



Notas sobre a atividade antileishmania e citotóxica de análogos da piplartina

Notes about antileishmania and cytotoxic activity of piplartine analogs

K. M. de Araújo-Vilges^{1*}; S. V. de Oliveira²; J. R. S. A. Leite³; S. A. S. Kuchelhaus³

¹Laboratório de Imunologia Celular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, 70910-900, Brasília, Distrito Federal, Brasil.

²Departamento de Saúde Coletiva, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, 38405-320, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

³Laboratório de Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, 70910-900, Brasília, Distrito Federal, Brasil.

*kelinemed@gmail.com

(Recebido em 22 de setembro de 2018; aceito em 22 de janeiro de 2019)

As leishmanioses são doenças parasitárias negligenciadas que afetam uma proporção significativa da população humana global. Muitos dos medicamentos disponíveis são tóxicos, caros e frequentemente ineficazes. A piplartina é uma amida extraída da espécie *Piper tuberculatum* que apresenta diferentes atividades biológicas, tendo destaque para ação antitumoral, antifúngica e antiparasitária. A utilização de substâncias sintetizadas a partir do modelo da piplartina pode ser importante para o desenvolvimento de novas drogas. O presente estudo avaliou o efeito dos análogos (A, B e C) da piplartina, em cultivos de *Leishmania amazonensis* e em células peritoneais de camundongos swiss. Todas as concentrações utilizadas de A, B e C diminuíram o percentual de formas promastigotas de *L. amazonensis* e também a viabilidade das células peritoneais, sendo a amida B a que apresentou melhor atividade biológica. Novos ensaios serão necessários para avaliar o efeito desses análogos sobre os macrófagos infectados, levando em consideração a modulação da resposta imune.

Palavras-chave: Leishmania, Piperaceae, piplartina, amidas.

Leishmaniasis is a neglected parasitic diseases that affect a significant proportion of the global human population. Many of the available medications are toxic, expensive and often ineffective. Piplartine is an amide extracted from the species *Piper tuberculatum* that presents different biological activities, with emphasis on antitumor, antifungal and antiparasitic action. The use of substances synthesized from the piplartine model may be important for the development of new drugs. The present study evaluated the effect of piplartine analogs (A, B and C) on *Leishmania amazonensis* cultures and on the peritoneal cells of swiss mice. All concentrations of A, B and C decreased the percentage of *L. amazonensis* promastigotes and also the viability of the peritoneal cells, with amide B being the one with the best biological activity. New assays will be required to evaluate the effect of these analogs on infected macrophages, taking into account the modulation of the immune response.

Keywords: Leishmania, Piperaceae, Piplartine, amides.

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças amplamente distribuídas em todo o mundo e são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* [1]. A imunopatogênese das leishmanioses é dependente de fatores intrínsecos ao hospedeiro, como o perfil imunogenético, e da especificidade antigênica de *Leishmania* sp. [2]. Um amplo espectro de manifestações clínicas pode ser observado: Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose Cutânea Mucosa (LCM), Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) e Leishmaniose Disseminada (LD), todas variantes da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Além disso, pode-se citar também a Leishmaniose Visceral (LV) [3]. No Brasil, há registros de casos autóctones da LTA em todos os estados da federação [4].

Algumas espécies de *Leishmania* responsáveis pela LTA já foram descritas no país, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. A *Leishmania (Leishmania) amazonensis* é uma espécie dermatotrófica, amplamente distribuída no Brasil e é o agente etiológico da leishmaniose cutânea e leishmaniose cutânea difusa [5,6]. Durante décadas as drogas antimonialis e anfotericina B foram utilizadas para tratar a doença, porém, esses medicamentos disponíveis são tóxicos, caros e muitas vezes ineficazes. As dificuldades no controle das leishmanioses estimulam a busca por novos agentes terapêuticos [7,8].

A família Piperaceae é uma das famílias mais primitivas das angiospermas, com cerca de 10 a 12 gêneros e um número estimado de 1400 a 2000 espécies distribuídas nos trópicos. Os maiores gêneros *Piper* e *Peperomia* são encontrados na flora brasileira [9,10]. A espécie *Piper tuberculatum* Jacq. conhecida no nordeste do Brasil como “*pimenta - longa*” ou “*pimenta - d’arda*” tem sido amplamente utilizada para fins medicinais [11]. A piplartina é uma amida encontrada em espécies do gênero *Piper*, como *P. tuberculatum* Jacq. [12], que apresenta diferentes atividades biológicas, tendo destaque para ação anti-inflamatória, antitumoral, antifúngica e antiparasitária [13,14].

Para caracterizar a eficácia de uma substância bioativa é importante determinar o mecanismo de ação frente as células do hospedeiro, pois este, pode não estar restrito ao agente etiológico, causando danos a célula humana. Assim diversos modelos experimentais têm sido utilizados para avaliar a citotoxicidade, como: a utilização de macrófagos peritoneais [15], linfócitos humanos [16], linhagens celulares MRC-5 [17] e fibroblastos de murino [18,19].

Tendo em vista as diferentes atividades biológicas da piplartina, esta tem sido utilizada como modelo para síntese de outras amidas, como as utilizadas neste estudo. A obtenção desses análogos pode ser importante para se estudar as relações entre a estrutura e a atividade dessas substâncias [20]. Sabe-se que a descoberta de um fármaco baseado em modificações estruturais é uma técnica que vem sendo bastante explorada pela indústria farmacêutica [21]. Assim o presente estudo visa avaliar o efeito dos análogos da piplartina sobre *L. amazonensis* bem como sobre as células peritoneais de camundongos swiss.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Amidas

A piplartina foi obtida a partir da raiz da planta *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae), coletada em 4 de maio de 2015 no jardim do Instituto de Química (Universidade de São Paulo: -23.564616, -46.726173). As raízes foram secas a 60 ° C por 48 h. Foram triturados 105g do material vegetal. O pó foi extraído quatro vezes com diclorometano: metanol (2:1; 400 mL). O extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo. O extrato bruto foi submetido à recristalização usando acetato de etila e metanol produzindo a piplartina pura (150 mg) [22]. A identificação da espécie *Piper tuberculatum* foi realizada pela Dra. Elsie F. Guimarães e a exsicata foi depositada no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Brasil (Kato-0169). As amidas A, B e C utilizadas nesse estudo foram sintetizadas, tendo a estrutura da piplartina como modelo, no Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Foram produzidas de acordo com o esquema sintético das cinamidas, como segue: (A) sintetizada a partir do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico; (B) sintetizada a partir do ácido 3,4-metilenodioxicinâmico e (C) sintetizada a partir do ácido 4-bromocinâmico [20](Tabela 1).

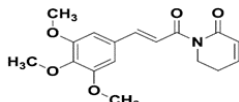
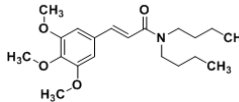
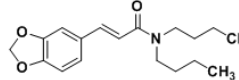
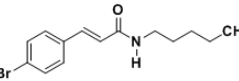
Micro-organismo

Leishmania amazonensis

A cepa MHOM/BR/pH8 proveniente do Laboratório de Leishmaniose do Núcleo de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, mantida em criopreservação, foi transferida para o meio de cultura sólido NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) por 48 h a 24 °C. Em

seguida, as formas promastigotas foram transferidas e cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado (Sigma-Aldrich) e gentamicina (40 mg/mL) (Schering Plough) até que os parasitos atingissem a fase Log de crescimento.

Tabela 1. Estrutura química da piplartina e dos análogos A, B e C.

	Amidas	Estrutura química
	Piplartina: 1-[(E)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-enoil]-2,3-diidropiridin-6-ona	
A	(E)-N,N-Dibutil-3-(3,4,5-trimetoxifenil)acrilamida	
B	(E)-3-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N,N-dibutilacrilamida	
C	(E)-3-(4-Bromofenil)-N-pentilacramida	

Animais

Para a obtenção das células peritoneais foram utilizados camundongos da linhagem swiss, não isogênicos, pesando de 30 a 40g, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Durante os experimentos os animais foram mantidos no alojamento de animais na Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília sob temperatura ambiente ciclo claro/escuro de 12 horas, alimentados com ração balanceada e recebendo água potável *ad libitum*. O estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de ética no Uso Animal (CEUA) do instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (Doc. nº 22199/2014).

Avaliação do efeito das amidas em *L. amazonensis* pelo método MTT

O ensaio foi realizado com 10⁶ promastigotas/escavação/100 µL incubados por 2 h a 26°C em placa de 96 escavações, em triplicata, em meio RPMI 1640 acrescido com 10 % de soro fetal bovino, na presença de diferentes concentrações das amidas A, B e C (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 ou 256 µg/mL/100 µL). Em seguida, 10 µL de MTT (5 mg/mL) foi adicionado às escavações e os cultivos foram novamente incubados a 26 °C por 4 h, ao abrigo da luz. Para o controle positivo foi utilizado 4 µg/mL do antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime® Rhodia Pharma, São Paulo, Brasil) e para o controle negativo meio RPMI 1640. Para a solubilização dos cristais de formazan foi adicionada a cada escavação 50 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) e a leitura das absorbâncias foi feita a 570 nm em espectrofotômetro (Spectra Max® Plus 384, Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Os resultados foram expressos em percentual [23].

Avaliação da toxicidade das amidas em células peritoneais de camundongos swiss pelo método MTT

As células foram obtidas pela lavagem da cavidade peritoneal dos camundongos com 10 mL de Salina Tamponada Fosfato, pH 7,2, a 4 °C, centrifugadas a 400 x g por 10 min, ressuspendidas em 1 mL de RPMI 1640 e quantificadas em hemocitômetro com 0,05 % de solução de nigrosina. Em seguida, uma suspensão contendo 2x10⁵ células/escavação/100 µL foi distribuída, em triplicata, em

placa de 96 escavações na presença de diferentes concentrações das amidas A, B e C (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 ou 256 µg/mL/100 µL), incubados em câmara úmida a 37°C, na presença de 5 % de CO₂ em ar por 2 h. Decorrido esse tempo, 10 µL de MTT (5 mg/mL) foi adicionado às escavações e depois de re-incubadas, nas mesmas condições descritas por 4 h, adicionou-se 50 µL de DMSO para a solubilização dos cristais de formazan. Para o controle negativo foi utilizado meio RPMI 1640. A leitura das absorbâncias foi em espectrofotômetro (Spectra Max® Plus 384) a 550 nm e os resultados expressos em percentual [23].

Análise estatística

A normalidade das variáveis foi analisada empregando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov e considerando a distribuição normal foi empregado o teste t pareado para comparar duas amostras dependentes. As análises e as representações gráficas foram feitas empregando-se o programa Prism® Software Package (GraphPad, USA, 1997) e diferenças de $p < 0,05$ foram consideradas significantes.

3. RESULTADOS

Efeito das amidas A, B e C em cultivos de *L. amazonensis*

Os resultados mostraram que a incubação por 6 horas com as amidas A, B e C inibiu o crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis* num padrão dose dependente sem, contudo, inibir o crescimento da totalidade dos parasitos até a máxima concentração testada (256 µg/mL), na comparação com o controle (Teste t pareado; $p < 0,05$). O controle positivo, antimoniato de N-metilglucamina, foi capaz de inibir 55,4 % dos parasitos depois de 6 horas de incubação. Os percentuais de parasitos viáveis bem como as concentrações inibitórias capazes de inibir 50 % (IC₅₀) deles são mostrados na tabela 2.

Tabela 2. Percentual de formas promastigotas viáveis de *L. amazonensis* depois da incubação com diferentes concentrações das amidas A, B e C.

Amidas	Concentrações das substâncias (µg/mL) e o percentual de viabilidade (Média e DP)										CI ₅₀ µg/mL
	0	1	2	4	8	16	32	64	128	256	
A	99±0,1	63±6,5*	75±5,2*	75±2,7*	75±0,5*	75±2,6*	76±3*	68±3,3*	56±5*	53±4*	245,7
B	99±0,1	79±10*	77±5*	80±5,5*	73±7,3*	72±5,5*	69±4,4*	64±4,4*	59±5*	40±4,6*	181,8
C	99±0,1	73±10,6*	79±7,2*	73±9,1*	75±8,8*	70±7,4*	68±9*	67±8*	63±9,5*	45±6*	216,3

CI₅₀ = Concentração Inibitória; (*) indicam a significância quando comparados com o controle (Teste t pareado; $p < 0,05$).

Efeito das amidas A, B e C em cultivos de células peritoneais de camundongos swiss

Os ensaios para avaliar os possíveis efeitos tóxicos das amidas A, B e C em cultivos de células peritoneais mostraram que a incubação por 6 horas com as diferentes concentrações das substâncias foram capazes de diminuir a viabilidade celular num padrão dose dependente na comparação com o controle (Teste t pareado; $p < 0,05$). Os percentuais de células peritoneais viáveis bem como as concentrações citotóxicas capazes de reduzir 50 % (CC₅₀) da viabilidade celular são mostrados na tabela 3.

Tabela 3. Percentual de células peritoneais viáveis depois da incubação com as diferentes concentrações das amidas A, B e C.

Amidas	Concentrações das substâncias ($\mu\text{g/mL}$) e o percentual de viabilidade (Média e DP)										CC ₅₀ $\mu\text{g/mL}$
	0	1	2	4	8	16	32	64	128	256	
A	99 \pm 0,1	90 \pm 20	77 \pm 10,6	81 \pm 22	84 \pm 16,7	79 \pm 16,4	88 \pm 18,3	84 \pm 20	61 \pm 9*	47 \pm 6,3*	236,7
B	99 \pm 0,1	83 \pm 13,6	79 \pm 13	79 \pm 14,2	71 \pm 12,4	86 \pm 15	78 \pm 15,8	73 \pm 9,4*	68 \pm 13,6	73 \pm 6,5*	604,5
C	99 \pm 0,1	76 \pm 7*	78 \pm 13,4	87 \pm 14	79 \pm 12	69 \pm 8	73 \pm 6,3*	69 \pm 4*	67 \pm 12,3*	53 \pm 7,5*	271,8

CC₅₀ = Concentração citotóxica; (*) indicam a significância quando comparados com o controle (Teste t pareado; $p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

A piplartina é uma amida bastante estudada que apresenta atividades biológicas distintas [12]. Sabe-se que modificações químicas em moléculas conhecidas têm sido uma das estratégias utilizadas na ciência para a introdução de novos fármacos na terapêutica atual, pois é possível aumentar a segurança e garantir um melhor perfil farmacocinético e farmacodinâmico da molécula sintetizada [24]. Nesse sentido, a piplartina tem sido amplamente utilizada como modelo para a síntese de diferentes análogos [25]. Para tanto, nosso estudo buscou determinar o efeito de amidas (A, B e C) derivadas da piplartina em cultivos de *L. amazonensis*, e também determinar as concentrações tóxicas sobre as células peritoneais de camundongos swiss.

Os resultados mostraram que as amidas A, B e C foram capazes de reduzir o crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis*, sendo que a menor IC₅₀ foi obtida para B (181,8 $\mu\text{g/mL}$). Em relação aos efeitos tóxicos envolvendo células peritoneais de mamíferos, a amida que apresentou menor toxicidade foi a B, com uma CC₅₀ de 604,5 $\mu\text{g/mL}$.

Em um estudo realizado por Araújo-Vilges et al. (2017)[23], amidas sintetizadas, tendo a piplartina como modelo, também foram capazes de inibir o crescimento de cultivos promastigotas de *L. amazonensis* e de *Plasmodium falciparum*, *in vitro*. Além disso, nesse mesmo estudo, a amida piplartina inibiu cultivos promastigotas de *L. amazonensis* (IC₅₀ 179 $\mu\text{g/mL}$) e diminuiu a viabilidade das células peritoneais de camundongos swiss (CC₅₀ 232 $\mu\text{g/mL}$).

Nos dados aqui apresentados, a amida B se mostrou menos tóxica para as células peritoneais quando comparada a piplartina e demais amidas avaliadas. Esse efeito pode estar relacionado a presença do grupo 3-(Benzo[1,3] dioxol-5-il associado a cadeia lateral N,N - dibutilacrilamida em B, o qual não ocorre na piplartina. Schaab (2008)[14] menciona que o potencial citotóxico da piplartina está relacionado a presença de duas carbonilas α , β - insaturadas em sua estrutura. Logo, a diminuição da toxicidade em B pode estar relacionada a ausência desses grupos nessa molécula.

No presente estudo, a amida B se mostrou promissora para continuidade dos ensaios que possam futuramente auxiliar no tratamento das leishmanioses, pois inibiu as formas promastigotas de *L. amazonensis* e também apresentou baixa toxicidade para as células peritoneais de mamíferos. Sendo assim, novos estudos estão sendo realizados para avaliar a relação estrutura-atividade desses análogos, bem como, ensaios *in vitro* utilizando macrófagos peritoneais infectados com *Leishmania*, levando em consideração o efeito microbicida, a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e também a produção de citocinas inflamatórias e/ou anti-inflamatórias.

5. CONCLUSÃO

As amidas A, B e C inibiram o crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis* e também a viabilidade celular num padrão dose dependente, sendo que a B apresentou baixa

toxicidade para as células de mamíferos e também melhor efeito inibitório nos cultivos promastigotas.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos o apoio de Renata e Tainan Ribeiro pela assistência durante os experimentos realizados, ao Harold Fokoue e Massuo Kato pela síntese das amidas e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento do projeto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Medeiros IM, Nascimento ED, Hinrichsen SL. Leishmanioses (visceral e tegumentar). Hinrichsen SL. DIP-Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 398-409.
2. Soong L. Modulation of dendritic cell function by Leishmania parasites. The Journal of Immunology. J Immunol. 2008 Apr;180(7):4355-4360, doi:https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4355
3. Vieira, ÉLM, Keesen TSL, Machado PR, Guimarães LH, Carvalho EM, Dutra WO, Gollob KJ. Immunoregulatory profile of monocytes from cutaneous leishmaniasis patients and association with lesion size. Parasite Immunol. 2013 Feb;35(2):65-72, doi:10.1111/pim.12012
4. Moura IM. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana: uma revisão sistemática. [Monografia] - Universidade Federal da Bahia; 2013. 43p.
5. Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar Americana. Rev Soc Bras Med Trop. 2003 Jan/Feb; 36(1):71-80, doi:http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822003000100011
6. Rocha MN, Côrrea CM, Melo MN, Beverley SM, Martins-Filho OA, Madureira AP, Soares RP, An alternative in vitro drugs screening test using *Leishmania amazonensis* transfected with red fluorescent protein. Diagn Microbiol Infec Dis. 2013 Mar;75(3):282-291, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.018
7. Monzote L. Current treatment of Leishmaniasis: a review. Open antimicrob Agents J. 2009 Oct;1:9-19, doi:10.2174/1876518100901010009
8. Kuckelhaus SAS, Kuckelhaus CE, Tosta MI, Muniz-Junqueira MI. Pravastatin modulates macrophage functions of *Leishmania (L.) amazonensis* - infected BALB/c mice. Exp Parasitol. 2013 May;134(1):18-25, doi:10.1016/j.exppara.2013.01.020
9. Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, Tyagi OD, Prasad AK, Olsen JWCE, Boll PM. Phytochemistry of the genus Piper. Phytochemistry. 1997 Oct;46(4):597-673, doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00328-2
10. Joly AB. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. 12 ed. São Paulo: Câmara Brasileira do Livro; 1998. 777p.
11. Ferreira MGPR, Kayano AM, Silva-Jardim, I, Silva TO, Zuliani JP, Facundo VA, Calderon LA, Almeida-Silva A, Ciancaglini P, Stábeli RG. Antileishmanial activity of 3-(3,4,5-trimethoxyphenyl) propanoic acid purified from Amazonian *Piper tuberculatum* Jacq., Piperaceae, fruits. Rev bras farmacogn. 2010 Dec;20(6):1003-1006, doi:http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000033
12. Bezerra DP, Pessoa C, de Moraes MO, Saker-Neto, N, Silveira ER, Costa-Lotufo LV. Overview of the therapeutic potential of peplartine (piperlongumine) Eur J Pharm Sci. 2013 Feb;48(3):453-463, doi:https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.12.003
13. Moraes J, Nascimento C, Lopes POMV, Nakano E, Yamaguchi LF, Kato MJ, Kawano T. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of piplartine. Experimental Parasitology. 2011 Oct;127(2):357-364, doi:https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.07.004
14. Schaad EH. Estudos oxidativos biomiméticos com os produtos naturais peperina e piplartina. [Dissertação de mestrado]. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo; 2008, 78p.
15. Houghton PJ, Howes MJ, Lee CC, Steventon G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: Visualizing an elephant. J Ethnopharmacol. 2007 Apr;110(3):391-400, doi:https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.01.032
16. Reyes-Chilpa R, Estrada-Muniz E, Veja-Avila E, Abe F, Kinjo J, Hernández-Ortega S. Trypanocidal constituents in plants: 7. Mamea-type coumarins. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008 Aug;103(5):431-6, doi:http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762008000500004
17. Cabral MMO, Barbosa-Filho JM, Maia GLA, Chaves MC, Braga MV, De Souza W, Soares RO. Neolignans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. Exp Parasitol. 2010 Mar;124(3):319-324, doi:10.1016/j.exppara.2009.11.007

18. Santos KKA, Rolon M, Veja C, De Arias AR, Costa JGM, Coutinho HDM. Atividade leishmanicida in vitro de *Eugenia uniflora* e *Momordica charantia*. *Rev Cienc Farm Basica Apl.* 2013 Jan;34(1):47-50.
19. Figueiredo FG, Tintino SR, Brito DIV, Braga MFBM, Leite NF, Lucena BFF, Sobral-Souza CE, Gomez MCV, Coutinho HDM. Avaliação das potenciais atividades tripanocida e antileishmania do extrato de folhas de *Piper arboreum* (Piperaceae) e de suas frações. *Rev Cienc Farm Basica Apl.* 2014 Jan;35(1):149-154.
20. Fokoue HH. Síntese, atividades biológicas e estudo de relação de estrutura-atividade de piperamidas. [Doutorado em Química]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2015. 337p.
21. Barreiro EJ, Manssour FCA. A questão da inovação em fármacos no Brasil: Proposta de criação do programa nacional de fármacos (PRONFAR). *Quim Nova.* 2005 Nov;28(0):S56-S63, doi:<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000700012>.
22. Continguiba F, Regasini LO, Bolzani VS, Deboni HM, Passerini GD, Cicarelli RMB, Kato MJ, Furlan M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. *Med Chem Res.* 2009 Dec;18(9):703-711, <https://doi.org/10.1007/s00044-008-9161-9>
23. Araújo - Vilges KM, Oliveira SV, Couto SCP, Fokoue HH, Romero GAS, Kato MJ, Romeiro LAS, Leite JRSA, Kuchelhaus SAS. Effect of piplartine and cinnamides on *Leishmania amazonensis*, *Plasmodium falciparum* and on peritoneal cells of Swiss mice. *Pharm Biol.* 2017 Dec;55(1):1601-1607, doi:10.1080/13880209.2017.1313870
24. Martins FI. Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos candidatos a protótipos de fármacos anti-inflamatórios desenhados a partir do nerolidilcatecol. [Dissertação mestrado]. Goiânia (GO): Universidade Federal de Goiás; 2009. 99p.
25. Rao VR, Muthenna P, Shankaraiah G, Akileshwari C, Babu KH, Suresh G, Babu KS, Kumar RSC, Prasad KR, Yadav PA, Petrash JM, Reddy GB, Rao JM. Synthesis and biological evaluation of new piplartine analogues as potent aldose reductase inhibitors (ARIs). *Eur J Med Chem.* 2012 Nov;57:344-61, doi:10.1016/j.ejmech.2012.09.014