



Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck

Celso V. Nakamura, Adriana O. Santos, Michele C. Vendrametto, Patrícia S. Luize, Benedito P. Dias Filho, Diógenes A.G. Cortez, Tânia Ueda-Nakamura*

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá,
Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brasil

RESUMO: A atividade biológica do extrato bruto e as várias frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck foi avaliada em *Leishmania amazonensis*. Este estudo incluiu o processo de extração e o fracionamento biomonitorado pelo método de cromatografia de adsorção. Um aumento progressivo no efeito antileishmania foi observado durante o processo de purificação. O extrato hidroalcoólico solúvel em água (EBA) apresentou concentração inibitória 50% (IC₅₀) igual a 167 µg/mL enquanto o extrato hidroalcoólico solúvel em acetato de etila (EBAcOEt) mostrou um IC₅₀ de 30 µg/mL sobre o crescimento de formas promastigotas após 48 h de cultivo. A fração hexano (FHex) apresentou uma atividade antileishmania maior que o EBAcOEt com IC₅₀ de 21,5 µg/mL. Análises de citotoxicidade indicaram que as concentrações tóxicas do EBA, EBAcOEt e das frações foram maiores para macrófagos J774G8 do que para os protozoários.

Unitermos: *Piper regnellii*, *Leishmania amazonensis*, pariparoba, atividade antileishmania, promastigota.

ABSTRACT: "Antileishmanial activity of hydroalcoholic extract and fractions obtained from leaves of *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.)". Biological activity of the crude extract and several fractions obtained from *Piper regnellii* var. *pallescens* was assessed on *Leishmania amazonensis*. This study included the extraction process and bioassay-guided fractionation by the adsorption chromatography method. A progressive increase in the antileishmanial effect was observed in the course of the purification process. The hydroalcoholic extract water soluble (EBA) had a 50% inhibitory concentration (IC₅₀) at 167 µg/mL whereas the hydroalcoholic extract acetate soluble (EBAcOEt) showed an IC₅₀ of 30 µg/mL against the growth of promastigote forms after 48 h of culturing. The hexan fraction (FHex) showed an antileishmanial activity greater than EBAcOEt with IC₅₀ at 21.5 µg/mL. Analysis of cytotoxicity indicated that the toxic concentrations of the EBA, EBAcOEt, and fractions were higher for J774G8 macrophages than for the protozoans.

Keywords: *Piper regnellii*, *Leishmania amazonensis*, pariparoba, antileishmanial activity, promastigote.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença que afeta aproximadamente 12 milhões de pessoas no mundo. A cada ano dois milhões de novos casos são diagnosticados (WHO, 2002). Os agentes causadores dessa doença são parasitas unicelulares heteroxênicos do gênero *Leishmania* que apresentam duas formas morfológicas no seu ciclo de vida: promastigota e amastigota (Michalick, 2003). As formas promastigotas caracterizam-se por serem fusiformes e com longo flagelo; são extracelulares e vivem no trato digestório do inseto vetor. As formas amastigotas, por sua vez, são arredondadas e com

curto flagelo que não se exterioriza; são intracelulares obrigatórias e parasitam principalmente macrófagos do hospedeiro vertebrado.

Essa zoonose compreende formas clínicas que podem ser divididas em dois grupos principais: a forma tegumentar e a forma visceral. A forma tegumentar apresenta variantes e pode ser subdivida em leishmaniose cutânea localizada, cutânea difusa e cutâneo-mucosa. Estas manifestações dependem da espécie de parasita, bem como da resposta imune do indivíduo infectado (Grevelink; Lerner, 1996; Herwaldt, 1999). 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). Os compostos antimoniais indicados para o tratamento das leishmanioses são o Pentostan® e o Glucantime® (Croft; Coombs, 2003). Como drogas de segunda escolha podem ser utilizadas a Anfotericina B ou a Pentamidina (Grevelink e Lerner, 1996; Sereno et al., 2000). Contudo, vale lembrar que além do alto custo, essas drogas são tóxicas e apresentam muitos efeitos colaterais.

Assim, a medida profilática ideal seria o desenvolvimento de uma vacina. Embora haja muitos grupos trabalhando na tentativa de desenvolvê-la (Convit et al., 2004; Tewary et al., 2004) ainda há vários fatores que dificultam, tais como os mecanismos efetores da resposta imune no homem, além de obstáculos de ordem política e econômica (Handman, 1997). Devido a essas dificuldades, torna-se importante a busca por novos agentes quimioterápicos. 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). A isso tudo, acrescenta-se os avanços da medicina que possibilita a comprovação da capacidade de cura de determinadas plantas, o que garante segurança na utilização das mesmas como medicamento. Deve-se ressaltar que as drogas derivadas de plantas também podem ser prejudiciais para o organismo, uma vez que é constituída por centenas de compostos e alguns são muito tóxicos. Todavia os efeitos adversos dos agentes fitoterápicos são menores, quando comparado com o das drogas sintéticas (Calixto, 2000).

O gênero *Piper* (família Piperaceae) inclui um grande número de espécies conhecidas popularmente como Pariparoba muito utilizadas no tratamento de diversas doenças, cuja importância econômica e comercial se deve à produção de óleos essenciais de interesse na indústria farmacêutica e de inseticida (Corrêa, 1984; Maia et al., 1987; Silva; Machado, 1999; Santos et al., 2001; Mesquita et al., 2005). Cerca de 700 espécies pertencentes ao gênero *Piper* estão distribuídas nos dois hemisférios, tanto em regiões tropicais como em subtropicais (Parmar et al., 1997). Na Jamaica, de 11 espécies estudadas *P. aduncun* (L) e *P. hispidum* (SW) foram listadas como remédio para estômago e repelente de insetos. *P. amalago* (L.), nativa do México, é usada para aliviar dores no estômago e como antiinflamatório e *P. marginatum* nativa do Brasil mostrou atividade antiinflamatória (Falcão et al 2005). Raízes e frutos de *P. chaba* (Hunter) têm muitas aplicações na medicina, dentre elas no tratamento de asma, bronquite e dores abdominais (Parmar et al., 1997) mas, um estudo com *P. nigrum* dos Estados Unidos da América, não mostrou atividade antidiabética *in vitro* (Barbosa-Filho et al., 2005).

A *Piper regnellii* var. *pallescens* apresenta amplo espectro de atividade antimicrobiana (bactérias

Gram-positivas, Gram-negativas e fungos leveduriformes) (Holetz et al., 2002; Pessini et al 2003a). Estudos fitoquímicos da raiz mostraram que esta espécie apresenta um acúmulo de vários fenilpropanóides e neolignanas dihidrobenzofuranicas incluindo o conocarpano como composto majoritário (Benevides et al., 1999; Pessini et al., 2005). Recentemente, Luize et al. (2005) demonstraram que extratos brutos de folhas de *P. regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* apresentam atividade antileishmania e antitripanossoma.

No presente estudo foi avaliada a atividade antileishmania de extratos brutos e frações obtidas de folhas de *P. regnellii* var. *pallescens* em formas promastigota de *L. amazonensis*. A atividade citotóxica também foi verificada em macrófagos J774G8 através da técnica da Sulforodamina B.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do extrato bruto e frações

As folhas de *P. regnellii* var. *pallescens* foram coletadas no Horto de plantas medicinais “Profª. Irenice Silva” do campus da Universidade Estadual de Maringá (UEM). A espécie vegetal foi identificada por MSc. Marília Borgo do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e, uma exsiccata foi depositada como documento taxonômico no Herbário da UEM, sob número de registro HUM 8392.

O material coletado foi seco em estufa de ar circulante (Quimis®, modelo Q-31) a temperatura de 40°C, durante 72 h e moído em moinho de facas (Tecnal Marconi®, modelo TE 048), acondicionado e armazenado em local seco ao abrigo da luz.

As folhas secas e moídas foram extraídas com solução hidroalcoólica a 90% v/v, na proporção 1:10 (material vegetal:solvente). O extrato foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotatório. A parte solúvel em água recebeu a denominação de extrato bruto fase aquosa (EBA) e a parte insolúvel, solubilizada em acetato de etila, denominada de extrato bruto fase acetato (EBAcOEt). Os extratos foram armazenados em frascos fechados e mantidos a -20°C em freezer.

Os extratos brutos (fase aquosa e fase acetato 90%) foram submetidos aos ensaios biológicos. O EBAcOEt, que apresentou maior atividade antileishmania, foi submetido ao fracionamento por Cromatografia em Coluna (CC) de adsorção sob pressão reduzida, utilizando diferentes sistemas eluentes, sendo eles: hexano, clorofórmio, clorofórmio:acetato de etila 95:5, clorofórmio:acetato de etila 90:10, clorofórmio:acetato de etila 50:50, acetato de etila, acetona, metanol, metanol:água, cujas frações foram denominadas de FHex, FClo, FCA5, FCA10, FCA50, FAac, Face, FMet, FMea, respectivamente. Estas foram posteriormente submetidas aos ensaios biológicos.

Manutenção de *Leishmania amazonensis*

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (cepa WHOM/BR/75/JOSEFA) foram cultivadas em meio Warren (Warren, 1960) pH 7,2, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB – Cultilab, Campinas) a 28 °C. As amostras foram mantidas através de passagens semanais no mesmo meio.

Atividade antipromastigota

Para avaliar o efeito dos extratos brutos e frações obtidas de folhas de *P. regnellii* var *pallescens* no crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis*, estes foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se uma solução estoque de 10.000 µg/mL. Em seguida foram realizadas diluições em meio de Warren para obter concentrações finais de 1000, 500, 100 e 10 µg/mL. Nestas foram adicionados os protozoários com 72 h de cultivo (inóculo inicial de 1×10^6 céls/mL). Os ensaios foram realizados em microplacas de 24 poços, incubadas a 28 °C. Após 72 h, o crescimento foi avaliado através da contagem dos protozoários em câmara de Neubauer. Anfotericina B utilizado como controle positivo foi obtido de Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, São Paulo, Brasil.

Ensaio de citotoxicidade pelo método colorimétrico da sulforodamina B

Cem microlitros de uma suspensão de macrófagos J774G8 (5×10^5 céls/mL em RPMI 1640) foram semeados em placas de 96 poços incubados a 37°C com tensão de 5% de CO₂. Após 24 h de incubação foram adicionadas 100 µL das várias concentrações das soluções do extrato bruto e frações das folhas de *P. regnellii* e incubadas por mais 48 h. O crescimento celular foi avaliado através do método colorimétrico de sulforodamina B previamente descrito (Skehan et al., 1990) com poucas modificações. As células foram fixadas com 50 µL de ácido tricloroacético a 10% em temperatura de 4°C por 1 h, lavadas 5 vezes com água corrente e secas. Em seguida foram adicionados 50 µL de solução de sulforodamina B (0,4% p/v em de ácido acético aquoso 1%) em cada poço e a placa foi incubada por 30 min a 4°C ao abrigo da luz. O corante foi removido lavando-se os poços 4 vezes com ácido acético 1%. Para avaliação do crescimento celular foram adicionados 150 µL de Tris base a 10 mM em cada poço, a placa foi agitada por 15 min e a leitura realizada em leitor de ELISA (Bio-Tek FL-600 Microplate Fluorescence Reader), em densidade óptica (DO) de 550 nm.

Análise estatística

Os dados foram analisados através da Análise

de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. O nível de significância aceito foi de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliadas as atividades dos extratos brutos e suas frações, obtidas a partir de folhas de *Piper regnellii* var *pallescens*, sobre formas promastigota de *L. amazonensis* cultivada em meio de Warren a 28 °C durante 72 h. O efeito do extrato bruto hidroalcoólico fase aquosa e fase acetato de etila no crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* está representado na Figura 1. O EBACoEt apresentou maior atividade sobre *L. amazonensis* com uma Concentração Inibitória 50% (IC₅₀) de 30 µg/mL, quando comparado com o EBA (IC₅₀ de 167 µg/mL). Por apresentar um efeito antileishmania maior o EBACoEt foi submetido ao processo de fracionamento utilizando-se uma coluna cromatográfica de adsorção sob pressão reduzida.

A Figura 2 mostra os resultados da atividade antileishmania das 9 frações (FHex, FClo, FCA5, FCA10, FCA50, FAac, Face, FMet, FMea) obtidas a partir do EBACoEt. As frações FHex e FClo foram as que apresentaram melhor atividade com um IC₅₀ de 21,5 e 32,0 µg/mL, respectivamente. Por outro lado as frações de polaridade crescente (FCA5, FCA10, FCA50, FAac, Face, FMet, FMea) apresentaram uma atividade inibitória inferior a do EBACoEt com um IC₅₀ de 176,5, 188,2, 133,3, 123,5, >1.000, >1.000 e >1.000 µg/mL, respectivamente. O DMSO na concentração máxima utilizada (1%) não interferiu no crescimento do parasita. Anfotericina B foi utilizada como controle positivo contra *L. amazonensis* e apresentou um IC₅₀ de 0,060 µg/mL (dados não mostrados).

Em um estudo realizado com formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Chagas), Luize et al. (2002) verificaram que o extrato bruto fase acetato de etila, obtido a partir de folhas de *Piper regnellii*, apresenta IC₅₀ de 54,0 µg/mL e a fase aquosa IC₅₀ > 500 µg/mL. Similarmente aos resultados obtidos no presente trabalho, as frações menos polares do EBACoEt apresentaram maior atividade tripanocida. As frações FHex e FClo, a uma concentração de 100 µg/mL, foram capazes de inibir o crescimento das formas epimastigotas em 92,2 e 86,9 %, respectivamente.

Diversos estudos têm demonstrado a atividade biológica das espécies de plantas pertencentes ao gênero *Piper*. Extrato de folhas de *P. aduncum* apresenta atividade anticonvulsiva (Cáceres et al., 1995), extrato de *P. methysticum* apresenta atividade antifúngica (Locher et al., 1995) e extrato clorofórmio de *P. sarmentosum* demonstra considerável efeito antimalárico (Rahman et al., 1999). Pessini et al. (2003b) relataram uma forte atividade de *P. regnellii* sobre *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, uma moderada atividade em *Pseudomonas aeruginosa* e uma fraca atividade em *Escherichia coli*.

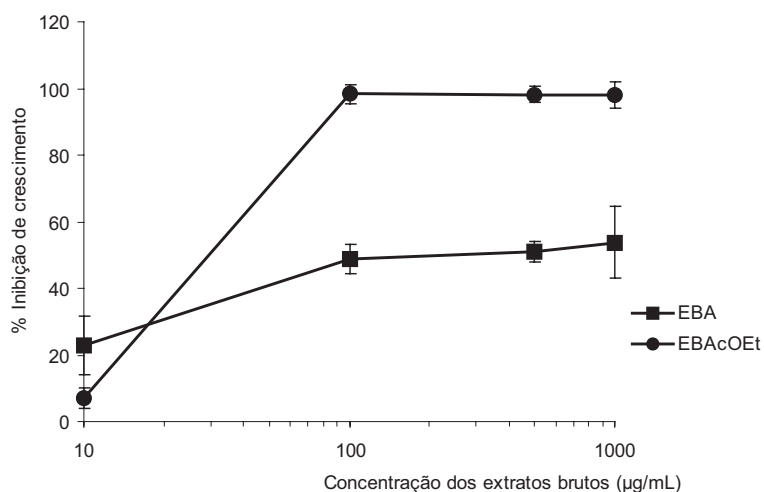


Figura 1. Efeito dos extratos brutos (EBA e EBAcOEt) obtidos a partir de folhas de *Piper regnellii* sobre formas promastigota de *Leishmania amazonensis* cultivadas durante 72 h nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL. Os resultados foram realizados em duplicata e representam a média de 2 experimentos independentes.

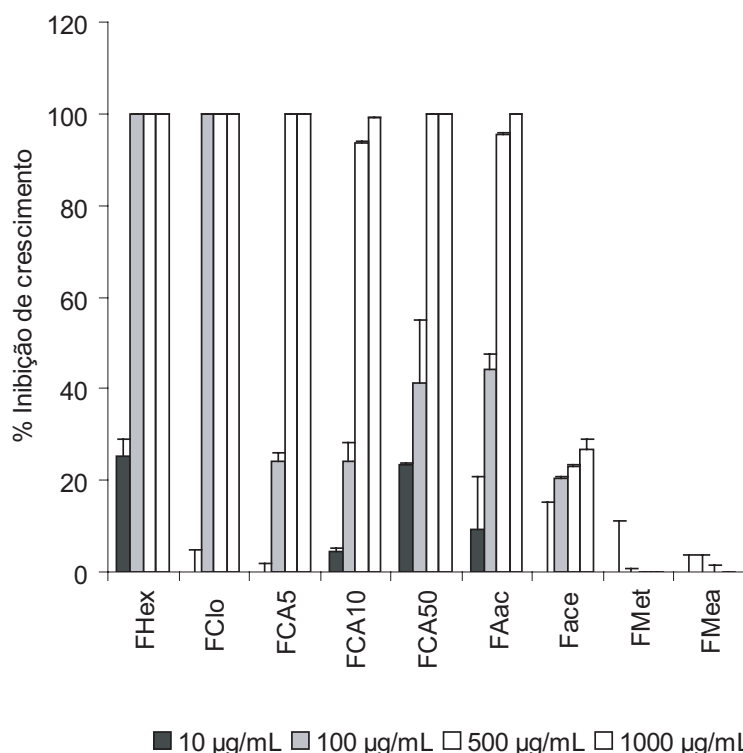


Figura 2. Efeito das frações obtidas a partir do extrato bruto (EBAcOEt) de *Piper regnellii* sobre formas promastigota de *Leishmania amazonensis* cultivadas durante 72 h nas concentrações de 10, 100, 500 e 1000 µg/mL. Os valores estão expressos em média (* estatisticamente diferente do controle – ANOVA seguida pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$). Controle positivo: Anfotericina B ($IC_{50}=0,060\mu\text{g/mL}$).

Tabela 1. Valores de CC_{50} para macrófagos J774G8 e IC_{50} para formas promastigota de *Leishmania amazonensis* e seus respectivos índices de seletividade (IS).

	J774G8	Promastigota	IS
	CC_{50}	IC_{50}	
	µg/mL		
EBA	>1000	167	>5,9
EBAcOEt	272	30	9,1
FHex	138	21,5	6,4
FClo	1000	32	31,2
FCA5	1000	176,5	5,7
FCA10	300	188,2	1,6
FCA50	300	133,3	2,3
FAac	300	123,5	2,4
Face	>1000	>1000	Nd
FMet	940	>1000	Nd
FMea	>1000	>1000	Nd

CC_{50} = Concentração citotóxica para 50% do tapete celular.

IC_{50} = Concentração capaz de inibir em 50% o número de protozoários em cultura.

IS = CC_{50} J774G8 / IC_{50} promastigota

Nd = não determinado

Produtos naturais têm um grande potencial na pesquisa por novos e seletivos agentes para o tratamento de importantes doenças causadas por protozoários (Wright; Phillipson, 1990). Várias classes de substâncias já foram isoladas a partir de espécies do gênero *Piper* tais como alcalóides, lignanas, neolignanas, terpenos e ácido benzóico e têm se mostrado bioativas (Zacchino et al., 1997; Park et al., 2002; López et al., 2002; Martins et al., 2003).

Um importante critério na pesquisa de compostos ativos com potencial terapêutico contra *L. amazonensis*, é determinar a ausência de efeitos tóxicos nas células do hospedeiro. A citotoxicidade para macrófagos J774G8 e para protozoários foi comparada utilizando o índice de seletividade (IS), que consiste na razão entre a Concentração Citotóxica 50% (CC_{50}) para células J774G8 e IC_{50} para protozoários. Os resultados de IS apresentados na Tabela 1 mostram que o EBAcOEt e a FHex são 9,1 e 6,4 vezes menos tóxicos para as células J774G8 do que para os protozoários. Resultado interessante também foi obtido com a fração FClo que apresentou atividade antileishmania semelhante ao do EBAcOEt, porém com um IS de aproximadamente 3,4 vezes maior.

Os resultados do presente trabalho demonstram que o extrato e frações obtidas de folhas de *P. regnellii* var *pallescens* apresentam atividade antileishmania. Estudos fitoquímicos e biológicos estão sendo realizados em nosso laboratório com a *P. regnellii* var *pallescens* para o isolamento e identificação de substâncias bioativas em *L. amazonensis* a partir das frações que apresentaram boa atividade.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Capacitação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Financiadoras de Estudos e Projetos – FINEP, PRONEX/ Fundação Araucária e Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Barbosa-Filho JM, Vasconcelos THC, Alencar AA, Batista LM, Oliveira RAG, Guedes DN, Falcão HS, Moura MD, Diniz MFFM, Modesto-Filho J 2005. Plants and their active constituents from South, Central, and North América with hypoglycemic activity. *Rev Bras Farmacogn* 15: 392-413.
- Benevides PJC, Sartorelli P, Kato MJ 1999. Phenilpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. *Phytochemistry* 52: 339-343.
- Cáceres A, Menendez H, Méndez E, Cohobón E, Samoya BE, Jáuregui E, Peralta E, Carrilho G 1995. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted disease. *J Ethnopharmacol* 48: 85-88.
- Calixto JB 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res* 33:179-189.
- Convit J, Ulrich M, Polegre MA, Avila A, Rodriguez N, Mazzedo MI, Blanco B. 2004. Therapy of Venezuelan patients with severe mucocutaneous or early lesions of diffuse cutaneous leishmaniasis with vaccine containing pasteurized *Leishmania* promastigotes

- and *Bacillus calmett-guerin* - Preliminary report. *Mem I Oswaldo Cruz* 99:57-62.
- Corrêa MP 1984. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, Rio de Janeiro: Empresa Nacional.
- Croft SL, Coombs GH 2003. Leishmaniasis - current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 19: 502-508.
- Grevelink SA, Lerner EA 1996. Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol* 34: 257-272.
- Handman E 1997. Leishmania vaccines: Old and new. *Parasitol Today* 13: 236-238.
- Herwaldt BL 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354: 1191-1199.
- Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP 2002. Screening of some plants used in Brazilian folk medicine for treatment of infectious diseases. *Mem I Oswaldo Cruz* 97: 1027-1031.
- Locher CP, Burch MT, Mower HF, Berestecky J, Davis H, Van Poel B, Lasure A, Vanden DAB, Vlietinck AJ 1995. Antimicrobial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 49: 23-32.
- López A, Ming DS, Towers GHN 2002. Antifungal activity of benzoic acid derivatives from *Piper lanceaeifolium*. *J Nat Prod* 65: 62-64.
- Luize PS, Morello LG, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Cortez DAG, Nakamura CV 2002. Antitrypanosoma activity of extract obtained from plant *Piper umbellatum*. *Rev Fitoter* 2: 315.
- Luize PS, Tiunan TS, Morello LG, Maza PK, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Cortez DAG, Mello JCP, Nakamura CV 2005. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Rev Bras Ci Farma* 41: 85-94.
- Maia JGS, Silva ML, Luz AIR, Zoghbi MGB, Ramos LS 1987. Espécies de *Piper* da Amazônia ricas em safrol. *Quim Nova* 10: 200-204.
- Martins RC, Lago JH, Albuquerque S, Kato, MJ 2003. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. *Phytochemistry* 64: 667-670.
- Mesquita JMO, Cavaleiro C, Cunha AP, Lombardi JA, Oliveira AB 2005. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. *Rev Bras Farmacogn* 15: 6-12.
- Michalick MSM 2003. Gênero *Leishmania*. In: Neves DP, Melo AL, Genaro O, Linardi PM *Parasitologia humana*. 10. ed. São Paulo: Atheneu, p.31-35.
- Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfäller MA 2000. *Microbiologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Park SB, Lee SE, Shin SC, Park JD, Ahn YJ 2002. Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. *J Agric Food Chem* 50: 1866-1870.
- Parmar VS, Jain SC., Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, Tyagi OD, Prasad AK, Wengel J, Olsen CE, Boll PM 1997. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* 46: 597-673.
- Pessini GL, Holetz FB, Sanches NR, Cortez DAG, Dias-Filho BP, Nakamura CV 2003a. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. *Rev Bras Farmacogn* 13(Supl 1): 21-24.
- Pessini GL, Dias Filho BB, Nakamura CV, Cortez DAG 2003b. Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallidescens* (C. DC.) Yunck. *Mem I Oswaldo Cruz* 98: 1115-1120.
- Pessini GL, Dias-Filho BP, Nakamura CV, Ferreira AG, Cortez DAG 2005. Neolignanas e análise do óleo essencial das folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallidescens* (C. DC.) Yunck. *Rev Bras Farmacogn* 15: 199-204.
- Rahman NNNA, Furuta T, Kojima S, Takane K, Mohd MA 1999. Antimalarial activity of extracts of Malaysian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 64: 249-254.
- Rocha LG, Almeida JRGS, Macêdo RO, Barbosa-Filho JM 2005. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine* 12: 514-535.
- Santos PRD, Moreira DL, Guimarães EF, Kaplan MAC 2001. Essencial oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic Forest. *Phytochemistry* 58: 547-551.
- Sereno D, Holzmüller P, Lemesre JL 2000. Efficacy of second line drugs on antimony-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. *Acta Trop* 74: 25-31.
- Silva EMJ, Machado SR 1999. Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* (Piperaceae). *Rev Bras Bot* 22: 117-124.
- Skehan P, Storeng R, Scudero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Nat Canc Inst* 82: 1107.
- Tewary P, Sukumaran B, Saxena S, Madhubala R 2004. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides are potent enhancers of protective immunity in mice immunized with recombinant ORFF leishmanial antigen. *Vaccine* 22: 3053-3060.
- Warren LG 1960. Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* Chagas. I. Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. *J Parasitol* 46: 529-39.
- WHO (World Health Organization) 2002. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. Disponível em <<http://www.who.int/wer>>, acessada em fev. 2005.
- Wright CW, Phillipson JD 1990. Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs. *Phytother Res* 4: 127-139.
- Zacchino S, Rodrigues G, Pezzenati G, Orellana G 1997. *In vitro* evaluation of antifungal properties of 8.O.4'-neolignans. *J Nat Prod* 60: 659-662.