexo de protozoários responsáveis pelas leishmanioses, que se apresentam em diferentes formas de manifestações clínicas severas, as quais podem culminar na morte dos pacientes infectados. Além disso, também são discutidos aqui aspectos envolvendo a acessibilidade ao produto natural, visto que o Brasil é um grande produtor de pimenta do reino; métodos de extração, bem como a sua biossíntese.

Palavras-chave: piperina; pimenta do reino; doença de Chagas; leishmaniose; produtos naturais; fármacos antiparasitários

PIPERINE, ITS ANALOGUES AND DERIVATIVES: POTENTIAL AS ANTIPARASITIC DRUGS

Abstract

This paper describes the importance and potentiality of natural piperine as precursor of new bioactive molecules. This natural product has the fruits of black pepper (*Piper nigrum*, Piperaceae) as its main source. We focused herein its potential antiparasitic activity against two important protozoa of the Trypanosomatidae family: *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease; and *Leishmania* sp., which involves a complex of protozoan responsible for leishmaniasis. These two diseases are responsible for different forms of severe clinical manifestations which can culminate in the

death of affected patients. In addition, some aspects involving the accessibility of this natural product; extraction methods; as well as its biosynthesis are also discussed herein.

Keywords: piperine; black pepper; Chagas' disease; leishmaniasis; natural products, antiparasitic drugs

* Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas. BR 465 Km 07 – 23.890-000 – Seropédica, RJ. (marco@ufrj.br).

PIPERINA, SEUS ANÁLOGOS E DERIVADOS: POTENCIAL COMO ANTIPARASITÁRIOS

Welisson S. Ferreira,^{a,b} Tatiany N. Franklim,^a Natália D. Lopes^a e Marco Edilson F. de Lima^{a*}

^aUniversidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas. BR 465 Km 07 – 23.890-000 – Seropédica, RJ.

^bCentro Federal de Educação Tecnológica Celso Suckow da Fonseca, Unidade-sede. Av. Maracanã, 229 – 20271-110- Maracanã, RJ.

*(marco@ufrj.br)

1. Introdução
2. Atividades biológicas da piperina
3. Metodologias de síntese para a piperina
4. Doenças negligenciadas
 - 4.1. Leishmaniose
 - 4.2. Doença de Chagas
5. Conclusões
6. Agradecimentos
7. Referências bibliográficas

1. INTRODUÇÃO

Algumas das moléculas que mais salvaram vidas humanas em toda a história foram, por exemplo, a quinina (1), extraída da *Cinchona officinalis* (Rubiaceae) e a penicilina G (2), obtida de processos fermentativos do *Penicillium chrysogenum* (Trichocomaceae) (Figura 1). Outra molécula natural de grande importância é o taxol (3), isolado pela primeira vez de *Taxus brevifolia* (Taxaceae). O taxol é um fármaco antitumoral, com ação antimetabólica, que possui aplicação no tratamento de diferentes tipos de cânceres, como o de ovário, pulmão, melanomas e de mama. O taxol age sobre o citoesqueleto, interrompendo o processo de citocinese, através da interferência no equilíbrio tubulina-microtúbulos. Assim, vemos que os produtos de origem natural ocupam posição de destaque quando o assunto é o desenvolvimento de novos fármacos, principalmente na área de quimioterapia de doenças infecciosas e do câncer.¹⁻⁴ Outro dado relevante aparece na análise do número de produtos naturais e seus derivados que figuram na lista de medicamentos considerados essenciais pela Organização Mundial de Saúde. A 17ª revisão desta lista, atualizada em março de 2011, inclui cerca de 350 diferentes fármacos.⁵

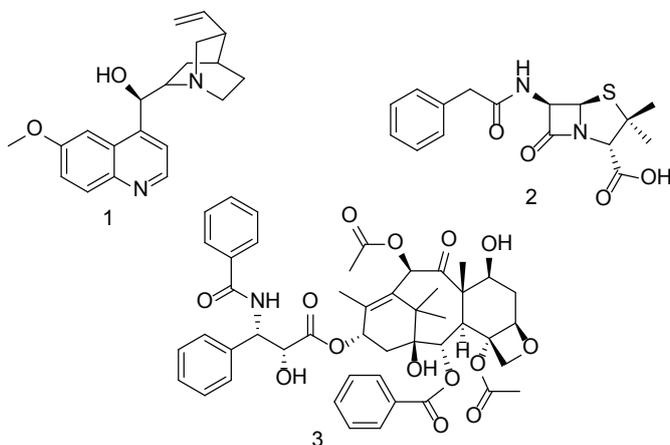


Figura 1. Quimioterápicos de origem natural.

Newman e Cragg publicaram um levantamento, em 2007, onde é descrito que do total de 1.184 novos fármacos introduzidos no mercado entre os anos de 1981 e 2006, 974 foram micromoléculas de origem natural, sintética ou semissintética.³ Estas novas micromoléculas foram agrupadas por indicação terapêutica e por fonte de origem. A análise dos números levantados neste trabalho deixa clara

a expressiva participação dos produtos naturais, direta ou indiretamente, no desenvolvimento destes novos fármacos. Por exemplo: na área dos antitumorais, de um total de 81 novas micromoléculas introduzidas para esta aplicação terapêutica, apenas 22,2 % (18 moléculas) não tiveram a participação direta ou indireta de produtos naturais no seu planejamento. As demais 63 micromoléculas (77,7%) introduzidas como antitumorais foram produtos naturais per se; ou derivados semissintéticos de produtos naturais; ou derivados sintéticos que tiveram seus farmacóforos planejados a partir do conhecimento da atividade descrita para produtos naturais; ou ainda substâncias de origem sintética que de alguma forma mimetizam produtos naturais. Das 13 novas moléculas introduzidas no mercado como fármacos antiparasitários, neste período, apenas 4 (30,7%) não tiveram a participação de produtos naturais no seu planejamento. Outro dado relevante que aparece na análise dos números apresentados neste trabalho é o reduzido percentual de novas moléculas desenvolvidas para utilização como antiparasitários, comparado com outras aplicações terapêuticas, o que evidencia a grande lacuna existente nesta área, bem como a necessidade de se somar esforços no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento deste conjunto de enfermidades.^{2,3}

Ao se imaginar a utilização de produtos naturais como fármacos, ou mesmo como matéria-prima para a preparação destes, esbarra-se no fato da maioria dos metabólitos especiais de origem vegetal serem biossintetizados em pequenas quantidades, serem de difícil isolamento, ou ainda, por não serem obtidos de fontes renováveis. A amida natural piperina (4) (Figura 2) está presente em diferentes espécies do gênero *Piper*, sendo mais abundante nos frutos de *Piper nigrum*.⁶ Conhecida popularmente no Brasil como pimenta do reino, *P. nigrum* tem seu uso bastante difundido na medicina popular da Índia, país de onde é originária, sendo que no Brasil seu principal uso é como condimento. A composição química da pimenta do reino vem motivando estudos científicos há quase duzentos anos, uma vez que o primeiro trabalho descrevendo o isolamento da piperina dos frutos de *P. nigrum* foi descrito em 1819 pelo químico e físico dinamarquês Hans Christian Oersted.⁷ Posteriormente, foi realizada a determinação estrutural desta amida

natural, como sendo a N-[5-(1,3-benzodioxola-4-il-1-oxo-penta-2E,4E-dienil]-piperidina(4) (Figura 2). Outras amidas, em menores concentrações, foram posteriormente isoladas da pimenta do reino, mas atribui-se principalmente à piperina o sabor pungente deste condimento.^{6,7} Apesar de ser considerada uma planta exótica, o Brasil é um dos grandes produtores mundiais de pimenta do reino, com um total de 35.120 toneladas, colhidas em cerca de 20.000 hectares de área cultivada no ano de 2006. Destaca-se como principal produtor o estado do Pará (78%), seguido pelo Espírito Santo (16%).⁸

Outro ponto relevante em relação a este produto natural é a sua abundância, sendo extraído em rendimentos de cerca de 3-7%, a partir dos frutos secos da planta.⁹ Além disso, devido à maior ocorrência da amida nos frutos, a pimenta do reino constitui-se como uma fonte renovável para esta substância, visto que com manejo adequado pode-se realizar colheitas sem comprometer a planta. A colheita é feita em três épocas: a primeira no mês de junho, a segunda em torno do mês de agosto, e a terceira e última colheita ocorre em outubro.¹⁰

1.1- Biossíntese da piperina

A piperina (4) é composta por um grupo 1,3-benzodioxola (subunidade A), ao lado de uma cadeia de ácido pentadienoico (subunidade B) e o fragmento piperidina (subunidade C) (Figura 2).

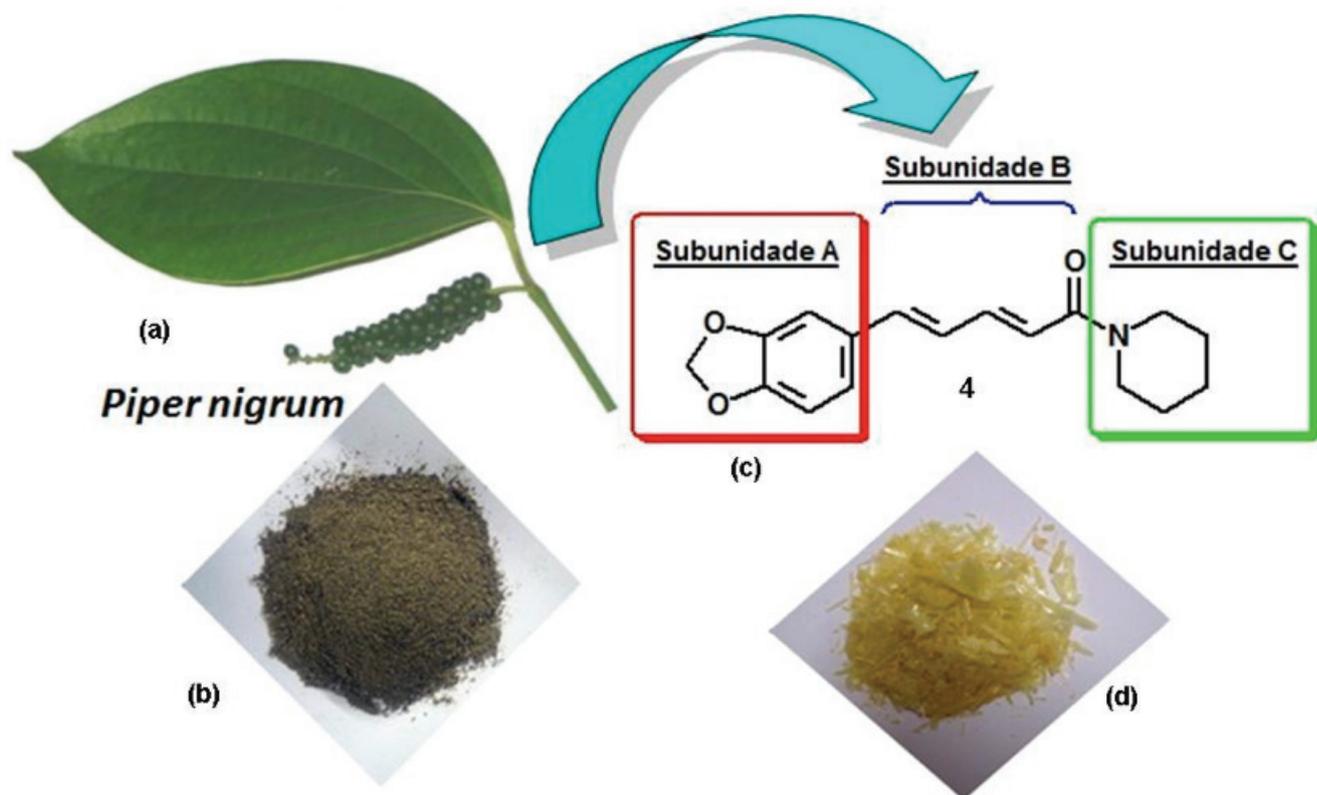
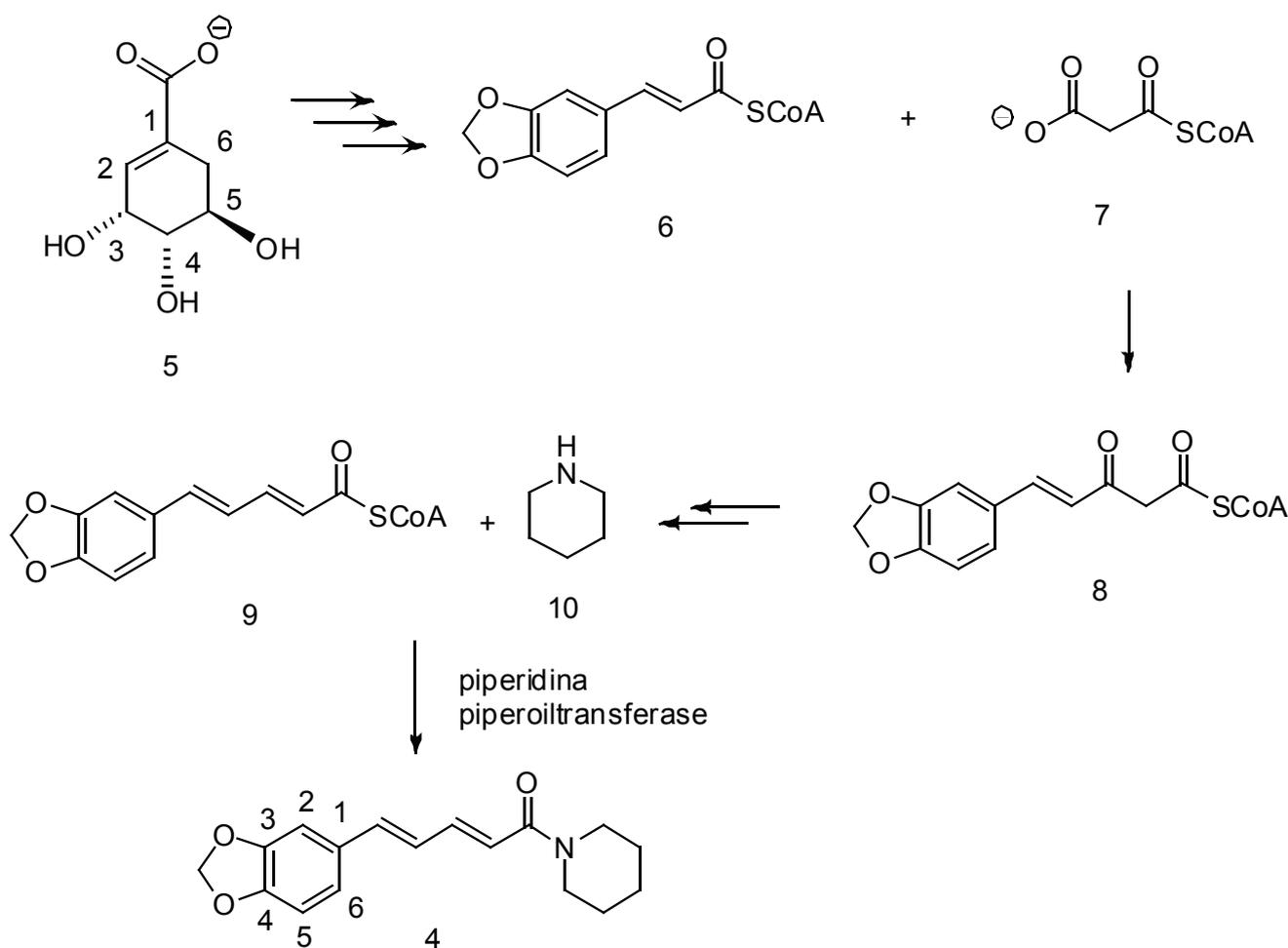


Figura 2. Frutos frescos (a) e moídos (b) de *P. nigrum*. Estrutura (c) e cristais (d) da amida natural piperina (4).

O ácido pipérico, porção acil da molécula da piperina (subunidades A e B, Figura 2), tem como precursor o respectivo derivado cinamoil-SCoA (6) (Esquema 1), o qual é biossintetizado a partir do ácido chiquímico (5), podendo apresentar diferentes padrões de oxigenação no anel aromático (nos carbonos 3, 4 e 5), sendo que o anel 3,4-metilenodioxi é bastante comum na classe dos fenil-propanoides (C_6-C_3). Após reação do derivado cinamoil-SCoA (6) com uma unidade de malonil-SCoA (7), seguida da redução da enona (8) e de uma β -eliminação, obtem-se o tioéster piperoil-SCoA (9), que reage com piperidina (10), formando a piperina (4).^{11,12} Desde o início dos estudos biossintéticos da piperina, foi proposto que sua formação dava-se por condensação da piperidina (10) com o tioéster piperoil-SCoA (9) (Esquema 1). Geissman e Crout,¹³ na década de 70, propuseram uma rota biossintética para a piperina que somente pôde ser confirmada após a descoberta da enzima piperidina piperoiltransferase. Esta enzima mostrou-se específica para piperidina, alcançando 100% de atividade relativa.¹²



ESQUEMA 1. Proposta biossintética para a formação da piperina.^{12,13}

1.2- MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DA PIPERINA

A extração de substâncias orgânicas por solventes, através de aquecimento e refluxo, é uma técnica tradicional que pode ser utilizada para o isolamento da piperina. Atualmente este método continua sendo adaptado e aprimorado, devido principalmente à sua versatilidade, baixo custo e também visando a otimização de tempo e rendimento. A extração por aquecimento e refluxo pode ser melhorada através da utilização de ultrassom e/ou líquidos iônicos orgânicos.¹⁴

O extrator de Soxhlet é um dos equipamentos mais usados de extração contínua no isolamento da piperina e seu funcionamento consiste na utilização de um solvente apropriado (que no caso da piperina

é normalmente o etanol).⁹ Subramaniam e colaboradores realizaram a extração contínua da piperina utilizando para isso um extrator de Soxhlet modificado, do tipo DBSA (Double Bypasses Soxhlet Apparatus), aumentando assim o número de ciclos de refluxo e diminuindo o tempo de extração.¹⁵ Depois de obtido o extrato, o isolamento da piperina pode ser realizado tanto por técnicas cromatográficas convencionais como pela sua simples precipitação, após remoção dos taninos presentes e adição de água em meio alcoólico básico.⁹

Além dos métodos mencionados para a obtenção da piperina, encontra-se descrito na literatura uma proposta alternativa relacionada à produção da amida natural em cultura líquida, induzida por fungos endofíticos (*Periconia* sp.), isolados de *Piper Longum*.¹⁶ Esta é uma alternativa bastante promissora para obtenção da piperina e outras substâncias bioativas em larga escala, principalmente pela possibilidade de preservar a estrutura física e a biodiversidade de plantas fitoterápicas.

2-ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA PIPERINA

A variedade de atividades biológicas exibida pela piperina é bastante ampla. A utilização da pimenta do reino como condimento é tão antiga quanto o conhecimento de suas propriedades inseticidas, que foram cientificamente constatadas apenas em 1924.¹⁷ Desde então, várias pesquisas foram desenvolvidas com o intuito de identificar as substâncias responsáveis por esta e outras atividades de *P. nigrum*. Como a piperina é a piperamida que ocorre em maior proporção na planta, esta se tornou o principal alvo de avaliações biológicas.^{18,19} Algumas destas atividades encontram-se sumarizadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Algumas das atividades biológicas da piperina.

Atividades biológicas	Referências
Amebicida	20, 21
Anticonvulsivante	22
Antidepressiva	23, 24
Antifúngica	21, 25
Anti-inflamatória	26, 27
Antitumoral	28, 29

Antimalárica*	30
Hepatoprotetora	31, 32
Inseticida	33-35
Inibição da resistência bacteriana	36
Leishmanicida	37-40
Protetora do SNC**	41
Reguladora do metabolismo lipídico	42
Tripanocida	43-47

*Em associação com outros fármacos

**Sistema Nervoso Central

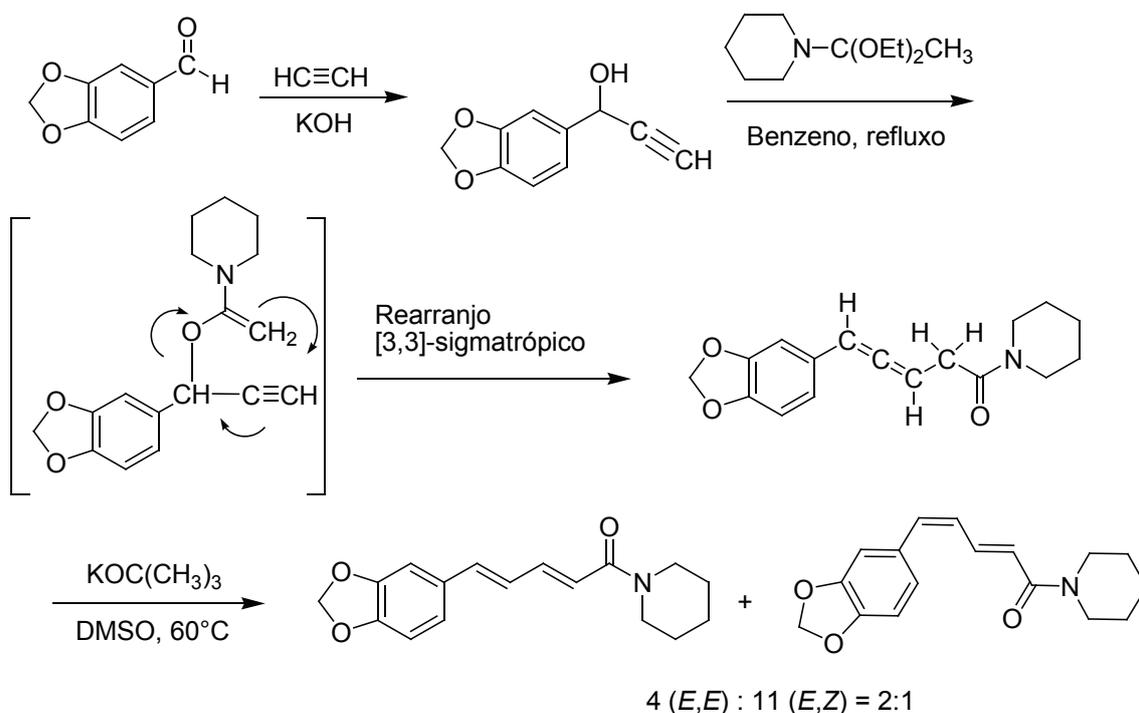
Uma das propriedades biológicas mais interessantes e relevantes da piperina está na sua capacidade de aumentar a biodisponibilidade de outros medicamentos, quando combinados à mesma. Este efeito promove uma maior concentração plasmática dos fármacos, aumentando sua eficiência devido à inibição do metabolismo hepático.⁴⁸ A maior parte das pesquisas nesta área relatam aumentos significativos na concentração plasmática tanto de fármacos como de demais compostos ativos, quando administrados em associação. Entre estes, podemos citar a vasicina (mucolítico) e a esparteína (anti-arritmico);⁴⁹ o propranolol (anti-hipertensivo), a teofila (anti-asmático) e a fenitoína (anti-epilético);⁵⁰ o diaril-heptanóide curcumina (antitumoral);⁵¹ em combinações para o tratamento da doença de Alzheimer;⁵² e no tratamento da malária-resistente à artemisinina.³⁰

Como pode ser visto na Tabela 1, encontram-se na literatura vários trabalhos descrevendo a avaliação da atividade da piperina frente a diferentes enfermidades.

3- METODOLOGIAS DE SÍNTESE PARA A PIPERINA

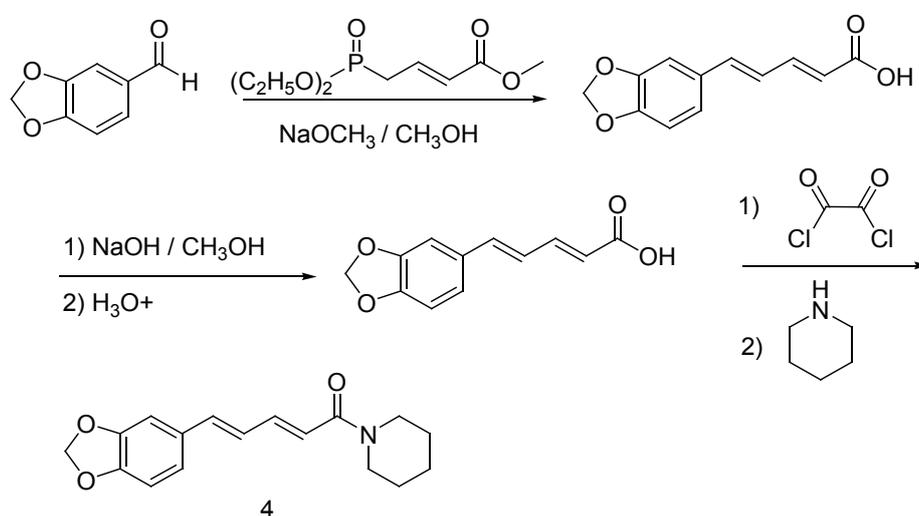
Devido ao fato da piperina ser um produto natural que se destaca por sua abundância, facilidade de extração, permitindo assim a avaliação de seu variado perfil de atividades biológicas, diferentes grupos de pesquisa trabalharam no desenvolvimento de rotas sintéticas que viabilizaram o acesso a este tipo de estrutura. A partir de pequenas modificações nas estratégias sintéticas estudadas, tornou-se possível

o acesso a diferentes alquenilamidas estruturalmente relacionadas. Esta abordagem permitiu a realização de estudos de REA (Relação Estrutura-Atividade) que levaram à compreensão dos requisitos estruturais relevantes para as diferentes atividades biológicas estudadas nesta classe de substâncias. Dentre as estratégias sintéticas descritas na literatura, foram selecionadas quatro, apresentadas a seguir. Em 1979 Tsuboi e Takeda descreveram uma abordagem que tem o rearranjo [3,3]-sigmatrópico de um éter de enol como etapa-chave (**Esquema 2**). A partir desta abordagem a piperina (4) e seu isômero, isochavicina (11), foram obtidas numa proporção de 2:1, em 57% de rendimento global.⁵³



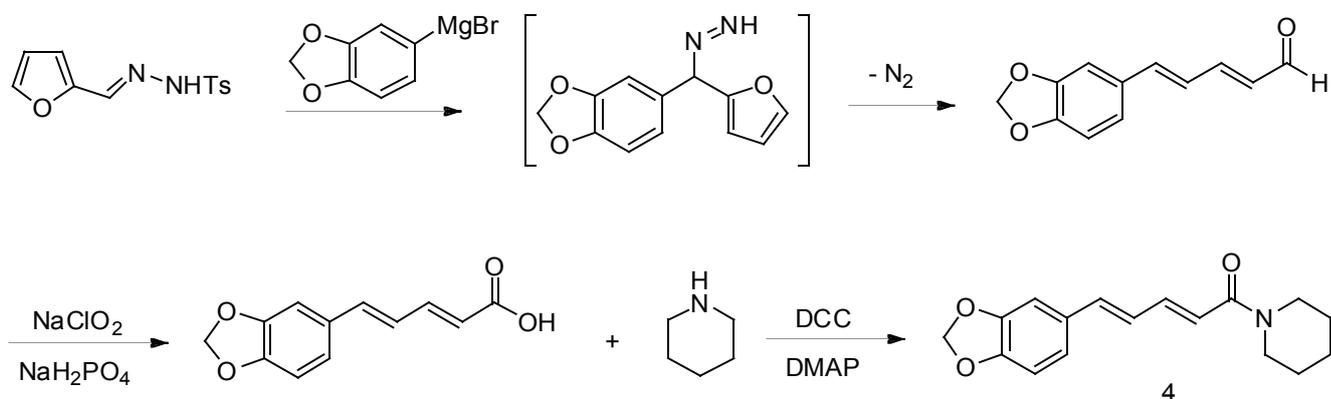
Esquema 2. Metodologia sintética descrita por Tsuboi e Takeda.⁵³

Sloop propôs, em 1995, a preparação da piperina, tendo como etapa-chave uma reação de Emmons-Horner do piperonal com o fosfonato adequado.⁵⁴ Após hidrólise do éster metílico e preparação do respectivo cloreto de acila, a piperina (4) foi obtida pela reação deste com piperidina em rendimento global de 50% (**Esquema 3**). Esta é uma sequência clássica para a obtenção destas amidas, tendo sido utilizada em diversos trabalhos de síntese de alquenilamidas relacionadas.



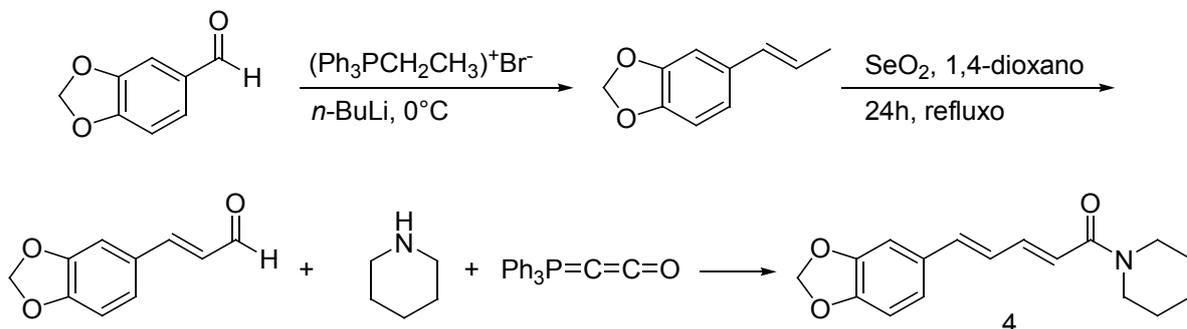
Esquema 3. Abordagem sintética descrita por Sloop.⁵⁴

Em 2000, Chandrasekhar e colaboradores descreveram uma rota sintética envolvendo a reação de tosil-hidrazonas com o derivado organomagnésiano 1,3-benzodioxola.⁵⁵ Nesta abordagem a piperina (4) foi obtida em 3 etapas, em 43% de rendimento global (**Esquema 4**).



Esquema 4. Metodologia sintética descrita por Chandrasekhar e colaboradores.⁵⁵

Em 2001 foi descrita por Schobert e colaboradores uma metodologia sintética extremamente interessante, através da qual foi possível a síntese da piperina e de outras amidas relacionadas.⁵⁶ A etapa-chave desta metodologia envolveu a reação de Wittig entre um aldeído cinâmico e uma piperidinil-fosforanoacetamida, gerada in situ, numa abordagem multicomponente, que possibilitou a preparação da piperina (4) em 54% de rendimento global (**Esquema 5**).



Esquema 5. Abordagem sintética desenvolvida por Schobert e colaboradores.⁵⁶

A piperina, devido às suas características peculiares, tem servido ainda de precursor para outros derivados em trabalhos de modificação estrutural. Alguns destes trabalhos, envolvendo a preparação e avaliação de derivados como antiparasitários, serão discutidos a seguir.

4- DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

As doenças tropicais como a dengue, leishmaniose, doença de Chagas, malária, doença do sono, filariose linfática e a esquistossomose continuam sendo a principal causa da morte de milhões de pessoas, que vivem principalmente em comunidades pobres nos países em desenvolvimento. Embora as doenças tropicais, juntamente com a tuberculose, sejam responsáveis por 11,4% da causa global de quadros clínicos desabilitantes, apenas 21 (1,3%) dos 1.556 novos medicamentos registrados entre 1975 e 2004

foram especificamente desenvolvidos para o tratamento deste conjunto de infecções.^{57,58} Vários estudos foram realizados visando o desenvolvimento de fármacos, a partir de produtos naturais, para o tratamento dessas doenças.^{59,60} Estas enfermidades são conhecidas como doenças negligenciadas, principalmente pela falta de investimentos por parte da indústria farmacêutica e pela escassez de políticas públicas voltadas à sua prevenção. As conexões entre saúde e direitos humanos são bastante

claras, uma vez que a saúde é diretamente afetada por condições adversas de saneamento básico, além de políticas públicas mal elaboradas. Uma equipe da Organização Mundial da Saúde (OMS) realizou, em 2007, uma análise focalizando o problema das doenças negligenciadas como causa e consequência da violação aos direitos humanos básicos.⁶¹ Falhas no suprimento e na possibilidade de acesso a água tratada, rede e tratamento de esgoto, moradias adequadas, educação e participação aumentam a vulnerabilidade destas populações às mais variadas infecções. Além disso, as pessoas acometidas por doenças negligenciadas têm seus direitos violados em diferentes aspectos como, por exemplo, no acesso a tratamentos eficientes e adequados para suas enfermidades, na dificuldade em encontrar trabalho e na discriminação que sofrem em muitos lugares por serem portadores de uma doença debilitante e, muitas vezes, desfigurante. Além disso, essas populações encontram-se alijadas da possibilidade de se beneficiarem do desenvolvimento científico alcançado pela humanidade, o qual deveria estar disponível a todos.⁶¹ Neste trabalho, do conjunto das doenças negligenciadas, será dado enfoque a duas parasitoses causadas por protozoários da família dos tripanossomatídeos, a leishmaniose e a doença de Chagas.

4.1- LEISHMANIOSE

A leishmaniose é transmitida por insetos hematófagos conhecidos como flebótomos ou flebotomíneos, popularmente conhecidos como mosquito palha ou birigui. Esta doença é causada por mais de 20 espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, pertencentes à família Trypanosomatidae, podendo se apresentar em três manifestações clínicas diferentes: leishmaniose cutânea ou tegumentar (LC), leishmaniose muco-cutânea (LMC) e a leishmaniose visceral (LV).⁶²

No Brasil, a média de casos de LV e LC no período de 2005 a 2009 foi de 3.679 e 24.684 caso/ano, respectivamente.⁶³ O tratamento no homem é feito por administração de alguns fármacos, tais como o antimoniato de meglumina (12), a pentamidina (13), a anfotericina B (14) e a miltefosina (15).⁶² Diversos trabalhos foram desenvolvidos na área de produtos naturais, visando o desenvolvimento de novos fármacos aplicáveis ao tratamento da leishmaniose.⁶⁴

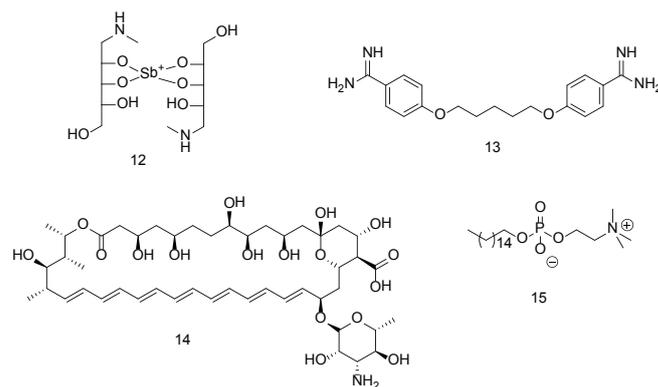


Figura 3. Fármacos com atividade leishmanicida.⁶²

A literatura relata vários trabalhos envolvendo a atividade leishmanicida de piperina (4). Primeiramente Kapil relatou a atividade leishmanicida in vitro da piperina contra cepas de *Leishmania donovani*, tendo como referência a pentamidina (13), fármaco indicado para o tratamento desta doença.³⁷ Posteriormente, Raay e colaboradores descreveram as atividades in vivo sobre hamsters infectados com *L. donovani*, apresentando significativa diminuição da parasitemia com doses extremamente baixas (6mg/kg).³⁸ Visando melhorar a farmacocinética da piperina (4), Veerareddy e colaboradores prepararam microemulsões com piperina em sistema água/lipídios.³⁹ Os resultados obtidos neste trabalho foram extremamente significativos, visto que ratos infectados com *L. donovani*, quando tratados com piperina, apresentaram uma redução de 38% na parasitemia; já aqueles tratados com piperina em microemulsão tiveram a parasitemia diminuída em 90%.³⁹

Em trabalho recente, Ferreira e colaboradores avaliaram o efeito tóxico da piperina (4) e alguns de seus derivados e análogos (16-20) (Figura 4) contra formas promastigota e amastigota intracelular de *L. amazonensis*.⁶⁵ As avaliações destes derivados mostraram a importância da função piperamida (subunidade C, Figura 2) e da presença dos quatro carbonos olefinicos (subunidade B) do produto natural no efeito tóxico contra o parasito na forma amastigota. Além disso, observou-se que a presença do substituinte 3,4-metilenodioxo no núcleo aromático (subunidade A) foi irrelevante para o efeito antiparasitário observado.⁶⁵ Do conjunto de moléculas avaliadas neste estudo (4; 16 a 20), a piperina (4) e o derivado fenilamida (16) apresentaram um melhor perfil de atividade. A piperina apresentou concentração inibitória para 50% (CI50) de 14,2µM

contra promastigotas e $CI_{50} = 28\mu\text{M}$ contra amastigotas de *L. amazonensis*. Já o derivado (16) apresentou valores de $CI_{50} = 28,9\mu\text{M}$ e $24,5\mu\text{M}$ contra promastigotas e amastigotas, respectivamente. Nestas avaliações foram usadas a anfotericina B (14) e a miltefosina (15) (Figura 3) como controles positivos.⁶⁵

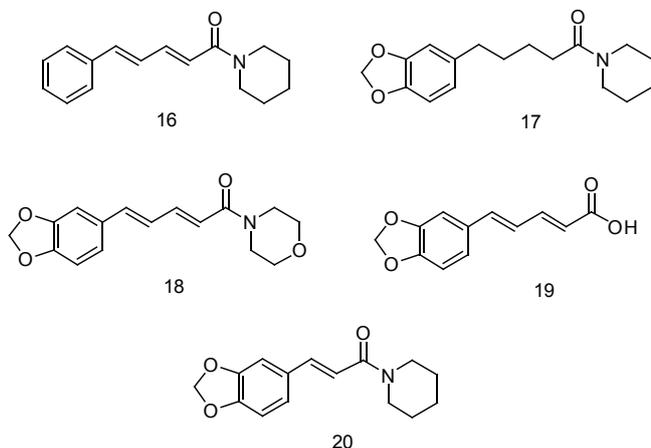


Figura 4. Derivados e análogos da piperina, avaliados por Ferreira e colaboradores.⁶⁵

Investigações sobre os prováveis mecanismos de ação dos compostos mais ativos, a amida natural (4) e seu análogo sintético (16), indicaram a interferência destas amidas na biossíntese de lipídeos na célula do parasito. Além disso, foram observados efeitos importantes sobre o ciclo celular da *L. amazonensis*, sugerindo uma ação sobre microtúbulos ou ainda inibição da topoisomerase do parasito. Outro aspecto importante observado neste trabalho envolveu o efeito tóxico da piperina e de seu análogo sobre a mitocôndria de *L. amazonensis*, fato observado em ensaios bioquímicos e por microscopia eletrônica de transmissão.⁶⁵

Recentemente, Singh e colaboradores utilizaram a estratégia de hibridação molecular, preparando amidas da piperina com ésteres metílicos de aminoácidos naturais, visando avaliar suas atividades leishmanicidas.⁴⁰ Esta estratégia se baseou na combinação das informações já descritas sobre as atividades leishmanicidas da amida natural (4) (Figura 2) e de ésteres de aminoácidos e de dipeptídeos.⁶⁶ Os compostos desenhados por Singh foram sintetizados a partir da hidrólise da piperina e posterior reação do mesilato do ácido pipérico com ésteres metílicos de diferentes α -aminoácidos, gerando os derivados (21) a (25) (Figura 5).⁴⁰

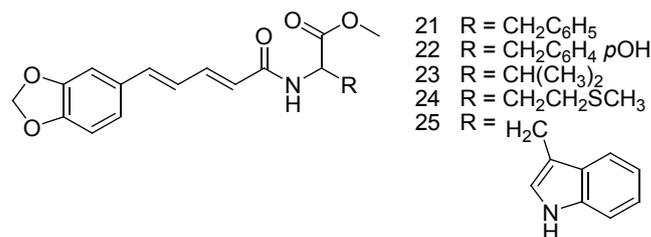


Figura 5. Estrutura dos derivados mais ativos, preparados por Singh e colaboradores.⁴⁰

A atividade leishmanicida das amidas mostradas na Figura 5 foi avaliada *in vitro* sobre promastigotas e amastigotas de *L. donovani*. Todas as amidas apresentaram maior atividade quando comparadas à piperina ($CI_{50} = 752\mu\text{M}$ contra amastigotas) ou aos ésteres metílicos de aminoácidos, quando avaliados isoladamente (por exemplo, o éster metílico da L-Valina apresentou valor de $CI_{50} = 1.760\mu\text{M}$ frente a amastigotas de *L. donovani*).⁴⁰ Além disso, as amidas (21)-(25) apresentaram atividade mais pronunciada contra a forma amastigota em comparação com a promastigota. O composto com melhor perfil de atividade anti-amastigota, dentre os derivados testados, foi a amida (23), conjugado do ácido pipérico com o éster metílico do aminoácido valina (Figura 5), que apresentou $CI_{50} = 75\mu\text{M}$. A amida (23) foi posteriormente avaliada num modelo de infecção *in vivo* em hamsters. Os resultados foram comparados com a miltefosina, usada como controle positivo ($CI_{50} = 18\mu\text{M}$ e $33\mu\text{M}$ frente a amastigotas e promastigotas, respectivamente).⁴⁰

Estudos de REA, visando avaliar o impacto das modificações estruturais na atividade leishmanicida, demonstraram que a redução das insaturações do espaçador de quatro carbonos presente entre o anel benzodioxola e a carbonila amídica (Figura 6) acarretou a diminuição da atividade anti-amastigota e levou ao incremento da atividade anti-promastigota dos derivados saturados obtidos. Os ácidos carboxílicos correspondentes, gerados pela hidrólise dos ésteres metílicos (Figura 6), apresentaram menor atividade frente às duas formas evolutivas do parasito.⁴⁰ Resultados obtidos através de docking molecular revelaram que o éster metílico piperil-valina (23) pode realizar interações no sítio ativo da enzima adenina fosforribosiltransferase (APRT), que possui papel essencial em amastigotas de *L. donovani*,⁴⁰ evidenciando esta proteína como um alvo promissor na quimioterapia da leishma-

niose.

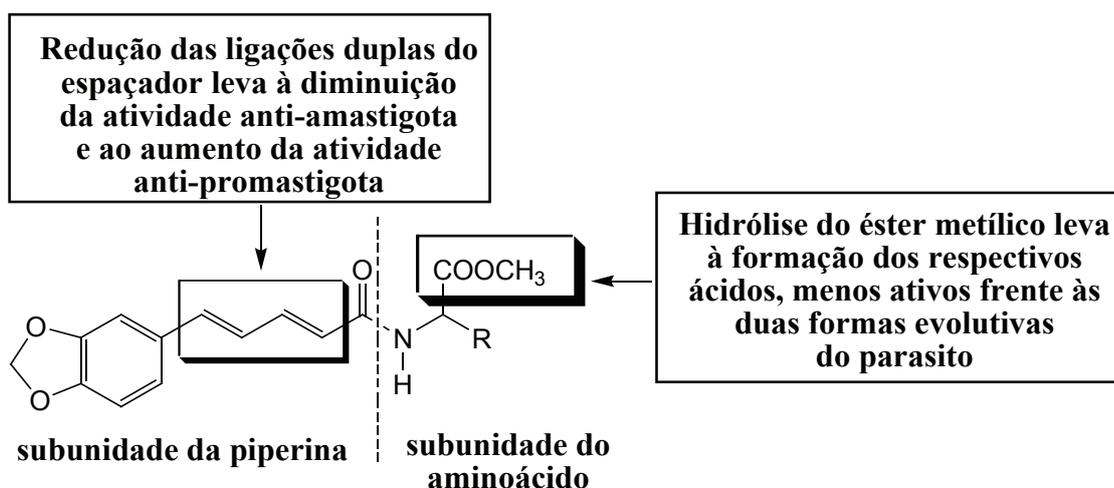


Figura 6. Relação estrutura-atividade dos conjugados do ácido pipérico com ésteres de aminoácidos. ⁴⁰
4.2- Doença de Chagas

4.2- DOENÇA DE CHAGAS

Hoje no Brasil existem dois milhões de pacientes crônicos portadores da doença de Chagas (DC). Destes, seiscentos mil desenvolvem complicações cardíacas ou digestivas que matam cerca de cinco mil pessoas a cada ano.⁶⁷

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da DC, é um protozoário flagelado pertencente à família dos tripanossomatídeos. A DC é uma parasitose bastante frequente em regiões tropicais, principalmente em áreas rurais com níveis de saneamento precário. Sua transmissão endêmica ocorre pelo inseto hematófago, o *Triatoma infestans* (Triatominae), popularmente conhecido como barbeiro, quando suas fezes contaminadas entram em contato com o orifício da picada realizada pelo inseto. Desde a descoberta de todo o ciclo do parasito, descrita em 1909 por Carlos Chagas,^{68,69} ainda nenhum fármaco eficaz foi disponibilizado no mercado para a fase crônica da doença.

A disponibilidade de fármacos aplicáveis ao tratamento da DC, na fase aguda, é extremamente restrita, havendo somente os nitro-heterociclos benzonidazol (26) e nifurtimox (27) (**Figura 7**). A partir de 1980 o nifurtimox (27) teve a sua comercialização interrompida, primeiramente no Brasil e depois em outros países da América do Sul (Venezuela, Chile, Argentina), em razão de seus efeitos tóxicos.⁷⁰

Atualmente, o benzonidazol (26) é o único fármaco destinado ao tratamento desta doença no Brasil, mesmo não sendo eficiente em alguns estágios clínicos e apresentando sérios efeitos colaterais.⁷¹ Observamos na literatura que diferentes alvos moleculares foram investigados visando o desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento da doença de Chagas.⁷²

Nesta abordagem, a diversidade estrutural dos produtos naturais se coloca como uma alternativa na busca por novos antichagásicos. A revisão descrita por Uchiyama relaciona os trabalhos recentemente desenvolvidos na investigação de produtos naturais aplicáveis à quimioterapia da doença de Chagas.⁷³

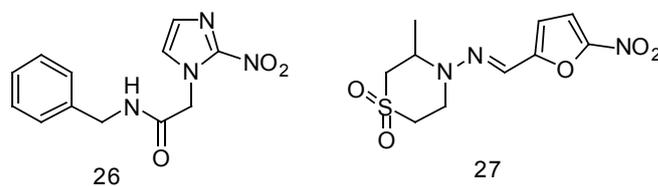


Figura 7. Fármacos com atividade tripanocida.⁷⁰

Tomando como ponto de partida os precedentes da literatura sobre a atividade leishmanicida da piperina, Ribeiro e colaboradores descreveram a atividade tripanocida da amida natural e com base nestes resultados propuseram a síntese de derivados e

análogos (Figura 8), que foram testados frente às formas epimastigota e amastigota do *T. cruzi*.

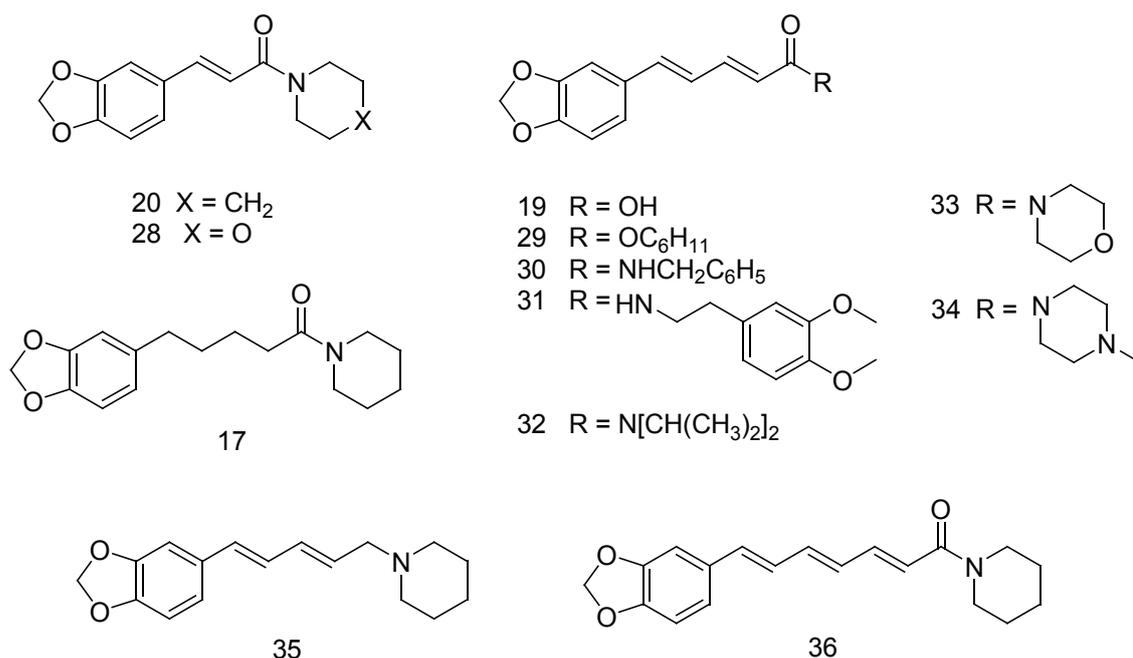


Figura 8. Derivados e análogos da piperina sintetizados por Ribeiro e colaboradores. ^{42,43}

Na avaliação, realizada *in vitro*, a piperina (4) apresentou $CI_{50} = 7,36\mu M$ e $4,91\mu M$ frente às formas epimastigota e amastigota de *T. cruzi*, respectivamente. A síntese de derivados foi uma estratégia que teve como objetivo otimizar o efeito tripanocida da piperina, além de avaliar a importância de algumas subunidades estruturais presentes na amida natural para a atividade antiparasitária estudada.^{43,44} Neste estudo, apesar de não ter sido obtido nenhum derivado mais ativo do que a amida natural, várias informações de REA foram evidenciadas. Verificou-se, por exemplo, a importância do tamanho do espaçador de cinco átomos de carbono, presente entre o anel aromático (subunidade A) e a piperamida (subunidade C) da estrutura da piperina (**Figura 2**), através da síntese dos derivados (20) e (36), que possuem, respectivamente, espaçadores de três e sete átomos de carbono (**Figura 8**). O derivado cinâmico (20) apresentou-se inativo contra o parasito na maior concentração avaliada ($CI_{50} > 96,52\mu M$ para epimastigota). Já o derivado que possui sete carbonos e três insaturações (36) ($CI_{50} = 10,67\mu M$ e $7,40\mu M$, frente às formas epimastigota e amastigota, respectivamente), mostrou atividade comparável à piperina, evidenciando a influência do tamanho da cadeia na atividade tripanocida destas alqueni-lamidas. A presença das insaturações mostrou-se

de importância secundária, uma vez que o derivado saturado da piperina, a amida (17), apresentou discreta redução de atividade contra epimastigotas e amastigotas ($CI_{50} = 19,41\mu M$ e $11,52\mu M$, respectivamente), quando comparado à amida natural. A substituição do grupo piperidinil da amida natural (4) por N,N-diisopropil (32) ($CI_{50} = 14,85\mu M$ e $7,77\mu M$, contra epimastigotas e amastigotas) ou morfolinil (33) ($CI_{50} = 56,13\mu M$ e $5,71\mu M$), diminuiu a atividade inibitória frente à forma epimastigota, sem alterar significativamente a atividade anti-amastigota. Já as amidas primárias (30) e (31), bem como o derivado secundário piperazinil (34) não foram ativos contra epimastigotas. Os resultados obtidos na avaliação da amina alílica (35) ($CI_{50} = 17,49\mu M$ e $9,63\mu M$ frente à epimastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, respectivamente), obtida pela redução da carbonila amídica do produto natural, sugerem que a presença da carbonila não interfere significativamente na atividade. A presença da função nitrogenada mostrou-se de significativa importância, uma vez que o ácido pipérico (19) ($CI_{50} > 114,67\mu M$) e o éster (29) ($CI_{50} > 83,33\mu M$) foram inativos, mesmo nas maiores concentrações avaliadas frente à epimastigotas do parasito.^{43,44}

Dando continuidade à investigação sobre a atividade tóxica da piperina contra *T. cruzi*, o mesmo

grupo de pesquisa realizou estudos de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão em epimastigotas tratados com doses sub-letais (5-8 μM) de piperina para, a partir das observações das alterações ultraestruturais ocorridas no parasito, poder inferir sobre os prováveis mecanismos de ação desta amida natural frente ao *T. cruzi*.⁴⁷ Conforme descrito na literatura, um dos mecanismos utilizados por macrófagos para combater amastigotas do *T. cruzi* é a produção de NO .⁷⁴ Como a piperina é capaz de inibir a formação deste óxido,⁷⁵ sua atividade deve estar diretamente relacionada a uma ação no parasito e não indiretamente pela indução do macrófago. Além disso, o conjunto de alterações ultraestruturais observadas no processo replicativo das formas epimastigotas do *T. cruzi*, quando tratados com piperina, sugerem que o seu efeito não esteja restrito apenas a um alvo do metabolismo do parasito. Verificou-se também neste trabalho o efeito tripanostático da amida natural sobre as formas epimastigotas, evidenciada pela interferência da piperina na citocinese do parasito.⁴⁷

Em trabalho realizado posteriormente por outro grupo de pesquisa, foi descrita a avaliação da atividade da piperina e de outras piperamidas naturais, isoladas de *Piper tuberculatum* e *Piper arboreum*, contra a forma epimastigota de *T. cruzi*.^{76,77} Do conjunto de resultados descritos nestes trabalhos, destacam-se as atividades anti-epimastigota dos análogos naturais da piperina, piperilina (37) e 4,5-di-hidropiperilina (38), isoladas das folhas de *P. arboreum* ($\text{CI}_{50} = 6,57\mu\text{M}$ e $210,0\mu\text{M}$, respectivamente). Estes resultados demonstraram a importância da conjugação entre o núcleo benzodioxola e a carbonila amídica para a atividade tripanocida (Figura 9).⁷⁷

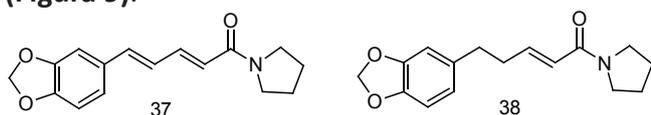


Figura 9. Análogos naturais da piperina, piperilina (37) e 4,5-diidropiperilina (38), isoladas de *P. arboreum*.⁷⁷

Utilizando a estratégia de hibridação molecular, Ferreira e colaboradores sintetizaram uma série de derivados e análogos da piperina com a incorporação de heterociclos mesoiônicos, da classe dos cloridratos 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (Figura 10).^{45,46} Já havia na literatura informações sobre

atividade tóxica contra *L. amazonensis* de moléculas contendo este núcleo heterocíclico. Desta forma, a estratégia de desenho molecular utilizada se baseou na junção das informações sobre a atividade antiparasitária da piperina e a atividade leishmanicida descrita para cloridratos 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina.⁷⁸

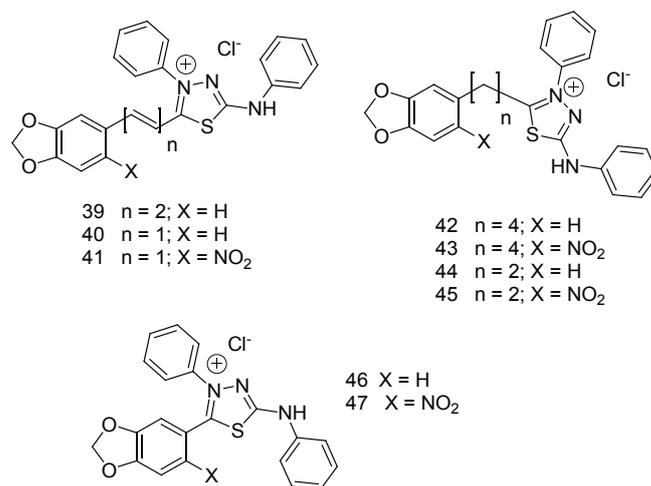


Figura 10. Cloridratos mesoiônicos, derivados e análogos da piperina.^{45,46}

A avaliação da atividade tripanocida dos derivados e análogos do produto natural, segundo Ferreira e colaboradores,⁴⁶ demonstrou a importância da conjugação entre o anel benzodioxola e o heterociclo mesoiônico, implementada pelas cadeias espaçadoras insaturadas presentes nos derivados (39), (40) e (41), com respectivos valores de $\text{CI}_{50} = 10,83\mu\text{M}$; $\text{CI}_{50} = 4,13\mu\text{M}$; e $\text{CI}_{50} = 0,64\mu\text{M}$ contra epimastigotas do *T. cruzi*. A série saturada (42-45) (Figura 10) apresentou uma importante diminuição da atividade. Outro aspecto estrutural evidenciado neste trabalho foi a importância do substituinte nitro no análogo cinâmico (41) para a atividade tóxica contra epimastigotas do *T. cruzi* ($\text{CI}_{50} = 0,64\mu\text{M}$). Contudo, o análogo (41) também apresentou elevada toxicidade frente às células do hospedeiro ($\text{CI}_{50} = 1,95\mu\text{M}$ frente macrófagos murinos). O cloridrato mesoiônico (46), que não possui espaçador entre o anel benzodioxola e o núcleo tiadiazolium apresentou menor atividade tripanocida, com $\text{CI}_{50} = 103,06\mu\text{M}$ contra epimastigotas. O análogo nitrado (47) apresentou-se ativo frente à epimastigotas do parasito ($\text{CI}_{50} = 13,42\mu\text{M}$), contudo apresentou elevado efeito tóxico frente aos macrófagos murinos ($\text{CI}_{50} = 6,62\mu\text{M}$), efeito já observado para o derivado cinâmico nitrado (41), evidenciando o potencial to-

xicofórico do grupamento nitro nesta série de compostos. Dentre os derivados e análogos preparados por Ferreira, o mesoiônico (39) foi o que apresentou menor efeito citotóxico em macrófagos murinos ($CI_{50} = 38,56\mu M$), demonstrando assim maior seletividade.^{45,46} Devido ao seu perfil de atividade, o derivado (39) foi avaliado contra tripomastigotas sanguíneos ($CI_{50} = 6,7\mu M$) e amastigotas intracelulares ($CI_{50} = 1,35\mu M$). Um resultado interessante observado neste trabalho foi a maior eficiência e a menor toxicidade do derivado (39), quando comparado ao benzonidazol (26) (**Figura 7**) e ao seu precursor, a amida natural (4). Além disso, o derivado (39) diminuiu a parasitemia de camundongos infectados a níveis indetectáveis, aumentando a sobrevivência dos animais tratados, quando comparados ao benzonidazol (26), (**Figura 7**), que foi utilizado como fármaco de referência.^{45,46}

5- CONCLUSÕES

Os produtos naturais abundantes, acessíveis e de fácil isolamento configuram-se como excelentes precursores para o desenvolvimento de novos fármacos, úteis no tratamento da leishmaniose e da doença de Chagas, além de outras parasitoses. Neste cenário, a amida natural piperina se coloca como uma alternativa extremamente promissora, devido ao grande número de atividades biológicas descritas para esta molécula, incluindo atividades contra *T. cruzi*, *L. amazonensis* e *L. donovani*. Além disso, sua abundância e facilidade de isolamento, aliada às diferentes manipulações sintéticas possíveis de serem realizadas em sua estrutura, tem motivado diferentes grupos de pesquisa a explorarem esta amida natural na obtenção de novos protótipos antiparasitários, além de outras possibilidades de aplicações terapêuticas.

6- AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e a CAPES pelas bolsas concedidas a Ferreira, W.S.; Franklim, T.N. e Lopes, N.D. e ao apoio financeiro concedido pela FAPERJ (APQ1) e CAPES/PROCAD-NF-2009. Os autores também agradecem à Profa. Rosane Nora Castro (DEQUIM-UFRRJ) pela leitura crítica do manuscrito.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hostettmann, K.; Queiroz, E. F.; Vieira, P. C.; Princípios ativos de plantas superiores. Série de Textos da Escola de Verão em Química, IV-UFS-Car, EDUFSCar, 2003.
- Newmann, D. J. *J. Med. Chem.* 2008, 51, 2589.
- Newmann, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* 2007, 70, 461.
- Butler, M. S. *Nat. Prod. Rep.* 2008, 25, 475.
- Sítio da Organização Mundial de Saúde, WHO Model List for Essential Medicines, 2011. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/a95053_eng.pdf>. Acesso em: 29 novembro 2011.
- Semler, U.; Gross, G. G. *Phytochemistry* 1998, 27, 1566.
- Zachariah, T. J.; Parthasarathy, V. A. Em *Chemistry of Spices*; Parthasarathy, V. A.; Chempakam, B.; Zachariah, T.J., eds; CAB International: Oxfordshire, 2008, cap. 2.
- Sítio do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Censo Agropecuário 2006. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil_2006/Brazil_censoagro2006.pdf>. Acesso em: 29 novembro 2011.
- Ikan, R.; *Natural Products: A Laboratory Guide*, 2a. ed., Academic Press: London, 1991.
- Embrapa - Amazônia Oriental. Sistema de Produção da Pimenta do Reino. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/PimenteiradoReino/paginas/colheita.htm>>. Acesso: 29 novembro 2011.
- Dewick, P. M.; *Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach*, 2nd. ed., Wiley: New York, 2001.
- Geisler, J. G.; Gross, G. G. *Phytochemistry* 1990, 29, 489.

- ¹³ Geissman, T. A.; Crout, D. H. G.; *Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism*, Freeman, Cooper & Co: São Francisco, 1969.
- ¹⁴ Cao, X.; Ye, X.; Lu, Y.; Mo, W. *Anal. Chim. Acta.* 2009, 640, 47.
- ¹⁵ Subramanian, R.; Subramaniyan, P.; Noorul, J. A.; Raj, V. *Arab. J. Chem.* 2011, No Prelo.
- ¹⁶ Verma, V. C.; Lobkovcsky, E.; Gange, A. C.; Singh, S. K.; Prakash, S. *J. Antibiot.* 2011, 64, 427.
- ¹⁷ Estrela, J. L. V.; Guedes, R. N. C.; Maltha, C. R. A.; Fasolin, M. *Neotrop. Entomol.* 2003, 32, 343.
- ¹⁸ Parmar, V. S.; Jain, S. C.; Bisht, K. S.; Taneja, P.; Jha, A.; Tyagi, O. D.; Prasad, A. K.; Wengel, J.; Olsen, C. E.; Boll, P. M. *Phytochemistry* 1997, 46, 597.
- ¹⁹ Srinivasan, K. *Critic. Rev. Food Sci.* 2007, 47, 735.
- ²⁰ Ghoshal, S.; Prasad, B. N. K.; Laksimi, V. J. *Ethnopharm.* 1996, 50, 167.
- ²¹ Marques, J. V.; Oliveira, A.; Raggi, L.; Young, M. C. M.; Kato, M. *J. Braz. Chem. Soc.* 2010, 21, 1807.
- ²² Perderson, M. E.; Metzler, B.; Stafford, G. I.; van-Standen, J.; Jäger, A. K.; Rasmussen, H. B. *Molecules* 2009, 14, 3833.
- ²³ Lee, S. A.; Hong, S. S.; Han, X. H.; Hwang, J. S.; Oh, G. J.; Lee, S. K. *Chem. Pharm. Bull.* 2005, 53, 832.
- ²⁴ Mao, Q. Q.; Xian, Y. F.; Ip, S. P.; Che, C. T. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2011, 35, 1144.
- ²⁵ Lee, S. E.; Park, B. S.; Kim, M. K.; Choi, W. S.; Kim, H. T.; Choi, K. Y.; Lee, H. S. *Crop. Protec.* 2001, 20, 523.
- ²⁶ Bae, G. S, Kim, M. S.; Jung, W. S.; Seo, S. W.; Yun, S. W.; Kim, S. G.; Park, R. K.; Kim, E. C.; Song, H. J.; Park, S. J. *Eur. J. Pharmacol.* 2010, 642, 154.
- ²⁷ Bang, J. S.; Oh, D. H.; Choi, H. M.; Sur, B. J. ; Lim, S. J. ; Kim, J. Y. ; Yang, H. I. ; Yoo, M. C. ; Hahm, D. H.; Kim, K. S. *2009 Arthrit. Res. Ther.* 2009, 11, R49.
- ²⁸ Sunila, E. S.; Kuttan, G. *J. Ethnopharmacol.* 2004, 90, 339.
- ²⁹ Rao, V. R. S.; Suresh, G.; Rao, R. R.; Babu, K. S.; Chashoo, G.; Saxena, A. K.; Rao, J. M. *Med. Chem. Res.* 2012, 21, 38.
- ³⁰ Martinelli, A.; Rodrigues, L. A.; Cravo, P. *Exp. Parasitol.* 2008, 119, 304. [CrossRef] [PubMed]
- ³¹ Matsuda H.; Ninomiya, K.; Morikawa, T.; Yasuda, D.; Yamaguchi, I.; Yoshikawa, M. *Bioorg. Med. Chem.* 2009, 17, 7313.
- ³² Chandrasekhar, R. B.; Jithan, A.; Narsimha, R. Y.; Malla, R. V. *Int. J. Pharm. Sci. Nanotech.* 2008, 1, 87.
- ³³ Romão, J. A.; Boccardo, L.; De Paula, V. F.; Chagas, R. J.; Moreira, B. O. *Rev. Bras. Toxicol.* 2008, 21, 33.
- ³⁴ Barbieri-Junior, E.; Barreto-Junior, C. B.; Ribeiro, R. C.; Oliveira, V. H. S.; Lima, M. E. F.; Moya-Borja, G. E. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2007, 16, 87.
- ³⁵ de Paula, V. F.; Barbosa, L. C. A.; Demuner, A. J.; Piló-Veloso, D.; Picanço, M. C. *Pest Manage. Sci.* 2000, 56, 168.
- ³⁶ Sangwan, P. L.; Koul, J. L.; Surrinder, K.; Reddy, M. V.; Thota, N.; Khan, I. A.; Kumar, A.; Kalia, N. P.; Qazi, G. N. *Biorg. Med. Chem.* 2008, 16, 9847.
- ³⁷ Kapil, A. *Planta Medica.* 1993, 59, 474.
- ³⁸ Raay, B.; Medda, S.; Mukhopadhyay, S.; Basu, M. K. *Indian J. Biochem. Biophys.* 1999, 36, 248.
- ³⁹ Veerareddy, P. R.; Vobalaboina, V.; Nahid, A. *Die Pharmazie* 2004, 59, 194. [PubMed]
- ⁴⁰ Singh, I. P. ; Jain, S. K. ; Kaur, A. ; Singh, S. ; Kumar, R. ; Garg, P. ; Sharma, S. S. ; Arora, S. K. *Eur. J. Med. Chem.* 2010, 45, 3439.
- ⁴¹ Chonpathompikunlert, P.; Wattanathorn, J.; Mutchimapura, S. *Food Chem. Toxicol.* 2010, 48, 798.

- ⁴² Kim, K. J.; Lee, M. S.; Jô, K.; Hwang, J. K. *Biochem. Bioph. Res. Comm.* 2011, 411, 219.
- ⁴³ Ribeiro, T. S.; Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 2004.
- ⁴⁴ Ribeiro, T. S.; Freire-de-Lima, L.; Previato, J. O.; Mendonça-Previato, L.; Heise, N.; Lima, M. E. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 3555.
- ⁴⁵ Ferreira, W. S.; Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 2006.
- ⁴⁶ Ferreira, W. S.; Freire-de-Lima, L.; Saraiva, V. B.; Alisson-Silva, F.; Mendonça-Previato, L.; Previato, J. O.; Echevarria, A.; Lima, M. E. F. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 2984.
- ⁴⁷ Freire-de-Lima, L.; Ribeiro, T. S.; Rocha, G. M.; Brandão, B. A.; Romeiro, A.; Mendonça-Previato, L.; Previato, J. O.; Lima, M. E. F.; Carvalho, T. M. U.; Heise, N. *Parasitol. Res.* 2008, 102, 1059.
- ⁴⁸ Koul, S.; Koul, J. L.; Taneja, S. C.; Dhar, K. L.; Jamwal, D. S.; Singh, K.; Reen, R. K.; Singh, J. *Bioorg. Med. Chem.* 2000, 8, 251.
- ⁴⁹ Atal, C. K.; Zutshi, U.; Rao, P. G. J. *Ethnopharm.* 1981, 4, 229.
- ⁵⁰ Bano, G.; Raina, R. K.; Zutshi, U.; Bedi, K. L.; Johri, R. K.; Sharma, S. C. *Eur. J. Clin. Pharm.* 1991, 41, 615.
- ⁵¹ Shoba, G.; Joy, D.; Thangam, J.; Majeed, M.; Raghendran, R.; Srinivas, P. S. R. *Planta Med.* 1998, 64, 353.
- ⁵² Parachikova, A.; Green, K. N.; Hendrix, C.; Laferla, F. M. *Plos one* 2010, 5, e14015.
- ⁵³ Tsuboi, S.; Takeda, A. *Tetrahedron Lett.* 1979, 20, 1043. [CrossRef]
- ⁵⁴ Sloop, J. C. *J. Chem. Educ.* 1995, 72, A25.
- ⁵⁵ Chandrasekhar, S.; Reddy, M. V.; Reddy, K. S.; Ramarao, C. *Tetrahedron Lett.* 2000, 41, 2667.
- ⁵⁶ Schobert, R.; Siegfried, S.; Gordon, G. J. *J. Chem. Soc., Perk. Trans.1* 2001, 2393.
- ⁵⁷ Chirac, P.; Torreale, E. *The Lancet* 2006, 367, 1560.
- ⁵⁸ Moran, M.; Guzman J.; Ropars, A. L.; McDonald, A.; Jameson, N.; Omune, B.; Ryan, S.; Wu, L. *PLoS Med.* 2009, 6, 137.
- ⁵⁹ Anthony, J. P.; Fyfe, L.; Smith, H. *Trends Parasitol.* 2005, 21, 462.
- ⁶⁰ Ioset, J. R. *Curr. Org. Chem.* 2008, 12, 643.
- ⁶¹ Hunt, P.; *Neglected diseases: a human right analysis.* World Health Organization (TDR), 2007. Disponível em: <<http://apps.who.int/tdr/svc/publications/tdr-research-publications/neglected-diseases-human-right-analysis>>. Acesso em: 20 novembro 2011.
- ⁶² WHO-Technical Report Series. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf>. Acesso em: 29 novembro 2011.
- ⁶³ Pelissari, D. M.; Cechinel, M. P.; Sousa-Gomes, M. L.; Lima-Junior, F. E. F. *Epidemiol. Serv. Saúde* 2011, 20, 107.
- ⁶⁴ Sen, R.; Chatterjee, M. *Phytomedicine* 2011, 18, 1056.
- ⁶⁵ Ferreira, C.; Soares, D. C.; Barreto-Junior, C. B.; Nascimento, M. T.; Freire-de-Lima, L.; Delorenzi, J. C.; Lima, M. E. F.; Atella, G. C.; Folly, E.; Carvalho, T. M. U.; Saraiva, E. M.; Pinto-Da-Silva, L. H. *Phytochemistry* 2011, 72, 2155.
- ⁶⁶ Rabinovitch, M. *Parasitol. Today* 1989, 5, 299.
- ⁶⁷ Rassi-Junior, A.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A. *The Lancet* 2010, 375, 1388. [CrossRef]
- ⁶⁸ Chagas, C. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1909, 1, 159.
- ⁶⁹ Foti, L.; Fonseca, B. P. F.; Nascimento, L. D.; Marques, C. F. S.; Silva, E. D.; Duarte, C. A. B. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2009, 104, 136.
- ⁷⁰ Coura, J. R.; Castro, S. L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2002, 97, 3.

⁷¹ Garcia, S.; Ramos, C. O.; Senra, J. F. V.; Vilasboas, F.; Rodrigues, M. M.; Campos-De-Carvalho, A. C.; Santos, R. R.; Soares, M. B. P. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49, 1521.

⁷² Dias, L. C.; Dessoy, M. A.; Silva, J. J. N.; Thiemann, O. H.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D. *Quím. Nova* 2009, 32, 2444.

⁷³ Uchiyama, N. J. *Health Sci.* 2009, 55, 35.

⁷⁴ Silva, J. S.; Vespa, G. N. R.; Cardoso, M. A. G., Aliberti, J. C. S.; Cunha, F. Q. *Infect. Immun.* 1995, 63, 4862.

⁷⁵ Pradeep, C. R.; Kuttan, G. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2003, 25, 337.

⁷⁶ Cotinguiba, F.; Regasini, L. O.; Bolzani, V. S.; De-bonsi, H. M.; Passerini, G. D.; Cicarelli, R. M. B.; Kato, M. J.; Furlan, M. *Med. Chem. Res.* 2009, 189, 703.

⁷⁷ Regasini, L. O.; Cotinguiba, F.; Passerini, G. D.; Bolzani, V. S.; Cicarelli, R. M. B.; Kato, M. J.; Furlan, M. *Braz. J. Pharmacog.* 2009, 19, 199.

⁷⁸ Silva, E. F.; Canto-Cavalheiro, M. M.; Braz, V. R.; Cysne-Finkelstein, L.; Leon, L. L.; Echevarria, A. *Eur. J. Med. Chem.* 2002, 37, 979.