



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,  
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA –  
CITA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE  
*SYMPHONIA GLOBULIFERA* L.f. PROVENIENTE DA  
RESERVA CHICO MENDES, BRASIL (ACRE)**

**RICARDO KIND LOPES**

**RIO BRANCO, AC  
JULHO, 2019**

**RICARDO KIND LOPES**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE  
*SYMPHONIA GLOBULIFERA* L.f. PROVENIENTE DA  
RESERVA CHICO MENDES, BRASIL (ACRE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências e Inovação Tecnológica**.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Garção de Carvalho

RIO BRANCO, AC  
JULHO, 2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

---

L864a Lopes, Ricardo Kind, 1963 -

Avaliação da atividade leishmanicida de *symphonia globulifera* L.f. proveniente da reserva Chico Mendes, Brasil (Acre) / Ricardo Kind Lopes; orientador: Dr. Carlos Eduardo Eduardo Garção de carvalho. – 2019.  
95 f.: il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia, Rio Branco, 2019.  
Inclui referências bibliográficas.

1. Látex. 2. Leishmania - Amazônia. 3. Reserva Chico Mendes - Acre. I. Carvalho, Carlos Eduardo Garção de. II. Título.

CDD: 509



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,  
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA –  
CITA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE  
*SYMPHONIA GLOBULIFERA* L.f. PROVENIENTE DA  
RESERVA CHICO MENDES, BRASIL (ACRE)**

RICARDO KIND LOPES

Dissertação aprovada em: \_\_\_\_\_

---

Prof. Dr. Carlos Eduardo Garção de Carvalho – Ufac (Orientador)

---

Profa. Dra. Almecina Balbino Ferreira – Ufac

---

Prof. Dr. Delcio Dias Marques – Ufac

Dedico este trabalho a todos aqueles que acreditaram em minha perseverança, especialmente a minha esposa, que me incentivou e apoiou.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por ter me ajudado a manter a serenidade e a perseverança durante toda a jornada da minha pesquisa.

Agradeço à Universidade Federal do Acre, pela disponibilidade do Programa de Pós-Graduação de Ciências, Inovação e Tecnologia para a Amazônia (CITA), e à Coordenação do CITA, que permitiu a efetivação desta pesquisa.

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais, por disponibilizar os laboratórios de Química e de Parasitologia para desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço ao Ifac, por ter disponibilizado o Laboratório de Química, e aos professores, pela colaboração irrestrita.

Agradeço a meu orientador, professor Dr. Carlos Eduardo Garção de Carvalho, ao professor Dr. Délcio Dias Marques e à professora Dra. Lúcia Pinheiro Pimenta, por todo o apoio, dedicação no acompanhamento nas etapas da pesquisa e conhecimento compartilhado.

Agradeço à professora Dra. Almecina Balbino Ferreira, por seu apoio e conhecimento compartilhado na área de Botânica e pelas sugestões imprescindíveis.

Agradeço ao professor Marcelo Machado Viana, por abrir as portas para as análises na UFMG, e ao professor Dr. Ricardo T. Fujiwara, por abrir as portas do laboratório de Parasitologia e pelo seu apoio e disponibilidade do conhecimento.

À professora Dra. Lucienir Pains Duarte, por todo seu apoio e conhecimento e por disponibilizar os laboratórios para as análises de cromatografia.

Faço um agradecimento especial à mestranda Mariana Guerra de Aguiar, por toda a dedicação e conhecimento nas análises químicas e por acompanhar e auxiliar pessoalmente toda essa fase na pesquisa, e à aluna Raquel Martins de Almeida, por executar e me orientar nas análises microbiológicas.

À Dra. Vanny Ferraz agradeço pela execução das análises de RMN, IV e CG/MS, pelo seu apoio e disponibilidade do conhecimento.

Agradeço, por fim, a todos que, direta ou indiretamente, cooperaram para a realização deste trabalho.

“A inteligência!  
É uma questão de química orgânica, nada mais.  
Não somos mais responsáveis por sermos inteligentes do que por sermos  
estúpidos.”  
Paul Léautaud

## RESUMO

A ocorrência persistente de leishmania no Brasil é indicativa da necessidade de estudos que avaliem o potencial da *Symphonia globulifera* L.f., já estudada em outros países, contra os parasitas *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*. A literatura indica que o emprego dos fármacos administrados contra a leishmania é questionável, em razão do alto custo, da forma de aplicação, da toxicidade e dos efeitos colaterais. Embora estudos com *S. globulifera* no continente africano tenham confirmado a sua atividade leishmanicida, no Brasil não foram realizadas muitas pesquisas relacionadas a essa planta. O material vegetal foi colhido no município de Brasileia, no seringal Porongaba, Colocação Santa Maria, no Acre, Brasil, e submetido a análise da ação leishmanicida, através de microdiluição em caldo, e fitoquímica, para confrontação com estudos realizados com plantas da África e da América Central. Neste trabalho, os resultados microbiológicos confirmaram atividades leishmanicidas para o látex de *S. globulifera*, colhido numa planta da Reserva Chico Mendes, no Acre, Brasil, e os índices de seletividade indicam que ele é muito tóxico. As amostras brutas apresentaram melhores resultados que os extratos, inclusive para o valor de  $IC_{50} 8,8 \pm 0,15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Confrontando os resultados de *L. amazonensis* com os de *L. infantum*, pode-se observar que tanto o látex quanto os extratos foram mais significativos para *L. amazonensis* e também apresentaram melhores índices de seletividade (IS). Somente o controle positivo foi mais eficiente para *L. infantum*.

**Palavras-chave:** Látex. Fármacos. *L. amazonensis*. *L. infantum*.



## ABSTRACT

The persistent occurrence of leishmania in Brazil is indicative of the need for studies that evaluate the potential of *Symphonia globulifera* L.f., already studied in other countries, against the parasites *Leishmania amazonensis* and *Leishmania infantum*. The literature indicates that the use of the drugs administered against leishmania is questionable, due to the high cost, the form of application, the toxicity and the side effects. Although studies with *S. globulifera* on the African continent have confirmed their leishmanicidal activity, in Brazil many researches related to this plant have not been carried out. The plant material was collected in the municipality of Brasileia, in the Porongaba rubber tree plantation, Colocação Santa Maria, in Acre, Brazil, and submitted to analysis of leishmanicidal action by microdilution in broth and phytochemistry, in order to compare with studies carried out with plants from Africa and of Central America. The microbiological results confirmed leishmanicidal activities for *S. globulifera* latex and selectivity indices indicate that it is very toxic. The crude samples presented better results than the extracts, even for the IC<sub>50</sub> value  $8.8 \pm 0.15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Confronting the results of *L. amazonensis* with those of *L. infantum*, it can be observed that both latex and extracts were more significant for *L. amazonensis* and also presented better selectivity indices (IS). Only the positive control was more efficient for *L. infantum*.

**Keywords:** Latex. Drugs. *L. amazonensis*. *L. infantum*.

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Uso etnomédico da <i>S. globulifera</i> .....	22
Quadro 2 – Espécies de importância médica quanto à forma clínica da doença e área de distribuição. ....	23
Quadro 3 – Screening fitoquímico da folha, casca, lenho e látex da <i>S. globulifera</i> ...	52

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Árvore ( <i>S. globulifera</i> ), localizada no seringal de Porangaba, Colocação de Santa Maria, Acre, Brasil, em que foi coletado o material.	37
Figura 2 – Momento da coleta de material.	38
Figura 3 – Lenho da <i>S. globulifera</i> triturado, pronto para secagem em estufa.	39
Figura 4 – Materiais vegetais de <i>S. globulifera</i> preparados para secagem.	39
Figura 5 – Avaliação dos compostos sobre o crescimento <i>in vitro</i> de formas amastigotas intracelulares de <i>L. infantum</i> .	47
Figura 6 – Teste de toxicidade BGM com os extratos de <i>S. globulifera</i> .	50
Figura 7 – Teste de toxicidade HEP com os extratos de <i>S. globulifera</i> .	50
Figura 8 – Teste de saponinas da <i>S. globulifera</i> .	53
Figura 9 – Teste de ácidos orgânicos da <i>S. globulifera</i> .	53
Figura 10 – Teste de açúcar redutor na resina da <i>S. globulifera</i>	54
Figura 11 – Teste de depsídio da <i>S. globulifera</i> .	54
Figura 12 – Teste por classe para flavonas, flavonóis, xantonas, flavanonas e flavanonóis com extratos de <i>S. globulifera</i> .	55
Figura 13 – Teste de antraquinonas, antronas e cumarinas com extratos de <i>S. globulifera</i> .	56
Figura 14 – Termogravimetria (TGA) e análise térmica diferencial (DTA) do látex in natura da <i>S. globulifera</i> .	58
Figura 15 – Espectro IV do extrato acetônico da <i>S. globulifera</i> .	59
Figura 16 – Espectro IV extrato de diclorometânico da <i>S. globulifera</i> .	60
Figura 17 – Espectro IV extrato hexânico da <i>S. globulifera</i> .	60
Figura 18 – Espectro IV do extrato hidroalcoólico (70% V/V) da <i>S. globulifera</i> .	61
Figura 19 – Espectro IV do látex <i>in natura</i> da <i>S. globulifera</i> .	61
Figura 20 – Presença da $\alpha,\beta$ -amirina na amostra do filtrado da fração F3 do extrato acetônico da <i>S. globulifera</i> , eluente hexano e acetato de etila (1:1), confrontada com o padrão.	63
Figura 21 – CCD da amostra sólida da fração F3 do extrato acetônico da <i>S. globulifera</i> , eluente dicloro metano + hexano (9:1).	64
Figura 22 – IV da parte sólida da fração F3 do extrato acetônico da <i>S. globulifera</i> .	65

Figura 23 – Cromatograma de íons totais (TIC) do ftalato éster de isobutil 4-metilhept-3-ila, sólido da fração F3 do extrato acetônico da <i>S. globulifera</i> .	65
Figura 24 – Cromatograma de massas do ftalato éster de isobutil 4-metilhept-3-ila, sólido da fração F3 do extrato acetônico da <i>S. globulifera</i> .	66
Figura 25 – Cromatograma de íons totais (TIC) dos metabólitos não saponificáveis sem TMS do látex <i>in natura</i> da <i>S. globulifera</i>	67
Figura 26 – Cromatograma de massas do hidroxitolueno butilado.	67
Figura 27 – Cromatograma de massas do 5,9,13-trimetiltetradeca-4,8,12-trien-1-ol.	68
Figura 28 – Cromatograma de massas do ácido n-hexadecanoico.	68
Figura 29 – Cromatograma de íons totais (TIC) dos metabólitos não saponificáveis com derivação de TMS do látex <i>in natura</i> da <i>S. globulifera</i> .	69
Figura 30 – Cromatograma de massas do transgeranilgeraniol.	71
Figura 31 – Cromatograma de massas do cicloartenol.	71
Figura 32 – Cromatograma de massas do (-) – isolongifolol	72
Figura 33 – Comatograma de íons totais (TIC) dos metabólitos saponificáveis com derivação de TMS do látex <i>in natura</i> da <i>S. globulifera</i> .	72
Figura 34 – Cromatograma de massas do dodecan-1-ol.	74
Figura 35 – Cromatograma de massas do ganederol B.	74
Figura 36 – Cromatograma de massas do $\beta$ -amirina.	75
Figura 37 – Cromatograma TIC do extrato hexânico da <i>S. globulifera</i> .	75
Figura 38 – Cromatograma de massas do ácido dodecanodioico.	77
Figura 39 – Cromatograma de massas do $\beta$ -patchouleno.	77
Figura 40 – Cromatograma de massas do 4-etil-3,5-di-t-butil-1H-pirazol.	77
Figura 41 – Cromatograma de massa do esqualeno.	78
Figura 42 – Cromatograma TIC da amostra B3 do extrato acetônico da <i>S. globulifera</i> .	79
Figura 43 – Cromatograma de massa do (E) -1,3-difenilbut-1-en-1-ol.	80
Figura 44 – Cromatograma de massas do ácido 3,4-di-hidroxibenzoico.	80
Figura 45 – Cromatograma de massas do 2,5-di-t-butil-1,4-benzoquinona.	81
Figura 46 – Cromatograma TIC da amostra A3 do extrato acetônico da <i>S. globulifera</i> .	81

Figura 47 – Cromatograma de massas do 4- (clorometil) -3,5-dimetil-Isoxazol.	82
Figura 48 – Cromatograma de massas do O-desmetilangolensina.	83
Figura 49 – Gráficos representativos das curvas de dose-resposta da atividade do látex puro e dos extratos da <i>S. globulifera</i> para a <i>L. infantum</i> .	86
Figura 50 – Gráficos representativos das curvas de dose-resposta da atividade do látex puro e dos extratos da <i>S. globulifera</i> para a <i>L. amazonensis</i> .	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Metabólitos da fração não saponificável sem derivação de TMS do látex <i>in natura</i> da <i>S. globulifera</i> detectados no CG/EM. ....	67
Tabela 2 – Metabólitos da fração não saponificável com derivação de TMS do látex <i>in natura</i> da <i>S. globulifera</i> obtidos no CG/MS. ....	70
Tabela 3 – Metabólitos saponificáveis com derivação de TMS do látex <i>in natura</i> da <i>S. globulifera</i> obtidos no CG/MS. ....	73
Tabela 4 – Metabólitos identificados da amostra B3 do extrato acetônico da <i>S. globulifera</i> em CG/EM. ....	76
Tabela 5 – Metabólitos identificados da amostra B3 do extrato acetônico da <i>S. globulifera</i> em CG/EM. ....	79
Tabela 6 – Metabólitos identificados da amostra A3 do extrato acetônico. ....	82
Tabela 7 – Dose letal mínima e índice de seletividade do látex puro da <i>S. globulifera</i> e seus extratos (acetônico, hidroalcoólico, hexânico) e controle positivo de drogas contra macrófago, BGM e Hep-G2, para <i>L. infantum</i> e <i>L. amazonensis</i> . ....	85

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>20</b>
2.1 Identificação botânica de <i>S. globulifera</i> L.f.	20
2.2 Características etnomédicas de <i>S. globulifera</i>	21
2.3 Estudos científicos da <i>S. globulifera</i>	24
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
3.1 Coleta do material vegetal	37
3.2 Triagem fitoquímica	40
Saponinas espumídicas	40
Açúcares redutores	40
Polissacarídeos	40
Proteínas e aminoácidos	40
Fenóis e taninos	40
Flavonoides	41
Antocianidinas, antocianinas, flavonas, flavanonóis, xantonas, chalconas, auronas e flavanonóis	41
Leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas	41
Flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas.	42
Glicosídeos cardíacos	42
Catequinas	42
Antraquinonas, antronas e cumarinas	42
Lactonas sesquiterpênicas e outras lactonas	42
Esteroides e triterpenoides	43
Azulenos	43
Alcaloides	43
Purinas	43
Depsídeos e depsidonas	43
3.3 Perfil cromatográfico	43

Cromatográfica líquida comum (CC)	44
Cromatografia de camada delgada (CCD)	44
Cromatografia líquida de média pressão	46
Cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massas.	46
As análises por infravermelho	46
<b>3.4 Análise térmica</b>	<b>46</b>
<b>3.5 Testes de sensibilidade a agentes leischimânicos</b>	<b>47</b>
3.5.1 Ensaio de viabilidade metabólica	49
3.5.2 Análise estatística	51
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>52</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>89</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\alpha$ : alfa

A.E.: acetato de etila

$\beta$ : beta

C-18: octadecil sílica

CAS: casca

CBA: compostos bioativos

CC: cromatografia em coluna

CCD: cromatografia em camada delgada

CG-EM: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CIM: concentração inibitória mínima

Clo: clorofórmica

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono

DMEM: do inglês, Dulbecco's modified eagle médium (meio de cultura utilizado na cultura de grande variedade de células de crescimento em monocamada)

DMSO: dimetilsulfóxido

DP: desvio padrão

ELISA: ensaio de imunoabsorção ligado a enzima

EPM: erro padrão da média

Et: etanólica

FOL: folha

$\gamma$ : gama

°C: grau Celsius

HCl: ácido clorídrico

HPLC: cromatografia líquida de alta performance

Hx: hexânica

IC<sub>50</sub>: concentração inibitória 50%

IFN: interferon

IL: interleucina

IV: espectroscopia de infravermelho

KOH: hidróxido de potássio

L.a.: *Leishmania amazonensis*  
LPG: lipofosfoglicano  
LPS: lipopolissacarídeo  
LTA: leishmaniose tegumentar americana  
 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ : micrograma/mililitro  
 $\mu\text{g}$ : micrograma  
 $\mu\text{L}$ : microlitro  
mg: miligrama  
ml: mililitro  
mm: milímetro  
MPLC: cromatografia líquida de média pressão  
MTT: brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio  
m/v: massa/volume  
m/z: massa/carga  
NM: nanômetros  
NO: óxido nítrico  
NP: 2-aminoetil difenilborinato  
OMS: Organização Mundial da Saúde  
PPAPs: acilfloroglucinóis poliprenilados policíclicos  
PBS: solução tampão salina fosfatada  
RES: resina  
Rf: fator de retenção  
RMN: ressonância magnética nuclear  
SDS: duodecil sulfato de sódio  
Th1: do inglês, T-helper 1  
Th2: do inglês, T-helper 2  
TIC: cromatografia de íons totais  
UV: ultravioleta  
v/v: volume/volume

## 1. INTRODUÇÃO

As comunidades de baixa renda, como as ribeirinhas, quilombolas, indígenas, seringueiras, de densos aglomerados urbanos (antes denominados favelas) e de residentes de regiões inóspitas, fazem parte do grupo de indivíduos brasileiros que carecem de infraestrutura de saneamento básico, de transporte e principalmente de assistência médica. Isso, somado à falta de medicamentos alopáticos, que geralmente são caros, contribui para o uso de plantas medicinais, devido ao seu baixo custo e a sua alta disponibilidade (RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

Devido às dificuldades na aquisição de medicamentos e ao tratamento de doenças dessas comunidades carentes, a OMS prioriza a investigação farmacológica de plantas medicinais (WHO, 2011). Nesse contexto, o Brasil, com sua enorme biodiversidade, vem desenvolvendo pesquisas com plantas que possam ter potencial na criação de novos fármacos.

As condições precárias em que vivem essas comunidades carentes as tornam mais suscetíveis a contrair várias enfermidades, descritas como doenças negligenciadas. Dentre elas, podemos destacar a leishmaniose, que é uma doença infecciosa causada por protozoários parasitários do gênero *Leishmania*, transmitidos por picada de insetos da subfamília *Phlebotominae* (WHO, 2014).

O tratamento da leishmaniose tem custo elevado, sendo demorado e doloroso e com efeitos colaterais desagradáveis (WHO, 2011), e é feito geralmente com drogas que são muito tóxicas, observando-se o aparecimento de resistência à medicação (BASTOS et al., 2012).

O interesse por fitoterápicos e produtos naturais para o tratamento da leishmaniose vem crescendo muito nos últimos anos no Brasil e no mundo, com vistas a encontrar fármacos mais eficientes e menos tóxicos (WHO, 2011).

O isolamento e investigação de metabólitos secundários na busca de princípios ativos com atividades leishmanicidas tem levado pesquisadores do mundo todo ao estudo de várias plantas, dentre elas a *Simphonia globulifera*, que foi testada com sucesso no continente africano por Lenta et al. (2006), utilizando o extrato

metanoico das folhas, e por Fromentin et al. (2013), utilizando o extrato metanoico da semente. Apesar de ambas as pesquisas conseguirem resultados positivos contra a leishmaniose, outras partes dessa planta ainda precisam ser testadas.

Esta pesquisa realiza o estudo fitoquímico do látex amarelo que exsuda do tronco da *S. globulifera* procedente do Brasil (Reserva Chico Mendes, estado do Acre), levanta os seus componentes químicos e confronta os resultados com estudos efetivados para espécimes de outros países, ressaltadas as divergências decorrentes de procedimentos experimentais. Em decorrência, levanta as oportunidades da realização de estudos específicos.

Notadamente quanto ao látex, este trabalho levanta a eficiência de seus princípios ativos no tratamento da *Leishmaniose infantum* e *Leishmaniose amazonensis* e enriquece a tradição etnomédica da região no que se refere ao controle da leishmaniose.

Objetiva verificar, ainda, o índice de seletividade, através da análise de citotoxicidade do látex.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Identificação botânica de *S. globulifera* L.f.

O gênero *Symphonia* consiste de 18 espécies, sendo que a *S. globulifera* L.f. da família Clusiaceae, classificada por Heinrich Gustav Adolf Engler [Engl.] (*FLORA BRASILIENSIS*), é encontrada na África, da Guiné-Bissau à Tanzânia, e nas Américas Central e do Sul, do México ao Brasil (BUDDE et al., 2013), e conhecida como marecage ou manil na Guiana Francesa, árvore buckwax na Guiana e Suriname (SILVA, 2011). No Brasil é popularmente conhecida como anani, ananim e oanani, nomes que vêm do tupi wana'ni (FERREIRA, 1986).

A *S. globulifera* possui inflorescências vermelhas e sua madeira é castanha, pesada, dura e com aproveitamento econômico. Também é utilizada como planta medicinal e ornamental. É uma árvore de até 40 metros de altura, com preferência por terrenos alagadiços. Seu tronco solta um látex de um amarelo intenso. A *S. globulifera*, em ambiente alagado, apresenta enormes raízes que crescem com o tronco e forma em volta dele divisões achatadas, e, em ambiente de terra firme, o tronco apresenta caule reto, sem a presença dessas sapopemas (PESCE, 2009).

Ndinga (2015) esclarece que, na linguagem botânica, os exsudatos são misturas complexas de compostos que são secretados na matriz extracelular e que normalmente aparecem na superfície da planta e completa dizendo que são substâncias que escorrem dos poros de um tecido doente ou danificado de uma planta. Esclarece, ainda, que os exsudatos das plantas se apresentam em forma de látex, goma ou resina, sendo que o látex é uma substância mais frequentemente leitosa, secretada pelas células chamadas laticíferas especializadas (verdadeiras ou anastomosadas) e que tem a particularidade de se solidificar em contato com o ar.

Konno (2011) diz que os látex são emulsões complexas de composição variável, dependendo da espécie, e que há sugestões de que o látex vegetal, análogo ao veneno animal, seja um tesouro de proteínas de defesa e produtos químicos úteis que evoluíram através de interações interespecíficas. Destaca que o látex contém terpenoides, alcaloides, isoprenoides e poliisoprenos (borracha), cardenólidos e enzimas, como proteases, quitinases e glucosidases.

De acordo com nossa constatação, o látex da *S. globulifera*, assim que é extraído, é amarelo-ouro, porém vai ficando alaranjado com pigmentos vermelhos até ficar marrom claro, e endurece, mas não cristaliza. À medida que entra em contato com o ar, no ambiente natural, vira um sólido pegajoso. Quando colocado na geladeira vai ficando amarelo-pardo, permanecendo no estado líquido. Quando guardado no congelador, fica quebradiço, retornando ao estado líquido com baixas temperaturas, como por exemplo o calor das mãos.

Konno (2011) esclarece que mais de 20.000 espécies de mais de 40 famílias de angiospermas expelem látex. O látex pode ser proveniente de várias partes da planta. A *S. globulifera* o produz tanto nos frutos, como no tronco.

Cottet et al. (2016) afirmam que, segundo a literatura, a fitoquímica da *S. globulifera* (Clusiaceae) parece estar altamente correlacionada ao ecossistema local, baseados em que, à época da pesquisa, nenhum dos 31 metabólitos já isolados de árvores da África era comum aos 13 isolados de árvores da Guiana Francesa. No estudo com a planta nascida na região Amazônica, esses pesquisadores detectaram apenas seis metabólitos comuns aos estudos anteriores. Sobre extratos de látex, eles afirmam que a boa separação de grupos com uma alta explicação da variância (> 60%) sugere diferenças fitoquímicas entre plantas de cada região. Também informam que compostos pertencentes a famílias moleculares menos polares parecem ser principalmente responsáveis pelas diferenças fitoquímicas.

Para investigar a influência geográfica no metaboloma em *S. globulifera*, uma abordagem metabolômica de alto rendimento foi desenvolvida envolvendo cromatografia líquida de ultra-alto desempenho (UHPLC) acoplada a espectrometria de massa de alta resolução (HRMS), levando à identificação de 37 compostos como potenciais regiomarcadores entre espécies africanas e americanas de *S. globulifera* (COTTET et al., 2017).

## **2.2 Características etnomédicas de *S. globulifera***

Fromentin et al. (2014) relatam que as atividades biológicas de *S. globulifera* variam de acordo com a parte vegetal usada, sendo que a casca é a principal, tanto na África quanto nas Américas Central e do Sul, preparada como uma decocção ou

infusão, e *que essa planta* é amplamente utilizada na medicina tradicional no combate a vários distúrbios, como exibido abaixo:

**Quadro 1 – Uso etnomédico da *S. globulifera*.**

<b>País</b>	<b>Parte da planta</b>	<b>Uso etnomédico</b>
Gamboia	Casca	Sarna
Nigéria	Folhas Frutos e folhas	Doenças de pele, malária e diabetes Doenças venéreas, problemas de ereção e feridas
Uganda	Casca	Tratamento de tosse e pré-hepático, icterícia, febre e vermes intestinais
Camarões	Casca e folhas	Leishmaniose e doenças protozoárias
Panamá	Látex fresco	Cataplasma contra doenças de pele e dores no corpo
Brasil – Pará	Látex  Casca	Estímulo à gravidez e tratamento de distensão muscular e fraturas ósseas (usado em lugar de gesso) Corrimento vaginal
Colômbia	Casca	Leishmaniose cutânea

Fonte: Fromentin et al. (2014)

De acordo com Ngouela et al. (2006) a casca é usada pelos curandeiros tradicionais para tratar a malária.

Silva (2011) relata que sua seiva/látex é empregada contra rasgadura, reumatismo e tumores.

A leishmaniose é uma doença do tipo antropozoonose que afeta 88 países, o que denota a importância da realização de estudos que permitam o desenvolvimento de novas estratégias de vacinação ou quimioterapias (PEREIRA, 2017).

As espécies do gênero *Leishmania* determinam doenças do sistema fagocítico mononuclear, causando um complexo de patologias denominado de leishmaniose. Em vista das doenças apresentarem características clínicas e epidemiológicas diversas em cada área geográfica, foram consideradas entidades distintas, sendo agrupadas em quatro grupos: leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea, leishmaniose cutânea difusa e leishmaniose visceral, conforme se vê no quadro 2 (REY, 2010).

**Quadro 2 – Espécies de importância médica quanto à forma clínica da doença e área de distribuição.**

<b>Forma clínica</b>	<b>Agente(s) etiológico(s)</b>
Velho Mundo	
Cutânea	<i>Leishmania aethiopica</i> ; <i>Leishmania major</i> ; <i>Leishmania tropica</i> ; <i>Leishmania infantum</i>
Difusa	<i>Leishmania aethiopica</i>
Visceral	<i>Leishmania donovani</i> ; <i>Leishmania infantum (chagasi)</i>
Novo Mundo	
Cutânea	<i>Leishmania amazonensis</i> ; <i>Leishmania braziliensis</i> ; <i>Leishmania guyanensis</i> ; <i>Leishmania lainsoni</i> ; <i>Leishmania mexicana</i> ; <i>Leishmania naiffi</i> ; <i>Leishmania panamensis</i> ; <i>Leishmania peruviana</i> ; <i>Leishmania shawi</i> ; <i>Leishmania venezuelensis</i> ; <i>Leishmania infantum</i>
Difusa	<i>Leishmania amazonensis</i> ; <i>Leishmania mexicana</i> ; <i>Leishmania pifanoi</i>
Mucosa	<i>Leishmania braziliensis</i>
Visceral	<i>Leishmania infantum (chagasi)</i>

Fonte: Markell & Voge S. Parasitologia Médica. 8ª Edição.

Segundo o Ministério da Saúde a leishmaniose visceral é uma zoonose de evolução crônica, com acometimento sistêmico, que, se não tratada, pode levar a óbito em até 90% dos casos. É transmitida ao homem pela picada de fêmeas do inseto vetor infectado. Os transmissores são insetos conhecidos popularmente como mosquito palha, asa-dura, tatuquiras e birigui, entre outros. No Brasil, a principal espécie responsável pela transmissão é a *Lutzomyia longipalpis*. Raposas (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*) e marsupiais (*Didelphis albiventris*) têm sido apontados como seus reservatórios silvestres e cães (*Canis lúpus*), como reservatórios urbanos.

A leishmaniose visceral (LV) canina é produzida por um protozoário dimórfico Trypanosomatidae do complexo *L. donovani* que, nas formas amastigotas, parasita o sistema fagocítico-mononuclear de mamíferos, incluindo o homem, e células apresentadoras de antígenos potenciais, como as células de Langerhans, dendríticas e granulócitos (POCAI et al., 1998).



Na leishmaniose o tratamento é feito principalmente com medicamentos à base de antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina), introduzidos como quimioterápicos na década de 1940, enquanto anfotericina B e pentamidina são os de segunda escolha na terapêutica. Contudo, a utilização desses extratos é questionável em virtude da eficácia variável entre as espécies de *Leishmania*, o alto custo, a via de administração parenteral, elevada toxicidade e efeitos adversos, como mialgias, nefrites, alterações hepáticas, distúrbios gastrointestinais, respiratórios, cardiovasculares, arritmias fatais e morte súbita. Além disso, há relatos de resistência dos parasitos, devido a baixas dosagens e tratamentos descontínuos (BRIGIDO, 2016).

O primeiro composto antimonial pentavalente utilizado no tratamento da leishmaniose foi a estibamina ureia, desenvolvida em 1920, seguida do estibogluconato de sódio (Pentostam®), em 1936 (RATH et al., 2003). No tratamento da leishmaniose cutânea e visceral utiliza-se o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®), em sua composição (BRIGIDO, 2016).

### **2.3 Estudos científicos da *S. globulifera***

Fromenti et al. (2014) relatam que as plantas da espécie *S. globulifera* surgiram nos continentes americano e africano e mostram alguma diversidade morfológica através dos locais, sendo que essa distinção morfológica e a existência de algumas subfamílias e diferenças no solo e no clima do país provavelmente induziram uma variação no metaboloma e geraram um pool de quimiodiversidade.

Esses autores informam que estudos fitoquímicos da *S. globulifera* levaram à identificação de mais de 40 compostos, incluindo vários policíclicos acilfloroglucínóis poliprenilados, e as avaliações apontaram a promissoras atividades biológicas desses metabólitos secundários, principalmente como antiparasitários ou antimicrobianos, confirmando o uso tradicional dessa planta, e que há estudos que comprovam que a *S. globulifera* apresenta atividade: antimalárica; antioxidante; antileishmanial; antimicrobiana; anticancerígena; anti-HIV; anti-FAZ; anticolinesterásica.

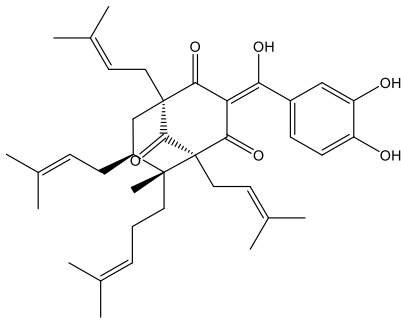
Cottet et al. (2016) realizaram uma comparação metabolômica de quatro diferentes partes de *S. globulifera* provenientes da Guiana Francesa e dos Camarões (casca, látex, folhas e galhos). Segundo eles, a identificação de xantonas foi complexa

devido ao grande número de isômeros existentes, similaridades entre padrões de fragmentação e numerosos centros estereoquímicos.

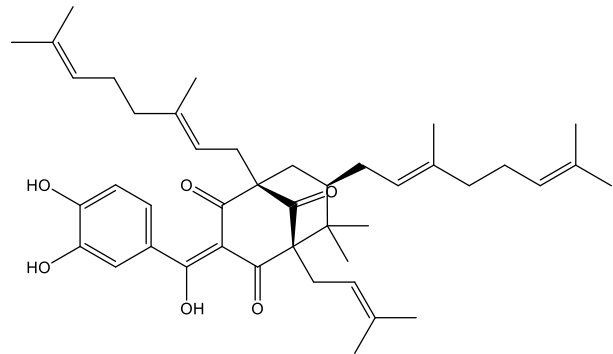
Segundo Fromenti et al. (2014), a *S. globulifera* tem sido submetida a vários estudos fitoquímicos nos continentes americano e africano e que, curiosamente, algumas desigualdades foram observadas quanto ao seu perfil metabólico, mas que, porém, desde a primeira publicação, em 1992, descrevendo alguns acilfloroglucinóis poliprenilados policíclicos (PPAPs) de *S. globulifera* como inibidores de HIV, o interesse pela planta e seus compostos bioativos tem crescido sempre.

Nesta dissertação foram selecionados 21 artigos, publicados a partir de 1992, com plantas procedentes da Camarões (África); Brasil, Peru e Colômbia (América do Sul) e Guiana Francesa (América Central), que ilustram a amplitude das áreas de interesse medicinal da *S. globulifera*, que variam de oncologia a odontologia, englobando virologia (herpes e HIV), bacteriologia (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Mycobacterium phlei*, *Escherichia coli*, *Vibrio anguillarum*, *Klebsiella pneumonia* e *Bacillus subtilis*), micologia (*Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*), parasitologia (*Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani*, *Leishmania chagasi* e *Leishmania infantum*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei rhodesiense*) e enzimologia (FAS), relatados a seguir.

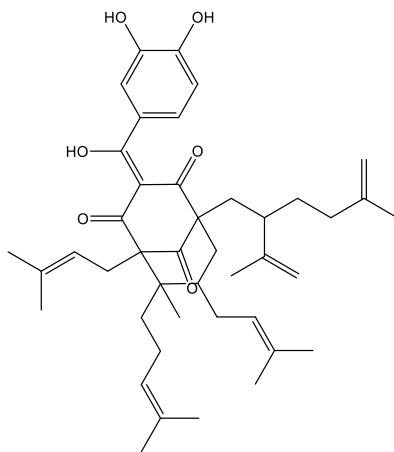
Gustafson et al. (1992) estudaram a atividade anti-HIV das gutíferonas, benzofenonas de raízes terrestres de *S. globulifera*, retiradas em área de estudo do gorila Ndakan da República Centro-Africana. O extrato CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH mostrou atividade anti-HIV reprodutível na triagem primária. As gutíferonas A-D foram testadas no rastreio primário anti-HIV do NCI e todas mostraram um nível semelhante de atividade.



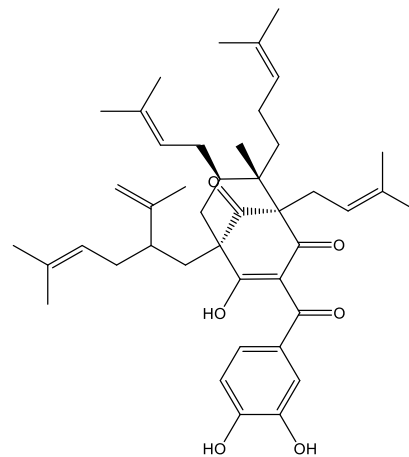
Guttiferona A



Guttiferona B



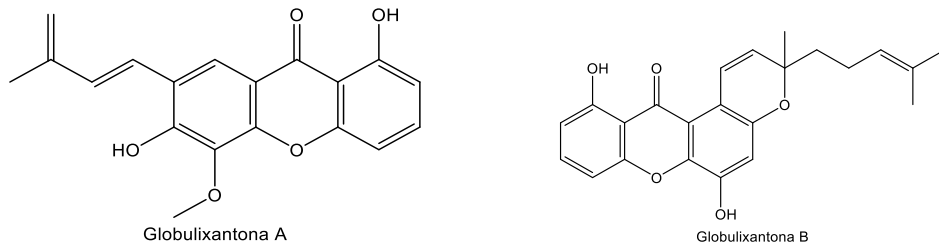
Guttiferona C



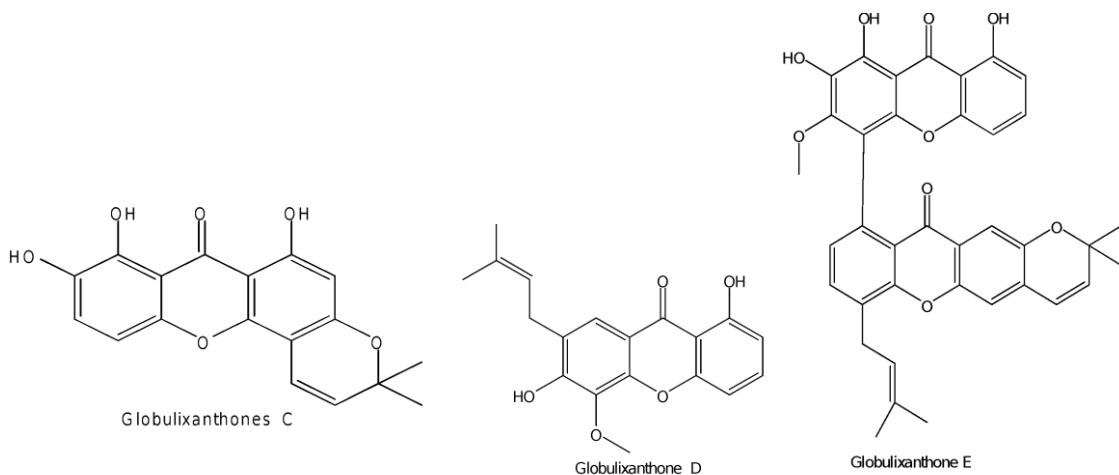
Guttiferona D

Lopez et al. (2001) analisaram a atividade antiviral e antimicrobiana de plantas medicinais colombianas, dentre elas a casca de uma *S. globulifera* de Baixo Calima, Colômbia. O extrato de *S. globulifera* apresentou atividade contra o vírus herpes simplex HSV (vírus completo inativado de  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) =  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; não apresentou citotoxicidade no teste e foi positivo para *S. faecalis*, *M. phlei* e *B. subtilis*.

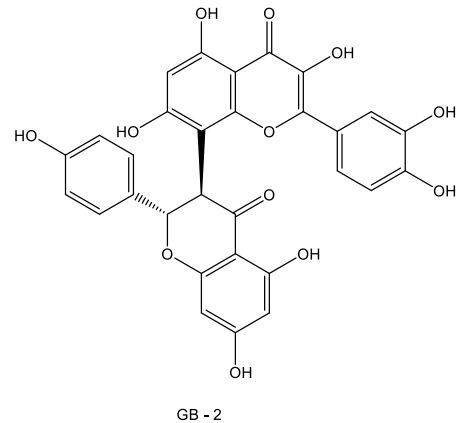
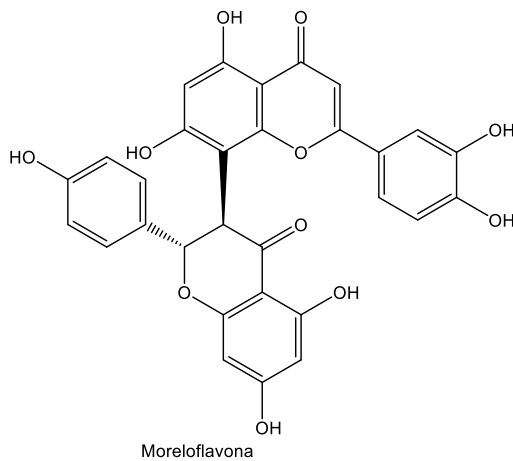
A atividade anticâncer de globulixantonas A e B, xantonas citotóxicas com grupos isoprenoides da casca da raiz de *S. globulifera* procedente de Yaounde, Camarões, foi analisada por Nkengfack et al. (2002). Os compostos globulixantonas A e B foram avaliados *in vitro* quanto a sua atividade citotóxica contra o carcinoma epidermoide humano das células da nasofaringe (KB) e possuem citotoxicidade significativa *in vitro* contra a linha celular KB.



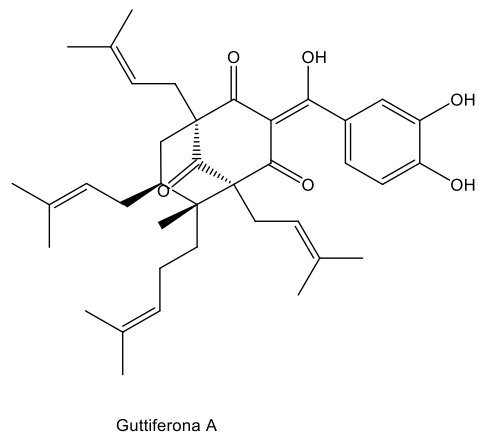
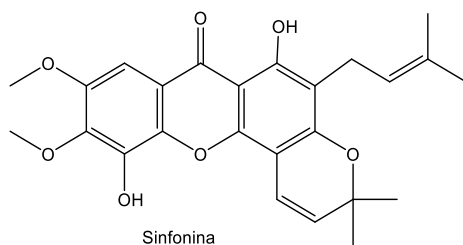
Nkengfack et al. (2002) estudaram globulixantonas C, D e E, xantonas preniladas com propriedades antimicrobianas, da casca da raiz de *S. globulifera* proveniente de laoundé, Camarões, África. As atividades dos três compostos foram quase equivalentes ou inferiores às demonstradas pela treptomicina com todas as três estirpes Gram-positivas testadas, mas nenhum desses compostos estava ativo (MIC > 100) contra bactérias Gram-negativas.



Moreloflavona e GB-2, isoladas de folhas de *S. globulifera* procedente de Maynas, Loreto, Peru, foram estudados como inibidores de sintase de ácidos graxos de plantas por Li et al. (2002). A pesquisa envolveu também fracionamentos de *Chlorophora tinctoria*, *Paspalum conjugatum*, *Buchenavia parviflora* e *Miconia pilgeriana*). Todos os compostos foram testados no ensaio antifúngico baseado em células contra *C. albicans* e *C. neoformans*. Os dois biflavonoides, moreloflavona e GB-2, foram ativos contra FAZ.

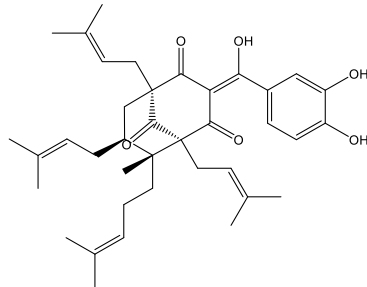


Sinfonina, uma piranoxantona prenilada com atividade antimicrobiana, isolada das sementes da *S. globulifera*, procedente de Fundong, na província noroeste de Camarões, foi pesquisada por Lenta et al. (2004). O extrato apresentou atividade fraca a  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  quando testado contra *S. aureus*, *S. feacalis*, *K. pneumonia* e *E. coli* no ensaio de diluição em linha de agar. A nova xantona sinfonina apresentou atividade antimicrobiana quase equivalente ou inferior à demonstrada pela gentamicina ( $0,60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $4,52 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $8,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $0,90 \mu\text{g.mL}^{-1}$  respectivamente) contra: *S. aureus* ( $3,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ); *S. feacalis* ( $4,20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ); *K. pneumoniae* ( $25,90 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e *E. coli* (inativo).



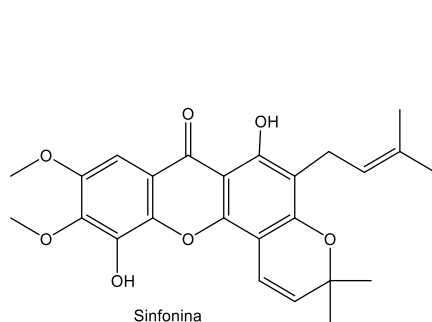
Cottet et al. (2006) demonstraram que agregados de guttiferona A modulam a atividade do regulador de informação silencioso 1 (SIRT1), através do estudo de

folhas, raízes, látex, casca, sementes, pericarpos e flores de *S. globulifera* de Macouria, Guiana Francesa.

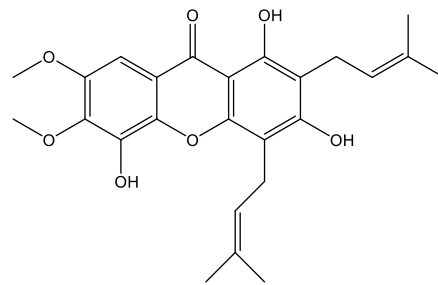


Guttiferona A

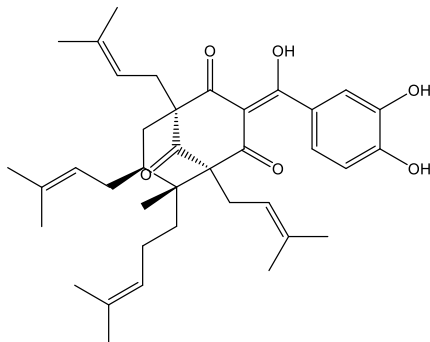
Em 2006, Ngouela et al. analisaram as atividades antiplasmodiais e antioxidantes de constituintes das conchas de sementes de *S. globulifera* de Fundong, na província noroeste dos Camarões. Como resultado foi demonstrado que o eritrócito infectado por *Plasmodium* está sob estresse oxidativo constante. A guttiferona A mostrou uma atividade de eliminação de radicais muito boa em relação ao antioxidante ácido caféico.



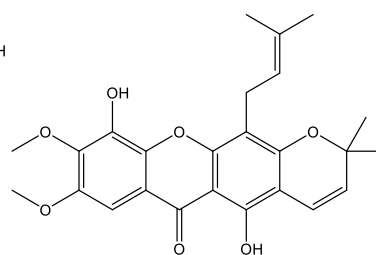
Sinfonina



Globuliferina

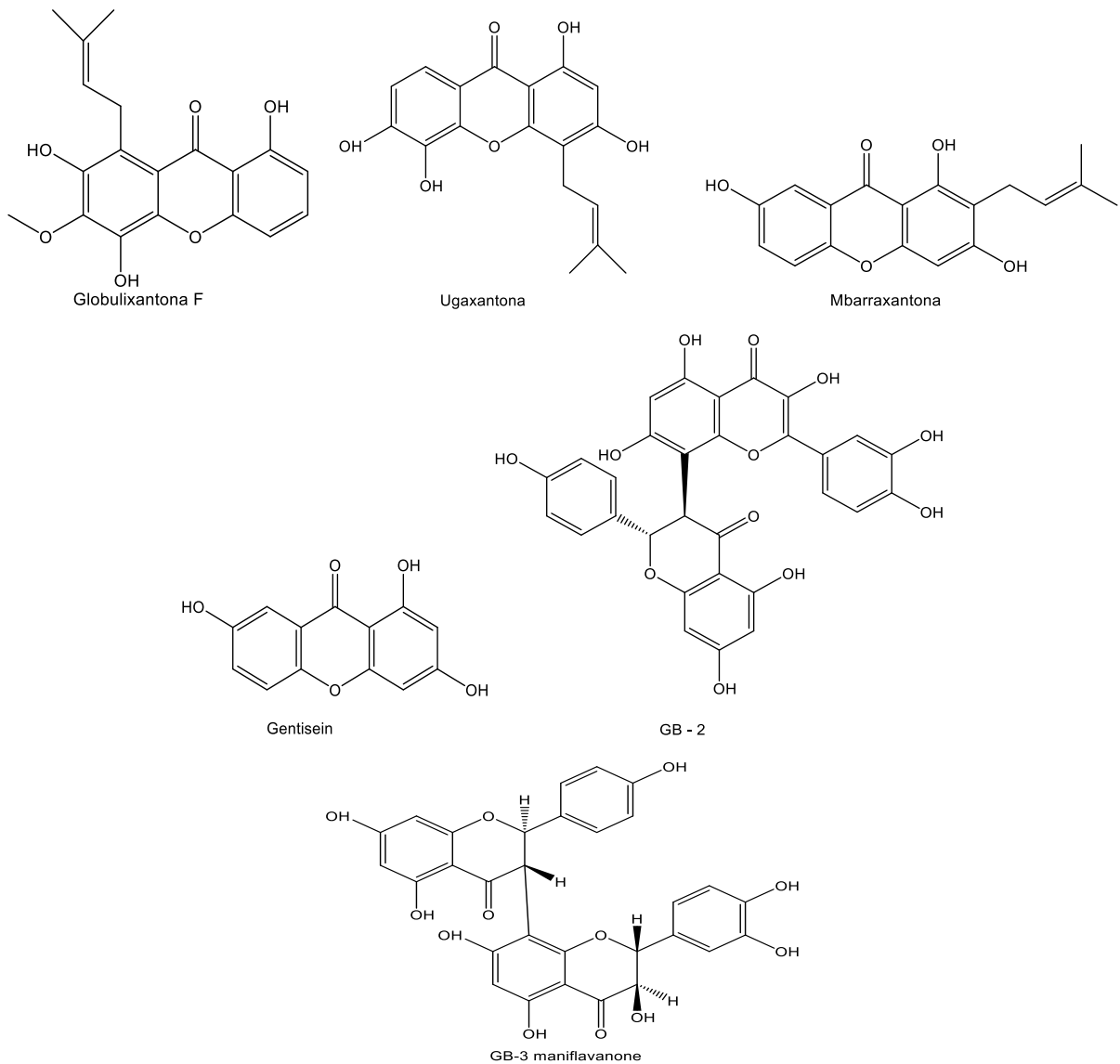


Guttiferona A



Gaboxantona

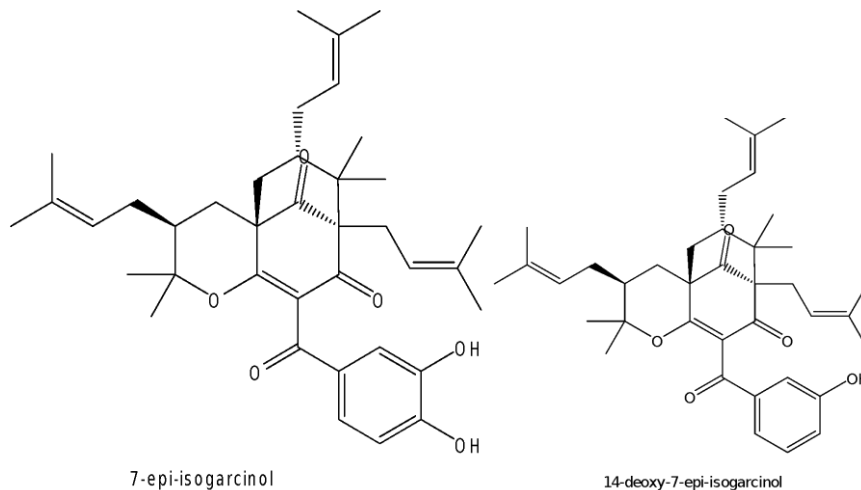
Mkounga et al. (2009) realizaram pesquisa com globulixantona F, uma nova xantona polioxygenada, com um grupo isoprenoide e dois biflavonoides antimicrobianos da casca do caule de *S. globulifera* de Yaounde, Camarões.



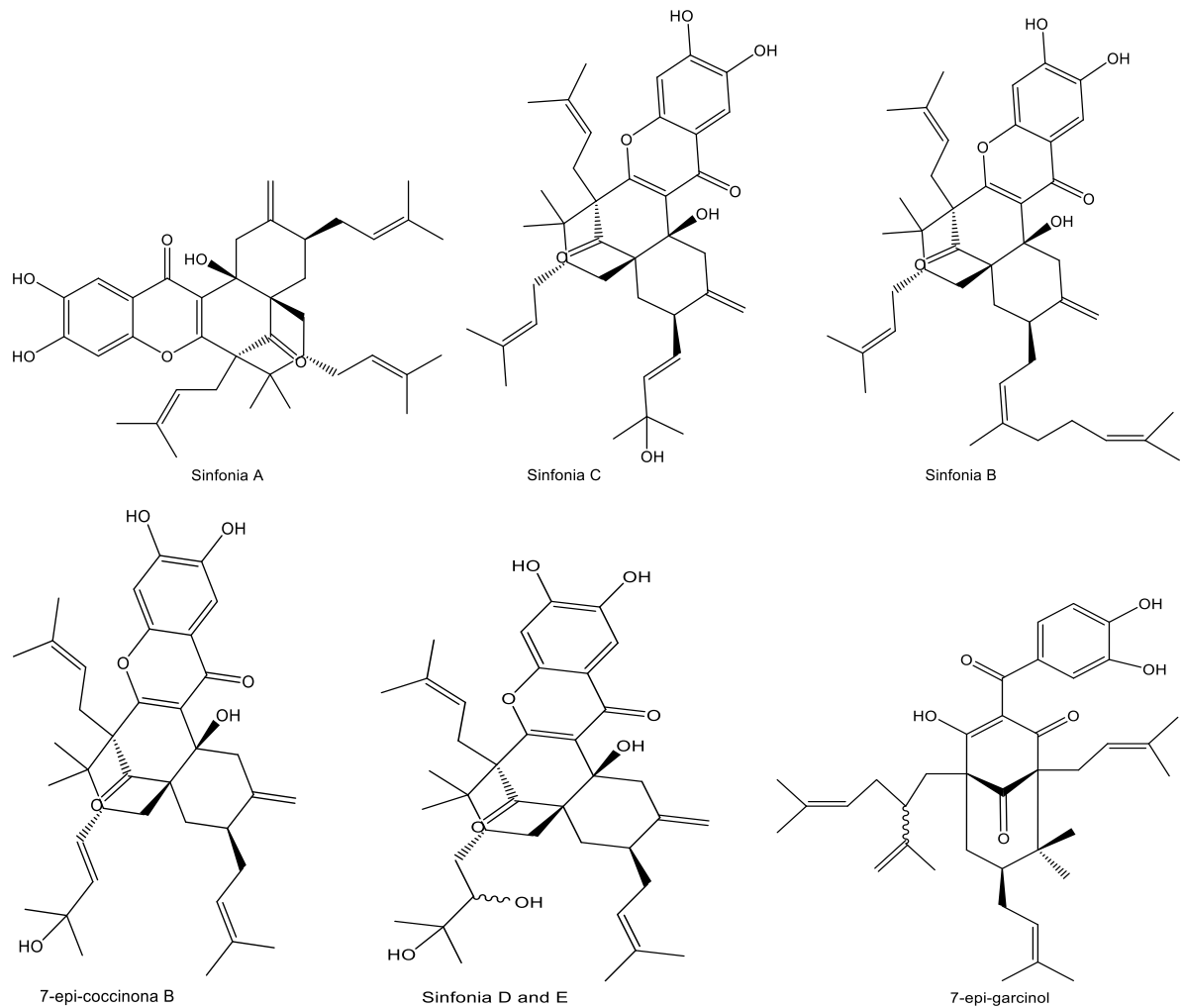
Em avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de extratos de folhas de *S. globulifera* proveniente de Icoaraci, Belém, Pará, Brasil, sobre microrganismos relacionados à lesão de mucosite oral, Araújo (2010) destacou halo de inibição  $\geq 12$  mm – CIM abaixo de  $100 \text{ mg. mL}^{-1}$  – sobre: *S. aureus* (halo de 13 mm), *C. krusei* (halo de 12 mm), *C. albicans* (halo de 12 mm), *C. parapsilosis* (halo de 12 mm), *S. mitis*

(halo de 12 mm), *S. sanguis* (halo de 13 mm) e *S. mutans* (halo de 12 mm). Em relação às propriedades anticolinesterase, que, segundo a autora, representam o alvo mais atraente para o desenho de drogas e a descoberta de inibidores baseados em mecanismos para o tratamento de distúrbios degenerativos dos neurônios, como a doença de Alzheimer, chegou a atividades inibitórias de AChE e BchE, com erro padrão de média de cinco ensaios, para gutiferona A – AchE $\pm$ SEM = 0,88  $\pm$  0,04 e BchE $\pm$ SEM = 2,77  $\pm$  0,02.

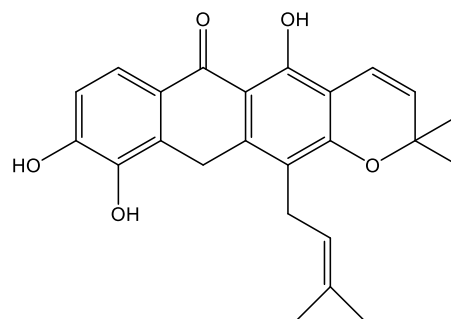
Marti et al. (2010) estudaram os derivados de benzofenona antiplasmodial da casca da raiz de *S. globulifera* procedente de densa floresta tropical da Guiana Francesa, o que levou ao isolamento de onze novos derivados de PPAPs. Ensaios biológicos revelaram que PPAPs tendo um heterociclo fundido à fração floroglucinol exibiu potente atividade antimalárica.







Atividades anticâncer de seis compostos naturais selecionados de algumas plantas medicinais camaronenses foram objeto de uma pesquisa realizada por Kuete et al. (2011). A xantona V1 foi isolada de folhas de *S. globulifera* e foi feita a análise anticâncer para as linhas celulares CCRF-CEM, CEM / ADR5000 e MiaPaCa-2.1.



Xantona V1

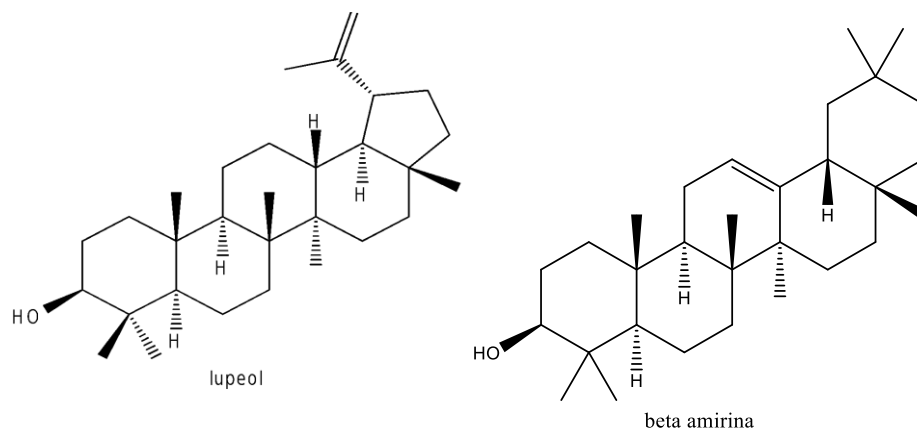
Folhas de *S. globulifera* do distrito de Icoaraci (região metropolitana de Belém, PA, Brasil) foram pesquisadas por Silva (2011), sendo que o extrato liofilizado de *S. globulifera* apresentou propriedade redutora do radical DPPH. Os ensaios da atividade antimicrobiana revelam que o extrato não apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, porém apresentou atividade fungistática para *C. albicans*. A fração hexânica também apresentou atividade fungistática, além de ter atividade bactericida para *S. aureus*.

A eficácia de extratos de órgãos aéreos de *S. globulifera* (a pesquisa envolveu extratos de 25 plantas da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica, Brasil), comparada com a clorexidina, contra *Enterococcus faecalis* como nova tendência em odontologia, foi comprovada por Castilho et al. (2013). Os extratos de *S. globulifera* preveniram significativamente a formação de biofilme e evitaram a formação de biogel. O RBUOH do extrato *S. globulifera* expressa atividade antioxidante, que pode estar relacionada à presença de compostos fenólicos, como flavonoides e seus derivados, iso-venonoides, calconas, catequinas, ácidos fenólicos livres, lignanas, curcumina e seus derivados, e/ou à presença de alcaloides específicos e compostos relacionados. Tais compostos podem estar envolvidos na atividade antibacteriana e antioxidante, embora não haja relação entre processos antioxidantes e agentes antibacterianos. O estudo mostrou atividade antimalárica significativa de *S. globulifera*, que pode ser devida à presença de acilnoroglucínóis poliprenilados policíclicos e derivados oxidados.

Oliveira et al. (2013) efetuaram um trabalho sobre 19 plantas medicinais coletadas no estado do Amapá, Brasil, para verificar a atividade antimicrobiana dessas plantas, concluindo que os extratos de *S. globulifera* (folhas, casca e frutos) foram ativos contra *S. aureus*, com desvio padrão e mediano (tamanho do halo) da atividade antimicrobiana de  $3,66 \text{ mm} \pm 0,76$ , respectivamente.

Rodrigues (2013) realizaram uma avaliação de extratos vegetais bioativos de plantas amazônicas sobre a concentração de testosterona sérica em camundongos pós-púberes. Como resultados, destacaram que a *S. globulifera* provocou interferência na concentração sérica de testosterona em camundongos pós-púberes e alteração de peso dos camundongos em relação aos grupos controle e no tamanho dos testículos.

Em um estudo para verificar as alterações do fenótipo comportamental de camundongos após a administração de anani, Suffredini et al. (2017) analisaram o lupeol,  $\beta$ -amirina e 3- $\beta$ -hidroxiglutina-5-eno e o ácido oleanólico (descrito pela primeira vez), presentes nos órgãos aéreos de planta da Floresta Amazônica (em floresta de igapó) de Manaus, AM, Brasil. Observaram que a EB1257 (amostra de *S. globulifera*) NLD mostrou um perfil similar dos comportamentos fenotípicos observados no primeiro estágio dos experimentos. Uma diminuição na atividade geral, sistemas autônomos e sensoriais foram observados. Além disso, um aumento da ptose e redução da piloereção e aumento da cianose reforçaram a hipótese de que o extrato de EB1257 atua nos níveis do sistema autônomo. Esses sinais poderiam estar relacionados à toxicidade do extrato, porque examinou-se a DLN, mas não a dose não tóxica. A compressão da cauda foi reduzida, sugerindo uma resposta reduzida à dor. Concluíram que a LD50 para EB1257 é de 547,0 mg / kg e informaram que o extrato é considerado prejudicial pela Comunidade Europeia ([oecd.org/ehs/test/testlist.htm](http://oecd.org/ehs/test/testlist.htm)) e pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (<http://www.epa.gov>).

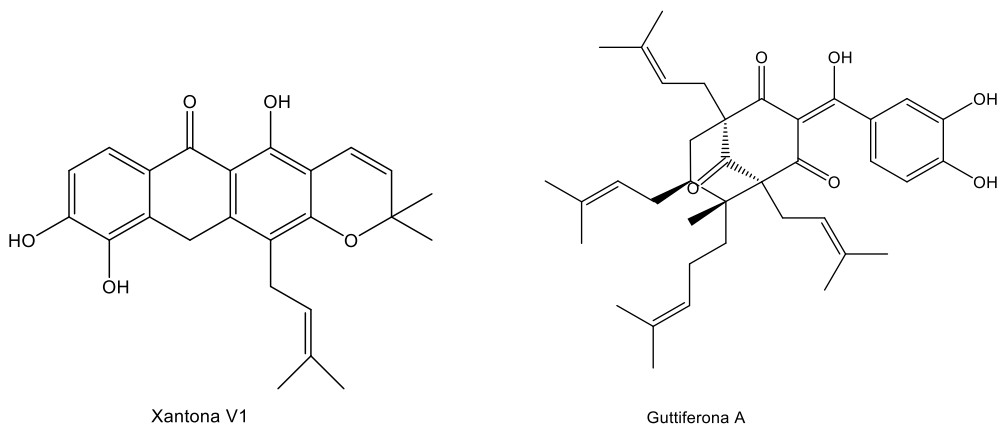


Ateba et al. (2018) pesquisaram as propriedades antiplasmodiais e citotoxicidade de fungos endofíticos do gênero *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* e *Bipolaris*, cultivados a partir de fragmentos da casca saudável e madura do caule de *S. globulifera* de Nomayos, Região Centro dos Camarões, África. Os resultados do estudo indicam que os fungos endofíticos de *S. globulifera* são fontes promissoras de compostos atípicos, que podem ser investigados como novas drogas contra a malária.

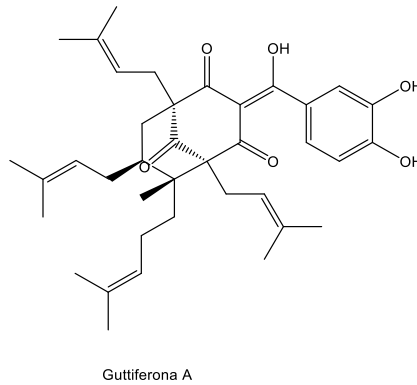
Relativamente a pesquisas relacionadas ao tratamento de leishmaniose, foram encontrados três artigos, sendo dois de Lenta et al. (2006 e 2007) e um de Frometnin et al. (2013), sendo que nenhum deles analisou o látex e abordou a *L. infantum* e a *L. amazonensis*, como segue.

Atividades antiprotozoárias *in vitro* e citotoxicidade de algumas plantas medicinais camaronenses selecionadas, incluindo folhas de *S. globulifera* procedente de Banganté, Camarões, foram pesquisadas por Lenta et al. (2006). O extrato metanólico de *S. globulifera* – IC<sub>50</sub> (µg.mL<sup>-1</sup>) apresentou os seguintes resultados: *P. falciparum* 4,1±0,5; *T. cruzi* >30; *T. brucei rhodesiense* 11,5±0,5; *L. donovani* 2,1±0,8. A citotoxicidade foi de 52,3±5,6 e a relação entre atividade citotóxica em células L-6 e atividade antiplasmodial contra a cepa K1 de *P. falciparum* foi de 14,0. O extrato apresentou a melhor relação entre citotoxicidade e atividade antiplasmodial (SI – índice de seletividade = 14,0) e boa atividade contra a cepa resistente à cloroquina K1 do *P. falciparum*, com valores de IC<sub>50</sub> abaixo de 5 µg.mL<sup>-1</sup> = extrato metanólico (IC<sub>50</sub> = 4,1 ± 0,5). Obs.: os valores de IC<sub>50</sub> são médias ± D.P. (n = 2), p <0,05; Sla: razão entre a atividade citotóxica nas células L-6 e a atividade antiplasmodial contra a cepa K1 de *P. falciparum*; Slb: razão entre a atividade citotóxica nas células L-6 e a atividade antitripanossomal contra *T. brucei rhodesiense*.

As atividades inibidoras leishmanicida e colinesterase de compostos fenólicos (gutiferona A e xantona V) de *S. globulifera* foram pesquisadas por Lenta et al. (2007), analisando extratos das folhas de planta de Banganté, Camarões, África. Rastreio leishmanicida dos compostos isolados mostrou que a inibição do crescimento do parasita foi superior a 50%: gutiferona A – 0,8 µg.mL<sup>-1</sup> = 82,1% e 4,8 µg.mL<sup>-1</sup> = 98,3%; xantona V1 – 0,8 µg.mL<sup>-1</sup> = 99,6% e 4,8 µg.mL<sup>-1</sup> = 71,9%; e determinação de IC<sub>50</sub> (µM) para gutiferona A – *L. donovani* = 0,16, células L6 = 7,3 e SI<sup>c</sup> = 46; Xantona V – *L. donovani* = 1,40, células L6 = 18 e SI<sup>c</sup> = 13.



Fromentin et al. (2013) investigaram as sementes de *S. globulifera* procedente da Província Noroeste dos Camarões, África, para estudar a ação da guttiferona A contra *T. brucei*, *L. donovani* LV9 e *P. falciparum*, obtendo como resultados: contra *T. brucei*: % de inibição 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  = 93,26 / 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  = 96,45 / 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  = 38,51;  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ )  $\pm$  SD= 2,95  $\pm$  0,94; células vero  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ )  $\pm$  SD = 7,05  $\pm$  0,36; SI = 2,4; contra *L. donovani* LV9: formas promastigotas  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ )  $\pm$  SD= 5,83  $\pm$  0,35; células vero  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ )  $\pm$  SD = 7,05  $\pm$  0,36; SI = 1,2; contra *P. falciparum*: % de inibição 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  = 99,63 / 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  = 98,10 / 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  = 16,11;  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ )  $\pm$  SD= 3,32  $\pm$  0,45.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta do material vegetal

O material vegetal da *S. globulifera* L.f., consistindo de folhas, cascas, lenho e látex, foi coletado no município de Brasileia, Estado do Acre, Brasil, no seringal Porongaba, colocação Santa Maria, no Km 28 do Ramal Esperança.

No entorno da colocação Santa Maria foi encontrada uma única árvore, sendo ela adulta, de aproximadamente 25 metros de altura, DAP 0,41 m, localizada sob coordenadas de latitude S 10° 48' 37,4" e longitude W 68° 46,31", elevação de 190 m, em terra firme, sem sapopemas, conforme perfil apresentado na **Erro! Fonte d e referência não encontrada..**

**Figura 1 – Árvore (*S. globulifera*), localizada no seringal de Porongaba, Colocação de Santa Maria, Acre, Brasil, em que foi coletado o material.**



Fonte: Ricardo Kind, 2018.

As exsiccatas serão depositadas no Herbário do Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre – Ufac-PZ, para que possam ser catalogadas e colocadas no acervo para futuras pesquisas.

As coletas foram autorizadas pelo SISBIO/ICMBio com a numeração 60470. A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA foi cadastrada no Sisgen sob o nº A0F89C0, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

A figura 2 apresenta o momento da coleta do látex da *S. globulifera*, feita no início de fevereiro de 2018. Foram utilizadas facas de seringa, de modo a não comprometer a sobrevivência da árvore; funil de plástico, para ajudar na coleta, e frasco âmbar, para acondicionar o material da coleta. A sangria ocorreu das 8 às 16 horas.

**Figura 2 – Momento da coleta de material.**



Fonte: Ricardo Kind, 2018.

Foram colhidas amostras de folha, casca, lenho e látex. Com exceção desse último, todos os materiais vegetais foram triturados e secos separadamente e colocados em estufa com circulação de ar Quimis a 40 C<sup>o</sup>, nos laboratórios da Unidade de Tecnologia de Alimentos (Utal) da Ufac, durante quatro dias, conforme mostrado nas figuras 3 e 4.

**Figura 3 – Lenho da *S. globulifera* triturado, pronto para secagem em estufa.**



Fonte: Ricardo Kind, 2018.

**Figura 4 – Materiais vegetais de *S. globulifera* preparados para secagem.**



Fonte: Ricardo Kind, 2018.

Em seguida, no laboratório de Pesquisa e Extensão da Ufac, essas amostras vegetais secas foram colocadas em álcool etílico 70% (V/V). As tinturas foram submetidas a filtrações e a evaporações e colocadas em estufa para obtenção dos extratos secos. Somente o látex foi utilizado *in natura*, não havendo necessidade de nenhum procedimento de extração, já que o mesmo permanecia em estado líquido quando acondicionado no refrigerador



### 3.2 Triagem fitoquímica

A caracterização do material fitoquímico foi realizada no laboratório de química do Instituto Federal do Acre (IFAC), Campus Xapuri, em triplicata e baseada nos trabalhos de Barbosa (2001), com algumas adaptações. Da amostra coletada foram utilizados 4 g (Mettler Toledo AB 104) do extrato seco da *S. globuifera* para a realização da caracterização fitoquímica do material.

Na preparação do extrato-mãe dissolveram-se 500 mg do extrato seco em 100 ml de água destilada.

#### *Saponinas espumílicas*

Foram diluídos 5 ml do extrato-mãe em 15 ml de água destilada e agitados vigorosamente durante 2 minutos em tubo fechado. Uma camada de espuma estável por mais de 30 minutos indica resultado positivo (BARBOSA, 2001).

#### *Açúcares redutores*

Foram adicionados 2 ml do teste químico para diferenciar carboidratos a 5 ml da solução-mãe e aquecidos em banho-maria em ebulição por 5 minutos. Precipitado vermelho-tijolo indica resultado positivo (BARBOSA, 2001).

#### *Polissacarídeos*

Adicionaram-se 2 gotas de lugol a 5 ml da solução-mãe. Coloração azul indica resultado positivo (BARBOSA, 2001).

#### *Proteínas e aminoácidos*

Foram adicionados 0,5 ml de solução aquosa de ninidrina a 0,1% a 3 ml da solução-mãe e aquecidos até ebulição. Coloração violeta persistente indica resultado positivo (BARBOSA, 2001).

#### *Fenóis e taninos*

Adicionaram-se 2 gotas de solução alcoólica de  $\text{FeCl}_3$  a 1% a 5 ml da solução-mãe. Mudança na coloração ou formação de precipitado é indicativa de reação positiva, quando comparado com o teste em branco. Coloração inicial entre o azul e o vermelho é indicativa da presença de fenóis, quando o teste em branco for negativo; precipitado escuro de tonalidade azul indica presença de taninos pirogálicos e verde, presença de taninos catéquicos (BARBOSA, 2001).

### *Flavonoides*

*Geral:* dissolveram-se 25 mg do extrato seco em 5 ml de metanol, que foram submetidos a filtração, aos quais foram adicionadas 5 gotas de HCl concentrado e raspas de magnésio. O surgimento de uma coloração rósea na solução indica reação positiva (BARBOSA, 2001).

Por classes: serão retirados 20 ml do extrato-mãe.

### *Antocianidinas, antocianinas, flavonas, flavononóis, xantonas, chalconas, auronas e flavanonóis*

Em três tubos de ensaio colocam-se 3 ml da solução em cada um deles, acidulando um a pH 3 e alcalinizando os dois restantes a pH 8,5 e 11.

- Coloração vermelha em pH 3, lilás em pH 8,5 e azul púrpura em pH 11 indicam resultado positivo para antocianidinas e antocianinas;
- coloração amarela em pH 11 indica resultado positivo para flavonas, flavonóis, xantonas;
- coloração vermelha em pH 3 e vermelho púrpura em pH 11 indicam resultado positivo para chalconas e auronas;
- coloração vermelho-laranja em pH 11 indica resultado positivo para flavanonóis.

### *Leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas*

Dividiram-se 6 ml da solução-mãe em dois tubos de ensaio. Um foi acidulado a pH 1-3 com HCl e o outro alcalizado a pH 11 com solução de NaOH. Ambos foram aquecidos com auxílio de uma lamparina a álcool durante 2-3 minutos, sendo observado se houve modificação na coloração, comparando-se com os tubos utilizados no teste anterior.

A presença de coloração vermelha em pH ácido indica resultado positivo para leucoantocianidinas;

- a presença de coloração pardo-amarela em pH ácido indica resultado positivo para catequinas (taninos catéquicos);
- a presença de coloração vermelho-alaranjada em pH alcalino indica resultado positivo para flavanonas.

#### *Flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas.*

Foram transferidos 3 ml da solução extrativa usada no teste anterior para um tubo de ensaio e acrescentados alguns miligramas de magnésio em raspas e 0,5 ml de HCl concentrado. Após o término da efervescência comparou-se a mudança na coloração em relação aos tubos acidificados dos testes anteriores. Cor vermelha indica a presença dos metabólitos (BARBOSA, 2001).

#### *Glicosídeos cardíacos*

Dissolveram-se 25 mg do extrato seco em 5 ml de metanol e filtrou-se. Foram adicionadas gotas do reativo de Keede em duas porções de 2 ml. Coloração azul ou violeta indica reação positiva (BARBOSA, 2001).

#### *Catequinas*

Dissolveram-se 15 mg do extrato seco em 3 ml de metanol que foram submetidos a filtração. Ao filtrado acrescentou-se 1 ml de solução alcoólica de vanilina a 1% e 1 ml de HCl concentrado. Coloração vermelha intensa indica reação positiva (BARBOSA, 2001).

#### *Antraquinonas, antronas e cumarinas*

Reagente de hidróxido de potássio (KOH): 5% ou 10% de hidróxido de potássio etanólico (reação de Borntrager). A placa CCD é pulverizada com 10 ml e avaliada em vis ou em UV-365 nm, com ou sem aquecimento. Detecção de antraquinonas (vermelho), antronas (amarelo, UV-365 nm); detecção de cumarinas (azul, UV-365 nm) (BARBOSA, 2001).

#### *Lactonas sesquiterpênicas e outras lactonas*

Dissolveram-se 15 mg do extrato seco em 3 ml de metanol e filtrou-se. Adicionaram-se 12 gotas de solução aquosa de cloridrato de hidroxilamina a 10% e 2 gotas de solução metanólica de KOH a 10% e aqueceu-se suavemente em banho-maria durante 2 minutos. Após, a solução foi resfriada e acidulada com solução de HCl a 1N e adicionada de 1 gota de FeCl<sub>3</sub> 1%. Coloração violeta indica reação positiva (BARBOSA, 2001)

### *Esteroides e triterpenoides*

Dissolveram-se 50 mg do extrato seco em 10 ml de clorofórmio e filtrou-se sobre carvão ativado. O filtrado foi transferido para um tubo de ensaio completamente seco, onde foi adicionado 1 ml de anidrido acético e agitado suavemente. Em seguida, adicionaram-se, cuidadosamente, 3 gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado e agitou-se a mistura. O rápido desenvolvimento de cores, que vão do azul evanescente ao verde persistente, indica resultado positivo (BARBOSA, 2001).

### *Azulenos*

Dissolveram-se 10 mg do extrato seco em 2 ml de clorofórmio e filtrou-se. A presença de proazulenos na fase aquosa é indicada por coloração azul, porém, em pequena quantidade, a coloração observada é esverdeada (BARBOSA, 2001).

### *Alcaloides*

Dissolveram-se 25 mg do extrato seco em 5 ml de solução de HCl a 5% e filtrou-se. Separaram-se quatro porções de 1 ml em placa de toque e adicionaram-se 3 gotas dos reativos de Bouchard, Dragendorff e Mayer. Precipitação ou turvação em pelo menos um tubo é indicativa de resultado positivo (BARBOSA, 2001).

### *Purinas*

Em cápsula de porcelana juntaram-se 5 mg do extrato seco, 3 gotas de solução de HCl 6N e 2 gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrado (30%). Evaporou-se a mistura em banho-maria até a formação de um resíduo corado de vermelho. Juntaram-se 3 gotas de solução de NH<sub>4</sub>OH (6N). Coloração violeta indica reação positiva (BARBOSA, 2001).

### *Depsídeos e depsidonas*

Dissolveram-se 25 mg do extrato seco em 5 ml de éter etílico e filtrou-se. Após o éter evaporar em banho-maria, juntou-se resíduo de 3 ml de metanol. Agitou-se a mistura e adicionaram-se 3 gotas de solução de FeCl<sub>3</sub> a 1%. Coloração verde, azul ou cinza indica reação positiva (BARBOSA, 2001).

## **3.3 Perfil cromatográfico**

O perfil cromatográfico teve início no laboratório de Pesquisa e Extensão da Ufac com uma filtração de separação, onde foram pesados 47,12 g da resina bruta da

*S. globulifera* em uma balança analítica Metter Toledo AB 104, aos quais foram misturados 85,21 g de sílica gel 230 a 240 mesh, pesados em uma balança semianalítica Marte AL500C Chromato – VUE, até obter uma mistura homogênea, que foi submetida a uma filtração a vácuo utilizando um funil de Buchner e um Kitasato, acoplados a uma bomba de vácuo Prismatec. Foram utilizados 500 ml de cada um dos seguintes solventes: hexano, diclorometano, acetona e uma solução hidroalcoólica a 70% (V/V) respectivamente. As frações coletadas foram concentradas no rotoevaporador IKA HB 10 digital modelo RV 10 D e secas na estufa com circulação de ar Quimis a 40 °C por 4 dias, obtendo-se assim 4 extratos secos: de hexano, diclorometano, acetona e hidroalcoólico.

No laboratório de química da UFMG os quatro extratos e o látex *in natura* no estado sólido foram submetidos a espectroscopia de infravermelho.

#### *Cromatográfica líquida comum (CC)*

O extrato acetônico foi submetido a uma coluna cromatográfica líquida comum (CC). A coluna de CC foi preparada com uma mistura homogênea de 5,05 g do extrato acetônico misturados com 399,02 g de sílica gel de 230 a 400 mesh. O gradiente de solventes foi:

- Fração 1: 500 ml de hexano puro.
- Fração 2: 450 ml de hexano e 50 ml de acetato de etila.
- Fração 3 e 4: 500 ml de hexano/acetato de etila (8:2).
- Fração 5: 500 ml de hexano/acetato de etila (7:3).
- Fração 6, 7, 8: 1.000 ml de hexano/acetato de etila (1:1).
- Fração 9, 10, 11, 12: 600 ml de acetato de etila puro.
- Fração 13, 14, 15, 16: 1.700 ml de etanol.

#### *Cromatografia de camada delgada (CCD)*

As placas de CCD foram confeccionadas utilizando 7 g de sílica gel 230 mesh diluídos em 15 ml de água, a fim de se obterem espessuras de 0,25 mm e de 0,75 mm, sendo secas em estufa Quimis a 100 °C por no mínimo 30 minutos. A revelação das placas foi a partir de solução (1:1) de vanilina 1% m/v em etano e ácido perclórico 3% v/v em água, seguida de aquecimento em estufa a 100 °C.

Como critério para verificação de pureza foi adotada a observação das manchas das placas de CCD, testando eluentes que pudessem fornecer um fator de retenção (RF) de 0,5.

A fração 3 foi submetida a uma filtração com hexano, gerando um sólido branco que foi submetido a uma análise de infravermelho e de cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massas (CG/EM). O filtrado foi comparado com o padrão de  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina.

As frações do extrato acetônico foram submetidas a análise de CCD usando como eluente 100 ml de diclorometano/hexano (1:1) para observação das referidas manchas, que foram reagrupadas em 12 amostras (A).

A amostra A2 do extrato acetônico foi submetida a cromatografia líquida de média pressão, sendo reagrupada em quatro novas amostras (B), que foram observadas nas placas de CCD utilizando como eluente 100 ml de acetato de etila/clorofórmio (6:4).

As amostras B3, A3 e uma amostra do extrato seco hexânico foram analisadas no CG/EM.

Uma fração de 40 g do látex *in natura* (estado líquido) também foi submetida ao CG/EM, no preparo da amostra:

- o látex da *Symphonia* foi submetido a hidrólise básica, gerando uma amostra do material não-saponificável (NSap) e uma amostra do material saponificável (Sap). A amostra NSap foi analisada *in natura* e como derivados TMS (sililados) e a amostra Sap foi analisada apenas como derivados TMS;
- a hidrólise básica foi feita dissolvendo-se ~40 mg do látex da *S. globulifera* em 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de etanol (95%) / hidróxido de potássio 1 mol.L<sup>-1</sup> (5%) em tubo criogênico de capacidade de 2 ml. Após agitação em vórtex por 10 segundos, o látex foi hidrolisado em um forno de micro-ondas doméstico (Electrolux MT030), à potência 30%, durante 6 minutos. Após resfriamento, adicionaram-se 400  $\mu\text{L}$  de água e 3x600  $\mu\text{L}$  de acetato de etila para remoção do material não-saponificável. As camadas orgânicas (material não saponificável) foram agrupadas, gerando a amostra NSap. Adicionaram-se, então, 100  $\mu\text{L}$  de ácido clorídrico conc e 600  $\mu\text{L}$  de acetato de etila. Após agitação em vórtex por 10 segundos e repouso por 2 minutos, uma alíquota de

300  $\mu$ l da camada orgânica foi retirada, colocada em tubo de microcentrífuga e seco por evaporação, obtendo-se assim a amostra saponificável (Sap);

• sililação: adicionou-se a amostra seca em tubo de microcentrífuga com 25  $\mu$ L de THF e 25  $\mu$ L do agente sililante (BSTFA). A reação foi conduzida em forno de micro-ondas doméstico Electrolux na potência 30% por 3 minutos. A amostra sililada foi resfriada em água e imediatamente foi injetada no CG-EM.

#### *Cromatografia líquida de média pressão*

As análises por cromatografia líquida de média pressão foram realizadas através do equipamento Isolera One – Biotage e coluna Biotage SNAP Cartridge KP-SIL 10 g no Departamento de Química da UFMG.

#### *Cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massas.*

Os espectros de massa foram realizados em um equipamento CGMS-QP2010 ULTRA (Shimadzu). Coluna: Rxi-1MS 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m (Restek). Temp coluna: 100 °C (5 min), 10 °C/min, 300 °C. Injetor: 300 °C Split (1:50), Interface CG-MS a 300 °C. Detector MS (Impacto eletrônico a 70 eV) a 300 °C. Gás de arraste: Hélio a 3,0 ml/min. Vol. de injeção: 1  $\mu$ L. Software de aquisição de dados: GCMS Solution (Shimadzu). Biblioteca espectral: NIST 11. Arquivos\*. qgd, do Departamento de Química da UFMG.

#### *As análises por infravermelho*

As análises por infravermelho foram realizadas através do espectrofotômetro Shimadzu IR-408 com pastilhas KBr (1%) no Departamento de Química da UFMG.

### **3.4 Análise térmica**

A análise termogravimétrica (TGA, DTA e DrTGA) do látex da *S. globulifera* foi realizada com a finalidade de definir o gradiente de temperatura para a análise de CG/EM.

As análises térmicas foram realizadas no Laboratório de Análises Térmicas da UFMG em um equipamento DTG-60 Shimadzu; as curvas de TG foram obtidas em gradiente de temperatura entre 22 e 700 °C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min<sup>-1</sup>), na razão de aquecimento (10 °C min<sup>-1</sup>), utilizando cadinho de alumina contendo 1,042 mg da massa do látex. Os cálculos de perda de massa e a derivada

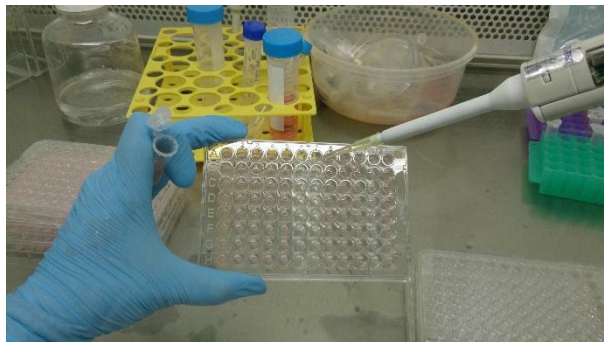
da TG foram feitos com auxílio do programa TA-60WS (Shimadzu) (CANEVALORO, 2007).

### 3.5 Testes de sensibilidade a agentes leishmânicos

Cepas de leishmaniose de *L. infantum* MHOM/BR/1974/PP75 e de *L. amazonensis* IFLA/BR/1967/PH8 foram cedidas pelo laboratório de parasitologia da UFMG, onde foram realizados todos os testes microbiológicos.

A avaliação dos extratos (hidroalcoólico, cetônico, hexânico e diclorometânico) e do látex *in natura* da *S. globulifera* sobre o crescimento *in vitro* de formas amastigotas intracelulares de *L. infantum*, conforme figura 5, e *L. amazonensis* foram realizadas seguindo metodologia utilizada por Boer et al. (2011) e Alvar et al. (2012) com algumas adaptações.

**Figura 5 – Avaliação dos compostos sobre o crescimento *in vitro* de formas amastigotas intracelulares de *L. infantum*.**



Fonte: Ricardo Kind Lopes, 2018.

Os testes para atividades leishmânicas *in vitro* dos extratos hidroalcoólico, acetônico, diclorometânico, hexânico e do látex *in natura* contra promastigotas foram realizados utilizando macrófagos caninos (DH82). Essas células foram plaqueadas a uma concentração  $5 \times 10^5$  macrófagos por poço, em placas de poliestireno de 96 poços (Cell Wells, Corning Glass Works) e incubadas a 37 °C, em 5% CO<sub>2</sub> em estufa.

Após 24 horas, os macrófagos aderidos foram infectados com *L. infantum* e *L. amazonensis*, em fase estacionária, em uma proporção de 50 parasitos para cada célula hospedeira. Quatro horas após a infecção, as culturas foram lavadas três vezes com tampão fosfato salino (PBS – pH 7,2) gelado para remover os parasitas extracelulares.



Logo em seguida, os compostos diluídos em RPMI (meio de cultura para células humanas) foram adicionados aos poços nas seguintes concentrações: 1.000, 100, 10, 1, 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Quatro replicatas foram realizadas para cada concentração.

Após 48 horas, as culturas foram fixadas com metanol gelado durante 15 minutos e secas com ar quente. Para o desenvolvimento do teste de Elisa, as placas de cultura fixadas foram lavadas três vezes com 100 mL de PBS contendo 5% de BSA (albumina de soro bovino) e, para bloquear a ligação inespecífica dos anticorpos, incubaram-se durante 1 hora a 37 °C com essa mesma solução. Após esse período, foi retirada a solução de bloqueio e adicionado soro de paciente infectado com *Leishmania* sp (diluição 1:300) e soro de paciente não infectado. Incubaram-se as placas durante 1 hora a 37 °C. Após esse período, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS contendo 0,05% de Tween-20 (pH 7,4). Logo em seguida, 100  $\mu\text{L}$  de IgG anticão conjugados com HPR (diluição 1:2000) foram adicionados aos poços antes de desenvolver a reação.

Para desenvolvimento, 100  $\mu\text{L}$  de solução de substrato (10 mL de tampão de citrato, 10 mg de OPD, ortofenilenodiamina, 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foram adicionados a cada poço. Após 15 minutos, a reação foi parada pela adição de 30  $\mu\text{L}$  da solução ácido sulfúrico 2  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).

A leitura da densidade óptica foi medida a 492 nm em um leitor de Elisa (Molecular Devices, EUA). O sal de antimônio III ( $\text{Sb}^{\text{III}}$ ) foi utilizado como controle positivo nas mesmas concentrações dos extratos testados, de 0,1 a 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Para cálculo do  $\text{IC}_{50}$  (concentração inibitória de 50% da multiplicação das amastigotas), primeiro, a influência do fundo placa (background) e da ligação de anticorpos não específicos para amastigotas de *Leishmania* foram corrigidas. Para corrigir a ligação inespecífica dos anticorpos, subtraiu-se dos macrófagos infectados com amastigotas de *L. infantum* e incubados com soro de paciente positivo a média da densidade óptica ( $\text{OD}_{492\text{ nm}}$ ) de macrófagos infectados, porém incubados com soro de pacientes negativos para *Leishmania* sp. Os resultados *in vitro* de atividade foram expressos como índice de inibição de crescimento em relação aos controles de macrófagos infectados com amastigotas e não tratados, metodologia adaptada de

Who (2010). Como segue:  $\text{Index} = (\text{OD}_{492 \text{ nm}} \text{ poços experimentais} / \text{OD}_{492 \text{ nm}} \text{ controles não tratados}) \times 100$ .

Conforme informam Nilubol et al. (2012), para determinar as atividades de alto rendimento dos compostos, os dados de resposta de índice foram plotados e modelados graficamente por uma curva de dose-resposta com base no ajuste logístico de quatro parâmetros.

A concentração inibidora de 50% do crescimento do parasita ( $\text{IC}_{50}$ ) foi determinada como a concentração do composto capaz de reduzir o index em 50%. (AULNER et al., 2013; HANSEN & BROSS, 2010). Para isso, utilizou-se o programa estatístico software GraphPad Prism 5.0.

### 3.5.1 Ensaio de viabilidade metabólica

Com o intuito de avaliar o citotoxicidade dos extratos, foi realizado o teste de metabolismo celular de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Esse método se baseia na dosagem da atividade metabólica de células viáveis, utilizando o ensaio colorimétrico.

O protocolo é adaptado a partir de métodos da literatura (MAIA et al., 2007, HANSEN & BROSS, 2010). Linhagens celulares de rim de macaco verde africano (BGM), hepatócito humano do tipo (HepG2) e macrófagos de cão DH82 foram cultivadas em RPMI (Sigma) contendo 100 U/ml de penicilina;  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino inativado. BGM, HepG2 foram plaqueadas a  $1 \times 10^4$  células por poço e DH82 foram plaqueadas a  $5 \times 10^4$  células por poço, como ilustrado nas figuras 6 e 7.

Quatro poços sem células foram utilizados como controles em branco. Em seguida,  $100 \mu\text{L}$  dos compostos dissolvidos e diluídos foram adicionados a cada poço e foram incubados durante 48 horas a  $37^\circ\text{C}$  em estufa contendo 5% de  $\text{CO}_2$ .

Os compostos e o controle foram testados nas seguintes concentrações 1.000, 100, 10, 1 e  $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Após o período de incubação,  $10 \mu\text{L}$  da solução de MTT ( $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foram adicionados a cada poço e incubados durante mais 4 horas. Em seguida, o sobrenadante foi removido e Formazan, o produto metabólico de MTT,

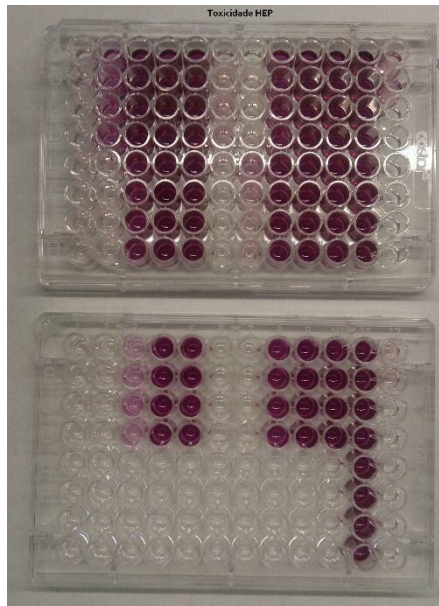
foi ressuspensionado em 50  $\mu$ L de DMSO, conforme pode ser observado nas figuras 6 e 7.

**Figura 6 – Teste de toxicidade BGM com os extratos de *S. globulifera*.**



Fonte: Ricardo Kind Lopes, 2018.

**Figura 7 – Teste de toxicidade HEP com os extratos de *S. globulifera*.**



Fonte: Ricardo Kind Lopes, 2018.

A intensidade colorimétrica foi medida por densidade óptica a 570 nm num leitor de Elisa (Molecular Devices, EUA). Os poços contendo células não tratadas foram usados como controlos negativos; poços vazios foram utilizados para corrigir a

influência da própria placa e poços contendo os extratos na maior concentração também foram utilizados a fim de confirmar que os extratos não reduziam o sal de MTT. Os valores de concentração que inibia 50% do metabolismo celular, dose letal ( $CC_{50}$ ), foram calculados para cada composto.

### *3.5.2 Análise estatística*

Todos os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão (DP) de quatro replicatas. Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. Os valores das concentrações máximas que inibiam 50% da multiplicação das amastigotas intracelulares ( $IC_{50}$ ) e 50% do metabolismo dos macrófagos, HEP e BGM ( $CC_{50}$ ), foram obtidos a partir de análise de regressão não linear das curvas de dose-resposta alcançadas a partir do programa estatístico GraphPad Prism 5.0. O índice de seletividade foi calculado pela razão entre  $CC_{50}$  e  $IC_{50}$  para cada composto.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise fitoquímica iniciou-se com a triagem, apresentada no quadro 3, para determinar qualitativamente os principais grupos químicos constituintes da *S. globulifera*. Testes simples de mudança de cor e precipitação, seguindo a metodologia apresentada por Barbosa (2001), com algumas adaptações, possibilitaram a comparação desta pesquisa, realizada no Brasil (estado do Acre, com análises laboratoriais realizadas no estado de Minas Gerais), com resultados apresentados em outras pesquisas.

Foram analisados o látex, folhas, casca e lenho, conforme consta do quadro 3, para uma comparação dos grupos químicos entre os mesmos.

Com exceção de proteínas, glicosídeos cardíacos, purinas e lactonas sesquiterpênicas, os demais grupos deram positivos em quase todas as partes da planta. Barbosa (2001) ressalta que a cor das amostras pode mascarar alguns resultados.

**Quadro 3 – Screening fitoquímico da folha, casca, lenho e látex da *S. globulifera***

<b>Metabólitos secundários</b>	<b>FOL</b>	<b>CAS</b>	<b>LEN</b>	<b>LAT</b>
Saponinas	+	+	+	+
Açúcares redutores	+	+	+	+
Polissacarídeos	+	+	+	+
Proteínas	-	-	-	-
Fenóis e taninos	+	+	+	+
Flavonas, flavonóis e xantonas	+	+	+	+
Flavanonas e flavanonóis	+	+	+	+
Alcaloides	+	-	+	-
Glicosídeos cardíacos	-	-	-	-
Catequinas	+	+	-	+
Benzo, nafto e fenantraquinonas	+	+	+	+
Antraquinonas	+	+	+	+
Purinas	-	-	-	-
Sesquiterpeno lactonas	-	-	-	-
Depsídeos e depsidonas	+	+	+	+
Cumarina	+	+	+	+

Abreviaturas: FOL- folhas; CAS – casca, LEN – lenho e LAT – látex, todos em extratos hidroalcoólicos.

Conforme visualizado na figura 8, o teste de saponinas deu positivo para todos os extratos das partes da planta que foram analisadas, inclusive para o látex *in natura*.

Segundo Lambert et al. (2011), as saponinas são metabólitos secundários amplamente distribuídos no reino vegetal e frequentemente são os componentes ativos das ervas medicinais, tendo potencial utilização para a indústria farmacêutica como drogas antibacterianas, virícidas, anti-inflamatórias e antileishmaniais.

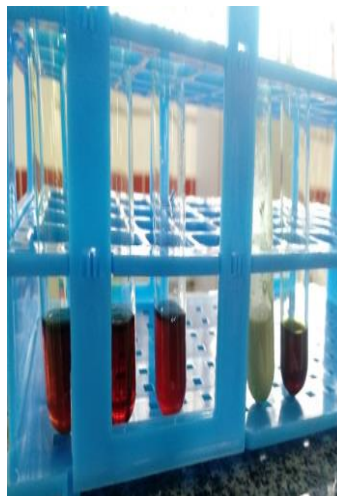
**Figura 8 – Teste de saponinas da *S. globulifera*.**



Fonte: Ricardo Kind 2018.

A figura 9 confirma os resultados positivos para ácidos orgânicos. Lues e Theron (2011) descrevem que, além da atividade antioxidante, os ácidos orgânicos também apresentam ação antimicrobiana.

**Figura 9 – Teste de ácidos orgânicos da *S. globulifera*.**



Fonte: Ricardo Kind, 2018.

A figura 10 mostra um sedimento avermelhado, o que caracteriza a presença de açúcar redutor. Todos os extratos e também o látex apresentaram açúcares redutores. Eles pertencem à classe dos monossacarídeos que possuem grupos carbonílicos e cetônicos livres, que oxidam na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas (DEMIATE et al., 2002).

**Figura 10 – Teste de açúcar redutor na resina da *S. globulifera***



Fonte: Ricardo Kind, 2018.

Os depsídeos e depsidonas apresentam atividades anti-inflamatória e antibiótica (MEDEIROS, 2010). Conforme demonstrado na figura 11, o teste de depsídio foi positivo para todas as amostras analisadas.

**Figura 11 – Teste de depsídio da *S. globulifera*.**



Fonte: Ricardo Kind, 2018.

A figura 12 apresenta o resultado por classe para flavonas, flavanóis, xantonas, flavanonas e flavanonóis, positivo somente para pH 11. Esses grupos químicos formam os metabólitos secundários de plantas medicinais que vêm sendo estudadas por Kuete et al. (2011) e por Nkengfack et al. (2001) para possíveis inibições de células cancerígenas.

**Figura 12 – Teste por classe para flavonas, flavanóis, xantonas, flavanonas e flavanonóis com extratos de *S. globulifera*.**

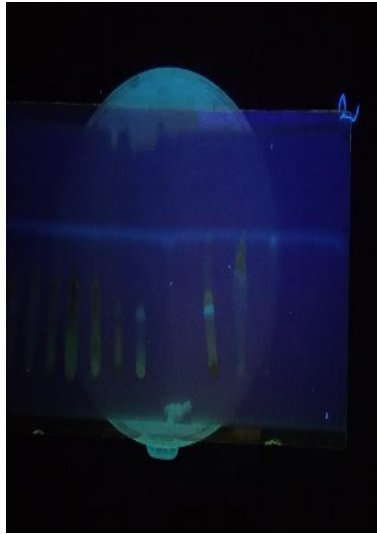


Fonte: Ricardo Kind, 2018.

Os testes para antraquinonas, antronas e cumarinas deram positivos com revelador de KOH, em placas de CCD reveladas na luz de ultravioleta, conforme mostrado na figura 13. Percebe-se fosforescências amarelas, vermelhas e azuis, indicando resultados positivos. Esses metabólitos vêm sendo estudados pelas suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (CASTILHO et al., 2013).



**Figura 13 – Teste de antraquinonas, antronas e cumarinas com extratos de *S. globulifera*.**



Fonte: Ricardo Kind, 2018.

A triagem fitoquímica realizada com as folhas, casca, lenho e o látex da *S. globulifera* neste trabalho confirmou os resultados encontrados na pesquisa de Silva et al. (2011).

Os grupos químicos das plantas originárias do continente africano e americano não apresentam diferenças, mas os perfis metabólicos diferem em razão de características de clima e solo, conforme descreveram Fromentin et al. (2014). Foi detectada a presença de agentes flavonóis, xantonas, antronas, flavanonas, isoflavonas, rotenoides, quinonas, cumarinas, taninos e depsídios, sugerindo que a planta tem características potenciais para o tratamento da leishmaniose, o que incentiva o aprofundamento da pesquisa sobre o seu uso (LENTA et al., 2007).

A figura 14 apresenta os resultados da análise termogravimétrica (TGA e DTA) do látex da *S. globulifera*, com a finalidade de definir o gradiente de temperatura para a análise de CG/EM. A termogravimetria ou análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica da análise térmica na qual a variação da massa da amostra é determinada em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a um gradiente programado de temperatura. De acordo com Silva et al. (2011), DTA é uma técnica em que a diferença de temperatura entre a substância e um material de referência é medida como uma função da temperatura, enquanto a substância e o material de referência estão sujeitos a uma programação controlada de temperatura.

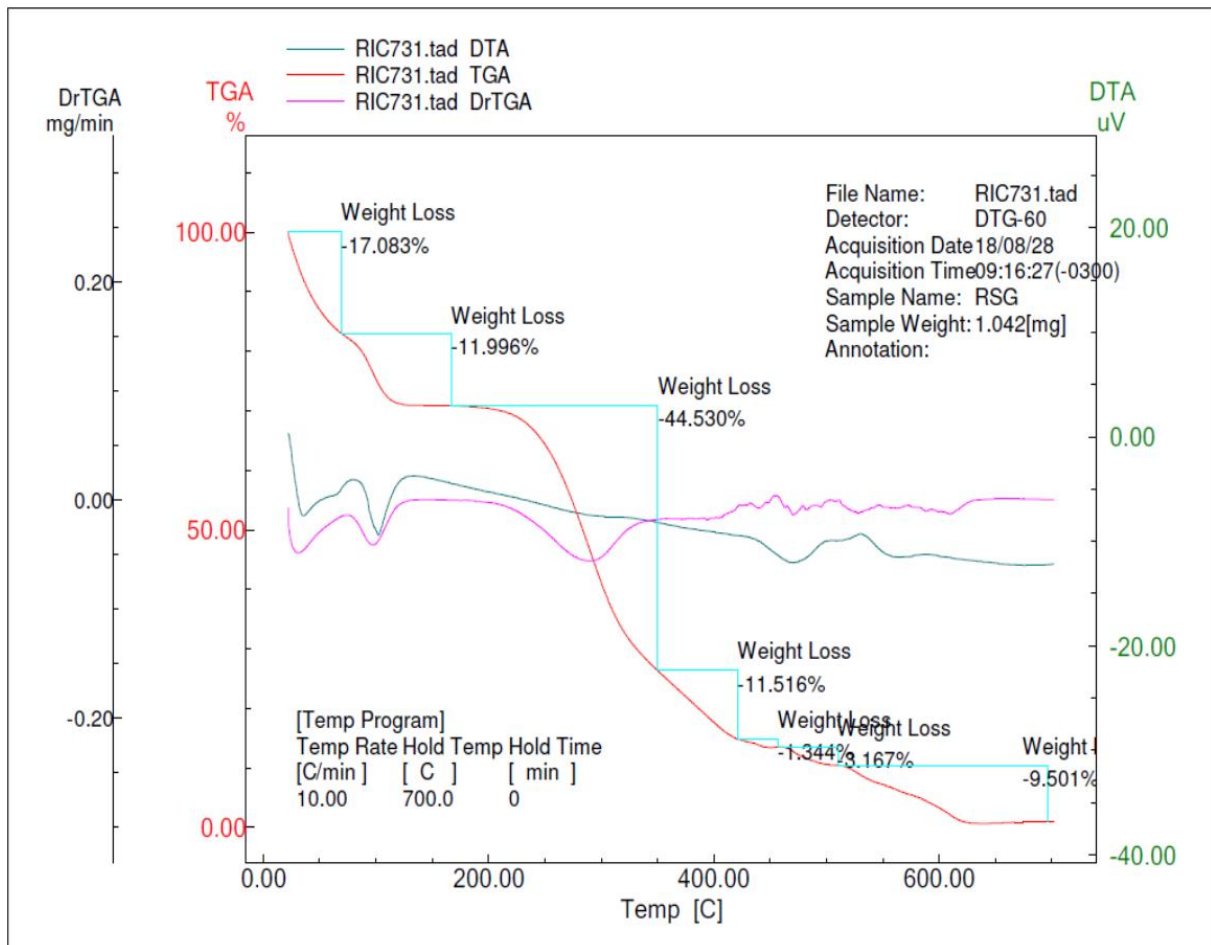
De acordo com os resultados apresentados na figura 14, de 28 °C até 140 °C a amostra começou a perder massa, provavelmente em decorrência da perda de água e compostos voláteis, pois o látex estava na sua forma líquida (bruta) quando foi submetido à análise. Essa perda correspondeu a dois eventos, um de 17,83% e outro no valor de 11,996%, totalizando uma perda de massa de 29,079%, o que pode ser confirmado por dois eventos endotérmicos, demonstrados na curva de DTA: um a 41,82 °C (desidratação) e o outro a 80,45 °C (desidratação + volatilização de compostos orgânicos).

De 140 °C até 700 °C verificou-se uma perda de massa equivalente a 70,058%, referente à decomposição dos compostos orgânicos. Isso ocorreu em cinco eventos, devido à mistura de compostos orgânicos complexos, de estruturas amorfas. Não houve mudança de fases, o que é confirmado pela curva de DTA, que mostra que a decomposição ocorreu em dois eventos endotérmicos.

A 308,68 °C ocorreu a perda mais rápida da amostra, equivalente a 0,464 mg, correspondente a uma perda de 44,530% da amostra inicial de 1,043 mg, demonstrado na curva de DTG.

Ao atingir a temperatura final de 700 °C a massa praticamente foi consumida, restando apenas um resíduo de 0,863%, o que corresponde a 0,008 mg de cinzas da amostra inicial.

Figura 14 – Termogravimetria (TGA) e análise térmica diferencial (DTA) do látex in natura da *S. globulifera*.



Fonte: Lab. Análise Térmica/DQ/ICEx/ UFMG.

Os resultados de TGA/DTA encontrados por Silva (2011) para a *S. globulifera* destacaram que, de 28 °C até 140 °C, houve perda de massa de 2,78%, proveniente de desidratação e compostos voláteis, devido ao extrato das folhas ter sido liofilizado, enquanto o látex do presente estudo foi utilizado *in natura*. Ainda pode ser observado que a amostra liofilizada do extrato levou à decomposição de massa a temperaturas mais elevadas do que as encontradas para o látex *in natura*. Isso indica a necessidade de liofilização da amostra, antes de ser definido o gradiente de temperatura do CG/EM, pois o equipamento poderia trabalhar com uma faixa de temperatura maior e, conseqüentemente, poder identificar uma gama maior de metabólitos secundários.

As figuras 15 a 19 apresentam os espectros de absorção na região do infravermelho dos extratos acetônico, diclorometânico, hexânico e hidroalcoólico, além do látex *in natura* da *S. globulifera*, com o objetivo de corroborarem as análises de cromatografia e o CG/EM, na identificação de metabólitos secundários.

**Figura 15 – Espectro IV do extrato acetônico da *S. globulifera*.**

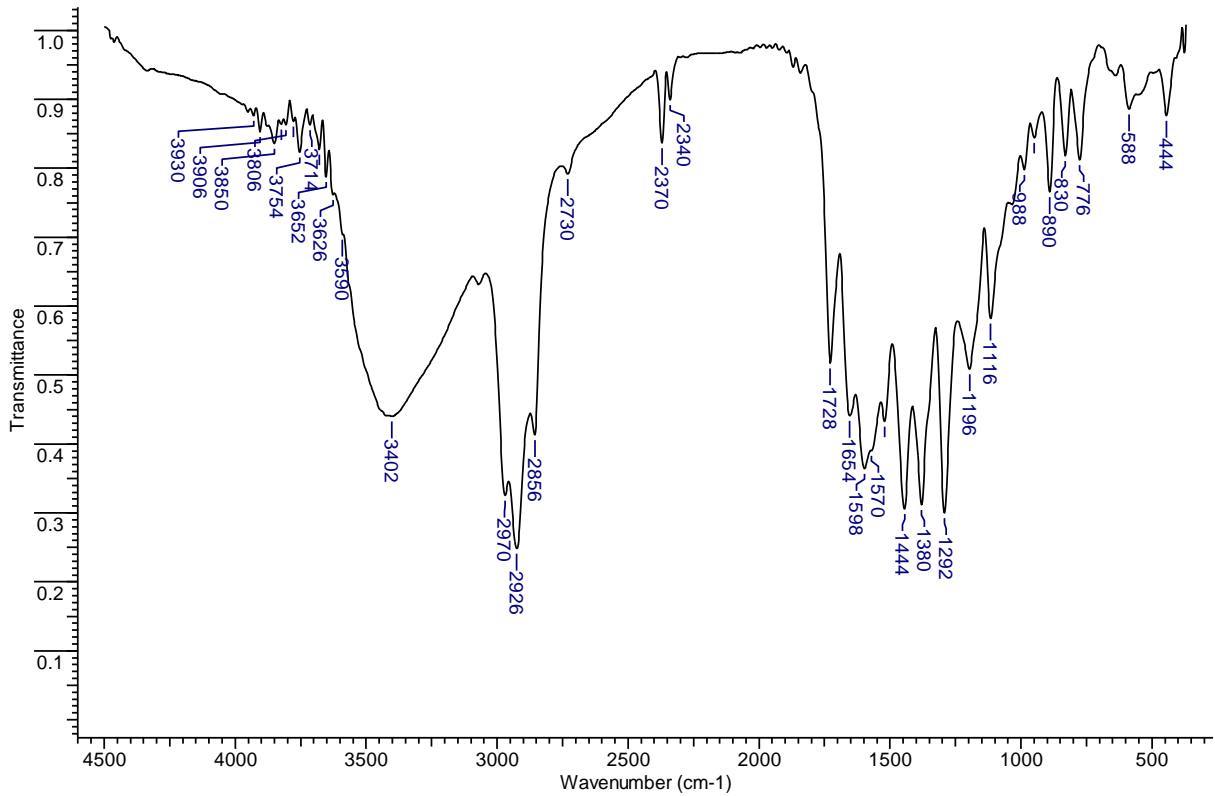


Figura 16 – Espectro IV extrato de diclorometânico da *S. globulifera*.

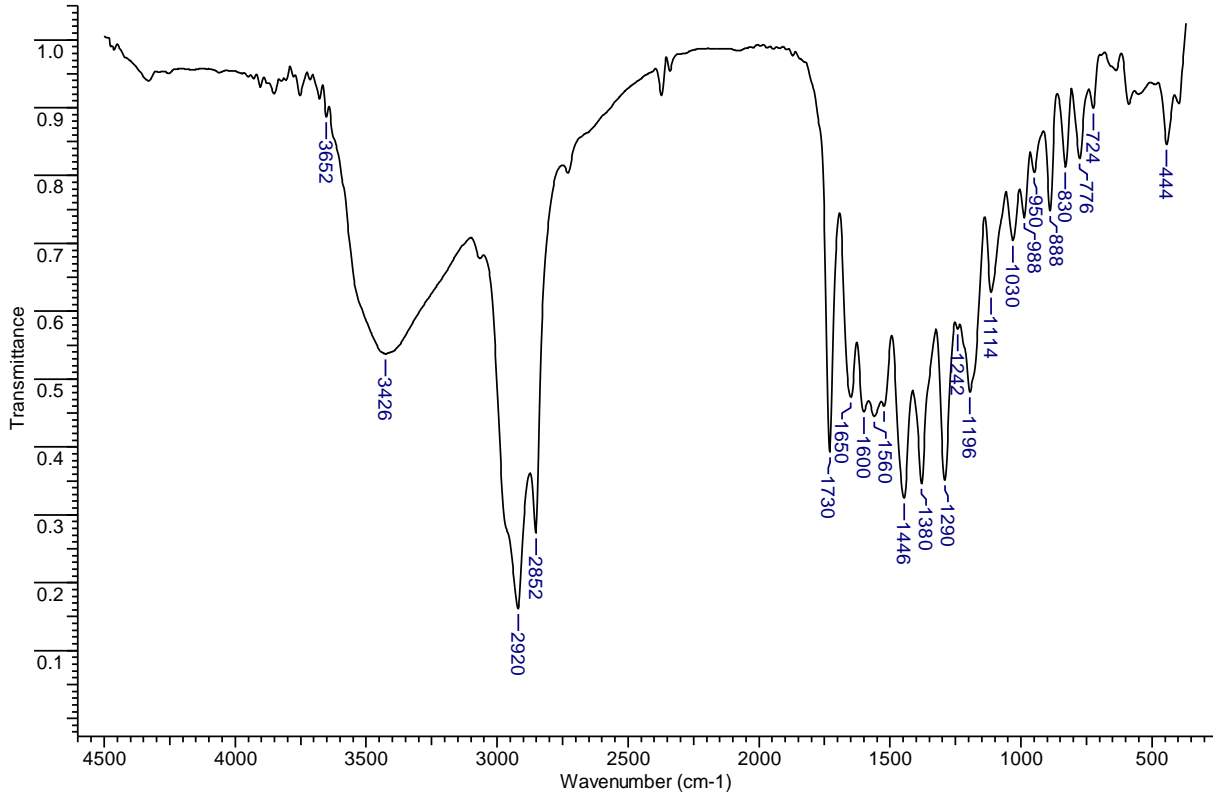


Figura 17 – Espectro IV extrato hexânico da *S. globulifera*.

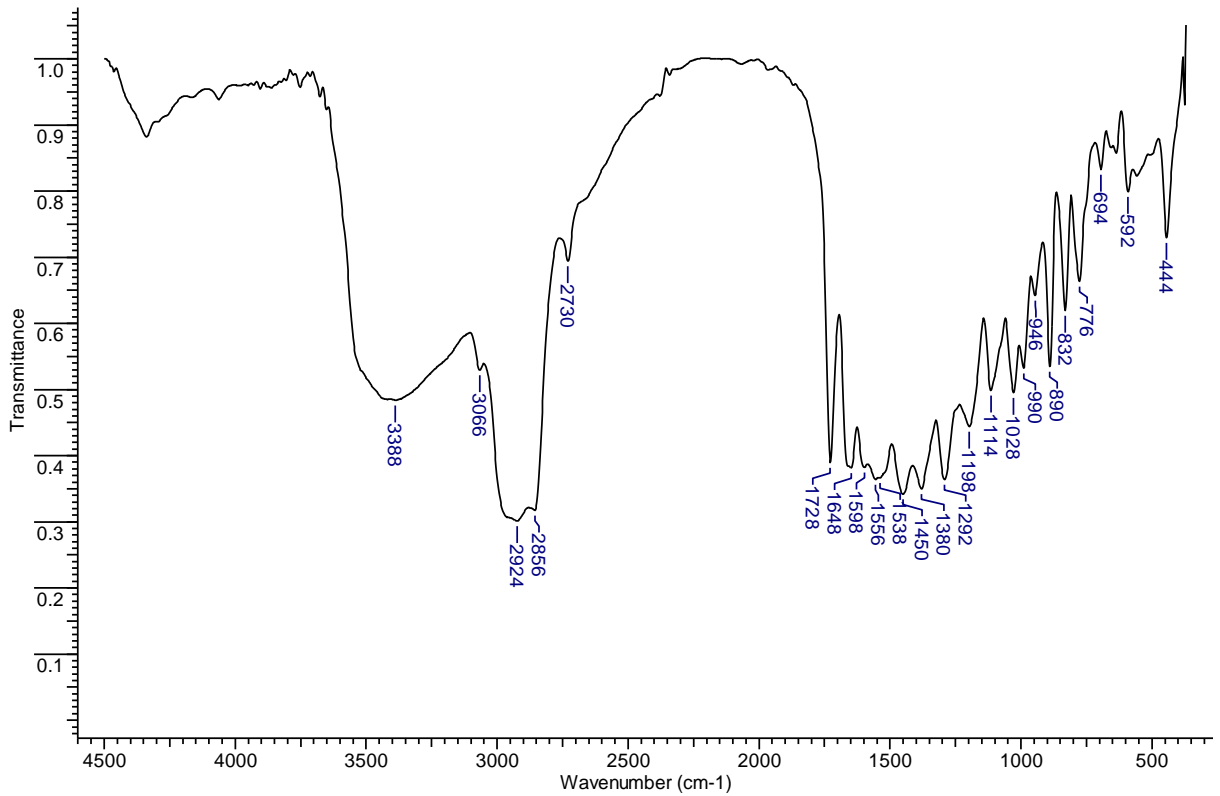


Figura 18 – Espectro IV do extrato hidroalcoólico (70% V/V) da *S. globulifera*.

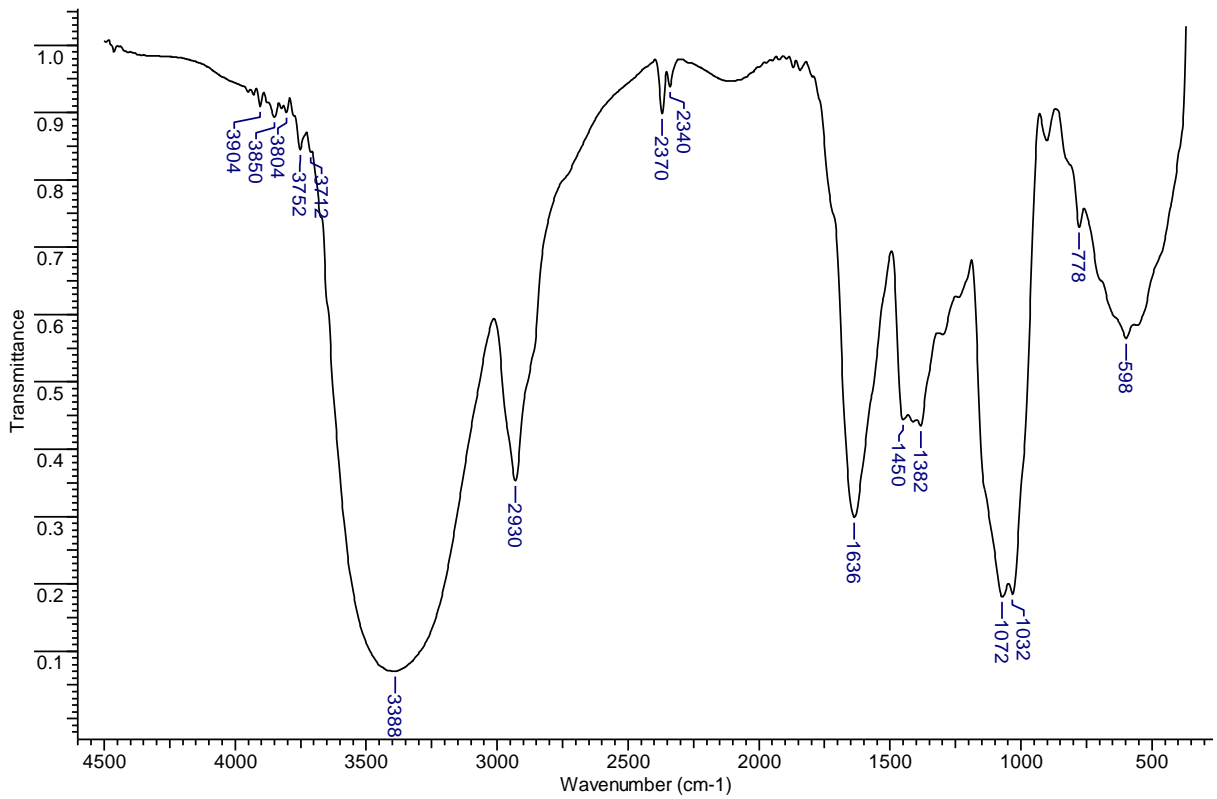
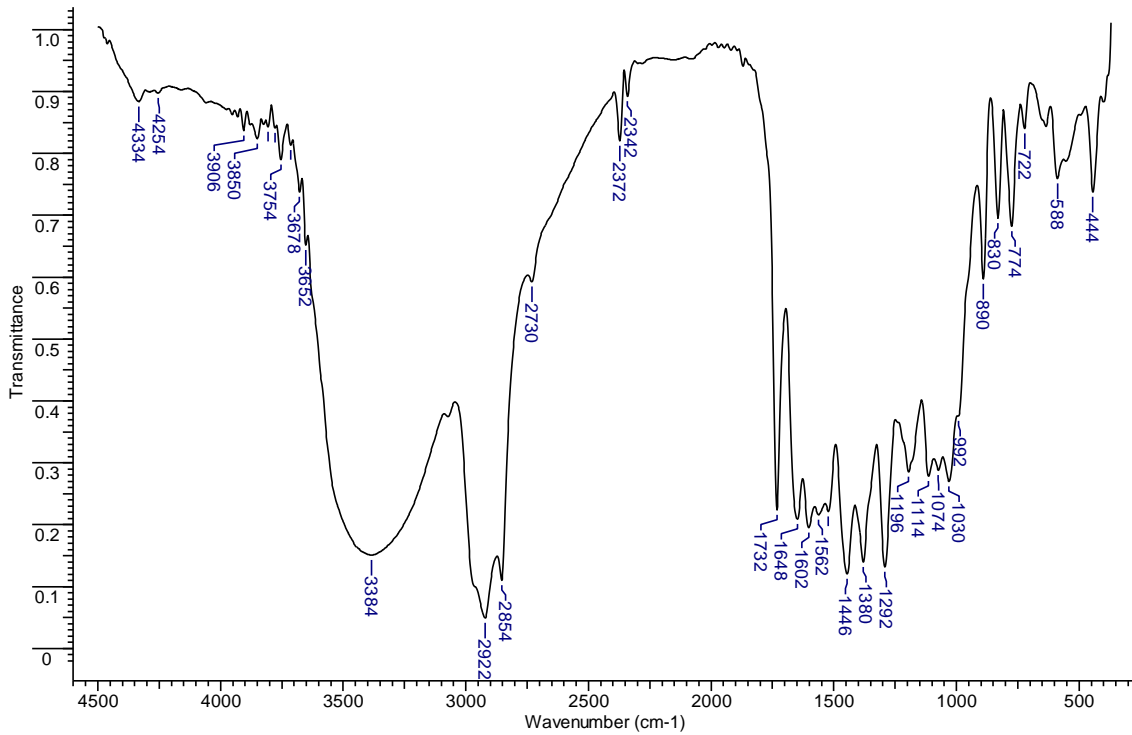


Figura 19 – Espectro IV do látex *in natura* da *S. globulifera*.



Os espectros na região do IV para o látex e os demais extratos da *S. globulifera* apresentaram bandas de absorção muito parecidas, com exceção do hidroalcoólico. Temos uma visão geral desses espectros, ao analisar o espectro de IV do látex da *S. globulifera*.

O látex da *S. globulifera* é uma mistura de vários compostos, que vão desde estruturas simples, como os hidrocarbonetos, até os mais complexos como os flavonoides. Apresentou máximos de absorção em  $3384\text{ cm}^{-1}$  das ligações de OH de alcoóis e fenóis e de NH de amins, com ligação de hidrogênio. Essa sobreposição gera uma banda larga e forte, resultante de associações poliméricas. Em  $2.922 - 2.854\text{ cm}^{-1}$  essa banda dupla evidencia a presença de frequências de estiramento de CH para compostos de caráter alifáticos (hidrocarbonetos, ácidos graxos). Já em  $2.730\text{ cm}^{-1}$  apresenta ligações de CH constatando a presença de aldeídos. As ligações de NH em  $2372-2342\text{ cm}^{-1}$  confirmam a presenças das amins terciárias. Em  $1.732\text{ cm}^{-1}$  apresenta uma banda fina e forte na frequência de estiramento de C=O, possivelmente sujeita a efeitos de conjugação e de efeito indutivo. As bandas duplas e fracas em  $1.648 - 1.602\text{ cm}^{-1}$  mostram a frequência de estiramento de ligações C=C típicas de alcenos conjugados. Em  $1.446 - 1.380\text{ cm}^{-1}$  caracteriza as ligações de CH<sub>2</sub>, deformação angular de -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, sendo que para  $n > 3$  a banda aparece na região por volta de  $720\text{ cm}^{-1}$  (deformação angular de cadeia) (SILVERSTEIN, 2010). A banda em  $1.292\text{ cm}^{-1}$  é característica de ésteres saturados. E finalmente em  $744 - 722\text{ cm}^{-1}$  essa banda dupla confirma a presença de anel aromático. Algumas bandas podem estar deslocadas, devido aos efeitos de conjugação e indutivos, mas as informações podem ser confirmadas quando comparamos com os metabólitos identificados nos espectros de CG/EM.

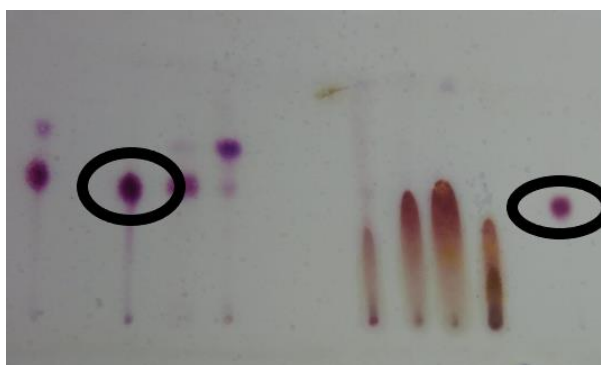
Baseado nessas observações, o extrato acetônico (5,29 g) foi escolhido por ser o mais polar, já que a amostra do extrato hidroalcoólico (0,95 g) era insuficiente para todas as análises químicas e microbiológicas e o extrato hexânico não apresentou atividade contra leishmaniose.

Depois de ser submetido a uma coluna de cromatografia comum preparativa, o extrato acetônico de *S. globulifera* originou 16 frações (F), que foram reagrupadas em 12 amostras (A). Destas, a fração F3, depois de ser filtrada com hexano, apresentou um filtrado que indicou a presença da mistura de  $\alpha,\beta$  amirina, quando

comparada sua mancha na placa de CCD com o padrão destacado à direita, conforme mostra a figura 20. Esse resultado também foi confirmado pela análise de CG/EM, que indica tanto a presença do  $\alpha$ -amirina como do  $\beta$ -amirina. Mas quando os espectros de massa apresentados pela biblioteca NIST-11 foram avaliados verificou-se que ambos espectros correspondiam a um único composto, ao  $\beta$ -amirina. De acordo com Tamai et al. (1989); Silva (2016), apesar de os espectros de massa do  $\alpha$ -amerina e do  $\beta$ -amerina possuírem semelhanças, existe uma variação na intensidade dos picos e uma curiosidade peculiar: o fragmento  $m/z = 189$  é mais intenso que o fragmento  $m/z = 203$  para o  $\alpha$ -amerina, sendo que para o  $\beta$ -amerina ocorre exatamente uma inversão das intensidades destes fragmentos.

Suffredini et al. (2017) isolaram três compostos do extrato das partes aéreas da *S. globulifera* e foram identificados como: lupeol,  $\beta$ -amirina e 3- $\beta$ -hidroxiglutina-5-eno, não sendo identificado o  $\alpha$ -amerina.

**Figura 20 – Presença da  $\alpha,\beta$ -amirina na amostra do filtrado da fração F3 do extrato acetônico da *S. globulifera*, eluente hexano e acetato de etila (1:1), confrontada com o padrão.**



Fonte: Ricardo Kind, 2018.

Biskup et al. (2012) relatam que, entre os triperthenos pentacíclicos, o  $\alpha$ -amirina e o  $\beta$ -amirina diferem apenas pela posição do grupo metila na posição C19 e C20 e, mesmo quando combinados, formando  $\alpha,\beta$ -amirina, não perdem as suas propriedades anti-inflamatórias. Geralmente são encontrados em resinas vegetais.

Aragão et al. (2006) evidenciaram efeitos sedativos e ansiolíticos dos  $\alpha$  e  $\beta$ -amirinas, que podem envolver uma ação em receptores benzodiazepínicos e um possível mecanismo noradrenérgico associado ao efeito antidepressivo, também relatado.



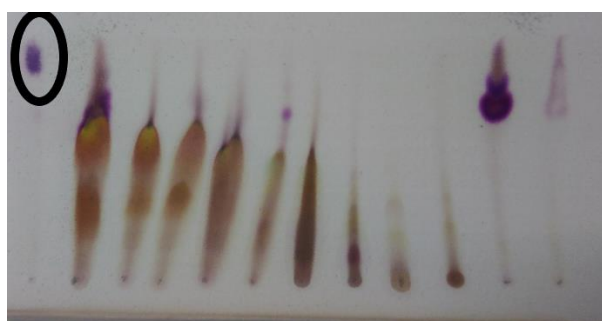
Santos et al. (2012) relatam que a  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina reduziu eficazmente os níveis elevados de glicose plasmática durante o teste de tolerância oral à glicose. O nível de insulina no plasma e a análise histopatológica do pâncreas revelou o efeito benéfico da  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina na preservação da integridade das células beta.

Outras pesquisas vêm sendo realizadas em busca de novas aplicações  $\alpha$ , $\beta$ -amirina, como, por exemplo, no tratamento da hipolipemiante, hipoglicemiante e antiobesidade (FERREIRA, 2017).

A presença da  $\beta$ -amirina só vem confirmar a importância deste trabalho. Suffredini et al. (2017), em pesquisa com extratos de partes aéreas da *S. globulifera*, buscam metabólitos para melhorar a medicina alternativa da América Latina e África.

Ainda da filtração de F3, um sólido branco foi coletado e submetido as análises de IV e CG/EM. Como foi a única substância pura isolada, conforme demonstrado na figura 21, verificou-se tratar de um éster.

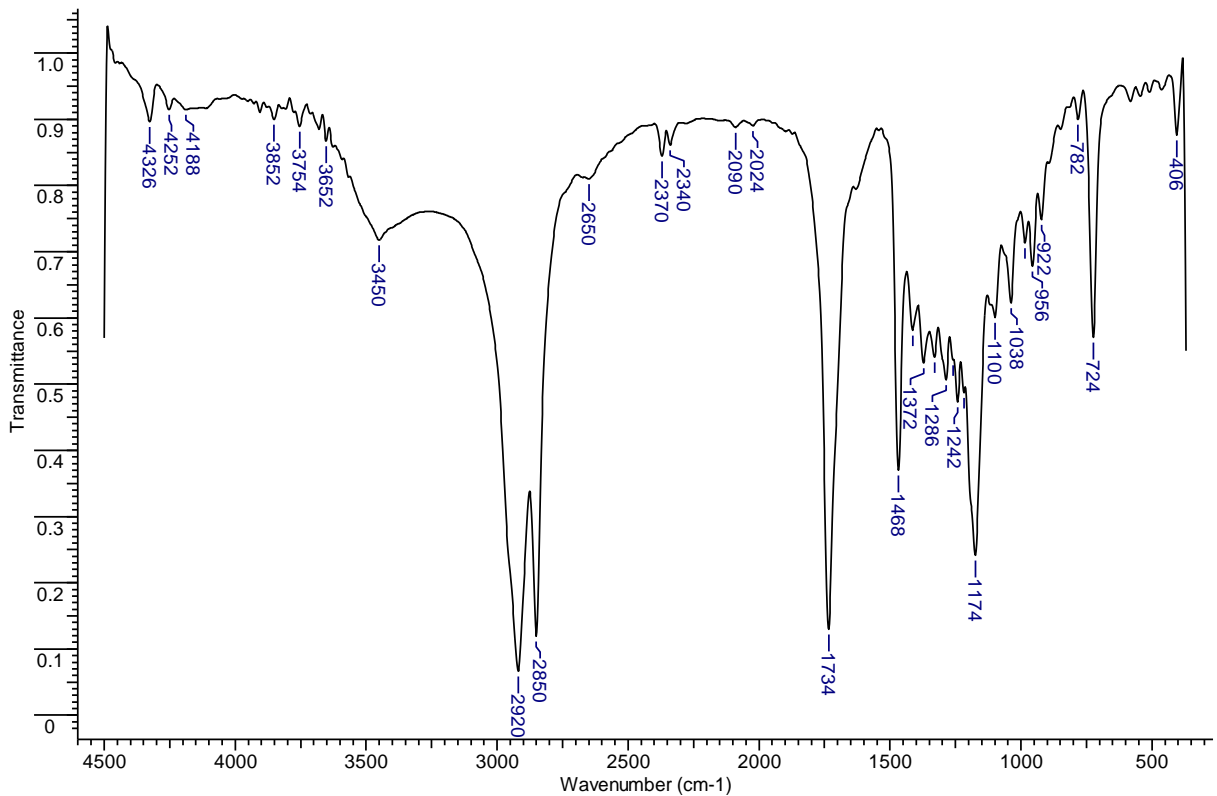
**Figura 21 – CCD da amostra sólida da fração F3 do extrato acetônico da *S. globulifera*, eluente dicloro metano + hexano (9:1).**



Fonte: Ricardo Kind, 2018.

O infravermelho do sólido da fração F3 (figura 21) apresentou máximos de absorção em 2.920, 2.850  $\text{cm}^{-1}$  e em 1.468, 1.372 e 1.286  $\text{cm}^{-1}$ , sugerindo caráter alifático da substância. Foi observada, ainda, banda dupla em 724 e 782  $\text{cm}^{-1}$ , correspondendo à deformação em fase do grupo  $(\text{CH}_2)_n$  onde  $n > 7$  (SILVERSTEIN, 2010). As bandas de absorção em 1.734  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$ ) evidenciam a presença de grupo carbonila de éster. As bandas de 1.242 e 1.038  $\text{cm}^{-1}$  indicam ligações C-O de ésteres, conforme espectro de IV da figura 22. A banda em 724  $\text{cm}^{-1}$ , característica de anel aromático, está deslocada, devido ao efeito indutivo da simetria do composto.

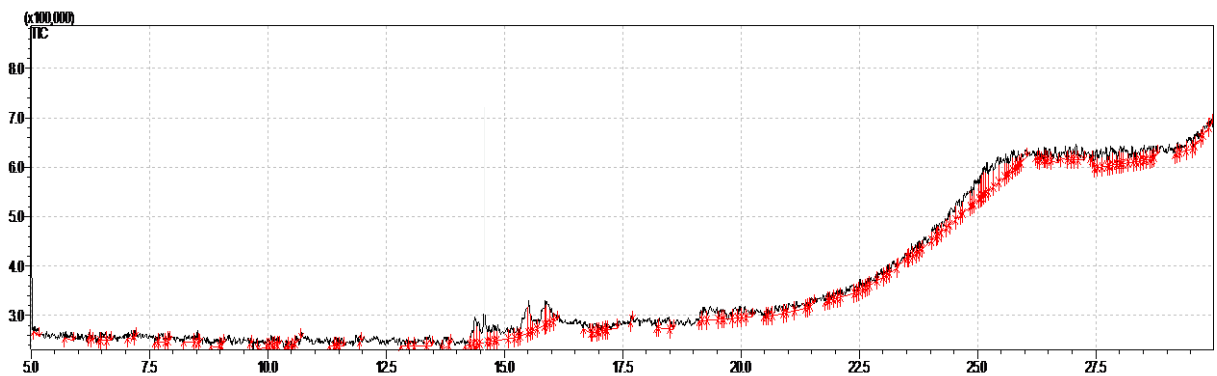
**Figura 22 – IV da parte sólida da fração F3 do extrato acetônico da *S. globulifera*.**



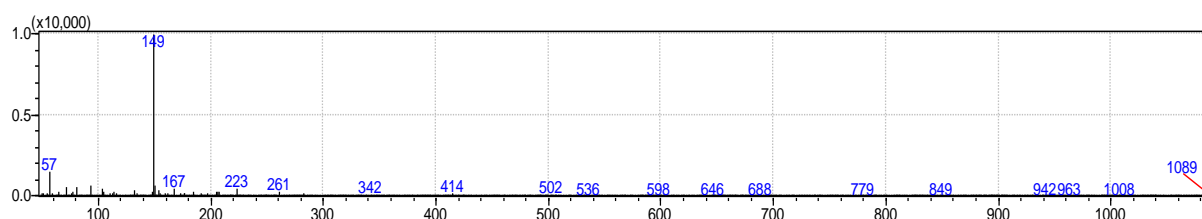
Fonte: Ricardo Kind, 2018.

As figuras 23 e 24 confirmam com seus espectros TIC e de massas a presença do ftalato de isobutil 4-metilhept-3-ila, concordando com a presença de éster sugerido pelo espectro de IV da figura 22.

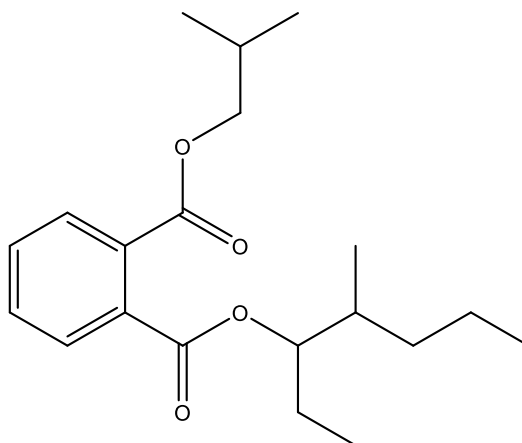
**Figura 23 – Cromatograma de íons totais (TIC) do ftalato éster de isobutil 4-metilhept-3-ila, sólido da fração F3 do extrato acetônico da *S. globulifera*.**



**Figura 24 – Cromatograma de massas do ftalato éster de isobutil 4-metilhept-3-ila, sólido da fração F3 do extrato acetônico da *S. globulifera*.**



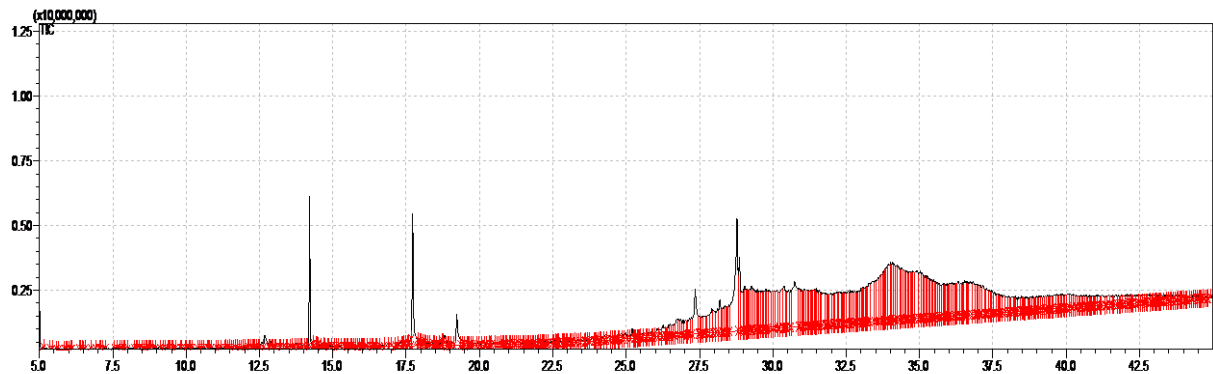
A fórmula estrutural do ftalato éster de isobutil 4-metil-hept-3-ila corresponde aos tipos de ligação descritos para o IV da figura 22. Esse mesmo metabólito foi identificado em análise de CG/EM por Rajkuberan (2017) em estudos intrínsecos de extratos de látex de *Euphorbia antiquorum* L. contra patógenos bacterianos humanos e mosquito vetor *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae).



ftalato éster de isobutil 4-metil-hept-3-ila

Utilizou-se a análise de CG/EM para a caracterização do látex *in natura* e de algumas frações de seus extratos, no sentido de corroborar a análise fitoquímica e identificar possíveis metabólitos secundários. A figura 25 demonstra o espectrograma de íons totais (TIC) da fração não saponificável sem derivação de TMS do látex *in natura* da *S. globulifera* e a tabela 1 lista os metabólitos referentes a esse espectro, obtidos na biblioteca NIST 11.

**Figura 25 – Cromatograma de íons totais (TIC) dos metabólitos não saponificáveis sem TMS do látex *in natura* da *S. globulifera***

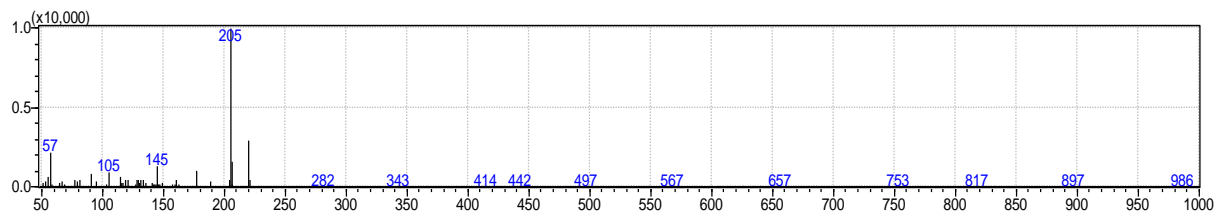


**Tabela 1 – Metabólitos da fração não saponificável sem derivação de TMS do látex *in natura* da *S. globulifera* detectados no CG/EM.**

Tempo de Retenção (min)	Área%	Substância
9.077	0,03	ciclohexano
12.576	0,11	$\alpha$ -ciclocitral
12.684	0,27	di-t-butilacetileno
12.901	0,07	1-epi-alfa-gurjuneno
14.207	1,29	hidroxitolueno butilado
17.642	0,02	5,9,13-trimetiltetradeca-4,8,12-trien-1-ol
17.709	1,76	trans-geranilgeraniol
18.806	0,15	3,11-tetradecadien-1-ol
19.221	0,48	ácido n-hexadecanoico
28.193	0,53	2,6,10,14,18-pentametil-2,6,10,14,18-eicosapentaeno

As figuras 26 a 28 referem-se aos fragmentos majoritários do espectro da figura 25.

**Figura 26 – Cromatograma de massas do hidroxitolueno butilado.**



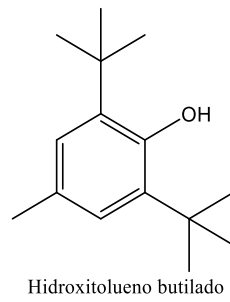


Figura 27 – Cromatograma de massas do 5,9,13-trimetiltetradeca-4,8,12-trien-1-ol.

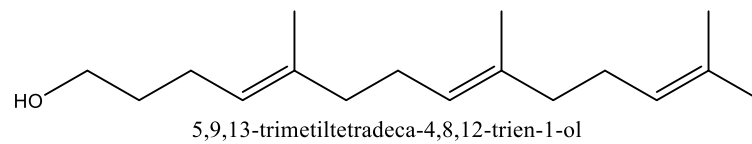
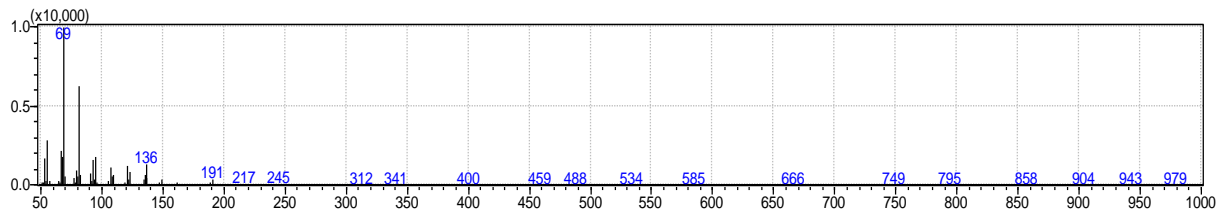
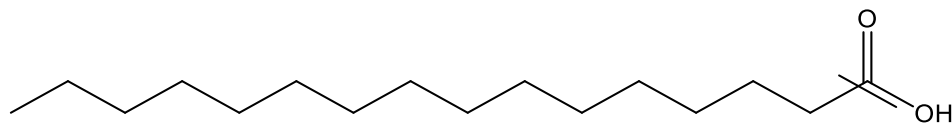
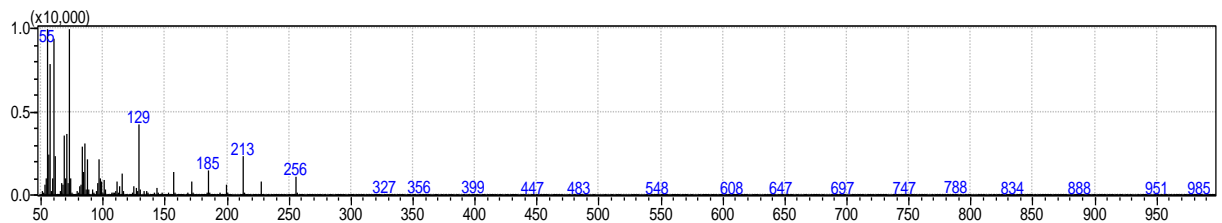
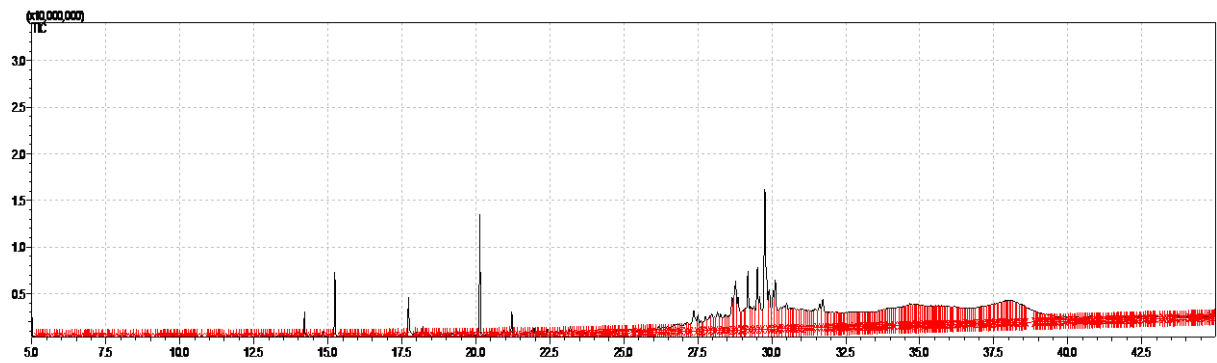


Figura 28 – Cromatograma de massas do ácido n-hexadecanoico.



A figura 29 representa o espectro TIC da fração não saponificável com derivação de TMS do látex *in natura* da *S. globulifera* e a tabela 2 corresponde aos metabólitos obtidos pela biblioteca NIST 11.

**Figura 29 – Cromatograma de íons totais (TIC) dos metabólitos não saponificáveis com derivação de TMS do látex *in natura* da *S. globulifera*.**

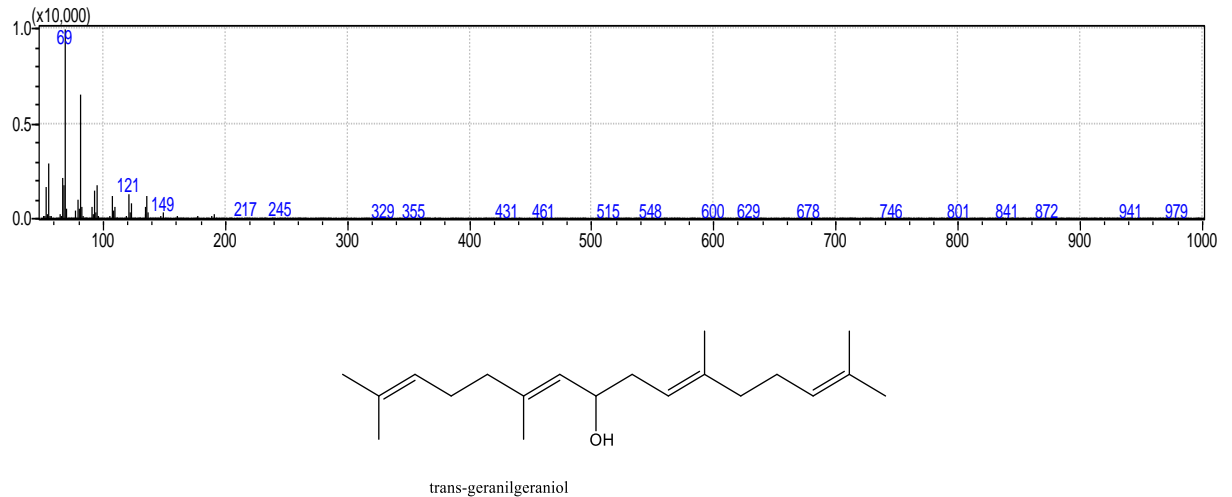


**Tabela 2 – Metabólitos da fração não saponificável com derivação de TMS do látex *in natura* da *S. globulifera* obtidos no CG/MS.**

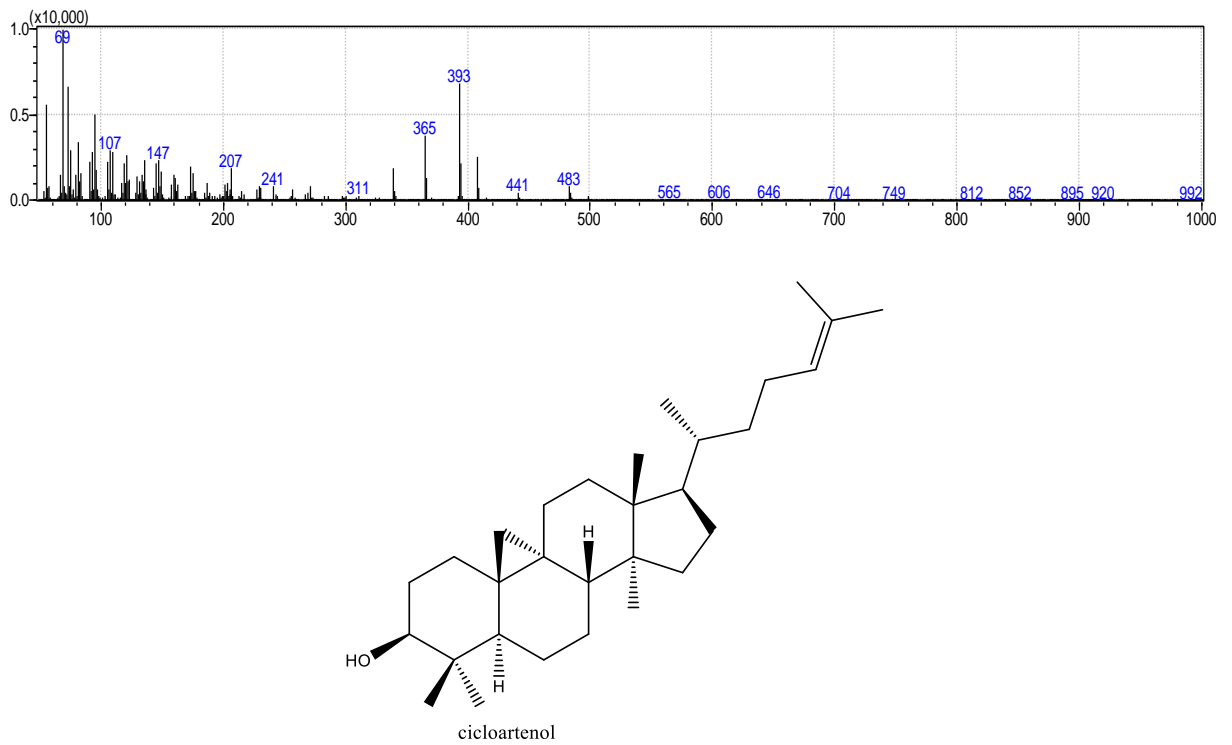
<b>Tempo de Retenção (min)</b>	<b>Área%</b>	<b>Substância</b>
6.707	0,06	2-hidroperoxitetra-hidrofurano
11.585	0,04	glicerol
12.694	0,07	$\alpha$ -ciclocitral
12.906	0,03	1-epi-alfa-gurjuneno
14.208	0,32	hidrixitolueno butilado
14.367	0,05	5,5-dietil-heptadecano
14.835	0,08	2,6-di-t-butilfenol
15.068	0,03	ácido 3-hidroxibenzoico
15.233	0,66	dodecan-1-ol
16.421	0,04	acrilato de dodecila
16.863	0,02	trans-geranilgeraniol
17.990	0,06	ácido 3,4-di-hidroxibenzoico
18.207	0,15	ácido tetradecanoico
18.824	0,06	hidrato de cis-sesquisabineno
19.188	0,07	ácido n-pentadecanoico
19.397	0,08	hexadecan-1ol
20.132	1,56	ácido hexadecanoico
20.865	0,06	(9E, 12Z) -tetradeca-9,12-dien-1-ol
20.941	0,06	(Z) -octadec-9-en-1-ol
21.088	0,02	ácido araquídico
21.212	0,34	octadecan-1-ol
21.383	0,04	fitol
21.971	0,12	(2-trans, 6-trans) -farnesol
22.422	0,13	ácido hexadec-9-enoico
22.880	0,09	isoeicosanol
24.767	0,06	glicerol 1-palmitato
25.203	0,12	1- [2-metil-2- (4-metil-3-pentenil) ciclopropil] etanol
26.162	0,16	monoestearato de glicerila
27.145	0,24	éter metil farnesil
27.759	0,55	acetato de geranilgeranila
29.190	1,6	ganoderol B
29.508	1,59	(-) – isolongifolol
29.764	4,28	$\alpha$ -amirina
30.116	1,38	cicloartenol

As figuras 30 a 32 referem-se a fragmentos dos espectros da figura 29.

**Figura 30 – Cromatograma de massas do transgeranilgeraniol.**

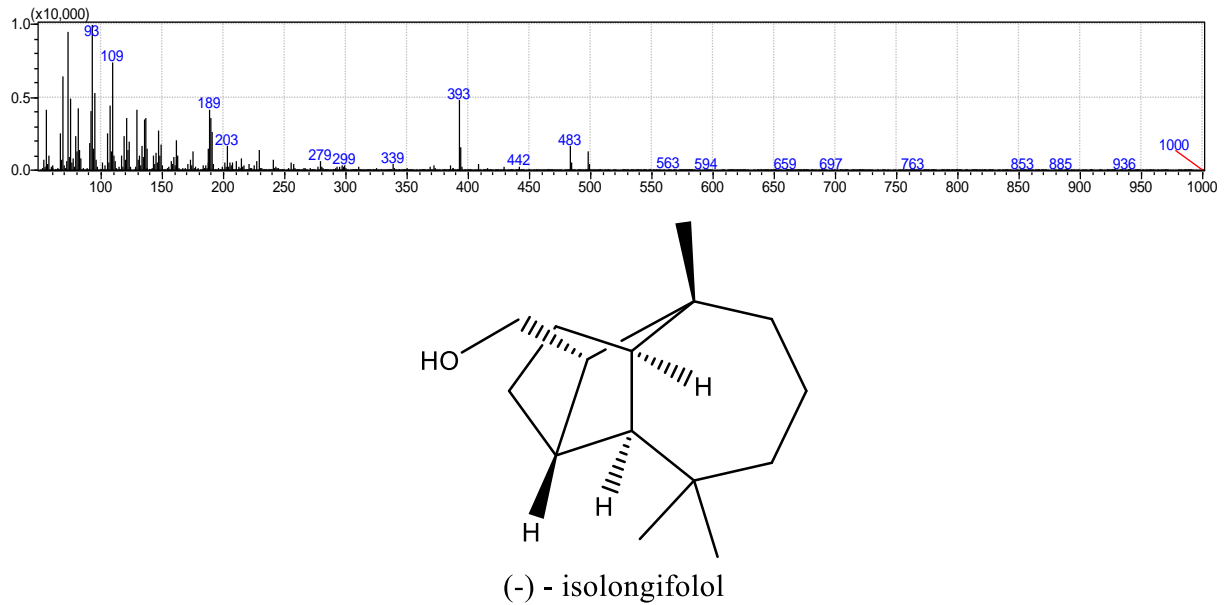


**Figura 31 – Cromatograma de massas do cicloartenol.**



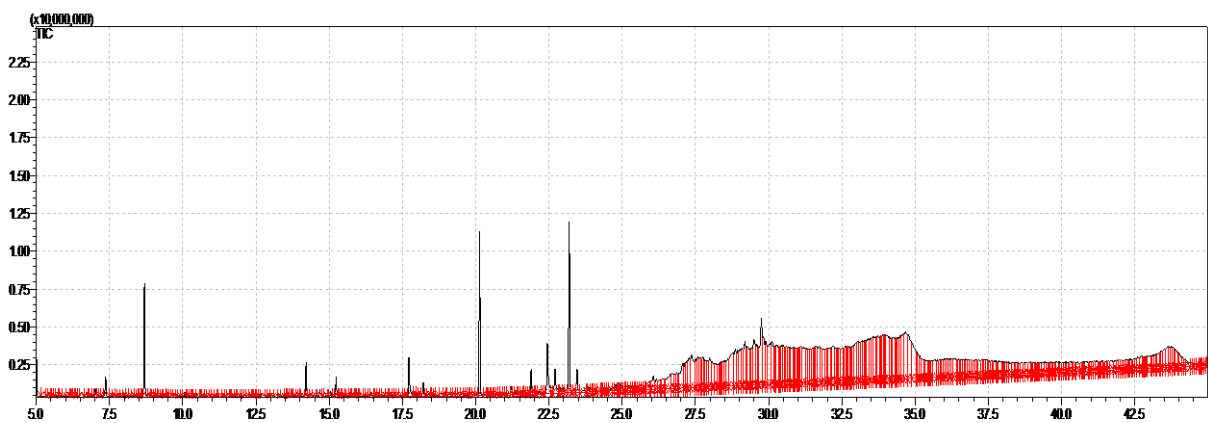


**Figura 32 – Cromatograma de massas do (-) – isolongifolol**



A figura 33 demonstra o espectro de íons totais da fração saponificável com derivação de TMS do látex *in natura* da *S. globulifera*. A tabela 3 lista os metabólitos referentes a esses espectros, obtidos na biblioteca NIST 11.

**Figura 33 – Comatograma de íons totais (TIC) dos metabólitos saponificáveis com derivação de TMS do látex *in natura* da *S. globulifera*.**



**Tabela 3 – Metabólitos saponificáveis com derivação de TMS do látex *in natura* da *S. globulifera* obtidos no CG/MS.**

<b>Tempo de Retenção (min)</b>	<b>Área%</b>	<b>Substância</b>
6.700	0,04	2-hidroperoxitetra-hidrofurano
7.019	0,09	ácido 4-etoxibutanoico
7.365	0,20	ácido láctico
7.633	0,05	ácido glicólico
8.689	0,90	ácido oxálico
8.834	0,01	ácido $\alpha$ -hidroxibutírico
10.060	0,05	ácido malônico
10.486	0,04	ácido benzoico
11.773	0,02	ácido succínico
12.607	0,03	di-t-butilacetileno
13.021	0,04	ácido 2-hidroxymalônico
14.209	0,27	hidroxitolueno butilado
14.676	0,09	ácido 2,4-diclorobenzoico
14.950	0,05	ácido 3-hidroxibenzoico
15.232	0,15	dodecan-1-ol
15.483	0,02	acetato de laurel
16.413	0,06	acrilato de dodecila
17.720	0,50	trans-geranilgeraniol
18.207	0,13	ácido tetradecanoico
18.806	0,06	ácido E-9-tetradecenoico
19.187	0,04	ácido n-pentadecanoico
19.525	0,05	ácido palmítico, éster etílico
20.132	1,24	ácido hexadecanoico
21.213	0,07	octandecan-1-ol
21.891	0,20	ácido esteárico
22.443	0,66	ácido (Z) -hexadec-9-enoico
22.706	0,36	juniperato de metila
22.883	0,07	Isoeicosanol
22.982	0,07	tetradecanodioato de dimetila
23.190	1,53	ácido dodecanodioico
23.457	0,24	ácido (E) -hexadec-9-enoico
24.770	0,08	palmitato de 2,3-di-hidroxipropila
26.166	0,17	estearato de 2,3-di-hidroxipropila
29.189	0,91	gadonerol B
29.750	1,32	$\beta$ -amirina

As figuras 34 a 36 são as frações dos espectros da figura 33.

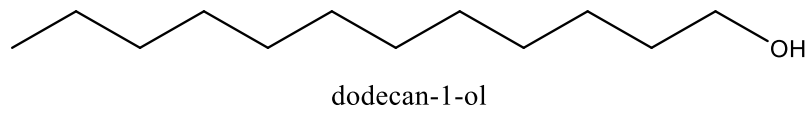
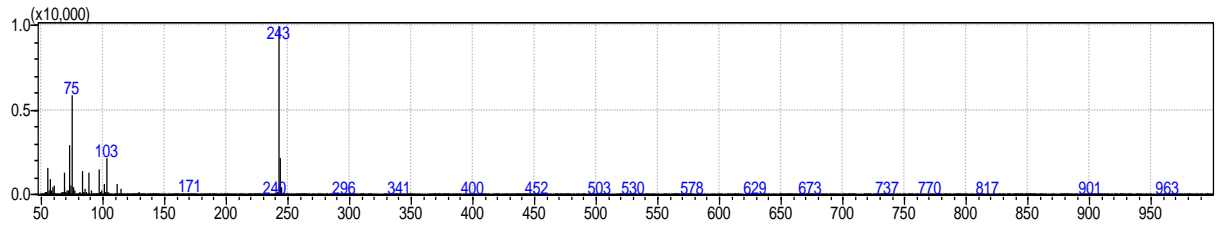
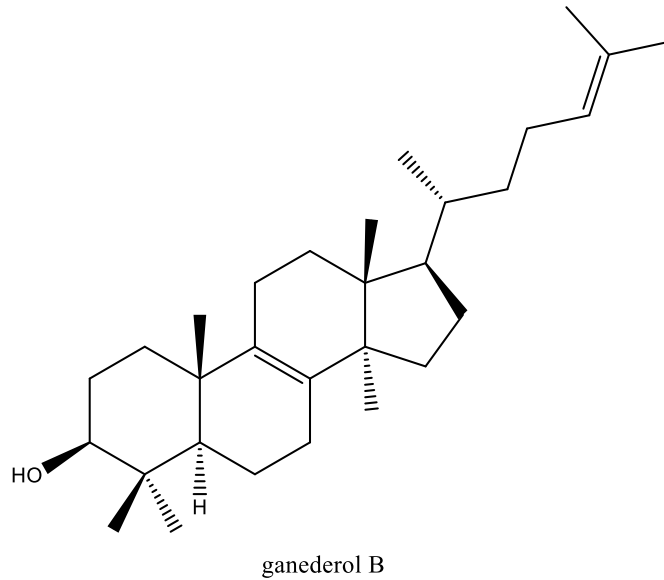
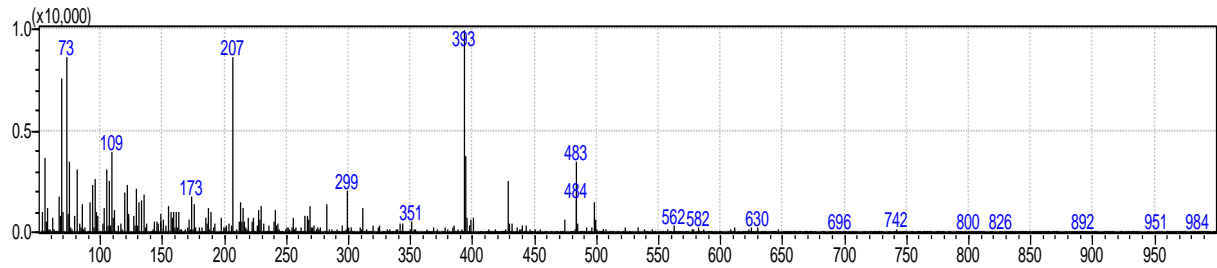
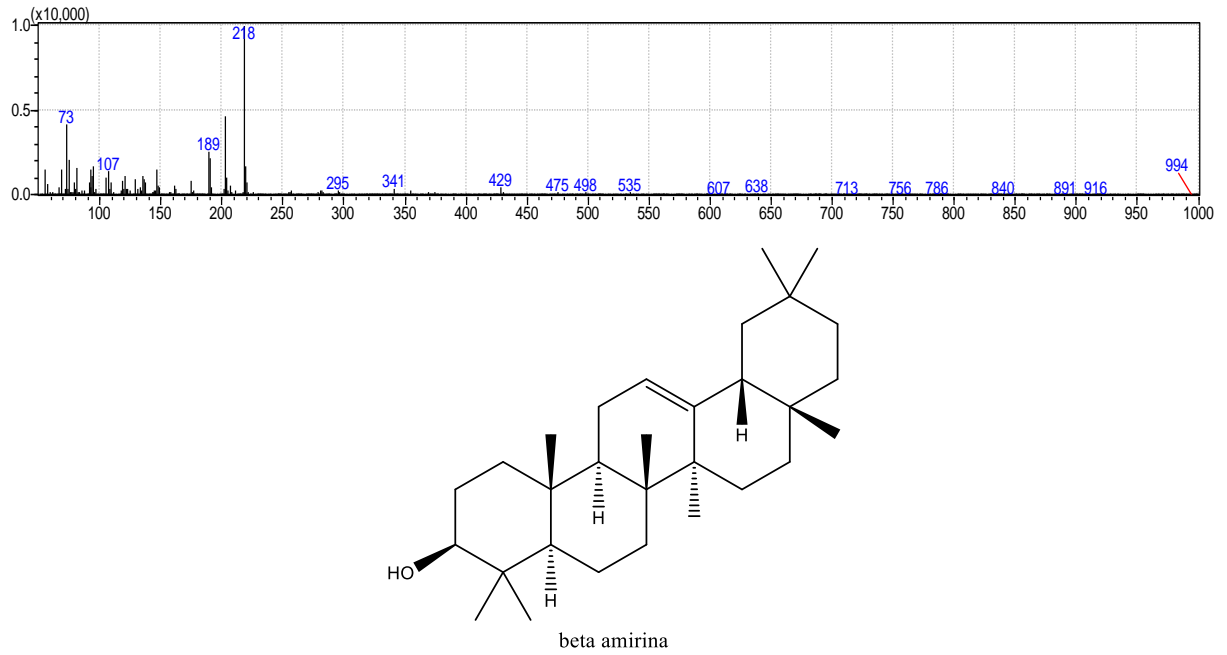
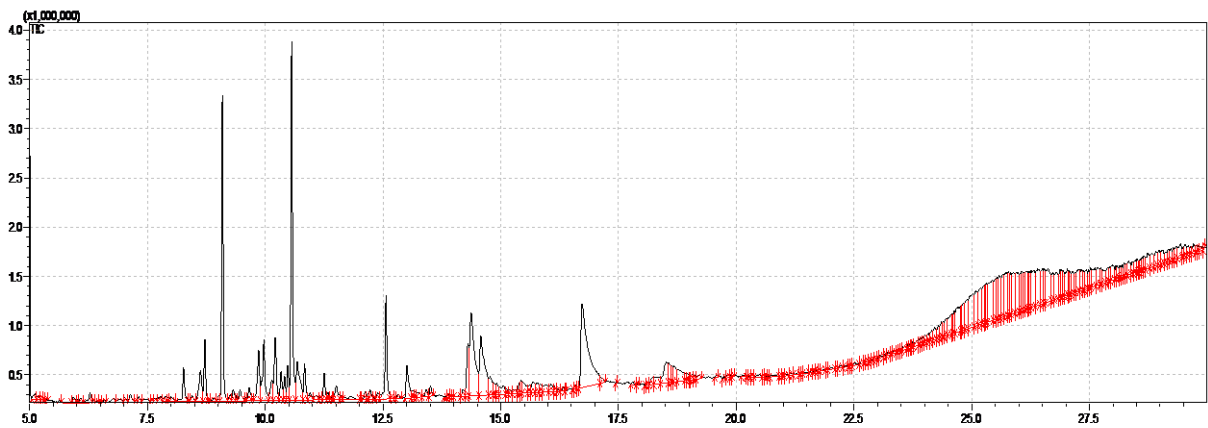
**Figura 34 – Cromatograma de massas do dodecan-1-ol.****Figura 35 – Cromatograma de massas do ganederol B.**

Figura 36 – Cromatograma de massas do  $\beta$ -amirina.



A figura 37 ilustra o espectro TIC do extrato hexânico da *S. globulifera* e a tabela 4 lista os metabólitos identificados.

Figura 37 – Cromatograma TIC do extrato hexânico da *S. globulifera*.

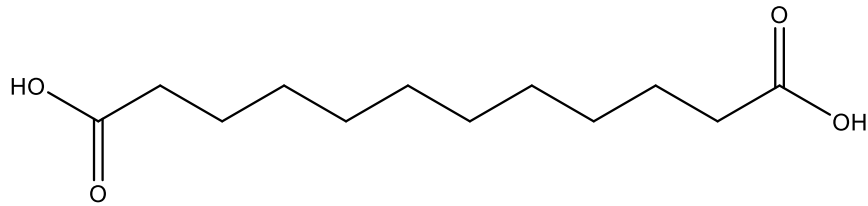
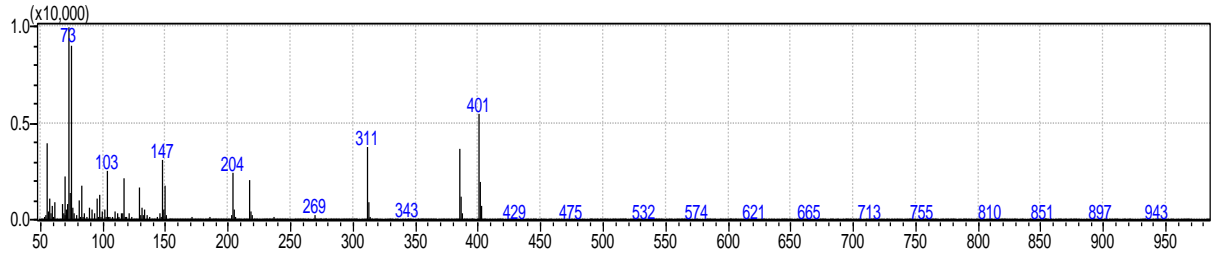


**Tabela 4 – Metabólitos identificados da amostra B3 do extrato acetônico da *S. globulifera* em CG/EM.**

<b>Tempo de Retenção (min)</b>	<b>Área%</b>	<b>Substância</b>
5.927	0,16	ácido benzoico
6.279	0,27	3-hidroxi-butanal
8.266	0,66	$\alpha$ -cubebeno
8.446	0,14	$\beta$ -patchouleno
8.623	0,84	di-t-butil-acetileno
8.713	0,96	$\alpha$ -copaeno
9.088	4,36	1-epi-gurjuneno
9.258	0,13	10s, 11s-himachala-3 (12), 4-dieno
9.317	0,21	Isoledeno
9.462	0,27	$\beta$ -copaeno
9.654	0,29	mentenil cetona
9.859	1,1	2,5-di-t-butil-1,4-benzoquinona
9.968	1,32	Rotundeno
10.210	1,25	Alloaromadendreno
10.411	0,39	$\beta$ -maalieno
10.478	0,54	$\alpha$ -selineno
10.559	5,33	hidroxitolueno butilado
10.676	1,26	$\beta$ -bisaboleno
10.834	0,64	$\beta$ -cadineno
11.250	0,42	2,6-di-t-butilfenol
11.506	0,37	ácido 3-hidroxibenzoico
12.563	1,8	4-etil-3,5-di-t-butil-1H-pirazol
13.006	0,80	(E) -1,3-difenilbut-1-en-1-ol
13.508	0,17	3,5-di-t-butil-4-hidroxibenzaldeído
14.371	3,65	esqualeno
14.576	2,61	ácido 3,4-di-hidroxibenzoico
16.726	5,48	ácido hexadecanoico

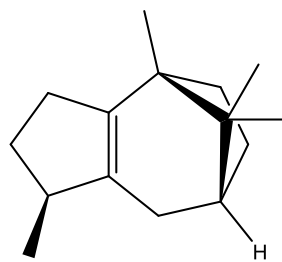
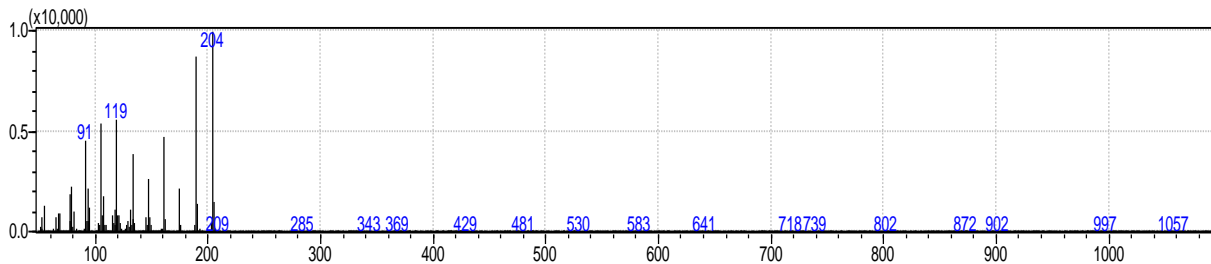
Os espectros das figuras 38 a 41 são os fragmentos do espectro do extrato hexânico da *S. globulifera* da figura 36.

**Figura 38 – Cromatograma de massas do ácido dodecanodioico.**



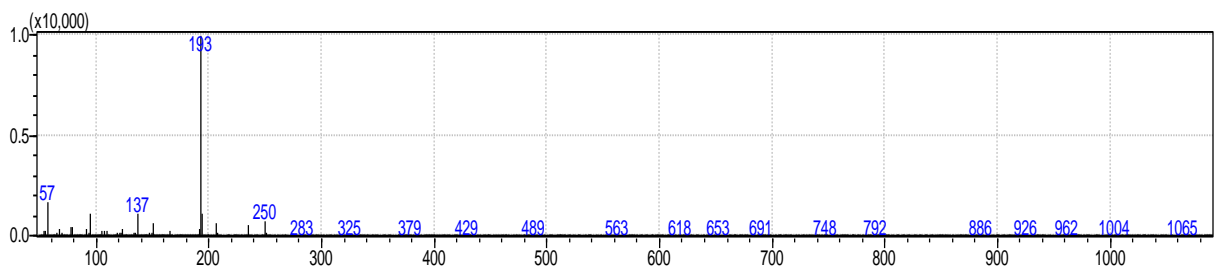
ácido dodecanodioico

**Figura 39 – Cromatograma de massas do  $\beta$ -patchouleno.**



beta-patchouleno

**Figura 40 – Cromatograma de massas do 4-etil-3,5-di-t-butil-1H-pirazol.**



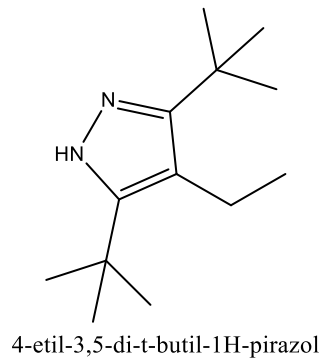
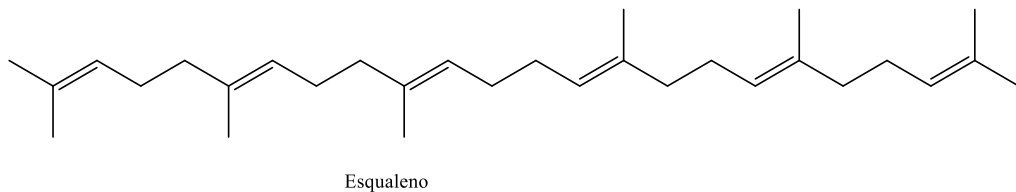
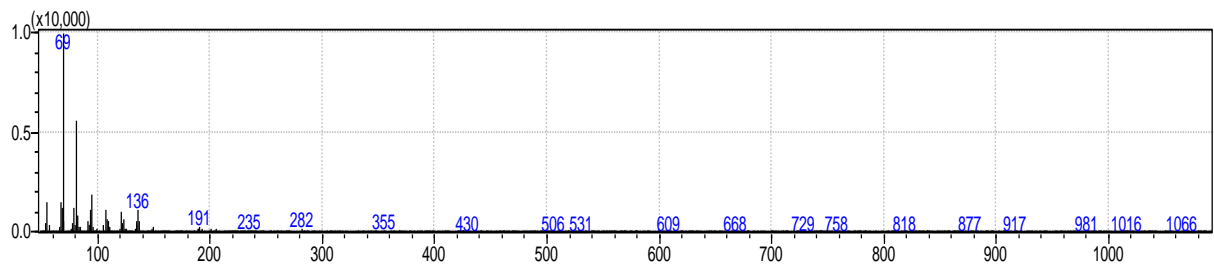
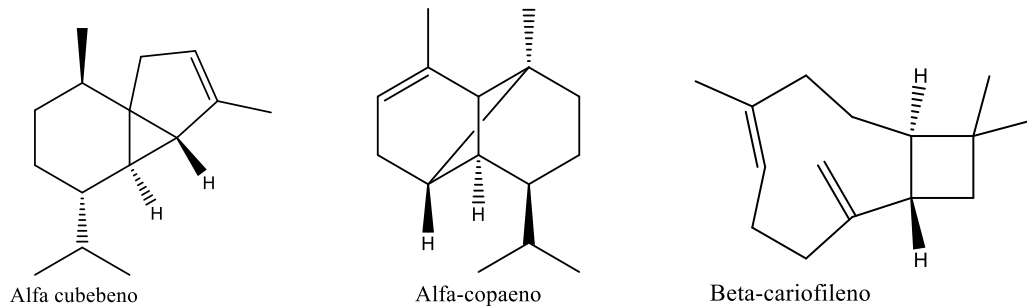


Figura 41 – Cromatograma de massa do esqualeno.



Nogueira et al. (2015), em seu estudo fitoquímico da *S. globulifera*, em análise de CG/EM, identificou alguns sesquiterpenos que também foram identificados no extrato hexânico listados na tabela 4. São eles:



Erro! Fonte de referência não encontrada. 42 representa o espectro TIC da amostra B 3 do extrato acetônico da *S. globulifera* e a tabela 5 lista os metabólitos identificados.

Figura 42 – Cromatograma TIC da amostra B3 do extrato acetônico da *S. globulifera*.

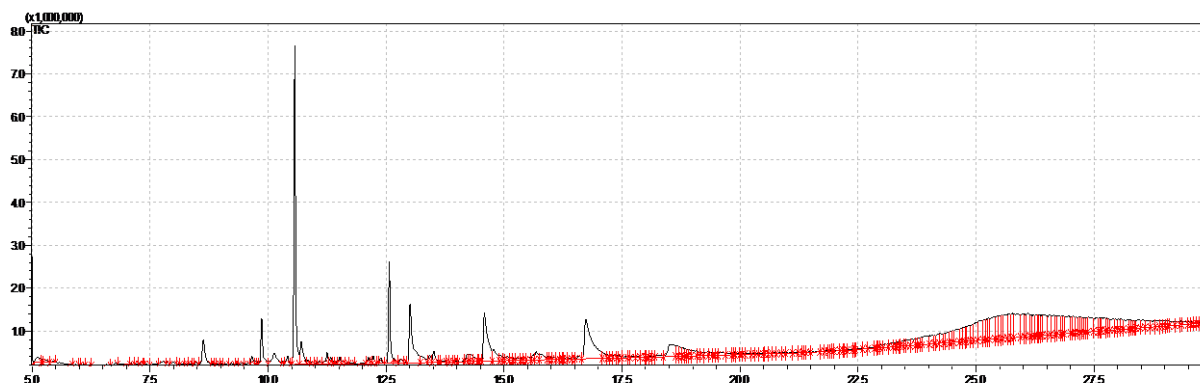


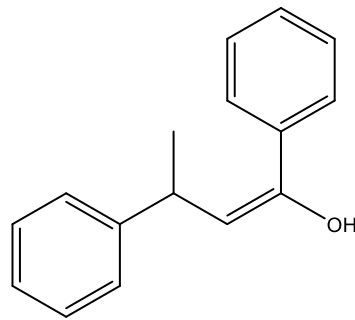
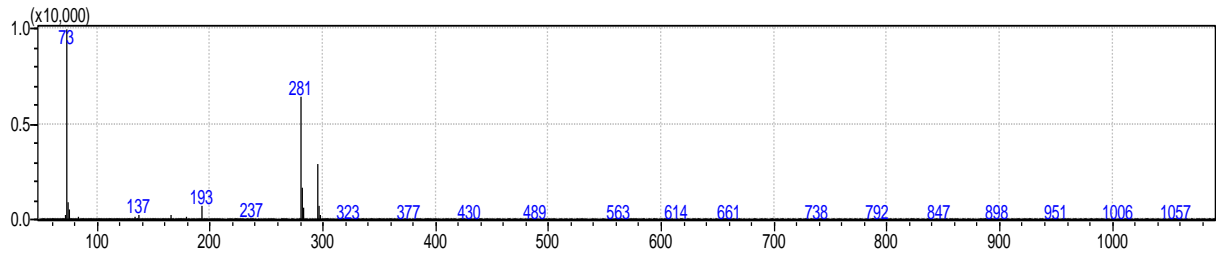
Tabela 5 – Metabólitos identificados da amostra B3 do extrato acetônico da *S. globulifera* em CG/EM.

Tempo de Retenção (min)	Área%	Substância
5.121	0,40	pirocatecol
6.067	0,09	ácido 4-hidroxibutanoico
7.129	0,11	3,3-dimetil-henano
7.311	0,08	glicerol
8.629	125	di-t-butil-acetileno
9.660	0,33	4,5-dietil-3,6-dimetil-3,5-octadieno
9.864	1,55	2,5-di-t-butil-1,4-benzoquinona
10.567	8,38	hidroxitolueno butilado
10.706	1,09	7,9-di-terc-butil-1-oxaespíro [4,5] deca-6,9-dien-8-ona
11.252	0,44	2,6-di-terc-butilfenol
12.232	0,21	1- (dietilboril) oxi-ciclocteno
12.571	2,9	4-etil-3,5-di-t-butil-1H-pirazol
13.010	3,29	(E) -1,3-difenilbut-1-en-1-ol
12.233	0,29	ácido 3,4-di-hidroxibenzoico
12.575	1,30	4-etil-3,5-di-t-butil-1H-pirazol
13.017	3,43	(E) -1,3-difenilbut-1-en-1-ol
13.512	0,44	3,5-di-t-butil-4-hidroxibenzaldeído
14.585	3,29	ácido 3,4-di-hidroxibenzoico
14.779	0,78	ácido tetradecanoico
18.551	1,36	ácido octadecanoico

As figuras 43 a 45 mostram os fragmentos da amostra B3 do extrato acetônico *S. globulifera* está listado na figura 42.

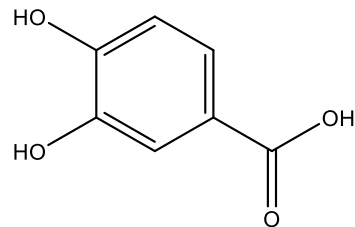
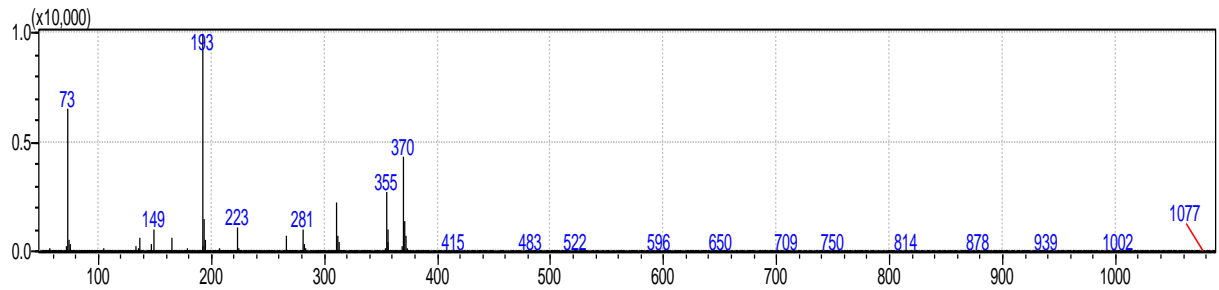


Figura 43 – Cromatograma de massa do (E) -1,3-difenilbut-1-en-1-ol.



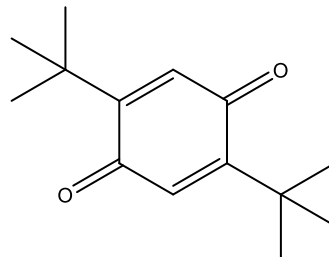
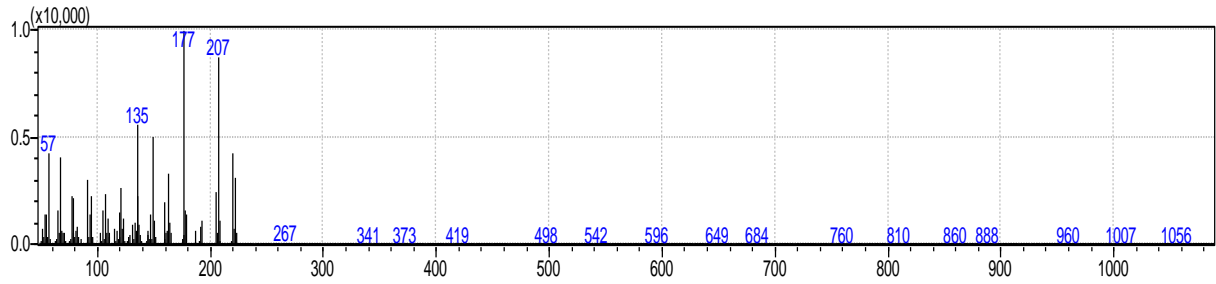
(E) -1,3-difenilbut-1-en-1-ol

Figura 44 – Cromatograma de massas do ácido 3,4-di-hidroxi-benzóico.



ácido 3,4-di-hidroxi-benzóico

**Figura 45 – Cromatograma de massas do 2,5-di-t-butil-1,4-benzoquinona.**



2,5-di-t-butil-1,4-benzoquinona

O espectrograma TIC da figura 46 é proveniente da amostra A3 do extrato acetônico da *S. globulifera* e a tabela 6 lista os metabólitos identificados por esses espectros.

**Figura 46 – Cromatograma TIC da amostra A3 do extrato acetônico da *S. globulifera*.**

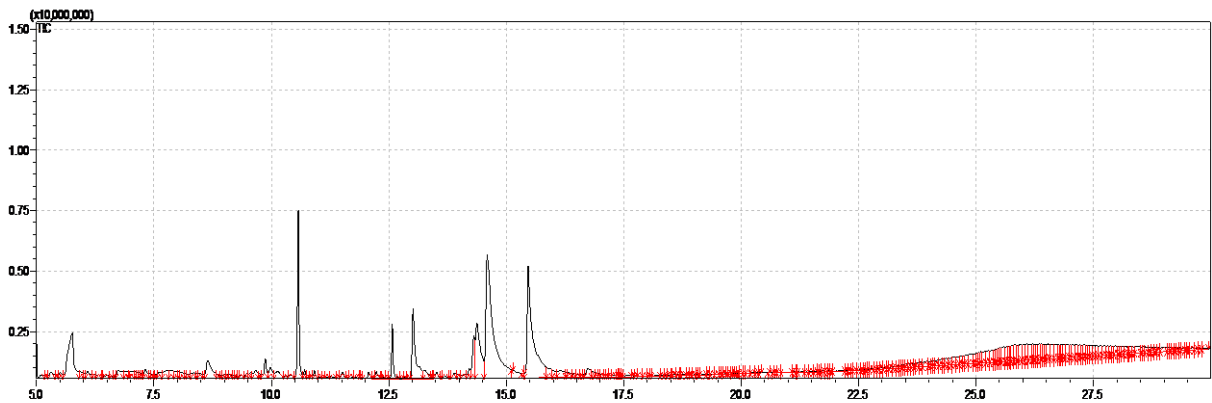
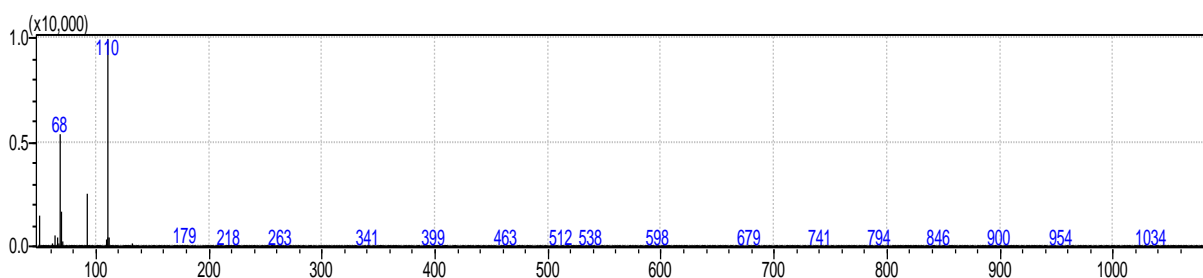


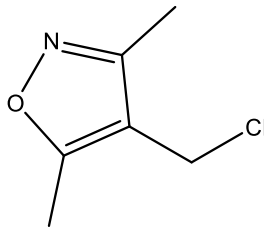
Tabela 6 – Metabólitos identificados da amostra A3 do extrato acetônico.

Tempo de Retenção (min)	Área%	Substância
5.763	3,97	4- (clorometil) -3,5-dimetil-isoxazol
6.083	0,44	ácido 4-hidroxi-butanoico
6.742	0,66	1-(2-hidroxi-4-metoxifenil) etanona
7.325	0,42	glicerol
7.625	0,35	pirocatecol
8.642	1,5	di-t-butil-acetileno
9.467	0,22	7,7-dimetil-2-propan-2-il-5-prop-1-en-2-il-biciclo [4.1.0] hept-3-eno
9.667	0,53	4-β-H, -5-alfa-eremofolina
9.867	0,75	2,5-di-t-butil-1,4-benzoquinona
9.975	0,62	gama-muroleno
10.575	4,02	hidroxitolueno butilado
10.708	0,26	7,9-di-t-butil-1-oxaespíro (4,5) deca-6,9-dieno-2,8-diona
12.075	0,24	ácido salicílico
12.233	0,29	4-etil-4,6-dietil-5-propan-2-il-1,3,2-dioxaborinina
12.575	1,30	4-etil-3,5-di-t-butil-1H-pirazol
13.017	3,43	(E) -1,3-difenilbut-1-en-1-ol
13.517	0,24	3,5-di-t-butil-4-hidroxibenzaldeído
13.892	0,26	ácido 3,4-di-hidroxibenzoico
14.308	1,52	trans-geranilgeraniol
14.375	3,84	esqualeno
15.467	9,00	o-desmetilangolensina
16.158	0,65	esculetina
16.733	0,55	ácido palmítico

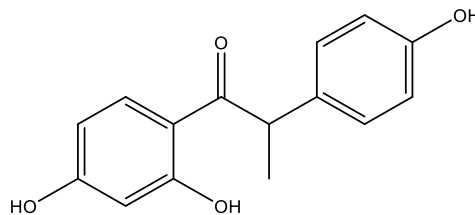
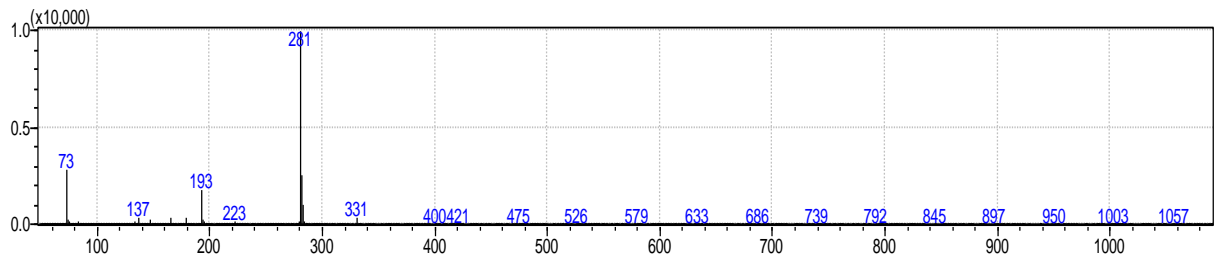
As figuras 47 e 48 representam os fragmentos apresentados no espectro TIC da figura 46 da amostra A3 do extrato cetônico da *S. globulifera*.

Figura 47 – Cromatograma de massas do 4- (clorometil) -3,5-dimetil-Isoxazol.





4- (clorometil) -3,5-dimetil-Isoxazol

**Figura 48 – Cromatograma de massas do O-desmetilangolensina.**

O-desmetilangolensina

Vários metabólitos isolados apresentam propriedades farmacológicas, que vêm sendo estudadas por pesquisadores em diversas plantas, com o intuito de criar novos fármacos e, ainda, de melhorar a etnomedicina utilizada pelas populações menos favorecidas. Nas tabelas apresentadas pelo CG/EM dos extratos e do látex *in natura* da *S. globulifera* foram identificados muitos metabólitos e entre eles podemos descrever alguns que já possuem algumas atividades comprovadas.

De acordo com Syafni et al. (2012) o ácido 3,4-di-hidroxibenzoico tem propriedades antioxidante e antimicrobiana.

Ainda pouco explorado o geraniogeraniol apresenta importantes propriedades farmacológicas (BOGDAN; ROSEMARY, 2015).

O esqualeno é um hidrocarboneto altamente insaturado da família dos triterpenoides muito utilizado em farmácia ou cosmetologia (WOLOSIK et al., 2012).

De acordo com Liang et al. (2017), a esculetina e seus derivados possuem importantes propriedades farmacológicas.

O extrato de diclorometano não apresentou atividades; o látex *in natura* da *S. globulifera* e os extratos EAC (acetônico), EHD (hidroalcoólico) e EHX (hexânico) apresentaram atividade contra a *L. infantum* e *L. amazonenses*, conforme tabela 7.

O teste de toxicidade apresentou valores altos, sendo que o látex *in natura* apresentou melhor resultado, o que pode ser confirmado pelo seu valor de índice de seletividade (IS) de 3,4 para *L. Amazonensis* e de 0,26 para a *L. infantum*.

Lenta et al. (2007) afirmam que as amostras brutas apresentaram resultados melhores do que os extratos. Nas suas análises ele encontrou valor de IC<sub>50</sub> de  $2,1 \pm 0,8$  µg para amostra bruta da *S. globulifera*, valor mais significativo do que os apresentados para os extratos.

Nesta pesquisa isso também ocorreu nas análises: o valor de IC<sub>50</sub>  $8,8 \pm 0,15$  µg da amostra bruta apresentou melhor atividade que os extratos. Na pesquisa camaronesa acima citada, mesmo sendo isolados os metabólitos secundários ativos, a resina bruta foi mais eficiente e menos tóxica em comparação com os mesmos. Lenta et al. (2007) confirmam com o isolamento de metabólitos secundários que a *S. globulifera* é rica em xantonas e benzofenonas, que vêm sendo testados para o tratamento de leishmania.

Comparando os resultados da *L. amazonensis* com os da *L. infantum*, percebe-se que tanto o látex quanto os seus extratos foram mais significativos para a *L. amazonensis* e também apresentaram melhores índices de seletividade (IS). Isso pode ser confirmado quando confrontados os valores da tabela 7.

**Tabela 7 – Dose letal mínima e índice de seletividade do látex puro da *S. globulifera* e seus extratos (acetônico, hidroalcoólico, hexânico) e controle positivo de drogas contra macrófago, BGM e Hep-G2, para *L. infantum* e *L. amazonensis*.**

Leishmania infantum

COMPOSTO	IC <sub>50</sub> (µg)	R <sup>2</sup>	IS	CC <sub>50</sub> (µg) Macrófago	CC <sub>50</sub> (µg) BGM	CC <sub>50</sub> (µg) Hep G2
RP	114,1 ± 0,35	0,82	0,26	30 ± 0,15	31 ± 0,14	52 ± 0,06
EAC	100,3 ± 0,40	0,79	0,08	8 ± 0,28	31 ± 0,13	19 ± 0,07
EHD	159,3 ± 0,14	0,80	0,15	24 ± 0,18	297,5 ± 0,13	33 ± 0,08
EHX	135,4 ± 0,15	0,86	0,08	11 ± 0,21	31 ± 0,14	4 ± 0,08
Ant III	80,0 ± 0,13	0,87	0,1	8,0 ± 0,07	131 ± 0,09	31 ± 0,07

Leishmania amazonensis

composto	IC <sub>50</sub> (µg)	r <sup>2</sup>	IS	CC <sub>50</sub> (µg) Macrófago	CC <sub>50</sub> (µg) BGM	CC <sub>50</sub> (µg) Hep G2
RP	8,8 ± 0,15	0,86	3,4	30 ± 0,15	31 ± 0,14	52 ± 0,06
EAC	26,87 ± 0,19	0,80	0,29	8 ± 0,28	31 ± 0,13	19 ± 0,06
EHD	57,99 ± 0,23	0,83	0,41	24 ± 0,18	297,5 ± 0,13	33 ± 0,08
EHX	9,25 ± 0,07	0,96	1,19	11 ± 0,21	31 ± 0,14	4 ± 0,08
ANT III	80.0 ± 0.13	0.87	0.02	2 ± 0.12	32 ± 0.05	3.2 ± 0.11

IC<sub>50</sub>= Concentração capaz de inibir 50% da multiplicação das amastigotas de *L. amazonensis*. R<sup>2</sup> = Coeficiente de determinação. Varia entre 0 e 1, indicando, em porcentagem, o quanto o modelo consegue explicar os valores observados. IS = índice de seletividade. Razão entre CC<sub>50</sub> /IC<sub>50</sub>. CC<sub>50</sub> = concentração citotóxica capaz de inibir 50% do metabolismo celular. MØ = macrófagos DH82. BGM= células derivadas de rim de macaco verde africano. HepG2= células de hepatoma humano.

Ainda em relação aos valores da tabela 7, observa-se que o controle positivo só foi mais eficiente para a *L. infantum* e que os índices de seletividade indicam que ele é muito tóxico.

Os gráficos representativos das curvas de dose-resposta da atividade do látex puro e dos extratos da *S. globulifera* apresentados na figura 30 mostram as linhas

de tendência, baseadas nas médias de absorbância de cada concentração dos compostos, obtidas por *fitting* sigmoidal dose-resposta (Graph Pad Prism 5).

Todos esses valores de IC<sub>50</sub> calculados foram obtidos de quatro repetições experimentais. A curva sigmoidal dose-resposta registra o composto versus a porcentagem de inibição do amastigota intracelular das formas de *L. infantum* e *L. amazonensis*.

**Figura 49 – Gráficos representativos das curvas de dose-resposta da atividade do látex puro e dos extratos da *S. globulifera* para a *L. infantum*.**

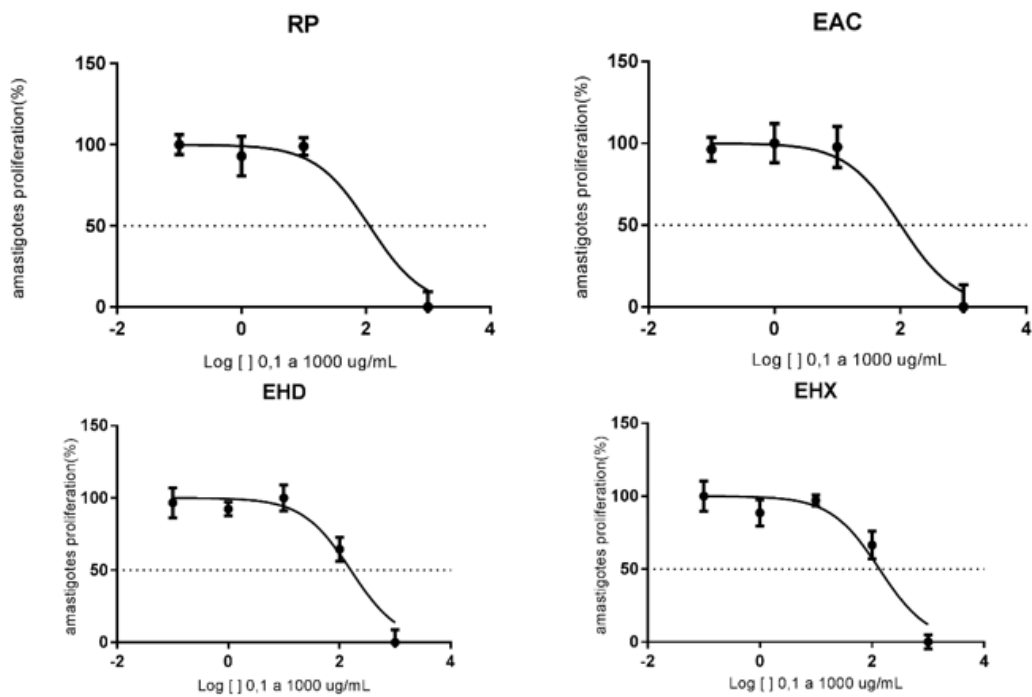
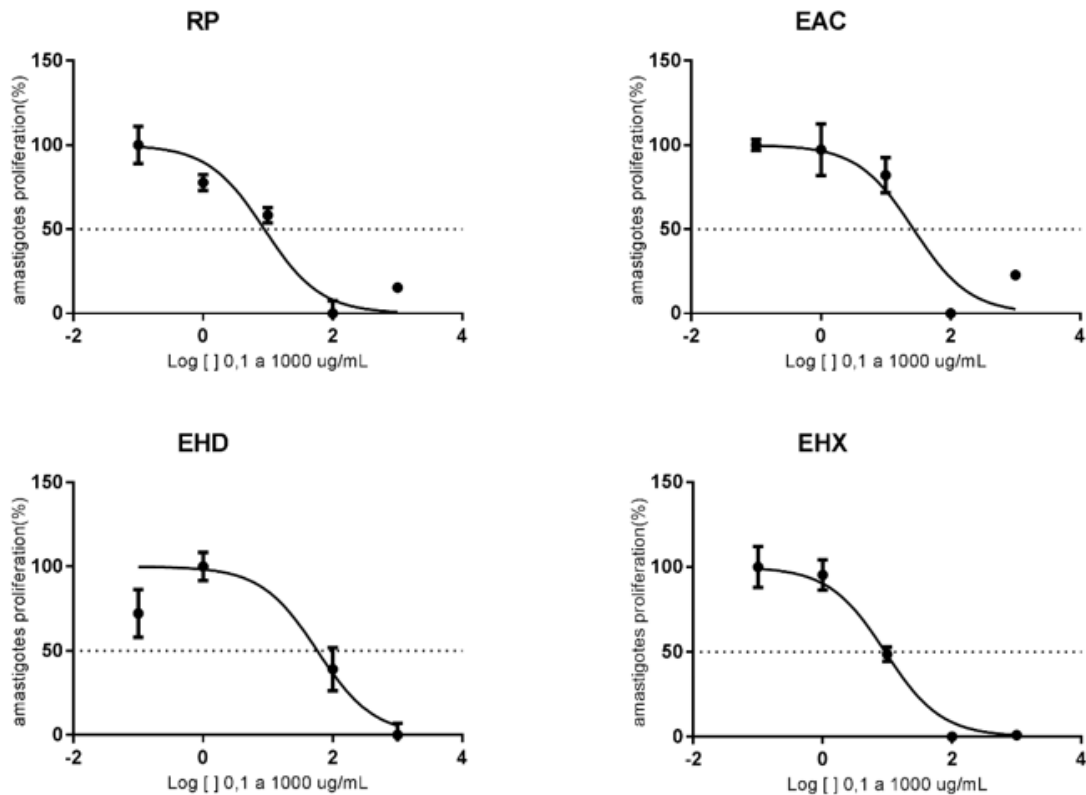


Figura 50 – Gráficos representativos das curvas de dose-resposta da atividade do látex puro e dos extratos da *S. globulifera* para a *L. amazonensis*.



Os resultados encontrados nas análises microbiológicas para a *L. infantum* e *L. amazonensis* não puderam ser confrontadas com outras pesquisas, por não terem sido encontrados outros trabalhos publicados com a utilização do látex e nem pela utilização dos parasitos acima citados. Lenta et al. (2007) relatam que várias xantonas foram descritas anteriormente com atividades leishmanicidas, mas não há relatos sobre a atividade leishmanicida de benzofenonas do tipo gutiferona.

Na revisão bibliográfica desta pesquisa só foram encontrados três trabalhos sobre leishmaniose e todos eles sobre a *L. donovani*, sendo que dois deles eram do próprio Lenta e o outro do Fromentin, já referenciados.

Apesar da *L. infantum* ser da classe das leishmanias viscerais, ela possui características diferentes da *L. donovani*, o que não nos permite comparar os dados com essas pesquisas camaronesas.

Quando comparados os resultados da gutiferona A com  $IC_{50} = 0,16 \mu\text{M}$  isoladas do extrato da folha da *S. globulifera* por Lenta et al. (2007) para inibição da *L. donovani*, com os de Fromentin et al. (2013), que isolou das sementes da mesma



espécie a Gutiferona A com IC 50 = 5,83  $\mu$ M, verificou-se valores bem discrepantes, e quando Fromentin testou os derivados da gutiferona A percebeu-se diminuição da atividade.

Conforme observado em Silva (2011), liofilizando o látex pode-se trabalhar com o CG/MS em uma temperatura maior, minimizando a perda de massa da amostra e, submetendo-o a uma cromatografia líquida de alta performance (CLAE), acredita-se no isolamento de muitos dos metabólicos secundários que ajudaram o desenvolvimento desta pesquisa para corroborar com as já existentes.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se afirmar que os objetivos desta pesquisa foram alcançados, já que ela demonstrou que o látex possui também grande potencial para elaboração de futuros fármacos, inclusive pela recorrente utilização do mesmo pelas populações carentes para tratamentos.

A presença de  $\beta$ -amirina e esqualeno, entre outros metabólitos secundários que foram identificados pelo CG/EM, reforça muito a importância da continuidade desta pesquisa. A ideia é isolar os metabólitos secundários do látex e realizar novas análises microbiológicas, pois os compostos analisados já demonstraram o potencial medicinal da planta.

Percebe-se que, liofilizando o látex, como fez Silva (2011), pode-se trabalhar com o CG/EM em um gradiente de temperaturas maior, minimizando a perda de massa da amostra, e, submetendo o látex a uma cromatografia líquida de alta performance (CLAE), ao invés de utilizar as colunas preparativas de média pressão, acredita-se chegar a resultados mais expressivos, pois vários dos metabólitos identificados no CG/EM e também encontrados em outras pesquisas são alvo de vários estudos farmacêuticos, o que sugere o aprofundamento das investigações sobre a *S. globulifera*.

Esses resultados reafirmam a importância da continuidade desta pesquisa, no sentido de tentar diminuir o grau de toxicidade e de investigar os efeitos colaterais que podem apresentar com o uso contínuo do látex da *S. globulifera*, já que a mesma vem sendo utilizada pela população local para tratamento medicinal.

Através da revisão bibliográfica, não foi encontrado nenhum trabalho que tenha abordado a atividade leishmanicida e a triagem fitoquímica do látex da *S. globulifera*. Entretanto, há de se registrar que a *S. globulifera* vem sendo pesquisada para a cura de várias enfermidades, sendo as folhas e a casca as partes mais exploradas pelos pesquisadores.

Pelo exposto, este estudo vem enriquecer o conhecimento químico e biológico da espécie.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, N.R.R. **Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre microrganismos relacionados à lesão de mucosite oral**. 2010. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade Federal do Pará. 2010.
- ATEBA, J. E. T. ; TOGHUEO, R. M. K.; AWANTU, A. F. ; MBA'NING, B. M. ; GOHLKE, S.; Sahal, D.; RODRIGUES-FILHO, D. E.; TSAMO, E.; Boyom, F. F.; SEWALD, N. e LENTA, B. N.. Cytotoxicity of Endophytic Fungi from *Symphonia globulifera* (Clusiaceae). Artigo. **Journal of Fungi**. Junho de 2018. Disponível em <https://www.mdpi.com/journal/jof>. Acesso em julho de 2018.
- AULNER, N.; DANCKAERT, A.; ROUAULT-HARDOIN, E.; DESRIVOT, J.; HELYNCK, O.; COMMERE, P-H.; MUNIER-LEHMANN, H.; SPÄTH, G.F.; SHORTE, S.L.; MILON, G.; PRINA, E. High content analysis of primary macrophages hosting proliferating leishmania amastigotes: application to anti-leishmanial drug Discovery. Artigo de pesquisa. **Plos**. 2013. doi.org/10.1371/journal.pntd.0002154 Disponível em <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal...> Acesso em junho de 2018
- BARBOSA, W. L. R. Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais. Belém – Pa: **Rev Cient UFPA**, vol. 4, 2001. Disponível em [www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000171&pid=S1516...Ing...](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000171&pid=S1516...Ing...) Acessado em junho de 2018.
- BASTOS, M. M.; BOECHAT, N.; GOMES, A. T. P. C.; NEVES, M. G. P. M. S.; CAVALEIRO, J. O Uso de Porfirinas em Terapia Fotodinâmica no Tratamento da Leishmaniose Cutânea. Artigo. **Rev. Virtual Quim.**, 2012, 4 (3), 257-267. Data de publicação na Web: 18 de abril de 2012. Disponível em <http://www.uff.br/rvq> Acesso em junho de 2018.
- BISKUP, E.; GOLEBIOWSKI, M.; GNIADOCKI, R. e STEPNOWSKI, P. Tripernoid  $\alpha$ - myrin stimulates proliferation of human keratnocytes but does not protect them against UVB damage. **Acta biochimica Polonica** 59 (2), 255-260, 2012. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22577623> Acesso em junho de 2018
- BOER, M.D.; ARGAW, D.; JANNIN, J., ALVAR, J., Leishmaniasis impact and treatment access, **Clin. Microbiol. Infect.** 17 (2011) 1471e1477.
- BRASIL. Governo Federal. Ministério Da Saúde. Leishmaniose Visceral. Disponível em <http://PortalmS.Saude.Gov.Br/Saude-De-A-Z/Leishmaniose-Visceral>. Acesso em julho de 2018.
- BRIGIDO, H. P. C. **Estudos farmacognósticos, fitoquímicos e biológicos de *Annona glabra L.* (Annonaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Pará. Belém, PA. 2016. Disponível em [repositorio.ufpa.br/jspui/handle/2011/8761](http://repositorio.ufpa.br/jspui/handle/2011/8761) Acesso em junho de 2018.
- BUDDE, K.B.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C.; HARDY, O.J.; HEUERTZ, M. *The ancient tropical rainforest tree *Symphonia globulifera* L. f.* Artigo. **Hereditarietade** (Edinb). 2013 jul; 111 (1): 66-76. Publicado online em 2013 10 de abril. Doi: 10.1038 / hdy.2013.21.
- CANEVALORO JUNIOR, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Editora Artliber, 2007.
- CASTILHO L.; SARACENI, A.C.; DÍAZ, C.C.; PACIENCIA, I.; SUFFREDINI, M. I. New trends in dentistry: Plant extracts against *Enterococcus faecalis*. The efficacy compared to chlorhexidine. Artigo. 2013. **Brazilian oral research**. 27. 109-15. 10.1590/S1806-83242013000100017. Disponível em [https://www.researchgate.net/publication/236089865\\_New\\_trends\\_in\\_dentistry\\_Plant\\_extracts\\_against\\_Enterococcus\\_faecalis\\_The\\_efficacy\\_compared\\_to\\_chlorhexidine](https://www.researchgate.net/publication/236089865_New_trends_in_dentistry_Plant_extracts_against_Enterococcus_faecalis_The_efficacy_compared_to_chlorhexidine) Acesso em junho de 2018.
- CHANDRASEKARAN, R.; GNANASEKAR, S.; SEETHARAMAN, P.; KRISHNAN, M.; SIVAPERUMAL, S. Intrinsic studies of *Euphorbia antiquorum* L. latex extracts against human bacterial pathogens and mosquito vector *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Artigo.

**Biocatal Agric Biotechnol.** Volume 10, Abril de 2017, Pags 75-82 Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818116301876> . Acesso em maio de 2019.

COTTET, K.; KOULOURAB, K.; KRITSANIDAA, M.; WANSIC, J.D.; ODonned G.; MICHELA, S.; HALABALAKIB, M. e LALLEMANDA, M.C. Comparative metabolomic study between African and Amazonian *Symphonia globulifera* by tandem LC–HRMS. Artigo. **Phytochemistry Letters** Volume 20, June 2017, Pages 309-315. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/.../S1874390017300642> Acesso em junho de 2018.

COTTET, K.; XU, B.; CORIC, P.; BOUAZIZ, S.; MICHEL, S.; VIDAL, M.; LALLEMAND, M. C. e BROUSSY, S.. Guttiferone A Aggregates Modulate Silent Information Regulator 1 (SIRT1) **Activity**. Artigo. **J. Med. Chem.** 2016, 59, 9560–9566 DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b01182 Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27669815>. Acesso em junho de 2018.

DEMIATE, I.M.; WOSIACKI, G.; CZELUSNIAK, C.; NOGUEIRA, A. Determinação de açúcares redutores e totais em alimentos: comparação entre método colorimétrico e titulométrico. Revisão de Publicação. UEPG. **Publimed**. Paraná, v. 8, n. 1, p. 65-78, 200. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22577623> Acesso em junho de 2018.

DEMCZUK JR, B. e RIBANI, R. H. Atualidades sobre a química e a utilização do urucum (*Bixa orellana* L.). Artigo. **Revista Brasileira em Pesquisa de Alimentos**. 2015. v. 6, n. 1, p. 37 – 50. Disponível em <https://periodicos.utfrpr.edu.br/rebrapa/article/download/3424/pdf> . Acesso em abril de 2019.

FERREIRA, A. B. H. **Novo Dicionário da Língua Portuguesa**. Segunda edição. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1986. p. 120 e 992, 1407. Disponível em <http://dicionario-aberto.net/dict.pdf> . Acesso em junho de 2018.

FERREIRA, R. G. S. **Obtenção da mistura triterpênica de  $\alpha,\beta$ - amirenona e avaliação de seus efeitos hipolipemiante, hipoglicemiante e antiobesidade**. Tese. Universidade Federal do Amazonas. 2017. Disponível em <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/5894> Acessada em agosto de 2018.

FROMENTIN, Y.; GABORIAUD-KOLAR, N.; LENTA, B. N.; WANSI, J. D.; BUISSON, D.; MOURAY, E.; GRELLIER, P.; LOISEAU, P. M.; LALLEMAND, M. C. e MICHEL, S. Síntese de novos derivados da guttiferona A: Avaliação in vitro para o Plasmodium falciparum, Trypanosoma brucei e Leishmania donovani. Artigo original. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 2013. Disponível em <http://www.elsevier.com/locate/ejmech> Acesso em julho de 2018.

FROMENTIN, Y.; COTTET, K.; KRITSANIDA, M.; MICHEL, S.; GABORIAUD-KOLAR, N.; LALLEMAND, M. C. *Symphonia globulifera*, a Widespread Source of Complex Metabolites with Potent Biological Activities. Artigo. **Planta Med** 2015; 81: 95–107. ISSN 0032-0943. DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1396148> P. 2015 Disponível em [https://www.researchgate.net/profile/Nicolas\\_Gaboriaud/publication/](https://www.researchgate.net/profile/Nicolas_Gaboriaud/publication/) Acesso em junho de 2018.

GUSTAFSON, K.R.; BLUNT, J.W.; MUNRO, M.H.G.; FULLER, R.W.; MCKEE, T.C.; CARDELLINA, I.I.; JOHN, H.; MCMAHON, J.B.; CRAGG, G.M. e BOYD, M.R. The guttiferones, HIVinhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. Artigo. 1992. **Tetrahedron** 48, 10093–10102. Disponível em [www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref...pid...](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref...pid...) Acesso em junho de 2018.

HANSEN, J.; BROSS, P. A cellular viability assay to monitor drug toxicity. Artigo. **Methods Mol. Biol.** 648 (2010) 303 e 311. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20700722> Acesso em junho de 2018.

KHAN, M.T.H. e ATHER, A. (eds.) Lead Molecules from Natural Products. Artigo. Published by **Elsevier B.V. Phytochemistry** 2006. 61:181–7. Disponível em <https://europepmc.org/abstract/med/19634326>. Acesso em julho de 2018.

KONNO, Kotaro. Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. Artigo. **Phytochemistry** Volume 72, Issue 13, September 2011, Pags 1510-1530. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942211001026> Acesso em maio de 2018.

KUETE, V.; WABO, H.Q.; EYONG, K.E.; FEUSSI, M.T.; WIENCH, B.; KRUSCHE, B.; TANE, P.; FOLEFOC, G.N. e EFFERTH, T. Anticancer Activities of Six Selected Natural Compounds of Some Cameroonian Medicinal Plants. Artigo. **PLoS ONE**. August 2011, Volume 6, Issue 8, e21762. Disponível em <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal...> Acesso em julho de 2018.

LAMBERT, E.; FAIZAL, A. e GEELLEN, D. Modulation of triterpene saponin production: *in vitro* cultures, elicitation, and metabolic engineering. Artigo. **Appl biochem biotechnol**. 2011. 164(2):220-37. Doi: 10.1007/s12010-010-9129-3. Epub Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21267794> Acesso em junho de 2018

LENTA B. N., NGOUELA, S.; NOUGOUE, D. T.; TSAMO, E. e CONNOLLY, J. D. Symphonin: a new prenylated pyranoxanthone with antimicrobial activity from the seeds of *Symphonia globulifera* (Guttiferae). Artigo. **Bull. Chem. Soc. Ethiop**. 2004. 18(2), 175-180. ISSN 1011-3924 Printed in Ethiopia 2004 Chemical Society of Ethiopia.

LENTA, B. N.; VONTHRON-SÉNÉCHEAU, C.; SOH, R. F.; TANTANGMO, F.; NGOUELA, S.; KAISER, M.; TSAMO, E.; ANTON, R. e WENIGER, B. *In vitro* antiprotozoal activities and cytotoxicity of some selected Cameroonian medicinal plants. Artigo. **Journal of Ethnopharmacology** 111 (2007) 8–12. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17141994>. Acesso em junho de 2018.

LENTA, B. N.; VONTHRON-SÉNÉCHEAU, C.; WENIGER, B.; DEVKOTA, K. P.; NGOUPAYO, J.; KAISER, M.; NAZ, Q.; CHOUDHARY, M. I.; TSAMO, E. e SEWALD, N. Leishmanicidal and Cholinesterase Inhibiting Activities of Phenolic Compounds from *Allanblackia monticola* and *Symphonia globulifera*. Artigo. **Molecules**, 12, 2007. 1548-1557. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17960072> Acesso em junho de 2018.

LI, C-C.; JOSHI, A. S.; ELSOHLY, H. N.; KHAN, S. I.; JACOB, M. R.; ZHANG, Z.; KHAN, I. A.; FERREIRA, D.; WALKER, L. A.; BROEDEL JR., S. E.; RAULLI, E. E. e CIHLARO, R. L. Fatty Acid Synthase Inhibitors from Plants: Isolation, Structure Elucidation, and SAR Studies. Artigo. **National Center for Natural Products Research**, The University of Mississippi. 2002. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12502337>. Acesso em junho de 2018.

LIANG, Chengyuan; JU, Weihui; PEI, Shaomeng; TANG, Yonghong; XIAO, Yadong. Pharmacological Activities and Synthesis of Esculetin and Its Derivatives: A Mini-Review. **Molecules**. 2017 Mar; 22(3): 387. Published online 2017. Mar 2. doi: 10.3390/molecules22030387. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6155195/> . Acesso em junho de 2018.

LOPEZ, A.; HUDSON, J. B. e TOWERS, G. H. N. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. Artigo. **Journal of Ethnopharmacology** 77. 2001. Págs. 189–196 [www.elsevier.com/locate/jethpharm](http://www.elsevier.com/locate/jethpharm) Acesso em julho de 2018.

LUES, J. F. R.; THERON, M.M. Comparing organic acids and salt derivatives as antimicrobials against selected poultry-borne *Listeria monocytogenes* strains *in vitro*. Artigo. **Foodborne pathogens and disease**, v. 9, n. 12, 2012. p. 1126-1129. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23190165> Acesso em junho de 2018.

MAIA, C.; ROLÃO, N.; NUNES, M.; GONÇALVES, L. e CAMPINO, L. Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*. Artigo. **Acta Trop**. 103 (2007) 150e155. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17626776> Acesso em junho de 2018.

MARTI, G.; EPARVIER, V.; MORETTI, C.; PRADO, S.; GRELLIER, P.; HUE, N.; THOISON, O.; DELPECH, B.; GUÉRITTE F. e LITAUDON, M. Antiplasmodial benzophenone derivatives from the root barks of *Symphonia globulifera* (Clusiaceae). Artigo em Fitoquímica. **PubMed**. Março 2010 DOI:

10.1016/j.phytochem. 2010.03.008. Disponível em <https://www.researchgate.net/publication/42806090>. Acesso em junho de 2018.

MEDEIROS, L. S. **Estudo químico e biológico de microorganismos endofíticos associados às frutas banana, pera e goiaba.** Tese. São Carlos, SP, 2010. Disponível em [bdtd.ibict.br/vufind/Record/SCAR\\_8b9d03c46867bd1e3d3f1d6014ffdb0b](http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/SCAR_8b9d03c46867bd1e3d3f1d6014ffdb0b) Acesso em junho de 2018.

MILLER, L.M.; LAMPE, J.W.; NEWTON, K.M.; GUNDERSEN, G.; FULLER, S.; REED, S.D. E FRANKENFELD, C.L. Being overweight or obese is associated with harboring a gut microbial community not capable of metabolizing the soy isoflavone daidzein to O-desmethylangolensin in peri- and post-menopausal women. Artigo. **Maturitas** 99, 2017. 37–42. doi: 10.1016/j.maturitas.2017.02.006 Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28364866>. Acesso em maio de 2019.

MKOUNGA, P. F. T.; MEYER, Z.; BODO, M. e NKENGFACK, A. Globulixanthone F, a New Polyoxygenated Xanthone with an Isoprenoid group and two Antimicrobial Biflavonoids from the Stem Bark of *Symphonia globulifera*. Artigo. **Natural product communications**. 4. 2009. 803-8. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19634326> . Acesso em julho de 2018.

NDINGA, A. M. E. **Inventaire et analyse chimique. Des exsudats des plantes d'utilisation courante. Au congo-brazzaville.** Tese. Université Marien Ngouabu. Laboratoire d'Etude des Techniques et d'Instruments d'Analyse Moléculaire (LETIAM) 2015. Disponível em <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01269459/document> Acesso em julho de 2018.

NGOUELA, S.; LENTA, B. N.; NOUNGOUE, D. T.; NGOUPAYO, J.; BOYOM, F. F.; TSAMO, E.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; CONNOLLY, J. D. Antiplasmodial and antioxidant activities of constituents of the seed shells of *Symphonia globulifera* Linn f. Artigo. **Phytochemistry** 2006, 67, 302-306. Disponível em <https://www.researchgate.net/.../7402984> Acesso em junho de 2018.

NILUBOL, N.; ZHANG, L.; SHEN, M.; ZHANG, Y.Q.; HE, M.; AUSTIN, C P. e KEBEBEW, E. Four clinically utilized drugs were identified and validated for treatment of adrenocortical cancer using quantitative high-throughput screening. Artigo. **J. Transl. Med.** 10 (2012) 198. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3493320/> Acesso em junho de 2018

NKENGFACK, A. E.; MKOUNGA, P.; MEYER, M.; FOMUM, Z. T. e BODO B. (2002) Globulixanthenes C, D and E: three prenylated xanthenes with antimicrobial properties from the root bark of *Symphonia globulifera*. Artigo. **Phytochemistry**. 2002 Sep;61(2):181-7. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12169313> Acesso em junho de 2018.

NKENGFACK, A. E.; MKOUNGA, P.; FOMUM, Z. T.; MEYER, M. e BODO, B. Globulixanthenes A and B, Two New Cytotoxic Xanthenes with Isoprenoid Groups from the Root Bark of *Symphonia globulifera*. Artigo. American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy. **J. Nat. Prod.** 2002, 65, 734-736. Disponível em <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np010478w> Acesso em junho de 2018.

NOGUEIRA, S. F.; BAYMA-SILVA, G.; MATEUS, G. P.; VICTORIA, D. C.; ANDRADE, R. G. e DEMARCHI, J. J. A. A. Avaliação do modelo de mistura espectral com múltiplos componentes (mesma) na discriminação de diferentes condições de cobertura em pastagens. **Anais XVII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto – SBSR**, João Pessoa-PB, Brasil, 25 a 29 de abril de 2015, INPE. Disponível em [www.geodegrade.cnpm.embrapa.br/artigo-tecnico-cientifico/-/asset\\_publisher/bX0Fgzw44i1h/document/id/69087;jsessionid=3A2D4F0B482CAB35E18CDA34FB99F4AE?](http://www.geodegrade.cnpm.embrapa.br/artigo-tecnico-cientifico/-/asset_publisher/bX0Fgzw44i1h/document/id/69087;jsessionid=3A2D4F0B482CAB35E18CDA34FB99F4AE?) Acesso em junho de 2018.

OLIVEIRA, A. A.; SEGOVIA, J. F. O.; SOUSA, V. Y. K.; MATA, E. C. G.; GONÇALVES, M. C. A.; BEZERRA, R. M.; JUNIOR, P. O. e KANZAKI, L. I. B. Antimicrobial activity of amazonian medicinal plants. Artigo. **Springerplus** 2013, 2:371 <http://www.springerplus.com/content/2/1/371> Acesso em julho de 2018.

PAN, H.; WANG, B-H.; LV, W.; JIANG, Y. E HE L. **Esculetin induces apoptosis in human gastric cancer cells through a cyclophilin D-mediated mitochondrial permeability transition pore**

**associated with ROS.** Artigo. **Chemico-Biological Interactions.** Volume 242, 5 de dezembro 2015, Pages 51-60. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279715300685>. Acesso em maio de 2019.

PEREIRA, B. A. S. **Leishmania (Leishmania) amazonensis: participação de fatores do hospedeiro e do parasito no curso da infecção experimental em camundongos.** Tese de doutorado. Arca Repositório Institucional da Fiocruz. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Oswaldo Cruz. 2017. Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Disponível em <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/4112> Acesso em junho de 2018.

PESCE, Celestino. **Oleaginosas da Amazônia.** 2 ed., rev. e atual. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi; Brasília: Ministério do Desenvolvimento Agrário, 2009. 334 p.: il. ISBN 978-85-61377-06-9 (MPEG) e 978-85-60548-39-2 (MDA).

POCAI, E. A.; FROZZA, L.; HEADLEY, A. S. e GRAÇA, D. L. Visceral Leishmaniasis (kala-azar): five cases in dogs in Santa Maria, Rio Grande do Sul, South Brazil. Artigo. **Cienc. Rural** vol. 28 no. 3 Santa Maria July/Sept. 1998. Versão on-line ISSN 1678-4596 Disponível em [www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84781998000300025](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84781998000300025) Acesso em junho de 2018.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D.M.; JESÚS, M. N. e MARZAL, P. C. Antimony agents used in the treatment of leishmaniasis: state of the art. Artigo. **Quím. Nova** [online]. 2003, vol.26, n.4, pp.550-555. ISSN 0100-4042.

REY, L. **Leishmaníases cutâneas e mucocutâneas do Novo Mundo.** Bases da Parasitologia Médica. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 62. 2010.

RODRIGUES, P. A. **Avaliação de extratos vegetais bioativos de plantas amazônicas sobre a concentração de testosterona sérica em camundongos pós púberes.** Dissertação. Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP. São Paulo, 2013. Disponível em [https://www.unip.br/presencial/ensino/POS.../medvet\\_paulaandreottirodrigues.pdf](https://www.unip.br/presencial/ensino/POS.../medvet_paulaandreottirodrigues.pdf) Acesso em junho de 2018.

RODRIGUES, V. E. G. e CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. Artigo. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.1, p.102-123, 2001.

SANTOS, F. A.; FROTA, J. T.; ARRUDA, B. R.; MELO, T. S.; SILVA, A. A. D. C. A.; BRITO, G. A. D. C.; CHAVES, M. H. e RAO, V. S. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. Artigo. **Lipids Health Dis.** 2012;11:98. doi: 10.1186/1476-511X-11-98. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3484111/> Acesso em junho de 2018

SILVA, E. M. **Caracterização farmacognóstica, físico-química e microbiológica das folhas de anani (Symphonia globulifera linn. f, clusiaceae).** Dissertação. Universidade Federal do Pará. Instituto de Ciências da Saúde. Belém – PA 2011. Disponível em Biblioteca Brasileira de Teses e Dissertações. Disponível em [http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UFPA\\_5944a403376cf63ae962f2c064676b05](http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UFPA_5944a403376cf63ae962f2c064676b05) Acesso em junho de 2018.

SILVA, K. L. **Contribuição ao conhecimento químico de espécies do gênero Protium (Protium hebetatum Daly e Protium leptostachyum Cuatrec.) Burseraceae.** Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Acre. 222f. Rio Branco, AC. 2016.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**, 7th ed.; John Wiley and Sons: Hoboken, NJ, 2005.

SUFFREDINI, I. B.; PACIENCIA, M. L. B.; DÍAZ, I. E. C.; FRANA, S. E. e BERNARDI, M. M. Mice Behavioral Phenotype Changes after Administration of Anani (*Symphonia globulifera*, Clusiaceae), an Alternative Latin American and African Medicine. Artigo. **Journal of Natural Products.** Pharmacognosy

Mag. 2017 Oct-Dec; 13(52): 617–626. Published online 2017 Nov 13. DOI: 10.4103/pm.pm\_168\_17. Disponível em <https://europepmc.org/search?query=Mice%20Behavioral%20Phenotype> Acesso em julho de 2018.

SYAFNI, N.; PUTRA, D. P. e ARBAIN, D. **4-dihydroxybenzoic acid and 3,4-dihydroxybenzaldehyde from the fern trichomanes chinense I.; isolation, antimicrobial and antioxidant properties.** Tese. Faculty of Pharmacy/Sumatran, Biota Laboratory. Indo. J. Chem., 2012, 12 (3), 273 – 278. Disponível em [library.umsida.ac.id/katalog.php?opo=lihatDetilKatalog&id...](http://library.umsida.ac.id/katalog.php?opo=lihatDetilKatalog&id...) Acesso em abril de 2019.

TAMAI, W.; WATANABE, N.; SOMEYA, M.; KONDOH, H.; OMURA, S.; LING, Z.P.; CHANG, R.; MING, C. W. New hepatoprotective triterpenes from *Canarium album*. **P. Med.**, v.55, p.44-47, 1989.

THOMPSON, A.; KWAK, S.; JIN, Y-S. Squalene Production using *Saccharomyces cerevisiae*. **i-ACES** Vol. 1 No. 1 (2014). Disponível em <https://ugresearchjournals.illinois.edu/index.php/iaces/article/view/50/32> . Acesso em maio de 2019.

WHO – World Health Organization. Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva: **WHO Press**, 2010. Disponível em <https://www.who.int/iris/handle/10665/44412> Acesso em junho de 2018

WHO -2011 World Health Organization – **The world medicines situation 2011. Traditional medicines: global situation, issues and challenges.** Geneva. 12p. Disponível em: [http://www.who.int/medicines/areas/policy/world\\_medicines\\_ation/WMS\\_ch18\\_wTraditionalMed.pdf](http://www.who.int/medicines/areas/policy/world_medicines_ation/WMS_ch18_wTraditionalMed.pdf). 2.

WHO Library **Cataloguing-in-Publication Data World health statistics 2014.** Disponível em [apps.who.int/iris/bitstream/10665/112738/1/9789240692671\\_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112738/1/9789240692671_eng.pdf) Acessado em junho de 2018.

WOLOSİK, K; KNAS, M.; ZALEWSKA, A.; NICZYPORUK, M.; PRZYSTUPA, A. W. The importance and perspective of plant-based squalene in cosmetology. **J. Cosmet. Sci.**,64, 19-65 Qantary. Fevereiro, 2013.