



Avaliação das potenciais atividades tripanocida e antileishmania do extrato de folhas de *Piper arboreum* (Piperaceae) e de suas frações

Fernando Gomes Figueredo^{1*}; Saulo Relison Tintino¹; Dara Isabel Vieira de Brito¹; Maria Flaviana Bezerra Morais Braga¹; Nadghia Figueiredo Leite¹; Bruno Feitosa Furtado Lucena¹; Celestina Elba Sobral-Souza¹; Maria Celeste Vega Gomez²; Henrique Douglas Melo Coutinho¹

¹Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil.

²Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Fundación Moisés Bertoni/Laboratorios Díaz Gill. Asunción-Paraguay.

RESUMO

A leishmaniose e a tripanossomíase americana fazem parte de um grupo de doenças tropicais endêmicas, especialmente entre as populações pobres. São consideradas doenças negligenciadas por não despertarem interesse da indústria farmacêutica. Atualmente, a quimioterapia é o único tratamento específico disponível para estas doenças, onde os medicamentos utilizados são nifurtimox e benzonidazol. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antiparasitária e citotóxica do extrato bruto etanólico e frações de folhas de *Piper arboreum*, frente a linhagens de *Leishmania brasiliensis* e de *Trypanosoma cruzi*. Após a preparação do extrato etanólico bruto e as suas respectivas frações, testes *in vitro* foram realizados para avaliar atividade antiparasitária frente a *T. cruzi*, utilizando o clone epimastigota CL-B5 e contra *L. brasiliensis* foram utilizadas formas promastigotas. O ensaio de citotoxicidade foi realizado com linhagens de fibroblastos NCTC929. Os resultados indicaram que as amostras apresentaram toxicidade elevada, com exceção da fração de acetato de etila. Já os resultados da atividade antiparasitária indicaram uma maior atividade da fração hexânica observando a morte de 62% e 51% de células epimastigotas e de 100% e 92% de células promastigotas, respectivamente. Através dos resultados conclui-se que a *P. arboreum* pode ser considerada uma fonte alternativa de produtos naturais com atividade contra *T. cruzi* e *L. brasiliensis*.

Palavras chaves: Citotoxicidade. *Piper arboreum*. *Trypanosoma cruzi*. *Leishmania brasiliensis*. Piperaceae.

INTRODUÇÃO

Apesar de avanços notáveis na ciência médica durante os últimos anos, a vida de milhões de pessoas ainda é afetada por doenças parasitárias. Dentre estas, a leishmaniose tem sido relatada em cerca de 88 países do mundo, estimando-se que existem por volta de 12 milhões de casos anuais e há aproximadamente 350 milhões de pessoas em risco para a doença (Desjeux, 2004).

Todos os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam ciclos de vida semelhantes, sendo parasitas transmitidos de um reservatório mamífero para o homem, através da picada das fêmeas do inseto do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo. Em humanos, existem três formas principais de Leishmaniose: cutânea, mucocutânea e visceral. Essas formas foram classificadas com base em critérios clínicos e são causadas por pelo menos 15 espécies diferentes de parasitas (Desjeux, 2004).

Diversas substâncias estão sendo testadas como quimioterápicos antileishmanioses, sendo que as principais estão direcionadas para a inibição de vias metabólicas vitais e específicas do parasita. O emprego dos fármacos de primeira escolha para o tratamento de Leishmanioses tem sido até hoje os antimoniais pentavalentes (Sb5+). Outros grupos de fármacos atuais utilizados contra leishmanioses são: amidinas, poliênico, aminoglicosídeos e hexadecilfosfolina (miltefosina), alguns se caracterizam por apresentar toxicidade para o paciente (Bezerra et al., 2004).

Outra doença parasitária, bastante difundida no mundo, é doença de Chagas causada pelo *Trypanosoma cruzi*, a qual afeta cerca de 10 milhões de pessoas nas Américas (WHO, 2010). A tripanossomíase é uma das mais graves endemias do Brasil. O parasita pode ser transmitido aos seres humanos por insetos triatomíneos, alimento contaminado, fezes, via oral, transfusão de sangue ou transplantes de órgãos de doadores infectados e o percurso transplacentária de uma mãe contaminada para

seu recém-nascido (WHO, 1997). O tratamento de doenças causadas por esses protozoários é difícil, pois, por serem também eucariotos compartilham muitas características com as células de mamíferos. Dessa forma, a atuação dos agentes antiparasitários ocorre em vias ou alvos comuns ao parasita e ao hospedeiro (Murray et al., 2000).

Por volta do início da década de 1970, dois compostos surgiram apresentando novas perspectivas para o tratamento da doença de Chagas, tanto pela eficácia na fase aguda quanto pela tolerância, e até hoje são os principais fármacos utilizados. Estes são o nifurtimox (Lampit®, da Bayer), 3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino) tetra-hidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido; e o benzonidazol (Rochagan®, da Roche), N-benzyl-2-nitroimidazol acetamida. Entretanto, devido a sua baixa especificidade de ação em vias bioquímicas definidas do parasita, os mesmos apresentam efeitos citotóxicos observados no tratamento dos pacientes (Dias et al., 2009).

Devido a essas dificuldades, torna-se importante a busca por novos agentes quimioterápicos que sejam eficazes e apresentem baixa toxicidade. Nesse contexto, uma alternativa bastante promissora é o uso de espécies vegetais, o que na verdade já vem sendo utilizado desde o início da civilização no processo de cura de inúmeras doenças (Calixto, 2000; Rocha et al., 2005). Muitas pesquisas foram realizadas para avaliar o efeito do uso de plantas ou dos seus vários metabolitos para a prevenção e tratamento desta protozoose (Rodríguez et al., 2008).

Neste contexto, as espécies do gênero *Piper* tornam-se relevantes, tendo em vista que muitas já foram extensivamente investigadas como uma fonte de metabolitos secundários, que apresentam atividades tripanocida, leishmanicida, ansiolíticos, anticonvulsivante e atividades anti-inflamatórias (Quintans-Júnior et al., 2008).

Investigações fitoquímicas de espécies do gênero *Piper* elucidaram vários compostos de classes típicas tais como amidas, terpenos, derivados do ácido benzoico, carotenos, hidroquinonas, lignanas, neolignanas e alguns alcaloides (Regasini et al., 2008; Continguiaba et al., 2009).

A espécie *Piper arboreum* tem sido utilizada popularmente no Brasil, na forma de decocto para o tratamento de reumatismo, bronquite, gripe e resfriado (Ramos & kato, 2009), além de também ser empregada contra doenças venéreas e do trato urinário (Agra et al., 2007). Alguns compostos já isolados de *Piper arboreum* tem atividade biológica comprovada. Um estudo mostrou que aminas pirrolidinas isoladas de *Piper arboreum* apresentam grande atividade antifúngica (Silva et al., 2002). Segundo Regasini et al. (2008), flavonoides isolados desta espécie apresentam atividade antioxidante e em outro estudo Regasini et al. (2009) demonstrou que alquilamidas pirrolidinas isoladas desta espécie apresentaram atividade tripanocida.

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar atividade antileishmania e tripanocida de extratos brutos e frações obtidas de folhas de *Piper arboreum* em formas promastigota do parasita *Leishmania braziliensis*, e epimastigota de *Trypanosoma cruzi*, além de avaliar a atividade citotóxica em fibroblasto.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do extrato bruto e frações

Folhas de *Piper arboreum* Aubl. foram coletadas na reserva ecológica de Gaiambira no município de Bananeiras, Paraíba, Brasil, no mês de março/2010. O material vegetal foi identificado e uma exsicata foi depositada em Herbário do Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, sob registro n°205.

Folhas de *Piper arboreum* após serem coletadas foram desidratadas em estufa com ar circulante a temperatura média de 40°C durante 72 horas, e em seguida pulverizadas em moinho mecânico, reduzindo-se a pó (0,72Kg). Estas foram submetidas à maceração para aumentar sua superfície de contato e em seguida acondicionada em um recipiente com 2L de etanol, volume suficiente para submergir todo material vegetal, permanecendo assim por 72h. Após esse período, o eluente foi filtrado em papel filtro para separação dos resíduos sólidos e concentrado em condensador rotativo a vácuo, resultando em 6.9% (49,68g) de extrato etanólico bruto (Brasileiro et al., 2006).

O extrato etanólico bruto (49,68g) foi solubilizado em MeOH:H₂O (7:3), obtendo-se a solução hidroalcolica. Esta foi submetida à partição líquido/líquido, em um funil de separação, utilizando-se os solventes hexano (C₆H₁₄), diclorometano (CH₂Cl₂) e acetato de etila (AcOEt), 3L, 3L e 4L, respectivamente. As soluções obtidas foram tratadas com sulfato de sódio (Na₂SO₄) anidro e submetidas à filtração (Matos, 2009). Após esse processo, os solventes foram evaporados em rotaevaporador, sob pressão reduzida, a temperatura não superior a 50 °C, fornecendo as fases: hexânica (3,0g), diclorometano (3,5g) e acetato de etila (9,0g). Para os testes foram utilizadas soluções preparadas a partir das amostras sob uma concentração de 10 mg/mL, dissolvidos em DMSO (dimetilsulfóxido), em seguida diluídas com água destilada para concentrações de 500, 250 e 100µg/mL.

Linhagens celulares utilizadas

Para os testes *in vitro* de *T. cruzi*, foi utilizado o clone CL-B5 (Buckner et al., 1996). Os parasitos, transfectados de forma estável com o gene para a β-galactosidase de *Escherichia coli* (*lacZ*), foram fornecidos pelo Dr. F. Buckner através do Instituto Conmemorativo Gorgas (Panama). As formas epimastigotas foram cultivadas a 28° C em meio de cultura *Liver Infusion Tryptose Broth* (Difco, Detroit, MI), suplementado com Soro Fetal Bovino 10% (SFB) (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina (Ern, S.A., Barcelona, Spain) e estreptomina (Reig Jofre S.A., Barcelona, Spain), conforme descrito por Le Senne et al. (2002). As células foram coletadas para os testes na fase exponencial de seu crescimento.

Culturas de *Leishmania braziliensis* foram obtidas do Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Asunción, Paraguay - IICS e identificadas por análise isoenzimática. A manutenção das linhagens, forma de cultivo e isolamento das formas promastigotas de

Leishmania spp. seguiram os procedimentos descritos por Roldos et al. (2008). Os ensaios de inibição das formas promastigotas foram realizados utilizando a linhagem de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), cultivada a 22° C em meio Schneider's *Drosophila*, suplementado com SFB 20%.

Os ensaios citotoxicidade foram realizados *in vitro* utilizando a cultura de linhagem de células do tecido conectivo de camundongo (NCTC) clone 929 (fibroblastos de mamíferos ATCC CCL-1), cultivada em Minimal Essential Medium (Sigma). O meio de cultura foi suplementado com SFB inativada por calor (10%), penicilina G (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). As culturas foram mantidas a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. A viabilidade destas linhagens foi avaliada através do uso da resazurina como método colorimétrico (Rolón et al., 2006).

Reagentes

Resazurina sódica foi obtida da Sigma–Aldrich (St Louis, MO) e estocada a 4°C ao abrigo da luz. A solução de resazurina foi preparada com tampão fosfato 1%, pH 7 e esterilizada por filtração antes de ser utilizada. O Clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosídeo (CPRG; Roche, Indianapolis, IN) foi dissolvido em uma solução de Triton X-100 0.9% (pH 7.4). Penicilina G (Ern, S.A., Barcelona, Spain), estreptomicina (Reig Jofré S.A., Barcelona, Spain), dimetilsulfóxido (DMSO), acetato de etila (EEL.S.A., São Paulo, Brasil), diclorometano (EEL.S.A., São Paulo, Brasil), metanol (EEL.S.A., São Paulo, Brasil) e hexano (EEL.S.A., São Paulo, Brasil) também foram utilizados.

Teste de atividade antiepipimastigota

O teste foi realizado em microplacas com 96 cavidades, com culturas na fase exponencial, conforme descrito por Vega et al. (2005). Epimastigotas foram inoculados em uma concentração de 1 x 10⁵ mL⁻¹ em 200 µL de caldo de fígado triptose. As placas foram então incubadas com as drogas nas concentrações de 100 e 500 µg/mL a 28° C por 72 h. Após este tempo, foram adicionados 50 µL da solução de CPRG, de forma a atingir uma concentração final de 200 µM. As placas foram incubadas por um tempo adicional de 6h a 37°C e foram submetidas a visualização sob 595nm. Cada experimento foi realizado três vezes e de forma independente, tendo sido cada concentração testada em triplicata em cada experimento. A eficiência de cada composto foi estimada através do cálculo do percentual de atividade antiepipimastigota (AE%).

Teste de atividade antipromastigota

Culturas de formas promastigotas de *L. braziliensis* foram cultivadas até uma concentração de 10⁶ células/mL e então transferidas para o teste. Os compostos foram dissolvidos em DMSO até as concentrações serem testadas e foram transferidos para as microplacas. Cada ensaio foi realizado em triplicata. A atividade dos compostos foi avaliada após 72h por contagem direta das células após diluições seriadas e comparadas com um controle não tratado (Rolón et al., 2006).

Teste de citotoxicidade

Fibroblastos NCTC929 foram plaqueados em placas de microdiluição de 96 cavidades a uma concentração final de 3 x 10⁴ células/cavidade. As células foram cultivadas a 37° C em atmosfera com 5% de CO₂. Após isso, o meio de cultura foi removido e os compostos foram adicionados a 200 µL, sendo realizado um novo cultivo por 24 h. Após esta incubação, 20 µL de uma solução de Resazurina 2 mM foi adicionada em cada cavidade. As placas foram incubadas por 3h e a redução da resazurina foi determinada através de dupla absorbância nos comprimentos de onda de 490 e 595 nm. O valor do controle (branco) foi subtraído. Cada concentração foi testada em triplicata (Rolón et al., 2006).

RESULTADOS

A Tabela 1 mostra a atividade citotóxica, antieishmania e tripanocida do extrato e das frações de *Piper arboreum*. O extrato etanólico e as frações de diclorometano e hexânica apresentaram toxicidade elevada nas concentrações de 500 e 100µg/ml, com mortalidade dos fibroblastos entre 100% e 79%.

Quanto à avaliação da atividade antiparasitária a fração hexânica, foi testada nas concentrações de 250 e 100 µg/ml apresentando a melhor atividade, com uma mortalidade de 62% e 51% de células epimastigotas e de 100% e 92% de células promastigotas respectivamente. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média das repetições.

Tabela 1: Atividade antieishmania, tripanocida e citotóxica de *Piper arboreum*

Amostras/fármacos	µg/mL	%C	%AE	%AP
Extrato Etanólico	500	100±2,0	69±1,5	99±2,9
	100	79±2,4	29±2,3	5,0±0,7
Fração de Diclorometano	500	99±0,1	53±2,1	0,0±1,9
	100	89±2,1	51±1,2	0,0±1,3
Fração de acetato de etila	500	40±3,0	20±1,5	12±3,0
	100	00±1,5	6,0±2,1	5,0±2,3
Fração Hexânica	500	95±1,8	62±2,5	100±0,6
	100	93±2,2	51±2,1	92±1,2
nifurtimox	1,0	-	54,9	-
	0,5	-	45,6	-
metronidazol	2,0	-	-	-
	1,0	-	-	-

%C - Porcentagem de fibroblastos N-CTC 929 mortos; %AE - Porcentagem de epimastigota de *T. cruzi* CL transfectada mortas; %AP - Porcentagem de promastigota *L. braziliensis* de cepas mortas, ± %DS - Desvio padrão

DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que a fração hexânica nas concentrações testadas apresentou uma melhor atividade contra as duas linhagens de parasitas quando

comparada com as frações de diclorometano e de acetato de etila. Quase todas as frações apresentaram algum efeito tóxico contra promastigotas e epimastigota. Apenas a fração diclorometano não mostrou ação contra a forma promastigota. Isto pode ser justificado, pelo fato de que na fração diclorometano há a presença de metabólitos secundários com bioatividade diferentes (Matos et al., 2009). Os melhores efeitos da fração hexânica demonstraram um percentual de inibição $\geq 50\%$ em todas as concentrações testadas, dado importante visto que uma inibição neste nível com uma concentração de $\leq 500\mu\text{g/mL}$ é considerado clinicamente relevante (Rosas et al., 2007).

Estes resultados discordam em relação à citotoxicidade de plantas do gênero *Piper* já existentes. Segundo Silva et al. (2009) extratos de *Piper ovatum* apresentaram citotoxicidade mais efetiva contra formas promastigota e amastigota de *L. amazonensis* do que contra as células de fibroblasto e macrófagos. No estudo realizado por Gallego et al. (2006), foi verificado um potencial efetivo, do extrato etanólico de *Piper arieianum* e a citotoxicidade observada foi de $40,8\mu\text{g/mL}$. No entanto, estes resultados podem ser justificados por que as mesmas são espécies diferentes e consequentemente apresentam alguns metabólitos secundários diferentes.

Estes resultados corroboram com estudos prévios, segundo Regasini et al. (2009), que se afirma que frações de hexânicas foram mais eficazes do que as de acetato de etila e as frações hidrometanólicas, sugerindo que os compostos com potencial antiparasitário estavam nas frações de baixa polaridade, além de indicar que as frações de hexano das folhas de *P. arboreum* e *P. tuberculatum* exibiram as melhores atividades contra forma epimastigota de *T. cruzi*.

Além disso, segundo o fracionamento realizado por Regasini et al. (2009) as folhas de *P. arboreum* apresentaram alquilamidas pirrolidina, piperilina (1) e 4,5-dihidropiperilina (2), responsáveis pelo efeito antitripanossoma observado na fração hexânica. E o isolado piperilina demonstrou uma maior atividade cerca de cinco vezes mais potente do que o controle positivo (benznidazole).

Os compostos 1 e 2 possuem uma ocorrência notável em espécies de *Piper*, cujas propriedades biológicas tem sido extensivamente demonstrada na literatura (Wei et al., 2004; Venkatasami et al., 2004). Outras amidas a partir de espécies de *Piper* estão entre os produtos naturais de interesse, uma vez que muitos dos compostos que exibem possuem uma ampla gama de atividades antiprotozoários (Bodiwala et al., 2007; Freire-de-Lima et al., 2008). Kapil (1993) relata uma investigação da atividade de piperina, contra formas promastigotas de *Leishmania donovani*. Ribeiro et al. (2004) relataram a atividade tripanocida significativa de piperina e seus derivados sintéticos em epimastigotas e amastigotas de *T. cruzi*.

Além disso, estudos demonstraram que a presença de ergosterol e seus análogos são essenciais para a manutenção e organização da mitocôndria na membrana de tripanossomos (Rodrigues et al., 2001). E estudos bioquímicos têm mostrado que ao contrario das células dos mamíferos, as células de tripanossomo apresentam, grandes quantidades de componentes estruturais do tipo esteróis endógenos e exógenos na membrana mitocondrial

(Rodrigues et al., 2001). Isso indica que a membrana mitocondrial de formas protozoárias, pode ser um importante alvo de quimioterápicos. Estudos anteriores têm demonstrado que alterações na membrana mitocondrial, de formas amastigotas de *L. amazonensis* foram verificadas, quando tratada com diferentes agentes, como a chalcona de *Piper aduncum*. (Torres Santos et al., 1999)

Neste contexto, vários metabólitos secundários de diferentes padrões estruturais têm se mostrado ativo contra *T. cruzi* (Saúde-Guimarães & Faria, 2007), a triagem de extratos de plantas é uma estratégia válida visto que esses produtos naturais são explorados para descobrir agentes tripanocidas (Luize et al., 2006; Pizzolatti et al., 2008).

Os presentes resultados indicam que o fracionamento do extrato da espécie de *Piper arboreum* produziu sub-frações com baixa polaridade e biologicamente mais ativas, possuindo um potencial antiparasitário. Com base no efeito tóxico contra a forma promastigota de *L. brasiliensis* e a forma epimastigota de *T. cruzi*, possivelmente relacionadas à presença de alquilamidas que já foram observadas na fração hexânica (Regasini et al., 2009), além de demonstrar uma elevada citotoxicidade frente a fibroblastos. Novos testes *in vitro* e *in vivo* são necessários para comprovar a atividade antiparasitária e a elucidação química para correlacionar com o provável mecanismo de ação.

ABSTRACT

Evaluation of the potential trypanocidal and anti-leishmanial activities in Piper arboreum (Piperaceae) leaf extract and its fractions.

Leishmaniasis and South American trypanosomiasis (Chagas disease) are part of a group of related human diseases endemic in tropical regions, especially among the poor. They are referred to as neglected diseases, because of a lack of interest on the part of the pharmaceutical industry. Today, chemotherapy is the only specific treatment against these diseases, the most frequently used drugs being nifurtimox and benznidazole. The aim of this study was to assess the antiparasitic and cytotoxic activity of the crude ethanolic leaf extract of *Piper arboreum* and its fractions against strains of *Leishmania brasiliensis* and *Trypanosoma cruzi*. After preparing the crude ethanolic extract and fractions, *in vitro* tests were performed to assay antiparasitic activity against *T. cruzi*, using the epimastigote clone CL-B5, while against *L. brasiliensis*, promastigote forms were used. The cytotoxicity assay was performed with a fibroblast cell line, NCTC 929. The results indicate that the samples possessed high toxicity, except for the ethyl acetate fraction. The results for antiparasitic activity showed highest activity in the hexane fraction, which was lethal to 62% and 51% of the epimastigotes and 100% and 92% of the promastigotes, at 500 and 100 $\mu\text{g/mL}$, respectively. From these results, it is concluded that *P. arboreum* can be considered an alternative source of natural products with activity against *T. cruzi* and *L. brasiliensis*.

Keywords: Cytotoxicity. *Piper arboreum*. *Trypanosoma cruzi*. *Leishmania brasiliensis*. Piperaceae.

REFERÊNCIAS

- Agra MF, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Synopsis of the plants as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn.* 2007;17:114-40.
- Bezerra RJS, Leon L, Genestra M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. *Rev Bras Ciênc Farm.* 2004;40(2):141-8.
- Bodiwala HS, Singh G, Singh R, Dey CS, Sharma SS, Bhutani KK, Singh IP. Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. *J Nat Med.* 2007;61:418-21.
- Brasileiro B G, Pizziolo VR, Raslan DS, Jamal CM, Silveira D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Rev Bras Ciênc Farm.* 2006;19:195-202.
- Buckner FS, Verlinde CL, La Flamme AC, Van Voorhis WC. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:2592-7.
- Calixto JB. Efficiency, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res.* 2000 33:179-89.
- Cotinguiba F, Regasini LO, Bolzani VS, Deboni HM, Passerini GD, Cicarelli RMB, Kato MJ, Furlan M 2009. Piperamides and their derivatives as potential antitrypanosomal agents. *Med Chem Res.* 2009 [cited 2009 fev 18]; 19(1B);1-7. (doi: 10.1007/s00044-008-9161-9).
- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol, Microbiol Infect Dis.* 2004;27:305-18.
- Dias LC, Dessoy MA, Silva JJN, Thiemann OH, Oliva G, Andricopulo AD, Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Quim Nova.* 2009;32(9):2444-57.
- Freire-de-Lima L, Ribeiro TS, Rocha GM, Brandão BA, Romeiro A, Mendonça-Previato L, Previato JO, Lima MED, Carvalho TMU, Heise N 2008. The toxic effects of piperine against *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural alterations and reversible blockage of cytokinesis in epimastigote forms. *Parasitol Res.* 2008;102:1059-67.
- Gallego A, Torres F, Robledo S, Vélez ID, Carrillo L, Muñoz DL, Quiñones W, Fonnegra R, Roldán J, Valencia L, Triana O, Echeverri F. *Leishmanicidal* and trypanocidal activity of *acacia farnesiana*, *Piper arieianum*, p. subpedale, sphagnum recurvum, and *vismia baccifera* subsp. *Ferruginea*. *Actual Biol.* 2006;28(84):39-49.
- Kapil A. Piperine: a potent inhibitor of *Leishmania donovani* promastigotes *in vitro*. *Planta Med.* 1993;59:474.
- Le Senne A, Muelas-Serrano S, Fernandez-Portillo C, Escario JÁ, Gómez-Barrio A. Biological characterization of a beta-galactosidase expressing clone of *Trypanosoma cruzi* CL strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97:1101-5.
- Luize PS, Ueda-Nakamura T, Dias-Filho BP, Cortez DAG, Nakamura CV. Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (MIQ.) C. DC. *var. pallescens* (C. DC.) Yunck against *Trypanosoma cruzi*. *Biol Pharm Bull.* 2006;29:2126-30.
- Matos FJA. Introdução a fitoquímica experimental. Fortaleza: UFC; 2009.
- Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Microbiologia médica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
- Pizzolatti MG, Mendes BG, Cunha-Júnior A, Soldi C, Koga AH, Eger I, Grisard EC Steindel M. Trypanocidal activity of coumarins and styryl-2-pyrones from *Polygala sabulosa* A.W. Bennet (Polygalaceae). *Rev Bras Farmacogn.* 2008;18:177-82.
- Quintans-Júnior LJ, Almeida JRGS, Lima JT, Nunes XP, Siqueira JS, Oliveira LEG, Almeida RN, Athayde-Filho PF, Barbosa-Filho JM. Plants with anticonvulsant properties - a review. *Rev Bras Farmacogn.* 2008;18(Supl.):798-819.
- Ramos CS, Kato MJ. Hydrolysis of Methyl Benzoate from *Piper arboreum* by *Naupactus bipes* Beetle. *J Braz Chem Soc.* 2009;20(3):560-3.
- Regasini LO, Cotinguiba F, Passerini GD, Bolzani VS, Cicarelli RMB, Kato MJ, Furlan M. Atividade tripanocida de *Piper arboreum* e *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Rev Bras Farmacogn.* 2009;19:199-203.
- Regasini, LO, Cotinguiba F, Siqueira JR, Bolzani VS, Silva DHS, Furlan M, Kato MJ. Radical Scavenging Capacity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Lat Am J Pharm.* 2008;27:(6):900-3.
- Ribeiro TS, Freire-de-Lima L, Previato JO, Mendonça-Previato L, Heise N, Lima MEF. Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Med Chem Lett.* 2004;14:3555-8.
- Rocha LG, Almeida JRGS, Macêdo RO, Barbosa-Filho JM. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine.* 2005;12:514-35.
- Rodrigues CO, Catisti R, Uymura SA., Vercesi AE., Lira R, Rodrigues C, Urbina JÁ, Docampo R. The sterol composition of *Trypanosoma cruzi* changes after growth in different culture media and results in the different sensitivity to digitonin permeabilization. *J Eukaryot Microbiol.* 2001;48:588-94.
- Rodríguez AM, Camargo JR, García FJB. Actividad *in vitro* de la mezcla de alcaloides de *Ervatamia coronaria* (Jacq) Staff. Apocynaceae sobre amastigotes de *Leishmania braziliensis*. *Rev Bras Farmacogn.* 2008;18:350-5.
- Roldos V, Nakayama H, Rolón M, Montero-Torres A, Trucco F, Torres S, Vega C, et al. Activity of a hydroxybenzyl

- bryophyte constituent against *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*: In silico, in vitro and in vivo activity studies. *Eur J Med Chem.* 2008;43:1797–1807.
- Rolón M, Seco E, Vega C, Nogal JJ, Escario JA, Gómez-Barrio A, Malpartida F. Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;28:104-9.
- Rosas LV, Cordeiro MSC, Campos FR, Nascimento SKR, Januário AH, França SC, Nomizo A, Toldo MP, Albuquerque S, Pereira PS. *In vitro* evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). *Braz J Med Biol Res.* 2007;40:663–70.
- Saúde-Guimarães DA, Faria AR. Substâncias da natureza com atividade *anti-Trypanosoma cruzi* 2007. *Rev Bras Farmacogn,* 2007;17:455-65.
- Silva RD, Nakamura CV, Dias Filho PB, Nakamura UT, Cortez DAP. In vitro Antileishmanial Activity of Hydroalcoholic Extract, Fractions, and Compounds Isolated from Leaves of *Piper ovatum* Vahl against *Leishmania amazonensis*. *Acta Protozool.* 2009;48:73–81.
- Silva RV, Navickiene H M, Kato M J, Bolzani VS, Méda CI, Young MCM, Furlan M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry.* 2002;59:521–52.
- Torres-Santos EC, Moreira DL, Kaplan MAC, Meirelles MN, Rossi-Bergmann B. Selective Effect of 2',6'-Dihydroxy-4'-Methoxychalcone Isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agent Chemother.* 1999;43:1234–41.
- Vega C, Rolón M, Martínez-Fernández AR, Escario JÁ, Gómez-Barrio A. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotas expressing beta-galactosidase. *Parasitol Res.* 2005;95:296-8.
- Venkatasamy R, Faas L, Young AR, Raman A, Hider RC 2004. Effects of piperine analogues on stimulation of melanocyte proliferation and melanocyte differentiation. *Bioorg Med Chem.* 2004;12:1905-20.
- Wei K, Li W, Koike K, Pei Y, Chen Y, Nikaido T. New amide alkaloids from the roots of *Piper nigrum*. *J Nat Prod.* 2004;67:1005-9.
- WHO World Health Organization. Chagas disease. Thirteenth Programme Report UNDP/WB/TDR, Geneva; 1997:23-112.
- WHO. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). In: WHO-World Health Organ fact sheet N° 340. 2010; [consultado em 17 de Setembro, 2012]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.

Recebido em 29 de abril de 2013

Aceito para publicação em 26 de junho de 2013