

Estudo fitoquímico e atividades biológicas do limãozinho *Zanthoxylum syncarpum* Tull.

Antonio Adailson de Sousa Silva¹, José Milton Ferreira Júnior², Maria Goretti de Vasconcelos Silva³, Selene Maia de Morais⁴

RESUMO: Algumas doenças consideradas negligenciadas, como o dengue e a leishmaniose, ainda não têm medicamentos e/ou formas de controle eficazes. O gênero *Zanthoxylum* apresenta vários metabólitos secundários como alcaloides, flavonoides, cumarinas, lignanas e terpenos, e tem sido amplamente utilizado na medicina popular para diversos fins. O objetivo deste estudo foi identificar os principais compostos do extrato etanólico das folhas do limãozinho (EEFL), *Zanthoxylum syncarpum* Tull. e avaliar sua atividade contra *Artemia salina*, *Aedes aegypti* e *Leishmania infantum chagasi* e inibição da acetilcolinesterase (AChE). O teste de toxicidade frente à *A. salina* foi realizado nas concentrações de 1.000, 100, 10 e 1 µg/mL com 10 larvas por tubo. A atividade contra *A. aegypti* foi testada nas concentrações de 1000, 500, 250, 100 e 50 µg/mL com 25 larvas por tubo. O ensaio leishmanicida foi realizado em placa de 96 poços, com 10⁶ parasitos por poço com EEFL nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL. Para determinar a atividade de inibição da AChE foram usadas soluções de ácido 5,5'-ditiobis-2nitrobenzóico e iodeto de acetilcolina em tampão em cromatoplaça. A inibição foi verificada com base na medição da espessura dos halos brancos em torno das amostras. Dicromato de potássio, pentamidina e fisostigmina foram usados como droga padrão para os testes artemicida, leishmanicida e anticolinesterásico respectivamente. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. O EEFL apresentou CL₅₀ com valores de 17,73 e 49,39 µg/mL para *A. salina* e *A. aegypti* respectivamente e contra *L. infantum chagasi*, apresentou CE₅₀ semelhante à droga padrão, com valores de 16,03 e 23,71 µg/mL respectivamente. A partir destes resultados, conclui-se que o EEFL, *Z. syncarpum* Tull. apresenta alternativa para o desenvolvimento de drogas leishmanicidas e larvicidas.

Palavra-chave: Atividade leishmanicida, Larvicida, *Zanthoxylum syncarpum* Tull.

Phytochemistry and biological activities of limãozinho *Zanthoxylum syncarpum* Tull

ABSTRACT: Some considered neglected diseases such as dengue and leishmaniasis, still do not have drugs or forms of effective control. The genus *Zanthoxylum* presents various secondary metabolites such as alkaloids, flavonoids, coumarins, lignans and terpenes, and has been widely used in folk medicine for various purposes. The aim of this study was to identify the main compounds of the ethanol extract of the leaves of the limãozinho (EEFL), *Zanthoxylum syncarpum* Tull. and assess their activity against *Artemia salina*, *Aedes aegypti* and *Leishmania infantum chagasi* and inhibition of acetylcholinesterase (AChE). The toxicity test in *A. Salina* was performed at concentrations of 1000, 100, 10 and 1 µg/mL with 10 larvae per tube. The activity against *A. aegypti* were tested at concentrations of 1000, 500, 250, 100 and 50 µg/mL with 25 larvae per tube. The antileishmanial assay was performed in a 96 well plate with 10⁶ parasites per well EEFL with concentrations of 100, 50, 25, 12.5 and 6.25 µg/mL. To determine the activity of AChE solutions were used 5,5'-dithiobis 2nitrobenzóico and acetylcholine iodide in buffer cromatoplaca. The inhibition was observed based on the measurement of the thickness of the white halos around the samples. Potassium dichromate, pentamidine and physostigmine were used as standard drug for artemicida tests, leishmanicidal and anticholinesterase respectively. All assays were performed in triplicate. The EEFL presented LC₅₀ with values of 17.73 and 49.39 µg/mL for *A. salina* and *A. aegypti* and respectively against *L. infantum chagasi*, showed a similar pattern to the drug, with values of EC₅₀ 16.03 and 23.71 µg/mL, respectively. From these results, it is concluded that the EEFL, *Z. syncarpum* Tull . shows an alternative for the development of antileishmanial drugs and larvicides.

Keywords: Leishmanicidal activity, Larvicidal, *Zanthoxylum syncarpum* Tull

¹Biólogo, Mestre em Ciências Veterinárias, Núcleo de Pesquisa em Sanidade Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil;

²Químico, Doutorando em Biotecnologia, Laboratório de Produtos Naturais, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil;

³Professora Associada da Universidade Federal do Ceará.

⁴Química Industrial, Doutora em Química Orgânica, Professora Titular da UECE, Laboratório de Produtos Naturais, Fortaleza, CE, Brasil.

Autor correspondente: Antonio Adailson de Sousa Silva.

E-mail: adailsonbio@yahoo.com.br

1. Introdução

Os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas têm obtido grandes avanços nos últimos anos. A utilização de plantas medicinais sempre foi um recurso terapêutico alternativo de grande aceitação pela população e ultimamente vem crescendo junto à comunidade médica, desde que sejam utilizadas plantas cujas atividades biológicas tenham sido investigadas cientificamente, comprovando sua eficácia e segurança (CECHINEL FILHO, 1998).

As plantas medicinais constituem a melhor fonte para obtenção de uma grande variedade de drogas (BERTINI et al., 2005). Portanto, o estudo de princípios biologicamente ativos de plantas, é urgentemente necessário. GEBHARDT et al. (2000), reforçam que a elucidação destes compostos, bem como seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a química

farmacêutica, bioquímica e a farmacologia.

O gênero *Zanthoxylum* (Rutaceae) compreende cerca de 200 espécies de árvores, arbustos e lianas distribuídas em todo o mundo. No Brasil são descritas 25 espécies de *Zanthoxylum*, dentre estas, a espécie *Z. syncarpum* Tull. conhecida popularmente por “limãozinho”, têm sua ocorrência principalmente na região nordeste, em especial nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco (ROSS et al., 2004; VIEIRA et al., 2009). As plantas deste gênero apresentam uma grande variedade de metabólitos secundários como alcaloides, flavonoides, cumarinas, lignanas e terpenos, e tem sido objeto de estudo devido principalmente às suas propriedades febrífugas, sudoríferas e diuréticas, além de serem amplamente utilizadas pela medicina popular no tratamento de doenças cardiovasculares, tuberculose, malária, dor de dente e contra alguns tipos de mordidas de cobra (FACUNDO et al., 2005).

Inúmeras doenças consideradas negligenciadas, como o dengue e a leishmaniose, não têm ainda medicamentos e/ou vacinas eficazes. Portanto, as plantas podem fornecer compostos bioativos para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento destas doenças.

O dengue é uma infecção reemergente que desperta preocupação nas autoridades sanitárias de todo o mundo, por ser uma arbovirose com circulação nos cinco continentes e elevado potencial para assumir formas graves e letais (HALSTEAD, 1997). Considerada um dos principais problemas de saúde pública no mundo, a OMS estima que 2,5 bilhões de pessoas estão sob risco de contrair dengue e que ocorram anualmente cerca de 50 milhões de casos. Desse total, cerca de 550 mil necessitam de hospitalização e pelo menos 20 mil morrem em consequência da doença (BRASIL, 2009).

Nesse contexto, o dengue tornou-se um problema contemporâneo e urgente para o sistema sanitário mundial

(GARCEZ et al., 2013) e até o presente momento, não foi desenvolvido nenhum tratamento preventivo ou curativo do Dengue. A principal estratégia adotada para diminuir sua incidência consiste em controlar a população de larvas de *Aedes aegypti*, vetor do arbovirus causador do dengue. O controle do *A. aegypti* é feito utilizando inseticidas organofosforados como temephos, malathion e fenitrothion, constituindo a principal medida adotada pelos Programas de Saúde Pública (MACORIS et al., 2003). No entanto, o uso contínuo de inseticidas sintéticos tem elevado à resistência de muitas populações de mosquito, além de causar poluição ambiental e toxicidade a organismo não alvo. Estes fatores têm estimulado a procura por métodos alternativos para o controle do mosquito (GARCEZ et al., 2013).

Outro grupo de doenças consideradas negligenciadas é o das leishmanioses, zoonoses causadas por protozoários *Leishmania* spp., endêmicas

em 98 países, com uma estimativa de dois milhões de novos casos por ano, sendo que 500 mil são de leishmaniose visceral (LV), potencialmente fatal (WHO, 2010). No Brasil, a LV é causada pela *L. infantum chagasi* (SILVA et al., 2007).

Atualmente, o arsenal terapêutico disponível para tratamento da leishmaniose é considerado precário, sendo restrito a duas classes de medicamentos: os antimoniais e os não antimoniais (GIL et al., 2008), ambos apresentam alta toxicidade e resistência (TEMPONE et al., 2005). Outros fatores inconvenientes ao tratamento convencional são as vias de aplicação, que geralmente são dolorosas e desconfortáveis e o fármaco precisa ser administrado diariamente por longos períodos, o que muitas vezes requer hospitalização acarretando em desconforto ao paciente e alto custo aos cofres públicos (BRAGA et al., 2007). Portanto, novos e melhores medicamentos são urgentemente necessários (OPPERDOES; MICHEL, 2008).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi qualificar os principais constituintes químicos e avaliar o potencial de atividade leishmanicida contra a *L. infantum chagasi*, larvicida contra *Aedes aegypti* e inibição da enzima acetilcolinesterase do limãozinho (*Z. syncarpum* Tull.).

2. Material e métodos

2.1 Planta utilizada

Foi utilizada neste estudo, a espécie *Zanthoxylum syncarpum* Tull., popularmente conhecida como limãozinho. As folhas do limãozinho foram coletadas no horto medicinal da Universidade Estadual do Ceará, Campus do Itaperi, em Fortaleza, Ceará, em janeiro de 2013. A exsicata foi confeccionada e depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, sob o número 51937.

2.2 Preparação do extrato etanólico das folhas do limãozinho (EEFL)

O extrato etanólico das folhas do limãozinho (EEFL) foi preparado com base na metodologia proposta por PIZZOLATTI et al. (2003). As folhas do limãozinho foram coletadas, picadas e colocadas para secar a 40 °C por uma semana. Subsequentemente, este material foi moído e colocado em etanol comercial (70%) por mais sete dias. Em seguida, a solução foi filtrada e o solvente etanol foi removido num evaporador rotativo, obtendo-se o EEFL.

2.3 Testes fitoquímicos

Os testes fitoquímicos qualitativos de fenóis, esteróides, triterpenos, alcalóides e flavonóides foram realizados com base em MATOS (2009). Esses testes foram baseados na observação visual das mudanças de cor ou a formação de precipitado após a adição dos reagentes específicos.

2.4 Toxicidade frente à *Artemia salina*

O teste de letalidade contra *A. salina* foi realizado de acordo com o método proposto por MEYER et al. (1982), com algumas modificações. Ovos de *A. salina* foram incubados em água do mar artificial à temperatura ambiente por 48 horas em um pequeno aquário. Com a ajuda de uma fonte de luz, as larvas foram atraídas para o claro e coletadas com pipeta de Pasteur e transferidas para um becher com água salina. O EEFL foi dissolvido em dimetilsulfoxido (DMSO) e água do mar nas concentrações de 1.000, 100, 10 e 1 µg/mL. 10 metanúplios foram transferidos para tubos de ensaio contendo 5 mL de cada concentração testadas. Um grupo controle foi preparado contendo apenas o DMSO, água salina e as larvas. O controle positivo usado foi o dicromato de potássio. Os ensaios foram realizados em triplicata. A contagem do número de larvas mortas foi realizada após 24 horas e esse número, usado para o cálculo da CL₅₀

utilizando o programa Microcal Origin versão 4.1.

2.5 Testes larvicida contra *Aedes aegypti*

Os bioensaios para determinar a atividade larvicida frente ao vetor da dengue e da febre amarela, o *A. aegypti*, foram realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Estadual do Ceará. As larvas de *A. aegypti* foram gentilmente cedidas pelo Núcleo de Controle de Vetores (Nuvet). O teste foi realizado de acordo com SILVA e SILVA (1999). Os ovos foram eclodidos em água isenta de cloro. Em condições normais, os ovos maduros eclodem após alguns minutos quando submersos em meio líquido e apresentam quatro estágios larvários. Foram selecionadas as larvas no estágio 3. Para tanto, o EEFL foi dissolvido em 0,3 mL de DMSO e posteriormente diluído em 19,7 mL de água para a preparação das concentrações do EEFL em recipientes de

vidro transparentes. Posteriormente, colocou-se 25 larvas em cada frasco. Após 24 horas realizou-se a contagem das larvas vivas, para determinar a concentração letal média (CL₅₀), com o auxílio do programa estatístico Statplus 2009.

2.6 Testes *in vitro* contra a forma promastigota de *Leishmania infantum chagasi*

A metodologia utilizada para avaliar a atividade leishmanicida do EEFL sobre as formas promastigotas de *L. infantum chagasi* teve como base TEMPONE et al. (2001). Para isso, as leishmanias foram acondicionadas em meio Shneider (Sigma[®]) suplementado e 10% de PBS (tampão fosfato-salino) com diferentes concentrações do extrato e com inóculo do parasito na ausência dos compostos (controle). Os extratos foram dissolvidos em DMSO e diluídos em meio Shneider (Sigma[®]). A concentração final de DMSO não ultrapassou 1%. Os experimentos foram realizados em placas

de 96 poços com extratos nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 µg/mL. Os inóculos constituíram-se de 10^6 parasitas por poço em fase logarítmica. O medicamento de referência usado foi a pentamidina. Os controles negativos foram realizados com 10^6 parasitas em meio Shneider (Sigma[®]) e 10% de PBS. As promastigotas foram incubadas a 26°C por 48 horas. Posteriormente foi analisada a viabilidade celular baseada na conversão do sal de tetrazólio MTT solúvel (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-brometo de 2,5-difeniltetrazólio (Sigma[®]) para dentro do formazan insolúvel por enzimas mitocondriais. Vinte µL de MTT [5 mg/mL] por poço foram adicionados à cultura, mantida durante 4 horas a 26 °C. Posteriormente foi adicionado 100 µL de uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%: álcool isopropílico (1:1). Após 15 minutos sob agitação, foi feita a leitura da densidade óptica no espectrofotômetro a 570 nm. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

2.7 Inibição da enzima

acetilcolinesterase (AChE)

Esse ensaio foi realizado com base em RHEE et al., (2001), com pequenas modificações. Foram usadas soluções de ácido 5,5'- ditiobis-2nitrobenzóico (DTNB) e iodeto de acetilcolina (ATCI) em tampão. As amostras foram aplicadas na cromatoplaca. Após evaporação do solvente, pulverizou-se o substrato (ATCI, 1mM em tampão) e o reagente de Ellman (DTNB, 1 mM em tampão). Após 3 a 5 minutos borrifou-se a enzima (3U/mL) e em 10 minutos a placa desenvolveu cor amarela. Halos brancos apareceram em torno das amostras indicando a inibição. Os halos foram medidos e comparados com o padrão, o alcaloide fisostigmina.

2.8 Análises estatísticas

Para a atividade leishmanicida, os valores da CE₅₀ (concentração do composto capaz de inibir 50% do parasita), com um intervalo de confiança de 95%

foram calculados usando uma curva de regressão não-linear com o auxílio do software de estatística GraphPad Prism 5.0. A CL_{50} contra *A. salina* e *A. aegypti*, foi determinada através da análise do Probit, utilizando o programa SPSS.

3 Resultados e discussão

Na busca por novos compostos com atividade leishmanicida e larvicida, as plantas tem sido a principal fonte de pesquisas, uma vez que apresentam grande diversidade de compostos químicos. Neste estudo, foram realizados teste fitoquímicos, artemicida, larvicida, leishmanicida e atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) do EEFL. Nos testes prévios para verificar a presença fenóis e taninos, obteve-se uma mudança na tonalidade do composto inicial para um verde profundo, indicando a presença de taninos condensados. O teste de antocianinas, antocianidinas e flavonoides, ao ser regulada com pH 11, apresentou uma coloração amarela,

sinalizando a presença de Flavonas, Flavonóis e Xantonas, que pertencem ao grupo dos flavonoides. As antocianinas e antocianidinas não foram identificadas neste procedimento. A presença de flavonóis foi confirmada através da metodologia de BARBOSA (2004), ocorrendo o aparecimento e intensificação da cor vermelha, que é indicativo da presença de flavonoides. No teste de esteroides e triterpenoides, surgiu coloração azul evanescente, passando posteriormente para o verde profundo, indica a presença de esteroides livre em solução. Enquanto que, no teste para identificação de saponinas, não houve aparecimento de espuma consistente, indicando que não há saponinas na amostra estudada (tabela 1).

Na literatura há relatos de que o limãozinho é boa fonte de alcaloides (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2009). Confirmando esses achados, foi detectada a presença destes compostos (tabela 1). Observou-se claramente a formação de

precipitado na presença de reagentes de Mayer e Dragendorff. Os alcaloides, nas plantas e na pele de alguns anfíbios funcionam como mecanismo de defesa contra seus predadores, sistema de armazenamento de energia e proteção

contra a intensidade dos raios UV. Eles também correspondem aos principais terapêuticos naturais com ação: anestésica, analgésica, psicoestimulantes, neurodepressores etc.

Tabela 1 – Prospecção fitoquímica do extrato etanólico das folhas do limãozinho

Componentes	Presente
Taninos Condensados	X
Antocianinas	-
Antocianidinas	-
Flavonas	X
Flavonóis	X
Xantonas	X
Esteroides	X
Triterpenoides	-
Saponinas	-
Alcaloides	X

Na Determinação do Teor de Fenóis Totais, onde o resultado expresso por mg de ácido gálico (EAG)/g de extrato

bruto foi de 166,74 mg EAG/g, demonstrando alto teor de fenóis totais, sendo uma fonte natural de compostos

fenólicos e possíveis alternativas para atividades biológicas.

A. salina (Artemiidae), também conhecida como a larva do camarão salmoura, é um microcrustáceo invertebrado, normalmente usada em ensaios biológicos para determinar a atividade e/ou toxicidade de compostos naturais. O uso de *A. salina* para este fim é justificado por ser um teste seguro, prático e econômico e estudos têm demonstrado que esses ensaios são eficazes na pesquisa de substâncias leishmanicidas (BARBOSA et al., 2009). Quanto a toxicidade de compostos, MEYER et al. (1982) consideram uma substância bioativa com CL_{50} até 1.000 $\mu\text{g/mL}$. O ensaio de toxicidade contra *A. salina* mostrou alta atividade do EEFL, o que demonstra que este extrato é rico em metabólitos com atividades biológicas (tabela 2).

A atividade larvicida contra *A. aegypti* do EEFL foi testada em cinco concentrações diferentes: 1000, 500, 250, 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 2). Foram usadas 25 larvas por tubo. Os testes foram realizados em triplicata para cada concentração. No Brasil, o controle das larvas de *A. aegypti* é feito principalmente à base de organofosforados como o temefós, que é aplicado á uma concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ nos locais que servem de criadouros para larvas do mosquito (BRASIL, 2009). O temefós utilizado como droga padrão frente à larvas de *A. aegypti* em concentração única de 100 $\mu\text{g/mL}$ obteve-se taxa de mortalidade de 100% (TELES, 2009). O EEFL apresentou CL_{50} com valor de 49,39 $\mu\text{g/mL}$ (tabela 2).

Tabela 2: Toxicidade contra *A. salina* e atividade larvicida frente ao *A. aegypti* do extrato etanólico das folhas do limãozinho

Composto	CL ₅₀ µg/mL (intervalo de confiança)*	
	<i>A. salina</i>	<i>A. aegypti</i>
EEFL	17,73 (10,33 – 30,63) ^a	49,39 (41,70 – 53,02)
Dicromato de potássio	11,01 (7,09 – 17,59) ^a	-
Temefós	-	100% ^{**}

*CL₅₀: concentração letal que mata 50% das larvas

**percentagem de morte à 100 µg/mL (TELES, 2009).

A procura por larvicidas naturais para combater o *A. aegypti*, tem despertado pesquisadores do mundo inteiro a realizar diversos trabalhos voltados para este fim. Uma das principais vantagens desta linha de pesquisa é que os larvicidas de origem natural reduzem de forma significativa o impacto que atualmente os inseticidas sintéticos causam à saúde da população e ao ambiente (TELES, 2009). No entanto, além dos riscos à saúde e ao meio ambiente, larvicidas organofosforados como o temefós apresenta-se de forma ineficaz e envolve enormes investimentos financeiros (AUGUSTO; FREITAS, 1998). Portanto o

EEFL constitui-se uma potencial fonte de compostos com atividade larvicida.

Quanto aos mecanismos de ação de larvicidas naturais, existem trabalhos na literatura que fazem uma correlação desta ação com a atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase (SILVA, 2006; TELES, 2009). O EEFL apresentou moderada atividade inibitória da AChE (tabela 3) o que sugere que há outros mecanismos de ação envolvidos na atividade larvicida.

O tratamento da leishmaniose, além de caro e doloroso, tem se tornado cada vez mais ineficaz, o que evidencia a urgente necessidade de novas drogas

leishmanicidas (RATH et al., 2013). Neste estudo, o EEFL apresentou atividade contra *L. infantum chagasi* semelhante à pentamidina (tabela 3), mostrando que a

espécie *Z. syncarpum* Tull. compõe fonte de compostos com potencial para o desenvolvimento de fármacos leishmanicidas.

Tabela 3: Atividade leishmanicida frente à *L. infantum chagasi* e inibição da acetilcolinesterase do extrato etanólico das folhas do limãozinho

Extrato / droga	CE ₅₀ <i>L. infantum chagasi</i>	Inibição da acetilcolinesterase (cm)
EEFL	16,03 (13,21 – 19,44) ^a	0,6
Pentamidina	23,71 (18,44 - 30,50) ^a	-
Fisostigmina	-	0,9

CE₅₀: concentração efetiva que mata 50% da cepa (µg/mL)

De acordo com VILA-NOVA et al. (2013), um possível mecanismo de ação de compostos leishmanicidas poderia ser a inibição da enzima AChE, com redução do substrato colina, essencial para a formação de lipídeos de membrana de *Leishmania* spp. Como o EEFL apresentou baixa atividade de inibição da AChE, é provável que a atividade leishmanicida deste extrato apresente outro mecanismo de ação. A excelente atividade do EEFL frente à *L. infantum chagasi*, pode ser

justificada pela presença de taninos, flavonoides, esteroides e alcalóides.

Conclusões

O EEFL apresenta metabólitos secundários de grande relevância na farmacologia de plantas medicinais, como alcalóides, triterpenos, flavonoides, xantonas e taninos condensados. Este extrato apresentou atividade larvicida, artemicida e leishmanicida. Portanto, a espécie *Zanthoxylum syncarpum* Tull. apresenta fonte alternativa para o

desenvolvimento de drogas leishmanicidas e larvicidas.

Referências Bibliográficas

AUGUSTO, L.G.S.; FREITAS, C.M. O Princípio da Precaução no uso de indicadores de riscos químicos ambientais em saúde do trabalhador. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, v.3, n.2, p.85-95, 1998.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food Chemical Toxicology**, v.46, p. 446-475, 2008.

BARBOSA, T. P., JUNIOR, C. G. L., SILVA, F.P.L., LOPES, H.M., FIGUEIREDO, L.R.F., SOUSA, S.C.O., BATISTA, G.N., SILVA, T.G., SILVA, T.M.S., OLIVEIRA, M.R., VASCONCELOS, M. L. A. A. Improved synthesis of seven aromatic Bayliss-Hillman adducts (BHA): evaluation against *Artemia salina* Leach. and *Leishmania chagasi*. **Eur. J. Med.Chem.** n.44, p.1726–1730, 2009.

BARBOSA, W. L. R. Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais (Edição Revisada). **Revista Científica da UFPA**, v.4, Belém – PA, 2004.

BERTINI, L.M.; PEREIRA, A.F.; OLIVEIRA, C.L.L.; MENEZES, E.A.; MORAIS, S.M.; CUNHA, F.A.; CAVALCANTI, E.S.B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v.17, p.80-83. 2005.

BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; MATOS, M. O.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.396-402, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue. Brasília: Ministério

da Saúde, 2009. 160 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

CECHINEL FILHO, V. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, p.1, 1998.

FACUNDO, V.A.; SILVEIRA, A.S.P.; BRAZ FILHO, R.B.; REZENDE, A.C.P.C. Constituintes químicos de *Zanthoxylum ekmanii* (URB.) ALAIN. **Química Nova**, v. 28, n.2, p.224-225, 2005.

GARCEZ, W.S.; GARCEZ, F.R.; SILVA, L.M.G.E.; SARMENTO, U.C. Substâncias de Origem Vegetal com Atividade Larvicida Contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, v.5, n.3, p.363-393, 2013.

GEBHARDT, R. In vitro screening of plant extracts and phytopharmaceuticals: novel approaches for the elucidation of active compounds and their mechanisms. **Planta Med**, v.66, p.99-105, 2000.

GIL, E. S.; PAULA, J. R.; NASCIMENTO, F. R. F.; BEZERRA, J. C. B. Produtos naturais com potencial leishmanicida. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.29, n.3, p.223-230, 2008.

HALSTEAD, S.B. *In: Dengue and dengue hemorrhagic fever*; GUBLER, D. J.; KUNO, G., eds.; CAB International: New York, p.23-44, 1997.

MACORIS, M.L.G.; ANDRIGHETTI, M.T.M.; TAKAKU, L.; GLASSER, C.M.; GARBELOTO, V.C.; BRACCO, J.E. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil to organophosphates insecticides. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, p.703-708, 2003.

MATOS, F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. UFC. Fortaleza-Ceará, 45pp. Ed. UFC, 2009.

MEYER, B.N., FERRIGINI, N.R., PUTNAN, J.E., JACOBSEN, L.B., NICHOLS, D.E., MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med**, v.45, p.31-34, 1982.

OLIVEIRA, J.R.; E.P.; LIMA, G.V.;
MORAIS, S.M.; COSTA, S.M.O.;
MAGALHÃES, C.E.C.; SILVA, R.C.B.

Uso do extrato de *Z. syncarpum* Tull como inibidor da corrosão do cobre, 32ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza, CE, 2009.

OPPERDOES, F.R.; MICHELS, P.A.A.

The metabolic repertoire of *Leishmania* and implications for drug discovery.

Disponível em

<http://www.icp.ucl.ac.be/trop/research/2008_Opperdoes.pdf> Acesso em 24 de outubro de 2013.

PIZZOLATTI, M.G.; CUNHA JÚNIOR, A.; SZPOGANICZ, B.; SOUSA, E.;

BRAZ-FILHO, R.; SCHRIPEMA, J. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae).

Química Nova, v.26, p.466-469, (2003).

RHEE, I. K.; MEEN, M.; INGKANINAN,

K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with

bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, v.915, p.217-223, 2001.

ROSS, S.A.; SULTANA, G.N.; BURANDT, C.L.; ELISOHLY, M.A.; MARAIS, P.J. FERREIRA, D.

Syncarpamide, a New Antiplasmodial (+)-Norepinephrine Derivative from *Zanthoxylum syncarpum*. 67ª ed. J. Nat. Prod. 2004.

SILVA, W. J. Atividade Larvicida de Óleos Essenciais de Plantas existentes no Estado de Sergipe contra *Aedes aegypti*. 2006, 69p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Cristóvão, São Cristóvão, SE, 2006.

SILVA, H. H. G., SILVA, I. G. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo evolutivo de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, p.349-355, 1999.

SILVA, J. G. D.; WERNECK, G. L.; CRUZ, M. S. P.; COSTA, C. H. N.;

MENDONÇA, I. L. Infecção Natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania* sp. em Terezina, Piauí, Brasil. *Caderno Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.23, n.7, p.1715-1720, jul, 2007.

SOUSA, A.E.F.; RIBEIRO, V.V. Perfil dos raizeiros e estudos de suas indicações acerca das plantas medicinais utilizadas no tratamento das doenças do trato respiratório. **Revista de Biologia e Farmácia**, v.03, 2008.

TELES, R.M. Caracterização Química, Avaliação Térmica e Atividade Larvicida Frente ao *Aedes aegypti* do Óleo Essencial da Espécie Vegetal *Aniba duckei* Kostermans, 2009, 126p. Tese (Doutorado em Química Orgânica), Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2009.

TEMPONE, A. G.; ANDRADE, H. F.; SPENCER, P. J.; LOURENCO, C. O.; ROGERO, J. R., NASCIMENTO, N. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its l-amino acid oxidase. **Biochemical and**

Biophysical Research Communications. v.280, p.620–624, 2001.

TEMPONE, A. G.; BORBOREMA, S. E. T.; ANDRADE JR, H. F.; GUALDA, N. C. A.; YOGI, A.; CARVALHO, C. S.; BACHIEGA, D.; LUPO, F.N.; BONOTTO, S.V.; FISCHER, D.C.H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**, v.12, p.382-390, 2005.

VIEIRA, M.G.S.; FREITAS, J,V,B.; LIMA, M.N.; GRAMOSA, N.V. Constituintes químicos voláteis das folhas e galhos de *Zanthoxylum syncarpum* Tull. **Química Nova**, v.32, n.2, 2009.

WHO, (2010). Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March, 2010.