



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JULIANA CORREA BARBOSA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE PROLIFERATIVA,
CICATRIZANTE E ANTILEISHMANIA DE *Zanthoxylum
rhoifolium* Lam. (Rutaceae)**

BELÉM - PA

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE PROLIFERATIVA,
CICATRIZANTE E ANTILEISHMANIA DE *Zanthoxylum rhoifolium*
Lam. (Rutaceae)**

Autora: Juliana Correa Barbosa

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fâni Dolabela

Co-orientadora: Profa. Dra. Marta Chagas Monteiro

Trabalho de Defesa de dissertação do mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM - PARÁ

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

- B238e Barbosa, Juliana Correa.
Estudo fitoquímico e atividade proliferativa, cicatrizante e antileishmania de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae) / Juliana Correa Barbosa. — 2022.
123 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof^a. Dra. Maria Fâni Dolabela
Coorientação: Prof^a. Dra. Marta Chagas Monteiro
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2022.
1. Alcaloides. 2. Cicatrização. 3. Leishmaniose. 4.
Zanthoxylum. I. Título.

CDD 615.321098113

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Correa Barbosa

Estudo fitoquímico e atividade proliferativa, cicatrizante e antileishmania de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae)

Trabalho de Defesa de dissertação do mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 27 de Janeiro de 2022.

Conceito: Excelente.

BANCA EXAMINADORA

Maria Fâni Dolabela

Profa. Dra. Maria Fâni Dolabela (Orientadora)

Marta Chagas Monteiro

Profa. Dra. Marta Chagas Monteiro (Co-orientadora)

Glenda Nicoli da Silva

Profa. Dra. Glenda Nicoli da Silva (Examinadora Externa)

Wagner Luiz Ramos Barbosa

Prof. Tit. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa (Examinador Interno)

BELÉM - PARÁ

2022

A Antonio Sérgio Barbosa (em memória), meu pai, que nunca me deixou pensar que meus sonhos eram grandes demais, mas sim possíveis, desde que com muita força de vontade e determinação. Ele sempre disse que a educação é algo que ninguém jamais tira da gente, e que não haveria melhor herança do que investir na educação das filhas. A quem nunca duvidou de mim e sempre foi meu maior fã, ao melhor pai do mundo, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A Deus, pela proteção, bênçãos e pela força concedidas a mim e minha família. Não foi fácil, mas até aqui Ele nos guiou e seguirá assim.

Ao meu pai Sérgio, por nunca ter duvidado de mim e por ser o meu maior fã. Papai sempre foi consolo, aconchego e meu companheiro de boas conversas e risadas. Sempre será assim: nós dois para tudo. Perdê-lo me fez repensar muita coisa. Eu achei que não teria forças para continuar, mas presente como sempre foi, ele deu um jeito de mostrar que permanece ao meu lado, agora como minha estrelinha. E para realizar o nosso sonho, eu continuei. Sei que o senhor está feliz e orgulhoso. Te amarei para sempre. Obrigada por ser o melhor pai que eu poderia ter.

À minha mãe Euzilene, por sempre acreditar em mim, sonhar comigo, por não me deixar desistir, embora tudo o que aconteceu, e por fazer de tudo para que eu conseguisse realizar o nosso sonho. Ela é a mulher que um dia eu quero ser. Eu sigo firme para em breve conseguir lhe proporcionar tudo o que a senhora merece. Eu te amo. Obrigada por ser a melhor mãe que eu poderia ter.

À minha irmã Juliene, por ser o meu ponto de equilíbrio. Ela é a “razão” da casa e é quem sempre tem uma frase que acalma o coração. Obrigada por me fazer sorrir ao menor sinal de alegria. Eu te amo muito, minha bebê.

Aos meus avós maternos Ribamar (em memória) e Maria (em memória) por me darem amor, carinho e atenção desde o meu nascimento. Daí do céu, sei que estão muito orgulhosos. Amarei vocês para sempre.

Aos meus avós paternos Antônio e Severina por sempre serem fonte de amor e cuidado. Obrigada por tudo. Amo muito vocês.

Aos meus tios, tias, primos e primas, por terem se unido em orações e demonstração de carinho. Obrigada por serem nossa rede de apoio. Saber que posso contar com vocês é um combustível.

Aos meus primeiros “filhos acadêmicos”, por acreditarem em mim e por enxergarem qualidades que eu mesma desconhecia. Ensino, mas acabo aprendendo bem mais com vocês, Dani e Pedro. Me orgulho em saber que vocês serão cientistas incríveis.

À minha orientadora, por me ensinar tanto nesses anos, pelas oportunidades e por ter sido colo no momento em que desistir desse sonho foi cogitado por mim.

À minha co-orientadora, pelos conhecimentos e oportunidades proporcionadas.

Aos membros de laboratórios vizinhos, por sempre me receberem de portas abertas para a realização de etapas desse trabalho, em especial ao laboratório de Fitoquímica/UFPA, LaBQuim/UFPA, CEABio/UFPA e Lamoc/UFRGS. Ressalto o nome de pessoas por quem tenho profunda admiração e que me fizeram crescer como profissional: prof. Andrey, Édson, Andryo, seu Jailton, Myrth, prof. Marcelo, Bibiana e Paloma. Obrigada por me ensinarem tanto e mostrarem que a pesquisa sempre deve ser feita de mãos dadas.

À Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por ter tornado possível a execução deste trabalho, mesmo diante do cenário atual. Em especial, à querida Cliciane, que sempre esteve disposta a ajudar.

Ao PROCAD/Amazônia, pela bolsa concedida para a realização de parte desse trabalho, permitindo a troca de experiências e vivências importantes para minha formação profissional.

Ao CNPq, pela bolsa concedida e conhecimentos adquiridos.

Aos membros do LFDN/UFPA, pela parceria e amizade desde o início de tudo. Em especial aos meus amigos Valdicley e Ton, que mesmo saturados dos meus pedidos de ajuda – pois foram muitos –, sempre estiveram dispostos a ajudar e me ensinar. Eu aprendi muito com vocês. À minha amiga Ana Laura, que foi minha dupla de viagem, dividimos muitos choros durante os experimentos, mas também muitos sorrisos a cada etapa que fomos vencendo. E aos amigos de quando eu ainda era uma caloura, que me ensinaram tanto: Rosana, Kelly, Mírian, João Victor, Erica Vanessa, Milena, Dayse, Amandinha, Hiro, Jhessica, Lulu, Érica Patrícia e Lara.

Aos meus amigos de graduação, Kelly Karolling, Cintia, Mayara, Gleidson, Simone, Layana e Dávila, que sempre torceram, acreditaram e comemoraram cada conquista minha como sendo deles. A nossa amizade é muito importante.

A todos os grandes amigos, por serem acaento, por rezarem e por não soltarem minha mão e da minha família. Em especial às minhas amigas Bárbara, Jamile, Iasmim, Ana Joyce, Janylle e Lorrane, as quais desde o ensino médio me acompanham e vibram comigo em todas as minhas conquistas.

E a todos que torcem por mim.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

RESUMO

BARBOSA, J. C. **Estudo fitoquímico e atividade proliferativa, cicatrizante e antileishmania de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae).** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 123 p. Universidade Federal do Pará, Belém, Belém, 2022.

Introdução: *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (mamica-de-cadela) é amplamente utilizada na medicina popular como antimicrobiano, anti-inflamatório e antiparasitário. **Objetivo:** Dessa forma, o presente estudo avaliou aspectos fitoquímicos e diferentes atividades biológicas de *Z. rhoifolium*. **Metodos:** O extrato etanólico (EE) foi obtido pela maceração do pó das cascas de *Z. rhoifolium* com etanol comercial 96° GL, submetido à partição ácido-base, obtendo-se as frações de neutros (FN) e de alcaloides (FA). As amostras foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS). A FN foi submetida ao fracionamento em coluna cromatográfica e a substância isolada foi identificada por ressonância magnética nuclear. Promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* foram utilizadas para a atividade leishmanicida. Para a citotoxicidade foram utilizados os métodos de viabilidade celular com MTT (células normais de rim de macaco verde africano- VERO) e TTC (macrófago de camundongos- J774), sendo calculados os índices de seletividade (IS) por divisão da concentração citotóxica (CC₅₀) e inibitória no parasito (CI₅₀). Além disso, foi feito o ensaio de proliferação celular em células HaCaT (queratinócitos humanos) e fibroblastos pelo método SRB (sulforrodamina B), bem como o ensaio de cicatrização de feridas com células HaCaT. **Resultados:** Em CCD e CLAE, detectou-se a presença de alcaloides no EE, FN e FA. Em LC-MS, EE, FN e FA apresentaram picos com espectro de massas sugestivos de alcaloides e de FN foi isolado o alcaloide cheleritrina. Em promastigota, o EE (CI₅₀= 1,3 µg/mL), FN (CI₅₀= 1,0 µg/mL) e FA (CI₅₀= 0,9µg/mL) foram ativos. No ensaio em amastigota, os índices de inibição de infecção do EE (200 µg/mL= 40%; 100 µg/mL= 25,5% e 50 µg/mL=27%) e da FN (200 µg/mL= 50%, 100 µg/mL=38% e 50 µg/mL= 31,7%) sugerem que são promissores. No teste de citotoxicidade em J774, observou-se que o EE (CC₅₀=107,45 µg/mL) e a FN (CC₅₀= 112,1 µg/mL) apresentaram citotoxicidade moderada para a J774, enquanto que a FA (CC₅₀=44,96 µg/mL) foi considerada citotóxica. Em células VERO, observou-se que o EE (CC₅₀=330,6 µg/mL) e a FA (CC₅₀= 111,7 µg/mL) apresentaram citotoxicidade moderada, enquanto que a FN (CC₅₀= 831,9 µg/mL) foi considerada não citotóxica. Considerando o IS, EE (VERO= 252,5; J774= 82,65), FN (VERO= 831,9; J774=112,1) e FA (VERO= 119,7; J774= 49,95) apresentaram elevada seletividade, com destaque para FN. EE e FN (HaCaT= 15 a 125 µg/mL, em ambas) aumentaram a proliferação celular em relação ao grupo controle e a FN apresentou propriedades cicatrizantes. **Conclusão:** A *Z. rhoifolium* apresentou atividade antileishmania e seletividade para o parasito. Além disso, a FN mostrou potencial cicatrizante.

Palavras-chave: alcaloides; cicatrização; leishmaniose; *Zanthoxylum*.

ABSTRACT

BARBOSA, J. C. **Phytochemical study and proliferative, healing and antileishmanial activity of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae)**. Dissertation (Master's degree) - Graduate Degree Program in Pharmaceutical Sciences, 123 p. Universidade Federal do Pará, 2022.

Introduction: *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (mamica-de-cadela) is widely used in folk medicine as an antimicrobial, anti-inflammatory and antiparasitic. **OBJECTIVE:** Thus, the present study evaluated phytochemical aspects and different biological activities of *Z. rhoifolium*. **Methods:** The ethanol extract (EE) was obtained by macerating *Z. rhoifolium* bark powder with commercial ethanol 96° GL. It was subjected to acid-base partition, obtaining the neutral (FN) and alkaloid (FA) fractions. The samples were analyzed by thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS). The FN was subjected to fractionation in a chromatographic column and the isolated substance was identified by nuclear magnetic resonance. *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes were used for leishmanicidal activity. For cytotoxicity, cell viability methods were used with MTT (normal African green monkey kidney cells - VERO) and TTC (mouse macrophage - J774). The selectivity indices (SI) were calculated by dividing the cytotoxic (CC_{50}) and inhibitory concentration in the parasite (IC_{50}). In addition, the cell proliferation assay was performed in HaCaT cells (human keratinocytes) and fibroblasts by the SRB method (sulforhodamine B), as well as the wound healing assay with HaCaT cells. **Results:** In TLC and HPLC, the presence of alkaloids was detected in EE, FN and FA. In LC-MS, EE, FN and FA showed peaks with mass spectrum suggestive of alkaloids and from FN the alkaloid chelerythrine was isolated. In promastigotes, EE (IC_{50} = 1.3 μ g/mL), FN (IC_{50} = 1.0 μ g/mL) and FA (IC_{50} = 0.9 μ g/mL) were active. In the amastigote assay, the infection inhibition rates of EE (200 μ g/mL= 40%; 100 μ g/mL= 25.5% and 50 μ g/mL=27%) and FN (200 μ g/mL= 50 %, 100 μ g/mL=38% and 50 μ g/mL= 31.7%) suggest they are promising. In the cytotoxicity test on J774, EE (CC_{50} =107.45 μ g/mL) and FN (CC_{50} = 112.1 μ g/mL) showed moderate cytotoxicity for J774, while FA (CC_{50} = 44.96 μ g/mL) was considered cytotoxic. In VERO cells, the EE (CC_{50} =330.6 μ g/mL) and FA (CC_{50} = 111.7 μ g/mL) showed moderate cytotoxicity, while FN (CC_{50} = 831.9 μ g/mL) was non-cytotoxic. Considering the SI, EE (VERO= 252.5; J774= 82.65), FN (VERO= 831.9; J774=112.1) and FA (VERO= 119.7; J774= 49.95) showed high selectivity, with emphasis on FN. EE and FN (HaCaT= 15 a 125 μ g/mL, in both) increased cell proliferation compared to the control group and FN showed healing properties. **Conclusion:** *Z. rhoifolium* showed antileishmania activity and selectivity for the parasite. In addition, NF showed healing potential.

Keywords: alkaloids; healing; leishmaniasis; *Zanthoxylum*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Espécie <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> Lam.	25
Figura 2:	Alcaloides isolados do gênero <i>Zanthoxylum</i> .	28
Figura 3:	Outros metabólitos isolados do gênero <i>Zanthoxylum</i> .	30
Figura 4:	Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania</i> spp.	39
Figura 5:	Estrutura química do Estibogluconato de sódio (A) e Antimoniato N-metilglucamina (B).	40
Figura 6:	Estrutura química da Anfotericina B.	41
Figura 7:	Modelo esquemático das placas de 96 poços de fundo chato e da distribuição das substâncias testadas que estão representadas por cores para teste de citotoxicidade.	61
Figura 8:	Análises em Cromatografia em Camada Delgada do extrato etanólico e frações (FN e FA) de <i>Z. rhoifolium</i> .	64
Figura 9:	Cromatograma do extrato etanólico de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> e seus respectivos espectros em ultravioleta.	66
Figura 10:	Cromatograma das frações de neutros (FN) e alcaloides (FA) de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	67
Figura 11:	Cromatograma do extrato etanólico (EE) de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	68
Figura 12:	Espectro de massas e fragmentações referentes ao tempo de retenção de 3,8 min. do extrato etanólico (EE) de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	68
Figura 13:	Espectro de massas e fragmentações referentes ao tempo de retenção de 3,9 min. do extrato etanólico (EE) de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	69
Figura 14:	Espectro de massas e fragmentações referentes ao tempo de retenção de 10,6 min. do extrato etanólico (EE) de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	70
Figura 15:	Espectro de massas e fragmentações referentes ao tempo de retenção de 13,8 min. do extrato etanólico (EE) de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	71

Figura 16:	Cromatograma da fração de neutros (FN) de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	72
Figura 17:	Espectro de massas e fragmentações referentes ao tempo de retenção de 5,6 e 6,7 min. da fração de neutros (FN) obtida do extrato etanólico (EE) de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	72
Figura 18:	Espectro de massas e fragmentações referentes ao tempo de retenção de 15,3 min. da fração de neutros (FN) obtida do extrato etanólico (EE) de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	73
Figura 19:	Espectro de massas e fragmentações referentes ao tempo de retenção de 16,8 min. da fração de neutros (FN) obtida do extrato etanólico (EE) de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	75
Figura 20:	Espectro de massas e fragmentações referentes ao tempo de retenção de 18,2 min. da fração de neutros (FN) obtida do extrato etanólico (EE) de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	77
Figura 21:	Cromatograma da fração de alcaloides (FA) de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	78
Figura 22:	Espectro de massas e fragmentações referentes ao tempo de retenção de 3,5 min. da fração de alcaloides (FA) obtida do extrato etanólico (EE) de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	79
Figura 23:	Espectro de massas e fragmentações referentes ao tempo de retenção de 4,0 min. da fração de alcaloides (FA) obtida do extrato etanólico (EE) de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	80
Figura 24:	Espectro de massas e fragmentações referentes ao tempo de retenção de 10,7 min. da fração de alcaloides (FA) obtida do extrato etanólico (EE) de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	81

Figura 25:	Espectro de massas e fragmentações referentes ao tempo de retenção de 13,7 min. da fração de alcaloides (FA) obtida do extrato etanólico (EE) de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	82
Figura 26:	Espectro de massas e fragmentações referentes ao tempo de retenção de 28,0 min. da fração de alcaloides (FA) obtida do extrato etanólico (EE) de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	83
Figura 27:	Análise de cromatografia em camada delgada preparativa de FN.	85
Figura 28:	Espectro de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) de SUB-FN4 obtida da fração de neutros (FN) de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	86
Figura 29:	Espectro de RMN ¹³ C (MeOD, 100 MHz) de SUB-FN4 obtida da fração de neutros (FN) de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	87
Figura 30:	Correlação de RMN bidimensional de HMBC da SUB-FN4 obtida da fração de neutros (FN) de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	88
Figura 31:	Espectro de RMN bidimensional de HMBC de SUB-FN4 obtida da fração de neutros (FN) de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	88
Figura 32:	Correlação de RMN ¹ H- ¹ H COSY da SUB-FN4 obtida da fração de neutros (FN) de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	89
Figura 33:	Espectro de RMN ¹ H- ¹ H COSY de SUB-FN4 obtida da fração de neutros (FN) de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	89
Figura 34:	Estrutura do alcaloide benzonantridínico cheleritrina, isolado da SUB-FN4 obtida da fração de neutros (FN) de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	90
Figura 35:	Atividade antipromastigota do extrato e frações de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	93

Figura 36:	Atividade anti-mastigota (<i>L. amazonensis</i>) do extrato etanólico (EE) e fração de neutros (FN) obtidos das cascas de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	95
Figura 37:	Avaliação do efeito proliferativo de <i>Z. rhoifolium</i> para queratinócitos (HaCaT) e fibroblastos primários normais.	100
Figura 38:	Ensaio de cicatrização do extrato etanólico em células HaCaT de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> . Fechamento das feridas em 0, 24, 48 e 72h.	103
Figura 39:	Ensaio de cicatrização da fração de neutros em células HaCaT de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> . Fechamento das feridas em 0, 24, 48 e 72h.	104
Figura 40:	Ensaio de cicatrização da fração de alcaloides em células HaCaT de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> . Fechamento das feridas em 0, 24, 48 e 72h.	105
Figura 41:	Fechamento sobre 0 do extrato e frações de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> em células HaCaT nos tempos de 0h, 36h, 48h e 72h.	106

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1:	Interpretação dos resultados baseado na faixa da Concentração Inibitória a 50%.	59
Quadro 2:	Interpretação dos resultados do ensaio de citotoxicidade.	63
Tabela 1:	Sistema de eluição empregado na obtenção dos perfis cromatográficos por CLAE-DAD do extrato etanólico obtido da casca da <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	55
Tabela 2:	Síntese dos resultados obtidos nos estudos cromatográficos.	84
Tabela 3:	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (MeOD, 400 MHz) para elucidação do alcaloide benzofenantridínico cheleritrina.	90
Tabela 4:	Determinação da atividade antileishmania (formas promastigotas) do extrato etanólico e frações de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	92
Tabela 5:	Avaliação da atividade anti-amastigota do extrato etanólico (EE) e fração de neutros (FN) em macrófagos (RAW 264.7) infectados com amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> .	95
Tabela 6:	Avaliação da citotoxicidade do extrato e frações (FN e FA) e índice de seletividade de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	98
Tabela 7:	Síntese dos resultados biológicos obtidos para a espécie <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> .	107

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1:	Percentual de fechamento da ferida sobre 0	58
Equação 2:	Percentual de viabilidade dos parasitos	59
Equação 3:	Percentual de infecção de amastigotas	60
Equação 4:	Percentual de células vivas	62
Equação 5:	Percentual de células mortas	62
Equação 6:	Índice de seletividade	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CC ₅₀	Concentração Citotóxica 50%
CI ₅₀	Concentração Inibitória 50%
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE/HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/ High performance liquid chromatography
COSY	Homonuclear COrelated Spectroscopy
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
EE	Extrato etanólicos
FN	Fração de neutros
FA	Fração de alcaloides
HMBC	Heteronuclear MultipleQuantum Coherence
Linhagem celular VERO	Células normais de Rim de Macaco Verde Africano
Linhagem celular RAW (264.7)	Macrófagos de camundongos leucêmicos
Linhagem J774	Macrófagos de camundongos da linhagem BALB/c
Linhagem celular HaCaT	Queratinócitos humanos normais
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
MTT	Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium (sal de tetrazólio)
SRB	Sulforrodamina – B
TTC	2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (cloreto de trifeniltetrazólio)
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol deuterado
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde/ World Health Organization
OPAS/PAHO	Organização Pan-Americana da Saúde/ Pan American Health Organization
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotação por minuto
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
DMEM	Eagle modificado por Dulbecco
Sb5+	Antimônio pentavalente
SBF	Soro Fetal Bovino
SUB-FN4	Subfração obtida a partir da fração de neutros de <i>Z. rhofoium</i> – identificada como alcaloide benzofenantridínico
TR	Tempo de retenção

UV
v/v
vis.

Ultravioleta
volume/volume
Visível

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

μL	Microlitro
μg	Micrograma
Mg	Miligrama
$\mu\text{g}/\text{ml}$	Micrograma/mililitro
Nm	Nanômetro
μm	Micromolar
cm^2	Centímetro quadrado
mm^3	Milímetro cúbico
>	Maior
<	Menor
%	Porcentagem
Ph	Potencial hidrogeniônico

Sumário

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1. <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> (Rutaceae)	24
2.1.1. ATIVIDADES ANTILEISHMANIA, CICATRIZANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DO GÊNERO ZANTHOXYLUM	36
2.2. Leishmaniose	38
2.4. Alcaloides e atividades cicatrizante e antileishmania	44
3 OBJETIVOS	48
3.1. Objetivo Geral	48
3.2. Objetivos específicos	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1. Material	49
4.1.1. EQUIPAMENTOS	49
4.1.2. SOLVENTES, FASES ESTACIONÁRIAS E DEMAIS REAGENTES	50
4.1.3. MATERIAL PLÁSTICO, METAL E VIDRARIAS	51
4.1.4. MEIO DE CULTURA E OUTROS	52
4.1.5. REVELADORES UTILIZADOS NA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) PARA A DETECÇÃO DE ALCALOIDES	52
4.1.5.1 Reagente de Dragendorff	52
4.1.6. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	53
4.1.7. MATERIAL BIOLÓGICO	53
4.2. Métodos	54
4.2.1. PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL E ESTUDOS QUÍMICOS	54
4.2.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS)	55
4.2.3. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO	56
4.2.4. ATIVIDADES CICATRIZANTES E ANTILEISHMANIA	57

4.2.4.1. Ensaio de proliferação e cicatrização de feridas	57
4.2.4.2. Atividade antileishmania	58
4.2.5 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ESTABELECIMENTO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE	61
4.2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1 Estudo Fitoquímico	64
5.2 Atividade cicatrizante e proliferativa de <i>Z. rhoifolium</i>	98
6 CONCLUSÃO	108
REFERÊNCIAS	109

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente, 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair a leishmaniose, com registro estimado de 20.000 a 30.000 mortes anualmente. As leishmanioses são classificadas de acordo com as manifestações clínicas, que se diferenciam em visceral e tegumentar ou cutânea. A tegumentar divide-se em três subtipos: mucocutânea, cutânea e cutânea difusa (CHAN-BACAB; PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001).

A espécie *L. amazonensis*, causadora da leishmaniose tegumentar, pode causar feridas de difícil cicatrização (MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004), e quando se fala do processo de cicatrização de feridas é importante conhecer sua origem. Esse processo envolve a interação entre células e vários sistemas mensageiros, sendo dividido em 3 fases: inflamatória, proliferativa e de remodelação (VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009). As feridas podem ser agudas (autocuráveis) ou podem evoluir para crônicas. As de origem crônica possuem o tempo de cicatrização maior que o esperado (VANWIJCK, 2001). Nesse contexto, uma ferida de difícil cicatrização pode ter sua origem na infecção pelo parasito da leishmaniose (SCOTT; NOVAIS, 2016).

Sabe-se que o tratamento convencional utilizado para as leishmanioses é o antimônio pentavalente (Sb^{5+} ; HERWALDT, 1999; RATH et al., 2003; BRASIL, 2007), sendo os seguintes fármacos disponíveis atualmente: Antimoniato N-metil glucamina (Glucantime®) ou Antimoniato de meglumina e Estibogluconato de sódio (Pentostan®, não comercializado no Brasil). Além destes fármacos, a anfotericina B e as pentamidinas (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina; BRASIL, 2010) são consideradas alternativas terapêuticas.

Em áreas endêmicas de leishmaniose, grande parte da população que adquire a doença não tem acesso a medicamentos, logo, utilizam as plantas para tratar e aliviar os sintomas (CHAN-BACAB; PEÑA-RODRIGUEZ, 2001). Nesse sentido, as plantas são importantes fontes de descoberta de fármacos, principalmente no que diz respeito a fármacos antiparasitários (ANTHONY; FYFE; SMITH, 2005), pois elas possuem metabólitos secundários (MORAIS;

BRAZ-FILHO, 2007), que podem atuar na destruição de agentes invasores (MISRA et al., 2009; LINDOSO et al., 2012), ao interferir no metabolismo parasitário ou alterando a permeabilidade de sua membrana.

O gênero *Zanthoxylum* é um exemplo de planta utilizada na medicina tradicional (LEM´EE, 1956), pertencente à família *Rutaceae*. Essa família possui os alcaloides como principais metabólitos secundários (DIEGUEZ-HURTADO et al., 2003; PATIÑO; CUCA, 2004). Espécies pertencentes ao gênero *Zanthoxylum* apresentaram atividades antitumoral (WEBER, 2005), antibacteriana (GONZAGA et al., 2003^a; GONZAGA et al., 2003^b; COSTA et al., 2010), anti-helmíntica (PENELUC et al., 2009) e antiprotozoária, tendo ação antimalárica *in vitro* em clones sensíveis e resistentes à cloroquina (ADIA et al., 2016; OMOSA; OKEMWA, 2017). De espécies pertencentes ao gênero *Zanthoxylum* foram isoladas lignanas (LI; LIU; ZHOU, 2015; OMOSA; OKEMWA, 2017), alcanidas (ROSS et al., 2005; OMOSA; OKEMWA, 2017) e alcaloides (OMOSA; OKEMWA, 2017).

Zanthoxylum rhoifolium Lam., popularmente conhecida como mamica-de-porca e mamica-de-cadela (SALGADO et al., 1998), é utilizada na medicina popular para diabetes, diarreia, hemorroidas e como relaxante muscular (BIESKI et al., 2012). Dessa espécie já foram isolados triterpenos (WEBER, 2005), alcaloides (diidrocheleritrina, bocconolina, cheleritrina e 6-acetonildiidrocheleritrina), que apresentaram atividades antibacteriana (GONZAGA et al., 2003^a; GONZAGA et al., 2003^b; COSTA et al., 2010) e antitumoral (WEBER, 2005). O extrato etanólico de cascas de haste de *Z. rhoifolium* e sua fração de hexano apresentaram efeito inibitório efetivo da infecção de macrófagos por *L. amazonensis* (MELO-NETO et al., 2016). Além disso, o alcaloide cantin-6-ona isolado de *Z. chiloperone* demonstrou atividade *in vivo* em ratos BALB/c infectados com *L. amazonensis* (FERREIRA, 2002).

Em outros estudos, avaliou-se o potencial cicatrizante de outras espécies pertencentes ao gênero *Zanthoxylum*, onde constatou-se por estudo *in vivo* que o óleo da semente de *Z. bungeanum* aumentou a proporção da cicatrização de feridas de forma dose-dependente e também reduziu significativamente o tempo de desincrustação da ferida e o tempo de fechamento completo, sendo o tempo de desincrustação menor que no controle positivo (LI et al., 2017). Neste estudo

também foi concluído que houve aumento significativo da expressão da proteína do colágeno tipo III nas feridas (LI et al., 2017).

Há estudos que comprovam a relação entre alcaloides e a atividade antileishmania. Como exemplos, o alcaloide piperina, que foi ativo *in vitro* frente a formas promastigotas de *L. donovani* (KAPIL, 1993). Outro estudo avaliou o efeito de alcaloides indólicos em promastigotas de *L. amazonensis*, e após tratamento por 72h, foi demonstrado que a ação foi dose-dependente (FERNANDES, 2017). Além disso, o alcaloide isoguattouregidina também apresentou atividade contra formas promastigotas de *Leishmania donovani* e *L. amazonensis* (MAHIOU et al., 1994).

Porém há carência de estudos que destaquem a propriedade cicatrizante de alcaloides, no entanto, alguns estudos comprovam a ação cicatrizante de outras espécies ricas desses metabólitos. Como exemplo a espécie *Bowdichia virgilioides*, que apresenta alcaloides como acosmina, ormosanina e podopetalina (BARBOSA-FILHO et al., 2004) em sua composição e demonstrou em camundongos uma redução significativa na área da ferida não infectada e infectada e em análise histológica induziu a deposição de colágeno, aumento na contagem de fibroblastos, poucas células inflamatórias e aumento na expressão de colágeno tipo I (AGRA et al., 2013).

Outra espécie rica em alcaloides e promissora como cicatrizante é a *Solanum xanthocarpum*, que apresentou redução no período de epitelização, somada a uma diminuição acentuada na área da cicatriz em ratos com feridas expostas (DEWANGAN et al., 2012). Bem como a espécie *Morinda citrifolia* L., rica em metabólitos como alcaloides e triterpenóides, que apresentou redução de 71% na área da ferida de ratos, aumento na taxa de epitelização e maior conteúdo de colágeno (NAYAK; SANDIFORD; MAXWELL, 2009).

Apesar de não haver propriedade cicatrizante já relatada para alcaloides isolados, ressalta-se que a espécie *Z. rhoifolium* possui alegações populares de uso para propriedades cicatrizantes e em queimaduras (LI et al., 2017; RIBEIRO et al., 2017). Associado a isso, ainda há carência de estudos fitoquímicos e que avaliem a atividade leishmanicida correlacionada à propriedade cicatrizante de *Zanthoxylum rhoifolium*, o que justifica a realização do presente estudo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Zanthoxylum rhoifolium* (Rutaceae)

Muitos estudos têm sido realizados com espécies da família Rutaceae, devido à sua distribuição limitada, biogênese razoavelmente definida, além da diversidade de micromoléculas já descritas. Os gêneros dessa família estão amplamente distribuídos nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo, com aproximadamente 1.600 espécies, com grande ocorrência na Austrália e África. No Brasil, a família está representada por cerca de 29 gêneros e 182 espécies, das quais cerca de 56 ocorrem na Amazônia (BARROSO et al., 1986). As espécies brasileiras de *Zanthoxylum* apresentam perianto diclamídeo, enquanto os espécimes de regiões temperadas da América Central e leste da Ásia apresentam perianto mono e diclamídeo (MELO; ZICKEL, 2004).

O gênero *Zanthoxylum* compreende mais de 200 espécies e se encontra distribuído em todo o mundo. São árvores, arbustos ou arvoretas, geralmente dioicos, raramente polígamo-dioicos, as arbóreas apresentam copa frondosa, alcançando até 20m de altura, troncos e ramos aculeados, raramente não aculeados, ocasionalmente com acúleos na face inferior dos folíolos; acúleos com grande variação intraespecífica, longos ou curtos, eretos ou recurvados, com ou sem tricomas simples e/ou estrelados, densos a esparsos nos ramos, folhas e elementos florais, com coloração esbranquiçada ou translúcida na maioria das espécies, ferrugínea em *Z. rhoifolium* e *Z. stelligerum*. Folhas alternas, compostas, paripinadas ou imparipinadas, com até 15 pares de folíolos, raramente uni ou trifolioladas, margem geralmente crenada, variando de crenulada até quase inteira, com glândulas oleíferas entre as crenas ou por toda a lâmina foliar; é frequente a presença de domácias presentes na face inferior do folíolo, principalmente na base de algumas espécies. Inflorescências terminais, axilares ou laterais, variando de tirso, panículas piramidais, corimbos, racemos a espigas (HARTLEY, 1966; PORTER; ELIAS, 1979; PIRANI, 1999).

O gênero *Zanthoxylum* possui uma variedade de constituintes químicos, dentre os quais podem ser citados, óleos essenciais (SILVA; FIGUEREDO;

YANO, 2007), terpenos (SANTIAGO-BRUGNOLI et al., 2013; AHMAD et al., 2014), alcaloides (GONZAGA et al., 2003b; JULLIAN et al., 2006; CASTILLO et al., 2014) cumarinas, glicosilflavonoides, esteroides (ARRUDA et al., 1992) e lignanas (WEBER, 2005; ZANON, 2010), sendo que cada metabólito possui sua relevância biológica, e por isso, são amplamente investigados na literatura.

A família é muito bem caracterizada pela variedade de alcaloides e cumarinas que apresenta (GIBBS, 1974). Este gênero é caracterizado pela presença de alcaloides (GONZAGA et al., 2003a; GONZAGA et al., 2003b; WEBER, 2005; OMOSA; OKEMWA, 2017), lignanas (LI; LIU; ZHOU, 2015; OMOSA; OKEMWA, 2017), triterpenos (WEBER, 2005) e terpenos (OLIVEIRA et al., 2002).

Pertencente a este gênero, a espécie *Zanthoxylum rhoifolium* (Figura 1) é popularmente conhecida como mamica-de-porca, mamica-de-cadela, laranjeira-brava e espinho-cheiroso, distribui-se principalmente em regiões de cerrado (SALGADO et al., 1998), mata atlântica e floresta amazônica (PIRANI, 2005).

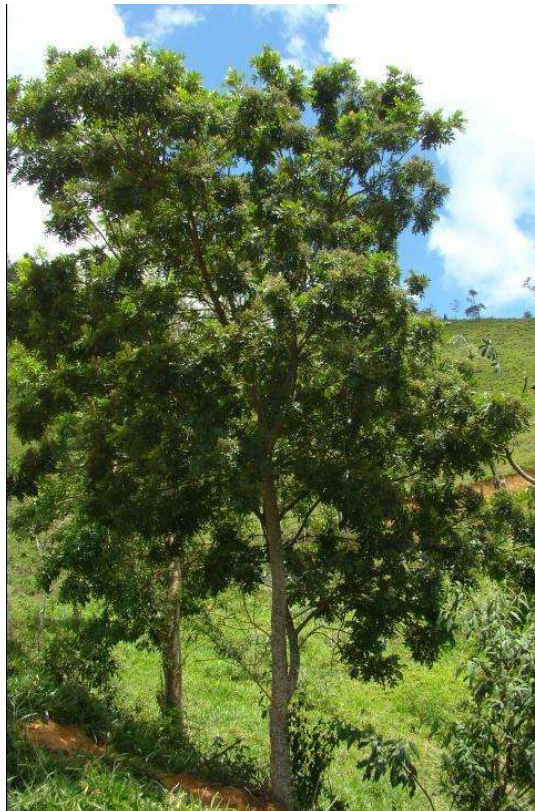


Figura 1 - Espécie *Zanthoxylum rhoifolium* Lam.

Fonte: Árvores do Brasil, 2019.

Estudos etnobotânicos relataram o uso de *Zanthoxylum rhoifolium* com o decocto obtido da casca, folha e raiz de para o tratamento doenças febris e malária (LEM´EE, 1956; CRUZ, 1995; VIGNERON et al., 2005); da dor, em especial das dores de dente, ouvido e cabeça (LEM´EE, 1956; CRUZ, 1995; MOURA-COSTA et al., 2012); uso de banhos para tratar dos cancros venéreos e a sarna (GRENAND et al., 2004). Outros estudos relataram, o uso das raízes, folhas e casca de *Z. rhoifolium* para o tratamento de problemas digestivos, tônica, anti-flatulência, cólica intestinal e dispepsia (CRUZ, 1995). Além disso, a casca e a folha da *Z. rhoifolium* já foi indicada para anemia, icterícia e pressão alta (MOURA-COSTA et al., 2012). Também já foi indicado o uso da casca (como decocto) de *Z. rhoifolium* para depuração do sangue e diabetes, sendo administradas via oral (YAZBEKA et al., 2019). Além disso, sementes de *Z. bungeanum* têm descritas atividades anti-inflamatórias e cicatrizantes e são utilizadas na medicina popular chinesa para asma e queimaduras (LI et al., 2017).

Na Amazônia legal, observa-se alegações de uso similares de *Z. rhoifolium* de outras localidades, tais como: depurativo do sangue, úlceras, gastrites, inflamações na garganta (forma oral) e cicatrizante de feridas (forma tópica; RIBEIRO et al., 2017).

Estudos químicos realizados com extratos obtidos das cascas da espécie *Z. rhoifolium* levaram ao isolamento dos seguintes alcaloides: decarina (Figura 2.1; MOURA et al., 1997), dictamina (Figura 2.2; VAQUETE; POUSET; PARIS, 1974; GRINA; RATCLIFF; STERMITZ, 1982; CUCA; TABORDA, 2007), cheleritrina (Figura 2.3; WEBER, 2005; ZANON, 2010; AHMAD et al., 2014; CASTILLO et al., 2014; TAVARES et al., 2014), fagaridina (Figura 2.4; JULLIAN et al., 2006; CASTILLO et al., 2014), dihidrocheleritrina (Figura 2.5; WEBER, 2005; ZANON, 2010; TAVARES et al., 2014), boconolina (Figura 2.6; WEBER, 2005; TAVARES et al., 2014), Y-fagarina (Figura 2.7; TAVARES et al., 2014), 8-hidroxi-4,7-dimetoxi-furoquinolina (Figura 2.8; TAVARES et al., 2014), roifolina A (Figura 2.9; GONZAGA et al., 2003b; TAVARES et al., 2014), roifolina B (Figura 2.10; GONZAGA et al., 2003b; TAVARES et al., 2014), dihidroavicina (Figura 2.11; JULLIAN et al., 2006; TAVARES et al., 2014), oxiavicina (Figura 2.12; JULLIAN et al., 2006), oxinitidina (Figura 2.13; MOURA et al., 1997; JULLIAN et al., 2006), dihidronitidina (Figura 2.14; MOURA et al., 1997; JULLIAN et al.,

2006), 6-acetonildiidrocheleritrina (Figura 2.15; GONZAGA et al., 2003b; WEBER, 2005), 6-acetonildihidronitidina (Figura 2.16; GONZAGA et al., 2003b), 6-acetonildihidroavicina (Figura 2.17; MOREL et al., 2002; GONZAGA et al., 2003b), zantoxilina (Figura 2.18; MOURA et al., 1997; GONZAGA et al., 2003b; ZANON, 2010; TAVARES et al., 2014), skimianina (Figura 2.19; ZANON, 2010; TAVARES et al., 2014), magnoflorina (Figura 2.20; ZANON, 2010), E,Z-dimetilroifolinato (Figura 2.21; ARRUDA et al., 1992), O-metilcapaurina (Figura 2.22; CAROTENUTO et al., 2015), avicina (Figura 2.23; JULLIAN et al., 2006; CASTILLO et al., 2014; TAVARES et al., 2014), nitidina (Figura 2.24; JULLIAN et al., 2006; BOUQUET et al., 2012; CASTILLO et al., 2014; TAVARES et al., 2014), fagaronina, nornitidina e norfagaronina (Figuras 2.25, 2.26, 2.27; CASTILLO et al., 2014). Ressalta-se que estes alcaloides já foram isolados de outras espécies deste gênero (VAQUETE; POUSSET; PARIS, 1974; STERMITZ; CAOLO; SWINHART, 1980; GRINA; RATCLIFF; STERMITZ, 1982).

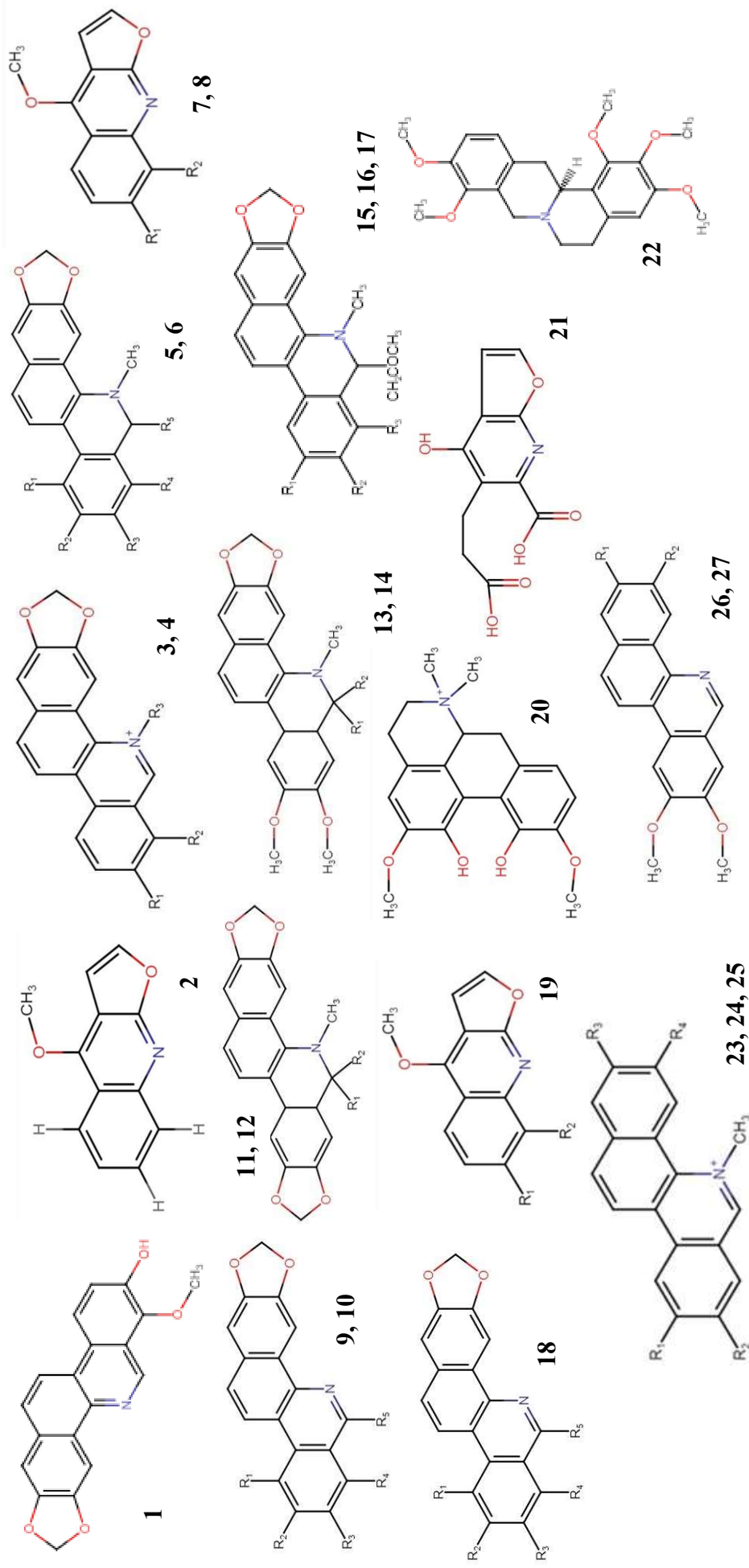


Figura 2 - Alcaloides isolados do gênero *Zanthoxylum*.

Legenda: **1**- Decarina; **2**- Dictamina; **3**- Chelerritrina: R₁=R₂=OCH₃, R₃=CH₃; **4**- Fagaridina-R₁=OH, R₂=OCH₃, R₃=CH₃; **5**- Dihidrocheleritrina-R₁=R₂=H, R₃=R₄=OCH₃, R₅=H; **6**- Boconolina- R₁=R₂=H, R₃=R₄=OCH₃, R₅=CH₂OH; **7**- Y-fagarina- R₁=H, R₂=OCH₃; **8**- 8-hidroxi-4,7-dimetoxi-furoquinolina- R₁=OCH₃, R₂=OH; **9**- Roifolina A- R₁=H, R₂=R₃=OCH₂O, R₄=H, R₅=OCH₃; **10**- Roifolina B- R₁=H, R₂=R₃=OCH₃, R₄=H, R₅=OCH₃; **11**- Dihidroavicina- R₁=R₂=H; **12**- Oxiavicina- R₁=R₂=O; **13**- Oxinitidina- R₁=R₂=O; **14**- Dihidronitidina- R₁=R₂=H; **15**- 6-acetonilhidroavicina- R₁=H; R₂=R₃=OCH₃; **16**- 6-acetonil-dihidronitidina- R₁=R₂=OCH₃; R₃=H; **17**- 6-acetonil-dihidroavicina- R₁=R₂=OCH₂O; R₃=H; **18**- Zantoxilina- R₁=OCH₃; R₂=OH; R₃=R₄=R₅=H; **19**- Skimianina- R₁=R₂=OCH₃; R₃=R₄=OCH₃; **20**- Magnoflorina; **21**- E-Z-dimetilroifolato; **22**- O-metilcapaurina; **23**- Avicina- R₁=R₂=R₃=R₄=OCH₂; R₃=R₄=OCH₃; R₅=CH₂; **24**- Nitidina- R₁=R₂=OCH₃; R₃=R₄=OCH₃; R₅=CH₂; **25**- Fagaronina- R₁=R₂=R₄=OCH₃; R₃=H; **26**- Norritidina- R₁=R₂=CH₂; **27**- Norfagaronina- R₁=H; R₂=CH₃.

Além dos alcaloides, outros metabólitos já foram isolados, como as cumarinas isopimpinina, felopterina, aurapteno, umbeliferona e 5'-hidroxiaurapteno (Figuras 3. 1, 3.2, 3.3, 3.4; ARRUDA et al., 1992), as lignanas sesamina (Figura 3.5; STERMITZ; CAOLO; SWINHART, 1980; WEBER, 2005; ZANON, 2010) e asaranina (Figura 3.6; STERMITZ; CAOLO; SWINHART, 1980), o glicosídeo hesperidina (ARRUDA et al., 1992) e os terpenos lupeol (Figura 3.7; ARRUDA et al., 1992; WEBER, 2005; ZANON, 2010; AHMAD et al., 2014), β -sitosterol, lupenona (Figuras 3.8, 3.9; ARRUDA et al., 1992), (13 R) -labdane-8 α , 7-O-neril éter de 2-quinolona, (13 S) -labdano-8 α , 15-diol, 15-diol e 13-(S) -8 α -13-epoxylabd-14-eno (Figuras 3.10, 3.11, 3.12, 3.13; SANTIAGO-BRUGNOLI et al., 2013).

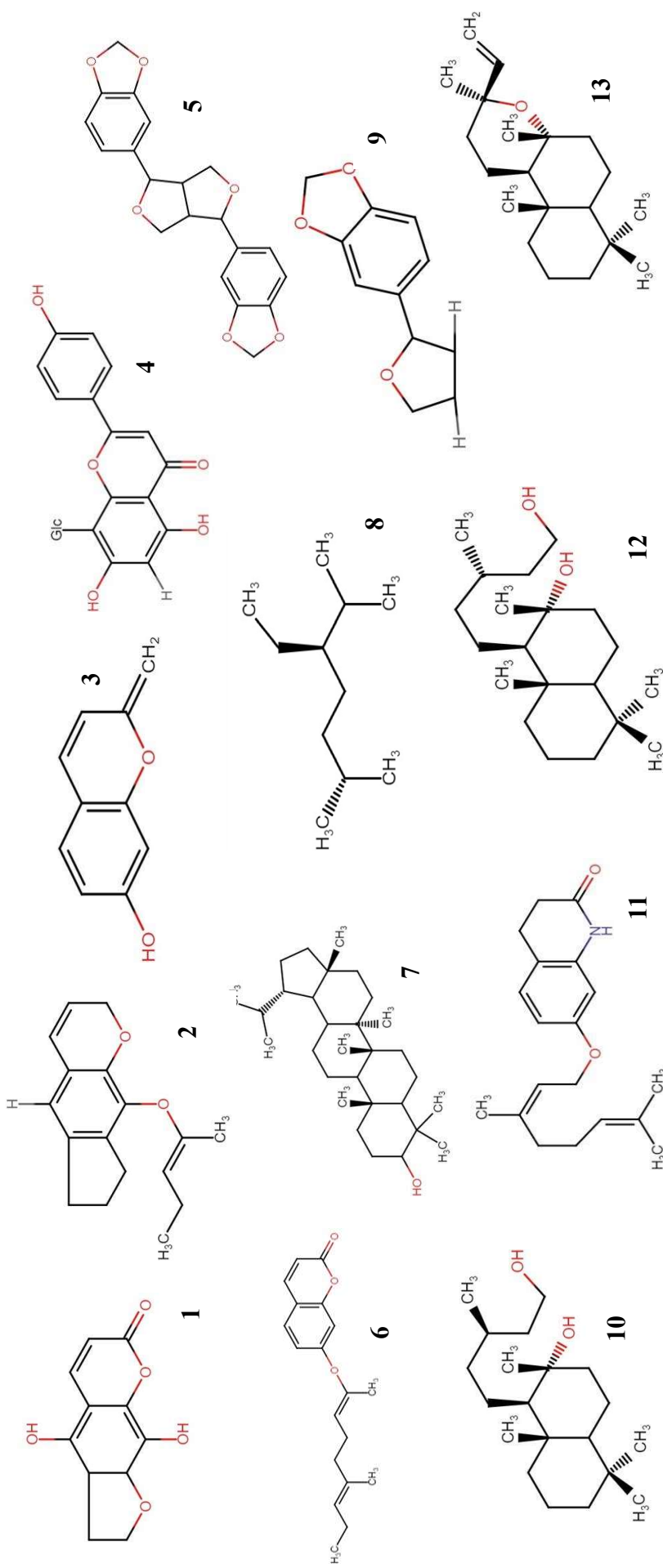


Figura 3 - Outros metabólitos isolados do gênero *Zanthoxylum*.

Legenda: **1**- Isopimpinina; **2**- Felopterina; **3**- Aurapteno; **4**- Umbeliferona; **5**- Sesamina; **6**- Asaranina; **7**- Lupeol; **8**- β -sitossterol; **9**- Lupenona; **10**- (13R)-labdane-8 α , 15-diol; **11**- 7-O-neril éter de 2-quinolona; **12**- (13S)-labdano-8 α , 15-diol; **13**- 13(S)-8 α -13-epoxilabd-14-eno.

Conforme dito anteriormente, a *Z. rhoifolium* é muito utilizada com fins medicinais em diferentes regiões do Brasil e alguns estudos avaliaram estas alegações de uso. A ação gastroprotetora do extrato etanólico da casca de *Z. rhoifolium* foi avaliada em camundongos Swiss e constatou-se que a proteção foi diretamente proporcional ao aumento da dose nos ensaios com lesões ocasionadas pelo etanol, etanol acidificado (HCl), indometacina e pelo estresse (FREITAS et al., 2011), confirmando a alegação do uso popular, o que ressalta a importância de investigações futuras acerca de qual metabólito secundário pode estar relacionada essa ação.

Em um estudo foi testada a atividade de extratos (hexânico, clorofórmico e metanólico) obtido das cascas de *Z. rhoifolium* em cepas de bactérias gram + (*Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*; *Micrococcus luteus*) e gram- (*Klebsiella pneumoniae*; *Salmonella setubal*; *Escherichia coli*) e constatou-se atividade em todas as cepas testadas (GONZAGA et al., 2003b). Outro estudo com extrato, dessa vez etanólico obtido de folhas da espécie também foi avaliado e este apresentou atividade frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (concentração inibitória mínima - CIM= 64µg/mL) e *Escherichia coli* (CIM= 256µg/mL; COSTA et al., 2010).

Outro estudo avaliou a atividade do extrato metanólico de *Z. rhoifolium* em cepas de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*), sendo ativo em todas as cepas testadas com resultados de CIM de 250 µg/mL. Além de extratos, amostras advindas do fracionamento destes foram analisadas, como a fração diclorometano da espécie, que apresentou atividade para micro-organismos gram positivos (*Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus subtilis*) e gram negativos (*Escherichia coli*; ZANON, 2010).

Além desse estudo, outros autores investigaram a atividade da fração diclorometano de *Z. rhoifolium* frente a cepas de *Bacillus subtilis*; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*; *Streptococcus pyogenes*; *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, onde a amostra mostrou-se ativa frente todos os micro-organismos. O autor afirma que essa fração é rica em metabólitos secundários do tipo alcaloide, e também testou os alcaloides isolados desta fração (dihidroceleritrina, dihidroavicina, avicina e cheleritrina), sendo todos ativos frente às cepas testadas (TAVARES et al., 2014).

Além desses alcaloides, alguns outros já foram testados e apresentaram atividade antibacteriana. Como o alcaloide chelitrina, que quando testado em bactérias gram positivas (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*) e gram negativas (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*) também apresentou atividade, sendo esta atividade maior que a do padrão utilizado (cloranfenicol; ZANON, 2010). Em outro estudo que avaliou a atividade antibacteriana de alcaloides constatou-se que os alcaloides 6-acetonildiidronitidina, 6-acetonildiidroavicina e zantoxilina também apresentaram atividade frente a cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *K. pneumoniae*, *Salmonella setubal* e *E. coli* (GONZAGA et al., 2003^b).

Não somente os alcaloides, afirma-se que outras classes de metabólitos secundários presentes em *Z. rhoifolium* também apresentam atividade antibacteriana, como o terpeno lupeol, que apresentou atividade frente a cepas de *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* e *Enterococcus faecalis* (SHAI et al., 2008) e frente a cepa de *Mycobacterium tuberculosis*, com CIM de 62,5µg/mL. Além disso, o terpeno lupenona também apresentou atividade antibacteriana quando testado em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, obtendo CIM de 125µg/mL (PRINCE et al., 2010).

Por fim, quando se avaliou a atividade do óleo volátil obtidos de folhas de *Z. rhoifolium* contra cepas de *Salmonella enteritidis* e *Shigella sonnei* (CIM: 20 e 5 mg/mL, respectivamente; SILVA; FIGUEREDO; YANO, 2006). Diante do exposto, ressalta-se o potencial antibacteriano promissor da espécie *Z. rhoifolium*, com destaque aos seus metabólitos secundários como alcaloides e terpenos. A ação encontrada nos estudos ratifica o uso popular da espécie como antimicrobiano (SILVA; FIGUEREDO; YANO, 2007).

Em um estudo com o extrato clorofórmico/metanólico de *Z. rhoifolium* detectou-se atividade antifúngica máxima contra cepas de *Botrytis cinerea* e *Sclerotinia sclerotiorum* (CAROTENUTO et al., 2015). Além disso, um estudo desenvolvido com o extrato hidroalcoólico de cascas da espécie constatou-se também atividade antifúngica, dessa vez frente a cepas *Candida albicans* (CIM= 31,25µg/mL; MOURA-COSTA et al., 2012).

Metabólitos secundários já foram isolados a partir de técnicas de fracionamento, como os alcaloides advindos da fração diclorometano de *Z.*

rhoifolium: dihidroceleritrina, dihidroavicina, avicina, cheleritrina e nitidina, que foram avaliados frente a cepas de *Candida albicans*, *Sacharomyces cerevisiae* e *Cryptococcus neoformans*, sendo todos os alcaloides ativos em pelo menos uma das cepas testadas. No entanto, o alcaloide cheleritrina apresentou melhor atividade antifúngica (CIM: 3,12; 6,25 e 3,12 µg/mL, respectivamente; TAVARES et al., 2014).

Outro estudo com o alcaloide cheleritrina apresentou atividade contra cepas de leveduras, com CIM de 3,1 µg/mL para *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* e de 6,25 µg/mL para *Sacharomyces cerevisiae* (ZANON, 2010). Além disso, um estudo com o alcaloide dictamina inferiu que em doses de 12 a 200 µg/mL ocorreu uma inibição de forte a completa em *Pyricularia oryzae*, sendo este considerado ativo frente às cepas testadas (YANG; CHEN, 2008).

Não somente os alcaloides, outros metabólitos da espécie já foram descritos para atividade antifúngica, como o terpeno lupeol, que foi ativo frente a cepas de *Sporothrix schenkii*, *Microsporium canis*, *Aspergillus fumigatus*, *C. albicans*, *C. neoformans*, *Candida guilliermondi* e *Candida spicata* (SHAI et al., 2008). Assim como, o terpeno lupenona que apresentou atividade em *Candida tropicalis* (OLIVEIRA-TAVARES et al., 2019).

Além disso, a cumarina 5'-hidroxiaurapteno apresentou atividade frente a cepas de *Cryptococcus neoformans*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* (KURDELAS et al., 2010). Por fim, também já foi testada a atividade antifúngica do óleo volátil de *Z. rhoifolium* e percebeu-se que este inibe o crescimento de *Aspergillus flavus* em uma CIM de 2,5 mg/mL (SILVA; FIGUEREDO; YANO, 2006).

Diante disso, confirma-se o potencial promissor como antifúngico da espécie, com destaque ao alcaloide cheleritrina, sendo o mais promissor nos estudos, além de terpenos e cumarinas, o que ratifica o uso popular da espécie como antimicrobiano (Da SILVA; FIGUEIREDO; YANO, 2007).

Ainda são escassos os estudos para a avaliação da atividade antitumoral de extratos e frações de *Z. rhoifolium*, no entanto, vários estudos avaliaram a atividade de metabólitos presentes na espécie, como o alcaloide norfagaronina, que foi avaliado em linhagem celular MCF-7 e apresentou atividade (CI₅₀ <2,98 µM; RIVAUD, 2012).

O alcaloide nitidina quando testado frente à ação antitumoral apresentou atividade nas seguintes doses: 2,5, 5,0 e 10mg/kg, resultando em uma inibição do volume relativo do tumor de 5,44, 4,75 e 3,75mm³, respectivamente (LIU et al., 2018). Outro estudo com o alcaloide nitidina também resultou em uma inibição da viabilidade celular de carcinoma de mama humano (MDA-MB-231) de 14 e 32% na presença de soro e 20 e 37% na ausência, em 24 e 48h, respectivamente (PAN et al., 2011).

O alcaloide cheleritina também já foi avaliado e apresentou atividade com concentração mínima de atividade (CMA) em linhagem celular de câncer de mama (MCF-7) de 10 e 20µM (ALMEIDA et al., 2017). Além disso, quando testado frente à linhagem celular MDA-MB-231, o alcaloide boconolina apresentou efeito antitumoral (CI₅₀: 7,8µM; BOURNINE et al., 2013).

Os alcaloides benzofenantridínicos: 6-acetonildihidroavicina e boconolina, isolados de *Z. rhoifolium* foram avaliados quanto à atividade antitumoral, onde o alcaloide boconolina apresentou atividade citocida na concentração de 250 µg/mL contra linhagens de células PC0-3 (próstata), 786-0 (rim) e UACC-62 (melanoma); e o alcaloide 6-acetonildihidroavicina apresentou atividade citotóxica na concentração de 250 µg/mL em linhagem OVCAR (ovário), UACC-62 (melanoma), NCI-460 (câncer de pulmão) e NCI-ADR (mama com fenótipo de resistência a múltiplas drogas; WEBER, 2005).

Terpenos também já foram testados frente à atividade antitumoral, como o terpeno lupeol, que foi avaliado em linhagens de tumores e apresentou atividade em todas as linhagens testadas: melanoma metastático humano (CI₅₀= 38µM), melanoma primário humano (CI₅₀= 32µM; SALEEM et al., 2008), adenocarcinoma pancreático humano (CI₅₀= 35µM; SALEEM et al., 2005b) e duas linhagens de câncer prostático humano (CI₅₀= 75µM e 18,5µM; SALEEM et al., 2005a). Além disso, o terpeno lupeol já apresentou atividade de redução da angiogênese em células endoteliais venosas umbilicais humanas (HUVEC), com uma inibição superior a 80% na maior dose testada (50mg/kg; YOU et al., 2003).

Após o exposto, destaca-se a espécie *Z. rhoifolium* como uma possível candidata ao desenvolvimento de fármacos antitumorais, principalmente em virtude de metabólitos secundários como alcaloides e terpenos, que já demonstraram potencial promissor. O que ressalta a importância de estudos da

atividade antitumoral da espécie, principalmente em tumores de mama e próstata.

Foi realizado teste *in vitro* com o extrato aquoso das folhas de *Z. rhoifolium* frente a *Haemonchus spp.*, *Oesophagostomum spp.* e *Trichostrongylus spp.*, onde detectou-se atividade anti-helmíntica com redução do número de larvas de nematoides gastrintestinais ($p < 0,05$) nas quatro maiores concentrações testadas, de 335 a 193,7 mg/mL, com o percentual de redução do número de larvas superior a 95% (PENELUC et al., 2009). Os resultados encontrados nesse estudo destacam o potencial promissor da espécie, sendo necessários estudos complementares que investiguem qual metabólito secundário é responsável pela ação.

Um estudo avaliou a atividade antimalárica do extrato aquoso da casca de *Z. rhoifolium* em clones de *Plasmodium falciparum* resistentes a cloroquina (FCB1 e W2), no qual o extrato foi considerado ativo no FCB1 (concentração inibitória a 50% - CI_{50} = 15,3 μ g/mL e 3,3 μ g/mL) em diferentes testes: indução de lactato desidrogenase (LDH) e medição de hipoxantina ([³H] hipoxantina), respectivamente (JULLIAN et al., 2006). Outro estudo com extrato da espécie mostrou que com a dose de 715mg/kg houve uma redução de 78% de parasitemia em camundongos infectados com *Plasmodium yoeli* que foram tratados por 4 dias, sendo este extrato considerado ativo (BERTANI et al., 2005).

Alcaloides isolados da espécie também já apresentaram atividade antimalárica em cepas resistentes à cloroquina, como o alcaloide avicina (FcB1- CI_{50} - LDH= 11,7 μ g/mL; CI_{50} -[³H]-hipoxantina= 4,3 μ g/mL), fagaridina (FcB1- CI_{50} - LDH= 13,6 μ g/mL) e o alcaloide nitidina (FcB1- CI_{50} - LDH= 1,8 μ g/mL; CI_{50} -[³H]-hipoxantina < 0,1 μ g/mL; JULLIAN et al., 2006).

O alcaloide nitidina também já foi avaliado por outros autores quanto sua atividade antimalárica, como no estudo que avaliou o alcaloide nitidina frente a diferentes clones de *P. falciparum* (sensíveis e resistentes à cloroquina), onde este apresentou novamente atividade (CI_{50} - F-32= 0.52 \pm 0.1 μ g/mL; FcM29= 0.49 \pm 0.1 μ g/mL; FcB1= 0.80 \pm 0.28 μ g/mL), sendo considerado promissor para esta atividade (BOUQUET et al., 2012). Além disso, o alcaloide norfagaronina, isolado de *Z. rhoifolium*, também foi ativo frente ao clone FcB1 (CI_{50} = 11,6 μ M; RIVAUD, 2012).

Os terpenos também já foram descritos com atividade antimalárica, como o terpeno lupeol, que foi testado frente a cepas de *Plasmodium falciparum* sensíveis (CI₅₀= 11,8µg/mL; ZIEGLER; STAALSØ; JAROSZEWSKI, 2006) e resistentes à cloroquina (CI₅₀ ≥20µg/mL; SUKSAMRARN; TANACHATCHAIRATANA; KANOKMEDHAKUL, 2003), e apresentou atividade, sendo a atividade mais promissora frente a cepas sensíveis à cloroquina. As cumarinas também já apresentaram efeito antimalárico, como a isopimpinellina, que apresentou CI₅₀ de 7 e 6µg/mL frente a cepas de *Plasmodium falciparum* de diferentes sensibilidades (NYAHANGA et al., 2013).

Além de todos os usos cientificamente comprovados, a espécie também apresenta potencial promissor como antimalárico, provavelmente em virtude de alcaloides e terpenos em sua composição. Tais achados ratificam as propriedades medicinais populares já descritas para a espécie no tratamento de malária e febre (LEM´EE, 1956; CRUZ, 1995; VIGNERON et al., 2005).

2.1.1. ATIVIDADES ANTILEISHMANIA, CICATRIZANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DO GÊNERO ZANTHOXYLUM

Estudo avaliou *in vitro* a atividade antileishmania do extrato etanólico obtido da casca de *Z. rhoifolium* frente a macrófagos infectados com promastigotas de *Leishmania amazonensis*, e este apresentou atividade em todas as horas de análise (24, 48 e 72h), sendo a melhor atividade em 72h (CI₅₀: 9,57 µg/mL). Além disso, obteve um índice de seletividade (IS) superior a 10, sendo considerado mais seletivo para o parasito do que para a linhagem celular normal (IS >24,37; MELO-NETO et al., 2016).

Além disso, outro extrato obtido da espécie foi testado frente à ação antileishmania, como o extrato hidroalcoólico de folhas de *Z. rhoifolium*, que apresentou atividade moderada frente a cepas de *Leishmania amazonensis* (CI₅₀: 143µg/mL ± 25; MOURA-COSTA et al., 2012). Amostras advindas de fracionamento também foram testadas, como a fração hexânica da espécie, que apresentou atividade *in vitro* frente a macrófagos infectados com promastigotas de *Leishmania amazonensis* em todas as horas analisadas (24, 48 e 72h), sendo

mais promissora em 72h (CI₅₀: 7,96µg/mL) e apresentou IS >29,28 (MELO-NETO et al., 2016).

A atividade antileishmania foi mais promissora após fracionamento do extrato em fração hexânica. Dessa fração, foi isolado o terpeno lupeol que também apresentou potencial promissor frente a promastigotas de *L. amazonensis* (IC₅₀: 13,61 µg/mL em 72h), o que sugere o terpeno lupeol como um biomarcador biologicamente ativo da espécie, bem como que a melhor ação da fração hexânica possivelmente pode estar relacionada a este metabólito secundário (MELO-NETO et al., 2016).

Alguns estudos avaliaram o potencial cicatrizante de outras espécies pertencentes ao mesmo gênero. Em um estudo com indução de queimaduras em ratos, constatou-se que no grupo tratado de forma tópica com óleo da semente de *Z. bungeanum* nas duas concentrações (500 e 1000 µL/ferida) houve aumento da proporção da cicatrização das feridas nos dias 7, 14, 21 e 31 após o ferimento, em comparação ao grupo controle, e o efeito foi considerado dose-dependente. Além disso, houve redução do edema no dia 14 de tratamento em relação ao grupo controle (LI et al., 2017).

O óleo da semente de *Z. bungeanum* na concentração de 1000 µL/ferida também reduziu significativamente o tempo de desincrustação da ferida (16,9%) e o tempo de fechamento completo (10,7%), sendo o tempo de desincrustação menor que no controle positivo (LI et al., 2017). Neste estudo também foi concluído que na análise de quantificação densitométrica houve aumento significativo da expressão da proteína do colágeno tipo III nas feridas e que esses efeitos de aprimoramento atingiram o pico no dia 14 ao serem tratados com o óleo da semente de *Z. bungeanum* nas concentrações de 500 e 1000 µL (LI et al., 2017). Apesar do estudo fazer referência a outra espécie, ressalta-se que a espécie *Z. rhoifolium* possui alegações populares de uso para propriedades cicatrizantes e em queimaduras (LI et al., 2017; RIBEIRO et al., 2017), o que justifica a investigação do potencial cicatrizante da espécie.

A atividade anti-inflamatória já foi investigada em alguns estudos, como no ensaio *in vivo* com ratos, em que o soro de animais foi coletado em diferentes dias após tratamento com o óleo de *Z. bungeanum* (7, 14 e 21 dias) e então quantificados os marcadores inflamatórios TNF-α, IL-6 e IL-1 β por ELISA. Nesse estudo, constatou-se que os marcadores estavam reduzidos significativamente

nos grupos tratados em comparação ao grupo controle, nos diferentes dias de exposição, bem como que a ação encontrada foi considerada dose-dependente, obtendo a melhor resposta na maior dose testada (1000 µL), o que sugere ação pró-inflamatória da amostra em análise (LI et al., 2017).

Além disso, alcaloides já isolados da espécie *Z. rhoifolium*, como os alcaloides roifolina B, nitidina e decarina já apresentaram ação anti-inflamatória, atuando como antioxidante através da inibição da produção de óxido nítrico (NO). Desses, o alcaloide decarina foi considerado o composto mais promissor (CI₅₀: 48,43µM e inibição de 51%; ZHANG et al., 2017).

Apesar das atividades já constatadas para esta espécie, estudos fitoquímicos e que avaliem a atividade leishmanicida correlacionada à propriedade cicatrizante de *Zanthoxylum rhoifolium* são escassos, o que enfatiza a importância do presente estudo.

2.2. Leishmaniose

A leishmaniose tegumentar se caracteriza por feridas na pele, em especial, nas partes descobertas do corpo e tardiamente, nas mucosas do nariz, da boca e da garganta. Nas Américas, são atualmente reconhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana e oito espécies descritas somente em animais. No entanto, no Brasil já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2007).

A doença é transmitida pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas. Os flebotomíneos são infectados pela ingestão de células infectadas durante o repasto sanguíneo. Os flebotomíneos infectados injetam as formas infecciosas (promastigotas) presentes em sua probóscide durante o repasto sanguíneo. As promastigotas que atingem a ferida de punção são fagocitadas por macrófagos e outros tipos de células fagocíticas mononucleares. No interior das células, as

formas promastigotas se transformam no estágio do tecido do parasita (isto é, amastigotas), que se multiplicam por simples divisão e prosseguem para infectar outras células fagocíticas mononucleares. Nos flebotomíneos, as formas amastigotas se transformam em promastigotas no intestino do inseto (no intestino posterior para a *Leishmania* do subgênero Viannia; no intestino médio para organismos do subgênero Leishmania) e migram para a probóscide do inseto, onde infectarão outro mamífero (Figura 4, CDC, 2018). Características do parasito, hospedeiro e outros fatores influenciam se a infecção pode se tornar sintomática e se a leishmaniose é cutânea/tegumentar ou visceral.

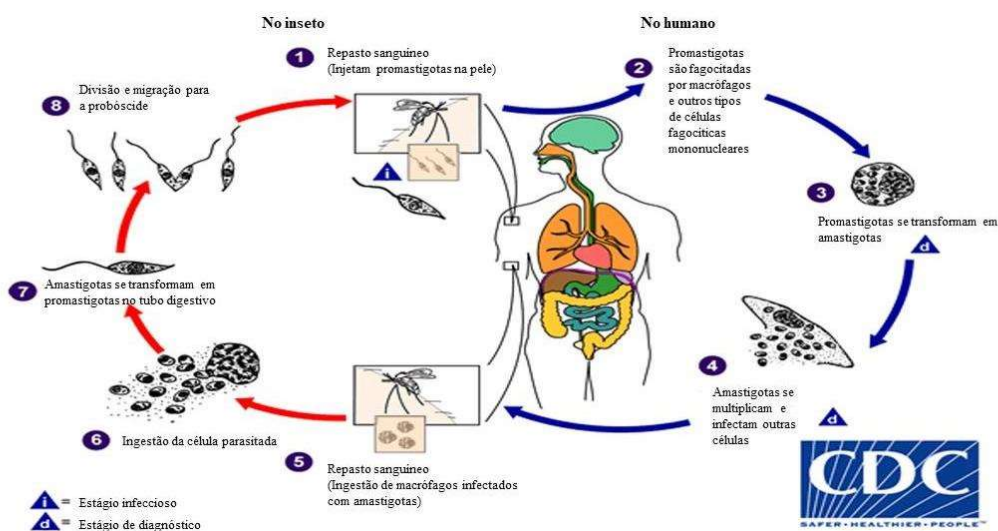


Figura 4 - Ciclo de vida do parasito *Leishmania* spp.

Fonte: Adaptado de CDC, 2018.

O tratamento da LTA na maioria dos casos é capaz de obter a cura da doença, evitando recidivas e evolução para as formas mucocutâneas, que leva a lesões mutilantes (GONTIJO; MELO, 2004). Os fármacos mais comumente utilizados no tratamento da leishmaniose cutânea e mucosa são os antimoniais pentavalentes, em duas formulações distintas: antimoniato N-metilglucamina e estibogluconato de sódio (Figura 5). Fármacos como isetionato de pentamidina, miltefosina, anfotericina B e anfotericina B lipossomal são outras opções terapêuticas (PAHO, 2018).

Os antimoniais pentavalentes são utilizados há mais de 60 anos, apresentam boa eficácia, embora a ocorrência de efeitos adversos e a via parenteral dificulte seu uso (BRASIL, 2006). Os efeitos adversos clínicos frequentemente relatados na literatura são dor músculo-esquelética, náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, dor de cabeça, anorexia, astenia, fadiga, febre, exantema, eritema e urticária. As anormalidades eletrocardiográficas mais citadas são prolongamento do intervalo QTc e distúrbios de repolarização ventricular (OLIVEIRA et al., 2011).

Não há mecanismo de ação esclarecido para os antimoniais pentavalentes. Porém, há evidências que o antimônio trivalente tem maior atividade leishmanicida, sugerindo que o antimônio pentavalente age como pró-fármaco, que é convertido em trivalente no interior dos macrófagos, interferindo na atividade glicolítica e via oxidativa dos ácidos graxos do parasito, levando à depleção do ATP intracelular. Outra possibilidade, é a substituição do zinco de uma metaloprotease zinco dependente pelo antimônio, levando à inativação desta enzima, que é essencial para as formas amastigotas (RATH et al., 2003; HALDAR; SEM; ROY, 2011).

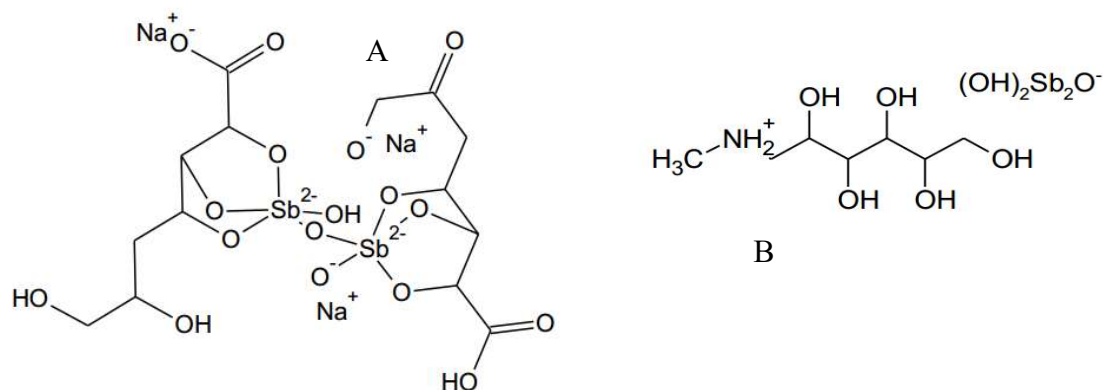


Figura 5 - Estrutura química do Estibogluconato de sódio (A) e Antimoniato N-metilglucamina (B).

A anfotericina B (Figura 6) é o fármaco leishmanicida mais eficaz, relacionada com os maiores níveis de cura, contudo, seus efeitos adversos e a longa duração do tratamento, com necessidade de internação, a mantém como

tratamento de segunda escolha, reservado a casos graves ou de falha terapêutica do tratamento de primeira escolha (BRASIL, 2006; BRASIL, 2010). Trata-se de um produto natural, isolado pela primeira vez em 1955, a partir de culturas de *Streptomyces nodosus* (LEMKE; KIDERLEN; KAYSER, 2005). É um fármaco desagradável, devido à sua toxicidade, principalmente renal e à necessidade de administração parenteral por infusão lenta ao longo de quatro horas (CROFT; COOMBS, 2003). Apesar das formulações lipossomais reduzirem estes efeitos (ANTONIADOU; DUPONT, 2005), o fármaco apresenta elevado custo, o que também limita sua aplicação.

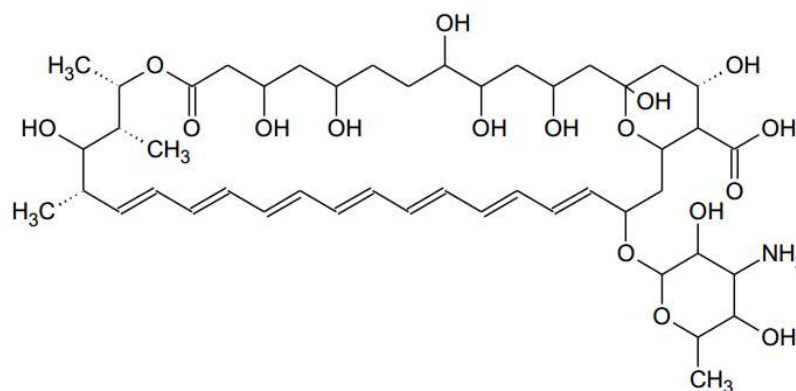


Figura 6 - Estrutura química da Anfotericina B.

O tratamento utilizado para leishmaniose possui elevada toxicidade, causando reações adversas (PELISSARI et al., 2011), via de administração parenteral (intramuscular ou endovenosa) geralmente dolorosa e desconfortável e, ainda, o tratamento com anfotericina B requer hospitalização (BRAGA et al., 2007) dificultam a adesão ao tratamento medicamentoso.

2.3. Origem e cicatrização de feridas

A pele é o maior órgão do corpo humano, protegendo contra atrito, patógenos, perda excessiva de água e atua em sua termorregulação

(BOGLIOLO, 2011). Quando ocorre uma modificação na estrutura da derme, epiderme ou tecido subcutâneo, considera-se uma ferida ou lesão que pode ser aguda ou crônica (BOGLIOLO, 2011; VANWIJCK, 2001). As feridas agudas podem ser causadas por fatores externos, como traumas físicos, químicos ou biológicos, e se não tratadas corretamente podem evoluir para crônicas. As feridas crônicas possuem o tempo de cicatrização maior que o esperado e são provenientes de fatores internos, como infecções, doenças metabólicas, vasculares ou por falta de cuidados corretos, o que ocasiona exposição a organismos externos que resultam nas complicações da cicatrização (VANWIJCK, 2001). Uma ferida de difícil cicatrização pode ter sua origem na infecção pelo parasito da leishmaniose (SCOTT; NOVAIS, 2016), o que pode agravar o estado do paciente.

As feridas ainda são classificadas em traumáticas, cirúrgicas e ulcerativas (CANTÃO et al., 2020). As feridas traumáticas podem ser causadas por: corte ou incisão; laceração, escoriação, perfuração, contusa, agentes externos (queimaduras, úlceras por pressão, por agentes químicos e físicos como o frio, calor ou radiação, entre outras; BOGLIOLO, 2011). Enquanto que, as feridas cirúrgicas podem ser ocasionadas de forma premeditada, com objetivo de algum tratamento específico, asséptica, ou seja, livre de contaminação. Fatores locais e sistêmicos (como doenças pré-existentes) influenciam no desenvolvimento da lesão e feridas patológicas (BOGLIOLO, 2011). Além disso, as feridas podem ser classificadas como: limpa, limpa-contaminada, contaminada e infectada (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

O processo de cicatrização de feridas envolve a interação entre células e vários sistemas mensageiros, sendo dividido em 3 fases: inflamatória, proliferativa e de remodelação (VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009). A fase inflamatória é caracterizada por fenômenos vasculares, hemostase e coagulação, e mecanismos predominantemente celulares (LAUREANO; RODRIGUES, 2011). Ainda, nesta etapa ocorre o influxo local de leucócitos, numa fase precoce com predomínio de neutrófilos e monócitos e, posteriormente, com declínio no número de neutrófilos e predomínio de macrófagos (NWOMEH; YAGER, 1998) e envolve diferentes mediadores químicos, tais como fatores de crescimento: epidérmico; dos fibroblastos; dos queratinócitos; derivado das plaquetas; de transformação- α ; de transformação-

β ; de necrose tumoral- α e do endotélio vascular (LAUREANO; RODRIGUES, 2011). Nesta fase ocorre a liberação de tromboxana A2 e prostaglandinas e a migração de macrófagos para o local da lesão e proliferação de fibroblastos tem papel fundamental no término do desbridamento iniciado pelos neutrófilos e contribui para a secreção de citocinas e fatores de crescimento, na angiogênese, fibroplasia e síntese de matriz extracelular (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006), que são essenciais para a transição para a fase proliferativa (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

A fase proliferativa precoce é da epitelização, sendo que nesta etapa as células epiteliais migram em direção superior sendo restauradas as camadas normais da epiderme ou as células epiteliais das bordas da ferida começam a proliferar para restabelecer a barreira protetora (LAWRENCE; DIEGELMANN, 1994). Na etapa seguinte, a angiogênese é estimulada pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e é caracterizada pela migração de células endoteliais e formação de capilares (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

A fase final proliferativa é a formação de tecido de granulação, havendo a migração de fibroblastos para a ferida, sendo ativados por fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF; BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006), seguida da liberação do TGF- β , que estimula a produção de colágeno tipo I e a transformarem-se em miofibroblastos, que promovem a contração da ferida (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

A última etapa da cicatrização é a fase de maturação ou remodelamento, que envolve deposição de colágeno de maneira organizada, sendo produzido inicialmente é mais fino do que o colágeno presente na pele normal, e com o passar do tempo, o colágeno inicial (colágeno tipo III) é reabsorvido e um colágeno mais espesso é produzido e organizado ao longo das linhas de tensão. Fibroblastos e leucócitos secretam colagenases, estas são responsáveis pela lise da matriz antiga e o sucesso da cicatrização envolve equilíbrio entre a síntese da nova matriz e a lise da matriz antiga (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

Para o tratamento das feridas podem ser utilizados as seguintes classes de fármacos: queratolíticos, isto é, substâncias que estimulam a renovação celular, desobstruem os folículos sebáceos, dissolvem as formações queratínicas da pele, favorecendo o desaparecimento de cicatrizes (LEITE,

2018); queratoplásticos, que contribuem para a regeneração do estrato córneo por meio do aumento da queratinização local; revulsivos atuam com objetivo de provocar uma irritação na pele para gerar um aumento do fluxo sanguíneo dos tecidos adjacentes; rubefaciente causam somente hiperemia no local da aplicação (LOURENÇO, 2013); antissépticos são usados na limpeza e assepsia da lesão (DANTAS et al., 2013; SANTOS et al., 2016); antimicrobianos, são utilizados para controle de contaminação e eliminação de bactérias, reduzindo assim, as taxas mundiais de morbidade e mortalidade (COSTA; SILVA-JUNIOR, 2017).

De acordo com Wannmacher (2006):

“Antimicrobianos tópicos são usados em tratamento de infecções de tecidos moles superficiais (acne, piodermite, celulite, eritasma, rosácea), prevenção de infecções em queimaduras, ferida operatória e aquelas relacionadas a cateter e de infecções recorrentes de pele e tecidos moles, bem como para erradicar o estado de portador nasal de *Staphylococcus aureus*. Entretanto, sempre têm pairado dúvidas sobre sua real eficácia e o potencial de risco”.

O uso de antissépticos em feridas pode ser tóxico para as células epiteliais, provocando atraso do processo cicatricial, sendo que estas substâncias atuam nas atividades celulares (mitogênese); na própria viabilidade dos fibroblastos e queratinócitos; nas atividades imunológicas, interferindo na atividade funcional dos neutrófilos (COOPER; LAXER; HANSBROUGH, 1991; RODEHEAVER, 1994; SIBBALD et al., 2000). Mediante estas questões, ainda é importante a busca de alternativas terapêuticas para o tratamento de feridas ocasionadas pela *Leishmania* e não ocasionadas pelo parasito que apresente baixa toxicidade e contribua para o processo de cicatrização.

2.4. Alcaloides e atividades cicatrizante e antileishmania

Diferentes classes de alcaloides e extratos alcaloídicos já foram avaliados para a atividade cicatrizante e/ou antileishmania.

Alcaloides ácidos e básicos (AAO e BAO) de partes aéreas de *Evolvulus alsinoides* e o alcaloide betaína (BEO) foram avaliados através de modelos de

excisão (14 dias) e incisão (10 dias) em ratos. AAO e BAO promoveram significativa atividade de cicatrização de feridas em ambos os modelos. A taxa mais alta de contração da ferida com aumento significativo no conteúdo de proteína nos grupos de tratamento estimulou a proliferação celular e epitelização. A regeneração dérmica e epidérmica precoce em grupos tratados confirmou o efeito positivo (MAHIBALAN et al., 2016).

Os mecanismos de efeitos regenerativos (cicatrização de feridas) de songorina, associados com ativação funcional de células progenitoras mesenquimais, foi avaliado. O papel principal dos receptores FGF sobre essas células progenitoras na estimulação da realização de seu potencial de crescimento sob o efeito do alcaloide foi demonstrado. Em condições *in vitro*, os anticorpos para o receptor de FGF reverteu o aumento induzido por songorina no número de fibroblastos e unidades formadoras de colônias em culturas de células de medula óssea. A intensidade de diferenciação dos precursores mesenquimais permaneceu inalterada. Estas descobertas sugerem que o papel fundamental na transdução do sinal estimulador de songorine para células progenitoras mesenquimais que determinam sua ação regenerativa são desempenhadas pelos receptores de FGF (ZYUZ'KOV et al., 2014). Ao mesmo tempo, mudanças idênticas nas funções de elementos progenitores causados pelo alcaloide estudado e FGF, um fator regulador pleiotrópico (POWERS; MCLESKEY; WELLSTEIN, 2000; ESWARAKUMAR; LAX; SCHLESSINGER, 2005), bem como a estimulação mais pronunciada da diferenciação do precursor indicam possível envolvimento de outros mecanismos para melhorar a realização do potencial de crescimento das células progenitoras durante o tratamento com songorina, em primeiro lugar, mecanismos mediados por elementos celulares do microambiente do tecido (ZYUZ'KOV et al., 2012; DYGAI et al., 2013).

A cafeína pode atuar como antagonista do receptor de adenosina e ativação deste pode promover a cicatrização de feridas. Para investigar os efeitos da cafeína nos processos envolvidos na epitelização, foram utilizados queratinócitos humanos primários (HaCaT), sendo avaliados os efeitos na proliferação, diferenciação, adesão e migração celular. A cafeína restringiu a proliferação celular de queratinócitos de uma maneira dependente da concentração, retardou a migração celular. A adesão e a diferenciação

permaneceram inalteradas em culturas de monocamada tratadas com várias doses de cafeína. Usando um modelo humano de feridas *ex vivo*, a aplicação tópica de cafeína impediu a epitelização. Em síntese, a cafeína impede a proliferação e migração dos queratinócitos, sugerindo que ela pode ter um efeito inibitório na cicatrização e epitelização de feridas (OJEH et al., 2014).

Além disso, o alcaloide mahanimbicina, isolado de *Murraya koenigii*, apresentou atividade cicatrizante promissora, onde após o 8º dia de ferimento em animais exibiu contração da ferida de 27%, sendo este valor superior ao encontrado para o grupo controle e para o grupo tratado com o controle positivo (15,9 e 20,5%, respectivamente; NAGAPPAN et al., 2012). Os alcaloides isolados da espécie *Z. rhoifolium* já relatados na literatura, até o momento não foram analisados quanto sua propriedade cicatrizante, ressaltando a importância do presente estudo.

Quanto à atividade em leishmania, o extrato de *Galipea longiflora*, *Angostura longiflora* (Krause) Kallunki já apresentou atividade antileishmania. O extrato de alcaloide (EA) matou o parasito na concentração de 10 µg/mL, porém não alterou a viabilidade e proliferação de células eucarióticas. Este foi mais ativo do que a 2-fenilquinolina, alcaloide majoritário do EA. O EA não estimulou células B ou T ou macrófagos J774, no entanto, interferiu na ativação de células T de camundongos e humanos, levou a redução de proliferação celular *in vitro* e produção de interferon-gama (IFN- γ). Estes efeitos foram mais evidentes quando as células foram pré-tratadas com AEE e subsequentemente estimuladas com os ativadores de células T policlonais, concanavalina A e anti-CD3. Em síntese, esta espécie tem efeito leishmanicida direto e, devido ao efeito na produção de IFN- γ , pode contribuir para o controle da reação inflamatória crônica relacionada à infecção por *Leishmania* (CALLA-MAGARINOS et al., 2009).

O alcaloide indólico flavopereirina se mostrou ativo frente a formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* em 24 e 72h (CI₅₀: 0,23 e 0,15 µg/mL, respectivamente) e com elevada seletividade (IS: 976,2 e 4993,2, respectivamente), ressaltando-se que tal ação pode ser justificada pelo fato do alcaloide flavopereirina possivelmente inibir a oligopeptidase B por ligação direta com o resíduo Tyr-499, sendo este um possível mecanismo de ação da molécula (SILVA e SILVA et al., 2019).

Analisou-se a atividade antileishmania de alguns alcaloides presentes no gênero *Zanthoxylum*. Em um estudo foi avaliada a atividade em amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis* (AA) e amastigotas intramacrofágicas de *L. amazonensis* (IM) de alcaloides isolados de *Z. rhoifolium*, onde infere-se que possivelmente os alcaloides fagaronina (CI₅₀- AA= 10,0 ± 0,4µg/mL; IM- 41,3 ± 6,7µg/mL), avicina (CI₅₀- AA >13,6 µg/mL; IM- 35,2 ± 5,5 µg/mL) e fagaridina (CI₅₀- AA >13,6 µg/mL; IM- 41,3 ± 6,7µg/mL) possuam atividade moderada em culturas de amastigotas axênicas e intramacrofágicas; já os alcaloides cheleritrina (CI₅₀- AA= 0,5 µg/mL; IM- 84,4 ± 0,3 µg/mL) e nitidina (CI₅₀- AA= 1,6 ± 0,8 µg/mL; IM- 77,3 ± 3,9 µg/mL) apresentaram menor atividade em culturas de macrófagos infectados com a forma amastigota, no entanto, foram considerados ativos em culturas axênicas da forma amastigota, sendo o alcaloide cheleritrina mais ativo (CASTILLO et al., 2014). A melhor ação da cheleritrina possivelmente está relacionada à inibição da proteína quinase C (PKC), podendo induzir apoptose (FUNAKOSHI et al., 2011; ZHANG et al., 2011).

Além disso, o alcaloide buesgenina, isolado de *Z. buesgenii*, apresentou atividade frente a formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* (CI₅₀: 5,70 ± 0,41 µg/mL; SANDJO et al., 2016). Bem como o alcaloide γ-fagarina, isolado da espécie *Z. tingoassuiba*, que obteve atividade frente a promastigotas de *L. amazonensis* (CI₅₀: 31,3 ± 1,4 µM; COSTA et al., 2018).

No entanto, estudos que correlacionem a atividade antileishmania e cicatrizante da espécie *Z. rhoifolium* são escassos, justificando a realização do presente estudo.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Verificar o potencial leishmanicida e cicatrizante da casca do caule de *Z. rhoifolium*.

3.2. Objetivos específicos

Realizar estudos químicos de *Z. rhoifolium*;

Estudar a atividade antileishmania das amostras;

Determinar a citotoxicidade e seletividade da espécie;

Avaliar a atividade proliferativa e cicatrizante de extrato e frações desta espécie.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. EQUIPAMENTOS

- Autoclave 75L - Phoenix;
- Banho-maria, modelo SL 150 - SOLABCientífica;
- Banho de ultrassom, modelo 2210 Brason - Tecnal Equipamentos para laboratório;
- Balança Analítica shimadzu - modelo AUY220;
- Bomba de vácuo - Fabbe;
- Câmara de contagem de Neubauer espelhada - Improved;
- Centrífuga refrigerada, modelo CT-600R - Cientec Equipamentos para Laboratório;
- Capela de exaustão SP Labor;
- Capela de fluxo laminar Veco, mod. VLFS-12;
- Contador manual de células -DIGETIMER;
- Espectômetro de massas MAXIS 3G – Bruker Daltonics;
- Cromatógrafo da linha Alliance e2695 (Waters), com um sistema de bomba binário e injetor automático acoplado a um detector de UV/Vis com arranjo de diodo abrangendo a faixa de comprimento de onda de 210 - 600 nm;
- Coluna de fase reversa Sunfise C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m);
- Coluna: Supelco Ascentis C18 (250x4.6 mm, 5 μ m);
- Dessecador de vidro;
- Destilador de água;
- Equipamento de Fluxo Unidirecional, modelo CFLV 12 - GrupoVeco;
- Estufa BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio), modelo HF212 UV - Byosistens com Importadora e Exportadora de Equipamentos para Laboratório LTDA;

- Estufa ventilada para secagem de material vegetal Fanem, mod. 501^a;
- Evaporador rotatório fisaton, modelo R 803, com banho-maria modelo 558;
- Estufa, modelo Md 12 – Medicate Produtos Médicos;
- Incubadora CO₂, modelo series 8000WJ - Thermoscientific;
- Micropipetas com volume ajustável de 10-100 µL e de 100-1000 µL - Paguepet;
- Microscópio Óptico, modelo E200-NIKON - Eclipse;
- Microscópio Zeiss;
- Microscópio time-lapse com uma câmera de dispositivo de carga acoplada (AxioCam mrm, Zeiss, Göttingen, Alemanha) anexado a um microscópio invertido (Axio Observer Z1, Zeiss, Göttingen, Alemanha);
- Sistema de Filtração a vácuo 250 mL, membrana 0,22 µm - TPP – Switzerland;
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker 400 MHz (modelo Ascend 400);
- Leitor de multiplacas (espectrofotômetro 490 e 560nm).

4.1.2. SOLVENTES, FASES ESTACIONÁRIAS E DEMAIS REAGENTES

- Acetato de etila PA (Labsynth[®]);
- Acetonitrila grau CLAE (Tedia Company[®]);
- Água destilada;
- Água ultrapura;
- Dimetilsulfóxido PA (Dinâmica[®]);
- Diclorometano PA (Labsynth[®]);
- Etanol 96% (Souza Cruz[®]);
- Metanol PA (Labsynth[®]);
- Metanol grau CLAE (Tedia Company[®]);
- Hexano PA (Labsynth[®]);
- Gel de sílica Sigma 230x400 mesh, 40-63 µm;
- Gel de sílica para cromatografia em coluna fina - Macherey-Nagel;
- HCl a 10% (Labsynth[®]);

- Hidróxido de amônio concentrado (Dinâmica®).

4.1.3. MATERIAL PLÁSTICO, METAL E VIDRARIAS

- Balões de fundo redondo de 100, 250 e 500 mL;
- Bastão de vidro;
- Béqueres de 10, 50, 100, 500 e 1000 mL;
- Coluna cromatográfica iide vidro 100 x 2,5 cm;
- Cubas cromatográficas;
- Garrafas de cultura de células 75cm² - TPP - Switzerland;
- Garrafas de cultura de células 25cm² - SPL Life Sciences;
- Membranas filtrantes de nylon com poros de 0,45 µm, da marca Millipore (Tullagreen, Carrigtwohill, Irlanda);
- Placas de cultura de células de 24 poços - TPP;
- Placas de cultura de células de 96 poços - TPP;
- Ponteira 200 µL amarela, tipo universal - Labware Manufacturing CO;
- Ponteira 100-1000 µL, azul, tipo universal - Kartell S.P.A.;
- Placa Petri - 55mm de diâmetro;
- Erlenmeyers de 50, 100, 250 e 500 mL;
- Espátulas de metal;
- Tubo para microcentrifuga de fundo cônico, Sigma Chemical Company;
- Frascos de penicilina 50 mL;
- Funis de separação de 250 mL e 1000 mL;
- Folha de alumínio comercial;
- Papel de filtro MN 618;
- Pinça;
- Pipetas graduadas de 1, 5 e 10 mL;
- Pipetas Pasteur de vidro e plástico;
- Pipetas de 10 a 1000µL e de 20 a 200µL;
- Placas cromatográficas de vidro 10 x 5 e 10 x 10cm;
- Provetas 5, 20, 50, 100, 500 e 1000 mL;
- Tubos de fundo cônico 15 e 50 mL;
- Tubos vial para CLAE.

4.1.4. MEIO DE CULTURA E OUTROS

- Eagle modificado por Dulbecco (DMEM);
- Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640);
- Hepes - SigmaAldrich;
- Meios de Cultivo Completo;
- SRB Sigma Aldrich;
- Penicilina/streptomicina (Gibco);
- Soro bovino Fetal - Gibco;
- Tripsina - EDTA (1x) - Gibco;
- Ácido tricloroacético a 10%;
- Ácido acético concentrado e a 1%;
- Glicose (Gibco);
- MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium);
- Corante Giemsa;
- Subnitrato de bismuto;
- Iodeto de potássio;
- Ácido acético glacial.

4.1.5. REVELADORES UTILIZADOS NA CROMATOLOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) PARA A DETECÇÃO DE ALCALOIDES

4.1.5.1 Reagente de Dragendorff

Para a análise em cromatografia em camada delgada foi utilizada a seguinte mistura: solução A obtida pela solubilização de 0,850g de subnitrato de bismuto ($\text{BiONO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) em 10mL de ácido acético e 40mL de água destilada; e solução B obtida pela dissolução de 8g de iodeto de potássio (KI) em 20mL de água destilada. As duas soluções foram homogeneizadas (1:1), resultando em

uma solução estoque. Para pulverização nas placas cromatográficas, diluiu-se 2mL de solução estoque em 4mL de ácido acético glacial e 20mL de água destilada (WAGNER et al., 1984).

4.1.6. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

No presente estudo foram utilizadas cascas da espécie vegetal *Zanthoxylum rhoifolium*. O material foi coletado e identificado pela Dra. Márlia R. F. Coelho (Museu Paraense Emílio Goeldi) e sua exsicata está depositada no Herbário João Murça do referido Museu, com o número de identificação (MG 224385).

4.1.7. MATERIAL BIOLÓGICO

Os parasitos utilizados no presente estudo são as formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, isoladas de caso humano procedente do município de Ulianópolis do estado de Pará, cedido pelo Instituto Evandro Chagas (IEC, Ananindeua/Pará) sob o registro - MHOM/BR/2009/M26361.

As células utilizadas no ensaio de citotoxicidade são da linhagem VERO (Rim de Macaco Verde Africano *Cercopithecus aethiops*) cedidas pelo Laboratório de Citogenética Humana (LCH) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará - UFPA, e da linhagem J774 (macrófagos de camundongos da linhagem BALB/c) cedidas pela Fiocruz - Rio de Janeiro.

As células utilizadas para o ensaio da atividade anti-mastigota são da linhagem RAW 264.7 (macrófagos de camundongos leucêmicos) cedidas pela Fiocruz - Rio de Janeiro.

As células utilizadas para o ensaio de proliferação celular são da linhagem HaCaT (queratinócitos humanos normais) e fibroblastos primários normais; as células utilizadas no ensaio de cicatrização são da linhagem HaCaT. Ambas

cedidas pelo Laboratório de Migração celular (Lamoc) do departamento de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS.

4.2. Métodos

4.2.1. PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL E ESTUDOS QUÍMICOS

A casca do material vegetal foi lavada em água corrente e higienizadas com álcool 70° GL. A secagem foi realizada em estufa de ar circulado a 40°C por 7 dias. Após seco, o material vegetal foi levado para moagem em moinho de facas até a sua pulverização.

O pó das cascas (600g) de *Z. rhoifolium* foi submetido à maceração exaustiva com etanol 96 °GL (proporção 1:10), em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A solução etanólica foi filtrada e concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida, até obtenção de resíduo, obtendo-se o extrato etanólico (EE) de *Z. rhoifolium*.

O fracionamento do EE foi realizado obtendo-se as frações de neutros (FN) e alcaloídica (FA) através da partição ácido-base. Para tal, 10g do extrato etanólico foi solubilizado em etanol (8 mL), seguida da adição de solução aquosa de ácido clorídrico (HCl) a 10% (v/v) até atingir pH 3,0. Esta fase aquosa ácida foi extraída com diclorometano, obtendo-se a fração de neutros (FN) e uma camada aquosa ácida. Posteriormente, a camada aquosa ácida foi alcalinizada com solução de hidróxido de amônio (NH₄OH) em volume suficiente para atingir o pH=10. Por fim, a camada aquosa foi extraída com diclorometano e concentrada em evaporador rotatório obtendo-se assim, a fração de alcaloides (FA).

As amostras foram caracterizadas por métodos cromatográficos de cromatografia em camada delgada (CCD) para a identificação de alcaloides e em aparelho de HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência; Waters 1525), com detector DAD (Waters 2998), tendo uma condição cromatográfica com uma

fase estacionária composta por coluna C18 (Sunfise c18 4,6 x 150 mm, 5 µm), e como fase móvel foi empregado gradiente linear composto por água deionizada acrescida de ácido fórmico 0,1% (eluente A) e acetonitrila acrescida de ácido fórmico 0,1% (eluente B). A temperatura do forno permaneceu em 40°C, o volume de injeção utilizado foi de 20 µL e o fluxo empregado foi de 0,5 mL/minuto. As condições cromatográficas estão resumidas na Tabela 1.

As amostras foram preparadas utilizando 1 mg de cada solubilizadas em metanol grau CLAE com sonicação em aparelho de ultrassom por 20min. até completa dissolução, sendo posteriormente centrifugada a 10000 RPM por 10min, armazenadas em frasco para CLAE (vial). As leituras foram feitas em detector de UV-DAD nos comprimentos de onda de 210-600 nm, registrando-se cromatogramas nos comprimentos de onda de 215, 229, 280, 290 e 320 nm (Tabela 1).

Tabela 1 - Sistema de eluição empregado na obtenção dos perfis cromatográficos por CLAE-DAD do extrato etanólico e frações obtidos da casca da *Zanthoxylum rhoifolium*.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	0,5	95	05
10	0,5	85	15
40	0,5	00	100
45	0,5	00	100

4.2.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS)

Os espectros de massa das amostras foram obtidos em equipamento MAXIS 3G – Bruker Daltonics. Foi dissolvido 1mg das amostras em 1 mL de metanol grau HPLC, sob sonicação em aparelho de ultrassom por 20 minutos, sendo posteriormente centrifugadas por 10 minutos a 10.000 RPM e filtradas em filtro de nylon de seringa (4mm x 22 µm). Foi utilizada coluna de fase reversa Supelco Ascentis C18 (250x4.6 mm) 5 µm, detecção UV de 200-400 nm, fluxo de 1,0 mL/min e forno da coluna a 40°C. O gradiente empregado foi de acetonitrila 0,1% ácido fórmico e água ultrapura 0,1% ácido fórmico, compreendendo um período de eluição linear longo (20 - 80% de acetonitrila, em

80 min). Na obtenção dos espectros de massas foi empregado um sistema de ionização por Spray de Elétrons (ESI+), voltagem do capilar 4500V; voltagem do cone 500V. Foram empregados solventes grau HPLC e água deionizada, filtrada em sistema Milli-Q.

4.2.3. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

A FN foi submetida a fracionamento por cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa (dimensões: 0,75 mm), utilizando como fase estacionária sílica gel e fase móvel de diclorometano: metanol (95: 5). Posteriormente, a sílica raspada durante o processo foi homogeneizada em uma solução de acetato: metanol (95: 5) e posteriormente filtrada. O filtrado foi levado à secagem e a subfração obtida a partir daí foi analisada em CCD analítica e submetida a fracionamento em cromatografia em coluna aberta isocrática (acetato de etila 100%). As subfrações obtidas foram novamente submetidas a CCD analítica e reunidas por semelhança em espectro de ultravioleta (UV 365 nm). Por fim, a amostra então foi refractionada em cromatografia em coluna aberta com acetato 100% e acetato: metanol (95: 5).

A substância isolada a partir desse processo foi identificada por métodos bidimensionais (COSY e HMBC) e ressonância magnética nuclear (RMN). Os espectros unidimensionais de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C , e espectros bidimensionais COSY e HMBC foram obtidos no equipamento Bruker 400 MHz (modelo Ascend 400), utilizando-se tetrametilsilano (TMS) e o solvente utilizado como referência interna. Os espectros de ^1H foram obtidos a 400 MHz, os de ^{13}C a 100 MHz. A amostra foi solubilizada em metanol deuterado. Os resultados foram interpretados e correlacionados obtendo-se então a identificação do composto. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Faculdade de Química da UFPA.

4.2.4. ATIVIDADES CICATRIZANTES E ANTILEISHMANIA

4.2.4.1. Ensaio de proliferação e cicatrização de feridas

Para o ensaio de proliferação celular utilizou-se o método de SRB em linhagem celular HaCaT (linha de células de queratinócitos humanos) e em fibroblastos primários. As linhagens foram cultivadas em Meio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco) suplementado com 10% de FBS (Gibco) e 1% de penicilina/streptomicina (Gibco), com acréscimo de glicose (Gibco) somente na linhagem HaCaT. Ambas foram incubadas em atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO₂. Quando se observou a confluência celular, as células foram desaderidas com tripsina e feito o ajuste para 10⁴ células/mL. Estas células foram distribuídas em placas de 96 poços (4000 células) e após 24h foram tratadas com diferentes concentrações de EE, FN e FA (15 a 700 µg/mL) e em seguida novamente incubadas por 24h. Após isso, as monocamadas de células foram fixadas com ácido tricloroacético a 10% (p/v) e coradas com corante SRB por 30 min. O excesso de corante foi removido por lavagem repetida com ácido acético a 1% (v/v). O corante ligado à proteína foi dissolvido em solução de base tris 10 mM para determinação da densidade óptica (DO) a 560 nm usando um leitor de multiplacas (adaptado de VIRCHAI; KIRTIKARA, 2006).

Para o ensaio de cicatrização de feridas (migração celular) usou-se a linhagem celular HaCaT cultivada em Meio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; Gibco), 1% de penicilina/streptomicina (Gibco) e glicose (Gibco). As células foram semeadas em placas de 6 poços e incubadas com meio completo a 37°C e 5% de CO₂. Quando observada a confluência celular, as células da monocamada foram raspadas horizontalmente e verticalmente com pontas de pipeta P200 estéreis formando uma cruz. Os detritos foram removidos por lavagem com PBS. As células foram tratadas com EE, FN e FA nas concentrações de 15 e 30µg/mL. As células sem tratamento foram utilizadas como controle negativo e as tratadas com solvente (500µg/mL) como controle do solvente. O arranhão induzido que representava a ferida foi fotografado em 0h usando microscópio de fase invertida

(Axio Observer Z1, Zeiss, Göttingen, Germany) com aumento de 10x, antes da incubação com o tratamento. Após 12, 24, 36, 48, 60 e 72h de incubação, novos conjuntos de imagens foram fotografados. Para determinar a taxa de migração, as imagens foram analisadas no software ImageJ e a porcentagem da área fechada foi medida e comparada com o valor obtido em 0h. Um aumento na porcentagem de área fechada indicou migração de células. Realizou-se análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Tukey para verificar diferenças entre os grupos. O cálculo utilizado para determinar a % de fechamento da ferida é representado pela equação 1:

$$\% \text{ fechamento da ferida sobre } 0 = 100 - \text{medição em } X \text{ horas} \quad (1)$$

Tais cálculos foram realizados individualmente para 12, 24, 36, 48, 60 e 72h de tratamento com EE, FN e FA.

4.2.4.2. Atividade antileishmania

Na avaliação da atividade antileishmania foram utilizadas as formas promastigota e amastigota de *L. (L.) amazonensis*. A forma promastigota foi cultivada em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI). O teste foi realizado na fase logarítmica, utilizando uma suspensão de 5×10^6 parasitos/100 μL do cultivo. Estes foram distribuídos em placas de 96 poços de fundo chato previamente dosificadas com as amostras, nas seguintes concentrações: 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125 $\mu\text{g/mL}$. Como controle negativo utilizou-se uma solução de meio de cultura e suspensão de parasito. Como controle positivo utilizou-se anfotericina B (concentrações 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625, 0,78125 e 0,3906 $\mu\text{g/mL}$). Posteriormente a isso, a placa foi incubada a 26°C por 24 horas. Após o período de incubação adicionou-se 10 μL de MTT [Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium]; (5 mg/mL) em cada poço. A placa foi protegida da luz, sucedendo-se nova incubação por 4 horas em estufa a 26°C

para que o MTT fosse metabolizado e, conseqüentemente, os cristais de formazan fossem formados. Depois de 4 horas, adicionou-se 10 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar os cristais de formazan gerados através da agitação manual até completa dissolução. Após isso, as placas foram novamente à estufa por 1 hora. Posteriormente, realizou-se a leitura da densidade óptica (D.O) das amostras em leitor de multiplacas sob o comprimento de onda de 490 nm. A viabilidade das formas promastigotas foi avaliada com base no metabolismo do MTT, sendo a mesma proporcional ao valor da absorbância gerada. A porcentagem de parasitos foi calculada pela equação 2, adaptada de Ngure et al. (2009):

$$\%viabilidade = \frac{abs\ dos\ poços\ com\ amostra - ab\ do\ reagente\ (branco)}{abs\ dos\ poços\ sem\ amostra - abs\ do\ reagente\ (branco)} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

Abs – absorbância

Para avaliar a atividade antipromastigota, utilizou-se a concentração inibitória de 50% (CI₅₀), que é a concentração que causa a redução de 50% das células em crescimento (viáveis), e foi determinada pelo programa GraphPad Prism versão 6.0. Para interpretação da CI₅₀ adotou-se os critérios adaptados de Mota et al. (2015):

Quadro 1 - Interpretação dos resultados baseado na faixa da Concentração Inibitória a 50%.

CI ₅₀ µg/mL	Resultados
Menor ou igual a 100	Ativo
Entre 101-200	Moderadamente ativo
Acima de 200	Inativo

Fonte: Mota et al., 2015.

Para o ensaio com a forma amastigota, os macrófagos da linhagem (RAW 264.7) foram aderidos em lamínulas circulares (13 mm) previamente inseridas em placas de 24 poços em uma concentração de 5×10^6 células por poço (1mL), e expostos à infecção com promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária de crescimento ajustadas numa concentração de 2×10^6 parasitas por poço (1mL) e incubadas por 4 horas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO_2 (SILVA, 2005). Após incubação, o conteúdo de cada poço foi aspirado e adicionado 1mL de meio RPMI 1640 a 37°C , contendo diferentes concentrações (200 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$) do EE e FN, que foram estabelecidas com base em estudos prévios de citotoxicidade. O controle negativo consistiu de macrófagos infectados com meio de cultura sem o fármaco. O controle positivo consistiu de anfotericina B (10 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ e 2,5 $\mu\text{g/mL}$), seguido de incubação por 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 . Os testes foram feitos em triplicata. Posteriormente, as lamínulas foram retiradas dos poços, lavadas em PBS estéril a temperatura ambiente, fixadas em metanol e coradas com o corante Giemsa durante 20 minutos. As lamínulas foram observadas em microscópio óptico com objetiva de 40x e de imersão (100x), onde foi determinado o número de amastigotas por 100 macrófagos em cada lamínula. A atividade anti-amastigota foi avaliada através da equação 3, segundo Silva (2005):

$$I = \frac{AT}{AC} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

I = % de infecção de amastigotas/100 macrófagos em relação ao controle sem droga.

AT = número de amastigotas/100 macrófagos no grupo tratado.

AC = número de amastigotas/100 macrófagos no grupo não tratado (controle).

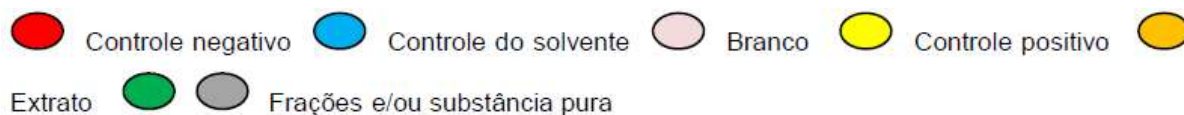
4.2.5 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ESTABELECIMENTO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE

Para determinação da citotoxicidade utilizou-se o ensaio com MTT em linhagem VERO e o ensaio de TTC em linhagem J774. O ensaio de citotoxicidade foi realizado para o EE, FN e FA de acordo com a metodologia descrita por Mosmann et al. (1983), utilizando placas de 96 poços (Figura 7), onde foram semeadas células da linhagem normal de Rim de Macaco Verde Africano (VERO), na concentração de 8×10^3 células/mL, acrescida de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e macrófagos J774 na concentração de 2×10^4 células/mL, acrescida de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figura 7 - Modelo esquemático das placas de 96 poços de fundo chato e da distribuição das substâncias testadas que estão representadas por cores para teste de citotoxicidade.

Legenda:



Depois de 24h de incubação foi realizado o tratamento com sete concentrações decrescentes do EE, FN e FA ($500\mu\text{g/mL}$; $250\mu\text{g/mL}$; $125\mu\text{g/mL}$; $62,5\mu\text{g/mL}$; $31,25\mu\text{g/mL}$; e $15,625\mu\text{g/mL}$ e $7,812\mu\text{g/mL}$). As placas foram

incubadas a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após 24h de tratamento foi adicionado 10µL da solução brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]; (MTT, 5mg/mL) para 100 µL de meio contido nos poços contendo células VERO; e 10µL da solução 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC, 5mg/mL) para 100 µL de meio contido nos poços contendo macrófagos J774. Para as placas onde foi adicionado TTC, a leitura deu-se em 2h após a aplicação em espectrofotômetro de varredura de microplacas, utilizando um comprimento de onda de referência de 560nm. Já as placas as quais adicionou-se MTT foram, novamente, incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ durante 4 horas. Após isso, desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se 100µL de dimetilsufóxido (DMSO) a todos os poços para dissolver os cristais de formazan. Depois disso, as placas foram homogeneizadas até completa dissolução dos cristais. Em aproximadamente 1 hora as absorbâncias dos poços foram lidas em espectrofotômetro de varredura de microplacas, utilizando um comprimento de onda de referência de 490nm.

Os valores da concentração citotóxica 50% (CC₅₀), concentração na qual foi reduzida 50% da viabilidade celular, foram calculados a partir da equação 4 (GALUCIO, 2014):

$$\% \text{ células vivas} = \frac{\text{absorbância das células}}{\text{absorbância das células sem tratamento}} \times 100 \quad (4)$$

Ou seja, para o cálculo das células mortas, a equação 5:

$$\% \text{ células mortas} = \frac{\text{absor células s/ tratamento} - \text{absor células tratadas}}{\text{absorbância das células s/ tratamento}} \times 100 \quad (5)$$

A CC₅₀ foi determinada por regressão linear (programa GraphPad Prism versão 6.0) e classificada em citotóxica, moderadamente citotóxica e não citotóxica (SILVA-SILVA, 2016; Quadro 2).

Quadro 2 - Interpretação dos resultados do ensaio de viabilidade celular.

CC₅₀ µg/mL	Resultados
Menor ou igual a 100	Citotóxico
Entre 101-500	Moderadamente citotóxico
Acima de 500	Não citotóxico

Fonte: Silva-Silva, 2016.

O índice de seletividade foi determinado pela equação 6, adaptada de Reimão (2009):

$$IS = \frac{CC50 \text{ em VERO ou J774}}{CI50 \text{ contra o parasito}} \quad (6)$$

Para a interpretação dos resultados do índice de seletividade, considerou que um IS superior a 10 indica que o composto em estudo apresenta maior toxicidade para o parasito do que para a linhagem celular VERO e/ou J774. Já um IS inferior a 10 indica um composto com maior toxicidade para a linhagem celular VERO e/ou J774, do que para o parasito. Quanto maior o valor numérico do IS, mais seletivo é o composto em estudo, ou seja, pouco tóxico para a linhagem celular analisada e ativo para o parasito (REIMÃO, 2009).

4.2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o GraphPad versão 5.0 (GraphPad Software). Os dados foram apresentados como número, porcentagem, média e desvio padrão. Para comparar a diferença entre os grupos, aplicamos análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Tukey. O nível de a significância estatística foi de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo Fitoquímico

No processo de extração para obtenção do extrato etanólico, obteve-se uma massa de 69g, cujo rendimento foi de 13,8%. O fracionamento de 10g de EE por partição ácido-base gerou a fração de neutros (FN) com rendimento de 24,338% (2,4338g) e a fração alcaloídica (FA) com rendimento de 1,577% (0,1577g).

O EE, FN e FA foram submetidos a análises em cromatografia em camada delgada (CCD) e apresentaram bandas sugestivas de alcaloides (Figura 8A e 8B). De *Z. rhoifolium* já foram isolados muitos alcaloides, como 6-acetonildiidronitidina, 8-acetonildiidronitidina, 6-acetonildiidroavicina, 8-acetonildiidroavicina, 6-acetonildiidrocheleritrina, zantoxilina (GONZAGA et al., 2003b), decarina (MOURA et al., 1997), fagaridina (JULLIAN et al., 2006; CASTILLO et al., 2014), boconolina (WEBER, 2005; TAVARES et al., 2014) e nitidina (JULLIAN et al., 2006; BOUQUET et al., 2012; CASTILLO et al., 2014; TAVARES et al., 2014), corroborando com os resultados deste estudo.

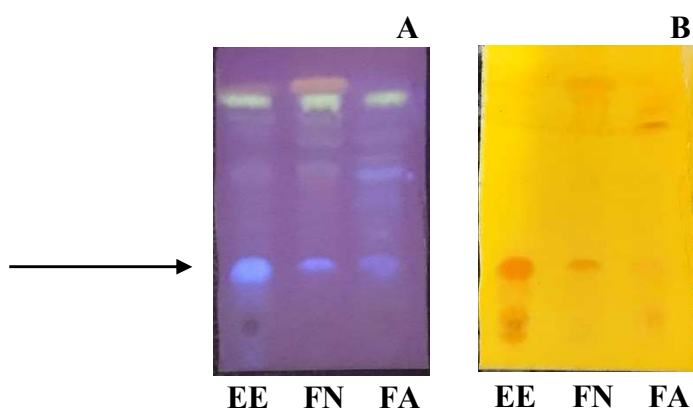


Figura 8 - Análises em Cromatografia em Camada Delgada das amostras.

Condições: Fase móvel - Diclorometano: Metanol: Hidróxido de Amônio (85:15:0,5);
Reveladores em **A:** luz Ultravioleta 365nm; **B:** Reagente Dragendorff.

Legenda: **EE:** Extrato Etanólico; **FN:** Fração de neutros; **FA:** Fração Alcaloídica. A seta indica presença de alcaloides.

O extrato etanólico (EE) obtido da casca de *Z. rhoifolium* foi analisado em CLAE-DAD. O cromatograma obtido do EE sugere a presença de compostos de alta a média polaridade. O pico com maior intensidade (TR= 2,000 min.) apresentou um espectro em UV com λ_{\max} de 221.5, 274.7 nm (Figura 9A); o pico em 3,000 min apresentou espectro em UV com λ_{\max} de 226.3, 270.0 nm (Figura 9B), e o pico em 32,000 min apresentou espectro em UV com λ_{\max} de 219.2, 265.3 nm (Figura 9D); o pico com tempo de retenção em 7,000 minutos apresentou espectro em UV com λ_{\max} de 226.3, 271.2, 310.4 nm. Os espectros em UV encontrados são sugestivos de tratarem-se de alcaloides benzofenantridínicos, como sanguinarina e cheleritrina, pois apresentam espectros com perfis semelhantes (SON et al., 2014). Ressalta-se que o alcaloide sanguinarina já foi descrito no gênero *Zanthoxylum* (TIAN; ZHANG; GUO, 2017; LIN et al., 2020) e o alcaloide cheleritrina já foi encontrado na espécie *Z. rhoifolium* (ZANON, 2010).

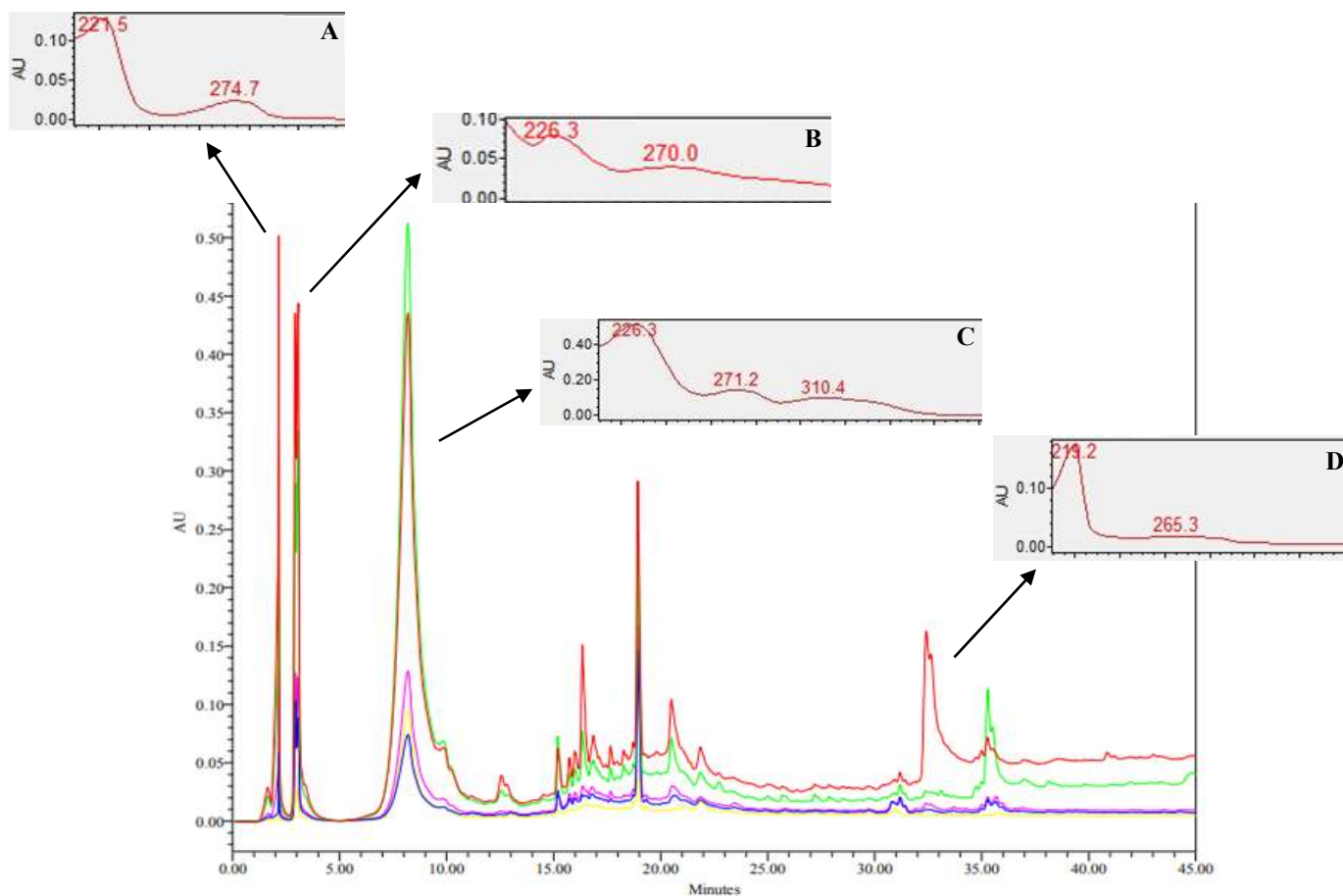


Figura 9 – Cromatograma do extrato etanólico de *Zanthoxylum rhoifolium* e seus respectivos espectros em ultravioleta.

Condições: Temperatura: 40°C; Fluxo: 0,5mL/min; volume: 20µL; coluna: C18; fase móvel: água deionizada, ácido fórmico 0,1% (eluyente A) e acetonitrila acrescida de ácido fórmico 0,1% (eluyente B); leitura nos comprimentos de onda de 215, 229, 280, 290 e 320nm.

Legenda: **A:** tempo de retenção de 2.000 minutos; **B:** tempo de retenção de 3.000 minutos; **C:** tempo de retenção de 7.000 minutos; **D:** tempo de retenção de 32.000 minutos.

Com o objetivo de separar os alcaloides presentes no EE, realizou-se o fracionamento. Após o fracionamento e análise dos cromatogramas, sugere-se que o fracionamento concentrou os alcaloides em teores distintos nas frações. Sugere-se que os alcaloides responsáveis pelas atividades da espécie estejam concentrados na FN (Figura 10).

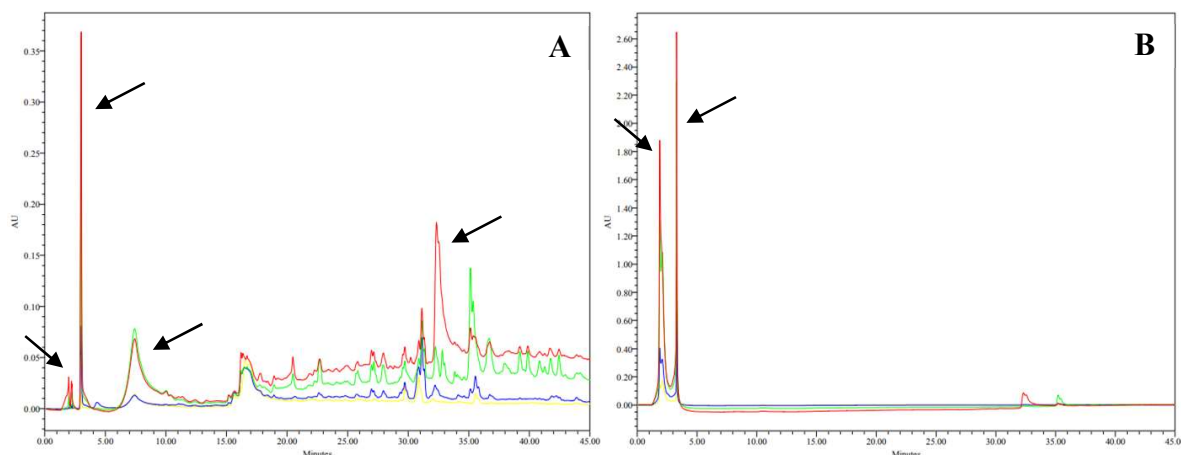


Figura 10 - Cromatograma das frações de neutros (FN) e alcaloides (FA) de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Condições: Temperatura: 40°C; Fluxo: 0,5mL/min; volume: 20µL; coluna: C18; fase móvel: água deionizada, ácido fórmico 0,1% (eluyente A) e acetonitrila acrescida de ácido fórmico 0,1% (eluyente B); leitura nos comprimentos de onda de 215, 229, 290 e 320 nm.

Legenda: **A:** fração de neutros; **B:** fração de alcaloides; **FN:** fração de neutros; **FA:** fração de alcaloides. As setas sugerem a presença de alcaloides.

O EE foi submetido a análises em LC-MS e cromatograma sugere que este é constituído, principalmente, por compostos de maior polaridade. Após análises preliminares dos espectros de massa, visando identificar possíveis alcaloides, foram selecionados os seguintes TR: 3,8; 3,9; 10,6 e 13,8 min. (Figura 11). O TR 3,8 min. apresentou um pico com ion molecular em m/z 342 U. As principais fragmentações foram em m/z 297 U e 265 U, sugerindo a perda inicial de $C_2H_6N_2^+$, seguida da perda de 2 hidroxilas (Figura 12). Dessa forma, sugere-se que o composto pode tratar-se tanto dos alcaloides magnoflorina ou laurifolina. Desta espécie já foi isolado a magnoflorina (ZANON, 2010), enquanto que a laurifolina foi isolada de outra espécie pertencente a este gênero (FAN et al., 2019). Desta forma, pode-se sugerir que este alcaloide deve ser a magnoflorina.

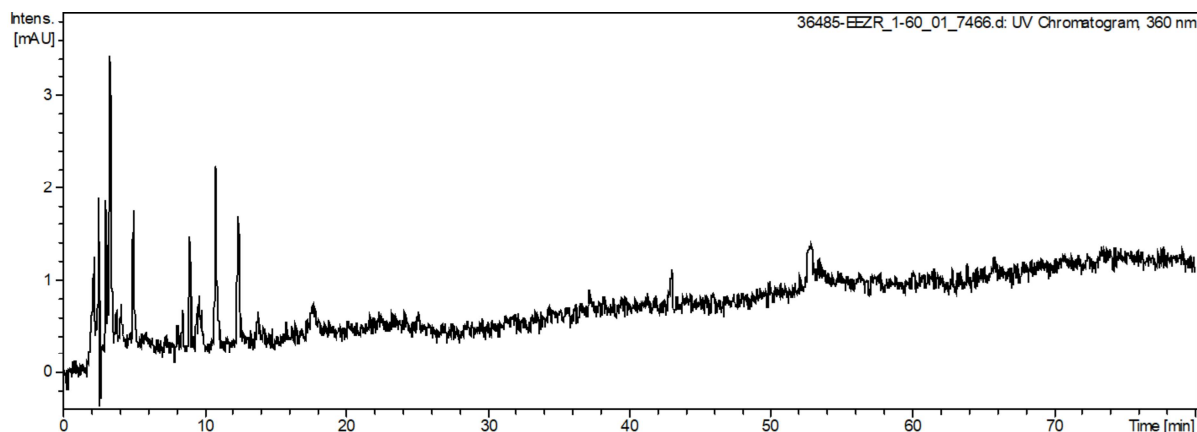


Figura 11 - Cromatograma do extrato etanólico (EE) de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Condições: Sistema obtido por HPLC-MS coluna C18 5 μm (250x4.6 mm); Fase móvel composta por água 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila 0,1% ácido fórmico (B): 0 min. 80% A e 20% de B, 80 min 20% A e 80% B; fluxo 1,0 mL/min; temp. 40°C; ionização ESI+ voltagem com capilar em 4500 eV; voltagem do cone em 500 Ev; leitura no comprimento de onda de 360 nm.

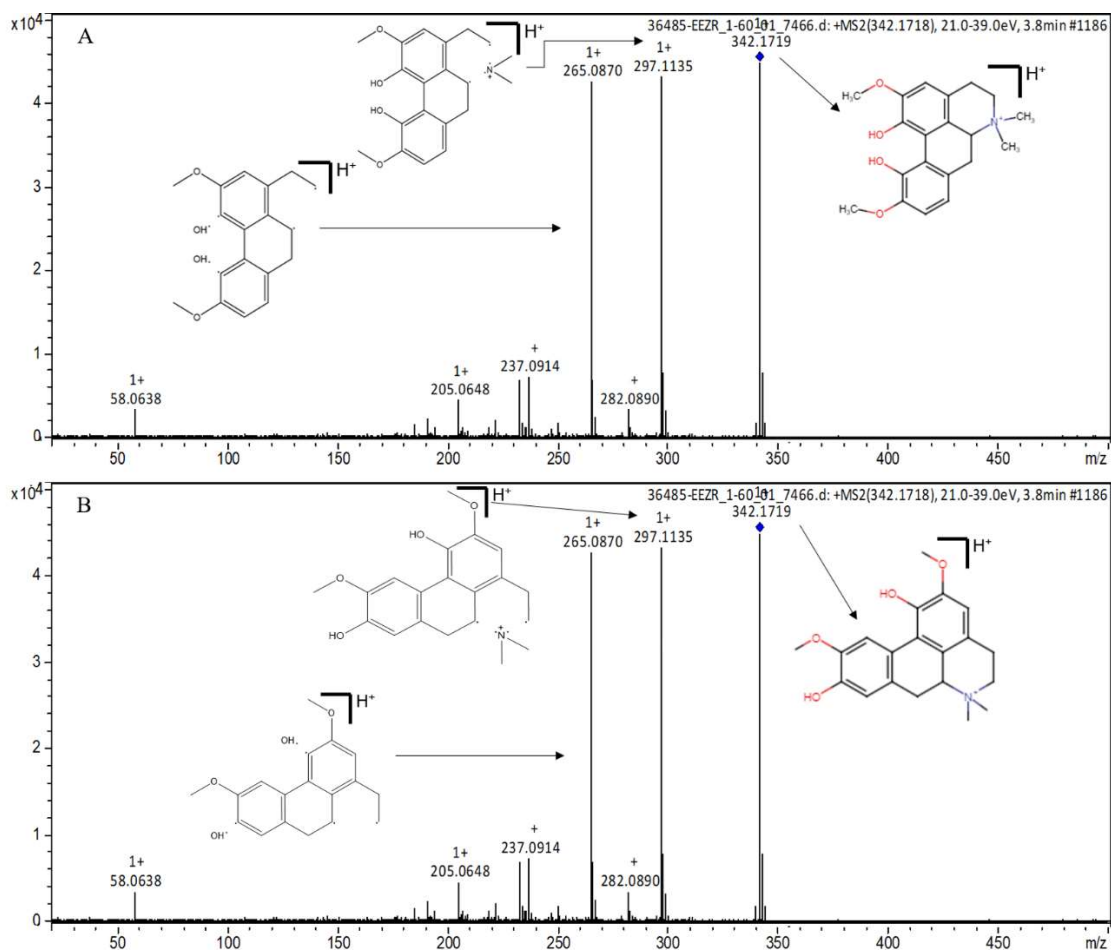


Figura 12 - Espectro de massas e fragmentações referentes ao tempo de retenção de 3,8 min. do extrato etanólico (EE) de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Legenda: A: sugestivo do alcaloide magnoflorina; B: sugestivo do alcaloide laurifolina.

Condições: Sistema obtido por HPLC-MS coluna C18 5 μm (250x4.6 mm); Fase móvel composta por água 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila 0,1% ácido fórmico (B): 0 min. 80% A e 20% de B, 80 min 20% A e 80% B; fluxo 1,0 mL/min; temp. 40°C; ionização ESI+ voltagem com capilar em 4500 eV; voltagem do cone em 500 eV.

Outro TR selecionado foi o de 3,9 min. que apresentou um pico com íon molecular em m/z 314 U. As principais fragmentações foram em m/z 269 U (314 - 45), que podem sugerir a perda de 3 metilas (CH_3) e em 209 U (314 - 105), sugerindo a perda de $\text{C}_3\text{H}_8\text{N}^+$, uma metoxila (CH_3O) e uma hidroxila (OH ; Figura 13). Dessa forma, sugere-se que o composto pode tratar-se tanto do alcaloide magnocurarina ou seu isômero isomagnocurarina. Tais alcaloides já foram isolados de outra espécie pertencente a este gênero (FAN et al., 2019).

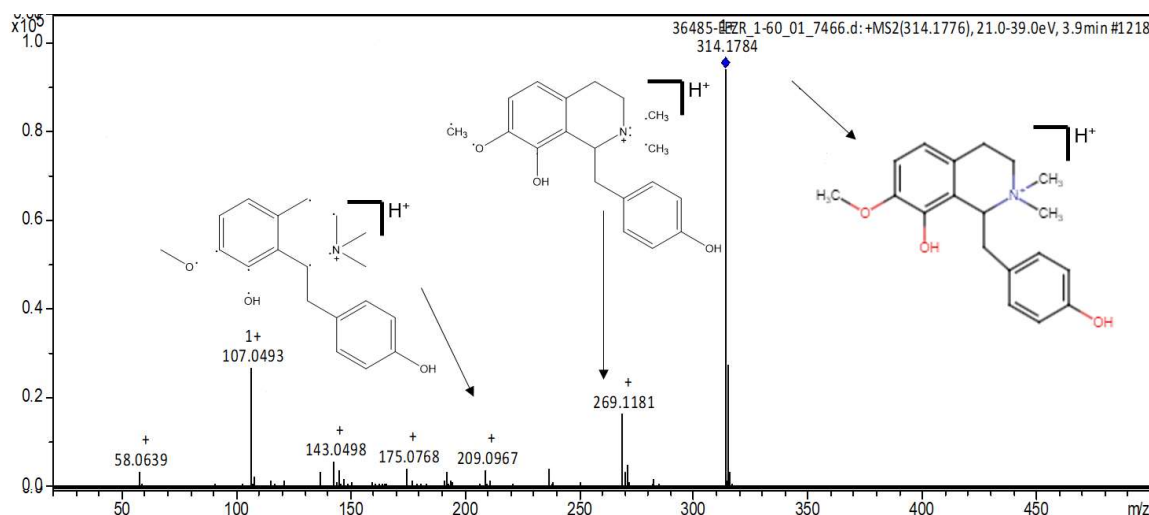


Figura 13 - Espectro de massas e fragmentações referentes ao tempo de retenção de 3,9 min. do extrato etanólico (EE) de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Condições: Sistema obtido por HPLC-MS coluna C18 5 μm (250x4.6 mm); Fase móvel composta por água 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila 0,1% ácido fórmico (B): 0 min. 80% A e 20% de B, 80 min 20% A e 80% B; fluxo 1,0 mL/min; temp. 40°C; ionização ESI+ voltagem com capilar em 4500 eV; voltagem do cone em 500 eV.

Ainda foi analisado o TR de 10,6 min. foi evidenciado um pico do ion molecular em m/z 332 U, com a principal fragmentação em m/z 274 U, sugerindo as seguintes perdas, respectivamente, CH_3 e $\text{CH}_2\text{O}^2 + \text{N}^{4+}$ (Figura 14). Estes resultados sugerem que o composto pode ser tanto o alcaloide avicina, quanto o alcaloide sanguinarina. De *Z. rhoifolium* já foi isolado o alcaloide avicina (JULLIAN et al., 2006; TAVARES et al., 2014), enquanto que a sanguinarina foi encontrada em outra espécie pertencente a este gênero (TIAN; ZHANG; GUO, 2017; LIN et al., 2020). Logo, pode-se sugerir que este alcaloide é a avicina.

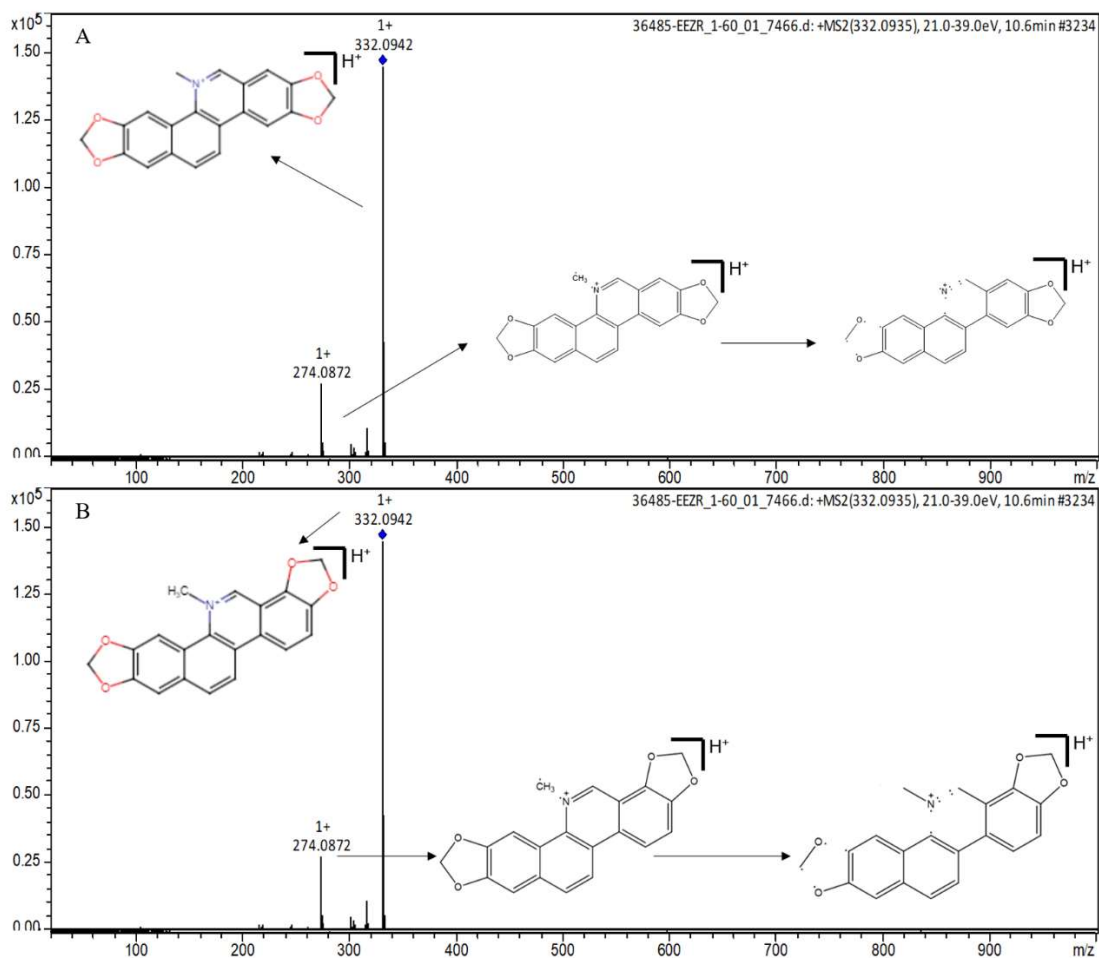


Figura 14 - Espectro de massas e fragmentações referentes ao tempo de retenção de 10,6 min. do extrato etanólico (EE) de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Legenda: A: sugestivo do alcaloide avicina; B: sugestivo do alcaloide sanguinarina.

Condições: Sistema obtido por HPLC-MS coluna C18 5 μ m (250x4.6 mm); Fase móvel composta por água 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila 0,1% ácido fórmico (B): 0 min. 80% A e 20% de B, 80 min 20% A e 80% B; fluxo 1,0 mL/min; temp. 40°C; ionização ESI+ voltagem com capilar em 4500 eV; voltagem do cone em 500 eV.

Por fim, analisou-se o TR 13,8 min. com íon molecular m/z 348 U. A análise do espectro de massa não permitiu propor de qual substância se tratava (Figura 15), no entanto, esta apareceu no espectro de massa da FN, sendo possível fazer uma proposta dos possíveis alcaloides.

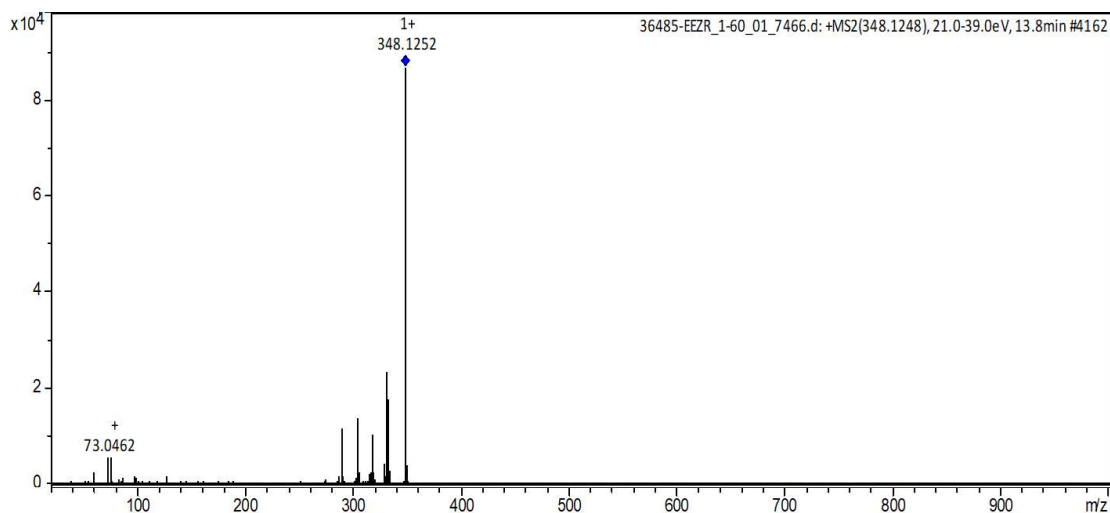


Figura 15 - Espectro de massas referente ao tempo de retenção de 13,8 min. do extrato etanólico (EE) de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Condições: Sistema obtido por HPLC-MS coluna C18 5 μm (250x4.6 mm); Fase móvel composta por água 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila 0,1% ácido fórmico (B): 0 min. 80% A e 20% de B, 80 min 20% A e 80% B; fluxo 1,0 mL/min; temp. 40°C; ionização ESI+ voltagem com capilar em 4500 eV; voltagem do cone em 500 eV.

Nas análises em LC-MS de FN, o cromatograma mostrou que a maioria dos compostos possuem TR inferior a 20 min., sugerindo a presença de compostos polares (Figura 16). Apesar de diferenças nos TR em relação ao EE, observou-se espectros de massas semelhantes. Nos tempos de retenção de 5,6 min e 6,7 min apresentou pico do íon molecular em m/z 342 U. As fragmentações principais foram evidenciadas em ambos os picos, a primeira originou um pico m/z de 297 U referente a $(342 - 45)$, sendo sugestivo da perda de $\text{C}_2\text{H}_6\text{N}^{2+}$ (Figura 17). A segunda originou um pico m/z de 265 U referente a $(297 - 32)$, sendo sugestivo da perda de duas hidroxilas (OH; Figura 17). Dessa forma, sugere-se que a massa identificada pode tratar-se tanto do alcaloide magnoflorina ou do alcaloide laurifolina. Como discutido anteriormente, sugere-se que o alcaloide presente em FN seja a magnoflorina.

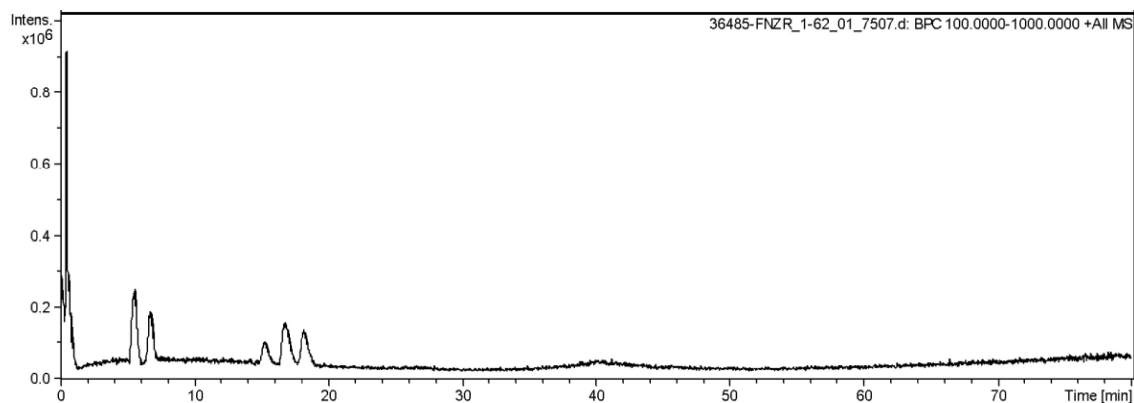


Figura 16 - Cromatograma da fração de neutros (FN) de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Condições: Sistema obtido por HPLC-MS coluna C18 5 μm (250x4.6 mm); Fase móvel composta por água 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila 0,1% ácido fórmico (B): 0 min. 80% A e 20% de B, 80 min 20% A e 80% B; fluxo 1,0 mL/min; temp. 40°C; ionização ESI+ voltagem com capilar em 4500 eV; voltagem do cone em 500 Ev; leitura no full-scan.

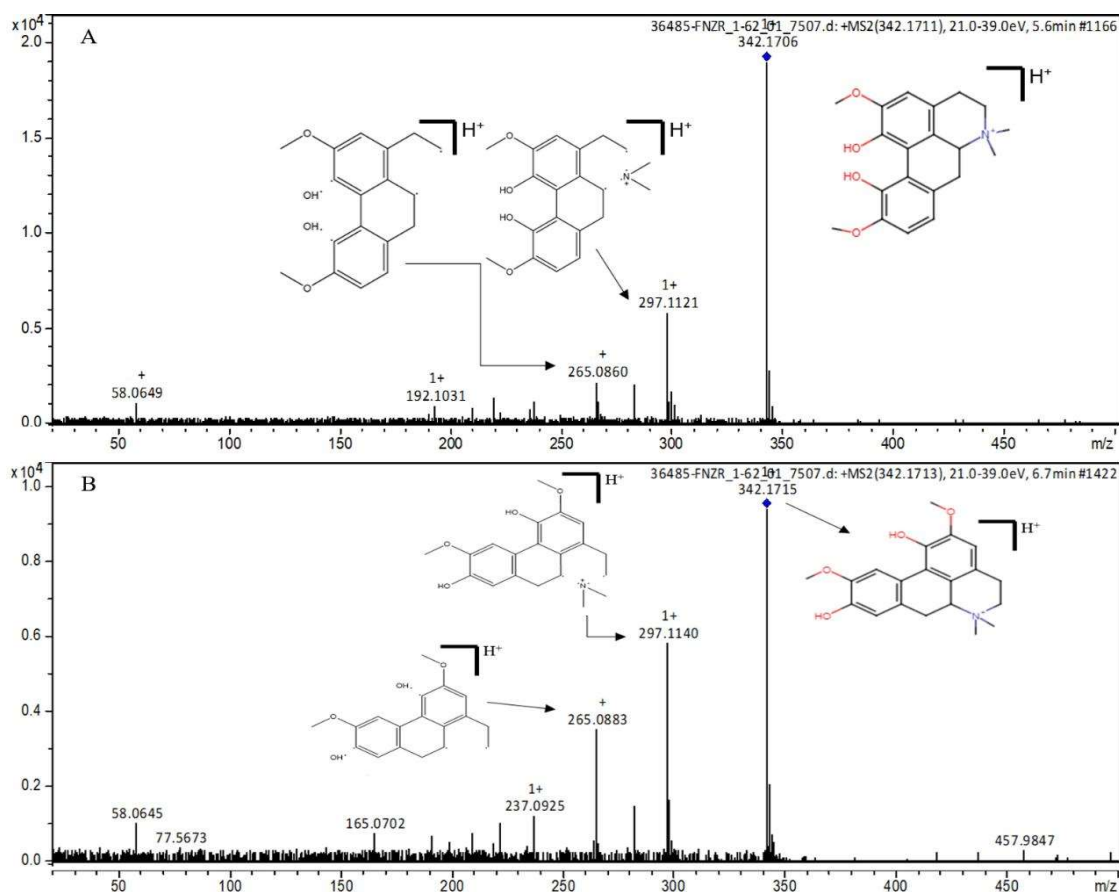


Figura 17. Espectro de massas e fragmentações referentes ao tempo de retenção de 5,6 e 6,7 min. da fração de neutros (FN) obtida do extrato etanólico (EE) de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Legenda: A: sugestivo do alcaloide magnoflorina; B: sugestivo do alcaloide laurifolina.

Condições: Sistema obtido por HPLC-MS coluna C18 5 μm (250x4.6 mm); Fase móvel composta por água 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila 0,1% ácido fórmico (B): 0 min. 80% A e 20% de B, 80 min 20% A e 80% B; fluxo 1,0 mL/min; temp. 40°C; ionização ESI+ voltagem com capilar em 4500 eV; voltagem do cone em 500 eV.

No tempo de retenção de 15,3 min. foi evidenciado um pico do íon molecular em m/z 332 U. As fragmentações principais foram evidenciadas, a primeira originou um pico m/z de 317 U referente a $(332 - 15)$, sendo sugestivo da perda de CH_3 (Figura 18). A segunda originou um pico m/z de 274 U referente a $(317 - 43)$, sendo sugestivo da perda de $\text{CH}_2\text{O}^2 + \text{N}^{4+}$ (Figura 18). Dessa forma, sugere-se que a massa identificada pode tratar-se tanto do alcaloide avicina como do alcaloide sanguinarina. Devido haver relato de isolamento da avicina na espécie em estudo (JULLIAN et al., 2006; TAVARES et al., 2014), sugere-se tratar-se deste alcaloide.

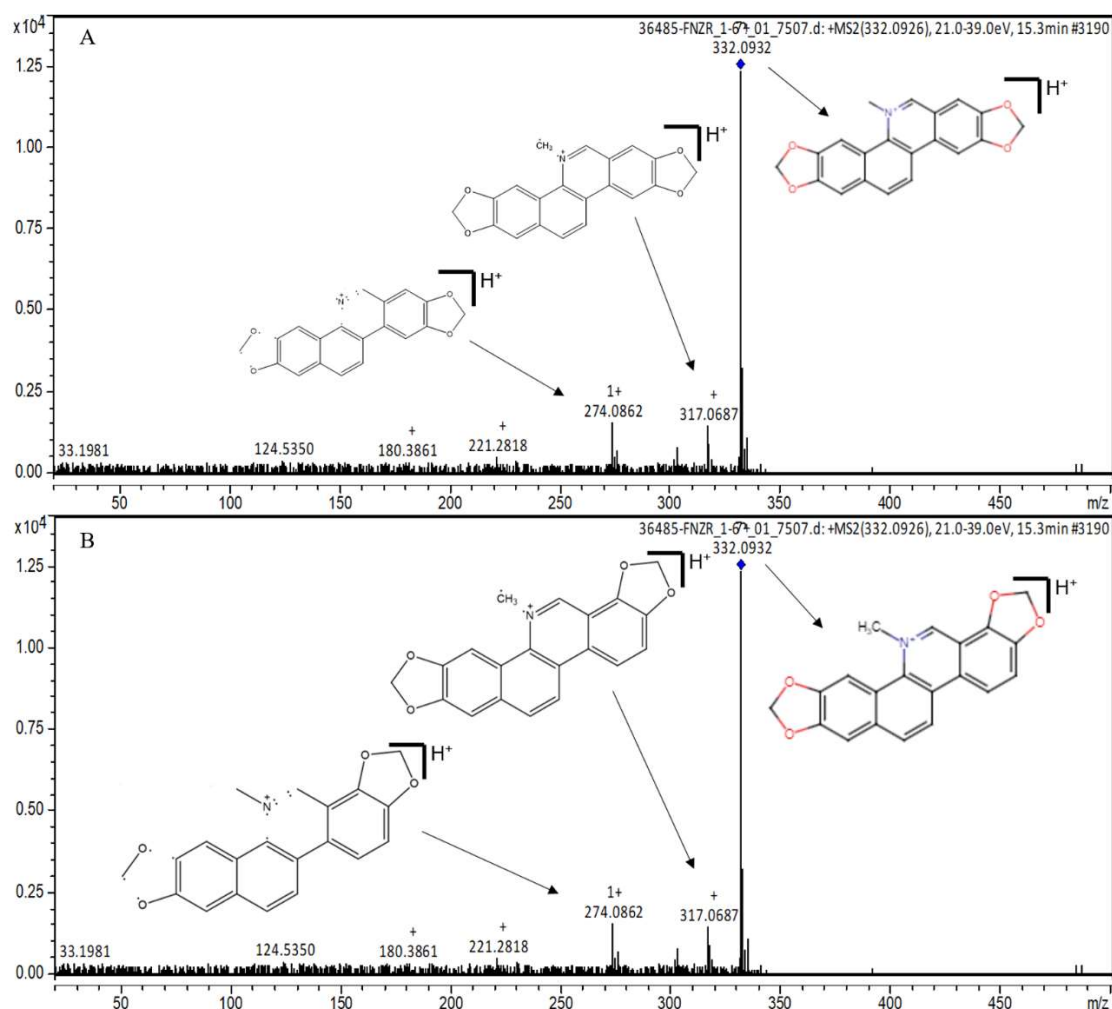


Figura 18 - Espectro de massas e fragmentações referentes ao tempo de retenção de 15,3 min. da fração de neutros (FN) obtida do extrato etanólico (EE) de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Legenda: A: sugestivo do alcaloide avicina; B: sugestivo do alcaloide sanguinarina.

Condições: Sistema obtido por HPLC-MS coluna C18 5 μm (250x4.6 mm); Fase móvel composta por água 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila 0,1% ácido fórmico (B): 0 min. 80% A e 20% de B, 80 min 20% A e 80% B; fluxo 1,0 mL/min; temp. 40°C; ionização ESI+ voltagem com capilar em 4500 eV; voltagem do cone em 500 eV.

No tempo de retenção de 16,8 min. foi encontrado um pico do íon molecular em m/z 348 U. As fragmentações principais foram evidenciadas em um pico m/z de 304 U referente a $(348 - 44)$, sendo sugestivo da perda de $\text{CH}_3\text{N}^{2+} + \text{O}^2$ (Figura 19A e 19B). A outra originou um pico m/z de 211 U referente a $(348 - 137)$, sendo sugestivo da perda de CH_2O_2 , mais CH_3N_2^+ e mais $(\text{CH}_3\text{O})^2$ (Figura 19A e 19B). Dessa forma, sugere-se que a massa identificada pode tratar-se tanto do alcaloide cheleritina como do alcaloide nitidina. Ainda nesse tempo de retenção (16,8 min), pode-se sugerir outro alcaloide, a oxiavicina, a partir das seguintes fragmentações: a primeira originou um pico m/z de 304 U referente a $(348 - 44)$, sendo sugestivo da perda de CH_3 mais CO^2 (Figura 19C). A outra originou um pico m/z de 211 U referente a $(304 - 93)$, sendo sugestivo da perda de $(\text{CH}_2\text{O}_2)^2$ (Figura 19C).

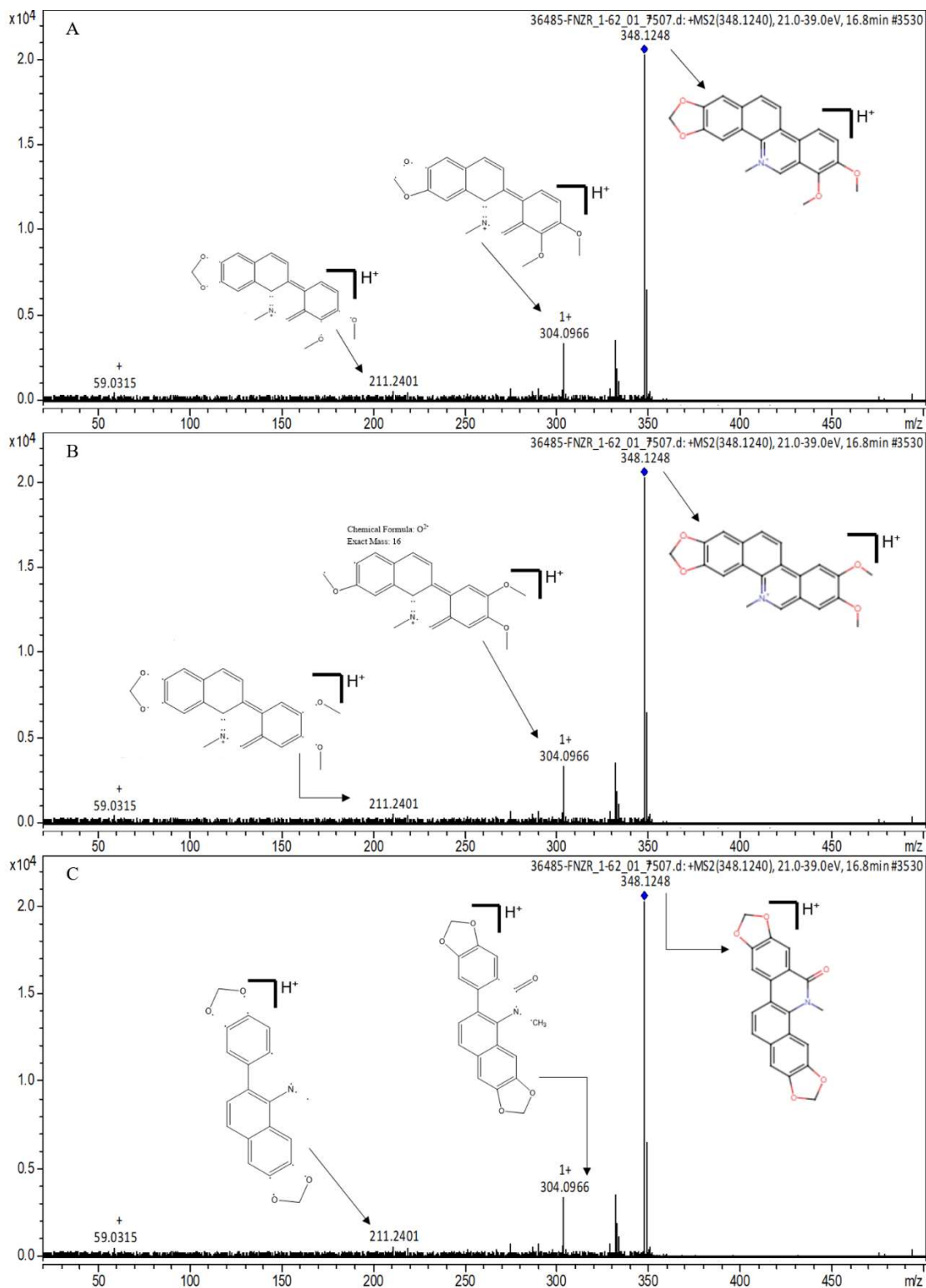


Figura 19 - Espectro de massas e fragmentações referentes ao tempo de retenção de 16,8 min. da fração de neutros (FN) obtida do extrato etanólico (EE) de *Zanthoxylum rhoifolium*.
Legenda: A: sugestivo do alcaloide chelitrina; B: sugestivo do alcaloide nitidina; C: sugestivo do alcaloide oxivicina.

Condições: Sistema obtido por HPLC-MS coluna C18 5 μ m (250x4.6 mm); Fase móvel composta por água 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila 0,1% ácido fórmico (B): 0 min. 80% A e 20% de B, 80 min 20% A e 80% B; fluxo 1,0 mL/min; temp. 40°C; ionização ESI+ voltagem com capilar em 4500 eV; voltagem do cone em 500 eV.

No tempo de retenção de 18,2 min. foi evidenciado um pico do íon molecular também em m/z 348 U. As fragmentações principais foram evidenciadas, a primeira originou um pico m/z de 332 U referente a (348 - 16), sendo sugestivo da perda de O^2 (Figura 20A). A outra originou um pico m/z de 304 U referente a (332 - 28), sendo sugestivo da perda de CH_3N^2 (Figura 20A). Dessa forma, sugere-se que a massa identificada pode tratar-se do alcaloide oxiavicina.

Ainda nesse mesmo tempo de retenção (18,2 min.), três fragmentações semelhantes à anterior, sugerem também poder tratar-se do alcaloide nitidina, onde a primeira fragmentação indica um pico m/z de 332 U referente a (348 - 16), sendo sugestivo da perda de O^2 . A segunda originou um pico m/z de 304 U referente a (332 - 28), sendo sugestivo da perda de CH_3N^{3+} . A terceira indica um pico m/z de 189 U referente a (304 - 115), sendo sugestivo da perda de $C_8H_5O^5$ (Figura 20B).

Seguindo no tempo de retenção de 18,2 min., três fragmentações semelhantes à anterior, sugerem também poder tratar-se do alcaloide cheleritina, onde a primeira fragmentação indica um pico m/z de 332 U referente a (348 - 16), sendo sugestivo da perda de O^2 (Figura 20C). A segunda originou um pico m/z de 304 U referente a (332 - 28), sendo sugestivo da perda de CH_3N^{2+} . A terceira indica um pico m/z de 189 U referente a (348 - 159), sendo sugestivo da perda de $C_9H_6O_2^2$ e CH_3 (Figura 20C).

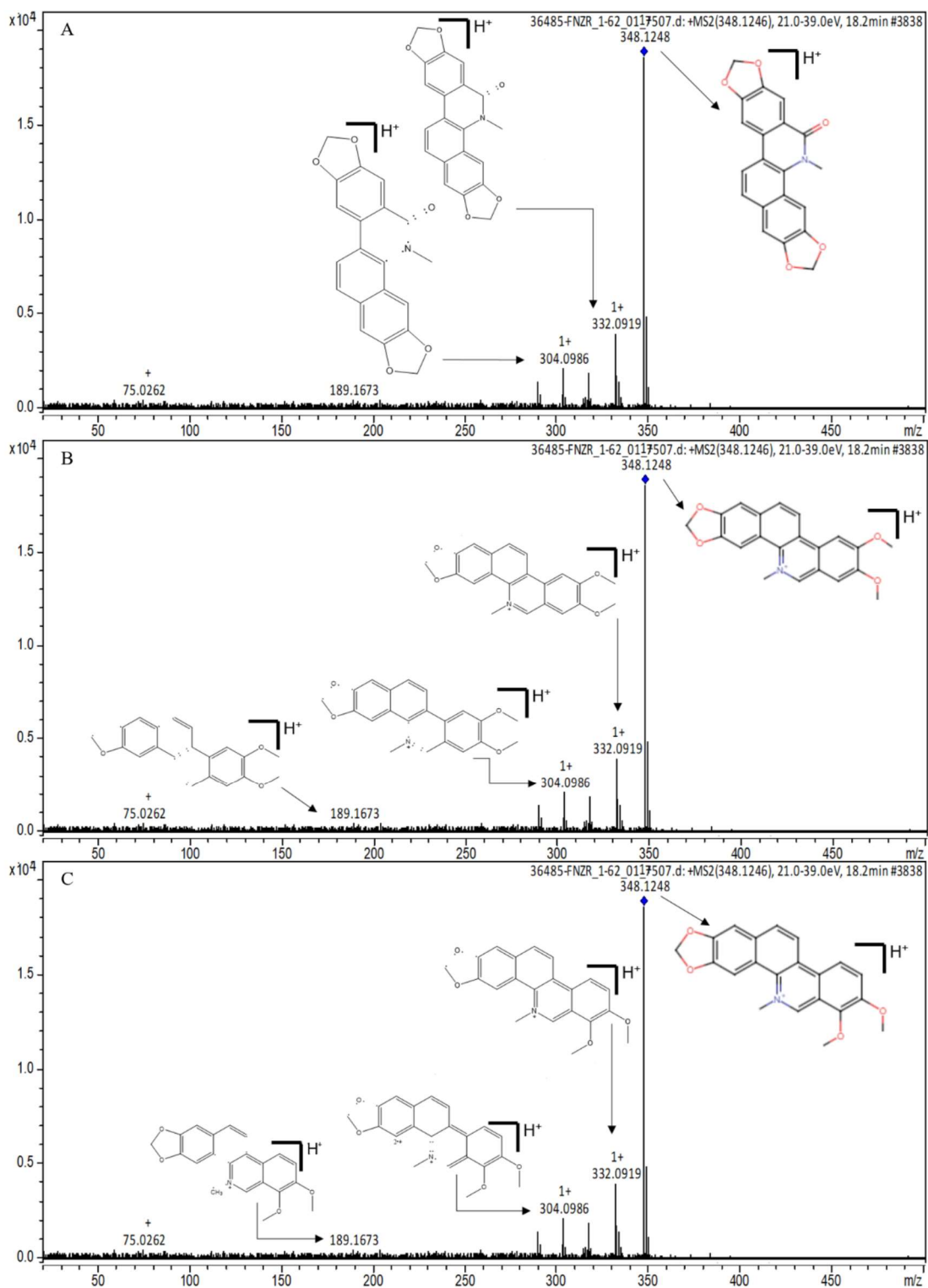


Figura 20 - Espectro de massas e fragmentações referentes ao tempo de retenção de 18,2 min. da fração de neutros (FN) obtida do extrato etanólico (EE) de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Legenda: A: sugestivo do alcaloide oxiajavina; B: sugestivo do alcaloide nitidina; C: sugestivo do alcaloide cheleritina.

Condições: Sistema obtido por HPLC-MS coluna C18 5 µm (250x4.6 mm); Fase móvel composta por água 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila 0,1% ácido fórmico (B); 0 min. 80% A e 20% de B, 80 min 20% A e 80% B; fluxo 1,0 mL/min; temp. 40°C; ionização ESI+ voltagem com capilar em 4500 eV; voltagem do cone em 500 eV.

O cromatograma da FA sugere a presença de compostos de alta e média polaridade (Figura 21), e os TR são próximos ao do EE, bem como, a maioria dos espectros de massa são similares aos encontrados em EE e FN. No TR de 3,5 min foi detectado um pico do íon molecular m/z 342 U, e as principais fragmentações foram em m/z 297 U e 265 U, sugerindo a perda inicial de $C_2H_6N_2^+$, seguida da perda de 2 hidroxilas (OH; Figura 22). Dessa forma, podem tratar-se dos alcaloides magnoflorina ou laurifolina. Como o alcaloide magnoflorina já foi isolado da espécie (ZANON, 2010), supõe-se que possa se tratar deste alcaloide aporfínico.

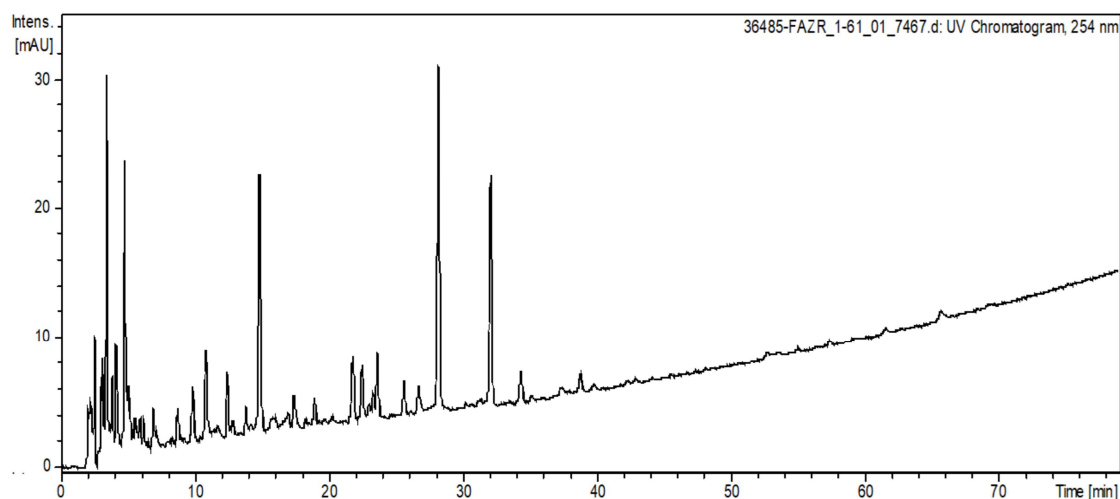


Figura 21 – Cromatograma da fração de alcaloides (FA) de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Condições: Sistema obtido por HPLC-MS coluna C18 5 μ m (250x4.6 mm); Fase móvel composta por água 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila 0,1% ácido fórmico (B): 0 min. 80% A e 20% de B, 80 min 20% A e 80% B; fluxo 1,0 mL/min; temp. 40°C; ionização ESI+ voltagem com capilar em 4500 eV; voltagem do cone em 500 Ev; leitura no comprimento de onda de 254nm.

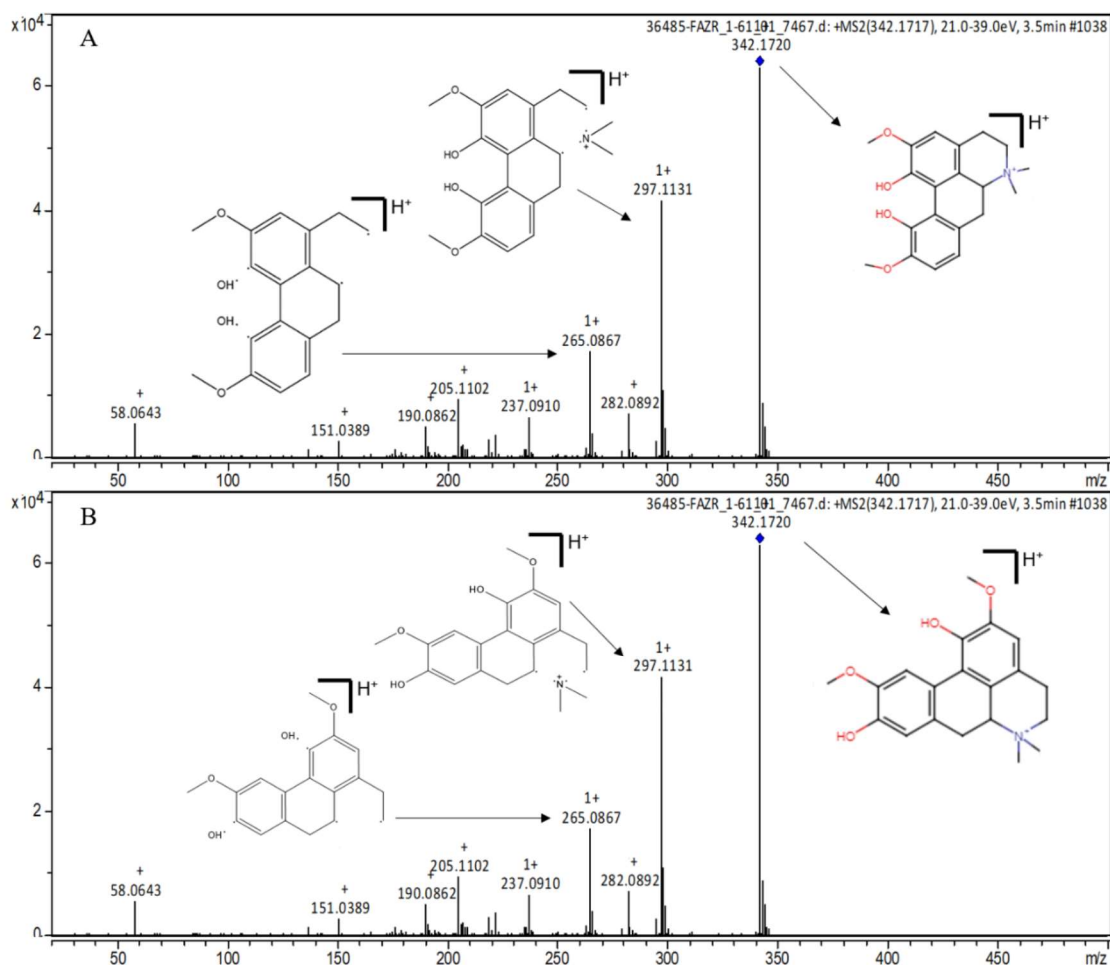


Figura 22. Espectro de massas e fragmentações referentes ao tempo de retenção de 3,5 min. da fração de alcaloides (FA) obtida do extrato etanólico (EE) de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Legenda: A: sugestivo do alcaloide magnoflorina; B: sugestivo do alcaloide laurifolina.

Condições: Sistema obtido por HPLC-MS coluna C18 5 μm (250x4.6 mm); Fase móvel composta por água 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila 0,1% ácido fórmico (B): 0 min. 80% A e 20% de B, 80 min 20% A e 80% B; fluxo 1,0 mL/min; temp. 40°C; ionização ESI+ voltagem com capilar em 4500 eV; voltagem do cone em 500 eV.

No TR de 4,0 min foi detectado um pico do íon molecular m/z 314 U, e as principais fragmentações foram em m/z 269 U (314 - 45), que podem sugerir a perda de de 3 metilas (CH_3) e em 237 U (314 - 77), sugerindo a perda de uma metoxila (CH_3O), duas metilas (CH_3) e uma hidroxila (OH; Figura 23). Dessa forma, sugere-se que o composto pode tratar-se tanto do alcaloide magnocurarina ou seu isômero isomagnocurarina. Como já descrito, esses alcaloides já foram isolados de outra espécie pertencente a este gênero (FAN et al., 2019), podendo sugerir que se trata desse alcaloide isoquinolínico.

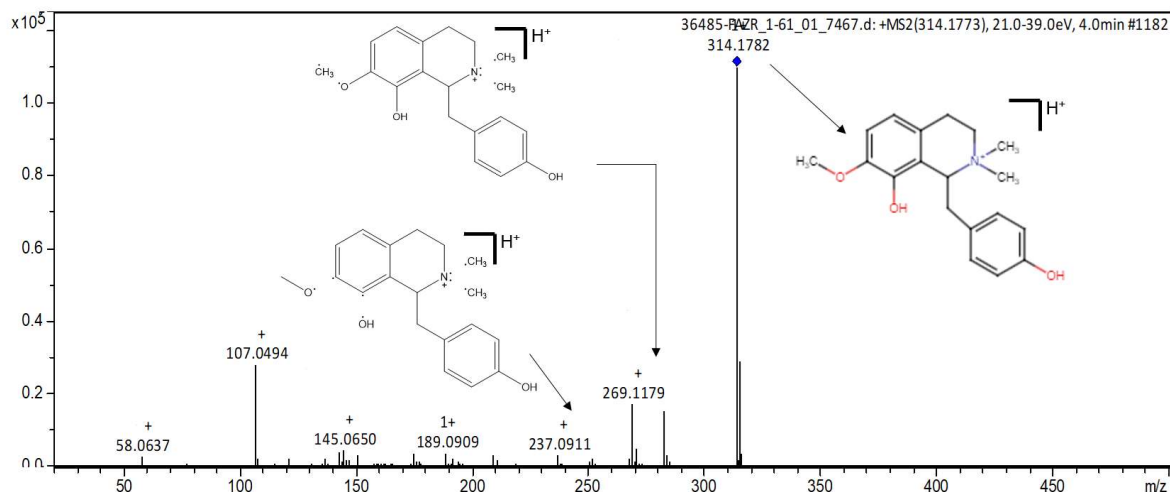


Figura 23. Espectro de massas e fragmentações referentes ao tempo de retenção de 4,0 min. da fração de alcaloides (FA) obtida do extrato etanólico (EE) de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Condições: Sistema obtido por HPLC-MS coluna C18 5 μm (250x4.6 mm); Fase móvel composta por água 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila 0,1% ácido fórmico (B): 0 min. 80% A e 20% de B, 80 min 20% A e 80% B; fluxo 1,0 mL/min; temp. 40°C; ionização ESI+ voltagem com capilar em 4500 eV; voltagem do cone em 500 eV.

No TR de 10,7min foi detectado um pico do íon molecular m/z 332U. A fragmentação sugere um pico m/z de 274 U ($332 - 58$), sendo sugestivo da perda de CH_3 , seguida da perda de CH_2O^2 e N^4+ (Figura 24). Dessa forma, sugere-se que a massa identificada pode tratar-se tanto do alcaloide avicina como do alcaloide sanguinarina, como sugerido nas outras amostras. Por já ter sido isolado da espécie estudada o alcaloide avicina (JULLIAN et al., 2006; TAVARES et al., 2014), sugere-se tratar-se deste alcaloide benzofenantridínico.

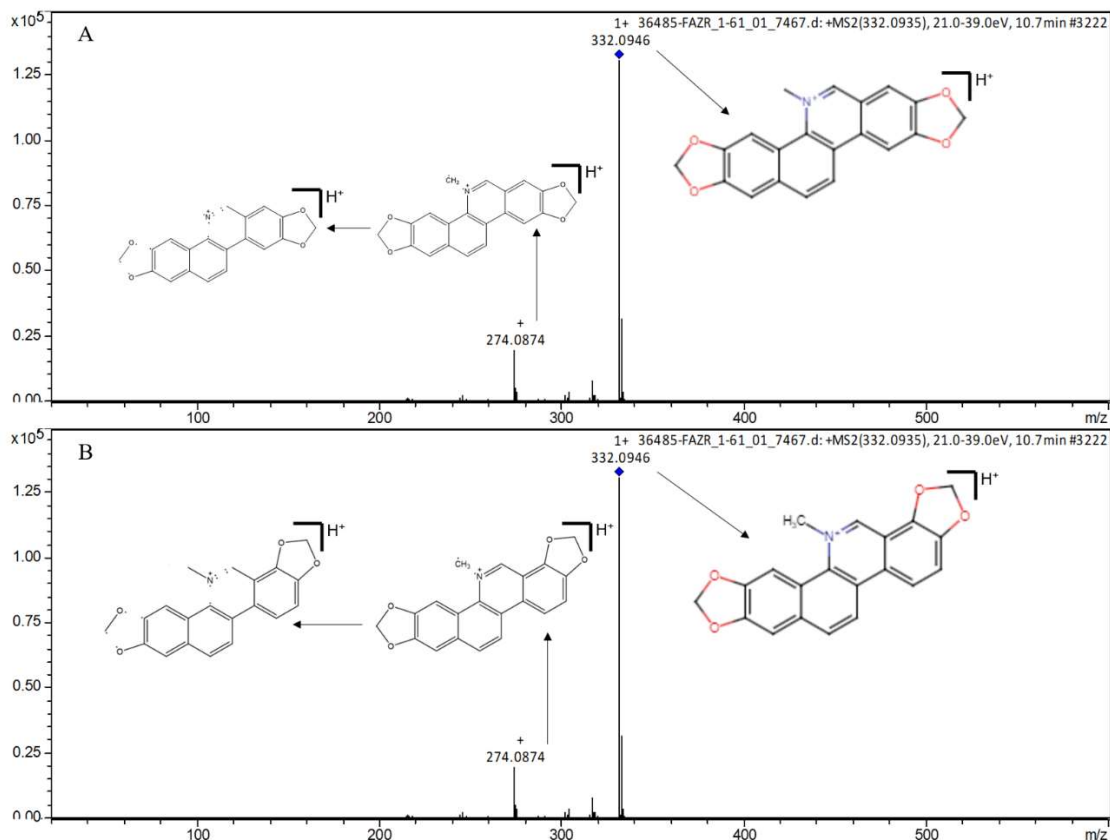


Figura 24. Espectro de massas e fragmentações referentes ao tempo de retenção de 10,7 min. da fração de alcaloides (FA) obtida do extrato etanólico (EE) de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Legenda: A: sugestivo do alcaloide avicina; B: sugestivo do alcaloide sanguinarina.

Condições: Sistema obtido por HPLC-MS coluna C18 5 μ m (250x4.6 mm); Fase móvel composta por água 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila 0,1% ácido fórmico (B): 0 min. 80% A e 20% de B, 80 min 20% A e 80% B; fluxo 1,0 mL/min; temp. 40°C; ionização ESI+ voltagem com capilar em 4500 eV; voltagem do cone em 500 eV.

O espectro de massa no TR de 13,7 min. (ion molecular m/z 348U, fragmentos m/z 254 e 75U; Figura 25) não permitiu propor de qual substância se tratava, no entanto, esta apareceu no espectro de massa da FN, sendo possível fazer uma proposta dos possíveis alcaloides (Figuras 19 e 20).

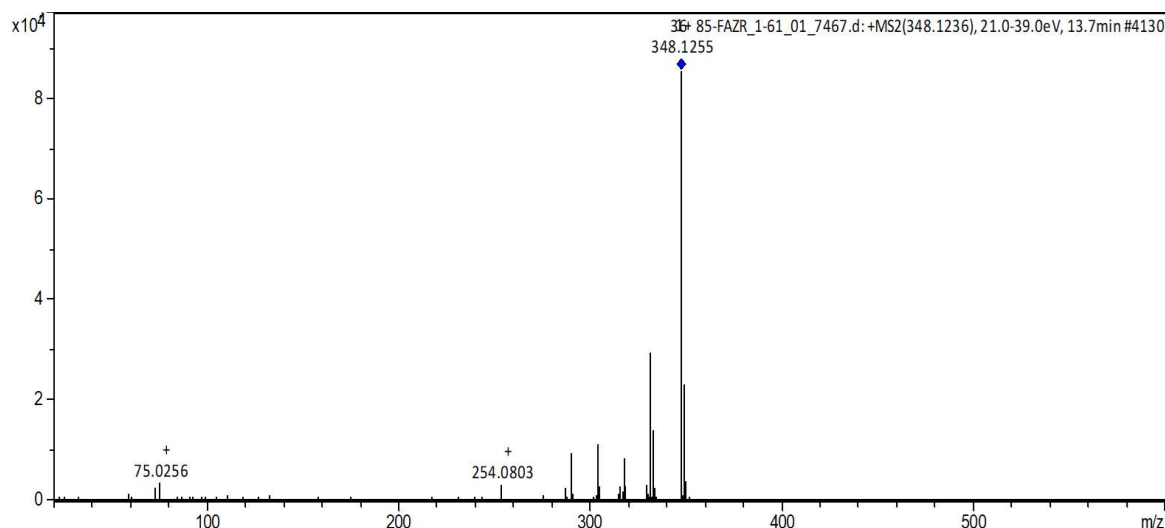


Figura 25. Espectro de massas e fragmentações referentes ao tempo de retenção de 13,7 min. da fração de alcaloides (FA) obtida do extrato etanólico (EE) de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Condições: Sistema obtido por HPLC-MS coluna C18 5 μm (250x4.6 mm); Fase móvel composta por água 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila 0,1% ácido fórmico (B): 0 min. 80% A e 20% de B, 80 min 20% A e 80% B; fluxo 1,0 mL/min; temp. 40°C; ionização ESI+ voltagem com capilar em 4500 eV; voltagem do cone em 500 eV.

Ainda na FA, foi detectado um outro pico do íon molecular não observado no EE, tendo m/z 382 U, no tempo de retenção de 28 min. As principais fragmentações indicam um pico m/z de 364 U referente a $(382 - 18)$, sendo sugestivo da perda de OH. A outra indica um pico m/z de 323 U referente a $(382 - 59)$, sendo sugestivo da perda de $\text{C}_2\text{H}_4\text{NO}$ (Figura 26). Dessa forma, sugere-se que a massa identificada pode tratar-se tanto do alcaloide arnottianamida como de seu isômero, o alcaloide isoartottianamida, alcaloides já isolados do gênero *Zanthoxylum* (HUANG et al., 2019).

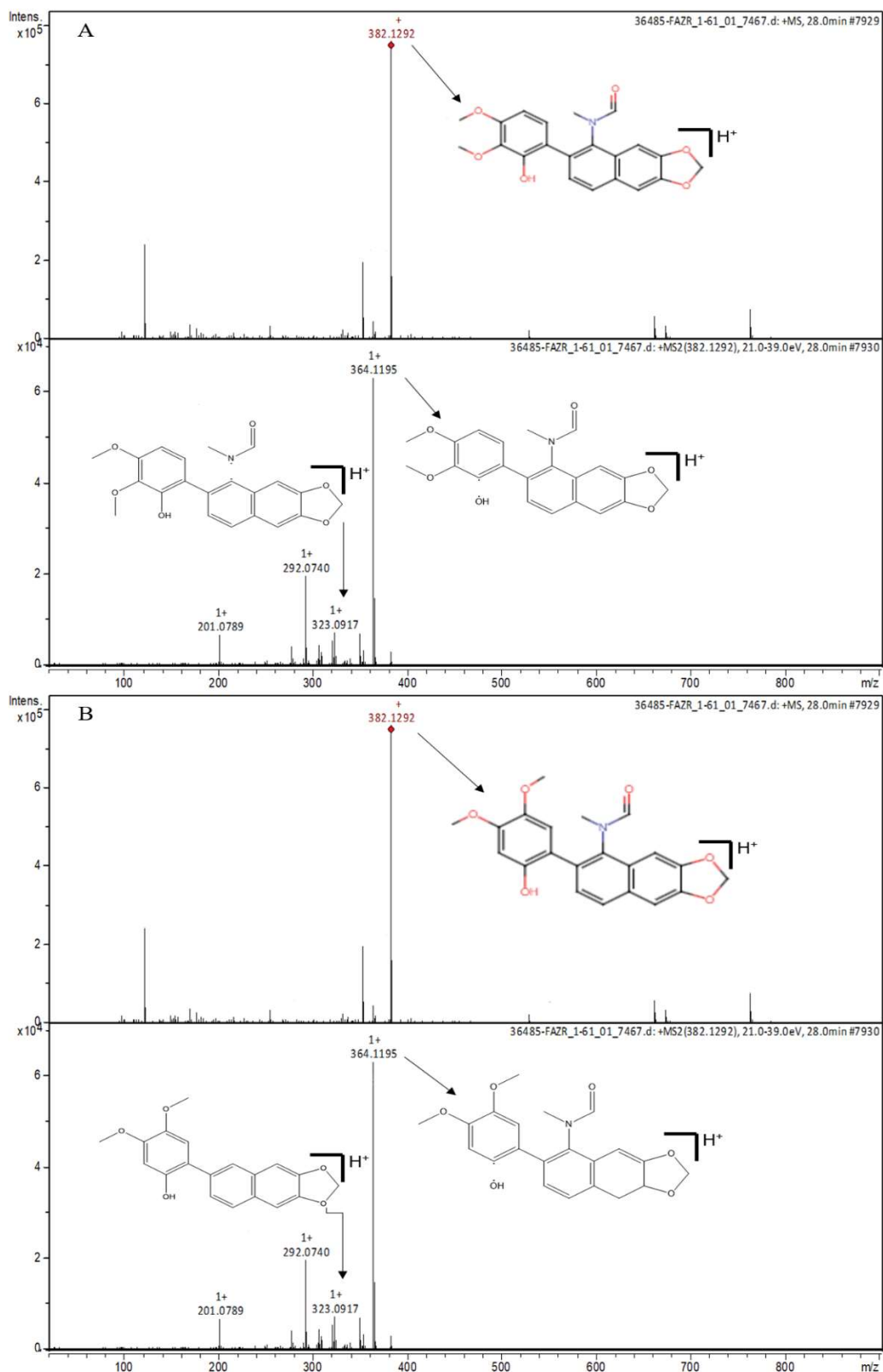


Figura 26 - Espectro de massas e fragmentações referentes ao tempo de retenção de 28,0 min. da fração de alcaloides (FA) obtida do extrato etanólico (EE) de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Legenda: A: sugestivo do arnottianamida; B: sugestivo do alcaloide isoarnottianamida.

Condições: Sistema obtido por HPLC-MS coluna C18 5 µm (250x4.6 mm); Fase móvel composta por água 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila 0,1% ácido fórmico (B): 0 min. 80% A e 20% de B, 80 min 20% A e 80% B; fluxo 1,0 mL/min; temp. 40°C; ionização ESI+ voltagem com capilar em 4500 eV; voltagem do cone em 500 eV.

Em síntese, os estudos em CCD e HPLC sugerem a presença de alcaloides em todas as amostras, onde pode-se sugerir a presença de alguns desses metabólitos a partir do LC-MS (Tabela 2). Os alcaloides sugeridos em ambas as amostras foram avicina, magnoflorina, laurifolina, sanguinarina, cheleritrina, nitdina e oxiavicina, sendo a FN a amostra que apresentou menor grau de complexidade, e dessa forma foi a selecionada para os fracionamentos seguintes.

Tabela 2 - Síntese dos resultados obtidos nos estudos cromatográficos.

Amostras	CCD* alcaloide	HPLC-DAD alcaloide	LC-MS (sugestivo)
EE	+	+	Avicina, magnoflorina, laurifolina, sanguinarina, cheleritrina, nitdina, oxiavicina, magnocurarina, isomagnocurarina
FN	+	+	Avicina, magnoflorina, laurifolina, sanguinarina, cheleritrina, nitdina, oxiavicina
FA	+	+	Avicina, magnoflorina, laurifolina, sanguinarina, cheleritrina, nitdina, oxiavicina, magnocurarina, isomagnocurarina, arnottianamida, isoarnottianamida

Legenda: EE- extrato etanólico; FN- fração de neutros; FA- fração de alcaloide; CCD- Cromatografia em Camada Delgada; HPLC-DAD-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Arranjos Diiodo; LC-MS- Cromatografia Líquida acoplada à espectrofotometria de massa. *Reveladas com lâmpada ultravioleta e Reagente de Dragendorff.

5.1.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA CHELERITRINA

Após maior rendimento da FN, esta foi submetida à CCD preparativa (Figura 27A e 27B), gerando uma subfração (SFN) com massa de 480 mg (Figura 27C). Posteriormente a isso, o filtrado foi submetido a cromatografia em coluna aberta (Figura 27D e 27E), gerando subfrações. Estas foram submetidas a análises em CCD e reunidas subfrações com perfis semelhantes (massa= 100 mg; Figura 27F).

Após nova análise em CCD analítica, percebeu-se que a amostra não estava totalmente pura, sendo essa submetida à nova cromatografia em coluna. As amostras foram triadas por CCD analítica e a amostra que apresentou somente uma banda na região de UV foi levada para identificação em RMN, sendo esta subfração denominada de SUB-FN4.

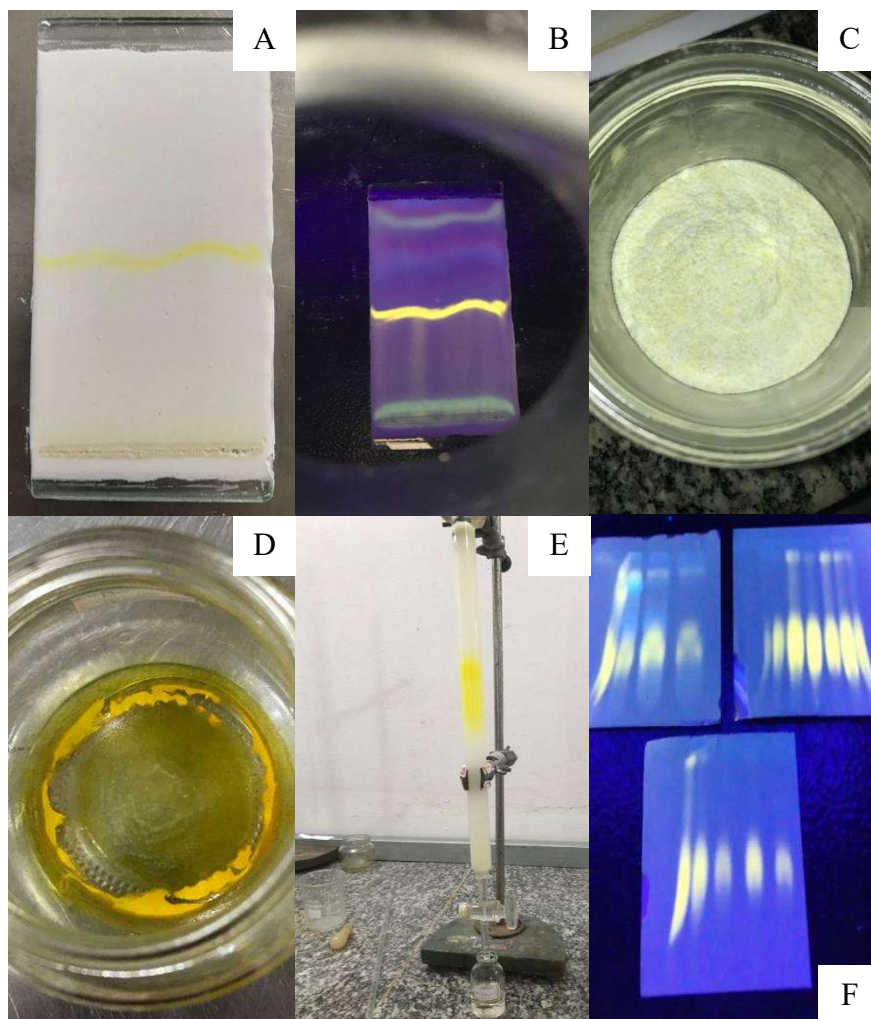


Figura 27 - Análise de cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa de FN.
Condições: Fase móvel - Diclorometano: Metanol (95:5) na CCD preparativa; Fase móvel – Acetato de Etila 100% em coluna cromatográfica aberta.
Legenda: **A:** fração de neutros em luz visível; **B:** fração de neutros em luz Ultravioleta 365nm; **C:** raspagem da FN da CCD preparativa; **D:** rendimento; **E:** o rendimento submetido à cromatografia em coluna aberta; **F:** reunião das subfrações geradas de FN por similaridade em CCD.

A SUB-FN4, quando submetida à análise em RMN¹H apresentou sinais característicos de alcaloides, sendo os principais o singlete em 2,73 ppm atribuído aos hidrogênios da metila ligado ao nitrogênio; o singlete em 3,92 ppm faz referência aos hidrogênios do grupo metoxila ligado a C-7; já o singlete em 3,93 ppm que se refere aos hidrogênios do grupo metoxila ligado a C-8; e o singlete em 6,05 ppm foi atribuído aos hidrogênios do CH₂ do grupo dioxolo (Figura 28, Tabela 3).

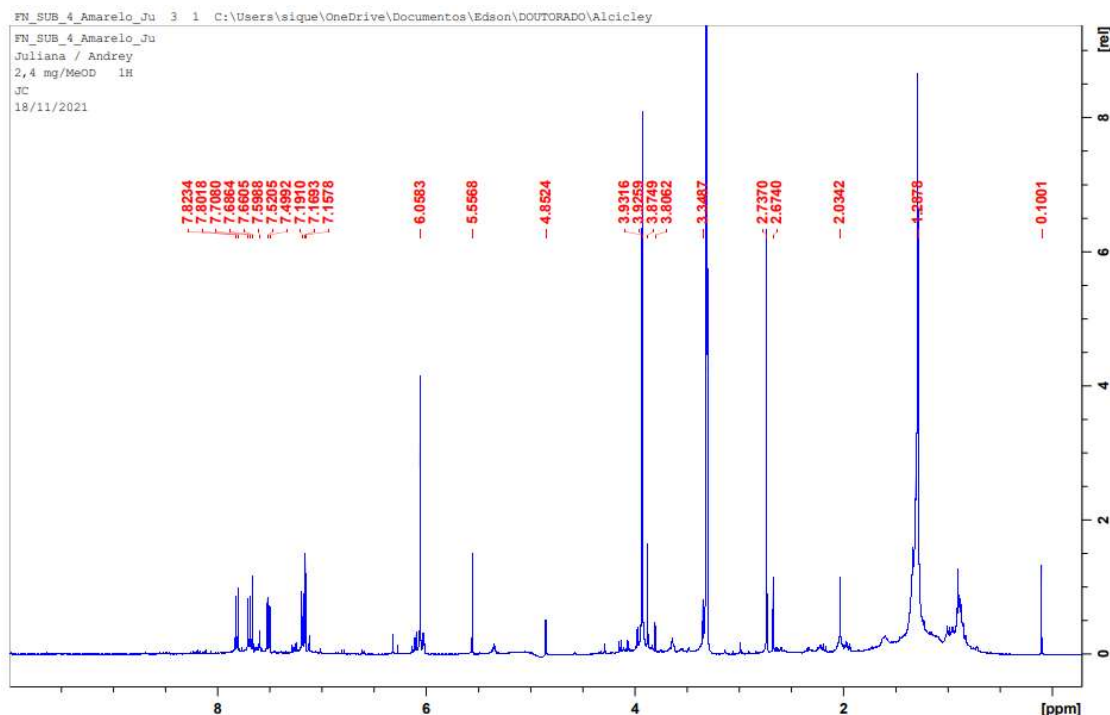


Figura 28 - Espectro de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) de SUB-FN4 obtida da fração de neutros (FN) de *Zanthoxylum rhoifolium*.

No espectro de RMN de ^{13}C dessa substância, foi detectada a presença de 21 sinais (Figura 29), nos quais a maioria faz referência aos carbonos dos anéis aromáticos (Tabela 3). Destaca-se a presença do sinal em 56,7 ppm, que se refere ao carbono da metoxila (C-8); o sinal em 62,1 ppm, que se refere ao carbono da metoxila (C-7), o sinal em 41,1 ppm é referente ao carbono da metila (C-5), e o sinal em 102,8 ppm que faz referência ao C do CH_2 no dioxolo (Tabela 3). Os dados de RMN ^1H e ^{13}C de de SUB-FN4 sugerem que o composto isolado é um alcaloide, entretanto para elucidar a estrutura foi necessário realizar análises de RMN bidimensionais, tais como HMBC e COSY (Figura 30, 31, 32 e 33).

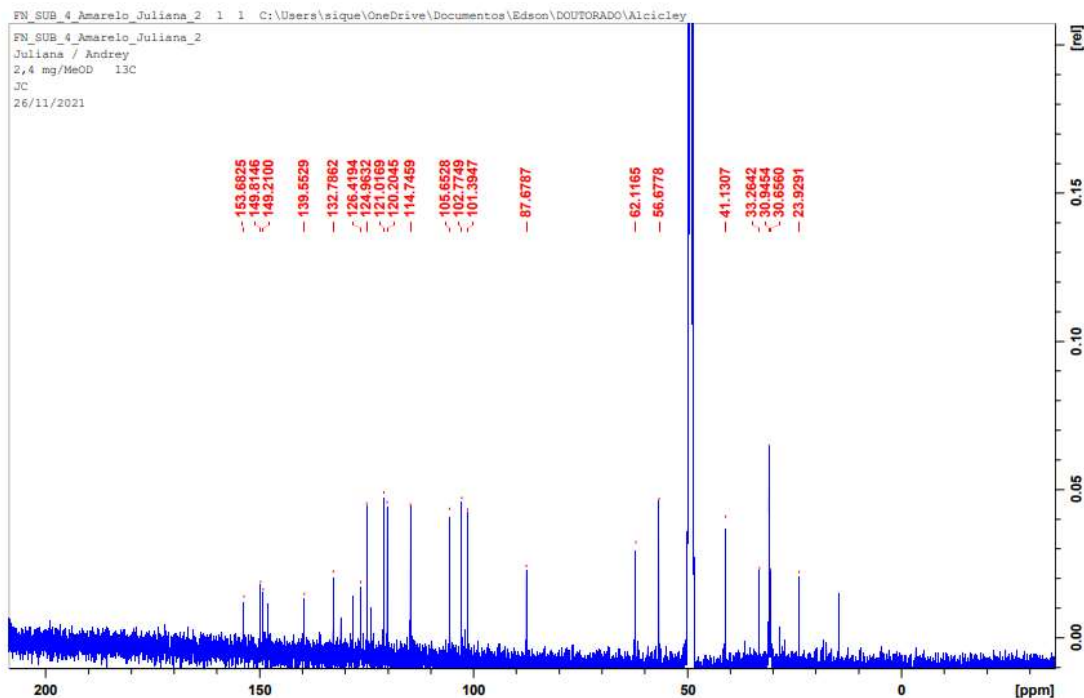


Figura 29 - Espectro de RMN ^{13}C (MeOD, 100 MHz) de SUB-FN4 obtida da fração de neutros (FN) de *Zanthoxylum rhoifolium*.

No experimento bidimensional de HMBC foram observados acoplamentos a longa distância que permitiram elucidar a estrutura final, onde destaca-se as seguintes correlações-chave: entre o H-12 (7,51 ppm) com C-4a (128 ppm) e com o C-10b (123,9 ppm). O H-1 (7,15 ppm) com C-4a (128 ppm). O H-6 (5,55 ppm) com C-6a (126,41 ppm, J_2), com C-7 (148 ppm) e com o C-5 da metila ligada ao nitrogênio (41,13 ppm). O H-9 (7,19 ppm) com C-7 (148 ppm) e com C-10a (126,3 ppm).

O H da metila ligada ao nitrogênio (C-5) em 2,73 ppm, com C-4b (139,55 ppm) com distância de duas ligações (J_2) e com C-6 (87,67 ppm) com distância de duas ligações (J_2). O H da metoxila (C-7) em 3,92 ppm, com C-7 (148,0 ppm) com distância de duas ligações (J_2). O H da metoxila (C-8) em 3,93 ppm, com C-8 (153,68 ppm) com distância de duas ligações (J_2), os quais podem ser observados nas figuras 30 e 31.

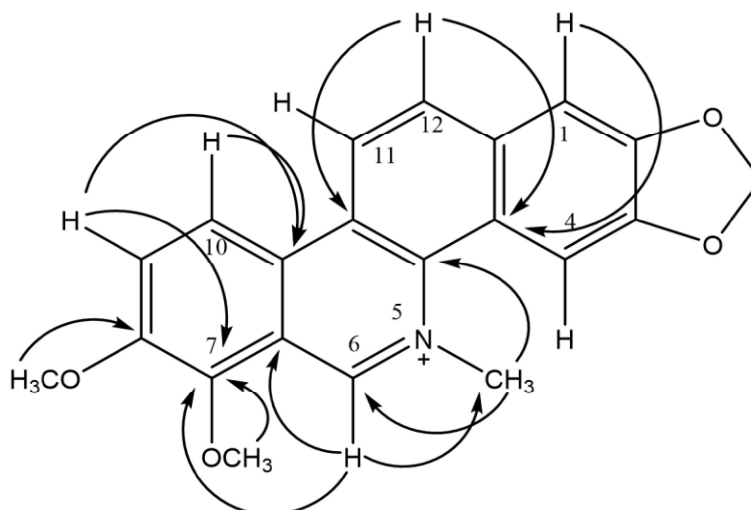


Figura 30 - Correlação de RMN bidimensional de HMBC da SUB-FN4 obtida da fração de neutros (FN) de *Zanthoxylum rhoifolium*.

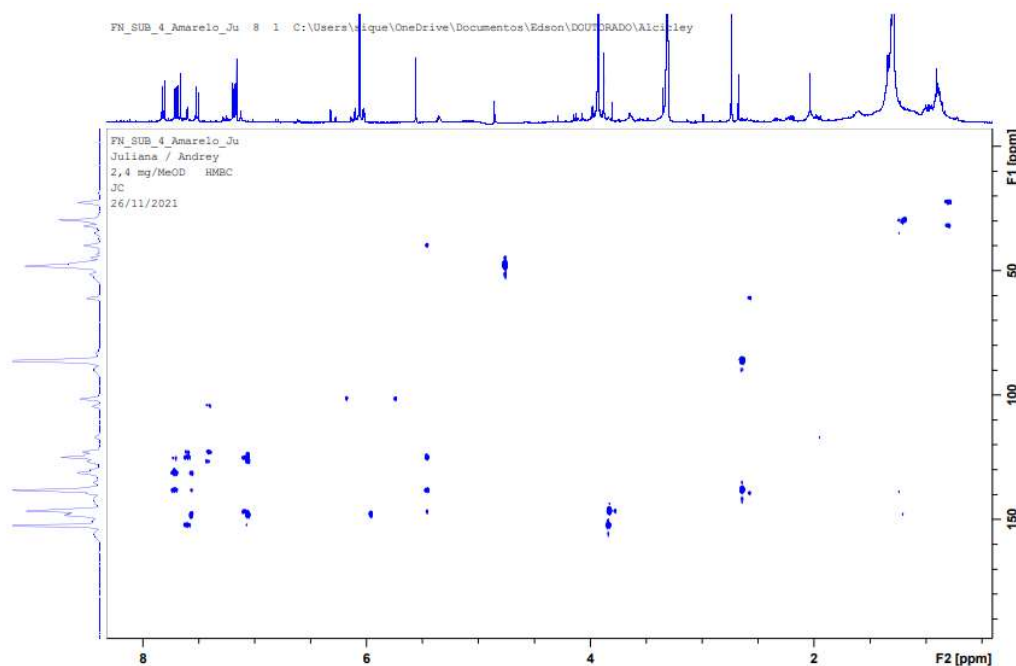


Figura 31 - Espectro de RMN bidimensional de HMBC de SUB-FN4 obtida da fração de neutros (FN) de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Condições: Solvente metanol deuterado e TMS como calibração interna, espectro obtido em aparelho de 100 MHz.

Por fim, a análise em COSY demonstrou dois acoplamentos que permitem ratificar a estrutura, sendo o acoplamento entre o hidrogênio (H-9) com o hidrogênio (H-10); e o acoplamento entre o hidrogênio (H-11) com o hidrogênio (H-12; Figura 32 e 33).

Todas as análises realizadas por métodos espectroscópicos de RMN, permitiram afirmar que SUB-FN4 é o alcaloide cheleritrina (Figura 34).

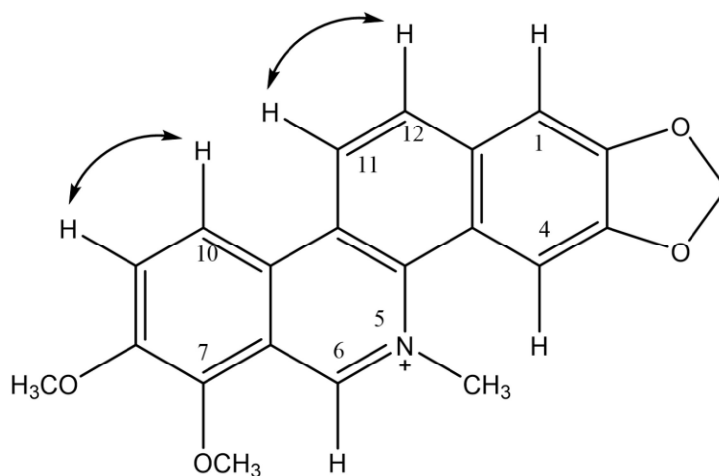


Figura 32 - Correlação de RMN ¹H-¹H COSY da SUB-FN4 obtida da fração de neutros (FN) de *Zanthoxylum rhoifolium*.

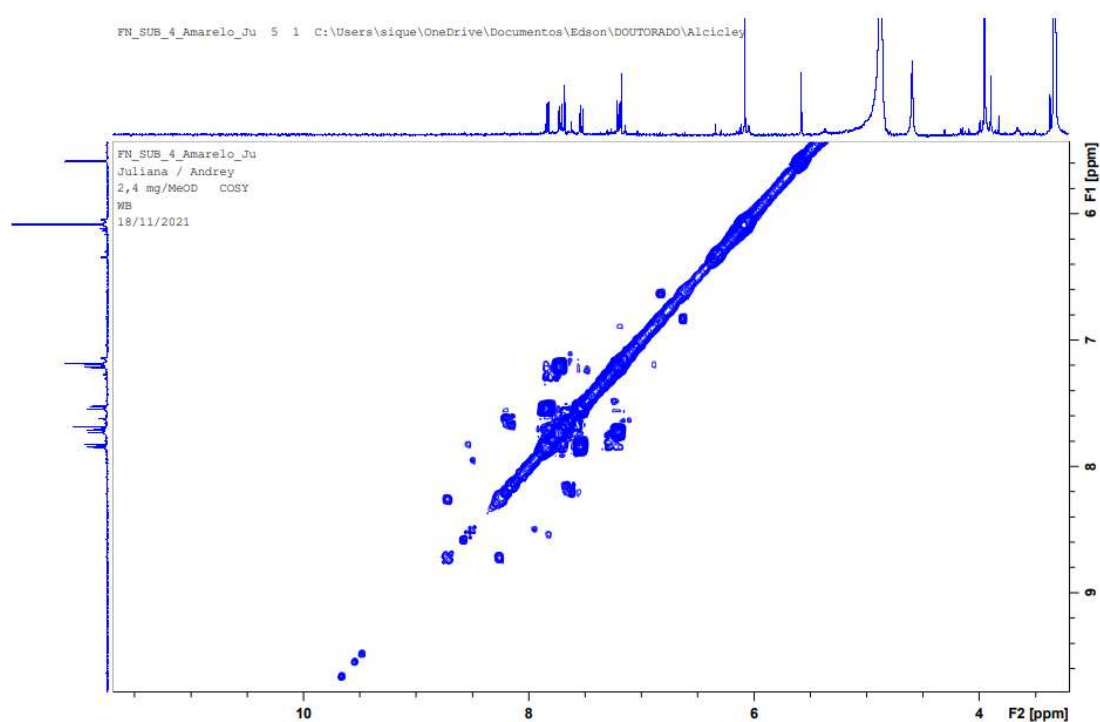


Figura 33 - Espectro de RMN ¹H-¹H COSY de SUB-FN4 obtida da fração de neutros (FN) de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Condições: Solvente metanol deuterado e TMS como calibração interna, espectro obtido em aparelho de 100 MHz.

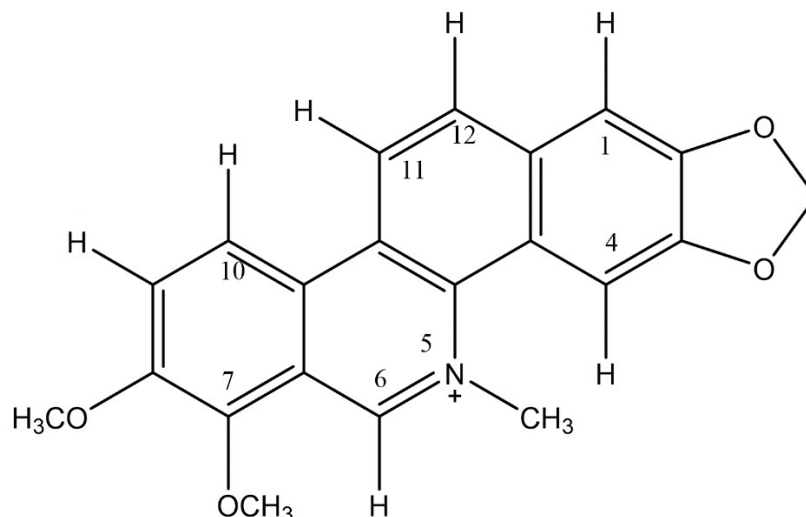


Figura 34 - Estrutura do alcaloide benzonantridínico cheliritrina, isolado da SUB-FN4 obtida da fração de neutros (FN) de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Tabela 3 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (MeOD, 400 MHz) para elucidação do alcaloide benzofenantridínico cheliritrina.

SUB-F4				
Posição	RMN ^1H (mult.)	RMN ^{13}C	HMBC	COSY
1	7,15 (s)	105,6	3 (J_3); 4a (J_3)	
2		149,2		
3		149,8		
4	7,66 (s)	101,4	2 (J_3); 4b (J_3); 12a (J_3)	
4 ^a		128,0*		
4b		139,5		
5				
6	5,55 (s)	87,7	4b (J_2); 6a (J_3); 7 (J_3); 5 da metila (J_3)	
6a		126,4		
7		148,0*		
8		153,7		
9	7,18 (d)	114,7	7 (J_3); 10a (J_3)	H9 ↔ H10
10	7,69 (d)	120,2	10b (J_3); 8 (J_3)	H10 ↔ H9
10a		126,3*		
10b		123,9*		
11	7,81 (d)	121,0	10a (J_3); 4b (J_3); 12a (J_3)	H11 ↔ H12
12	7,51 (d)	124,9	1 (J_3); 4a (J_3); 10b (J_3)	H12 ↔ H11
12a		132,8		
5-CH ₃	2,73 (s)	41,1	4b (J_2); 6 (J_2)	
7-OCH ₃	3,92 (d)	62,1	7 (J_2)	
8-OCH ₃	3,93 (d)	56,7	8 (J_2)	
CH ₂ dioxolo	6,05 (s)	102,8	3 (J_2)	

Legenda: singlete (s); duplete (d); distância de duas ligações (J_2); distância de três ligações (J_3); Heteronuclear MultipleQuantum Coherence (HMBC); homonuclear CORrelated Spectroscopy (COSY); *deslocamento evidenciado através do HMBC.

Outro estudo isolou da fração diclorometano de *Z. rhoifolium* este alcaloide, no entanto os dados de RMN não puderam ser comparados em virtude da diferença de solvente utilizado nos trabalhos, sendo utilizado em outro estudo o DMSO (ZANON, 2010) e no presente trabalho a amostra foi dissolvida em MeOD. Destaca-se que a calibração do eixo de deslocamento químico do espectro varia de acordo com o solvente empregado (SILVA, 2010). Assim uma única faixa integrada é utilizada em todos os espectros. Sendo assim, a diferença de solventes utilizados gera resultados distintos em virtude do valor de referência de cada solvente. Entretanto, todas as análises realizadas permitem afirmar que a substância isolada se trata do alcaloide benzofenantridínico cheleritrina.

5.2. Atividade leishmanicida e seletividade

O EE obtido da casca de *Z. rhoifolium* se apresentou ativo frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* ($CI_{50}=1,3\mu\text{g/mL}$). As frações obtidas da partição ácido-base (FN e FA) também apresentaram atividade antipromastigota ($CI_{50}=1,0\mu\text{g/mL}$ e $CI_{50}=0,9\mu\text{g/mL}$, respectivamente; Tabela 4 e Figura 35). Outro estudo verificou a atividade antileishmanicida em promastigotas de *L. amazonensis* do extrato etanólico de casca de caule de *Z. rhoifolium* e de sua fração n-hexana, e constatou que as duas amostras promoveram um efeito antipromastigota ($CI_{50}= 88,58$ e $19,24\mu\text{g/mL}$, respectivamente; MELO-NETO et al., 2016). No entanto, diferente aos resultados encontrados neste trabalho, cujos resultados foram mais promissores, e podem estar relacionados à presença de alcaloides na composição das amostras testadas (Tabela 2).

Estudos realizados em cromatografia acoplada à espectrometria de massas no EE sugere que as amostras possuem alcaloides aporfínicos, benzofenantridínicos e isoquinolínicos (Figuras 12, 13 e 14; Tabela 2). Destaca-se que alcaloides dessa classe, com ênfase nos alcaloides benzofenantridínicos, já apresentaram atividades antiparasitárias frente a cepas de *Plasmodium* (JULLIAN et al., 2006; BOUQUET et al., 2012; GOODMAN et al., 2019) e cepas de *L. amazonensis* (CASTILLO et al., 2014).

Alcaloides isolados de outras espécies do gênero, como o alcaloide y-fagarina, isolado da espécie *Z. tingoassuiba*, obteve atividade frente a promastigotas de *L. amazonensis* ($CI_{50}= 31,3 \pm 1,4\mu\text{M}$; COSTA et al., 2018). Dessa forma, pode-se sugerir que a atividade das amostras esteja relacionada à presença desses metabólitos em sua composição.

O mecanismo de ação de alcaloides não é completamente elucidado, mas já foi observado que os alcaloides podem inibir um antioxidante essencial da enzima em leishmania, o tripanotiona redutase (FOURNET et al., 2000). Além disso, também podem atuar como inibidores da síntese proteica (ANGENOT et al., 1991), bem como podem exercer seu efeito antileishmania através da ligação com o complexo DNA topoisomerase (BRANDÃO et al., 2010).

Tabela 4 - Determinação da atividade antileishmania (formas promastigotas) do extrato etanólico e frações de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Amostra	CI ₅₀ (µg/mL)	Interpretação
EE	1,3 ± 0,2	Ativo
FN	1,0 ± 0,4	Ativo
FA	0,9 ± 0,2	Ativo
Anfotericina B	0,1 ± 0,0	Ativo

Legenda: CI₅₀ - Concentração Inibitória 50%; EE- Extrato Etanólico; FN- Fração de Neutros; FA- Fração Alcaloídica.

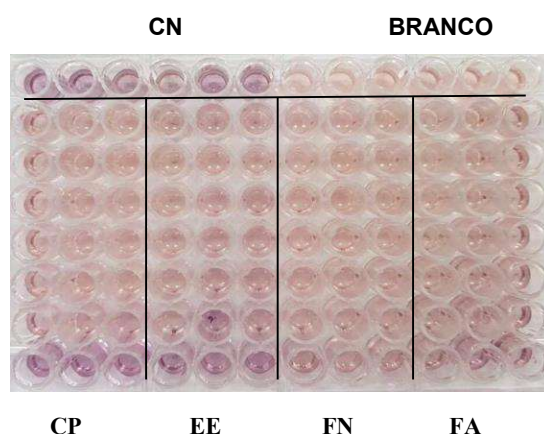


Figura 35 - Atividade antipromastigota do extrato e frações de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Legenda: CP- Controle Positivo; EE- Extrato Etanólico; FN- Fração de Neutros; FA- Fração Alcaloídica.

A atividade do EE e FN foi avaliada frente a formas amastigotas de *L. amazonensis* em um teste piloto. Em todas as concentrações testadas do EE, observou-se inibição da infecção por amastigotas nas células quando comparadas com o controle negativo. As inibições foram, respectivamente, 40%, 25,5% e 27% (Figura 36, Tabela 5), não sendo dependentes da dose, sendo a CI₅₀ > 200mg/mL.

Em outro estudo, verificou-se a atividade antileishmania do extrato etanólico de casca de caule de *Z. rhoifolium*, constatando-se que a amostra promoveu redução da infecção de macrófagos por *L. amazonensis*, de 45%, 38% e 34% nas respectivas concentrações testadas (354; 88,6 e 22,1 µg/mL; MELO-NETO et al., 2016). O resultado encontrado no presente estudo foi divergente, e tal fato pode estar relacionado com a origem do isolamento das cepas testadas nos trabalhos. Destaca-se que dependendo da origem do isolamento das cepas de *Leishmania amazonensis*, a virulência pode ser diferenciada e,

consequentemente, a taxa de infecção de macrófagos pode ser comprometida (MACHADO, 2014).

Além disso, a atividade em amastigotas de espécies de *Leishmania* de alguns extratos já foi avaliada, como a do extrato de diclorometano e do extrato aquoso da casca da raiz de *Zanthoxylum zanthoxyloides* frente a macrófagos RAW infectados com *Leishmania major*, no qual o extrato de diclorometano e o extrato aquoso exibiram elevado impacto na sobrevivência do parasito na forma intracelular na maior concentração testada (35 µg/mL), sendo < 10% (0,9%) para o extrato de diclorometano e entre 10 e 20% (14,5%) para o extrato aquoso (AHUA et al., 2007). Logo, conseguiram reduzir mais de 80% da infecção em macrófagos. A atividade encontrada para o EE no presente estudo foi inferior ao encontrado no estudo citado (AHUA et al., 2007). Uma hipótese para tal resultado é que haja diferença na virulência entre as espécies de *Leishmania* testadas.

A FN também foi avaliada neste estudo, e após tratamento se observou que a taxa de inibição foi de 50%, 38% e 31,7%, respectivamente, sendo a inibição da infecção das amastigotas nos macrófagos considerada dose-dependente, já que na maior dose testada levou a inibição de 50% do parasito (Figura 36; Tabela 5). Sugere-se, assim que a melhor atividade da FN esteja relacionada a maiores teores do alcaloide cheleritrina, pois este metabólito já apresentou efeito promissor quando testado isoladamente em cepas amastigotas de *L. amazonensis* (CASTILLO et al., 2014).

Em um estudo, a atividade de alcaloides benzofenantridínicos isolados da casca da raiz de *Z. rhoifolium* foi avaliada frente a amastigotas (*Leishmania amazonensis*) intramacrófagos (macrófagos peritoneais de ratos) e inferiu-se que os alcaloides cheleritrina e nitidina foram ativos e poderiam ser comparados ao composto de referência (anfotericina B; CASTILLO et al., 2014). Da FN também foi isolado o alcaloide cheleritrina e sugere-se que o alcaloide nitidina também esteja contido nessa fração através da espectrometria de massas, podendo justificar a atividade contida nessa amostra.

No estudo citado, os alcaloides cheleritrina e nitidina apresentaram uma redução de 84,4% e 77,3%, respectivamente na concentração de 2,6 µM (CASTILLO et al., 2014), o que corrobora com a hipótese apresentada de que os alcaloides são responsáveis pela atividade da espécie.

Tabela 5 - Avaliação da atividade anti-amastigota do extrato etanólico (EE) e fração de neutros (FN) em macrófagos (RAW 264.7) infectados com amastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Amostras	Índice de Inibição (%)		
	Concentrações (µg/mL)		
	200	100	50
EE	40 ± 4,3	25,5 ± 2,1	27 ± 7,0
FN	50 ± 5,6	38 ± 1,4	31,7 ± 3,1
Amostras	Concentrações (µg/mL)		
	10	5	2,5
	Anfotericina B	93 ± 1,5	85 ± 5,0

Legenda: EE – extrato etanólico; FN – Fração de neutros.

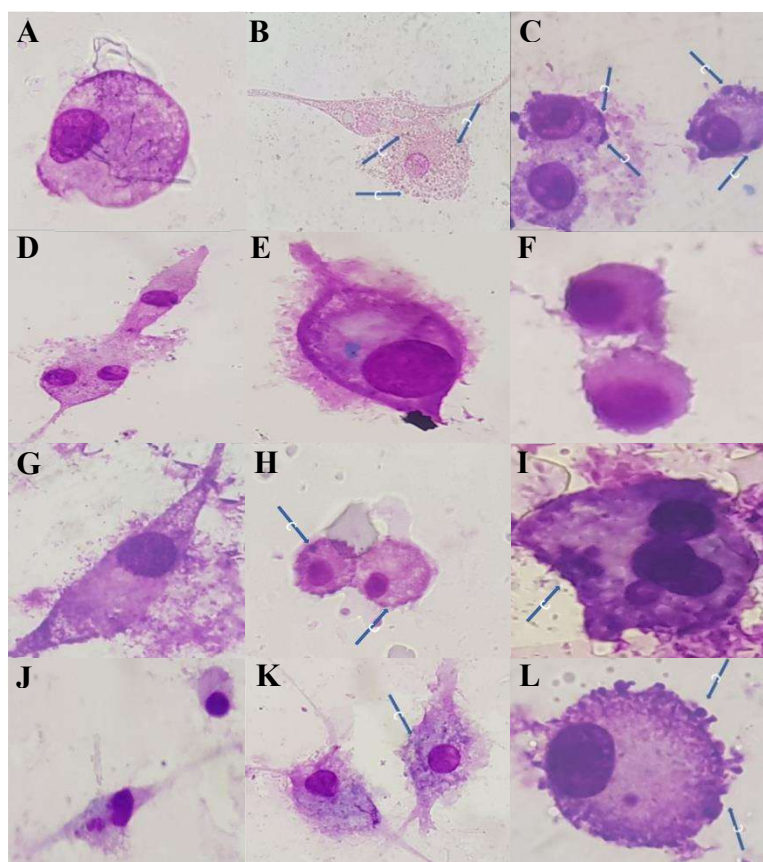


Figura 36 - Atividade anti-amastigota (*L. amazonensis*) do extrato etanólico (EE) e fração de neutros (FN) obtidos das cascas de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Legenda: **A:** Controle de macrófagos não infectados (aumento de 40x); **B:** Controle negativo; **C:** Controle do solvente; **D:** Ação anti-amastigota da Anfotericina B na concentração de 10 µg/mL (aumento de 40x); **E:** Ação anti-amastigota da Anfotericina B na concentração de 5 µg/mL (aumento de 40x); **F:** Ação anti-amastigota da Anfotericina B na concentração de 2,5 µg/mL (aumento de 40x). **G:** Ação anti-amastigota do extrato etanólico (EE) na concentração de 200 µg/mL (aumento de 40x); **H:** Ação anti-amastigota do extrato etanólico (EE) na concentração de 100 µg/mL (aumento de 40x); **I:** Ação anti-amastigota do extrato etanólico (EE) na concentração de 50 µg/mL (aumento de 40x); **J:** Ação anti-amastigota da fração de neutros (FN) na concentração de 200 µg/mL (aumento de 40x); **K:** Ação anti-amastigota da fração de neutros (FN) na concentração de 100 µg/mL (aumento de 40x). **L:** Ação anti-amastigota da fração de neutros (FN) na concentração de 50 µg/mL (aumento de 40x). As setas indicam a presença de amastigotas.

Ressalta-se que o medicamento utilizado como controle positivo no ensaio e também utilizado como alternativa terapêutica para o tratamento da leishmaniose apresenta toxicidade em humanos, principalmente renal, bem como necessita que o paciente esteja em uma unidade de internação para administração parenteral por infusão lenta (CROFT; COOMBS, 2003). E embora apresente formulações com apresentação lipossomal, o que reduz tais efeitos (ANTONIADOU; DUPONT, 2005), ainda apresenta elevado custo, o que também limita sua aplicação. Dessa forma, a FN, amostra que reduziu 50% da infecção na dose de 200 µg/mL, pode se tornar uma candidata à nova terapia com menor custo e perfil melhorado de toxicidade.

Visando avaliar se realmente o EE, FN e FA possuem baixos potenciais citotóxicos, estes foram submetidos ao ensaio de viabilidade celular (MTT e TTC) utilizando células VERO e J774, respectivamente. Na análise da citotoxicidade frente a células VERO, o EE e a FA obtidos de *Z. rhoifolium* foram considerados moderadamente citotóxicos (CC₅₀: 330,6µg/mL e 111,7µg/mL, respectivamente; Tabela 6). Em contrapartida, a fração de neutros (FN) advinda do EE de *Z. rhoifolium*, não foi citotóxica, apresentando uma CC₅₀ de 831,9µg/mL (Tabela 6). Destacando que o fracionamento do EE contribuiu para a diminuição da citotoxicidade da FN (Tabela 6).

Quando se correlacionam os dados da atividade antipromastigota com os de citotoxicidade em células VERO, destaca-se que ambas as amostras apresentaram elevado índice de seletividade, onde o EE apresentou índice de seletividade (IS) de 252,5; e a FN e FA, advindas da partição ácido-base, apresentaram IS de 826,1 e 119,7, respectivamente, sendo todas as amostras consideradas bastante seletivas para os parasitos (Tabela 6). Destaca-se ainda, que a fração de neutros foi a mais seletiva neste estudo.

Pela primeira vez, foi descrito no presente estudo a elevada seletividade do EE, FN e FA, fato interessante, pois como as células VERO são advindas do principal órgão excretor de substâncias, os rins, faz-se necessário analisar a toxicidade de um possível novo fármaco neste órgão (BASTOS, 2017). Além disso, a principal reação adversa dos fármacos disponíveis para a leishmaniose é a nefrotoxicidade (CROFT; COOMBS, 2003), ressaltando a importância de analisar a citotoxicidade em células advindas deste órgão.

Quando analisados os resultados frente a células J774, percebeu-se que o EE e a FN foram moderadamente citotóxicos (CC_{50} : 107,45 $\mu\text{g/mL}$ e 112,1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente; Tabela 6), já a FA foi considerada citotóxica (CC_{50} : 44,96 $\mu\text{g/mL}$), no entanto, as três amostras apresentaram elevado IS para os parasitos (82,65; 112,1 e 49,95, respectivamente; Tabela 6), sendo a FN, também, a mais seletiva. Esse resultado pode estar diretamente ligado às diferentes concentrações de alcaloides e também outros metabólitos nas amostras, por isso, as respostas de citotoxicidade e seletividade foram diferentes. Além disso, pode estar diretamente ligado ao fato de que os métodos apresentados evidenciam linearidade e sensibilidade diferentes (MARTIN, CLYNES, 1993).

A citotoxicidade de extratos já foi avaliada em estudos anteriores, como no estudo que avaliou a citotoxicidade do extrato etanólico de casca de caule de *Z. rhoifolium* pela determinação de concentração citotóxica (CC_{50}) frente a macrófagos peritoneais murinos, onde os resultados indicaram que a amostra pode ser moderadamente ou não citotóxica, obtendo uma $CC_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$. Além de também apresentar seletividade toxicológica para formas promastigotas de *L. amazonensis*, ao invés de macrófagos, obtendo índice de seletividade $> 24,37$ (MELO-NETO et al., 2016).

Fato semelhante foi encontrado para a fração n-hexana de *Z. rhoifolium*, que também apresentou moderada ou não citotoxicidade em macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos Swiss ($CC_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$) e seletividade toxicológica para formas promastigotas de *L. amazonensis*, ao invés de macrófagos, obtendo índice de seletividade $> 29,28$ (MELO-NETO et al., 2016).

O encontrado foi semelhante ao descrito no presente estudo quanto à citotoxicidade em células normais, mas destaca-se que os IS encontrados para EE, FN e FA foram mais promissores, destacando o potencial leishmanicida promissor da espécie *Z. rhoifolium*, com destaque para FN. Destaca-se, ainda, que um elevado IS é uma característica valiosa de medicamentos eficazes para o tratamento da leishmaniose (MELO-NETO et al., 2016).

Tal fato encontrado pode estar relacionado à presença de alcaloides benzofenantridínicos em maior concentração, como o alcaloide cheleritina isolado dessa fração no presente trabalho. Destaca-se que os alcaloides podem gerar citotoxicidade por indução de apoptose através da elevação de espécies

reativas de oxigênio, modulação da função mitocondrial, bem como da inibição da DNA topoisomerase-I (BADMUS et al., 2020).

Ressalta-se que a capacidade de um composto apresentar citotoxicidade e inibição para protozoários destacada através do índice de seletividade (IS) é um importante critério na pesquisa de compostos ativos com potencial terapêutico contra Leishmania, pois determina a ausência de efeitos tóxicos nas células do hospedeiro (NAKAMURA et al., 2006). Dessa forma, destaca-se a FN como a mais promissora no presente estudo.

Tabela 6 - Avaliação da citotoxicidade do extrato e frações (FN e FA) e índice de seletividade de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Amostras	CC ₅₀ (µg/mL) - VERO	CC ₅₀ (µg/mL) - J774	CI ₅₀ (µg/mL)	IS - VERO	IS - J774
EE	330,6 ± 0,8	107,45 ± 0,4	1,3 ± 0,2	252,5	82,65
FN	831,9 ± 0,6	112,1 ± 0,2	1,0 ± 0,4	826,1	112,1
FA	111,7 ± 0,8	44,96 ± 0,9	0,9 ± 0,2	119,7	49,95
Anfotericina B	-	32,97 ± 0,9	0,1 ± 0,0	-	329,7

Legenda: CI₅₀- Concentração Inibitória 50%; CC₅₀- Concentração Citotóxica 50%; IS- Índice de Seletividade; EE- Extrato Etanólico; FN- Fração de Neutros; FA- Fração Alcaloídica.

5.2 Atividade cicatrizante e proliferativa de *Z. rhoifolium*

Na leishmaniose tegumentar, o sujeito pode apresentar uma ferida de difícil cicatrização e em virtude disso surgiu o seguinte questionamento: “será que além do potencial antiparasitário a planta possui atividade cicatrizante?”. Então, inicialmente, foi avaliado sua ação proliferativa em linhagens de queratinócitos (HaCaT) e fibroblastos primários, utilizando o ensaio de sulforrodamina B - SRB. Em seguida, foi realizado o ensaio de migração celular

Em células HaCaT, o EE e frações (FN e FA) não apresentaram citotoxicidade nas menores concentrações (30 a 125 µg/mL; Figura 37). Enquanto que, nas concentrações de 250 a 700 µg/mL houve diminuição significativa da proliferação celular quando comparada ao grupo controle. Estes resultados sugerem que quanto maior a concentração testada, menor será a

proliferação celular quando comparada ao grupo controle, indicando que as menores concentrações são menos citotóxicas.

O EE foi submetido ao ensaio para avaliar o seu efeito na proliferação celular de HaCaT, sendo observado maior proliferação nas células tratadas com EE em menores concentrações (15 a 125µg/mL) que no controle negativo. Nas demais concentrações (250 a 700 µg/mL) houve uma redução na proliferação celular ocasionado pelo EE (Figura 37). Ainda foi avaliado o potencial na proliferação celular em fibroblastos, sendo observado que, nas concentrações de 15 a 60 µg/mL, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao controle negativo. No entanto, nas demais concentrações (125 a 700mg/mL) observou-se um efeito inibitório na proliferação celular, sugerindo citotoxicidade (Figura 37). A citotoxicidade deste extrato nas células VERO e J774, observou-se um efeito citotóxico moderado.

Além do EE, avaliou o efeito proliferativo das frações (FN e FA) em HaCaT e fibroblastos. Quando a HaCaT foi tratada com FN, houve um aumento na proliferação celular ($p < 0,05$) nas concentrações de 15 a 60µg/mL, enquanto que nas concentrações de 250 a 700µg/mL houve um efeito inibitório na proliferação celular ($p < 0,05$). Resultados bem semelhantes foram obtidos no ensaio com fibroblastos, isto é, nas concentrações de 15 a 60µg/mL houve um aumento na proliferação e nas demais observou efeito inibitório (Figura 37). Ressalta-se que nesta fração não foi observada citotoxicidade para a célula VERO e apenas uma moderada citotoxicidade para a J774.

Quando comparado ao controle negativo, em células HaCaT tratadas com FA não se observou diferença significativa na proliferação celular ($p > 0,05$), sugerindo que não seja citotóxica para esta linhagem nas concentrações de 15 a 125µg/mL (Figura 37). Ainda foi avaliado o potencial na proliferação celular de FA em fibroblastos, sendo observado nas concentrações de 15 a 60 µg/mL não houve diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao controle negativo. No entanto, nas demais concentrações (125 a 700mg/mL) observou-se um efeito inibitório na proliferação celular, sugerindo certa citotoxicidade (Figura 37). Quando se compara estes resultados aos resultados de citotoxicidade para célula VERO (moderadamente citotóxica) e célula J774 (citotóxica), verifica-se que o potencial citotóxico das amostras não é igual para todas as linhagens celulares, podendo variar de célula para célula.

A diferença encontrada nos resultados em linhagem de queratinócitos (HaCaT) e de fibroblastos podem ter algumas explicações, são elas: comportamentos fisiológicos e citomorfológicos distintos apresentados pelas linhagens (TARÔCO, 2016). Os queratinócitos são uma linhagem imortalizada, já o fibroblasto primário pode ser mais sensível a efeitos citotóxicos.

Dentre as principais características que os fitocompostos devem apresentar para auxiliar no processo de cicatrização está a contribuição da amostra para o aumento da proliferação celular (atividade mitogênica; GHOSH; GABA, 2013). Dessa forma destaca-se que, em baixas doses e frente a células da linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT), as amostras utilizadas são promissoras para o processo de cicatrização.

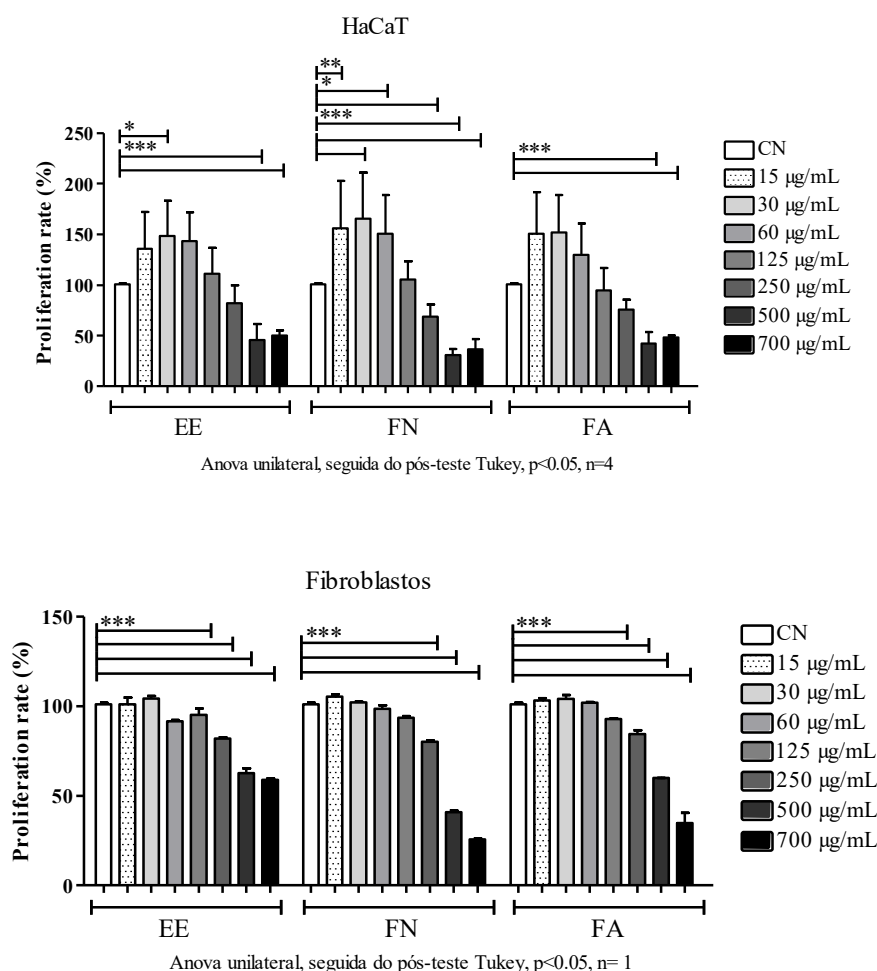


Figura 37 - Avaliação do efeito proliferativo de *Z. rhoifolium* para queratinócitos (HaCaT) e fibroblastos primários normais.

Legenda: **EE:** extrato etanólico de *Zanthoxylum rhoifolium*; **FN:** fração de neutros de *Zanthoxylum rhoifolium*; **FA:** fração de alcaloides de *Zanthoxylum rhoifolium*. Análise de variância e pós-teste de Tukey $p < 0,05$, $n = 1$. Asteriscos(*) indicam diferenças entre as concentrações.

Devido ao potencial proliferativo das amostras em HaCaT, foi avaliado o seu potencial cicatrizante através do ensaio de migração celular. Todas as amostras foram testadas em 2 concentrações (15 e 30µg/mL), sendo observado nas células tratadas com EE, na concentração de 15µg/mL, progressão no fechamento da ferida de forma tempo dependente, isto é, somente no tempo de 72h houve o completo fechamento. No entanto, quando a HaCaT foi tratada com 30µg/mL de EE não se observou efeito potencial de cicatrização nos tempos avaliados (Figuras 38 e 41).

Ainda se avaliou o efeito na migração celular de HaCaT da FN nas mesmas concentrações do EE. Diferente do extrato, observou-se a migração celular nas duas concentrações usadas, porém o efeito foi mais pronunciado na concentração mais baixa. De forma similar ao EE, o efeito máximo foi observado no maior tempo de exposição (Figuras 39 e 41).

Diferente do EE e FN, a FA apresentou um efeito de migração celular de menor intensidade, sendo que na concentração de 15µg/mL e no tempo de 72h houve uma migração celular mais pronunciada e bem similar ao controle negativo. Nos demais tempos e na concentração de 30µg/mL, não se observou efeito significativo no processo de migração (Figuras 40 e 41).

Sabe-se que plantas que possuem alcaloides podem ser promissoras como cicatrizantes e a literatura descreve esta relação. Alguns exemplos são: *Bowdichia virgilioides*, que apresenta alcaloides como acosmina, ormosanina e podopetalina (BARBOSA-FILHO et al., 2004) e sua atividade cicatrizante foi demonstrada em camundongos com ferida não infectada e infectada, induzindo deposição de colágeno, aumento na contagem de fibroblastos e poucas células inflamatórias, bem como o aumento na expressão de colágeno tipo I (AGRA et al., 2013), sugerindo que seus constituintes podem atuar na fase proliferativa da cicatrização.

Outro exemplo é a *Solanum xanthocarpum*, que reduziu no período de epitelização, somada a uma diminuição acentuada na área da cicatriz em ratos com feridas expostas (DEWANGAN et al., 2012).

Por fim, a espécie *Morinda citrifolia* L., rica em metabólitos como alcaloides e triterpenoides, apresentou efeito cicatrizante significativo em ratos com feridas expostas, onde constatou-se aumento na taxa de contração da ferida (redução de 71% na área da ferida), na taxa de epitelização e no peso do tecido

de granulação (fibroblastos, colágeno, edema e novos pequenos vasos sanguíneos), o que sugere que houve maior conteúdo de colágeno. Além disso, na análise histológica do tecido de granulação identificou-se bandas aumentadas e bem organizadas de colágeno, mais fibroblastos e poucas células inflamatórias e dessa forma sugere-se que os constituintes presentes no extrato da espécie (alcaloides e triterpenoides) agem como promotores da formação de colágeno, atuando na fase proliferativa da cicatrização de feridas (NAYAK; SANDIFORD; MAXWELL, 2009).

Durante a cicatrização, uma das etapas é a fase proliferativa (VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009) que é primariamente composta por fibroblastos, colágeno, edema e novos pequenos vasos sanguíneos (NAYAK; SANDIFORD; MAXWELL, 2009), e talvez a *Z. rhoifolium* atue nesta mesma fase. Sabe-se que já foi relatado em estudo etnobotânico realizado na Amazônia Legal Brasileira o uso tópico do decocto ou macerado de cascas ou frutos da espécie *Z. rhoifolium* para a cicatrização de feridas (RIBEIRO et al., 2017), corroborando ao encontrado no estudo, onde as cascas de *Z. rhoifolium* foram maceradas e fracionadas, obtendo a FN, amostra que apresentou maior potencial cicatrizante.

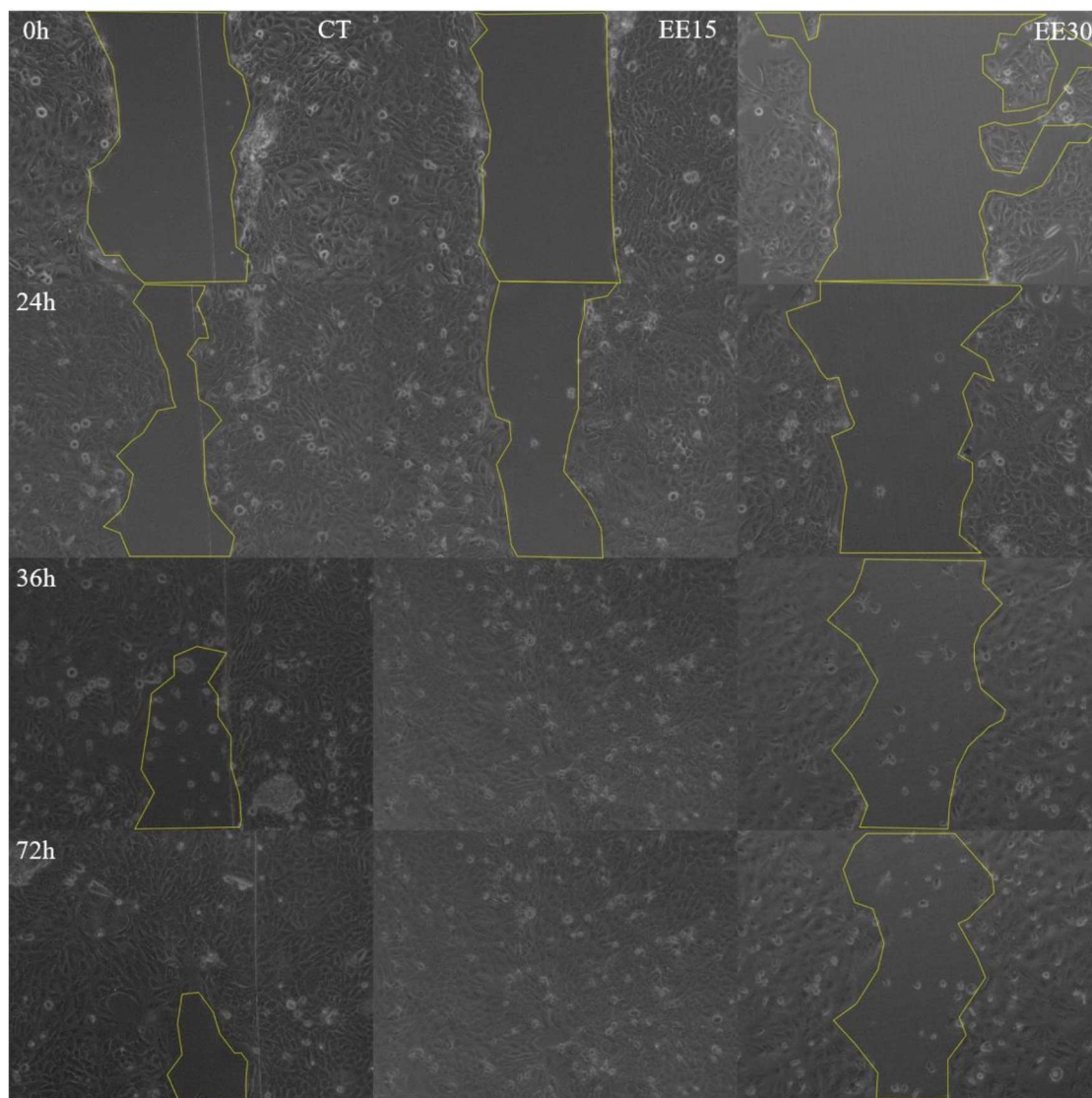


Figura 38 - Ensaio de cicatrização do extrato etanólico em células HaCaT de *Zanthoxylum rhoifolium*. Fechamento das feridas em 0, 24, 48 e 72h.
Legenda: EE: extrato etanólico de *Zanthoxylum rhoifolium*.

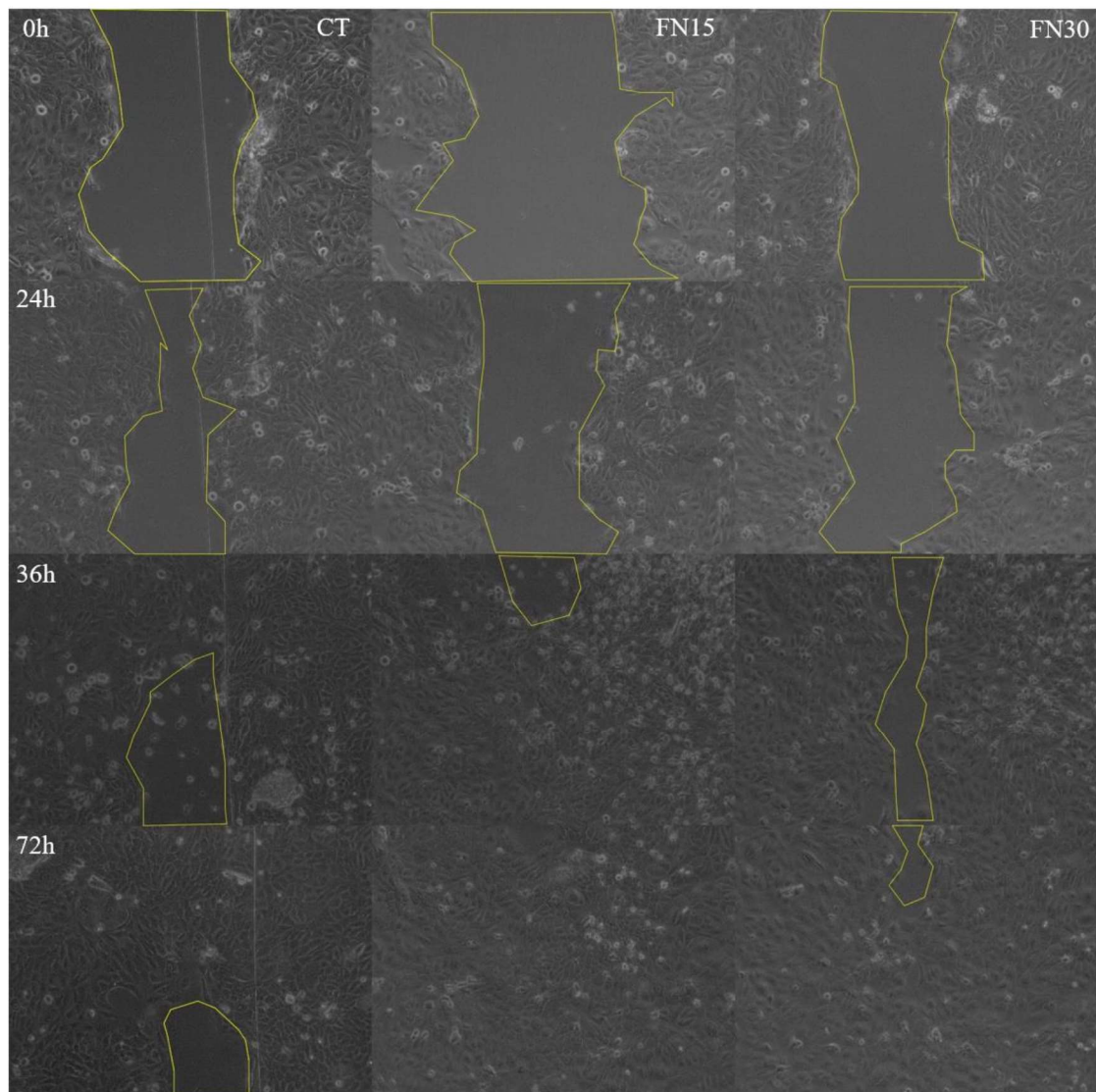


Figura 39 - Ensaio de cicatrização da fração de neutros em células HaCaT de *Zanthoxylum rhoifolium*. Fechamento das feridas em 0, 24, 48 e 72h.
Legenda: FN: fração de neutros de *Zanthoxylum rhoifolium*.

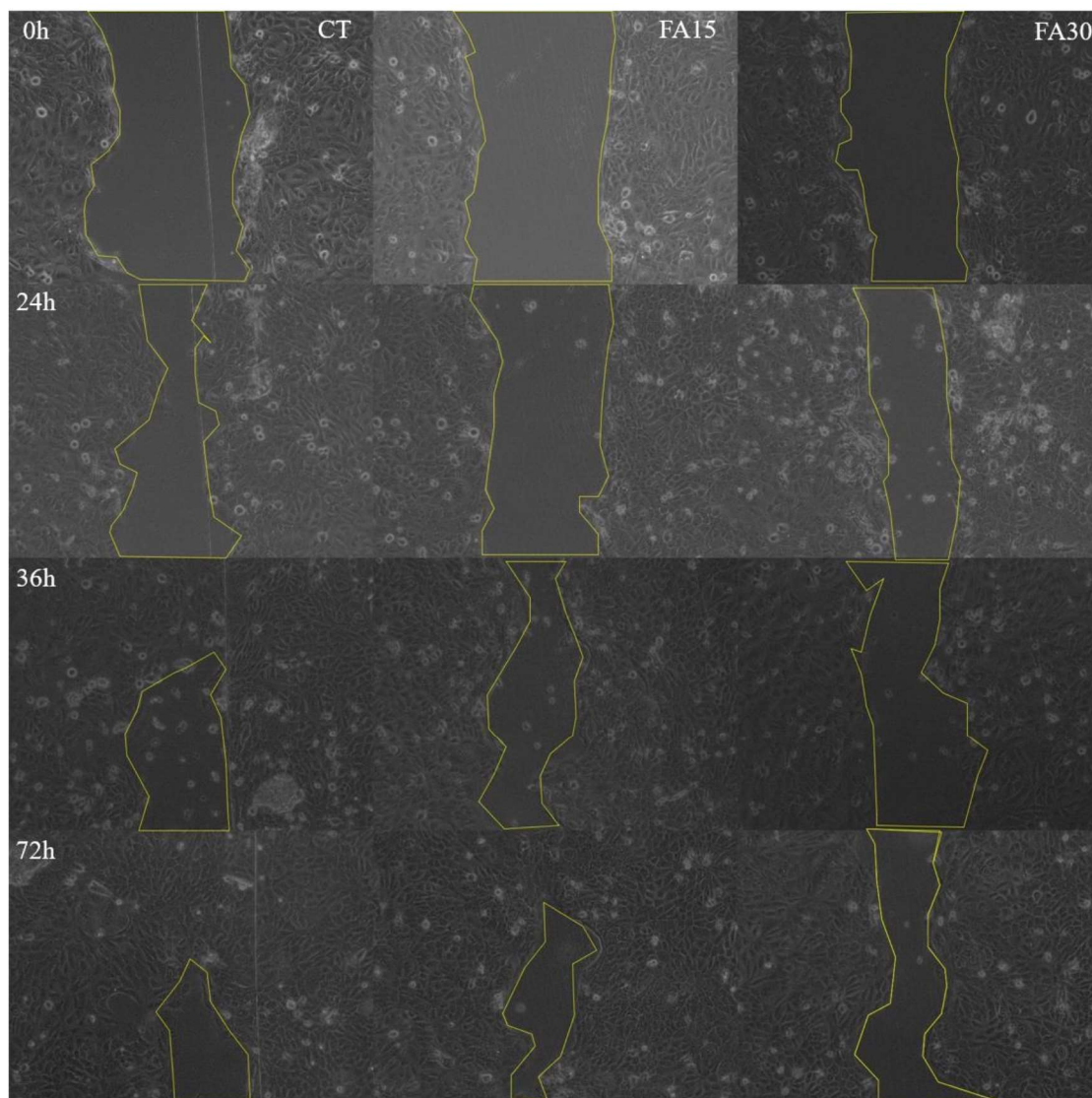


Figura 40 - Ensaio de cicatrização da fração de alcaloides em células HaCaT de *Zanthoxylum rhoifolium*. Fechamento das feridas em 0, 24, 48 e 72h.

Legenda: FA: fração de alcaloides de *Zanthoxylum rhoifolium*.

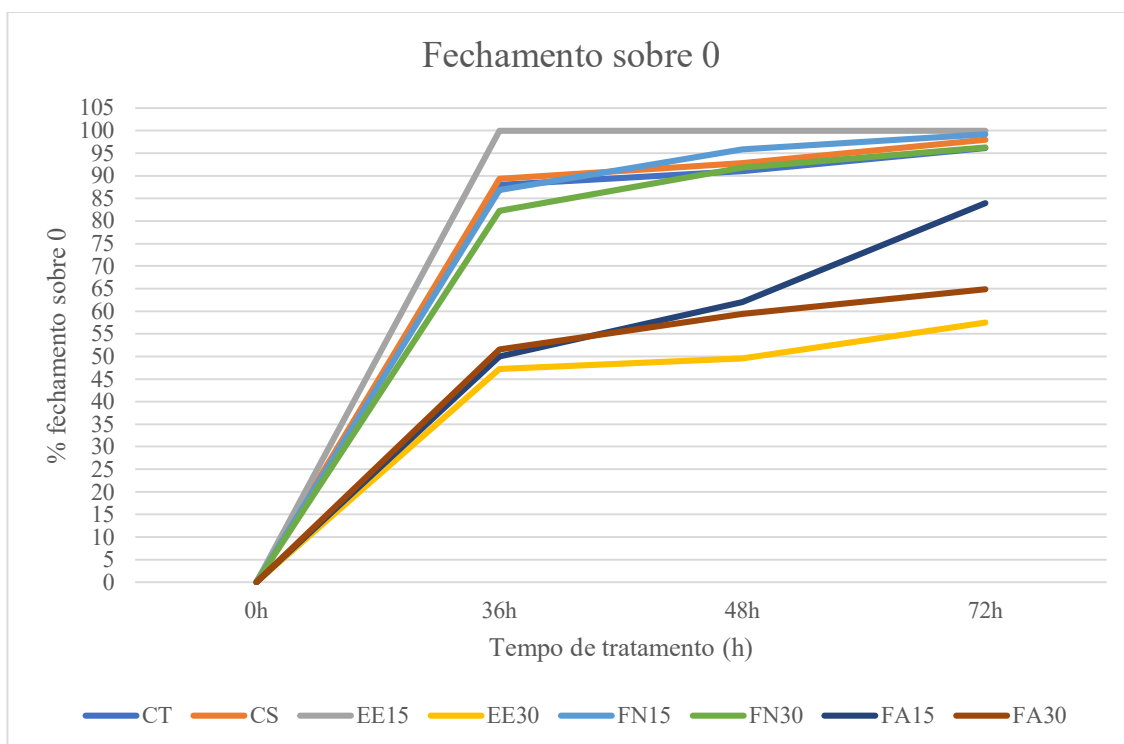


Figura 41 - Fechamento sobre 0 do extrato e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* em células HaCaT nos tempos de 0h, 36h, 48h e 72h.

Legenda: EE: extrato etanólico de *Zanthoxylum rhoifolium*; FN: fração de neutros de *Zanthoxylum rhoifolium*; FA: fração alcaloídica de *Zanthoxylum rhoifolium*.

Em síntese, ao analisar todos os resultados obtidos para o EE e frações (FN e FA), destaca-se que o EE é promissor como leishmanicida e cicatrizante, que a FN é a amostra mais promissora em virtude da diferença encontrada no ensaio anti-mastigota e de migração celular, evidenciando maior potencial leishmanicida e cicatrizante para a amostra, já a FA é a amostra menos promissora (Tabela 7). Dessa forma, justifica-se a realização da fitoquímica na FN, que resultou no isolamento e identificação do alcaloide benzofenantridínico cheleritrina. Ressalta-se que não foi possível realizar ensaios biológicos no alcaloide testado.

Tabela 7 - Síntese dos resultados biológicos obtidos para a espécie *Zanthoxylum rhoifolium*.

Amostras	Alcaloides	Leishmania		Seletividade (CC ₅₀ /CI ₅₀ *)	Proliferação celular		MC- HaCaT	Conclusão	
		Promastigota	Amastigota (II)#		VERO	J774			HaCaT
EE	+	Ativo	40%	Seletivo	Seletivo	Aumento**	Aumento**	Fechamento [^]	promissor
FN	+	Ativo	50%	Seletivo	Seletivo	Aumento**	Aumento**	Fechamento [€]	+ promissora
FA	+	Ativo	NA	seletivo	Seletivo	Aumento**	Aumento**	SF	- promissora

Legenda: II- Índice de inibição da infecção dos macrófagos; # 200µg/mL; * promastigota; Seletividade > 10; HaCaT??? **: apenas nas menores concentrações; MC: migração celular; ^ apenas em 15µg/mL; €= 15 e 30µg/mL.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a *Z. rhoifolium* é uma espécie com alta atividade antileishmania, tanto frente a formas promastigotas quanto formas intracelulares obrigatórias de *L. amazonensis*. Além disso, a espécie demonstrou-se promissora no processo de cicatrização, em virtude de sua capacidade de aumentar a taxa de proliferação celular. Vale ressaltar que o fracionamento do extrato é de suma importância, visto que a FN apresentou o melhor índice de seletividade frente a *L. amazonensis* e foi a amostra mais promissora para a atividade cicatrizante.

REFERÊNCIAS

ADIA, M. M.; EMAMI, S. N.; BYAMUKAMA, R.; FAVE, I.; BORG-KARLSON, A.K. Antiplasmodial activity and phytochemical analysis of extracts from selected Ugandan medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 186, p. 14-19, 2016.

AGRA, I. K. R.; PIRES, L. L. S.; CARVALHO, P. S. M.; SILVA-FILHO, E. A.; SMANIOTTO, S.; BARRETO, E. Evaluation of wound healing and antimicrobial properties of aqueous extract from *Bowdichia virgilioides* stem barks in mice. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 3, p. 945-954, 2013.

AHMAD, M.; WEBER, A. D.; ZANON, G.; TAVARES, L. D. C.; ILHA, V.; DALCOL, I. I.; MOREL, F. A. Inhibitory and enzyme-kinetic Investigation of chelerythrine and lupeol Isolated from *Zanthoxylum rhoifolium* against krait snake venom acetylcholinesterase. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 1, p. 98-103, 2014.

AHUA, K. M.; IOSET, J. R.; IOSET, K. N.; DIALLO, D.; MAUEL, J.; HOSTETTMANN, K. Antileishmanial activities associated with plants used in the Malian traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 99-104, 2007.

ALMEIDA, I. V.; FERNANDES, L. M.; BIAZI, B. I.; VICENTINI, V. Evaluation of the Anticancer Activities of the Plant Alkaloids Sanguinarine and Chelerythrine in Human Breast Adenocarcinoma Cells. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 11, p. 1586-1592, 2017.

ANGENOT, L.; QUENTIN-LECLERCQ, J.; PHILLIPSON, D. J.; WARHURST, D. C.; O'NEILL, M. J.; BRAY, D. H.; WRIGHT, C. W. Antiamoebic and antiplasmodial activities of alkaloids isolated from *Strychnos usambarensis*. **Planta Medica**, v. 57, p. 337-340, 1991.

ANTHONY, J. P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 10, p. 462-468, 2005.

ANTONIADOU, A.; DUPONT, B. Lipid formulations of amphotericin B: where are we today? **Journal de Mycologie Médicale**, v. 15, n. 4, p. 230-238, 2005.

ARRUDA, D. C.; D'ALEXANDRI, F. L.; KATZIN, A. M.; ULIANA, S. R. B. Antileishmanial Activity of the Terpene Nerolidol. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1679-1687, 2005.

ARRUDA, M. S.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. D. G.; PIRANI, J.R. Chemistry of *Zanthoxylum rhoifolium*: A new secofuroquinoline alkaloid. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 20, n. 2, p. 173-178, 1992.

Árvores do Brasil, Mamica de porca - *Zanthoxylum rhoifolium*, 2019. Disponível em: <<https://www.arvores.brasil.nom.br/new/mamicadeporca/index.htm>>. Acesso em: 12 de março de 2019.

BADMUS, J. A.; EKPO, O. E.; SHARMA, J. R.; SIBUYI, N.; MEYER, M.; HUSSEIN, A. A.; HISS, D. C. An Insight into the Mechanism of Holamine- and Funtumine-Induced Cell Death in Cancer Cells. **Molecules**, v. 25, n. 23, 2020.

BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, J. R. G. S.; COSTA, V. C. O.; DA-CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; BRAZ-FILHO, R. Bowdichine, a new diaza-adamantane alkaloid from *Bowdichia virgilioides*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 6, n. 1, p. 11-17, 2004.

BARROSO, G. M.; GUIMARÃES, E. F.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; PEIXOTO, A. L.; LIMA, H. C. Sistemática de Angiospermas do Brasil. **Imprensa Universitária**, Universidade Federal de Viçosa, v. 2, 1986.

BASTOS, M. L. C. **Avaliação da citotoxicidade e seletividade do extrato, frações e alcaloide de *Geissospermum sericeum* (Apocynaceae) em linhagens celulares ACP02, HepG2 e VERO.** 108 f. (Dissertação mestrado) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2017.

BERTANI, S.; BOURDY, G.; LANDAU, I.; ROBINSON, J. C.; ESTERRE, P.; DEHARO, E. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 1-2, p. 45-54, 2005.

BIESKI, I. G. C.; SANTOS, F. R.; OLIVEIRA, R. M.; ESPINOSA, M. M.; MACEDO, M.; ALBUQUERQUE, U. P.; MARTINS, D. T. O. Ethnopharmacology of medicinal plants of the pantanal region (Mato Grosso, Brazil). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

BOGLIOLO, L. **Patologia I.** [editor] Geraldo Brasileiro Filho. - 8.ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

BOUQUET, J.; RIVAUD, M.; CHEVALLEY, S.; DEHARO, E.; JULLIAN, V.; VALENTIN, A. Biological activities of nitidine, a potential anti-malarial lead compound. **Malaria Journal**, v. 11, n. 1, p. 1-8, 2012.

BOURNINE, L.; BENSALAM, S.; WAUTERS, J. N.; IGUER-OUADA, M.; MAIZA-BENABDESSELAM, F.; BEDJOU, F.; CASTRONOVO, V.; BELLAHCÈNE, A.; TITS, M.; FRÉDÉRICH, M. Identification and quantification of the main active anticancer alkaloids from the root of *Glaucium flavum*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 12, p. 23533-44, 2013.

BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L.; FABRI, R. L.; DE O. MATOS, M.; 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, n. 2, p. 396-402, 2007.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. atual. Brasília: Ministério da Saúde, p. 180, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. Brasília, DF: Editora do Ministério da Saúde, p. 182, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose Visceral Grave: normas e condutas**. Brasília, DF: Editora do Ministério da Saúde, p. 60, 2006.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plast Reconstr Surg**, v. 117, n. 7, p. 12S-34S, 2006.

CALLA-MAGARINOS, J.; GIMÉNEZ, A.; TROYE-BLOMBERG, M.; FERNÁNDEZ, C. An Alkaloid Extract of Evanta, Traditionally Used as Anti-leishmania Agent in Bolivia, Inhibits Cellular Proliferation and Interferon-c Production in Polyclonally Activated Cells. **Clinical Immunology**, v. 69, n. 3, p. 251-258, 2009.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007.

CANTÃO, B. C. G.; LIMA, A. B.; PEREIRA, G. F.; VELOSO JUNIOR, A. A.; CUNHA, J. F.; SILVA, H. R. S. **Feridas e suas classificações**. Capítulo III *in* Guia de curativos em feridas ortopédicas/CANTÃO, B. C. G.; LIMA, A. B. / Juiz de Fora: Editora Perensin, 2020.

CAROTENUTO, G.; CARRIERIA, R.; TARANTINO, P.; ALFIERIB, M.; LEONEB, A.; TOMMASIB, N.; LAHOZA, E. Fungistatic activity of Zanthoxylum rhoifolium Lam. bark extracts against fungal plant pathogens and investigation on mechanism of action in Botrytis cinerea. **Natural Product Research**, v. 29, n. 23, p. 2251-2255, 2015.

CASTILLO, D.; SAUVAIN, M.; RIVAUD, M.; JULLIAN, V. In Vitro and In Vivo Activity of Benzo[c]phenanthridines against Leishmania amazonensis. **Planta Medica**, v. 80, n. 11, p. 902-906, 2014.

CDC, **Centers for disease control and prevention**, 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>>. Acesso em: 22 de novembro de 2018.

CHAN-BACAB, M. J.; PEÑA-RODRÍGUES, L. M. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Natural Products Reports**, v. 18, n. 6, p. 674-688, 2001.

CHÁVEZ ENCISO, N. A.; COY-BARRERA, E. D.; PATIÑO, O. J.; CUCA, L. E.; DELGADO, G. Evaluation of the Leishmanicidal Activity of Rutaceae and Lauraceae Ethanol Extracts on Golden Syrian Hamster (*Mesocricetus auratus*) Peritoneal Macrophages. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 76, n. 3, p. 188-197, 2014.

CHEN, I. S.; LIN, Y. C.; TSAI, I. L.; TENG, C. M.; KO, F. N.; ISHIKAWA, T.; ISHII, H. Coumarins and anti-platelet aggregation constituents from *Zanthoxylum schinifolium*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 5, p. 1091-1097, 1995.

COOPER, M. L.; LAXER, J. A.; HANSBROUGH, J. F. The cytotoxic effects of commonly used topical antimicrobial agents on human fibroblasts and keratinocytes. **Journal of Trauma**, v. 31, n. 6, p. 775-784, 1991.

COSTA, A. L. P.; SILVA-JUNIOR, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.

COSTA, J. G. M.; CAMPOS, A. R.; BRITO, S. A.; PEREIRA, C. K. B.; SOUZA, E. O.; RODRIGUES, F. F. G. Biological screening of Araripe basin medicinal plants using *Artemia salina* Leach and pathogenic bacteria. **Pharmacognosy Magazine**, v. 6, n. 24, p. 331-334, 2010.

COSTA, R. S.; SOUZA-FILHO, O. P.; JÚNIOR, O. C. S. D.; SILVA, J. J.; HYARIC, M. L.; SANTOS, M. A. V.; VELOZO, E. S. In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activity of compounds isolated from the roots of *Zanthoxylum tingoassuba*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, n. 5, p. 551-558, 2018.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis— current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **TRENDS in Parasitology**, v. 19, n.11, p. 502-508, 2003.

CRUZ, G. L. Dicionário de plantas úteis do Brasil. In: **Bertrand Brasil**, v. 5, p. 436, 1995.

CUCA, L. E. S.; TABORDA, M. E. Un nuevo alcaloide carbozólico de *Zanthoxylum rhoifolium*. **Scientia et Technica**, v. 13, n. 33, p. 191-192, 2007.

DANTAS, R. F.; DIAS, M. A. P.; DANTAS-FILHO, M. O.; RIBEIRO, E. D.; ANDRADE, G. S. S. Lesão de tecidos moles causada por arma branca - Revisão de literatura. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 40-46, 2013.

DEWANGAN, H.; BAIS, M.; JAISWAL, V.; VERMA, V. K. Potential wound healing activity of the ethanolic extract of *Solanum xanthocarpum* schrad and wendl leaves. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, n. 1, p. 189-194, 2012.

DE PRINCE, K.; PAVAN, F. R.; SATO, D. N.; VILLEGAS, W.; LEITE, S. R.; LEITE, C. Q. Avaliação das moléculas com atividade antiTB das plantas do cerrado brasileiro. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. 16, p. S83-S88, 2010.

DIEGUEZ-HURTADO, R.; GARRIDO-GARRIDO, G.; PRIETO-GONZÁLEZ, S.; IZNAGA, Y.; GONZÁLEZ, L.; MOLINA-TORRES, J.; CURINI, M.; EPIFANO, F.; MARCOTULLIO, M. C. Antifungal activity of some Cuban Zanthoxylum species. **Fitoterapia**, v. 74, n. 4, p. 384-386, 2003.

DOFUOR, A. K.; DJAMEH, G. I.; AYERTEY, F.; BOLAH, P.; AMOA-BOSOMPEM, M.; KYEREMEH, K.; OKINE, L. K.; GWIRA, T. M.; OHASHI, M. Antitrypanosomal Effects of Zanthoxylum zanthoxyloides (Lam.) Zepern. & Timler Extracts on African Trypanosomes. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.

DYGAI, M.; ZYUZ'KOV, G. N.; ZHDANOV, V. V.; UDUT, V. V. et al. Immobilized Using Nanotechnology of Electron-Beam Synthesis Regulators of Progenitor Cells Functions: Remedies of New Generation for Regenerative Medicine. **Recent Patents on Regenerative Medicine**, v. 3, n. 2, p. 160-175, 2013.

ESWARAKUMAR, V. P.; LAX, I.; SCHLESSINGER, J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 16, n. 2, p. 139-149, 2005.

FERNANDES, N. S. **Investigação de alcaloides de Lauraceae da Amazônia como tratamento para tripanosomíase e leishmaniose: avaliação fenotípica e busca de alvos moleculares**. 214 f. (Tese doutorado) Programa multi-institucional de pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2017.

FERNANDEZ, M. A.; DE LAS HERAS, B.; GARCÍA, M. D.; SÁENZ, M. T.; VILLAR, A. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 11, p. 1533-1539, 2001.

FERREIRA, M. E.; ARIAS, A. R.; ORTIZ, S. T.; INCHAUSTI, A.; NAKAYAMA, H.; THOUVENEL, C.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of Zanthoxylum chiloperone var. angustifolium. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, n. 2-3, p. 199-202, 2002.

FOURNET, A.; ARIAS, A. R.; FERREIRA, M. E.; NAKAYAMA, H.; ORTIZ, S. T.; SCHININI, A.; SAMUDIO, M.; BILBAO, N. F.; LAVAUULT, M.; BONTÉ, F. Efficacy of the bisbenzylisoquinoline alkaloids in acute and chronic Trypanosoma cruzi murine model. **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 13, n. 3, p. 189-195, 2000.

FREITAS, F. F.; FERNANDES, H. B.; PIAUILINO, C. A.; PEREIRA, S. S.; CARVALHO, K. I.; CHAVES, M. H.; SOARES, P. M.; MIURA, L. M.; LEITE, J. R.;

OLIVEIRA, R. C.; OLIVEIRA, F. A. Gastroprotective activity of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. in animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 700-708, 2011.

FUNAKOSHI, T.; AKI, T.; NAKAYAMA, H.; WATANUKI, Y.; IMORI, S.; UEMURA, K. Reactive oxygen species-independent rapid initiation of mitochondrial apoptotic pathway by chelerythrine. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 8, p. 1581-1587, 2011.

GALUCIO, N. C. R. **Estudos Fitoquímicos, Citotoxicidade e Genotoxicidade de Eleutherine Plicata Herb**. 2014. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Belém, 2014.

GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 1, p. 77-80, 2001.

GHOSH, P. K.; GABA, A. Phyto-extracts in wound healing. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 5, p. 760-820, 2013.

GIBBS, R. D. **Chemotaxonomy of Flowering Plants: Four Volumes**. [s.l.] McGill-Queen's University Press, 1974.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GONZAGA, W. A.; WEBER, A. D.; GIACOMELLI, S. R.; DALCOL, I. I.; HOELZEL, S. C.; MOREL, A. F. Antibacterial alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Planta Medica**, v. 69, n. 4, p. 371-374, 2003b.

GONZAGA, W. A.; WEBER, A. D.; GIACOMELLI, S. R.; SIMIONATTO, E.; DALCOL, I. I.; DESSOY, C. M.; MOREL, A. F. Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Planta Medica**, v. 69, n. 8, p. 773-775, 2003a.

GRELAND, P.; MORETTI, C.; JACQUEMIN, H.; PRÉVOST, M. F. **{P}harmacopées traditionnelles en {G}uyane: créoles, wayapi, palikur**. **{P}aris: IRD**, v. 161, p. 816, 2004.

GRINA, J. A.; RATCLIFF, M. R.; STERMITZ, F. R. Old and new alkaloids from *Zanthoxylum arborescens*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 47, n. 13, p. 2648-2651, 1982.

HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. **Molecular Biology International**, v. 2011, p. 1-23, 2011.

HARTLEY, T. G. A revision of the Malesian species of *Zanthoxylum* (Rutaceae). **Journal of the Arnold Arboretum**, v. 47, n. 3, p. 172-219, 1966.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19-20, p. 894-901, 2008.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999.

JULLIAN, V.; BOURDY, D.; GEORGES, S.; MAUREL, S.; SAUVAIN, M. Validation of use of a traditional antimalarial remedy from French Guiana, *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 348-352, 2006.

KAPIL, A. Piperine: A potent inhibitor of *Leishmania donovani* promastigotes in vitro. **Planta Medica**, v. 59, n. 5, p. 474, 1993.

KURDELAS, R. R. et al. Antifungal Activity of Extracts and Prenylated Coumarins Isolated from *Baccharis darwinii* Hook & Arn. (Asteraceae). **Molecules**, v. 15, n. 7, p. 4898-4907, 2010.

LAUREANO, A.; RODRIGUES, A. M. Wound Healing. **Journal of the Portuguese Society of Dermatology and Venereology**, v. 69, n. 3, p. 355-367, 2011.

LAWRENCE, W. T.; DIEGELMANN, R. F. Growth factors in wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 12, n. 1, p. 157-69, 1994.

LEITE, L. R. V. **Farmacologia das feridas: uma revisão de literatura**. 57 f. Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) - Centro de Educação e Saúde/UFCG, Campina Grande, 2018.

LEM´EE, A. **Flore de la Guyane Française**, 1 ed., v. 3. Paris: Paul Chevalier Editions, 1956.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 2, p. 151-162, 2005.

LI, D. X.; LIU, M.; ZHOU, X. J. A new dimeric lignan from *Zanthoxylum simulans*. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 40, n. 14, p. 2843-2848, 2015.

LI, X. Q.; KANG, R.; HUO, J. C.; XIE, Y. H.; WANG, S. W.; CAO, W. Wound-healing Activity of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim Seed Oil on Experimentally Burned Rats. **Pharmacognosy Magazine**, v. 13, n. 51, p. 363-371, 2017.

LINDOSO, J. A. L.; COSTA, J. M. L.; QUEIROZ, I. T.; GOTO, H. Review of the current treatments for leishmaniasis. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 3, p. 69-77, 2012.

LIU, L. M. et al. DNA topoisomerase 1 and 2A function as oncogenes in liver cancer and may be direct targets of nitidine chloride. **International Journal of Oncology**, v. 53, n. 5, p. 1897-1912, 2018.

LOURENÇO, A. R. N. **Administração tópica de fármacos: das restrições aos desafios**. 51f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2013.

MACHADO, M. M. **Análise de diferentes cepas de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* quanto a infectividade/virulência e perfil de citocinas produzidas por macrófagos murinos infectados**. 136 f. (Dissertação mestrado) Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

MAHIBALAN, S.; STEPHEN, M.; NETHRAN, R. T.; KHAN, R.; BEGUM, S. Dermal wound healing potency of single alkaloid (betaine) versus standardized crude alkaloid enriched-ointment of *Evolvulus alsinoides*. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 12, p. 2851-2856, 2016.

MAHIOU, V.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; ROJAS de ARIAS, A.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; FOURNET, A.; ANGELO, A. New aporphine alkaloids from *guatteria foliosa*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 7, p. 890-895, 1994.

MARTIN, A.; CLYNES, M. Comparison of 5 microplate colorimetric assays for in vitro cytotoxicity testing and cell proliferation assays. **Cytotechnology** **1993** **11:1**, v. 11, n. 1, p. 49-58, 1993.

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania* major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? **Immunological Reviews**, v. 201, n. 1, p. 206-224, 2004.

MELO, M. de F. F.; ZICKEL, C. S. Os gêneros *Zanthoxylum* L. e *Esenbeckia* Kunth (Rutaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 1, p. 73-90, 2004.

MELO-NETO, B.; LEITÃO, J. M. S. R.; OLIVEIRA, L. G. C.; SANTOS, S. E. M.; CARNEIRO, S. M. P.; RODRIGUES, K. A. F.; CHAVES, M. H.; ARCANJO, D. D. R.; CARVALHO, F. A. A. Inhibitory effects of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae) against the infection and infectivity of macrophages by *Leishmania amazonensis*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 3, p. 1851-1861, 2016.

MISRA, P.; KUMAR, A.; KHARE, P.; GUPTA, S.; KUMAR, N.; DUBE, A. Pro-apoptotic effect of the landrace Bangla Mahoba of *Piper betle* on *Leishmania donovani* may be due to the high content of eugenol. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1058-1066, 2009.

MORAIS, S. L.; BRAZ-FILHO, R. (Orgs.). **Produtos Naturais: estudos químicos e biológicos**. Editora da Universidade Estadual do Ceará, p. 240, 2007.

MOREL, A. F.; GONZAGA, W. A.; BURROW, R. A.; MAICHLE-MOESSMER, C.; STRAEHLE, J. 6-acetonyldihydroavicine. **Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications**, v. 58, n. 10, p. o606-o607, 2002.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOTA, E. F.; ROSARIO, D. M.; SILVA VEIGA, A. S.; BRASIL do S.; SILVEIRA, F. T.; DOLABELA, M. F. Biological activities of *Croton palanostigma* Klotzsch. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n. 43, p. 601-606, 2015.

MOURA, N. F. GIACOMELLI, S. R.; MACHADO, E. C. Antibacterial activity of *Zanthoxylum rhoifolium*. **Fitoterapia**, v. 69, n. 3, p. 271-272, 1998.

MOURA, N. F.; RIBEIRO, H. B.; MACHADO, E. C. S.; ETHUR, E. M., ZANATTA, N.; MOREL, A. F. Benzophenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Phytochemistry**, Nantes, v. 46, n. 8, p. 1443-1446, 1997.

MOURA-COSTA, G. F.; NOCCHI, S. R.; CEOLE, L. F.; DE MELLO, J. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; TEMPONI, L. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Antimicrobial activity of plants used as medicinals on an indigenous reserve in Rio das Cobras, Paraná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 631-638, 2012.

NAGAPPAN, T.; SEGARAN, T. C.; WAHID, M. E. A.; RAMASAMY, P.; VAIRAPPAN, C. S. Efficacy of Carbazole Alkaloids, Essential Oil and Extract of *Murraya koenigii* in Enhancing Subcutaneous Wound Healing in Rats. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14449-14463, 2012.

NAKAMURA, C. V.; SANTOS, A. O.; VENDRAMETTO, M. C.; LUIZE, P. S.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 61-66, 2006.

NAYAK, B. S.; SANDIFORD, S.; MAXWELL, A. Evaluation of the Wound-healing Activity of Ethanolic Extract of *Morinda citrifolia* L. Leaf. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n. 3, p. 351-356, 2009.

NGURE, P. K.; TONUI, W. K.; INGONGA, J.; MUTAI, C.; KIGONDU, E.; NG'ANG'A, Z.; RUKUNGA, G.; KIMUTAI, A. *In vitro* antileishmanial activity of extracts of *Warburgia ugandensis* (Canellaceae), a Kenyan medicinal plant. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 2, p. 61-66, 2009.

NWOMEH, B. C.; YAGER, D. R. Physiology of the chronic wound. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 25, n. 3, p. 341-356, 1998.

NYAHANGA, T.; JONDIKO, J. I.; MANGURO, L. O. A.; ORWA, J. A. Antiplasmodial and larvicidal compounds of *Toddalia asiatica* root bark. **Journal of Chemical Sciences**, v. 125, n. 5, p. 1115-1121, 2013.

OJEH, N.; STOJADINOVIC, O.; PASTAR, I.; SAWAYA, A.; YIN, N.; TOMIC-CANIC, M. The effects of caffeine on wound healing. **International Wound Journal**, v. 13, n. 5, p. 605-613, 2014.

OLIVEIRA, E. L.; FREITAS, P. C.; GUEDES, M. L. S.; VELOZO, E. S. Estudo fitoquímico de *Zanthoxylum stelligerum* (Turcz). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 29-30, 2002.

OLIVEIRA, L. F.; SCHUBACH, A. O.; MARTINS, M. M.; PASSOS, S. L.; OLIVEIRA, R. V.; MARZOCHI, M. C.; ANDRADE, C. A. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 87-96, 2011.

OLIVEIRA-TAVARES, N. N.; LEMOS, A. S. O.; PEREIRA, A. P. O.; FABRI, R. L.; CHEDIER, L. M. Atividade Antifúngica do Látex de *Jatropha multifida* L. (Euphorbiaceae) e de Lupenona isolada de suas Folhas Antifungal Activity of Latex and Lupenone from *Jatropha multifida* L. (Euphorbiaceae). **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 5, p. 1579-1590, 2019.

OMOSA, L. K.; OKEMWA, E. K. Antiplasmodial Activities of the Stem bark Extract and Compounds of *Zanthoxylum gillettii* (De wild) P.G. Waterman. **Pharmacognosy Communications**, v. 7, n. 1, p. 41-46, 2017.

PAHO, **Pan American Health Organization**. Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417:2012-leishmaniasis-cutanea-mucosa&Itemid=39345&lang=en>. Acesso em: 24 de novembro de 2018.

PAHO, **Pan American Health Organization**. Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.paho.org/leishmaniasis>>. Acesso em: 22 de novembro de 2018.

PAN, X.; HAN, H.; WANG, L.; YANG, L.; LI, R.; LI, Z.; LIU, J.; ZHAO, Q.; QIAN, M.; LIU, M.; DU, B. Nitidine chloride inhibits breast cancer cells migration and invasion by suppressing c-Src/FAK associated signaling pathway. **Cancer letters**, v. 313, n. 2, p. 181-191, 2011.

PATIÑO, O. J.; CUCA, L. E. ALCALOIDES BENZOFENANTRIDINICOS DE *Zanthoxylum quinduensis*. **Revista Colombiana de Química**, v. 33, n. 1, p. 13-20, 2004.

PELLISSARI, D. M.; CECHINEL, M. P.; SOUSA-GOMES, M. L.; LIMA JR, F. E. F. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 107-110, 2011.

PENELUC, T.; DOMINGUES, L. F.; de ALMEIDA, G. N.; AYRES, M. C. C.; MOREIRA, E. L. T.; da CRUZ, A. C. F.; BITTENCOURT, T. C. B. S. C.; de ALMEIDA, M. A. O.; BATATINHA, M. J. M. Atividade anti-helmíntica do extrato aquoso das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. SUPPL.1, p. 43-48, 2009.

PIRANI, J. R. **Estudos taxonômicos em Rutaceae: Revisão de Helietta e Balfourodendron (Pteleinae); Análise cladística de Pteleinae; Sinopse de Rutaceae do Brasil**. 197f. (Tese de livre docência), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

PIRANI, J. R. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: RUTACEAE. **Rodriguésia**, v. 56, n. 86, p. 189-204, 2005.

PORTER, D. M.; ELIAS, T. S. Flora of Panama. Part VI. Family 89. Rutaceae. **Annals of Missouri Botanical Garden**, v. 66, n. 2, p. 123-164, 1979.

POWERS, C. J.; MCLESKEY, S. W.; WELLSTEIN, A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. **Endocrine Related Cancer**, v. 7, n. 3, p. 165-197, 2000.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; De JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C.; De ANDRADE JÚNIOR.; H. F.; TEMPONE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado de arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

REIMÃO, J. Q. **Estudo da atividade anti-leishmania de compostos de invertebrados marinhos brasileiros**. 2009. 132 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria do Estado de São Paulo, Programa de Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2009.

RIBEIRO, R. V; BIESKI, I. G. C; BALOGUN, S. O; DE OLIVEIRA MARTINS, D. T. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 205, p. 69-102, 2017.

RIVAUD, M. **Les Benzo[c]phénanthridines antipaludiques d'origine naturelle: synthèse d'analogues et étude de leur mode d'action**. Dissertação de doutorado (Programa de Química – Biologia – Saúde), Universidade de Toulouse, Toulouse, França, Nov 2012.

RODEHEAVER, G. T. Influence of antiseptics ion wound healing. **Nursing RSA**, v. 9, n. 2, p. 10-1, 1994.

ROSS, S. A.; AL-AZEIB, M. A.; KRISHNAVENI, K. S.; FRONCZEK, F. R.; BURANDT, C. L. Alkamides from the leaves of *Zanthoxylum syncarpum*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 8, p. 1297-1299, 2005.

SALEEM, M.; MADDODI, N.; ABU ZAID, M.; KHAN, N.; BIN HAFEEZ, B.; ASIM, M.; SUH, Y.; YUN, J. M.; SETALURI, V.; MUKHTAR, H. Lupeol Inhibits Growth

of Highly Aggressive Human Metastatic Melanoma Cells In vitro and In vivo by Inducing Apoptosis. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 7, p. 2119-2127, 2008.

SALEEM, M.; KWEON, M. H.; YUN, J. M.; ADHAMI, V. M.; KHAN, N.; SYED, D. N.; MUKHTAR, H. A Novel Dietary Triterpene Lupeol Induces Fas-Mediated Apoptotic Death of Androgen-Sensitive Prostate Cancer Cells and Inhibits Tumor Growth in a Xenograft Model. **Cancer Research**, v. 65, n. 23, p. 11203-11213, 2005a.

SALEEM, M.; KAUR, S.; KWEON, M. H.; ADHAMI, V. M.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Lupeol, a fruit and vegetable based triterpene, induces apoptotic death of human pancreatic adenocarcinoma cells via inhibition of Ras signaling pathway. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 11, p. 1956-1964, 2005b.

SALGADO, M. A. S.; REZENDE, A. V.; SOUSA-SILVA, J. C.; FELFILI, J. M.; FRANCO, A. C. Crescimento inicial de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. em diferentes condições de sombreamento. **Boletim do Herbário Ezechias Paulo Heringer**, v. 3, p. 37-45, 1998.

SANDJO, L. P.; DE MORAES, M. H.; KUETE, V.; KAMDOUM, B. C.; NGADJUI, B. T.; STEINDEL, M. Individual and combined antiparasitic effect of six plant metabolites against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 7, p. 1772-1775, 2016.

SANTIAGO-BRUGNOLI, L.; ROSQUETE-PORCAR, C.; POUYSÉGU, L.; QUIDEAU, S. Zanthoxyfolina, un nuevo meroterpenoide y derivados del labdano aislados de las hojas de *Zanthoxylum rhoifolium* LAM (Rutaceae). **Avances en Química**, v. 8, n. 2, p. 85-88, 2013.

SANTOS, E.; QUEIRÓS, P.; CARDOSO, D.; CUNHA, M.; APÓSTOLO, J. A eficácia das soluções de limpeza para o tratamento de feridas: uma revisão sistemática. **Revista de Enfermagem Referência**, v. 4, n. 9, p. 133-144, 2016.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology** **2016** **16**:9, v. 16, n. 9, p. 581-592, 2016.

SHAI, L. J.; MCGAW, L. J.; ADEROGBA, M. A.; MDEE, L. K.; ELOFF, J. N. Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 2, p. 238-244, 2008.

SIBBALD, R. G.; WILLIAMSON, D.; ORSTED, H. L.; CAMPBELL, K.; KEAST, D.; KRASNER, D.; SIBBALD, D. Preparing the wound bed - - debridement, bacterial balance, and moisture balance. **Ostomy Wound Management**, v. 46, n. 11, p. 4-34, 2000.

SILVA E SILVA, J. V.; BRÍGIDO, H. P. C.; ALBUQUERQUE, K. C. O.; CARVALHO, J. M. et al. Flavopereirine--An Alkaloid Derived from

Geissospermum vellosii--Presents Leishmanicidal Activity In Vitro. **Molecules**, v. 24, n. 4, p. 785, 2019.

SILVA, F. S. **Avaliação in vitro da azitromicina nas espécies Leishmania (Leishmania) amazonensis, Leishmania (Leishmania) braziliensis e Leishmania (Leishmania) chagasi**. 2005. 43 p. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de doenças infecciosas e parasitárias) – Centro de pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2005.

SILVA, R. O. **A espectroscopia de RMN como ferramenta elucidativa: estruturas moleculares, mecanismos de reação e metabonômica**. 229 f. (Tese doutorado) Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

SILVA, S. L.; FIGUEREDO, P. M. S.; YANO, T. Antibacterial and antifungal activities of volatile oils from *Zanthoxylum rhoifolium* leaves. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, n. 9, p. 657-659, 2006.

SILVA, S. L.; FIGUEREDO, P. M. S.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. leaves. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 2, p. 281-286, 2007.

SILVA-SILVA, J. V. **Estudo farmacognóstico, fitoquímico e atividade leishmanicida de duas espécies de Geissospermum (Apocynaceae)**. 114 f. (Dissertação mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.

SON, S. Y.; RHEE, H. S.; LEE, M.W.; PARK, J. M. Analysis of benzo[c]phenanthridine alkaloids in *Eschscholtzia californica* cell culture using HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 78, n. 7, p. 1103-1111, 2014.

STERMITZ, F. R.; CAOLO, M. A.; SWINEHART, J. A. Alkaloids and other constituents of *Zanthoxylum williamsii*, *Z. monophyllum* and *Z. fagara*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 7, p. 1469-1472, 1980.

SUKSAMRARN, A.; TANACHATCHAIRATANA, T.; KANOKMEDHAKUL, S. Antiplasmodial triterpenes from twigs of *Gardenia saxatilis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, n. 2-3, p. 275-277, 2003.

TANAKA, J. C. A.; da SILVA, C. C.; FERREIRA, I. C. P.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; de OLIVEIRA, A. J. B. Antileishmanial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytomedicine**, v. 14, n. 6, p. 377-380, 2007.

TARÔCO, B. R. P. **Avaliação da atividade cicatrizante do extrato de *Achyrocline alata* (Kunth) DC**. 120f. Dissertação (Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular), Universidade Federal de São João Del Rei, Divinópolis, 2016.

TAVARES, L. C.; ZANON, G.; WEBER, A. D.; NETO, A. T.; MOSTARDEIRO, C. P.; DA CRUZ, I. B.; OLIVEIRA, R. M.; ILHA, V.; DALCOL, I. I.; MOREL, A. F. Structure-Activity Relationship of Benzophenanthridine Alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium* Having Antimicrobial Activity. **PLOS ONE**, v. 9, n. 5, p. e97000, 2014.

TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. **Wound biology and healing. Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 41, n. 3, p. 259-64, 2008.

VANWIJCK, R. Surgical biology of wound healing. **Bulletin et Mémoires de l'Académie Royale de Médecine de Belgique**, v. 156, n. 3-4, p. 175-84, 2001.

VAQUETE, J.; POUSSET, J. L.; PARIS, R. Alcaloïdes de *Zanthoxylum decaryi*: la decarine, nouvel alcaloïde dérivé de la benzophénanthridine. **Phytochemistry**, v. 13, n. 7, p. 1257-1259, 1974.

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The wound healing process: An overview of the cellular and molecular mechanisms. **Journal of International Medical Research**, v. 37, n. 5, p. 1528-1542, 2009.

VIGNERON, M; DEPARIS, X; DEHARO, E; BOURDY, G. (2005). Antimalarial remedies in French Guiana: a knowledge attitudes and practices study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 3, p. 351-360, 2005.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols** **2006** **1:3**, v. 1, n. 3, p. 1112-1116, 2006.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant Drug Analysis**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 1984.

WANNMACHER, L. **Antimicrobianos em dermatologia**. Cap. 12 in *Uso Racional de Medicamentos: temas selecionados*, v. 3, n. 12, 2006.

WEBER, A. D. **Estudo fitoquímico e da atividade biológica de *Zanthoxylum rhoifolium***. 138f. (Dissertação mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

WHO, **World Health Organization**. Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2016a. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 22 de novembro de 2018.

WHO, **World Health Organization**. Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2016b. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/research/en/>>. Acesso em: 22 de novembro de 2018.

YANG, G.; CHEN, D. Alkaloids from the roots of *Zanthoxylum nitidum* and their antiviral and antifungal effects. **Chemistry and Biodiversity**, v. 5, n. 9, p. 1718-1722, 2008.

YAZBEKA, P.B., MATTAB, P., PASSERO, L. F. et al. Plants utilized as medicines by residents of Quilombo da Fazenda, Núcleo Picinguaba, Ubatuba, São Paulo, Brazil: A participatory survey. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 244, p. 1-12, 2019.

YOU, Y. J.; NAM, N. H.; KIM, Y.; BAE, K. H.; AHN, B. Z. Antiangiogenic activity of lupeol from *Bombax ceiba*. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 4, p. 341-344, 2003.

ZANON, G. **Análise fitoquímica e estudo das atividades antimicrobiana, antioxidante e de inibição da enzima acetilcolinesterase das espécies *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum hyemale***. 174 f. Dissertação mestrado (Programa de Pós-graduação em Química), Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2010.

ZHANG, H. L.; GAN, X. Q.; FAN, Q. F.; YANG, J. J.; ZHANG, P.; HU, H. B.; SONG, Q. S. Chemical constituents and anti-inflammatory activities of Maqian (*Zanthoxylum myriacanthum* var. *pubescens*) bark extracts. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

ZHANG, Z. F.; GUO, Y.; ZHANG, J. B.; WEI, X. H. Induction of apoptosis by chelerythrine chloride through mitochondrial pathway and Bcl-2 family proteins in human hepatoma SMMC-7721 cell. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 5, p. 791-800, 2011.

ZIEGLER, H. L.; STAALSØ, T.; JAROSZEWSKI, J. W. Loading of erythrocyte membrane with pentacyclic triterpenes inhibits *Plasmodium falciparum* invasion. **Planta Medica**, v. 72, n. 7, p. 640-642, 2006.

ZYUZ'KOV, G. N.; CHAIKOVSKII, A. V.; LIGACHEVA, A. A.; ZHDANOV, V. V. et al. Role of Receptors to Fibroblast Growth Factor (FGF) on Mesenchymal Precursor Cells in the Realization of Regenerative Effects of Alkaloid Songorine. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 157, n. 1, p. 146-149, 2014.

ZYUZ'KOV, G. N.; KRAPIVIN, A. V.; NESTEROVA, Y. V.; POVETIEVA, T. N. et al. Mechanisms of regenerative effects of Baikal Aconite diterpene alkaloids. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 153, n. 6, p. 846-850, 2012.