

ATIVIDADE TRIPANOCIDA *IN VITRO* DE AMIDAS NATURAIS E SEUS RESPECTIVOS ANÁLOGOS SINTÉTICOS

IN VITRO OF TRIPANOCID ACTIVITY OF NATURAL AMIDES AND THEIR RESPECTIVE SYNTHETIC ANALOGS

Minelly Azevedo Da Silva^{1*}, Guilherme Matos Passarini², Leandro Do Nascimento Martinez³, Saara Neri Fialho⁴, Policarpo Ademar Sales Júnior⁵, Harold Hilarion Fokoue⁶, Massuo Jorge Kato⁶, Carolina Bioni Garcia Teles⁷ E Christian Collins Kuehn⁸.

¹ Docente do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia – campus: Porto Velho – Calama.

Doutoranda da Universidade Federal de Rondônia – PPG em Biologia Experimental – UNIR;

² Doutoranda da Universidade Federal de Rondônia – PPG em Biologia Experimental – UNIR;

³ Mestrando da Universidade Federal de Rondônia – PPG em Biologia Experimental – UNIR;

⁴ Doutoranda da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal – Bionorte;

⁵ Instituto René Rachou / IRR - Fundação Oswaldo Cruz – Minas Gerais (FIOCRUZ-MG);

⁶ Instituto de Química da Universidade de São Paulo – IQ-USP;

⁷ Pesquisadora da Fundação Oswaldo Cruz – Rondônia (FIOCRUZ –RO); EpiAmO e Docente no PPG em Biologia Experimental – UNIR;

⁸ Docente da Universidade Federal de Rondônia – PPG em Biologia Experimental – UNIR.

* Correspondence to: minelly.silva@ifro.edu.br

RESUMO

Tendo em vista o restrito arsenal terapêutico para o tratamento da doença de Chagas e o potencial das moléculas a serem estudadas e exploradas, esse trabalho descreve a avaliação tripanocida *in vitro* sobre as formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* de cultivo celular, atividade citotóxica frente a linhagem L929 e a atividade hemolítica das amidas naturais e de seus respectivos análogos sintéticos. Os compostos 18a (IC₅₀ 14.33µM) e 18b (IC₅₀ 16.54 µM) foram considerados ativos para a atividade tripanocida, com destaque para o análogo 1m (IC₅₀ <5.62 µM). De acordo com os resultados de citotoxicidade com células L929, os compostos não foram considerados tóxicos; o composto 1m mostrou valor de índice de seletividade acima de 50, sendo recomendado para o ensaio *in vivo*. Os compostos não foram considerados hemolíticos na maior concentração (200 µM). Assim, todos os compostos são de interesse para futuras investigações.

Palavras-chave: Hemólise; protozoário; amidas; análogos.

ABSTRACT

In the view of the scarce therapeutical arsenal for the treatment of Chagas' disease and the potential of the molecules to be studied and explored, this work describes the *in vitro* trypanocidal activity against amastigote and trypomastigote forms of *T. cruzi*, as well as the cytotoxic activity (against the L929 cell line) and hemolytic activity of natural and semisynthetic amides. Compounds 18a (IC₅₀ of 14.33µM) and 18b (IC₅₀ of 16.54 µM) were considered active against *T. cruzi*, with compound 1m showing remarkable activity (IC₅₀ <5.62 µM). The cytotoxicity experiments showed that the compounds were not toxic to L929 cells. Compound 1m had a selectivity index (SI) > 50, being recommended for further *in vivo* investigations. The compounds were not hemolytic at the highest concentration tested (200 µM). Thus, all evaluated compounds are of interest for future investigations.

Keywords: Hemolysis; protozoon; amides; analogs.

1. INTRODUÇÃO

As amidas são metabólitos secundários que pertencem à classe dos alcaloides, um grupo de biomoléculas relativamente grande presente na natureza [1]. As amidas naturais e

sintéticas são descritas na literatura com uma vasta gama de perfis farmacológicos, tais como atividades antimicrobianas, antifúngicas, antitumorais, citotóxicas, antiparasitárias, antioxidantes, antimutagênicas, antigenotóxicas e alucinógenas [2-6]

A pipartina e piperina são substâncias de grande importância biológica e que pertencem a classe das amidas. A pipartina foi isolada em 1962 dos caules da espécie *Piper longum* (Piperaceae) [7]; sua síntese foi descrita pela primeira vez por Boll, Hansen, Simonsen e Thorup [8]. A piperina foi isolada pela primeira vez em 1819 por Hans Christian Orsted, nos frutos da espécie *Piper nigrum* (Piperaceae) [9]. Segundo Dewick [1] os alcaloides, mesmo em pequenas quantidades, são substâncias naturalmente tóxicas. Sendo assim, a verificação da atividade citotóxica e hemolítica das substâncias faz-se necessário, tendo em vista que algumas podem induzir hemólise devido a sua capacidade oxidante [10].

A doença de Chagas (*Tripanossomíase Americana*) é uma infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, faz parte de um grupo de doenças negligenciadas que afeta milhões de pessoas por ano na América Latina. A transmissão da doença pode ocorrer por via vetorial, transfusional, vertical, oral e acidental [11].

No estado de Rondônia, localizado na Amazônia Legal, região Norte do Brasil, segundo o relatório anual (2018) de gestão da Agência Estadual de Segurança em Saúde-AGEVISA, foram investigados no período de 2011 a 2017, um total de 224 casos suspeitos de Doença de Chagas. No ano de 2017 foram notificados 57 casos da doença, 36 foram descartados, 10 confirmados e 11 em fase de investigação. Os casos estavam concentrados em sete municípios: Candeias do Jamari (12 casos), Espigão do Oeste (67 casos), Itapuã do Oeste (12 casos), Machadinho do Oeste (49 casos), Nova Brasilândia (22 casos), Ouro Preto (17 casos) e Porto Velho (45 casos). Em 2018, o Estado teve o seu primeiro registro de transmissão vetorial da doença, o que chamou a atenção das autoridades de saúde local [12].

A doença deve ser tratada durante a fase aguda. Os únicos medicamentos disponíveis foram desenvolvidos há mais de quatro décadas, o Nifurtimox (3-metil-4-(5'-nitrofurfurilideneamina) tetra- hidro-4H-1,4-tiazina-1,1-diido, Bayer 2502) e o Benznidazol (Bz) (N-benzil-2- nitroimidazole acetamida, RO7-1051), com fortes efeitos colaterais, seus usos não são indicados para pacientes grávidas, pessoas com infecções sistêmicas, insuficiência cardíaca, respiratória, renal ou hepática, hemopatias e neoplasias associadas a Chagas e idosos debilitados [13-14]. No Brasil o Benznidazol é o fármaco de escolha disponível. O Nifurtimox pode ser utilizado como alternativa em casos de intolerância ou que não respondam ao tratamento com Benznidazol [11; 14].

A avaliação da atividade hemolítica é muito importante na investigação da ação de substâncias naturais e/ou sintéticos sobre o sangue humano para triagem de diferentes agentes tóxicos. Os ensaios de atividade hemolítica podem ser considerados como indicadores de toxicidade geral e bioatividade [16].

A hemólise pode ser desencadeada por algumas substâncias com propriedades oxidativas. Segundo Brodie e Udenfriend [15], alguns metabólitos provocam a oxidação da hemoglobina e a lise dos eritrócitos *in vitro*. Em sua pesquisa, Cohen [10], reporta que algumas substâncias podem ser convertidas *in vivo* em derivados auto-oxidáveis. A lise das hemácias pode provocar a elevação da hemoglobina plasmática induzindo efeitos deletérios principalmente nos rins e no sistema cardiovascular [10].

Tendo em vista o restrito arsenal terapêutico para o tratamento da doença de Chagas e o potencial das moléculas a serem estudadas e exploradas, esse trabalho descreve a avaliação tripanocida sobre as formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* de cultivo celular, a atividade citotóxica e hemolítica das amidas naturais e de seus respectivos análogos sintéticos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos compostos

As substâncias naturais das espécies de Piper (amidas) e seus análogos sintéticos foram fornecidos pelo professor Dr^o Massuo Jorge Kato, isoladas e sintetizadas pelo Dr. Harold Hilarion Fokoue do Laboratório de Química do Instituto de Química da USP. As mesmas foram conservadas em temperatura ambiente e protegidas da luz. Os ensaios *in vitro* frente a espécie *T. cruzi* e citotóxicos (L929), foram realizados no Instituto René Rachou / IRR - Fundação Oswaldo Cruz – Minas Gerais (FIOCRUZ-MG). Os ensaios hemolíticos foram conduzidos na Plataforma de Bioensaios de Malária e Leishmaniose (PBML)/Fiocruz Rondônia.

2.2 Atividade Hemolítica

Neste ensaio, as substâncias foram ajustadas a uma concentração inicial de 2000 a 15.6 μM (20 μL). Após a diluição, 180 μL de hemácias a 1% foram distribuídos na placa de 96 poços em fundo “U”. Dessa forma, as substâncias foram diluídas 10x (200 -1.56 μM). Foi utilizado como controle positivo de hemólise uma solução de saponina (0.05%) e como controle negativo, hemácias sem tratamento. A placa foi incubada por 30 minutos, com

agitação a cada 5 minutos. Após este período foi realizada a centrifugação da placa por 10 minutos a 1.500 rpm, em seguida, transferiu-se 100 µL do sobrenadante para uma placa de fundo chato. A leitura da absorbância (540 nm) foi realizada no espectrofotômetro (Biochrom, Asys Expert Plus). Para a análise dos resultados foi utilizado o software (Graphpad Prism 6), considerando o controle positivo (saponina 0.05%) como composto 100% hemolítico, base para se calcular o percentual hemolítico das outras amostras (controle sem tratamento, compostos e DMSO 0.04%) [28].

2.3 Teste citotóxico *in vitro* dos compostos

As substâncias foram testadas *in vitro* para determinação da toxicidade celular em células L-929 não infectadas utilizando o corante alamarBlue® [14]. As células foram expostas as substâncias em concentrações crescentes a partir do valor IC₅₀ para o *T. cruzi*. Após 96h de incubação com as substâncias, o alamarBlue® foi adicionado e a absorbância foi medida a 570 e 600 nm após 4-6 horas. A viabilidade celular foi expressa como a porcentagem de diferença na redução entre células tratadas e não tratadas. Os valores de IC₅₀ foram calculados por interpolação linear e o índice de seletividade (IS) foi determinado com base na razão entre o valor de IC₅₀ na célula hospedeira dividido pelo valor IC₅₀ do parasita. As quadruplicatas foram executadas na mesma placa e os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes.

2.4 Ensaio *in vitro* com formas tripomastigotas e amastigotas intracelulares de *Trypanosoma cruzi*

Ensaio *in vitro* com formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* foram realizados conforme protocolos estabelecidos por Buckner e colaboradores e modificados por Romanha e colaboradores [14]. Os parasitos *Trypanosoma cruzi* (cepa de Tulahuen) expressando o gene da β-galactosidase de *Escherichia coli* foram cultivados em uma monocamada de fibroblastos L929 de camundongo. As culturas foram cultivadas em meio RPMI 1640 (pH 7.2-7.4) vermelho de fenol, mais 10% de soro fetal de bovino e glutamina (2 mM). L929 fibroblastos foram semeados em uma microplaca de cultura de tecidos de 96 poços em uma concentração de 4.0 x 10³ por poço em um volume de 80 µL e incubados durante a noite. Os tripomastigotas que expressam a β-galactosidase foram então adicionados em uma concentração de 4.0 x 10⁴ por poço em um volume de 20 µL. Após 2 h, o meio contendo tripomastigotas que não penetravam nas células foi descartado e substituído por 200 µL de

meio fresco. Após 48 h, o meio foi novamente descartado e substituído por 180 μL de meio fresco e com as substâncias de teste em diferentes concentrações (80 a 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após 7 dias de incubação, foram adicionados os reagentes Chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (CPRG) (concentração final de 100 μM) e Nonidet P-40 (concentração final de 0.1%) nas placas, seguido de incubação *overnight* a 37° C. A absorbância foi medida a 570 nm em um leitor de microplacas automatizado. Utilizou-se Benznidazol no seu IC_{50} (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ = 3.81 μM) como controle positivo. Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição do crescimento para 50% dos parasitos (IC_{50}). As quadruplicatas foram executadas na mesma placa e os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Devido à ausência de informações sobre a atividade tripanocida e hemolítica dos análogos sintéticos das amidas aqui apresentadas, as relações entre as estruturas químicas e as atividades destes derivados foram investigadas, visto que essas informações podem contribuir no processo de descoberta de novos protótipos.

Para avaliação da atividade tripanocida, formas tripomastigotas e amastigotas intracelulares, foram testadas com os compostos 1b, 1g, 1k, 1m, 14f, análogos sintéticos da amida natural 1a (piplartina) e o composto 18b análogo sintético da amida natural 18a (piperina) nas concentrações de 80 a 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, frente as formas amastigotas e tripomastigotas (Tabela I).

Tabela I. IC_{50} das substâncias frente ao *T. cruzi* e da célula L929 frente as substâncias.

Substâncias	IC_{50} sobre o parasita ¹		IC_{50} sobre células ²		(IS) ³	
	($\mu\text{g}/\text{mL}$)	(μM)	($\mu\text{g}/\text{mL}$)	(μM)		
1a	> 80	>260	> 80	>260	-	-
1b	> 80	>260	> 80	> 260	-	-
1g	> 80	>260	> 80	> 260	-	-
1k	> 80	>260	> 80	-	-	-
1m	< 2.5	<5.62	> 160	> 359.33	> 64	> 63.93
14f	NR	NR	NR	NR	NR	NR
18a	4.1 \pm 1.6	14.33	61.7 \pm 8.0	215.63	15.05	15.05
18b	4.8 \pm 3.4	16.54	72.9 \pm 3.0	251.23	15.2	15.2

Benznidazol	1 µg/mL (3.81 µM)	625 µg/mL (2.381 µM)	625
--------------------	-------------------	----------------------	-----

As células L929 foram incubadas com diferentes concentrações (25–100 µg/mL). A porcentagem de citotoxicidade foi determinada usando o corante alamarBlue®; ¹ Concentração do composto que reduz em 50% o crescimento parasitário, formas amastigotas e tripomastigotas; ² Concentração do composto que induz 50% de morte celular (L929); ³IS – Índice de Seletividade - IC₅₀ do composto sobre as células dividido pelo IC₅₀ do composto sobre o parasita; Os valores de IC₅₀ foram calculados através de interpolação linear. NR – Não realizado, apresentou problema com a solubilidade.

Os compostos 1m, 18a e 18b foram considerados ativos. A substância 14f apresentou precipitados nas concentrações, impossibilitando a leitura do teste. A modificação realizada no composto 1b se deu somente na retirada das insaturações na parte alifática e da porção da dihidropiperidinona. As modificações realizadas nas estruturas 1g, 1k e 1m ocorreram no anel dihidropiperidinona. No composto 14f as modificações ocorreram nas porções dihidropiperidinona e trimetoxibenzeno. Os compostos 1g (adição de um grupo piperidinila) e 1k (adição de uma cadeia acíclica insaturada) foram inativos (IC₅₀ > 80 µg/mL) contra as formas amastigotas e tripomastigotas da espécie *T. cruzi*.

Pôde-se perceber que a adição de um grupo volumoso e a manutenção do radical trimetoxibenzeno proporcionou ao análogo 1m (IC₅₀ < 2.5 µg/mL) a melhor atividade tripanocida em relação aos demais análogos e da própria amida natural 1a (IC₅₀ > 80 µg/mL). Em relação ao análogo 18b da piperina (18a), a retirada das insaturações na cadeia alifática reduziu a atividade (18b IC₅₀ < 4.8 µg/mL), o que pode justificar a importância das insaturações para a atividade tripanocida da molécula.

Cotiguiba e colaboradores [17] realizaram experimentos com a piplartina, piperina e alguns análogos sintéticos frente às formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*. Os autores observaram que semelhantemente a piplartina, a redução ou retirada das ligações duplas da piperina causava uma diminuição significativa na toxicidade, indicando-as como essenciais na atividade tripanocida. O trabalho dos autores também sugere que as ligações conjugadas com um grupo carbonila são importantes para atividade tripanocida.

Vieira e colaboradores [18], avaliaram o efeito da piplartina frente o proteoma de epimastigotas de *T. cruzi* usando 2D-DIGE, os resultados do estudo sugeriram que a atividade piplartina em tripanossomos promoveu desequilíbrio de algumas enzimas importantes relacionadas ao metabolismo redox nesses parasitas. Os dados encontrados para as amidas naturais são variados e diferentes dos nossos, e podem ser explicados pela diferente susceptibilidade de várias cepas e formas do parasito.

O ensaio de citotoxicidade frente as células fibroblásticas de camundongo L929, não demonstrou significativa toxicidade após 96h de incubação nas diferentes concentrações (Tabela I).

A toxicidade das amidas naturais (piplartina e piperina) frentes a algumas linhagens celulares é bem referenciada em vários trabalhos. Sunilla e Kuttan [19], relatam em seu trabalho que a piperina produz citotoxicidade em relação às células L929 em cultura, a uma concentração de 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Estudos realizados por Chang-Yih e colaboradores [20] sugerem que esta maior citotoxicidade da piplartina deve-se a presença de duas carbonilas α,β -insaturadas. Os nossos dados corroboram com esta hipótese, uma vez que os análogos 1b, 1g, 1k, 1m e 14f não foram citotóxicos. A piperina e seu análogo 18b foram fracamente citotóxicos.

A substância 1m apresentou a melhor atividade tripanocida e não apresentou citotoxicidade na maior concentração testada para a célula, apresentando um bom índice de seletividade (63.93). De acordo com Romanha e colaboradores [14] somente os compostos com Índice de Seletividade maior ou igual a 50 são considerados ativos e recomendados para ensaios *in vivo*.

Nos análogos 1b, 1g, 1k, 14f e 18b percebemos que as alterações estruturais contribuíram com a melhora na toxicidade frente às células L929, porém, para alguns análogos essas alterações demonstram a diminuição da atividade tripanocida. As modificações estruturais feitas em grupos funcionais são responsáveis pelas atividades biológicas [21]. Segundo Campelo e colaboradores [22] essas alterações nas estruturas moleculares podem provocar em alguns casos, diminuição da toxicidade com uma perda associada da atividade biológica investigada.

Os ensaios hemolíticos foram realizados com eritrócitos humanos. Nos gráficos 1 e 2 são apresentados os resultados do teste hemolítico dos compostos 1a, 1b, 1g, 1k, 1m, 14f, 18a e 18b na concentração máxima de 200 μM . São representadas também as médias das triplicatas e os desvios-padrão (\pm) de um dos três experimentos realizados de forma independente. Observa-se que os valores de absorbância dos compostos foram muito próximos ao valor do controle de hemácias mantidas em meio RPMI (CN) nos dois gráficos, não apresentando diferença estatística. Portanto, os compostos não foram hemolíticos na maior concentração testada (200 μM).

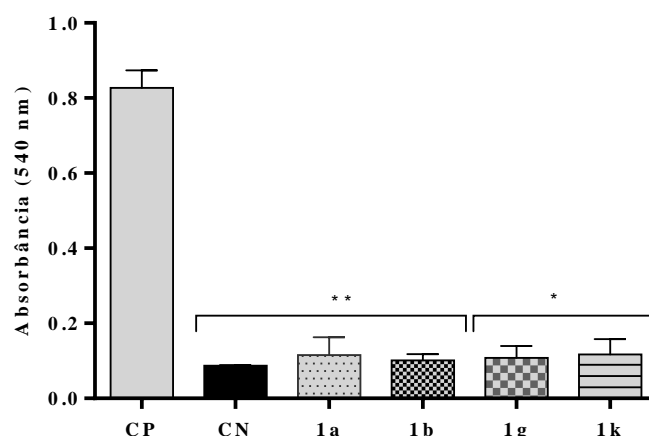


Grafico 1. Avaliação da taxa hemolítica dos compostos 1a, 1b, 1g e 1k (200 μ M). As colunas marcadas com asterisco (*) representam a diferença estatística significativa ($* = p \leq 0.05$ e $** = p \leq 0.01$) em relação ao grupo controle positivo (CN) pelo teste ANOVA ($p < 0,05$), pós-Teste de Tukey. A barra cinza (CP) representa os eritrócitos tratados com tampão contendo saponina (0.05%) e a barra preta (CN) representa o controle de hemácias mantidas em meio RPMI e não tratados. A média e desvio-padrão foram analisados entre diferentes pontos de cada coluna.

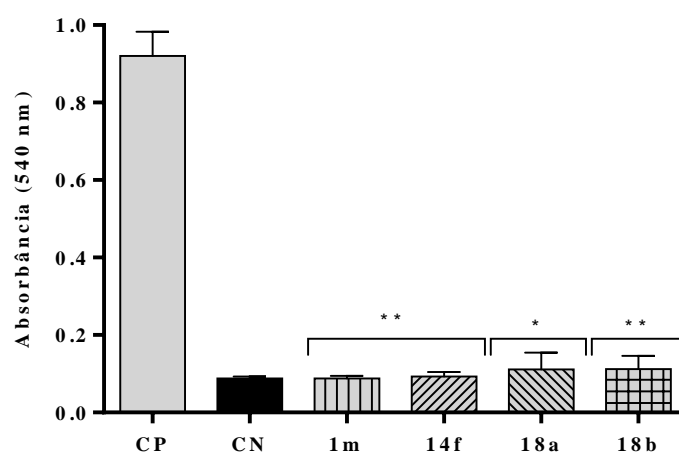


Grafico 2. Avaliação da taxa hemolítica dos compostos 1m, 14f, 18a e 18b (200 μ M). As colunas marcadas com asterisco (*) representam a diferença estatística significativa ($* = p \leq 0.05$ e $** = p \leq 0.01$) em relação ao grupo controle positivo (CN) pelo teste ANOVA ($p < 0,05$), pós-Teste de Tukey. A barra cinza (CP) representa os eritrócitos tratados com tampão contendo saponina (0.05%) e a barra preta (CN) representa o controle de hemácias mantidas em meio RPMI e não tratados. A média e desvio-padrão foram analisados entre diferentes pontos de cada coluna.

A atividade hemolítica das amidas piplartina e piperina já havia sido avaliada em outros estudos, Bezerra e colaboradores demonstraram que a piplartina também normaliza as proporções de leucócitos e não induz hemólise de eritrócitos em camundongos [23-24].

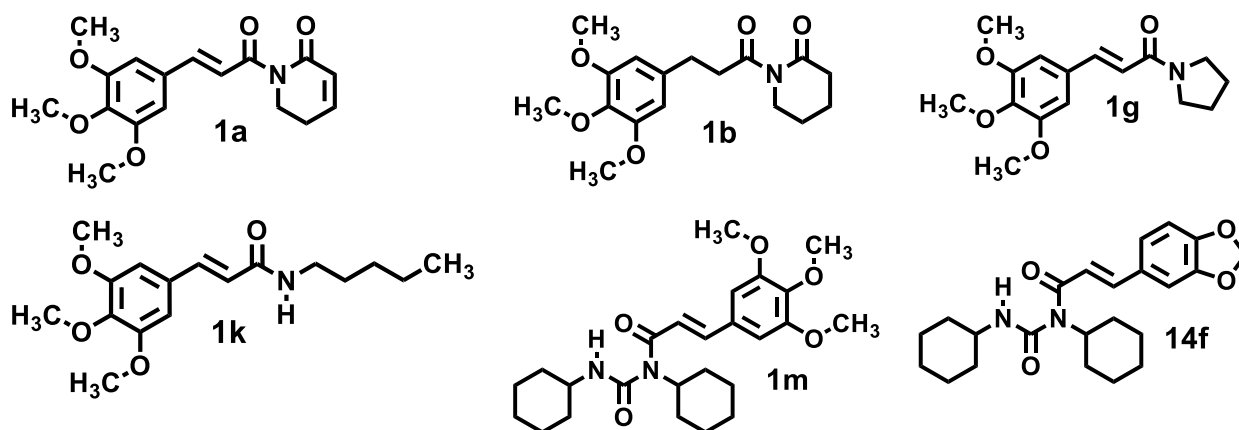


Figura 1. Estruturas dos compostos 1a, 1b, 1g, 1k, 1m e 14f.



Figura 2. Estruturas dos compostos 18a e 18b.

Estudo realizado por Wang e colaboradores [25] sobre a atividade hemolítica das saponinas estereoidais revelaram que os compostos que possuem dupla ligação entre os carbonos indicaram leves alterações nesta atividade. Berliner e Schoenheimer [26] em seu estudo sobre ácidos biliares e esteróis associam a ação anti-hemolítica do colesterol e do ácido biliar à presença da ligação dupla. Estudos realizados por Oda e colaboradores [27] mostra que ceramidas com ligações insaturadas na cadeia acíclica gorda estimulam a hemólise induzida pela toxina de eritrócitos de ovelha.

3. CONSIDERAÇÕES

A partir deste estudo, pode-se observar que o grupo funcional trimetoxibenzeno e as insaturações são importantes para as atividades avaliadas. Foram considerados ativos (tripanocida *in vitro*) os compostos 1m, 18a e 18b. O composto 1m é recomendado para ensaios *in vivo*. Nenhum dos compostos apresentou atividade hemolítica na maior concentração. Assim, todos os compostos são de interesse para futuras investigações.

Agradecimentos

Agradecemos ao Instituto Federal de Rondônia, campus Porto Velho – Calama; Plataforma de Bioensaios de Malária e Leishmaniose – FIOCRUZ-RO; Instituto Nacional e Epidemiologia na Amazônia Ocidental (INCT-EpiAmO); Instituto René Rachou / IRR - FIOCRUZ-MG; Instituto de Química da Universidade de São Paulo – USP e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental – PGBIOEXP/UNIR.

Declaração de interesse

Nenhum potencial conflito de interesse foi relatado pelos autores.

REFERENCES

- [1] DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. New York: John Wiley & Sons. 2008, 546p. 2008
- [2] EGUSA, H.; DOI, M.; SAEKI, M.; FUKUYASU, S.; AKASHI, Y.; YOKOTA, Y.; YATANI, H.; KAMISAKI, Y. The small molecule harmine regulates NFATc1 and Id2 expression in osteoclast progenitor cells. **Bone**. Aug;49(2):264-74. 2011
- [3] ZAKER, F.; OODY, A.; ARJMAND, A. A study on the antitumoral and differentiation effects of peganum harmala derivatives in combination with ATRA on leukaemic cells. **Arch Pharm Res**. Jul; 30(7):844-9. 2007
- [4] FARZIN, D.; HAGHPARAST, A.; MOTAMAN, S.; BARYAR, F.; MANSOURI, N. Effects of harmane and other β -carbolines on apomorphine-induced licking behavior in rat. **Pharmacol Biochem Behav**. Apr;98(2):215-9. 2011
- [5] BOUAYAD, N.; RHARRABE, K.; LAMHAMDI, M.; NOUROUTI, N.G.; SAYAH, F. Dietary effects of harmine, a β -carboline alkaloid, on development, energy reserves and α -amylase activity of *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). **J Biol Sci**. Jan; 19(1):73-80. 2012
- [6] SINGH, T.P.; SINGH, O.M. Recent Progress in Biological Activities of Indole and Indole Alkaloids. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. Volume 18, Issue 1. 2018
- [7] CHATTERJEE, S.; NIAZ, Z.; GAUTAM, S.; ADHIKARI, S.; VARIYAR, P.S.; SHARMA, A. Antioxidant activity of some phenolic constituents from green pepper (*Piper nigrum* L.) and fresh nutmeg mace (*Myristica fragrans*). **Food Chemistry**, 101(2), 515–523. 2007
- [8] BOLL, P.M.; HANSEN, J.; SIMONSEN, O.; THORUP, N. Synthesis and molecular structure of pipartine (piperlongumine). **Tetrahedron**, 40(1), 171–175. 1984

- [9] MHASKE, D.B.; SREEDHARAN, S.; MAHADIK, K.R. Role of Piperine as an Effective Bioenhancer in Drug Absorption. **Pharmaceutica Analytica Acta** 9:591. 2018
- [10] COHEN, G.; HOCHSTEIN, P. Generation of Hydrogen Peroxide in Erythrocytes by Hemolytic Agents. **Biochemistry**, 3(7), 895–900. 1964
- [11] BRASIL.Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde : volume 3** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. – 1. ed. atual. – Brasília: Ministério da Saúde. 2017
- [12] BRASIL. Governo do Estado de Rondônia. Secretaria de Estado da Saúde – Agência Estadual de vigilância em saúde – AGEVISA. **Relatório Anual de Gestão 2017. Rondônia; AGEVISA**. 2018. Disponível em: <http://www.rondonia.ro.gov.br/publicacao/relatorio-de-gestao-2017/>. Acesso: 22 de fevereiro de 2019, às 17h36.
- [13] COURA Jr.; DE CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 97: 3-24. 2002
- [14] ROMANHA, A.J.; CASTRO, S.L.; SOEIRO, M. D.E. N.; LANNES-VIEIRA, J.; RIBEIRO, I.; TALVANI, A.; BOURDIN, B.; BLUM, B.; OLIVIERI, B.; ZANI, C.; SPADAFORA, C.; CHIARI, E.; CHATELAIN, E.; CHAVES, G.; CALZADA, J.E.; BUSTAMANTE, J.M.; FREITAS-JUNIOR, L.H.; ROMERO, L.I.; BAHIA, M.T.; LOTROWSKA, M.; SOARES, M.; ANDRADE, S.G.; ARMSTRONG, T.; DEGRAVE, W.; ANDRADE, Z.A. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 2010;105: 233-238.
- [15] BRODIE, B.B.; UDENFRIEND, S. Metabolites of pamaquine in urine. *Proc Soc Exp Biol Med*. Aug; 74(4):845-8. **PubMed PMID**: 14781199. 1950
- [16] KUBLIK, H.; BOCK, T.K.; SCHREIER, H.; MÜLLER, B.W. Nasal absorption of 17- β estradiol from different cyclodextrin inclusion formulations in sheep. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 42, p. 320-24. 1996
- [17] COTINGUIBA, F.; REGASINI, LO.; BOLZANI, VS.; DEBONSI, HM.; PASSERINI, GD.; SICARELLI, RMB.; KATO, MJ.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Med Chem Res**. 18:703–711. 2009
- [18] VIEIRA, G.; SILVA, M.T.A.D.; REGASINI LO, F.C.; LAURE, H.J.; ROSA, J.C.; FURLAN. M.; CICARELLI, R.M.B. *Trypanosoma cruzi*: analysis of two different strains after pipartine treatment. **Braz J Infect Dis**. May - Jun;22(3):208-218. 2018
- [19] SUNILA, E.S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. **J Ethnopharmacol**. Feb;90(2-3):339-46. 2004
- [20] CHANG-YIH, D.; YANG-CHANG, W.; SHANG-KWEI, W. Alcalóides de piridona citotóxicos de *Piper aborescens*. **Phytochemistry**. 29 (8), 2689-2691. doi: 10.1016 / 0031-9422 (90) 85215-2 . 1990

[21] LAGO, E.M.; XAVIER, R.P.; TEIXEIRA, T.R.; SILVA, L.M.; DA SILVA FILHO, A.A.; DE MORAES, J. Antischistosomal agents: Estado de arte e perspectivas. **Futuro Med.Chem.**10, 89-120. 2018

[22] CAMPELO, Y.; OMBREDANE, A.; VASCONCELOS, A.G.; ALBUQUERQUE, L.; MOREIRA, D.C.; PLÁCIDO, A.; ROCHA, J.; FOKOUE, H.H.; YAMAGUCHI, L.; MAFUD, A.; MASCARENHAS, Y.P.; DELERUE-MATOS, C.; BORGES, T.; JOANITTI, G.A.; ARCANJO, D.; KATO, M.J.; KUCKELHAUS, S.; SILVA, M.; MORAES, J.; LEITE, J.R.S.A. Structure-Activity Relationship of Piplartine and Synthetic against *Schistosoma mansoni* and Cytotoxicity to Mammalian Cells. **Int J Mol Sci** 19: 1802-1818. 2018

[23] BEZERRA, D.P.; DE CASTRO, F.O.; ALVES, A.P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.; ELMIRO, F.J.; DE ALENCAR, N.M.; MESQUITA, R.O.; LIMA, M.W.; COSTA-LOTUFO, L.V. *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **J. Appl. Toxicol.**, v.28, p.156–163. DOI: 10.1002/jat.1261. 2008

[24] BEZERRA, D.P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.; ELMIRO, F.J.; COSTA-LOTUFO, L.V. Antiproliferative effects of two amides, piperine and piplartine, from Piper species. **Z Naturforsch C**. Jul-Aug;60(7-8):539-43. 2005

[25] WANG, Y.; ZHANG, Y.; ZHU, Z.; ZHU, S.; LI, Y.; LI, M.; YU, B. Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity, and cytotoxicity of steroid saponins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 15(7), 2528–2532. 2007

[26] BERLINER, F.; SCHOENHEIMER, R. Hemolytic And Antihemolytic Properties Of Bile Acids And Sterols In Relation To Their Structure. **Journal of Biological Chemistry**, 124, 525-541. 1938

[27] ODA, M.; MATSUNO, T.; SHIIHARA, R.; OCHI, S.; YAMAUCHI, R.; SAITO, Y.; IMAGAWA, H.; NAGAHAMA, M.; NISHIZAWA, M.; SAKURAI, J. The relationship between the metabolism of sphingomyelin species and the hemolysis of sheep erythrocytes induced by *Clostridium perfringens* alpha-toxin. **J Lipid Res**. May;49(5):1039-47. doi: 10.1194/jlr.M700587-JLR200. Epub 2008 Feb 8. 2008