

FENILPROPANOIDES COM AÇÃO ANTI-*Trypanosoma cruzi* ISOLADOS DE *Baccharis ligustrina* C. DC. (ASTERACEAE)

Matheus L. Silva^a, Leila Gimenes^b, Paulete Romoff^c, Marisi G. Soares^d, Fernanda F. Camilo^e, Erica Valadares de C. Levattif, Andre G. Tempone^f e João Henrique G. Lago^{a,*},

^aCentro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, 09210-170 São Paulo – SP, Brasil

^bCentro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais, Instituto Agrônomico de Campinas, 13012-970 São Paulo – SP, Brasil

^cCentro de Ciências e Humanidades, Universidade Presbiteriana Mackenzie, 01302-907 São Paulo – SP, Brasil

^dInstituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, 37130-001 Alfenas – MG, Brasil

^eCentro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, 01246-000 São Paulo – SP, Brasil

^fInstituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, 09972-270 São Paulo – SP, Brasil

Recebido em 22/06/2022; aceito em 22/08/2022; publicado na web em 26/09/2022

ANTI-*Trypanosoma cruzi* PHENYLPROPANOIDS ISOLATED FROM *Baccharis ligustrina* C. DC. (ASTERACEAE). In the present work, dried aerial parts of *Baccharis ligustrina* (Asteraceae) were subjected to microwave assisted extraction (MAE) using aqueous solution of 1-butyl-3-methylimidazolium bromide (BMImBr) and the obtained extract was successively partitioned using hexane and EtOAc. Using reduced amounts of extracts and efficient chromatographic steps, four acyl C₆C₃ derivatives (*n*-hexacosyl ferulate, *n*-hexacosyl, *n*-octacosyl, and *n*-triacontyl *p*-coumarates) were obtained from hexane phase whereas two C₆C₃ acids (ferulic and *p*-coumaric) were obtained from EtOAc phase. Isolated phenylpropanoids were evaluated against amastigote forms of parasite *Trypanosoma cruzi*. As result, it was observed that *p*-coumaric and ferulic acids were inactives whereas alkyl derivatives displayed EC₅₀ values of 6.5 μmol L⁻¹ (*n*-octacosyl *p*-coumarate), 9.3 μmol L⁻¹ (*n*-triacontyl *p*-coumarate), 15.7 μmol L⁻¹ (*n*-hexacosyl *p*-coumarate), and 32.2 μmol L⁻¹ (*n*-hexacosyl ferulate). All tested compounds displayed reduced toxicity against NCTC cells (CC₅₀ > 200 mmol L⁻¹).

Keywords: *Baccharis ligustrina* C. DC.; Asteraceae; phenylpropanoids; *Trypanosoma cruzi*.

INTRODUÇÃO

O gênero *Baccharis* apresenta ampla distribuição em diferentes regiões do Brasil e conta com aproximadamente 500 espécies, das quais cerca de 20% são utilizadas na medicina popular para tratamento de inflamações, males do fígado, reumatismo e úlceras.^{1,2} Tais espécies são encontradas nas regiões sul e sudeste do país, principalmente em regiões de altitude (a cerca de 1800-2000 m do nível do mar), que são biomas com predominância de gramíneas e arbustos.³ Do ponto de vista químico, espécies de *Baccharis* são produtoras de diferentes metabólitos dos quais se destacam flavonoides, diterpenos de esqueletos caurano, labdano e clerodano e também de triterpenoides, principalmente de esqueletos oleanano e ursano.⁴⁻⁶ Além desses metabólitos, merece destaque a ocorrência de tricotecenos, que são derivados diterpênicos com importantes ações farmacológicas.⁷ Dentre as espécies estudadas quimicamente encontra-se *B. ligustrina*, distribuída amplamente nos estados de Minas Gerais e São Paulo, e que se mostrou constituída essencialmente por dois triterpenos (ácidos oleanólico e ursólico) e dois flavonóides (naringenina e hispidulina).⁸

Como parte dos nossos estudos visando a prospecção de compostos bioativos em espécies de *Baccharis*,⁹⁻¹¹ as partes aéreas de *B. ligustrina* foram submetidas à extração assistida por micro-ondas (MAE) usando solução aquosa de 1-butil-3-brometo de metilimidazólio (BMImBr) e o extrato assim obtido foi extraído sucessivamente com hexano e com AcOEt. Após diferentes processos de fracionamento cromatográfico em pequena escala foram obtidos, de ambas as fases de partição, seis derivados fenilpropanoídicos: ácido ferúlico (**1**), ácido *p*-cumárico (**2**), ferulato de *n*-hexacosila (**3**), *p*-cumarato de

n-hexacosila (**4**), *p*-cumarato de *n*-octacosila (**5**) e *p*-cumarato de *n*-triacontila (**6**). Adicionalmente, os derivados C₆C₃ isolados (**1-6**) foram avaliados quanto a ação antiparasitária, em especial frente as formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*, protozoário causador da doença de Chagas. Essa doença, endêmica no Brasil, conta com um único fármaco disponível no país, o benznidazol, extremamente tóxico e com baixa eficácia, especialmente na fase crônica da doença.¹² Frente a essa problemática, a busca de novos protótipos moleculares para o desenvolvimento de futuros fármacos para a doença de Chagas baseados em produtos naturais oriundos da biodiversidade brasileira consiste em uma abordagem importante, particularmente devido a ampla diversificação estrutural dos metabólitos especiais encontrados em espécies vegetais.^{13,14}

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Partes aéreas de *B. ligustrina* foram submetidas à extração assistida por micro-ondas (MAE) com solução aquosa de brometo de 1-butil-3-metilimidazólio (BMImBr) e o material assim obtido foi extraído com hexano e com AcOEt. O fracionamento cromatográfico de ambas as fases permitiu a obtenção de seis fenilpropanoides (**1-6**), como mostrado na Figura 1.

Os espectros de RMN de ¹H dos compostos **1** e **2** mostraram-se muito semelhantes devido à presença de dois dupletos em δ 6,35/6,28 (*J* = 16,0 Hz, H-8) e em δ 7,49/7,48 (*J* = 16,0 Hz, H-7) atribuídos a hidrogênios de sistemas carbonílicos α,β-insaturados em configuração *trans*. No caso de **2** foram observados também dois dupletos em δ 7,50 (*J* = 8,6 Hz, H-2/H-6) e 6,78 (*J* = 8,6 Hz, H-3/H-5), referentes a um sistema aromático 1,4-dissubstituído enquanto que, para **1**, foram observados três sinais em δ 7,27 (d, *J* = 2,5 Hz, H-2),

*e-mail: joao.lago@ufabc.edu.br

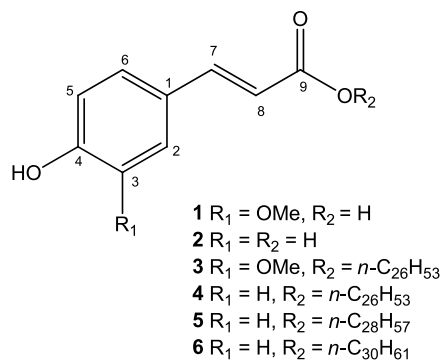


Figura 1. Estruturas dos compostos 1-6 identificados em *B. ligustrina*

7,08 (dd, $J = 8,2$ e $2,5$ Hz, H-6) e 6,78 (d, $J = 8,2$ Hz, H-5), indicativos da ocorrência de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído. No caso de **1**, foi observado um sinal adicional em δ 3,81 (3H), relativo a um grupo metoxílico ligado ao anel aromático. Os espectros de RMN de ¹³C mostraram sinais referentes a carbonos sp² entre δ 113-159 (C-1 a C-8), a carbonos carbonílicos (C-9) em δ 168,0 e 167,9 para **1** e **2** além de um sinal em δ 55,7, relativo ao grupo metoxílico de **1**. A comparação dos dados espectrais obtidos com aqueles descritas na literatura^{15,16} permitiu caracterizar os compostos **1** e **2** como ácidos ferúlico e *p*-cumárico, respectivamente. Apesar das similaridades com os espectros de RMN de ¹H dos compostos **1** e **2**, aqueles registrados para **3** e **4** mostraram um sinal intenso em δ 1,2 além de dois tripletos em δ 4,18 ($J = 6,7$ Hz, H-1') e em δ 0,89 ($J = 6,5$ Hz), sugerindo a ocorrência de ferulato/*p*-cumarato de cadeia longa. Os espectros de RMN de ¹³C de **3** e **4** mostraram sinais referentes aos carbonos carbonílicos (C-9) em cerca de δ 167, sinais atribuídos aos carbonos carbinólicos (C-1') em aproximadamente δ 65, enquanto aqueles referentes à cadeia metilênica longa e ao grupo metílico terminal foram observados em δ 29 e δ 14, respectivamente. Do mesmo modo que definido para **4**, os espectros de RMN de ¹H dos compostos **5** e **6** indicaram a ocorrência de ésteres alquílicos do ácido *p*-cumárico devido aos sinais em δ 7,43 (d, $J = 8,5$ Hz, H-2/H-6), 6,85 (d, $J = 8,5$ Hz, H-3/H-5), 6,30 ($J = 16,0$ Hz, H-8), 7,63 ($J = 16,0$ Hz, H-7) e 4,19 (t, $J = 6,6$ Hz, H-1'). Além desses, foram observados sinais referentes a hidrogênios de cadeia carbônica saturada em δ 1,2 (sl) e 0,89 (t, $J = 6,5$ Hz). Finalmente, as extensões das cadeias dos compostos **3** – **6** foram definidas por espectrometria de massas com ionização por *electrospray*, cujos espectros apresentaram picos referentes aos íons [M - H]⁻ em m/z 557,4563 (**3**), 527,4446 (**4**), 555,4774 (**5**) e 583,5094 (**6**) consistentes com as fórmulas moleculares C₃₆H₆₂O₄ (erro -1,26), C₃₅H₆₀O₃ (erro -3,41), C₃₇H₆₄O₃ (erro -0,54) e C₃₉H₆₈O₃ (erro 0,69), respectivamente. Assim, após comparação com dados descritas na literatura,^{17,18} as estruturas foram definidas como ferulato de *n*-hexacosila (**3**), *p*-cumarato de *n*-hexacosila (**4**), *p*-cumarato de *n*-octacosila (**5**) e *p*-cumarato de *n*-triacontila (**6**). Os compostos **1** e **4** foram isolados, respectivamente, de *Baccharis uncinella*¹⁹ e de *B. sphenophylla*⁹ ao passo que a ocorrência dos compostos **2**, **3**, **5** e **6** está sendo descrita pela primeira vez no gênero *Baccharis*. No entanto, tais compostos foram descritos anteriormente em outras espécies vegetais tais como *Gnetum cleistostachyum* (**2**),²⁰ *Bauhinia manca* (**3** – **5**),¹⁷ *Tapirira guianensis* (**4** e **5**)²¹ e *Dendrobium fuscescens* (**6**).¹⁸

Finalmente, neste estudo, foi avaliada a efetividade contra formas clínicas não replicativas (amastigota intracelular) de *T. cruzi* dos compostos **1-6** isolados de *B. ligustrina*. Para tanto, foram determinados os valores de CE₅₀ e de CC₅₀ (Tabela 1), esses últimos frente a fibroblastos murinos (células NCTC), necessários para o cálculo dos índices de seletividade desses compostos. Como observado, os ácidos carboxílicos livres **1** e **2** se mostraram inativos

Tabela 1. Atividade anti-*T. cruzi* (formas amastigotas) e citotoxicidade em mamíferos (células NCTC) dos compostos **1** – **6** isolados de *B. ligustrina* e do controle positivo benznidazol

Composto	CE ₅₀ (μmol L ⁻¹)	CC ₅₀ (μmol L ⁻¹)	IS
1	NA	> 200	-
2	NA	> 200	-
3	31,2 ± 7,6	> 200	> 6,4
4	15,7 ± 4,3	> 200	> 12,7
5	9,3 ± 1,5	> 200	> 21,5
6	6,5 ± 2,1	> 200	> 30,8
Benznidazol	5,5 ± 0,2	> 200	> 36,4

CE₅₀ – concentração efetiva 50%; CC₅₀ – concentração citotóxica 50%; IS – índice de seletividade (CC₅₀/CE₅₀); NA – não ativo.

(CE₅₀ > 200 μmol L⁻¹), enquanto os ésteres **3** e **4** apresentaram potencial com CE₅₀ de 32,2 e 15,7 μmol L⁻¹, respectivamente, todos sem demonstrar citotoxicidade em células de mamífero até a concentração máxima testada (CC₅₀ > 200 μmol L⁻¹). No caso de **4**, o potencial frente a formas intracelulares de *T. cruzi* foi similar ao obtido anteriormente (CE₅₀ = 16,9 μmol L⁻¹).⁹ No caso dos ésteres **5** e **6**, ambos com reduzida toxicidade (CC₅₀ > 200 μmol L⁻¹), os valores de EC₅₀ determinados foram 9,3 e 6,5 mmol L⁻¹, sendo, no caso de **6**, similar ao do controle positivo benznidazol (EC₅₀ = 5,5 μmol L⁻¹). Tais resultados sugerem que a presença do grupo alquílico é crucial para a atividade frente aos amastigotas sendo potencial intensificado com o aumento da cadeia lateral. Tal observação estaria possivelmente associada ao aumento da lipofilicidade dos ésteres em relação ao ácido *p*-cumárico uma vez que os valores de log P_{ow} foram determinados como 1,29 (**2**), 10,59 (**4**), 11,28 (**5**) e 12,07 (**6**). Tal característica pode fazer com que tais compostos adquiram um caráter anfílico permitindo, portanto, que atravessem a membrana celular e atinjam os parasitas no interior das células.^{22,23} Tais resultados permitem sugerir, no futuro, a realização de estudos de relação estrutura/atividade com ésteres do ácido *p*-cumárico contendo diferentes grupos alquílicos seguido da avaliação da atividade frente as formas amastigotas de *T. cruzi*. Apesar de estudos similares terem sido realizados contra formas extracelulares do parasita,²⁴ nosso trabalho teve um enfoque na forma clínic e intracelular do parasita, os amastigotas, uma vez que são considerados alvos preferenciais em estudos de *Drug Discovery*.²⁵

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos gerais

Experimentos de extração assistida por micro-ondas (MAE) foram realizados em um forno de micro-ondas MAS-I (2450 MHz, *Sineo Microwave Chemistry Technology Company*, Xangai, China) com uma potência máxima fornecida de 1000 W sendo a temperatura interna monitorada por uma sonda infravermelha. Nas separações cromatográficas em coluna aberta foram utilizados gel de sílica (Merck, 230-400 mesh) e gel de Sephadex LH-20 (Amersham-Bioscience), enquanto nas análises com camada fina foi utilizado gel de sílica 60 PF₂₅₄ (Merck) (0,25 mm) seguido de revelação com luz UV (254 e 366 nm). As separações por CLAE foram efetuadas em cromatógrafo Dionex Ultimate 3000, em coluna Luna Phenomenex C₁₈ (5 μm, 250 mm × 10 mm, 120Å). Os espectros de massas de alta resolução foram registrados em espectrômetro Bruker Daltonics q-ToF Maxis, operando por ionização por *electrospray*, em modo negativo. Os espectros de ressonância magnética nuclear foram registrados em espectrômetro Varian Inova (¹H: 500 MHz e ¹³C:

125 MHz). CDCl_3 e DMSO-d_6 foram utilizados como solventes e como referência interna o sinal residual do solvente.

Material vegetal

As partes aéreas de *B. ligustrina* DC. (Asteraceae) foram coletadas em Campos do Jordão/SP, Brasil em junho de 2017 recebendo o código de coleta SISGEN A4123E4. Uma exsicata foi preparada e comparada com aquela de número SPSF37589, catalogada no Herbário D. Bento Pickel, do Instituto Florestal de São Paulo (PMSF).

Extração e isolamento dos constituintes químicos

As partes aéreas de *B. ligustrina*, secadas e moídas (25 g), foram submetidas à extração assistida por micro-ondas (MAE) com 50 mL de mistura contendo $\text{H}_2\text{O}:\text{BMImBr}$ 1:1 (v/v) durante 15 min a 60 °C, sendo o líquido iônico brometo de 1-butil-3-metilimidazólio (BMImBr) preparado conforme descrito na literatura.²⁶ Após esse procedimento, a solução foi filtrada e extraída sucessivamente com hexano (3 × 25 mL) e com AcOEt (3 × 25 mL). Após secagem com Na_2SO_4 e evaporação dos solventes sob pressão reduzida, foram obtidos 121 mg e 412 mg das fases em hexano e em AcOEt, respectivamente. Parte da fase em *n*-hexano (100 mg) foi submetida a fracionamento cromatográfico em gel de sílica utilizando-se misturas de *n*-hexano/AcOEt (9:1, 8:2, 7:3, 1:1, 6:4 e 3:7) fornecendo seis frações (H1 – H6). A fração H2 (12 mg) foi purificada via CLAE (C_{18} , MeOH:H₂O 3:7 com 0,1% de HCOOH), fornecendo **3** (5,1 mg), **4** (2,9 mg), **5** (0,7 mg) e **6** (0,5 mg). Parte da fase em AcOEt (150,0 mg) foi submetida à permeação em gel de Sephadex LH-20 eluída com MeOH fornecendo cinco frações (A1 – A5). A fração A2 (64,1 mg) mostrou-se composta por uma mistura de **1** + **2** enquanto a fração A3 (2,2 mg) mostrou-se constituída majoritariamente por **2**. Parte de fração A2 (30,0 mg) foi purificada via CLAE (C_{18} , MeOH:H₂O 1:1 com 0,1% de HCOOH), fornecendo **1** (14,8 mg) e **2** (10,2 mg).

Parasitas

Formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram cultivadas em células LLC-MK2 (Rhesus Monkey Kidney Cells – ATCC CCL 7) em meio RPMI-1640, suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas a temperatura de 37 °C em estufa com 5% CO_2 .^{27,28} As formas amastigotas foram obtidas por meio da infecção de macrófagos aplicados a 1×10^5 /poço com formas tripomastigotas na proporção de 5:1 parasitas/macrófagos e incubadas por quatro horas. Os parasitas foram contados em hemocitômetro e depois aplicados a 1×10^6 /poço em placas de 96 poços.

Células de mamíferos

Fibroblastos de camundongo, NCTC clone 929 (*American Type Culture Collection* - ATCC CCL-1), foram fornecidas pela Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, e armazenadas em nitrogênio líquido a temperatura -70 °C. Posteriormente foram mantidas em meio M-199 suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10%, sob a temperatura de 37 °C em estufa com 5% de CO_2 .²⁹

Determinação do potencial frente as formas amastigotas de *T. cruzi*

Para determinar a atividade contra amastigotas intracelulares, macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados com formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Os macrófagos obtidos da

cavidade peritoneal de camundongos BALB/c foram plaqueados em uma lâmina de câmara de 16 poços (NUNC, 1×10^5 /poço) e incubados por 24 h a 37 °C em uma incubadora umidificada com 5% de CO_2 . Tripomastigotas foram lavados em meio RPMI-1640, contados e utilizados para infectar os macrófagos (parasita:macrófago, razão = 10:1). Após 2 h de incubação a 37 °C em uma incubadora umidificada com 5% de CO_2 , os parasitas não internalizados foram removidos por lavagem com meio. Os compostos a serem testados (**1-6**) foram incubados com macrófagos infectados (48 h a 37 °C, 5% CO_2) em concentração seriada usando benznidazol como droga padrão. Ao final do ensaio, as lâminas foram fixadas com MeOH e coradas com Giemsa antes da contagem em microscópio de luz (EVOS M5000, THERMO). Os valores de EC_{50} foram calculados conforme descrito previamente.^{27,28}

Determinação da toxicidade frente a células de mamíferos

A citotoxicidade dos compostos **1-6** foi avaliada utilizando-se células NCTC (clone 929), na concentração de 6×10^4 células/poço. As células foram incubadas com os compostos isolados, em diluição seriada, em meio M-199 e 10% de soro fetal bovino em placas de 96 poços. Em seguida, as células foram mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO_2 por 48 h. Após esse período, foram adicionados 20 μL de resazurina a 10%, seguido de incubação por 20 h, com a leitura realizada da mesma forma descrita acima.²⁹

Análise estatística

Os dados obtidos representam a média e o desvio padrão de amostras duplicadas de dois ensaios independentes. Os valores de CE_{50} foram calculados usando curvas sigmoide dose-resposta no software GraphPad Prism 5.0.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Os espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C e de massas referentes aos compostos estudados no presente trabalho estão disponíveis em <http://quimicanova.s bq.org.br> em formato pdf, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP (2021/02789-7), CNPq e CAPES pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho. F. F. C., A. G. T. e J. H. G. L. agradecem ao CNPq pelas bolsas de produtividade em pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Moreira, F. P. M.; Coutinho, V.; Montanher, A. B. P.; Caro, M. S. B.; Brighente, I. M. C.; Pizzolatti, M. G.; Monache, F. D.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 309. [Crossref]
- Hischmann, G.; De Arias, A. R.; *J. Ethnopharmacol.* **1990**, *29*, 159. [Crossref]
- Safford, H. D.; *J. Biogeography* **1999**, *26*, 693. [Crossref]
- Emerenciano, V. P.; Ferreira, Z. S.; Kaplan, M. A. C.; Gottlieb, O. R.; *J. Phytochemistry* **1987**, *26*, 3103. [Crossref]
- Jakupovic, J.; Schuster, A.; Ganzer, U.; Bohlmann, F.; Boldt, P. E.; *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2217. [Crossref]
- Boldt, P. E.; *Baccharis (Asteraceae) a review of its taxonomy, phytochemistry, ecology, economic status*. College Station, Texas, The Texas A & M University System, 1989.
- Verdi, L. G.; Brighente, I. M. C.; Pizzolatti, M. G.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, 85. [Crossref]

8. Moreira, F. P. M.; Branco, A.; Pizzolatti, M. G.; Morais, A. A.; Monache, F. D.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2002**, *31*, 319. [Crossref]
9. Silva, M. L.; Costa-Silva, T. A.; Tempone, A. G.; Lago, J. H. G.; *Chem. Biodivers.* **2021**, *18*, e2100466. [Crossref]
10. Costa-Silva, T. A.; Silva, M. L.; Antar, G. M.; Tempone, A. G.; Lago, J. H. G.; *Phytomedicine* **2021**, *93*, 153748. [Crossref]
11. Sessa, D. P.; Mengarda, A.; Simplicio, P.; Antar, G. M.; Lago, J. H. G.; Moraes, J.; *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 3744. [Crossref]
12. Morillo, C. A.; Marin-Neto, J. A.; Avezum, A.; *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 189. [Crossref]
13. Newman, D. J.; Cragg, G. M.; *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 770. [Crossref]
14. Pirintsos, S.; Panagiotopoulos, A.; Bariotakis, M.; Daskalakis, V.; Lionis, C.; Sourvinos, G.; Karakasiliotis, I.; Kampa, M.; Castanas, E. *Molecules* **2022**, *27*, 4060. [Crossref]
15. Swisłocka, R.; Kowczyk-Sadowy, M.; Kalinowska, M.; Lewandowski, W.; *Spectroscopy* **2012**, *27*, 35. [Crossref]
16. Prachayasittikul, S.; Suphamong, S.; Worachartcheewan, A.; Lawung, R.; Ruchirawat, S.; Prachayasittikul, V. *Molecules* **2009**, *14*, 850. [Crossref]
17. Achenbach, H.; Stöcker, M.; Constenla, M. A.; *Z. Naturforsch.* **1986**, *41*, 164. [Crossref]
18. Talapatra, B.; Das, A. K.; Talapatra, S. K.; *Phytochemistry* **1989**, *28*, 290. [Crossref]
19. Bocco, B. M.; Fernandes, G. W.; Lorena, F. B.; Cysneiros, R. M.; Christoffolete, M. A.; Grecco, S. S.; Lancellotti, C. L.; Romoff, P.; Lago, J. H. G.; Bianco, A. C.; Ribeiro, M. O. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2016**, *49*, e5003. [Crossref]
20. Yao, C. S.; Lin, M.; Liu, X.; Wang, Y. H. J. *Asian Nat. Prod. Res.* **2005**, *7*, 131. [Crossref]
21. Correia, S. J.; David, J. P.; David, J. M.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 36. [Crossref]
22. Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V.; *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42717. [Crossref]
23. Hanneschlaeger, C.; Horner, A.; Pohl, P.; *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 5922. [Crossref]
24. Lopes, S. P.; Castillo, Y. P.; Monteiro, M. L.; Menezes, R. R. P. P. B.; Almeida, R. N.; Martins, A. M. C., Sousa, D. P.; *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5916. [Crossref]
25. Katsuno, K.; Burrows, J. N.; Duncan, K.; Hoof van Huijsduijnen, R.; Kaneko, T.; Kita, K.; Mowbray, C. E.; Schmatz, D.; Warner, P.; Slingsby, B. T.; *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 751. [Crossref]
26. Huddleston, J. G.; Visser, A. E.; Reichert, W. M.; Willauer, H. D.; Broker, G. A.; Rogers, R. D.; *Green Chem.* **2001**, *3*, 156. [Crossref]
27. Kesper Jr., N.; Almeida K. A.; Stolf, A. M. S.; Umezawa, E. S.; *J. Parasitol.* **2000**, *86*, 862. [Crossref]
28. Martins, L. F.; Mesquita, J. T.; Pinto, E. G.; Costa-Silva, T. A.; Borborema, S. E.; Galisteo Junior, A. J.; Neves, B. J.; Andrade, C. H.; Shuhaib, Z. A.; Bennett, E. L.; Black, G. P.; Harper, P. M.; Evans, D. M.; Fiture, H. S.; Leyland, J. P.; Martin, C.; Roberts, T. D.; Thornhill, A. J.; Vale, S. A.; Howard-Jones, A.; Thomas, D. A.; Williams, H. L.; Overman, L. E.; Berlinck, R. G.; Murphy, P. J.; Tempone, A. G.; *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 2202. [Crossref]
29. Tada, H.; Shiho, O.; Kuroshima, K.; Koyama, M.; Tsukamoto, K.; *J. Immunol. Methods* **1986**, *93*, 157. [Crossref]