



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

Isolamento de substâncias ativas, atividade antimalárica *in vitro* e antioxidante da
Bertholletia excelsa Bonpl. (castanha-do-Brasil)

DIANA MARUJA SANGAMA MOZOMBITE

MANAUS

2020

DIANA MARUJA SANGAMA MOZOMBITE

Isolamento de substâncias ativas, atividade antimalárica *in vitro* e antioxidante da
Bertholletia excelsa Bonpl. (castanha-do-Brasil)

Tese apresentada ao Programa Multi-
Institucional de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal do
Amazonas, como requisito para obtenção do
título de Doutor em Biotecnologia, área de
concentração saúde.

Orientador: Dr. Adrian Martin Pohlit

Co-orientador: Dr. Felipe Moura Araujo da Silva

MANAUS

2020

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M939i Mozombite, Diana Maruja Sangama
Isolamento de substâncias ativas, atividade antimalárica in vitro e antioxidante da *Bertholletia excelsa* Bonpl. (castanha-do-Brasil). / Diana Maruja Sangama Mozombite . 2020
159 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Adrian Martin Pohlit
Coorientador: Felipe Moura Araujo da Silva
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. castanha-do-Brasil. 2. *Bertholletia excelsa* Bonpl.. 3. ácido elágico. 4. *P. falciparum*. I. Pohlit, Adrian Martin. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

DIANA MARUJA SANGAMA MOZOMBITE

**Isolamento de substâncias ativas, atividade antimalárica *in vitro* e antioxidante da
Bertholletia excelsa Bonpl. (castanha-do-Brasil)**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração saúde. Aprovada em 02 de outubro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof Dr. Adrian Martin Pohlit – Presidente
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Profª Drª. Cecília Verónica Nunez
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Profª Drª. Stéfanie Costa Pinto Lopes
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – FIOCRUZ

Profª Drª. Rosemary Aparecida Roque
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Profª Drª. Nádia Cristina Falcão Bucker
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA



Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

ATA DA 260ª DEFESA DE TESE PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Aos 02 dias do mês de outubro de 2020, às 09 h, a banca examinadora composta pelos docentes Prof(a). Dr(a). Adrian Martin Pohlit (Presidente), Prof(a). Dr(a). Cecília Verônica Nunez (Membro), Prof(a). Dr(a). Stefanie Costa Pinto Lopes (Membro), Prof(a). Dr(a). Rosemary Aparecida Roque (Membro) e Prof(a). Dr(a). Nádia Cristina Falcão Bucker (Membro), assim designados pela Portaria 029/PPGBIOTEC de 17/09/2020, se reuniu para avaliar a apresentação e defesa de tese do(a) discente DIANA MARUJA SANGAMA MOZOMBITE, com trabalho intitulado "Isolamento de substâncias ativas, atividade antimalárica *in vitro* e antioxidante da *Bertholletia excelsa* Bonpl. (castanha-do-Brasil)". O coordenador do PPGBIOTEC, Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade, fez a abertura da sessão, quando relatou que o(a) discente cumpriu todos os pré-requisitos necessários para a apresentação e defesa de sua tese de doutorado. Informou que o(a) discente dispõe de 30 a 60 minutos para concluir a sua apresentação e que em seguida terá início a arguição, sendo de até 30 minutos para cada membro da banca, com igual tempo para o(a) discente fazer as suas considerações. Ao término da arguição, cada membro da banca examinadora fará o seu julgamento, em sessão secreta, atribuindo ao(a) discente o conceito APROVADO ou REPROVADO. O(A) discente será considerado APROVADO se receber este parecer pela maioria dos membros da banca examinadora. O coordenador finalizou o seu pronunciamento de abertura informando que a aprovação na defesa de tese é um pré-requisito para a obtenção do título de Doutor(a) em Biotecnologia e, que somente após a entrega da versão final da tese defendida, lhe será concedido o título de Doutor(a) em Biotecnologia. O coordenador delegou então a coordenação das atividades ao(a) presidente da banca examinadora, Prof(a). Dr(a). Adrian Martin Pohlit, que conduziu as atividades. A apresentação, a arguição e a defesa foram realizadas de modo remoto utilizando a ferramenta para conferência web: <https://meet.google.com/>. Após a arguição e deliberação a banca examinadora emitiu os seguintes pareceres:

Examinador(a)	Aprovado(a)	Reprovado(a)
Prof(a). Dr(a). Adrian Martin Pohlit (Presidente)	X	
Prof(a). Dr(a). Cecília Verônica Nunez (Membro)	X	
Prof(a). Dr(a). Stefanie Costa Pinto Lopes	X	
Prof(a). Dr(a). Rosemary Aparecida Roque	X	
Prof(a). Dr(a). Nádia Cristina Falcão Bucker	X	
Parecer Final	X	

Nada mais havendo a tratar, eu, Adrian Martin Pohlit, dei por encerrada a reunião e lavrei a presente ata que segue assinada por mim, pelos demais membros da banca examinadora e pelo coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

09/11/2020

SEI/UFAM - 0327664 - Ata

em Manaus, 02 de outubro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por Edmar Vaz de Andrade, Coordenador, em 02/10/2020, às 14:20, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539 de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Adrian Martin Pohlit, Usuário Externo, em 02/10/2020, às 21:11, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539 de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Cecília Veronica Nunez, Usuário Externo, em 03/11/2020, às 18:20, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539 de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Stefanie Costa Pinto Lopes, Usuário Externo, em 04/11/2020, às 10:19, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539 de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Nádia Cristina Falcão Bucker, Usuário Externo, em 06/11/2020, às 15:15, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539 de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Rosemary Aparecida Roque, Usuário Externo, em 08/11/2020, às 17:01, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539 de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufam.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0 informando o código verificador 0327664 e o código CRC 5AD73338.

Avenida General Rodrigo Octávio, 6200 - Bairro Coroado I Campus Universitário Senador Arthur Virgílio Filho, Setor Sul, Bloco 1, ICB, 3º andar - Telefone: (92) 3305-1181 / Ramal 2380
CEP 69080-900, Manaus/AM, ppgbiotec@ufam.edu.br

Referência: Processo nº 23105.033819/2020-32

SEI nº 0327664

Dedico este trabalho àqueles que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la, Arturo e Maruja, meus pais (in memoriam), com todo meu amor e gratidão.

Agradecimentos

A Deus, pela vida e pela força para enfrentar os desafios.

À minha família, em especial a minhas irmãs e sobrinhos pela cumplicidade, amor, carinho e apoio dedicado, e que a pesar da distância sempre ficaram na torcida pelo meu sucesso.

Ao meu Orientador Dr. Adrian Martin Pohlit, pelos ensinamentos e por todo apoio e oportunidade de crescimento profissional. Obrigada pela paciência, confiança e constante incentivo.

Ao meu co-orientador Dr. Felipe Moura Araujo da Silva, pela amizade e conhecimento transmitido durante esta caminhada.

Ao Dr. Sergio Vergueiro e a todos os funcionários da Agropecuária Aruanã, pelo auxílio na obtenção das amostras, pelo suporte logístico e pelo acolhimento nas dependências da Fazenda Aruanã.

Aos professores do Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC) e à Universidade Federal do Amazonas (UFAM) pelos conhecimentos adquiridos.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pelo suporte necessário oferecido para realização do projeto.

Ao Dr. Emerson Lima e ao doutorando Leonard Rosales, pelas análises de DPPH.

Aos órgãos de fomento, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo financiamento.

A todos os integrantes da Central Analítica e Temática de Química e Produtos Naturais, em especial ao grande amigo Magno Perea, por sua dedicação, capacidade e apoio em todo momento.

A toda equipe do Laboratório de Malária e Dengue, em especial a minhas grandes amigas Jaqueline Siqueira, Laís Garcia e Marlene Camargo, pela dedicação e boa vontade sempre.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM) no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), por discutir bastante Química e Quimiometria comigo, pelo inestimável auxílio e convívio no laboratório: Edizon Lopes, Marlene Camargo, Bruna de Oliveira, Tiago Barbosa, Paula Suellen, Rita Cynara, Berna Almeida, Henrique Alves, Claudia Moraes, Djalma Pereira, Abrãao Alexandre, Andreia Montoia, Yara Lins e Renan Feitosa. Sucesso a todos nós.

Aos meus amigos Carlos Demeterco, Otávio Giatti, Diego Meneghelli, Alina Celarié, Maryori Medina, Tomás Escobar, Astrid Pérez, Cleiry Simone, Max Reginaldo, Antonio Lisboa, Margarita Almansa, Marden Espinoza, Angela Scaramuzza, Emilia Villalba, Bruna Barbosa, Sandra Hernandez e Galileu Dantas, alguns de perto e outros de longe, obrigada pela torcida e por estarem comigo nos momentos lindos e complicados. Amo vocês.

A Sirley Almeida e Mayte Fachin por me incentivarem a fazer o doutorado em Manaus e por estarem abertas a conversar comigo sobre ciência e muitas outras coisas mais, obrigada por acreditarem em mim.

Enfim, a todos que colaboraram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

Obrigada por tudo!

"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos"
– Marie Curie.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar a composição química e avaliar a atividade antiplasmódica *in vitro* de extratos e substâncias de *Bertholletia excelsa*, através de estudo bioguiado. Resíduos de raiz, casca de raiz, casca do caule e entrecasca desta espécie foram coletados, provenientes da Fazenda Aruanã em Itacoatiara-AM. Os extratos foram preparados com base em um planejamento experimental de misturas do tipo simplex-centroide, com três componentes diferentes (Grupo 1: hexano, diclorometano e acetato de etila, e grupo 2: acetona, etanol e água). Realizou-se um estudo quimiométrico, baseado em dados de espectrometria de massas desses extratos, onde os dados obtidos foram tratados e interpretados no programa Chemoface. A análise foi realizada por parte da planta, a fim de identificar extratos com componentes com *m/z* associados à atividade antiplasmódica. Os extratos foram testados para atividade antimalárica *in vitro* frente à cepa K1 de *P. falciparum* inicialmente por *screening* (triagem) inicial em duas concentrações (50 e 5 µg/mL). Dos quarenta e um (41) extratos que foram priorizados para determinação de concentração inibitória de 50% (CI₅₀), nas concentrações de 100 a 1,56 µg/mL, quatro (4) dos extratos da raiz foram parcialmente ativos (10,3 – 12,3 µg/mL) e trinta e sete (37) foram considerados ativos (1,7 – 8,2 µg/mL), destacando-se o extrato obtido da entrecasca da *B. excelsa* na mistura acetona/etanol/água (E56) como o mais ativo (1,7 µg/mL). Os dados quimiométricos foram trabalhados para encontrar uma relação entre os extratos ativos e o perfil químico, notando-se a presença de três (3) picos principais: 301; 447; 469 nos extratos ativos. Estes resultados ao serem correlacionados com atividade e rendimento dos extratos ajudou a definir a escolha do extrato E56 para separação por CLAE, então uma nova extração em maior escala foi realizada. A fração metanólica do E57, obtida por coluna de EFS (extração em fase sólida), foi analisada por CLAE, resultando na coleta de 6 substâncias. A identificação/caracterização das substâncias obtidas foi realizada por meio das análises dos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C (mono e bidimensionais) e EMAR, conforme as características estruturais, observando-se que os sinais característicos correspondem a ácido elágico e derivados (ácido valoneico dilactona, ácido elágico hexosídeo, ácido elágico pentosídeo, eschweilenol C e ácido metil-elágico ramnopiranosídeo), apresentando atividade antiplasmódica (IC₅₀ = 2,08 – 9,47 µM) e antioxidante (IC₅₀ = 15,58 – 35,47 µM) importantes. O fracionamento bioguiado se mostrou eficiente no isolamento de substâncias com atividade antiplasmodial *in vitro*.

Palavras-Chaves: castanha-do-Brasil, *Bertholletia excelsa* Bonpl., ácido elágico, *P. falciparum*.

ABSTRACT

This work aimed to study the chemical composition and evaluate the *in vitro* antiplasmodic activity of extracts and substances from *Bertholletia excelsa*, through bioguided study. Root residues, root bark, stem bark and bark of this species were collected, from Fazenda Aruanã in Itacoatiara – AM. The extracts were prepared based on an experimental design of mixtures of the simplex-centroid type, with three different components (Group 1: hexane, dichloromethane and ethyl acetate, and group 2: acetone, ethanol and water). A chemometric study was carried out, based on mass spectrometry data of these extracts, where the obtained data were treated and interpreted in the Chemoface program. The analysis was carried out by the plant, in order to identify extracts with components with *m/z* associated with antiplasmodic activity. The extracts were tested for antimalarial activity *in vitro* against the *P. falciparum* K1 strain initially by initial screening in two concentrations (50 and 5 µg/mL). Of the forty-one (41) extracts that were prioritized to determine the 50% inhibitory concentration (IC₅₀), in the concentrations of 100 to 1.56 µg/mL, four (4) of the root extracts were partially active (10.3 - 12.3 µg/mL) and thirty-seven (37) were considered active (1.7 - 8.2 µg/mL), highlighting the extract obtained from the *B. excelsa* bark in the acetone/ethanol/water mixture (E56) as the most active (1.7 µg/mL). The chemometric data were worked to find a relationship between the active extracts and the chemical profile, noting the presence of three (3) main peaks: 301; 447; 469 in active extracts. These results, when correlated with activity and yield of the extracts, helped to define the choice of extract E56 for separation by HPLC, so a new extraction on a larger scale was performed. The methanolic fraction of E57, obtained by column solid phase extraction, was analyzed by HPLC, resulting in the collection of 6 substances. The identification/characterization of the substances obtained was carried out by analyzing the ¹H and ¹³C NMR spectra (mono and two-dimensional) and LC-MS, according to the structural characteristics, observing that the characteristic signs correspond to ellagic acid and derivatives (valoneic acid dilactone, ellagic acid hexoside, ellagic acid pentoside, eschweilenol C and methyl ellagic acid ramnopyranoside), with antiplasmodic activity (IC₅₀ = 2.08 - 9.47 µM) and antioxidant (IC₅₀ = 15.58 - 35.47 µM) important. Bioguided fractionation proved to be efficient in the isolation of substances with antiplasmodial activity *in vitro*.

Keywords: Brazil nut, *Bertholletia excelsa* Bonpl., Ellagic acid, *P. falciparum*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa do Brasil que destaca as áreas de risco para malária, de acordo com os diferentes níveis de incidência parasitária anual (IPA) em 2018.....	22
Figura 2. Esquema do ciclo evolutivo do <i>Plasmodium</i> no homem.....	24
Figura 3. Antimaláricos naturais de plantas usadas tradicionalmente.....	25
Figura 4. Antimaláricos sintéticos inspirados na quinina.....	26
Figura 5. Antimaláricos sintéticos inspirados na artemisinina.....	27
Figura 6. Estruturas de alguns triterpenos encontrados em <i>B. excelsa</i>	37
Figura 7. Estruturas de alguns esteroides encontrados em <i>B. excelsa</i>	37
Figura 8. Estruturas de alguns tocoferóis encontrados em <i>B. excelsa</i>	38
Figura 9. Estruturas de alguns ácidos fenólicos, flavonoides e derivados encontradas em <i>B. excelsa</i>	39
Figura 10. Estrutura do ácido digálico.....	41
Figura 11. Biossíntese do ácido gálico.....	42
Figura 12. Biossíntese do ácido elágico.....	44
Figura 13. Estrutura dos derivados de ácido elágico (AE).....	47
Figura 14. Derivados do AE metabolizado pela microbiota intestinal, as urolitinas.....	48
Figura 15. Planejamento experimental do tipo simplex-centróide com três componentes /solventes.....	55
Figura 16. Dendrograma de AAH da entrecasca de <i>B. excelsa</i>	69
Figura 17. Gráfico de <i>score</i> de ACP (A) e <i>biplot</i> (B) para os dados da entrecasca de <i>B. excelsa</i>	70
Figura 18. Dendrograma de AAH da casca da raiz de <i>B. excelsa</i>	71
Figura 19. Gráfico de <i>score</i> de ACP (A) e <i>biplot</i> (B) para os dados da casca da raiz de <i>B. excelsa</i>	71
Figura 20. Dendrograma de AAH da casca do caule de <i>B. excelsa</i>	72
Figura 21. Gráfico de <i>score</i> de ACP (A) e <i>biplot</i> (B) para os dados da casca do caule de <i>B. excelsa</i>	72
Figura 22. Dendrograma de AAH da raiz de <i>B. excelsa</i>	73

Figura 23. Gráfico de <i>score</i> de ACP (A) e <i>biplot</i> (B) para os dados da raiz de <i>B. excelsa</i>	74
Figura 24. Cromatograma com os picos correspondentes às substâncias obtidas da fração metanólica (E57B) em CLAE semi-preparativo.....	76
Figura 25. Estrutura proposta para E57B-1.....	78
Figura 26: Algumas correlações de HSQC (azul) e HMBC (vermelho) da substância E57B-1 (ácido valoneico dilactona, 47)	80
Figura 27. Estrutura proposta para E57B-2.....	81
Figura 28. Estrutura proposta para E57B-3.....	82
Figura 29: Algumas correlações no HSQC (azul) e HMBC (vermelho) da substância E57B-3 (ácido elágico pentosídeo, 49).....	85
Figura 30. Estrutura proposta para E57B-4.....	86
Figura 31: Algumas correlações no HSQC (azul) e HMBC (vermelho) da substância E57B-4 (Eschweilenol C, 50).....	89
Figura 32. Estrutura proposta para E57B-5.....	91
Figura 33: Algumas correlações no HSQC (azul) e HMBC (vermelho) da substância E57B-5 (ácido elágico, 23).....	93
Figura 34. Estrutura proposta para E57B-6.....	95
Figura 35: Algumas correlações no HSQC (azul) e HMBC (vermelho) da substância E57B-6 (ácido metil elágico ramnospiranosídeo, 51).....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Usos tradicionais da <i>B. excelsa</i>	34
Tabela 2. Atividade antiplasmódica de <i>B. excelsa</i> . 500 mg/kg.....	35
Tabela 3. Micromoléculas encontradas em <i>B. excelsa</i>	36
Tabela 4. Composições das misturas extratoras e rendimento das extrações por parte da planta (Grupo 1).....	63
Tabela 5. Composições das misturas extratoras e rendimento das extrações por parte da planta (Grupo 2).....	64
Tabela 6. Atividade antiplasmodica <i>in vitro</i> dos extratos de <i>B. excelsa</i> em duas concentrações, CI ₅₀ e classificação de atividade.....	67
Tabela 7. Extratos de <i>B. excelsa</i> mais ativos <i>in vitro</i> contra <i>P. falciparum</i> e seus (m/z) associados e teores extrativos.....	75
Tabela 8. Massa das subfrações obtidas por CLAE semi-preparativo.....	76
Tabela 9. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C, HSQC e HMBC da substância E57B-1, comparadas com a literatura para ácido valoneico dilactona.....	79
Tabela 10. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C, HSQC e HMBC da substância E57B-3 comparadas com a literatura para ácido elágico pentosídeo.....	84
Tabela 11. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C, HSQC e HMBC da substância E57B-4 comparadas com a literatura para eschweilenol C.....	88
Tabela 12. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C, da substância E57B-5 comparadas com a literatura para ácido elágico.....	92
Tabela 13. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C, HSQC e HMBC da substância E57B-6 comparadas com a literatura para ácido metil-elágico ramnopiranosídeo.....	96
Tabela 14. Atividade antioxidante e antimalárica contra <i>Plasmodium falciparum</i> de substâncias isoladas de <i>B. excelsa</i>	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1D	unidimensional
2D	bidimensional
AAH	Análise de agrupamentos hierárquicos
ACP	Análise de componentes principais
AE	Ácido elágico
APCI	Ionização química à pressão atmosférica
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL-EM	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
COSY	Correlação homonuclear (^1H - ^1H)
DMSO	Dimetilssulfóxido
EFS	Extração em fase sólida
EM	Espectrometria de massas
EMAR	Espectrometria de massas de alta resolução
IES	<i>Ionização por electrospray</i>
HMBC	Correlação heteronuclear de múltiplas ligações
HSQC	Correlação heteronuclear de quantum-simples
OMS	Organização Mundial da Saúde
RMN	Ressonância magnética nuclear
TMS	Tetrametilsilano
UDPGlc	Uridina difosfogluose
UV	Ultravioleta
COSAS	Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
UFAM	Universidade Federal do Amazonas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1. Malária no mundo e no Brasil	21
2.2. Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i>	23
2.3. Tratamento e Resistência aos antimaláricos.....	25
2.4. Família Lecythidaceae.....	29
2.4.1 Etnobotânica da família Lecythidaceae.....	30
2.4.2. Fitoquímica da família Lecythidaceae.....	32
2.5. Castanha-do-Brasil (<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K.)	33
2.5.1. Usos tradicionais de <i>B. excelsa</i>	34
2.5.2. Atividade biológica de <i>B. excelsa</i>	35
2.5.3. Composição química da <i>B. excelsa</i>	36
2.6. Substâncias fenólicas.....	40
2.6.1. Ácido elágico (AE).....	41
2.6.2. Atividade biológica do AE	45
2.7. Quimiometria.....	49
3. OBJETIVOS.....	51
3.1. Objetivo geral	51
3.2. Objetivos específicos.....	51
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	52
4.1. MATERIAIS	52
4.1.1. Equipamentos	52
4.1.2. Solventes e reveladores	52
4.2. MÉTODOS.....	53
4.2.1. Análises cromatográficas.....	53
4.2.1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	53
4.2.2. Métodos espectroscópicos/espectrométricos.....	53
4.2.2.1. Ressonância magnética nuclear (RMN)	53
4.2.2.2. Espectrometria de massas (EM)	54
4.2.3. Coleta e identificação do material botânico	54
4.2.4. Secagem e moagem do material vegetal	55
4.2.5. Planejamento experimental de misturas	55

4.2.6. Preparação de extratos para estudos quimiométrico e biológico.....	56
4.2.6.1. Preparo dos extratos em escala analítica	56
4.2.6.2. Análise dos extratos por EM e tratamento quimiométrico dos dados	56
4.2.6.3. Preparo dos extratos em maior escala	57
4.2.6.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	58
4.2.7. ENSAIOS BIOLÓGICOS	58
4.2.7.1. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Plasmodium falciparum</i>	58
4.2.7.2. Microteste de suscetibilidade <i>in vitro</i>	59
4.2.7.3. Determinação do fator antioxidante mediante a reação com DPPH	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	61
5.1. Resultado do teste antiplasmódico <i>in vitro</i> dos extratos	65
5.2. Perfil químico dos extratos por EM e tratamento quimiométrico dos dados	68
5.3. Análises químicas e fracionamento do extrato	75
5.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	75
5.5. Identificação das substâncias obtidas	77
5.5.1. Identificação estrutural da amostra E57B-1	77
5.5.2. Identificação estrutural da amostra E57B-2	81
5.5.3. Identificação estrutural da amostra E57B-3	82
5.5.4. Identificação estrutural da amostra E57B-4	86
5.5.5. Identificação estrutural da amostra E57B-5	91
5.5.6. Identificação estrutural da amostra E57B-6	94
5.6. Resultado do teste antioxidante e antiplasmódico <i>in vitro</i> das substâncias.....	99
6. CONCLUSÃO.....	103
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

1. INTRODUÇÃO

No contexto das endemias mundiais, o flagelo da malária continua a matar mais de 400.000 pessoas a cada ano, se posicionando como uma das doenças infecto-parasitárias com maiores taxas de morbidade e mortalidade, atingindo mais fortemente mulheres grávidas e causando a morte de uma criança menor de cinco anos, a cada dois minutos. De acordo com os dados recolhidos do último relatório mundial da malária, em 2018 houve um número estimado de 228 milhões de casos e 405.000 mortes em todo o mundo. Isso representa cerca de 3 milhões a menos de casos e 11.000 a menos de mortes em comparação com 2017 (OMS, 2018; OMS, 2019). Apesar da redução no número de casos de malária dos últimos anos, e embora a maior incidência da doença seja no continente africano, a disseminação da doença é uma realidade preocupante pelo possível surgimento de parasitos resistentes às drogas já disponíveis no mercado.

Na ausência de uma vacina efetiva contra a malária, a farmacoterapia é, atualmente, uma arma capaz de auxiliar no controle e combate a essa enfermidade. Os antimaláricos naturais, quinina e artemisinina, que deram origem aos antimaláricos quinolínicos e derivados da artemisinina, foram isolados das espécies vegetais *Cinchona officinalis* e *Artemisia annua*, respectivamente (KLAYMAN, 1985; CECHINEL & YUNES, 1998). No entanto, a resistência de *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* a estas e outras drogas, constitui um grave problema para a saúde pública e afeta negativamente os esforços para controlar esta doença (POHLIT *et al.*, 2013).

Na África, 80% da população faz uso da medicina tradicional como primeiro tratamento para a malária. Estudos indicam o uso de mais de 1.200 espécies de plantas ao redor do mundo para o tratamento da malária e das febres que ela causa (WILLCOX *et al.*, 2004; DEHARO & GINSBURG, 2011). Estudos etnobotânicos como fonte de busca são mais eficientes na descrição e descoberta de plantas com potencial terapêutico do que a busca aleatória (BRANDÃO *et al.*, 1992; ELISABETSKY, 2005). Ainda no caso das populações amazônicas, o difícil acesso ao tratamento, complica o uso adequado desses fármacos, e o uso de plantas e frutos com objetivos medicinais, baseado no conhecimento tradicional, é

uma realidade frequente que, desde antepassados indígenas, usavam as riquezas naturais da floresta no combate de diversas afecções (MARTINS, 2013).

Em meio a esta grande diversidade de etnoespécies regionais de uso conhecido na medicina tradicional no tratamento da malária, encontra-se a castanheira (*Bertholletia excelsa*) (OLIVEIRA *et al.*, 2015). A castanheira é uma espécie de grande importância socioeconômica para a Amazônia, fonte de bioprodutos de importância econômica internacional, como as amêndoas conhecidas mundialmente por seu alto valor nutritivo, ricas em lipídeos, proteínas, fibras e sais minerais (YANG, 2009). Entre as comunidades tradicionais é conhecido seu uso no tratamento de moléstias do fígado, hepatite e malária. A casca, a entrecasca, e as amêndoas desta espécie são utilizadas na preparação de chás para o tratamento de malária e outras enfermidades (BRANDÃO *et al.*, 1992; COELHO-FERREIRA, 2009; TOMCHINSKY, 2014; FRAUSIN *et al.*, 2015).

As técnicas instrumentais, principalmente nas áreas da espectrometria de massas e cromatografia (CHIARADIA *et al.*, 2008), têm surgido como uma excelente ferramenta para o estudo do metabolismo secundário de plantas, fornecendo uma alternativa rápida e eficiente frente às estratégias clássicas envolvidas no estudo de produtos naturais.

Uma alternativa para a obtenção de novas substâncias biologicamente ativas a partir de extratos naturais complexos é o desenvolvimento de estudo bioguiado. Neste contexto, o presente trabalho realizou o estudo químico e biológico a partir de resíduos da espécie *B. excelsa* em abordagens diferenciadas envolvendo planejamento de misturas do solvente extrator, instrumentação analítica e ferramentas quimiométricas visando o isolamento de novas substâncias ativas com potencial antimalárico *in vitro* contra *Plasmodium falciparum*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Malária no mundo e no Brasil

A malária, popularmente conhecida como paludismo ou febre intermitente, é uma doença infecciosa parasitária, transmitida por mosquitos do gênero *Anopheles* e provocada por protozoários do gênero *Plasmodium*. Apresenta grande morbidade, sendo considerado um dos mais graves problemas de saúde pública do mundo. Esta parasitose acomete milhões de pessoas nas áreas tropicais e subtropicais do planeta, e continua sendo de considerável impacto econômico no Brasil e no mundo. De acordo com o último Relatório Mundial da Malária, não houve ganhos globais na diminuição de novas infecções por malária de 2014 a 2018. Em 2018 foram registrados 228 milhões casos de malária e 405.000 mortes no mundo, e praticamente não houve redução nos óbitos por malária em 2018 quando comparado ao ano anterior, onde se registraram 231 milhões de casos e 416.000 mortes (OMS, 2018; OMS, 2019). Aproximadamente metade da população mundial está em risco de contraí-la, principalmente aqueles que vivem em países de baixa renda. Nas Américas, a transmissão permanece endêmica em 19 países e territórios, entre eles o Brasil. Por isso, diversas localidades brasileiras têm utilizado estratégias eficazes para eliminar a doença.

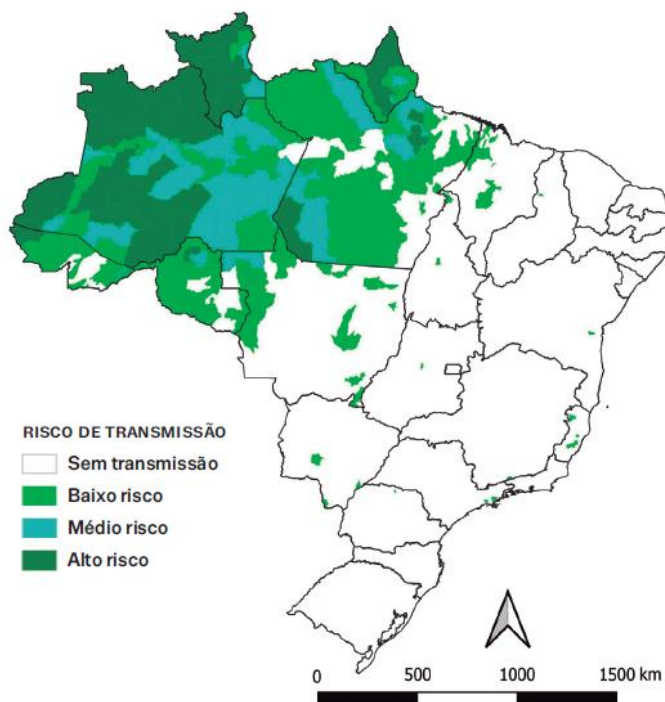
No mundo todo, 38 países e territórios já foram declarados livres da malária, sendo 17 deles localizados na Região das Américas. Em 2018 o Paraguai recebeu o certificado de país livre da malária. Em maio de 2019, a Argentina foi oficialmente reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como livre da malária. A certificação é concedida quando um país prova que interrompeu a transmissão autóctone da doença por pelo menos três anos consecutivos. El Salvador completou três anos sem transmissão local e provavelmente será certificado como livre de malária este ano. Belize também não teve transmissão local em 2019, colocando-se no caminho da certificação livre de malária em 2022 (OMS, 2018; OMS, 2019).

No Brasil, a transmissão de malária ocorre predominantemente na região Amazônica (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins) abarcando no total 808 municípios. A distribuição espacial do risco de transmissão da doença

no Brasil, baseando-se nos registros do ano de 2018, quando foram notificados cerca de 190 mil casos, é apresentada na Figura 1. A transmissão geralmente ocorre em áreas rurais, em comunidades ribeirinhas, assentamentos, áreas indígenas e garimpos, mas também são registrados casos em áreas urbanas e periurbanas.

Na região extra-Amazônica, constituída pelos demais estados brasileiros e o Distrito Federal, mais de 80% dos casos notificados são importados de áreas endêmicas ou de outros países endêmicos, como os do continente africano. Do total de casos registrados no país em 2019, 89% destes foram por *P. vivax*, sendo a espécie mais prevalente no Brasil. Dados do Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária (PNCM), da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS), apontam uma queda na frequência de casos de malária a partir de 2010 até 2016 (BRASIL, 2019).

Figura 1. Mapa do Brasil que destaca as áreas de risco para malária, de acordo com os diferentes níveis de incidência parasitária anual (IPA) em 2018 (BRASIL, 2020).



Fonte: Sinan e Sivep-Malária (SVS/MS).

Em 2017, foi registrado um aumento de aproximadamente 50,4% nos casos em relação ao ano de 2016. Em 2018, houve um aumento expressivo dos casos na região extra-Amazônica (44,2%), enquanto a região Amazônica foi registrada uma redução menor que 1%. Dados preliminares de 2019 demonstram que foram registrados 155.638 casos no país, com redução de 27,1% (535) no número de casos na região extra-Amazônica e 20,0% (155.103) na região Amazônica, em relação ao ano de 2018 (BRASIL, 2019).

No entanto, os desafios nas Américas incluem um aumento na transmissão relacionada aos movimentos da população vulnerável entre e dentro dos países, bem como o enfraquecimento das ações dos programas de malária que podem piorar no contexto da COVID-19. A OPAS e a OMS instam os países a garantir a continuidade dos serviços de malária no contexto da pandemia, desde que sejam seguidas as melhores práticas para proteger os trabalhadores e as comunidades de saúde, para que sejam mantidos os progressos já atingidos na luta global contra a malária.

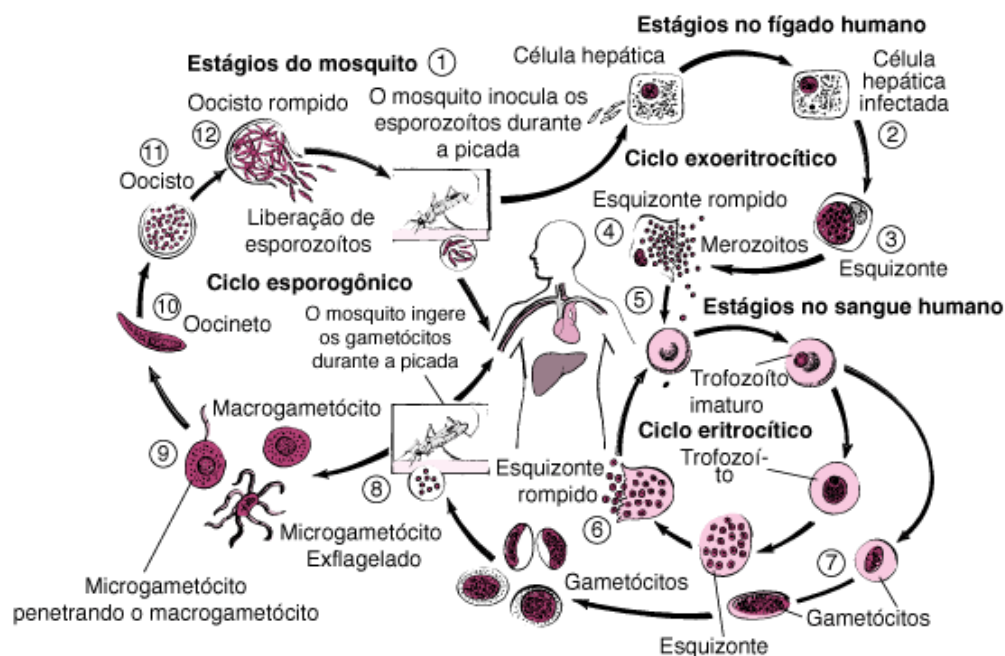
2.2. Ciclo biológico do *Plasmodium*

A malária é uma doença infecciosa cujo agente etiológico são protozoários do gênero *Plasmodium*. As espécies associadas à malária humana são: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. cynomolgy* e *P. ovale* (curtisi e wallikeri). Plasmódios que infectam macacos também podem causar doença em seres humanos, como o *P. knowlesi* e o *P. simium*, sendo este último já detectado no Brasil. Nunca foi registrada, no Brasil, transmissão autóctone de *P. ovale*, espécie restrita a determinadas regiões da África. A transmissão natural da malária ocorre por meio da picada de fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Anopheles*, sendo mais importante no País a espécie *Anopheles darlingi*, cujos criadouros preferenciais são coleções de água limpa, quente, sombreada e de baixo fluxo, muito frequentes na Amazônia brasileira (COX-SINGH *et al.*, 2008; SHARMA & KHANDURI, 2009; OMS, 2019; BRASIL, 2020).

A infecção inicia-se quando os esporozoítos são inoculados pelo vetor, os quais invadem as células do fígado, os hepatócitos (Figura 2). Nessas células, multiplicam-se e dão origem a milhares de novos parasitas (merozoítos), que rompem os hepatócitos e, entrando na circulação sanguínea, invadem as hemácias, dando início à segunda fase do ciclo, chamada

de esquizogonia sanguínea. É nessa fase sanguínea que aparecem os sintomas da malária. O desenvolvimento do parasita nas células do fígado requer aproximadamente uma semana para o *P. falciparum* e *P. vivax* e cerca de duas semanas para o *P. malariae*. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, alguns parasitas se desenvolvem rapidamente, enquanto outros ficam em estado de latência no hepatócito. São, por isso, denominados hipnozoítos (do grego *hipnos*, sono). Esses hipnozoítos são responsáveis pelas recaídas da doença, que ocorrem após períodos variáveis de incubação (geralmente dentro de seis meses) (COWMAN *et al.*, 2016; YANG & BODDEY, 2017; BRASIL, 2020). Na fase sanguínea do ciclo, os merozoítos formados rompem a hemácia e invadem outras, dando início a ciclos repetitivos de multiplicação eritrocitária. Os ciclos eritrocitários repetem-se a cada 48 horas nas infecções por *P. vivax* e *P. falciparum* e a cada 72 horas nas infecções por *P. malariae*. Depois de algumas gerações de merozoítos nas hemácias, alguns se diferenciam em formas sexuais: os macrogametas (feminino) e microgametas (masculino). Esses gametas no interior das hemácias (gametócitos) não se dividem e, quando ingeridos pelos insetos vetores, irão fecundar-se para dar origem ao ciclo sexuado do parasito (COWMAN *et al.*, 2016; YANG & BODDEY, 2017; BRASIL, 2020).

Figura 2. Esquema do ciclo evolutivo do *Plasmodium* no homem (FRANÇA, et al., 2008).

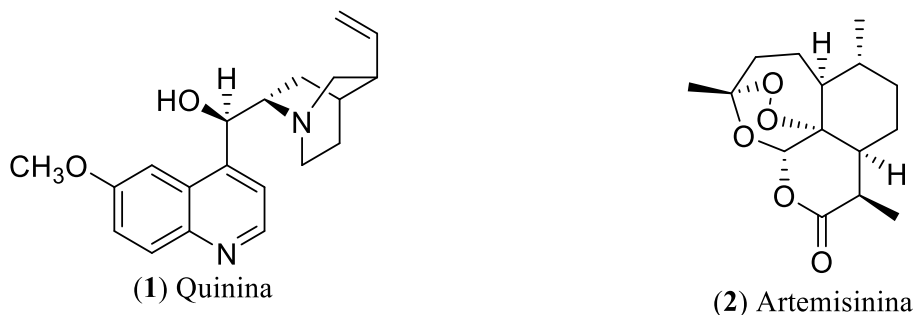


2.3. Tratamento e resistência aos antimaláricos

Como ainda não existe uma vacina para prevenção da malária, seu tratamento e profilaxia são feitos por meio de drogas antimaláricas. Entretanto, um dos maiores desafios no controle da doença é o desenvolvimento da resistência pelo *Plasmodium* às diferentes classes de drogas disponíveis para o tratamento (Moorthy *et al.*, 2004; Polley *et al.*, 2004).

A primeira droga antimalárica a ser usada foi a quinina (1) (Figura 3), alcaloide indólico monoterpênico do grupo das aminoquinolinas (França *et al.*, 2008). A quinina foi isolada em 1820, da casca de *Cinchona officinalis*, planta tradicionalmente utilizada na prevenção e tratamento da malária desde o século XVII, quando espanhóis observaram, no Peru, que o uso costumeiro da planta pelas populações locais mostrava-se efetivo no combate à doença. Em 1972 foi isolado o sesquiterpeno artemisinina (2) (Figura 3), que é obtido a partir da planta *Artemisia annua*. Essa planta já era usada na China há cerca de 2000 anos como febrífugo (Vale *et al.*, 2005).

Figura 3. Antimaláricos naturais de plantas usadas tradicionalmente

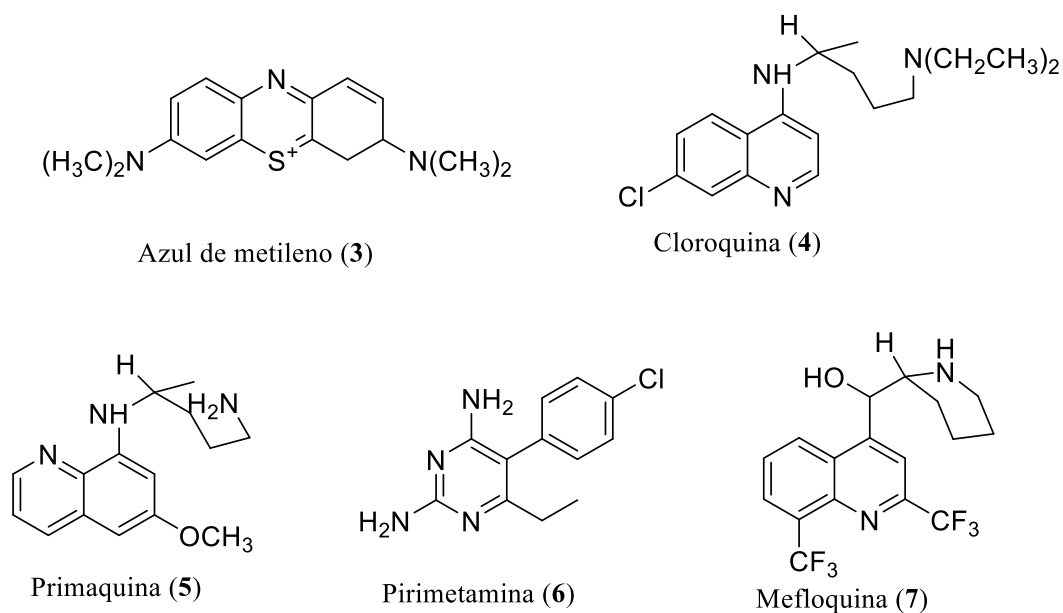


Com o tempo, os pesquisadores passaram a testar novas fórmulas, e dentre esses novos fármacos, e partindo de noções sobre a estrutura molecular da quinina, foram desenvolvidas novas drogas antimaláricas sintéticas, como o azul de metileno (3), (Figura 4) no final do século XIX que surgiu como o primeiro antimalárico sintético (OLIVEIRA & FRANÇA, 2011). Em 1934, o químico alemão Hans Andersag desenvolveu e patenteou, a molécula conhecida como resochin e um derivado que chamou de sontochin. Suas estruturas químicas tinham uma base comum a 4-amino-quinolina, apontada como responsável pela ação terapêutica na fase esquizonte do plasmódio (ROSENTHAL, 2001). Durante a Segunda

Guerra Mundial, a molécula sintética resochin ganhou outro nome, cloroquina (4), (Figura 4), e foi testada clinicamente pelos americanos em 1946. No mesmo período, outra substância marcou fortemente a história dos medicamentos antimalariais: a primaquina (5), (Figura 4), desenvolvida por pesquisadores norte-americanos. A cloroquina foi amplamente utilizada durante os anos 1950 em todo o mundo, na campanha da Erradicação da Malária empregada pela OMS (HAY *et al.*, 2004), sendo uma das substâncias antimaláricas mais utilizadas para a supressão e profilaxia da malária em muitas regiões endêmicas (GREGSON & PLOWE, 2005).

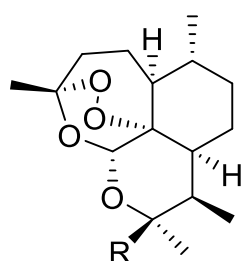
A primeira menção sobre a resistência à quinina surgiu em 1910 na revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Neiva, 1910), enquanto a resistência à cloroquina começou a ser relatada na Ásia nos anos 1950 (HARINASUTA *et al.*, 1965). Nas décadas seguintes, estes relatos se estenderam aos continentes Africano e Americano (AMBROISE-THOMAS & ROSSIGNOL, 1986; MOORE & LANIER, 1961). A partir da década de 1960, com os primeiros relatos de recidivas, foram sintetizadas a pirimetamina (6) e mefloquina, (7) (Figura 4), dentre outras (VALE *et al.*, 2005; MANZALI, 2011). Nos anos 1980, a mefloquina passou a ser utilizada para o tratamento da malária, mas semelhante às outras drogas, a resistência apareceu rapidamente (SEVERINI & MENEGON, 2015).

Figura 4. Antimaláricos sintéticos inspirados na quinina.



Os derivados semissintéticos da artemisinina, surgiram com o propósito de melhorar a eficiência e solubilidade, tais como artesunato (**8**), artemeter (**9**), diidroartemisinina (**10**), arte-éter (**11**) e o ácido artelínico (**12**) (Figura 5) (FRANCO *et al.*, 2009). O tratamento baseado em terapias combinadas de artemisinina (TCA), especificamente a combinação de mefloquina com artemeter, começou a ser usado nos anos 1990 (LOOAREESUWAN *et al.*, 1992) e teve grande impacto na redução dos casos de *P. falciparum* (NOSTEN *et al.*, 2000; PRICE *et al.*, 1996).

Figura 5. Antimaláricos sintéticos inspirados na artemisinina.



- (**8**) R= O₂CCH₂CH₂CO₂Na; Artesunato
- (**9**) R=OCH₃; Artemeter
- (**10**) R=OH; Diidroartemisinina
- (**11**) R=OCH₂CH₃; Arte-éter
- (**12**) R= *p*-CH₃O-Φ-CO₂⁻; Ácido artelínico

No Brasil, vários estudos já relataram resistência de *P. falciparum* à cloroquina, sulfadoxina-pirimetamina, mefloquina, quinina e amodiaquina (DE SOUZA, 1992; DE SOUZA, 1983; NORONHA *et al.*, 2000; ZALIS *et al.*, 1998). No final da década de 1980 registraram-se níveis tão elevados quanto 90 e 100% de falha no tratamento com sulfadoxina-pirimetamina e cloroquina, respectivamente (DE SOUZA, 1992; ZALIS *et al.*, 1998). O primeiro relato de resistência de *P. vivax* à cloroquina surgiu no final dos anos 1990 na Indonésia e Papua Nova Guiné (BAIRD *et al.*, 1991; RIECKMANN *et al.*, 1989). No Brasil, os primeiros casos de resistência de *P. vivax* à cloroquina e primaquina foram descritos na década de 1990 em Manaus (ALECRIM *et al.*, 1999; BRASIL *et al.*, 1999).

Por causa da resistência das monoterapias, a partir de 2006 a OMS definiu como terapêutica de primeira linha a combinação à base de artemisinina (TCA) para o tratamento malária não-complicada causada do *P. falciparum*. Desde então, esses medicamentos contribuíram substancialmente para o declínio acentuado da carga global de doenças da malária e salvaram milhões de vidas. Esses ganhos estão agora ameaçados pelo surgimento e disseminação da resistência à artemisinina no sudeste da Ásia. A resistência à artemisinina

em *P. falciparum* surgiu e se espalhou por toda a sub-região do Grande Mekong, e é caracterizada pela eliminação lenta do parasita *in vivo*, resultante da sensibilidade reduzida dos parasitas em fase de anel aos medicamentos. A perda de eficácia da artemisinina em TCAs facilitou o ressurgimento da resistência à mefloquina na fronteira Tailândia-Myanmar e contribuiu para o surgimento e disseminação da resistência à piperaquina em *P. falciparum* no Camboja e no sul do Vietnã (VAN DER PLUIJM *et al.*, 2019).

A definição do tipo de tratamento depende da espécie de *Plasmodium*, da idade do paciente, da história de exposição anterior à infecção e outras condições associadas, como gravidez, outras doenças e gravidade da doença. De acordo com os protocolos de tratamento, as drogas são associadas, sendo que para o *P. falciparum* indica-se a associação: artemeter + lumefantrina, artesunato + mefloquina, quinina + doxiciclina + primaquina. Para o *P. vivax* ou *P. ovale* indica-se a associação: cloroquina + primaquina (OMS, 2019; BRASIL, 2020). TCA's tem sido parte integrante dos notáveis sucessos no controle global da malária, e existe um amplo consenso de que proteger a eficácia dessas combinações de medicamentos é uma prioridade urgente (OMS, 2019).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) aprovou no dia 30 de outubro de 2019 o registro para o medicamento Kozenis (succinato de tafenoquina) fabricada pela farmacêutica GlaxoSmithKline (GSK). Trata-se de uma versão da primaquina, tomada em dose única, a droga age por um período superior a 20 dias, sendo que o esquema tradicional exige seguir um tratamento por até 14 dias. Ao fazer isso, o Brasil se tornou o primeiro país com malária endêmica a aprovar tafenoquina. Antes da medicação ser disponibilizada à população em geral, o Ministério da Saúde, em parceria com a MMV, conduzirá um estudo de viabilidade com o objetivo de testar a tafenoquina com o teste da enzima G6PD no cenário de vida real.

Nos últimos anos o grupo de pesquisa do Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM) no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), tem estudado a química de plantas de diversas famílias, tais como Apocynaceae, Simaroubaceae, Piperaceae, Gentianaceae e outras, com indicação popular para tratamento da malária. Muitos destes estudos químicos, conduziram ao isolamento e caracterização de diversas substâncias, algumas das quais tiveram suas atividades antimaláricas *in vitro* publicadas pelo nosso grupo

de pesquisa como 4-nerolidilcatecol (ANDRADE-NETO *et al.*, 2007), os alcalóides indólicos elipticina e aspidocarpina (ANDRADE-NETO *et al.*, 2007; HENRIQUE *et al.*, 2010), e os quassinóides isobruceína-B e neosergeolida (ANDRADE-NETO *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2009), todas consideradas ativas com concentração inibitória 50% (CI₅₀) menores que 1 µM. Também, integrantes do LAPAAM elaboraram a semi-síntese de derivados de 4-nerolidilcatecol com maior estabilidade e atividade antiplasmódica *in vitro* comparável ao 4-nerolidilcatecol (PINTO *et al.*, 2009;), alguns derivados semissintéticos da elipticina com atividade antiplasmódica *in vitro* comparável à da elipticina (MONTAIA 2013) e alguns derivados da neosergeolida e isobruceína B com reduzida atividade antiplasmódica *in vitro* (SILVA *et al.*, 2009).

Diante da urgente necessidade da descoberta e desenvolvimento de novas drogas antimaláricas, imposta pelo aumento da resistência do *Plasmodium* spp. aos antimaláricos tradicionais e do grande potencial antiplasmódico das substâncias estudadas pelo nosso grupo de pesquisa, no presente trabalho estudamos o potencial antimalárico de resíduos da castanheira, pertencente à família Lecythydaceae.

2.4. Família Lecythydaceae

A família Lecythydaceae tem distribuição pantropical e está no grupo principal das Angiospermas (plantas com flores), com cerca de 350 espécies incluídas em 24 gêneros (MORI *et al.*, 2007; MORI *et al.*, 2010a; THE PLANT LIST 2010; PRANCE & KARTAWINATA 2013; PRANCE & JONGKIND 2015), distribuídas na África (incluindo Madagascar), Ásia no sentido mais amplo, e na América do Sul e Central.

No Brasil, são registradas 119 espécies distribuídas em 14 gêneros, sendo 104 encontradas no domínio amazônico, 40 delas endêmicas do país (SOUZA & LORENZI, 2008). No bioma amazônico a presença de Lecythydaceae é indício de florestas de terras baixas preservadas ou pouco perturbadas (PRANCE & MORI, 1979), e devido à tamanha representatividade nestes ambientes, a família pode ser útil no monitoramento das alterações na composição florestal resultante de distúrbios antrópicos e mudanças climáticas (Mori *et al.* 2001). No recente “Livro Vermelho da Flora do Brasil” (Martinelli & Moraes 2013), Lecythydaceae também foi considerada uma das dez famílias botânicas de maior interesse para conservação e

pesquisa, por possuir muitas espécies com distribuição restrita e/ou pela insuficiência de dados para a classificação de vulnerabilidade da maioria das espécies da família

2.4.1 Etnobotânica da família Lecythidaceae

Da maioria das espécies desta família, são extraídas fibras longas de sua casca e usadas para ligar e transportar cargas. A madeira é comercializada e utilizada industrialmente. Suas pranchas são usadas para construção do telhado e usado também na fabricação artesanal de ornamentos e objetos de decoração. Entre as espécies mais conhecidas, pertencentes a esta família temos a *Couropita guianensis* Aubl. (abricó de macaco) de frutos não consumidos por humanos, porém servem de alimento para galinhas, porcos, patos e perus. Os frutos vazios servem para uso doméstico e o líber das fibras utilizadas como cordoalhas rústicas (MORI *et al.*, 2010).

A madeira de *Eschweilera ovata* Mart. (biriba ou embiriba) é utilizada na construção de postes, mourões, dormentes, casas rústicas, pequenos barcos, estacas marítimas e trapiches entre outros produtos (MAINIERI, 1983), sendo seu emprego relacionado às características como dureza, peso, uniformidade, resistência a fungos e durabilidade. A madeira apresenta ainda excelente sonoridade, ressonância e operacionalidade, sendo por isso empregada na confecção do arco do berimbau (BONARTES *et al.*, 1998).

Espécies de diversos gêneros tais como *Bertholletia*, *Couropita*, *Eschweilera*, *Grias* e *Gustavia* têm sido utilizadas na medicina popular no tratamento da malária e outras doenças (DUKE & VASQUEZ, 1994; SANZ-BISET *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2015; TOMCHINSKY *et al.*, 2017).

Cascas e folhas de *Couropita guianensis* Aubl. têm indicações etnofarmacológicas como anti-hipertensiva, antimalárica, antitumoral, analgésica, anti-inflamatória e anti-helmíntica. A polpa do fruto é usada para tratamento de sarnas e as flores para combater o resfriado, gases intestinais e dor estomacal (REVILLA, 2002). A casca de *Cariniana rubra* Miers, é usada como anti-inflamatório em infusão e decocção (SANTOS, 2000). Os extratos do caule e cascas de *Gustavia augusta* possuem atividade anti-inflamatória, antimalárica e anti-leishmaniose (GRENAND *et al.*, 1987). A polpa do fruto de *Lecythis pisonis* é atribuída

à propriedade de reduzir os níveis de açúcar no sangue (NASCIMENTO; CONCEIÇÃO, 2011).

A madeira da *Gustavia augusta* L. pode ser usada na construção civil e marcenaria; as raízes e folhas reputadas como medicinais têm respectivamente ação laxante e descongestionante. As cascas são usadas no curtimento de couros e a polpa dos frutos, em algumas regiões, são comidas assadas ou cozidas com arroz (REYES, 2007). Nos últimos anos, alguns trabalhos relacionados à composição química de espécies do gênero *Gustavia* vem sendo desenvolvidos, devido ao seu frequente uso popular, no combate à malária e leishmaniose (extratos da casca, do caule e das folhas), atividade anti-inflamatória (extratos do caule, cascas e sementes) e um novo inibidor tumoral a gustastatina (ALMEIDA *et al.*, 2011; JARDIM; MEDEIROS, 2006). *G. augusta*, também é citada como tendo propriedades resolutive, descongestionante, laxante, emética e anti-inflamatória (extratos do caule e cascas) (SOUZA *et al.*, 2001). Entretanto, a principal atividade atribuída pelos índios da Guiana Francesa é no tratamento da leishmaniose (GRENAND, 1987).

Outro representante importante da família Lecythidaceae é *Lecythis pisonis* Cambess. (sapucaia) os frutos são utilizados como adorno, recipiente (LORENZI, 1992) e como campânulas de agogô (instrumento musical de origem africana). As sementes são comestíveis, saborosas e conforme referem Braga *et al.* (2007) medicinais, agindo de forma específica sobre o bacilo da lepra. Lorenzi (2002) informa que a madeira de *L. pisonis* é moderadamente pesada, dura e resistente, sendo utilizada para fabricação de produtos como assoalhos, caibros e ripas, esteios, vigas, pontes, mastros e dormentes, móveis, artigos domésticos decorativos, brinquedos e instrumentos musicais, construção civil e naval (BRAGA *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 1997). A sapucaia tem aproveitamento etnofarmacológico variado, sendo as cascas usadas no tratamento de diarreias, as folhas em chá ou infusão como tonicardíacas, diuréticas, em banho contra coceira e a tintura para tratar micoses. A polpa além de comestível e nutritiva é usada no tratamento do diabetes e o óleo extraído das sementes é indicado para mialgia (BRAGA *et al.*, 2007; NASCIMENTO; CONCEIÇÃO, 2011).

2.4.2. Fitoquímica da família Lecythidaceae

Os prováveis constituintes químicos relacionados às propriedades medicinais em Lecythidaceae têm incentivado a pesquisa de constituintes e da atividade farmacológica das mesmas. Os metabólitos encontrados e identificados com maior frequência em espécies de esta família, são os triterpenos, saponinas, esteroides, tocoferóis, ácidos fenólicos, flavonoides e derivados, sequiterpenos, norisoprenoides, derivados de ácido graxos, cumarinas, xantonas e depsídeos (MAHATO & DUTTA, 1972; BILLET & HEITZ, 1974; BARUA *et al.*, 1976; PETTIT *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2011).

Em espécies de *Gustavia* foram identificados triterpenos pentacíclicos, saponinas, ácido elágico e alcalóides do tipo indolo [2,1-quinazolínicos, depsídeo gustastatina e o ácido betulínico (ALMEIDA *et al.*, 2011; BERGMLAN, 1995; COSTA; CARVALHO, 2003; EL-SEEDI *et al.*, 1999; PETTIR *et al.*, 2004; OLIVEIRA, 2010).

Na casca de *C. guianensis* Aubl. foram isolados α -amirina, β -amirina, β -sitosterol, taninos (ROW; SANTRY; SURYNAYANA *et al.*, 1966) e cetosteróide (ANJANEYULU, 1998). Óleos voláteis, oriundos das flores apresentaram eugenol, linalool e (E,E)-farnesol (WONG; TIE, 1995; ANDRADE *et al.*, 2000), Em folhas, se caracterizou ésteres triterpenoídicos de ácidos graxos como o palmitato de β -amirina (EKNAT; SHIVCHANDRAJI, 2002), e em frutos se caracterizou constituintes indólicos (SEN *et al.*, 1974; BERGMAN *et al.*, 1995). Em sementes, se demonstrou a presença de ácidos graxos, tocoferóis, esteróides, açúcares e ácidos aminados (ANDRADE *et al.*, 2000).

G. augusta figura como uma das espécies mais importantes da família, por sua composição química, rica em triterpenos pentacíclicos, esteróides, saponinas, cromonóis, ácido elágico e alcalóide do tipo indolo [2,1- β] quinozonílicos (CARVALHO *et al.*, 1998; PANT; RASTOGI, 1979). De acordo com Souza *et al.*, (2001), o extrato etanólico da casca do caule de *G. augusta* apresenta uma esterona, dois esteróis e oito triterpenos pentacíclicos. Esteronas são raras em plantas, nunca foram isoladas antes de Lecythidaceae e a ocorrência em *G. augusta* pode justificar a ação anti-inflamatória dos extratos da planta. Outras substâncias de ocorrência rara em plantas como a taraxerona, espinasterol, taraxerol e ácido betulínico foram identificadas pela primeira vez em Lecythidaceae, na espécie *G. augusta*.

A análise de sementes de sapucaia provenientes de diferentes regiões brasileiras apresenta elevado teor de óleo com ácidos graxos poli-insaturados; proteínas, fibras e minerais, com baixo teor de sódio, o que favorece o sistema cardiovascular (DENADAI, 2007; SOUZA *et al.*, 2008). Do extrato etanólico das folhas de *L. pisonis*, foram isolados sete triterpenos: α -e β amirina, uvaol, eritrodiol, os ácidos ursólico e oleanólico e 3β -friedelinol (friedelan- 3β -ol), uma mistura dos esteróides sitosterol e estigmasterol e um diterpeno (E)-fitol.

Na família Lecythidaceae, várias espécies têm sido investigadas com relação à composição química das sementes, destacando-se: *L. pisonis*, *B. excelsa*, *C. guianensis* Aubl. as quais apresentam um perfil oleaginoso (63,03%; 65,94%; 33,7%, respectivamente) e uma quantidade elevada de ácidos graxos insaturados (superiores a 70%), sendo o ácido linoleico o majoritário em todas as espécies da família estudadas até o momento (NETO *et al.*, 2009; VALLILO *et al.*, 1998).

2.5. Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)

A castanha-do-Brasil (*B. excelsa*, H.B.K.), é a única espécie do gênero *Bertholletia* e é também conhecida como castanheira, castanha-verdadeira, castanha-do-pará e castanha-do-maranhão. É uma espécie arbórea, que pode atingir mais de 50 m de altura por 1 a 1,8 m de diâmetro (BONELLI *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2004), possuem tronco reto, cilíndrico e desprovido de ramos. Folhas simples, coriáceas, alternadas em formato oval e alongadas de 25 – 36 cm de comprimento. A frutificação ocorre entre 8 e 12 anos (MULLER *et al.*, 1995; LORENZI, 2002; LOCATELLI *et al.*, 2005). Os castanhais ocorrem em regiões de clima quente e úmido, em áreas de terra firme, florestas não inundadas da região amazônica na Bolívia, Brasil, Colômbia, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Suriname, Venezuela, bem como, Trindade e Tobago (MORI *et al.*, 2010a). No Brasil ocorrem nos Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia e Roraima. Suas amêndoas apresentam alto valor econômico, tornando-se uma das principais atividades econômicas de exploração extrativista na região amazônica (SMITH *et al.*, 2015).

2.5.1. Usos tradicionais de *B. excelsa*

A castanha-do-Brasil é largamente usada na culinária, consumida in natura e como ingrediente em diversos pratos (peixada, mingau, farofa, bolos, doces e sorvetes) (SOUZA, 2006). Locatelli *et al.*, (2011) relatam o uso da torta resultante da extração do óleo das amêndoas na composição de farinhas e rações. De acordo com Sousa (2006), os frutos lenhosos podem ser aproveitados no artesanato (luminárias, cinzeiros, colares), enquanto a castanha é usada em cosméticos (hidratantes, óleo e batom) e fármacos (repelentes e cicatrizantes). Esta planta tem ampla utilização na medicina popular pelas comunidades amazônicas, conforme apresentado na tabela 1. Sendo importante para este estudo o uso no tratamento da malária.

Tabela 1. Usos tradicionais da *B. excelsa*

Procedência	Parte usada	Indicações	Fonte
Pará (Comunidade Marudá)	Entrecasca; frutos	Gripe com tosse, congestão, anemia, malária , febre, hemorragia, pós-parto, hepatite, problemas das mulheres, engravidar, flatulência	Coelho-Ferreira, (2009)
Barcelos, AM.	Semente, frutos, casca e entrecasca.	Malária , hepatite, fígado e infecção.	Tomchinsky, (2014)
Manacapuru, AM	Casca do caule e fruto	Inflamação, menopausa, diarreia, diabetes antibiótico, golpe	Vásquez <i>et al.</i> (2014)
Santa Isabel do Rio Negro (mais de 20 grupos indígenas)	Casca do caule; semente	Malária , febre, limpeza do sangue, inchaço do fígado	Frausin <i>et al.</i> (2015)
Pará (comunidades quilombolas)	Casca interna da fruta	Malária , icterícia	Oliveira <i>et al.</i> (2015)

2.5.2. Atividade biológica de *B. excelsa*

Diversos estudos têm sido desenvolvidos a partir de relatos do uso da castanheira na medicina popular a fim de comprovar suas atividades biológicas, em especial, atividades antiparasitárias. Em um estudo realizado por Campos *et al.* (2005) sobre a atividade tripanocida da casca de *B. excelsa*, encontraram inibição significativa sobre as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Sousa (2013) relatou atividade antiplasmódica *in vitro* da casca e ouriço de *B. excelsa* frente à cepa 3d7 de *Plasmodium falciparum* (Tabela 2). Em outro estudo, sobre o efeito protetor de *B. excelsa* sobre camundongos infectados por *P. berghei*, Martins (2013) acompanhou dois grupos de animais infectados, detectando uma redução de 37,5% da parasitemia no grupo que recebeu solução aquosa contendo a amêndoa triturada e liofilizada em relação ao grupo sem pré-tratamento. Oliveira *et al.* (2015) relataram atividade antiplasmódica *in vitro* frente à cepa W2 de *P. falciparum*, com resultados significativos de extratos de castanha-do-Brasil.

Tabela 2. Atividade antiplasmódica de *B. excelsa*. 500 mg/kg

Partes utilizadas	Extratos e frações	CI ₅₀ <i>in vitro</i> contra <i>P. falciparum</i> (µg/mL)	% Inibição <i>P. berghei in vivo</i> 500 mg/kg/dia	Resultado	Fonte
Amêndoa <i>in natura</i>	Amêndoa liofilizada e suspensa em água		37,5	Parcialmente ativo	Martins (2013)
Casca seca	Ex. EtOH	6,0 ± 0,05	99,3	Ativo	Souza (2013)
	Fr. AcOEt	0,1 ± 0,05	88,0	Ativo	
	Fr. acetona	15 ± 0,05	-	Ativo	
Ouriço	Fr. acetona	10 ± 0,05	-	Ativo	
Casca do ouriço	EtOH	4,7 ± 0,7	-	Ativo	Oliveira <i>et al.</i> (2015)
Casca	EtOH	2,0 ± 0,0	-	Ativo	
Entrecasca	Seiva	7,5 ± 3,5	-	Ativo	

Em estudos por John & Shahidi (2010) foram identificadas e quantificadas substâncias fenólicas, como o ácido gálico (22), ácido elágico (23), ácido vanílico (24), catequina (26) e quercetina (30) na “pele marrom” da amêndoa (Tabela 3). Concluíram que a amêndoa com pele marrom, apresentou uma atividade antioxidante mais elevada que a amêndoa sem pele.

2.5.3. Composição química da *B. excelsa*

Estudos anteriores desta espécie demonstram isolamento e/ou identificação de metabólitos secundários relatados em estudos anteriores, e são apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Micromoléculas encontradas em *B. excelsa*.

Classe	Substância	Referência
Triterpenos	ácido betulínico (13) esqualeno (14)	Campos <i>et al.</i> , (2005) Yang (2009) Ryan <i>et al.</i> , (2006)
Esteroides	β -sitosterol (15) estigmasterol (16) campesterol (17) sitostanol (18)	Chunhieng <i>et al.</i> , (2008) Kornsteiner <i>et al.</i> , (2005) Ryan <i>et al.</i> , (2006)
Tocoferóis	α , β e γ -tocoferóis (19, 20, 21)	Chunhieng <i>et al.</i> , (2008)
Ácidos fenólicos, flavonoides e derivados	ácido gálico (22) ácido elágico (23) ácido vanílico (24) ácido protocatéquico (25) catequina (26) galocatequina (27) taxifolina (28) miricetina (29) quercetina (30)	Silva <i>et al.</i> , (2018) John & Shahidi (2010)

Figura 6. Estruturas de alguns triterpenos encontrados em *B. excelsa*

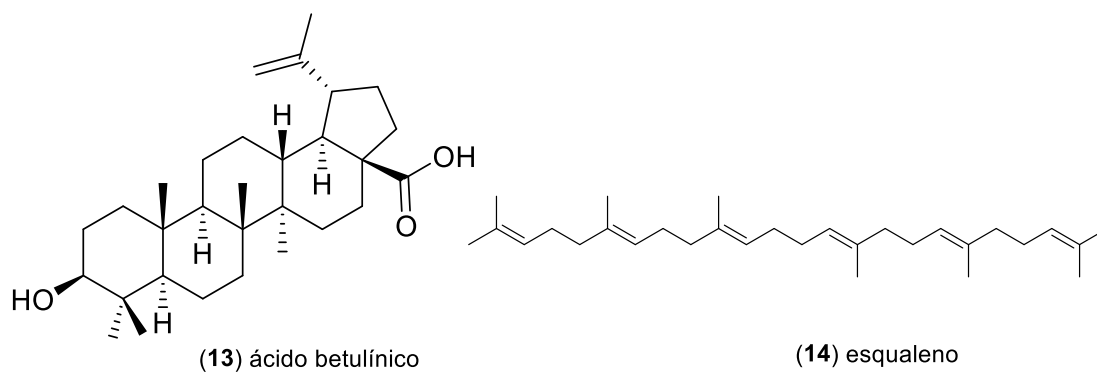


Figura 7. Estruturas de alguns esteroides encontrados em *B. excelsa*

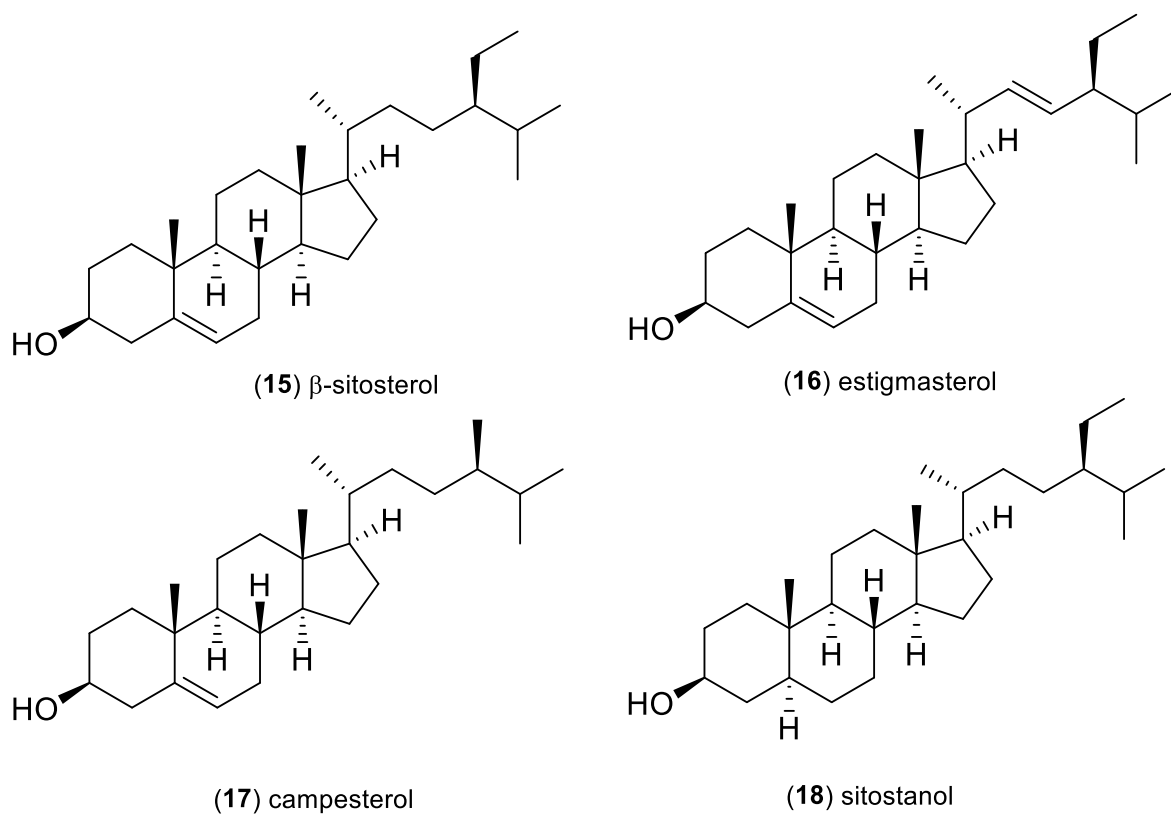


Figura 8. Estruturas de alguns tocoferóis encontrados em *B. excelsa*

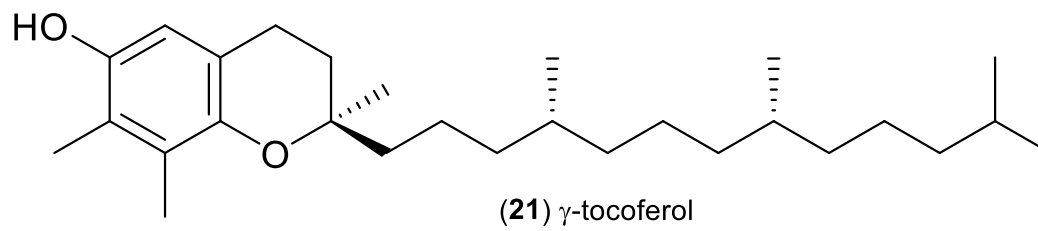
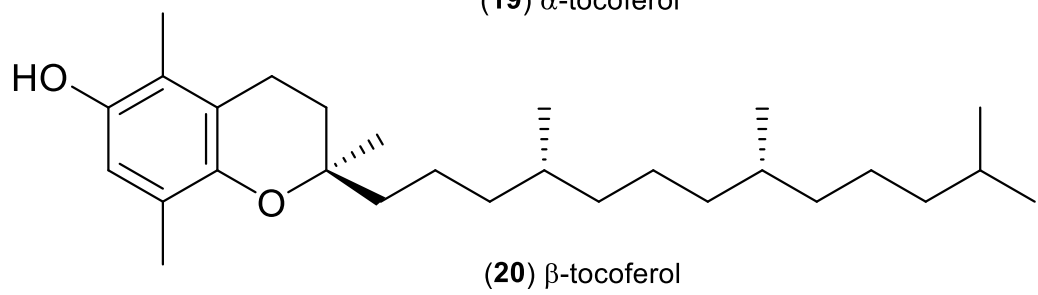
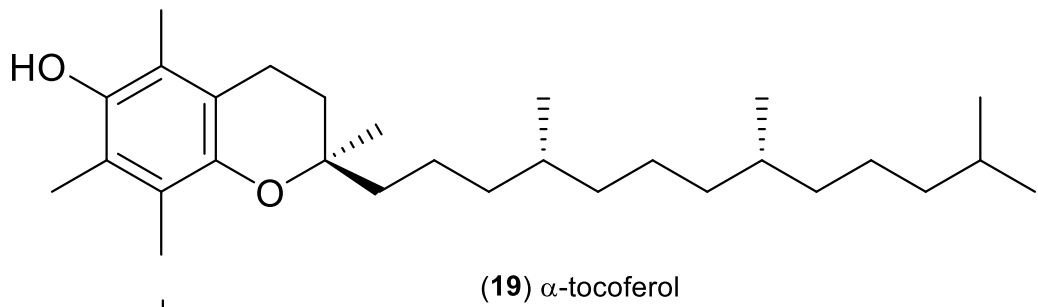
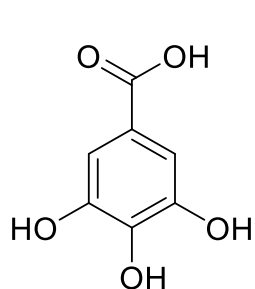
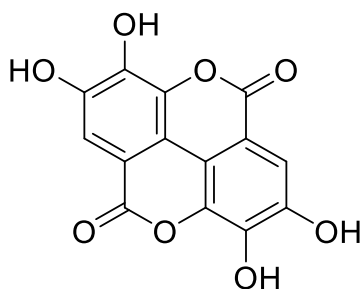


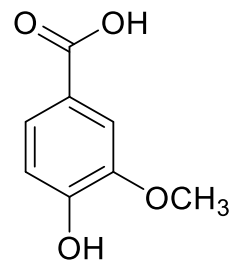
Figura 9. Estruturas de alguns ácidos fenólicos, flavonoides e derivados encontradas em *B. excelsa*



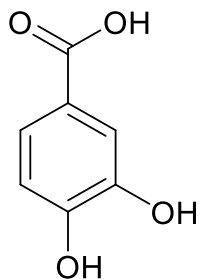
(22) ácido gálico



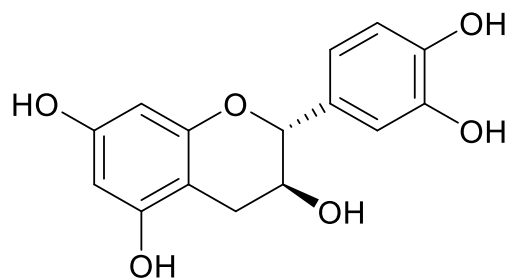
(23) ácido elágico



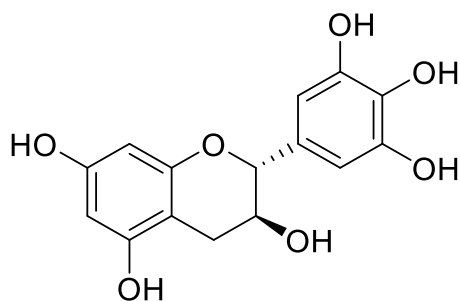
(24) ácido vanílico



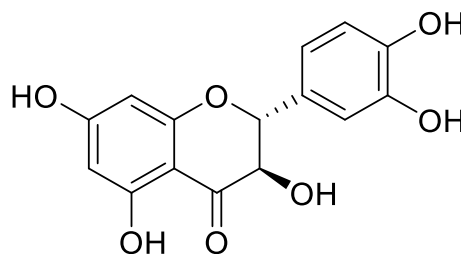
(25) ácido protocatéquico



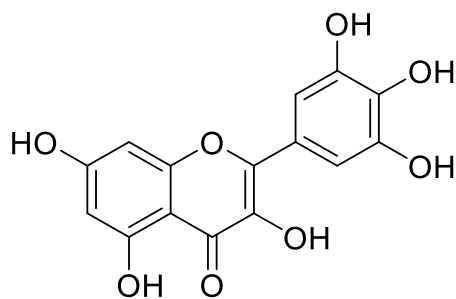
(26) catequina



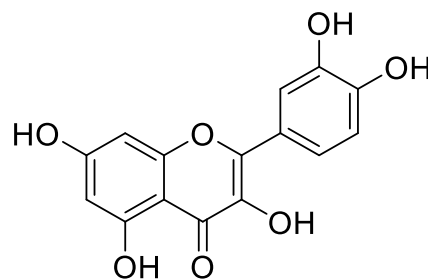
(27) galocatequina



(28) taxifolina



(29) miricetina



(30) quercetina

2.6. Substâncias fenólicas

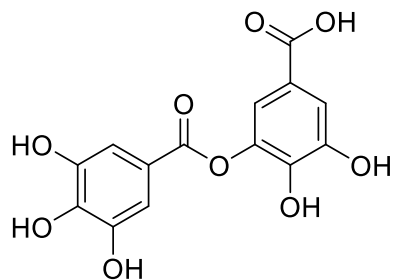
Entre as diferentes classes de substâncias bioativas, destacam-se as substâncias fenólicas. São produzidas a partir do metabolismo de plantas, o qual é dividido em primário e secundário. A presença do grupo fenol é a característica comum a todas. Entretanto, apresentam estruturas e funções diversas e dessa forma, podem ser divididos em três classes principais: flavonoides, ácidos fenólicos e taninos. Flavonoides são substâncias presentes na alimentação oferecendo muitos benefícios para a saúde humana graças a sua atividade antioxidante, antidiabética, anti-inflamatória, anti-Alzheimer, antimicrobiana entre outros (CAO *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2014; XIAO; CHEN; CAO, 2014). Os flavonoides são divididos em oito subclasses, as quais compreendem flavona, chalcona, flavonol, flavanona, flavan-3-ol, flavanonol, antocianidinas e isoflavonas (COOK & SAMMAN, 1996).

Os ácidos fenólicos podem ser divididos basicamente em derivados de ácidos benzóicos e de ácidos cinâmicos. São encontrados em frutas, vegetais, grãos, sementes e são clivados por hidrólise ácida ou alcalina e, também por ação de enzimas (TSAO, 2010). A pesar que podem ser produzidos em fungos, são amplamente mais distribuídos no reino vegetal e são importantes nas interações entre plantas e microorganismos, agindo como moléculas de sinalização e de defesa (MANDAL *et al.*, 2010).

Polifenóis constituem um dos grupos mais numerosos de metabólitos secundários de plantas, com mais de 8.000 estruturas conhecidas. Esses caracterizam-se por apresentarem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula (FERGUSON; HARRIS, 1999; DEWICK, 2009; BARBOSA, 2010; MARVALIN; AZERAD, 2011).

Algumas substâncias fenólicas não se apresentam na forma livre em tecidos vegetais, mas na forma de polímeros, como os taninos. Estes são classificados em dois grupos: taninos condensados, responsáveis pelas características normalmente atribuídas a estas substâncias, como adstringência e precipitação de proteínas; e os taninos hidrolisáveis, que são ésteres do ácido gálico (**22**) e seus dímeros ácido digálico (**31**) e ácido elágico (**23**) com monossacarídeos, principalmente a glicose (BOLWELL, 1990; HELDT, 1997; GRUNDHÖFER *et al.*, 2001).

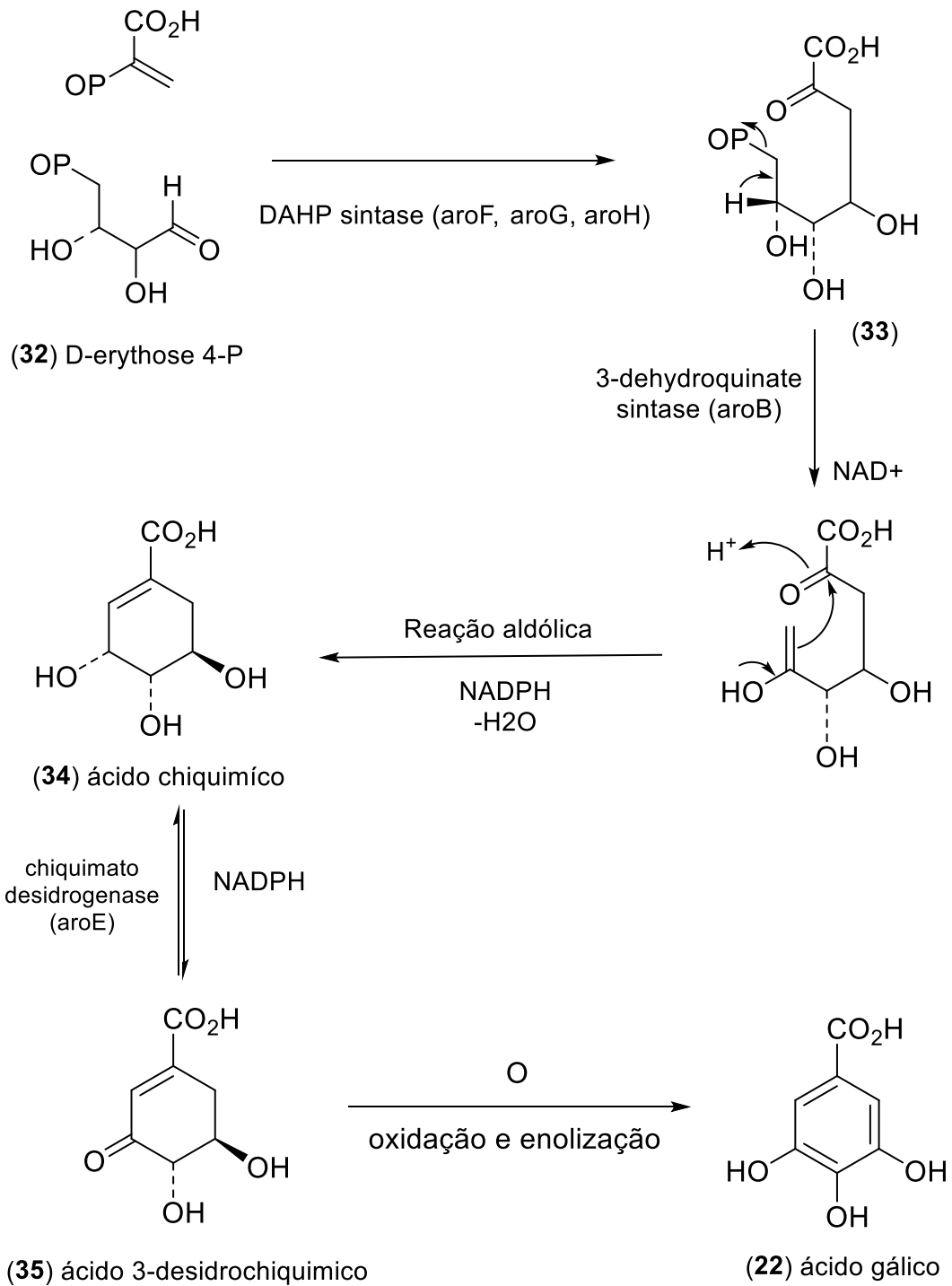
Figura 10. Estrutura do ácido digálico.



(31) ácido digálico

O ácido gálico (**22**) ou ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico é um composto orgânico, com um grupo benzênico, com três hidroxilas e uma subunidade carboxilada obtidos através de taninos hidrolisáveis, da via do ácido chiquimíco, um intermediário do metabolismo secundário das plantas e pode ser formado por reação de ramificação do ácido 3-desidroxiqumico que envolvem desidrogenação e enolização (Figura 11).

Figura 11. Biossíntese do ácido gálico.



Fonte: Adaptado de Dewick, 2009.

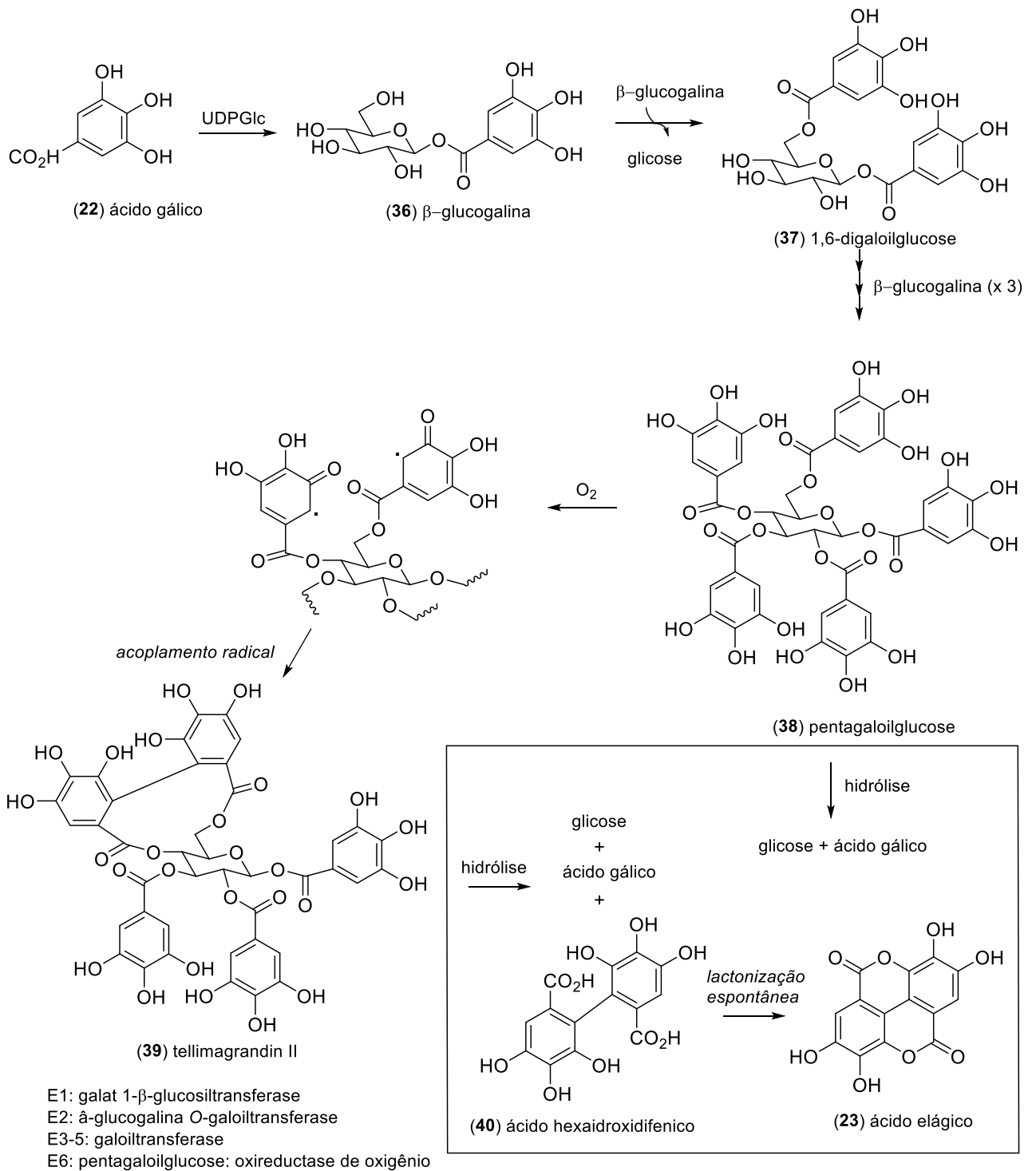
2.6.1. Ácido elágico (AE)

Os galotaninos são ésteres de ácido gálico com um poliálcool, tipicamente glicose,, pentagaloilglucose, enquanto os elagitaninos contêm uma ou mais funções de ácido hexahidroxidifênico, telimagrandina II (Figura 12). Os ésteres do ácido hexahidroxidifênico são formados por acoplamento oxidativo fenólico de funções galoíla catalisadas por uma enzima fenol oxidase do tipo lacase (Figura 12). A hidrólise química de um elagitanino leva à formação do ácido elágico dilactona.

O AE (**23**) é um polifenol natural, encontrado em muitas frutas, nozes e extratos de plantas nas formas de taninos hidrolisáveis chamados elagitaninos, tais como framboesas, morangos, uvas, romã, groselhas negras, camu-camu, manga, goiaba, nozes, amêndoas, sementes longan e chá verde (DANIEL *et al.*, 1989; VEKIARI *et al.*, 2008; TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 2014). AE está presente em plantas na forma de elagitaninos hidrolisáveis como componentes de parede e membrana de célula de plantas. Elagitaninos são ésteres de glicose com duas unidades do ácido gálico que ao hidrolisar forma AE (Figura 12) (BATE-SMITH, 1972; SANTOS-BUELGA & SCALBERT, 2000).

A estrutura molecular de AE (**23**) ou 2,3,7,8-tetrahidroxi-cromeno[5,4,3-cde]cromeno-5,10-diona tem sido determinada anteriormente na sua forma anidra, por análise difração de raios-X. A molécula de AE (**23**) compreende quatro grupos hidroxila, que apresentam uma boa funcionalidade para ligação de hidrogênio como doadores de prótons. Os dois grupos de lactona, presentes na molécula de AE (**23**), podem estar envolvidos na ligação de hidrogênio como aceptores de prótons (TÜRK *et al.*, 2010; ŻESŁAWSKA; SKÓRSKA-STANIA, 2013).

Figura 12. Biossíntese do ácido elágico.



Fonte: Adaptado Dewick, 2009.

2.6.2. Atividade biológica do ácido elágico (AE)

O interesse no AE (23) é devido principalmente às suas propriedades biológicas, sendo relatado como um potente antioxidante, com ação anticarcinogênica, agente antiproliferativo, utilizado para tratar doenças cardiovasculares, distúrbios neurológicos, diabetes e doenças inflamatórias.

Lin e colaboradores (2020) avaliaram o efeito protetor *in vitro* e *in vivo* do AE na osteoartrite. Os testes revelaram que o AE pode inibir as condições inflamatórias induzidas pela estimulação com interleucina-1 β (IL-1 β), incluindo uma redução na expressão de matriz metaloproteinase-13 (MMP-13), motivos de trombospondina 5 (ADAMTS5), ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em condrócitos de osteoartrite humana. Além disso, relataram que o AE inibiu a inflamação por IL-1 β -induzida ao suprimir o caminho do fator kappa B (NF- κ B), podendo ser uma via terapêutica válida para atenuar a progressão da osteoartrite. Eles afirmam também que o AE pode desempenhar um papel protetor na cultura celular, além de um modelo de camundongo com osteoartrite. Tomados em conjunto, esses achados indicam o potencial do AE na prevenção e tratamento da osteoartrite.

Os estudos de Abdelkader e colaboradores (2020), investigaram o efeito hepatoprotetor do AE contra a hepatotoxicidade induzida pelo ácido valpróico (AV) em ratos, tratados diariamente com AE (60 mg/kg/dia) por uma semana, seguido por via oral concomitante de AV (250 mg/kg/dia) por mais 14 dias consecutivos para induzir dano hepatocelular em ratos adultos Sprague-Dawley. O tratamento com AE atenuou significativamente a lesão hepática induzida por AV em ratos, podendo este efeito, ser atribuído a potentes atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e hepatoprotetora.

Park e colaboradores (2014) avaliaram a atividade antiviral do AE frente aos rinovírus humanos (HRV) que são responsáveis por mais da metade de todos os casos de resfriado. A taxa de inibição de pré-incubação com 50 μ g/mL de AE foi de 17%, enquanto que a presença contínua de AE durante a infecção conduziu a um aumento significativo na inibição até 70%. Estes resultados sugerem que o AE não interage com as partículas HRV e podem interagir

diretamente com as células humanas na fase precoce de infecções por HRV para proteger as células.

A atividade antioxidante do AE e seus derivados foi estudado por Nuncio-Jáuregui e colaboradores (2015) em romãs espanholas, descrevendo uma forte atividade antioxidante, corroborando com os dados de outros autores (HENNING *et al.*, 2010; CALÍN-SÁNCHEZ *et al.*, 2012; TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 2014).

Vicinanza e colaboradores (2013), compararam o efeito do AE e da urolitina A (UA) nas linhas celulares DU-145 e PC-3 (linhas celulares de câncer de próstata) e observou que o AE (15–45 μM) impediu a proliferação celular durante a fase S, em que os níveis de ciclina B1 e D1 foram reduzidos. A apoptose também foi induzida por AE em ambas as linhas celulares. Por outro lado, a UA (30–90 μM) deteve células cancerígenas durante a fase G2/M e induziu um efeito levemente apoptótico na linha celular DU-145, inibindo o complexo ciclina B1/cdc2 quinase. Curiosamente, os autores observaram que a proliferação celular foi sinergicamente reduzida em 50% a 60% quando avaliaram o efeito combinatório de AE (7,5 mM) e UA (15-180 mM) em células PC-3.

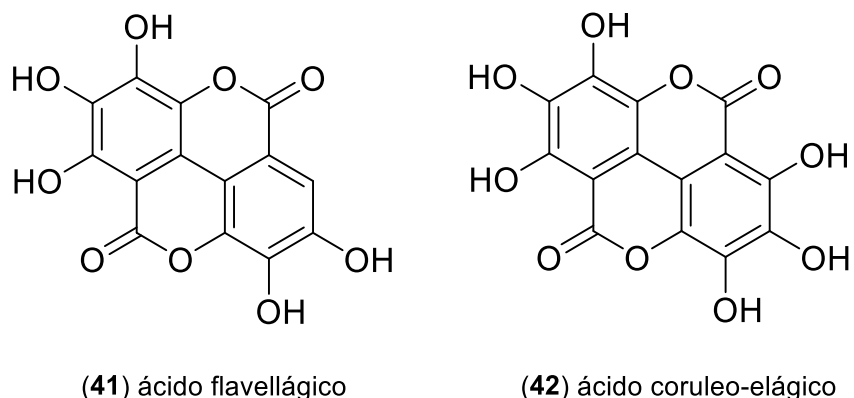
Os estudos de Kyriakis e colaboradores (2015), investigaram a atividade antidiabética do AG e AE, sendo que este último é mais potente e se liga ao sítio inibidor de glicogénio-fosforilase que adiciona um potencial forte anti-hiperglicemiante. Esse resultado pode servir como o ponto de partida para a exploração de produtos alimentares que contêm AE para utilização antidiabética e o desenvolvimento de novos alimentos e suplementos alimentares biofuncional.

Ferreres e colaboradores (2013) extraiu o AE e seus derivados da casca de *Cochlospermum angolensis* Welw. que é uma planta medicinal consumida para o tratamento de doenças hepáticas e para a profilaxia da malária. Os testes revelaram que o AE tem a capacidade de eliminação de radicais livres mais forte do que a do ácido ascórbico. A sua atividade antidepressiva foi também muito forte.

Derivados do AE foram avaliados por Sturm e colaboradores (2009), onde sintetizaram ácido flavellágico (**41**) e o ácido coruleo-elágico (**42**) a partir do AE (Figura 13) a fim de aumentar a atividade do AE. O ácido flavellágico mostrou CI_{50} entre 94 e 186 nM, já o ácido coruleo-elágico apresentou CI_{50} entre 42 e 116 nM frente as cepas 3D7, HB3, Dd2 e K1 de

P. falciparum, que, em comparação com a atividade do AE (CI₅₀ entre 351 e 1325 nM), mostraram atividade antiplasmodial melhorada.

Figura 13. Estrutura dos derivados de ácido elágico (AE)

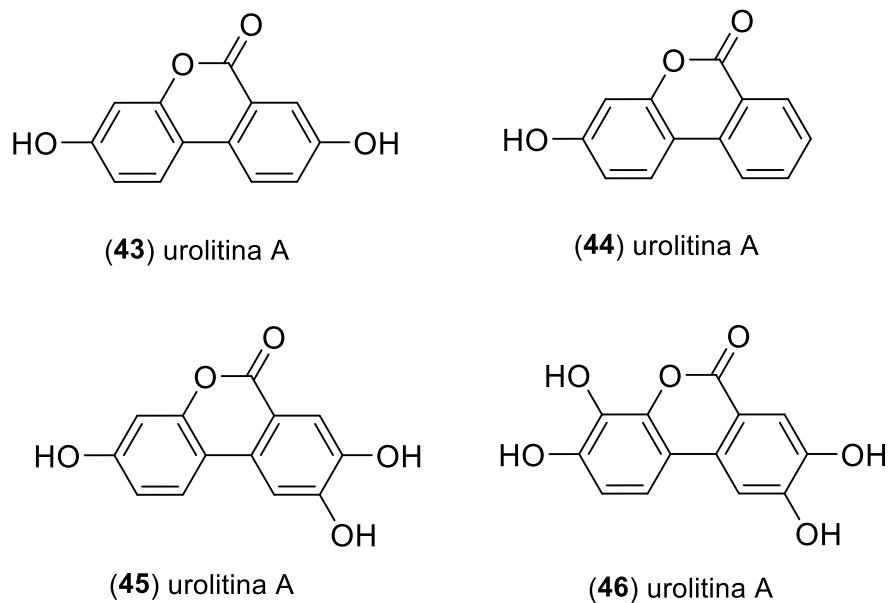


Soh e colaboradores (2008) mostraram atividade do AE comercial obtido da Acros Organics (Bélgica), com uma inibição significativa *in vitro* contra cinco cepas de *P. falciparum* (F32, Dd2, FcB1, W2 e FcM29) com CI₅₀ variando de 105 a 330 nM, além do seu efeito sinérgico com cloroquina, atovaquona, mefloquina e artesunato, potencializando a atividade *in vitro* destes antimaláricos. Nos estudos *in vivo* relataram inibição de 100% da parasitemia em camundongos infectados por *Plasmodium vinckei petteri* tratados com doses de 50 e 100 mg/kg/dia de AE via intraperitoneal. Por outro lado, camundongos tratados por via oral mostraram muito pouca inibição do crescimento do parasita. Além de avaliarem os efeitos profiláticos deste composto, mostrando sua ação protetora no 6º dia após o início do tratamento. A parasitemia dos camundongos sobreviventes tratados por via oral e intraperitoneal foi monitorizada dos dias 5 a 60. Não foi observada recrudescência de malária em camundongos tratados intraperitonealmente com 50 e 100 mg/kg/dia de AE.

Em condições fisiológicas *in vivo* o AE é metabolizado de forma gradual, na microbiota intestinal para produzir diferentes tipos de derivados como urolitina (BIALONSKA *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2011). Portanto, no intestino AE parece ser transformado por clivagem do anel lactona, por reações de descarboxilação e desidroxilação (ESPÍN *et al.*, 2013; TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 2014). Urolitina A (43), urolitina B (44), urolitina C (45) e D (46), Figura

14, são produzidos e absorvidos no intestino, como a sua lipofilicidade aumentada (CERDÁ; TOMÁS-BARBERÁN; ESPÍN, 2005).

Figura 14. Derivados do AE metabolizado pela microbiota intestinal, as urolitinas.



Cerdá e colaboradores (2003), avaliaram a biodisponibilidade e metabolismo de punicalagina e AE (23) em ratos após a ingestão diária foram identificados derivados no plasma, fezes e urina.

2.7. Quimiometria

A quimiometria é uma área especificamente destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada. A quimiometria emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada, além de fornecer dados quantitativos de uma propriedade de interesse e assim fornecer o máximo de informação química com a análise dos dados obtidos (BORGES, 2011; FERREIRA, 2015). Ela é aplicada em algumas áreas principais, como: processamento de sinais analíticos, planejamento e otimização de experimentos, reconhecimentos de padrões e classificação de dados, calibração multivariada, monitoramento e modelagem de processos multivariados e métodos de inteligência artificial (OLIVEIRA, 2016). A partir da década de setenta, com o avanço da instrumentação e automação dentro dos laboratórios foi possível obter grande quantidade de informações de forma rápida e com boa qualidade, sendo fundamental a utilização de ferramentas estatísticas para a melhor compreensão destas informações (MOITA NETO & MOITA, 1998; BARROS NETO *et al.*, 2006).

Os métodos quimiométricos utilizados para identificar as semelhanças e as diferenças em variados tipos de amostras para classificá-las estão divididos em dois grupos: os métodos “supervisionados”, e os métodos “não supervisionados” de reconhecimento de padrões. A análise de componentes principais (ACP) e análise de agrupamentos hierárquicos (AAH), são métodos não supervisionados de reconhecimento de padrões, porque não fazem uso de informação preestabelecida da amostra analisada e, por tanto não requerem nenhum conhecimento prévio a respeito da classificação das amostras. Elas são agrupadas naturalmente com base na informação contida nos dados experimentais em questão (BARROS NETO *et al.*, 2006).

A ACP consiste essencialmente em transformar as coordenadas das amostras em outro sistema de eixos mais conveniente para análise de dados. É uma forma de identificar padrões nos dados e expressá-los de um modo que se possa enxergar as suas diferenças e similaridades, reduzindo a dimensionalidade sem perder informação. Considerado um método de grande importância na Quimiometria e na análise multivariada em diferentes áreas, a APC, além da redução nas dimensões do grupo de dados analisados, é também

utilizada no reconhecimento de tendências nos dados que corroboram para o agrupamento de amostras semelhantes, permitindo também a identificação de amostras atípicas ou anômalas.

A compressão de dados é realizada efetuando-se combinações lineares entre as variáveis dos dados originais, realizando aglomeração daqueles que possuem informações correlacionadas, reorganizando os dados em um novo sistema de eixos, chamado de componentes principais (PC, do inglês *Principal Component*). Esse novo sistema de coordenadas torna mais fácil a interpretação dos dados e evidencia agrupamentos de amostras com características semelhantes, sendo também possível detectar amostras com comportamentos distintos. As PC's devem ser ortogonais, garantindo que a informação contida em uma delas não esteja presente na PC subsequente. A primeira PC, ou PC1, está direcionada ao longo do sentido de maior variância dos dados. Da mesma forma, a PC2 está direcionada ao longo do segundo sentido de maior variância e é ortogonal à PC1 e essa regra segue para se obter as demais PC's (PANERO *et al.*, 2009).

AAH descreve a estrutura dos dados interligando as amostras por suas associações, revelando os agrupamentos naturais existentes no conjunto de dados. O processo de agrupamento hierárquico de dados multidimensionais pode ser representado graficamente em um esquema bidimensional (MASSART *et al.*, 1988, FERREIRA, 2015). O objetivo da HCA é exibir os dados em um espaço bidimensional de maneira a enfatizar os seus agrupamentos e padrões naturais. A distância entre os pontos (amostras ou variáveis) reflete a similaridade de suas propriedades, sendo útil para determinar a semelhança entre amostras. O método relaciona as amostras de forma que as mais semelhantes são agrupadas entre si. Os resultados são apresentados na forma de um dendrograma que agrupa amostras ou variáveis em função da similaridade (PANERO *et al.*, 2009). Ambos, são métodos matemáticos de análise exploratória que tem concepções totalmente distintas e que podem ser aplicados aos dados multivariados, tornando possível a visualização desejada (FERREIRA, 2015).

O uso de técnicas analíticas instrumentais como a espectroscopia de massas, espectroscopia Raman, fluorescência molecular, ressonância magnética nuclear, cromatografia, dentre outras, têm em comum a geração de dados multivariados para uma mesma amostra. Com análise desses dados aliados à quimiometria pode-se obter informações que muitas vezes resolvem limitações e ajudam a nortear escolhas nos estudos bioguiados.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Descobrir novas substâncias antimaláricas de resíduos da produção de *Bertholletia excelsa* Bonpl. (castanha-do-Brasil).

3.2. Objetivos específicos

- Identificar componentes químicos em extratos de entrecascas, cascas do caule, raízes e cascas de raízes de *B. excelsa* a partir de investigações por IES-EM e técnicas quimiométricas (análises multivariadas de AAH e ACP) dos conjuntos de dados obtidos;
- Identificar extratos de *B. excelsa* com elevada atividade inibitória contra a cepa K1 de *P. falciparum in vitro*;
- Isolar e confirmar as estruturas dos componentes químicos a partir dos extratos ativos de *B. excelsa*, através de métodos espectrométricos (RMN 1D/2D e EM);
- Identificar as substâncias isoladas de *B. excelsa* com elevada atividade inibitória contra a cepa K1 de *P. falciparum in vitro*;
- Identificar as substâncias isoladas de *B. excelsa* com elevada atividade antioxidante mediante a reação com DPPH.

4. PARTE EXPERIMENTAL

Este trabalho foi realizado mediante parceria entre o Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), o Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CALTQPN) do INPA, o Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM) da Central Analítica Multidisciplinar (CAM) da UFAM, bem como o Laboratório de Cultivo de *Plasmodium falciparum* (Laboratório de Malária e Dengue), COSAS/INPA e o Laboratório de Atividades Biológicas - BIOPHAR da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM.

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Equipamentos comuns de laboratório

- Balança analítica: Marca Ohaus, modelo AY220.
- Balança semi-analítica: Marca Ohaus, modelo ARC120.
- Balança de precisão: Marca Ohaus, modelo SJX1502BR/E
- Estufa de secagem e esterilização: Marca Famem, modelo 320-SE.
- Microscópio óptico: Marca Global optics, modelo NO218T
- Moinho de 4 facas: Marca Marconi, modelo MA 340.
- Evaporador rotatório: Marca Fisatom, modelo 804.
- Banho de ultrassom: Marca Unique, modelo USC-1800 A.
- Manta aquecedora: Marca Fisatom, modelo 752 A.

4.1.2. Solventes e reveladores

Os solventes utilizados foram de grau técnico, submetidos à destilação prévia. Todos os solventes utilizados nos procedimentos cromatográficos e em experimentos de EM foram de grau CLAE da marca Tedia. Solventes deuterados da marca Merck foram utilizados para

obtenção dos espectros de RMN. Água ultrapura foi obtida a partir de um sistema milli-Q, modelo Simplicity® 185 marca Millipore.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Análises cromatográficas

4.2.1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises de CLAE desenvolvidas no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM), foram realizadas em coluna analítica, seguida de uma semi-preparativa. As análises em CLAE analítico utilizaram um cromatógrafo modelo Surveyor Plus® (Thermo Scientific) equipado com bomba Surveyor LC Pump Plus, autoamostrador Surveyor Autosampler Plus, válvula de injeção Rheodyne (25 µL), operando simultaneamente com detector de arranjo de diodos (DAD) Surveyor PDA Plus Detector e de espectrometria de massas (MS) (TSQ Quantum Access). As análises em CLAE semi-preparativo foram realizadas em cromatógrafo modelo UFLC® (Shimadzu) equipado com duas bombas LC-6AD, degaseificador DGU-20A5, detector de ultravioleta (UV) SPD-20AV, modulo de comunicação CBM-20A e válvula de injeção Rheodyne (200 ou 500 µL).

4.2.2. Métodos espectroscópicos/espectrométricos

4.2.2.1. Ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises de RMN foram realizados no Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CALTQPN). Os espectros de RMN unidimensionais (¹H, ¹³C e DEPT135) e bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC) foram obtidos em espectrômetro de RMN de marca Bruker modelo Avance IIIHD, 300 MHz. Foi utilizado o programa TopSpin 3.6 para a manipulação dos espectros de RMN. As amostras foram dissolvidas em DMSO deuterado (CD₃)₂SO).

4.2.2.2. Espectrometria de massas (EM)

Os 56 extratos obtidos, foram analisadas em EM e realizadas no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM), no equipamento marca Thermo Scientific, modelo LCQ Fleet® com analisador ion-trap, fonte de ionização electrospray (ESI) a voltagem e a temperatura do capilar em IES: 20,0 V e 200 °C, respectivamente. A voltagem do *spray*: 5,0 kV, sendo este operado em modo positivo e DIC (dissociação induzida por colisão) de 25 - 28%. Gás nebulizador e gás de secagem: N₂. No analisador de DIC utilizou-se He como gás de fragmentação.

As substâncias obtidas neste trabalho, foram analisadas em espectrômetro de massas de alta resolução (EMAR) realizadas no Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CALTQPN) no equipamento Marca Bruker Daltonics, modelo MicroTOF-QII com analisador time-of-flight de alta resolução 17500 (FWHM) e fonte ESI.

4.2.3. Coleta e identificação do material botânico

A coleta de resíduos de entrecascas, cascas do caule, raízes e cascas de raízes da *B. excelsa*, foi realizada na Fazenda Aruanã, localizada no quilometro 215 da rodovia AM 010, município de Itacoatiara – AM (58°49'48.0"W 03°00'17.0"S) em 15 de novembro de 2016. Exsicata do material coletado foi depositada para identificação taxonômica no Herbário da Coordenação de Biodiversidade (COBIO/ INPA) e registradas com o número 277498. O acesso ao patrimônio genético foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) com o código A11C513.

Foram utilizados padrões de ácido elágico e derivados (ácido valoneico dilactona e eschweilenol C) cedidos pelo Dr. Felipe Moura Araujo da Silva do Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM), a partir de amostras vegetais de *B. excelsa* coletadas também na Fazenda Aruanã com acesso ao patrimônio genético registrado no SisGen sob o código A442001.

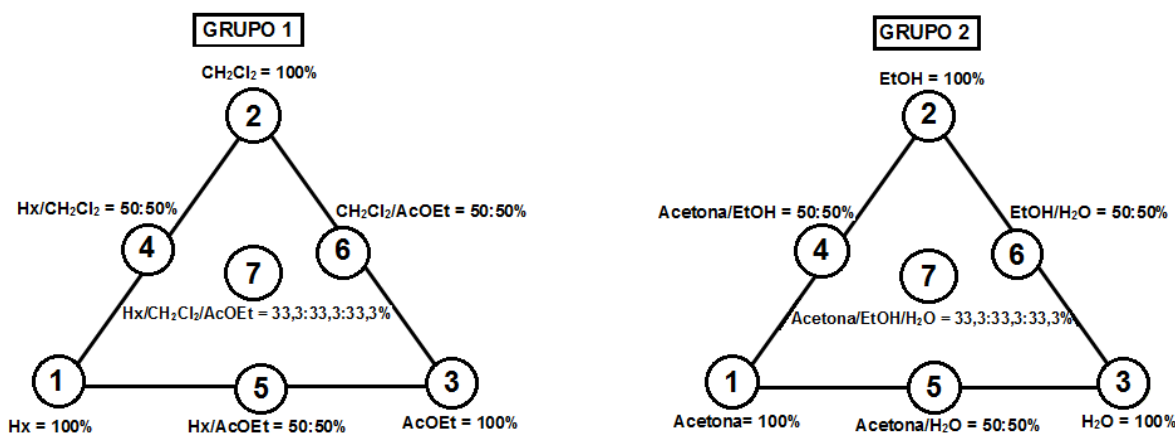
4.2.4. Secagem e moagem do material vegetal

As entrecascas, cascas do caule, raízes e cascas de raízes da *B. excelsa*, foram levadas ao Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM/INPA). Após a separação, foram colocadas na estufa a 40 °C para secagem até peso constante. O material vegetal foi seco em estufa separadamente por partes. Uma vez secas, foram trituradas em moinho de facas e a parte lenhosa (cascas do caule e raízes) foram moídas em moinho industrial no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia/INPA. Após a moagem as amostras foram pesadas, embaladas e armazenadas na geladeira até a extração.

4.2.5. Planejamento experimental de misturas

Os extratos foram preparados com base em um planejamento experimental do tipo simplex-centroide (BRUNS *et al.*, 2006) com três componentes (solventes). Foram divididos em dois grupos experimentais, utilizando solventes com diferentes graus de polaridade. Grupo 1 (hexano (Hx); diclorometano (CH_2Cl_2); acetato de etila (AcOEt)) e Grupo 2 (acetona; etanol (EtOH); água (H_2O)), figura 15.

Figura 15. Planejamento experimental do tipo simplex-centroide com três componentes/solventes.



Os vértices dos triângulos (1, 2 e 3) correspondem aos solventes puros, os centros das arestas (4, 5 e 6) correspondem às misturas binárias com os dois componentes em proporções iguais, e o ponto no centro do triângulo (7), corresponde ao ponto central, isto é, a mistura contendo os três solventes em proporções iguais. Os solventes puros foram selecionados com base no triângulo de seletividade de solventes de Snyder para cromatografia (SNYDER, 1974). Esse planejamento deu origem a 7 sistemas de solventes de extração para cada grupo (1 e 2) para um total de 14 sistemas de extração. Porções de cada uma das 4 partes da planta (entrecasca, cascas do caule, raiz e casca de raiz), foram extraídas individualmente levando a um total de 56 extratos, conforme detalhado a seguir.

4.2.6. Preparação de extratos para estudos quimiométrico e biológico

4.2.6.1. Preparo dos extratos em escala analítica

Foram preparados um total de 56 extratos de *B. excelsa* (resíduos de raiz, casca de raiz, casca do caule e entrecasca) pesando-se 1 g de cada material vegetal seco e triturado e adicionando-se 100 mL do solvente extrator de acordo com as composições do planejamento simplex-centróide. Foram feitas duas extrações em duplicata, utilizando-se uma nova porção de material vegetal em cada extração. As misturas foram mantidas sob agitação constante (*shaker*) por 24 h à temperatura ambiente. Em seguida os extratos foram filtrados e concentrados por evaporação rotatória. Os frascos contendo cada extrato foram colocados em banho de areia à 40 °C até a evaporação completa dos solventes. As amostras secas foram pesadas, foi calculado o percentual de rendimento de extrato e depois foram armazenadas em freezer à -20 °C para posterior análise.

4.2.6.2. Análise dos extratos por EM e tratamento quimiométrico dos dados

Amostras de todos os extratos obtidos foram pesados, dissolvidos a uma concentração de 3 mg/mL (solução estoque) em metanol e filtrados com filtro millipore 0,20 µm. Alíquotas (30 µL) das soluções estoques foram posteriormente diluídas com metanol (970 µL) e

analisadas por infusão direta no espectrômetro de massas da UFAM. Foram injetados por grupos de solventes (Grupo 1 e 2). Após a aquisição dos espectros de massas, os dados (m/z dos íons e suas respectivas intensidades relativas) foram processados utilizando o Programa Xcalibur 2,0.

Para a realização dos cálculos quimiométricos, uma matriz de dados, foi construída colocando-se o sistema de extração da amostra nas cabeças de coluna e as respectivas m/z dos íons obtidas a partir dos espectros de massas das amostras foram colocadas nas colunas. A construção da matriz de dados é mostrada esquematicamente no Anexo 1. Os dados foram avaliados por parte da planta separadamente, comparando método de extração, m/z e porcentagem em relação ao pico base (maior que 5%), os íons de intensidade abaixo de 5% relativo ao íon base foram negligenciados (SCHIOZER *et al.*, 2012) indicado por “0” na planilha (Anexo 1). Para auxiliar na interpretação dos resultados, foi utilizado o programa computacional livre Chemoface versão 1.5, análise de componentes principais (ACP) e análise de agrupamentos hierárquicos (AAH), calculados através da variação dos íons registrados (variáveis), e distância euclidiana respectivamente.

4.2.6.3. Preparo de extrato em maior escala e fracionamento em fase sólida

Com base nos resultados de percentual de rendimento, dados quimiométricos e atividade antiplasmódica escolheu-se o extrato na mistura de solventes acetona/EtOH/H₂O (1:1:1) para ser preparado em maior escala. A partir de 10 g de entrecasca, conforme procedimento descrito na seção 4.2.6.1. obteve-se um total de 4,1 g de extrato seco (E57). Foi realizada uma extração em fase sólida (EFS), 1 g do extrato E57 e passado através de um cartucho contendo 10 g de fase KP-C18-HS (Biotage, VA, USA) previamente ativada em metanol grau CLAE (70 mL) e condicionada com água (70 mL). A coluna foi eluída com água (70 mL) e eluída adicionalmente com metanol grau CLAE (70 mL). A fração metanólica foi seca em banho de areia a 40 °C e obtiveram-se 704 mg (E57B), enquanto a fração aquosa (E57A) foi liofilizada e obtiveram-se 210 mg.

4.2.6.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As absorções foram registradas de 254 a 300 nm. O método utilizado foi otimizado em coluna analítica (Figura 15) de forma a permitir a separação escalonada para isolamento. A fração metanólica (E57B) do extrato E57, foi dissolvido em DMSO (40 mg/100 µL) e injetada em uma coluna semi-preparativa C18 com fluxo de 3 mL/min.

As separações foram realizadas em um sistema Accela HPLC (Thermo Scientific). A fase móvel consistia em metanol (A) e uma solução aquosa, acidificada com ácido fórmico a 1% (B) com gradiente de eluição de 20 a 80% B ao longo de 20 min (1 mL/min), seguido de 80% B por mais 10 min (Silva *et al.*, 2018), totalizando 30 min de corrida, o que resultou na coleta de 7 subfrações (E57B-1, E57B-2, E57B-3, E57B-4, E57B-5, E57B-6 e E57B-7). Cada injeção continha 40 mg da fração DE56B solubilizados em 100 µL de DMSO.

4.2.7. ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.2.7.1. Cultivo *in vitro* de *Plasmodium falciparum*

A cultura *in vitro* de *P. falciparum* e os testes de atividade antimalárica *in vitro* foram realizados no Laboratório de Cultivo de *Plasmodium falciparum* (Laboratório de Malária e Dengue), COSAS/INPA. O método utilizado é uma modificação da técnica de Trager e Jensen (1976) adaptada pela Gerência de Malária da FMT-HVD, baseada no desenvolvimento *in vitro* dos estágios eritrocitários desta espécie parasitária. Foi utilizada a cepa K1 de *P. falciparum* (MRA-159, MR4, ATCC, Manassas Virginia), resistente à cloroquina e pirimetamina, cultivada em eritrócitos humanos do tipo A+ a 37 °C, em frascos de poliestireno de 50 mL hermeticamente fechados, a uma atmosfera de baixa tensão de oxigênio (5% de CO₂, 5% de O₂ e N₂ balanceado).

4.2.7.2. Microteste de suscetibilidade *in vitro*

O ensaio antiplasmódico foi realizado de acordo com o método descrito por Rieckmann *et al.* (1978), com adaptações descritas por Andrade-Neto *et al.* (2007). Para avaliação inicial da atividade, as amostras foram submetidas a uma peneiragem em duas concentrações: 50 e 5 µg/mL. As amostras que apresentaram um percentual de inibição da parasitemia acima de 80% (frente aos controles negativos) na maior concentração foram consideradas ativas e avaliadas em sete concentrações, na faixa de 100 a 1,56 µg/mL, para determinação da concentração capaz de reduzir o crescimento do parasita em 50% (CI₅₀). Os antimaláricos padrões cloroquina e quinina foram avaliados em sete concentrações, de 2,5 a 3,4×10⁻³ µg/mL, como controles positivos. Cada amostra diluída foi testada em triplicata na etapa da peneiragem, e em duplicata para cálculo de CI₅₀, em microplacas de 96 poços. A concentração inibitória (CI₅₀) foi calculada com o auxílio do software GraphPad Prism.

4.2.7.3. Determinação do fator antioxidante mediante a reação com DPPH

A determinação do fator antioxidante foi realizada no Laboratório de Atividades Biológicas - BIOPHAR da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM., executada pelo aluno de doutorado Leonard Domingo Rosales Acho, sob a orientação do Prof. Dr. Emerson Silva Lima.

Este teste avalia a habilidade que uma substância tem de sequestrar o radical livre estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), e está baseado no descoramento (geralmente cor amarela) de uma solução composta pelo radical estável, de cor violeta, quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). Para este procedimento, utilizou-se a metodologia utilizada por Chiang (2013), com modificações.

Foi preparada uma solução de 0,05 µg/mL de DPPH em etanol. 30 µL das substâncias solubilizadas em DMSO (1 mg/mL) e 30 µL de padrão ácido gálico (100 µg/mL) foram adicionados a cada um dos poços da microplaca e colocadas em contato com a solução de DPPH (170µL em cada poço). Para o controle, foram utilizados 170 µL de DPPH e 30 µL de DMSO e como branco de cada amostra foi adicionado também 170 µL do solvente e 30 µL da substância sem adição do DPPH. A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente, no escuro e foi feita a leitura em 492 nm. Em seguida, foi feito o cálculo de inibição baseado na absorbância do controle utilizando o programa Excel.

As análises foram realizadas em triplicata e os cálculos de porcentual de inibição (inibição %) foram realizados baseando-se na absorbância do controle e utilizando o programa Excel. Quando o porcentual de inibição foi maior a 50%, foram realizadas até 8 diluições consecutivas para obtenção dos valores de CI₅₀, calculados pelo programa GraphPad Prism, versão 6.0. A percentagem de inibição foi obtida a través da equação 1:

Equação 1:

$$\% \text{ inibição} = 100 - [\text{Absa} / \text{AbsC}] \times 100.$$

Absa=Absorbância da amostra

Absc=Absorbância do controle

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho teve como objetivo o isolamento de substâncias com atividade antimalárica, portanto foi realizada como primeira etapa, a análise do perfil químico dos extratos por EM e tratamento quimiométrico dos dados, e em conjunto com os dados de percentual de rendimento e atividade antimalárica *in vitro*, foi definida a escolha da melhor metodologia de extração para o isolamento bioguiado. No total foram obtidos 56 extratos em duplicata, a primeira para teste de percentual de rendimento e a segunda para verificação de reprodutibilidade, sendo esta utilizada na fase exploratória. Os resultados de percentual de rendimentos dos 56 extratos são apresentados nas tabelas 4 e 5.

De forma geral, os extratos obtidos apresentaram coloração marrom escuro, com percentuais de rendimentos globais variando entre 2,1% e 41,2%. Dos extratos obtidos a partir das raízes, E35 apresentou o melhor percentual de rendimento com 18,4% e E1 com 2,1% foi considerado o extrato com percentual de rendimento mais baixo de todos. A casca de raiz E42 apresentou o melhor percentual de rendimento com 24,4% e o rendimento mais baixo foi obtido no extrato E8 com 3,8%. A casca de caule, o extrato E49 apresentou o melhor percentual de rendimento com 39,3% e o rendimento mais baixo foi obtido no extrato E15 com 2,3%. Os extratos da entrecasca, E55 e E56 apresentaram os melhores percentuais de rendimento de todos os extratos obtidos com 41,2 e 40,5% respectivamente, por outro lado, o extrato E54 apresentou um percentual de rendimento mais baixo com 8%. Pode-se observar também que houve uma boa reprodutibilidade de percentual de rendimento na segunda repetição. A entrecasca foi quem apresentou maiores valores de percentual de rendimento em comparação com as outras partes vegetais de *B. excelsa*.

Foi possível observar que as misturas binárias e ternárias dos solventes extratores, apresentaram maiores valores de percentual de rendimento em comparação com os solventes puros.

Os maiores rendimentos de extrato bruto foram obtidos com os solventes acetona, etanol e água, todos eles solventes polares. Geralmente, os compostos de alta

polaridade são solúveis em solventes também polares, o que está de acordo com a regra empírica de grande utilidade: “polar dissolve polar, apolar dissolve apolar” ou “o semelhante dissolve o semelhante”. A solubilidade depende, portanto, das forças de atração intermoleculares que foram documentadas pela primeira vez por Van der Waals (1910).

Tabela 4. Composições das misturas extratoras e rendimento das extrações por parte da planta (Grupo 1)

N° Extração	Solvente (% v/v)			Rendimento %							
	Hexano	CH ₂ Cl ₂	AcOEt	Raiz		Casca de raiz		Casca de caule		Entrecasca	
				1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°
E1	100	0	0	2,1	2,7	-	-	-	-	-	-
E2	0	100	0	9,4	7,0	-	-	-	-	-	-
E3	0	0	100	9,3	8,2	-	-	-	-	-	-
E4	50	50	0	7,6	8,0	-	-	-	-	-	-
E5	50	0	50	16,8	15,1	-	-	-	-	-	-
E6	0	50	50	8,0	10,0	-	-	-	-	-	-
E7	33,3	33,3	33,3	15,7	16,3	-	-	-	-	-	-
E8	100	0	0	-	-	4,2	3,8	-	-	-	-
E9	0	100	0	-	-	10,5	12,3	-	-	-	-
E10	0	0	100	-	-	11,9	11,1	-	-	-	-
E11	50	50	0	-	-	6,5	7,2	-	-	-	-
E12	50	0	50	-	-	20,6	19,0	-	-	-	-
E13	0	50	50	-	-	9,0	10,3	-	-	-	-
E14	33,3	33,3	33,3	-	-	20,4	21,5	-	-	-	-
E15	100	0	0	-	-	-	-	3,1	2,3	-	-
E16	0	100	0	-	-	-	-	11,8	12,4	-	-
E17	0	0	100	-	-	-	-	12,7	11,0	-	-
E18	50	50	0	-	-	-	-	13,5	11,2	-	-
E19	50	0	50	-	-	-	-	15,2	16,2	-	-
E20	0	50	50	-	-	-	-	10,1	9,8	-	-
E21	33,3	33,3	33,3	-	-	-	-	11,6	12,6	-	-
E22	100	0	0	-	-	-	-	-	-	3,6	2,7
E23	0	100	0	-	-	-	-	-	-	11,1	13,2
E24	0	0	100	-	-	-	-	-	-	9,0	9,1
E25	50	50	0	-	-	-	-	-	-	9,5	10,4
E26	50	0	50	-	-	-	-	-	-	9,7	11,8
E27	0	50	50	-	-	-	-	-	-	5,6	4,5
E28	33,3	33,3	33,3	-	-	-	-	-	-	4,6	5,8

Tabela 5. Composições das misturas extratoras e rendimento das extrações por parte da planta (Grupo 2).

N° Extração	Solvente (% v/v)			Rendimento %							
	Acetona	EtOH	H ₂ O	Raiz		Casca de raiz		Casca de caule		Entrecasca	
				1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°
E29	100	0	0	7,3	9,0	-	-	-	-	-	-
E30	0	100	0	9,7	12,1	-	-	-	-	-	-
E31	0	0	100	15,9	15,6	-	-	-	-	-	-
E32	50	50	0	15,8	14,8	-	-	-	-	-	-
E33	50	0	50	14,0	13,5	-	-	-	-	-	-
E34	0	50	50	11,1	14,1	-	-	-	-	-	-
E35	33,3	33,3	33,3	15,9	18,4	-	-	-	-	-	-
E36	100	0	0	-	-	9,6	10,7	-	-	-	-
E37	0	100	0	-	-	18,8	17,1	-	-	-	-
E38	0	0	100	-	-	19,3	20,1	-	-	-	-
E39	50	50	0	-	-	17,1	20,4	-	-	-	-
E40	50	0	50	-	-	21,0	23,6	-	-	-	-
E41	0	50	50	-	-	21,6	22,7	-	-	-	-
E42	33,3	33,3	33,3	-	-	24,0	24,4	-	-	-	-
E43	100	0	0	-	-	-	-	19,5	19,5	-	-
E44	0	100	0	-	-	-	-	32,9	34,2	-	-
E45	0	0	100	-	-	-	-	22,9	24,7	-	-
E46	50	50	0	-	-	-	-	33,4	36,0	-	-
E47	50	0	50	-	-	-	-	29,7	33,9	-	-
E48	0	50	50	-	-	-	-	17,0	18,1	-	-
E49	33,3	33,3	33,3	-	-	-	-	39,3	38,4	-	-
E50	100	0	0	-	-	-	-	-	-	18,9	19,0
E51	0	100	0	-	-	-	-	-	-	29,8	29,9
E52	0	0	100	-	-	-	-	-	-	28,7	30,0
E53	50	50	0	-	-	-	-	-	-	29,8	32,0
E54	50	0	50	-	-	-	-	-	-	8,0	10,8
E55	0	50	50	-	-	-	-	-	-	33,9	41,2
E56	33,3	33,3	33,3	-	-	-	-	-	-	38,5	40,5

Os resultados de percentual de rendimento obtidos mostraram de forma geral a importância do planejamento de misturas do tipo centroide-simplex com três componentes aplicado à obtenção dos extratos brutos de *B. excelsa* em termos da informação obtida por cada um dos diferentes extratores, pois em todos os casos destacaram-se as misturas binárias e ternárias superiores em comparação com a extração com solventes puros. Este fato é importante porque permitiu a possibilidade de selecionar misturas de solventes capazes de extrair maiores quantidades de metabólitos presentes, e junto com os resultados dos testes antimaláricos que serão mostrados a continuação, direcionam a escolha do melhor extrato bruto com atividade biológica elevada.

5.1. Resultado do teste antiplasmódico *in vitro* dos extratos

Um total de 15 extratos de 56 foram desconsiderados para determinação de CI_{50} , por apresentarem uma inibição da parasitemia menor que 80% no *screening*. Os percentuais de inibição dos extratos e os valores das CI_{50} estão apresentados na Tabela 6. Os critérios utilizados para classificação da atividade dos extratos brutos estão de acordo com os usados pelo LAPAAM e outros grupos de pesquisas (KRETTLI *et al.*, 2009). Concentração inibitória 50% (CI_{50}): maior que 25 $\mu\text{g/mL}$ = inativo (I); entre 25 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$ = parcialmente ativo (PA); entre 10 $\mu\text{g/mL}$ e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ = ativo (A); menor que 1,0 $\mu\text{g/mL}$ = muito ativo (MA).

Das amostras testadas (Tabela 6), quarenta e um extratos foram avaliados para determinar as suas CI_{50} por apresentarem uma inibição \geq de 80 %. Os extratos obtidos em solventes mais polares e com maior rendimento apresentaram maior atividade, ocorrendo um aumento da inibição da parasitemia conforme o rendimento dos extratos. Vinte e um extratos obtidos a partir da entrecasca, casca de caule e casca de raiz (E36 - E56) e extraídos com solventes puros e misturas de acetona, etanol e água foram classificados como ativos por apresentarem valores de CI_{50} desde 1,7 até 7,8 $\mu\text{g/mL}$. Sendo os extratos mais ativos E38 ($CI_{50} = 2,0 \mu\text{g/mL}$), E47 ($CI_{50} = 1,7 \mu\text{g/mL}$) e E56 ($CI_{50} = 21,7 \mu\text{g/mL}$), correspondentes aos

extratos obtidos de casca de raiz, casca de caule e entrecasca. Um estudo realizado por Souza (2013) mostrou a atividade do extrato etanólico da casca da *B. excelsa* contra a cepa 3D7 de *P. falciparum* (cloroquina sensível), com CI_{50} igual a 6,0 $\mu\text{g/mL}$. Oliveira et al. (2015) em seu estudo com plantas utilizadas por comunidades quilombolas contra a malária, demonstraram a atividade do extrato etanólico da casca com CI_{50} igual a 2,0 $\mu\text{g/mL}$ frente a estirpe W2 de *P. falciparum* (cloroquina resistente), resultados semelhantes aos aqui obtidos. O extrato aquoso, obtido da seiva no trabalho de Oliveira et al. (2015) que realizou a extração de amostras frescas desta parte da planta e relatou CI_{50} de 7,5 $\mu\text{g/mL}$ frente a estirpe W2 de *P. falciparum*, neste estudo apresentou CI_{50} igual a 2,0 $\mu\text{g/mL}$.

Os sete extratos obtidos a partir das raízes e extraídos em solventes hexano, diclorometano e acetona apresentaram valores de CI_{50} desde 6,3 até 12,3 $\mu\text{g/mL}$, sendo classificados como ativos e parcialmente ativos. Dos sete extratos da raiz obtidos em solventes mais polares (acetona, etanol e água) e testados para atividade antiplasmódica, cinco foram classificados como ativos.

Tabela 6. Atividade antiplasmodica *in vitro* dos extratos de *B. excelsa* em duas concentrações, CI₅₀ e classificação de atividade.

Parte	Solvente	Extrato	Concentrações (µg/mL)			Classificação
			50	5	CI ₅₀	
Raiz	Hx	E1	82	1	11,4	PA
	CH ₂ Cl ₂	E2	92	2	8,2	A
	AcOEt	E3	94	4	10,3	PA
	Hx/CH ₂ Cl ₂	E4	95	1	11,0	PA
	Hx/AcOEt	E5	96	54	6,3	A
	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt	E6	96	52	12,3	PA
	Hx/CH ₂ Cl ₂ /AcOEt	E7	96	45	6,8	A
	Acetona	E29	92	47	5,9	A
	EtOH	E30	78	34	NT	I
	H ₂ O	E31	80	0	2,0	A
	Acetona/EtOH	E32	90	0	NT	NC
	Acetona/H ₂ O	E33	94	30	4,2	A
	EtOH/H ₂ O	E34	83	43	3,2	A
	Acetona/EtOH/H ₂ O	E35	93	86	4,6	A
Casca de raiz	Hx	E8	87	0	NT	NC
	CH ₂ Cl ₂	E9	80	30	5,4	A
	AcOEt	E10	89	2	7,6	A
	Hx/CH ₂ Cl ₂	E11	66	27	NT	I
	Hx/AcOEt	E12	87	0	NT	NC
	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt	E13	92	16	6,2	A
	Hx/CH ₂ Cl ₂ /AcOEt	E14	91	0	NT	NC
	Acetona	E36	80	30	3,3	A
	EtOH	E37	93	60	3,2	A
	H ₂ O	E38	92	85	2,0	A
	Acetona/EtOH	E39	95	25	4,7	A
	Acetona/H ₂ O	E40	95	20	5,3	A
	EtOH/H ₂ O	E41	92	66	4,0	A
	Acetona/EtOH/H ₂ O	E42	85	33	4,0	A
Casca de caule	Hx	E15	19	0	NT	I
	CH ₂ Cl ₂	E16	88	14	6,8	A
	AcOEt	E17	83	0	NT	NC
	Hx/CH ₂ Cl ₂	E18	93	0	NT	NC
	Hx/AcOEt	E19	74	3	NT	I

	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt	E20	76	0	NT	I
	Hx/CH ₂ Cl ₂ /AcOEt	E21	91	34	5,5	A
	Acetona	E43	91	84	3,9	A
	EtOH	E44	95	44	3,8	A
	H ₂ O	E45	88	60	4,0	A
	Acetona/EtOH	E46	83	68	2,2	A
	Acetona/H ₂ O	E47	84	75	1,7	A
	EtOH/H ₂ O	E48	82	5	7,8	A
	Acetona/EtOH/H ₂ O	E49	81	62	1,9	A
Entrecasca	Hx	E22	40	0	NT	I
	CH ₂ Cl ₂	E23	84	1	6,7	A
	AcOEt	E24	80	14	5,9	A
	Hx/CH ₂ Cl ₂	E25	81	0	NT	NC
	Hx/AcOEt	E26	87	16	6,5	A
	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt	E27	79	0	NT	I
	Hx/CH ₂ Cl ₂ /AcOEt	E28	76	0	NT	I
	Acetona	E50	82	74	4,8	A
	EtOH	E51	80	33	2,3	A
	H ₂ O	E52	81	81	2,0	A
	Acetona/EtOH	E53	82	54	3,1	A
	Acetona/H ₂ O	E54	84	65	5,8	A
	EtOH/H ₂ O	E55	80	68	4,9	A
Acetona/EtOH/H ₂ O	E56	84	30	1,7	A	

Nt = não testados; I = inativo; NC = amostras não classificadas/não priorizadas

5.2. Perfil químico dos extratos por EM e tratamento quimiométrico dos dados

Na análise dos extratos por espectroscopia de massas observa-se um variado número de íons (m/z) para cada amostra. Percebe-se também que alguns dos íons principais se repetem na maioria dos extratos da mesma parte da planta avaliada neste estudo. A análise inicial foi realizada por parte da planta, a fim de se avaliar a composição relativa dos extratos e identificar extratos com componentes com m/z associados à atividade antiplasmodial.

O gráfico de AAH da entrecasca (Figura 16) permitiu a observação de dois grupos. Este agrupamento deve-se provavelmente à similaridade dos componentes químicos obtidos a partir das misturas de solventes e que são evidenciadas pela ausência e presença dos íons

em cada grupo. Este mesmo perfil observa-se também nos dados quimiométricos mostrados em casca da raiz e casca do caule. O Grupo I é composto pelos extratos E22 a E28 e o grupo II composto pelos extratos E50 a E56. Este agrupamento, confirma-se no gráfico de ACP da entrecasca (Figura 17).

Quando correlacionamos os extratos avaliados para CI_{50} , observa-se que a maioria dos extratos dos Grupos I e II, possuem valores menores a $10 \mu\text{g/mL}$, classificando-se como extratos ativos. De acordo com Figura 17, os íons que estão correlacionando os extratos do Grupo II, são m/z 301, 447 e 469, sendo E51, E52, E53 e E56 os extratos mais ativos com elevada atividade inibitória contra a cepa K1 de *P. falciparum in vitro*. Por outro lado, os extratos do grupo I apresentam valores de CI_{50} maiores em comparação aos valores de CI_{50} dos extratos do Grupo II. Os íons que correlacionam os três extratos ativos do Grupo I, são m/z 339, 279 e 353, sendo que 4 dos 7 extratos pertencentes a este grupo foram desconsiderados para avaliação de CI_{50} por apresentarem uma inibição da parasitemia menor que 80% no *screening* (triagem).

Figura 16. Dendrograma de AAH da entrecasca de *B. excelsa*

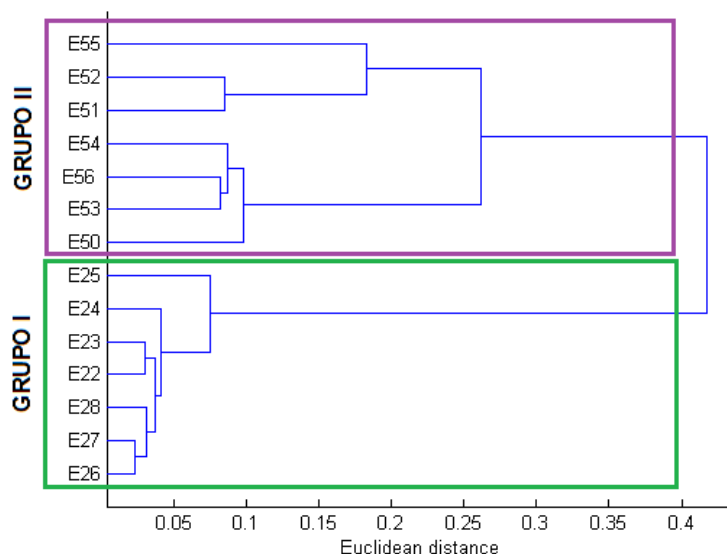
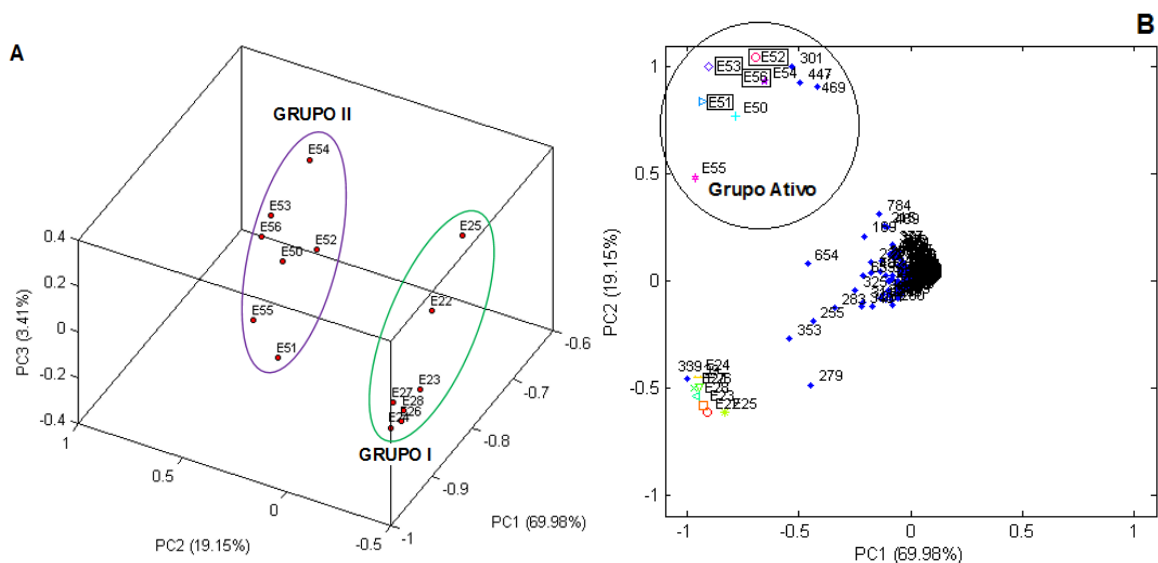


Figura 17. Gráfico de score de ACP (A) e biplot (B) para os dados da entrecasca de *B. excelsa*



No gráfico de AAH da casca de raiz (Figura 18) observam-se dois grupos. O grupo I é composto pelos extratos E8 a E14 e o Grupo II é composto pelos extratos E36 a E42. Este agrupamento confirma-se no gráfico de ACP da casca de raiz (Figura 19). A maioria dos extratos do Grupo II possuem valores de CI_{50} menores a $10 \mu\text{g/mL}$, classificando-se como extratos ativos. Por outro lado, apenas 3 dos 7 extratos que compõem o Grupo I apresentaram CI_{50} menores a $10 \mu\text{g/mL}$. De acordo com a figura 19 os íons que estão correlacionando esses extratos são os de m/z 301, 447 e 469, sendo que os íons m/z 301 e 469 estão correlacionados aos extratos E37 e E38, os mais ativos do grupo II.

Figura 18. Dendrograma de AAH da casca da raiz de *B. excelsa*

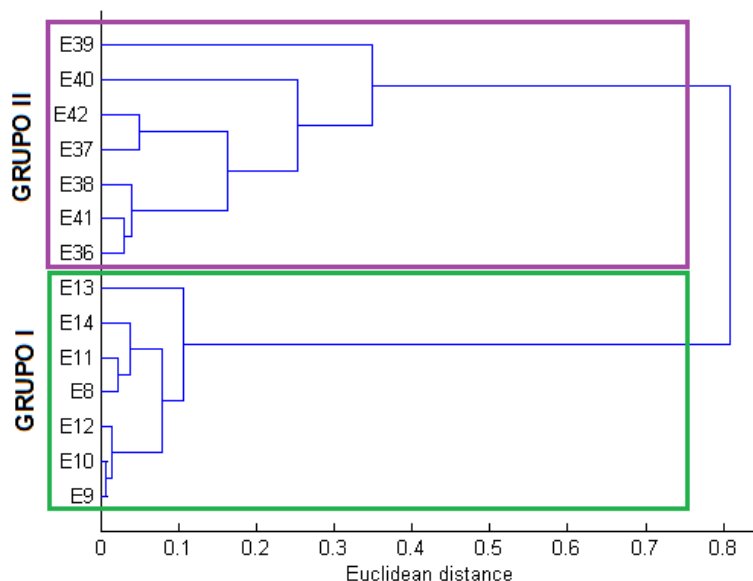
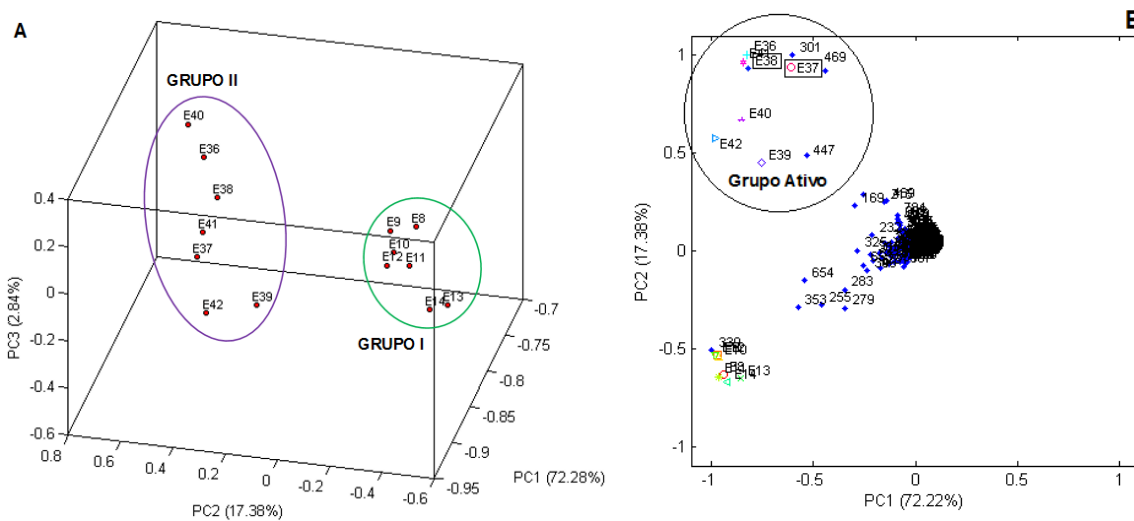


Figura 19. Gráfico de *score* de ACP (A) e *biplot* (B) para os dados da casca da raiz de *B. excelsa*



No dendrograma de AAH e no gráfico de *score* de ACP da casca do caule (figura 20 e 21) observam-se dois grupos definidos. O Grupo II é composto pelos extratos E43 a E49 e o grupo I composto pelos extratos E15 a E21. A maioria dos extratos do Grupo II possuem valores de IC_{50} menores a $10 \mu\text{g/mL}$, classificando-se como extratos ativos. Por outro lado,

somente 2 dos 7 extratos que conformam o Grupo I, apresentaram CI_{50} menor a $10 \mu\text{g/mL}$. De acordo com os gráficos de *score* de ACP e *biplot* (Figura 21) o único íon que está correlacionando aos extratos do Grupo II é m/z 301, sendo que os extratos E46, E47 e E49 foram os mais ativos deste grupo, com elevada atividade inibitória contra a cepa K1 de *P. falciparum in vitro*.

Figura 20. Dendrograma de AAH da casca do caule de *B. excelsa*

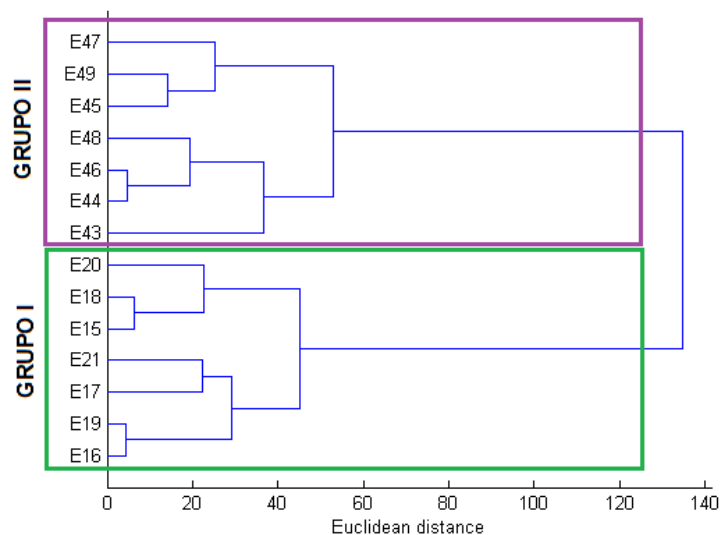
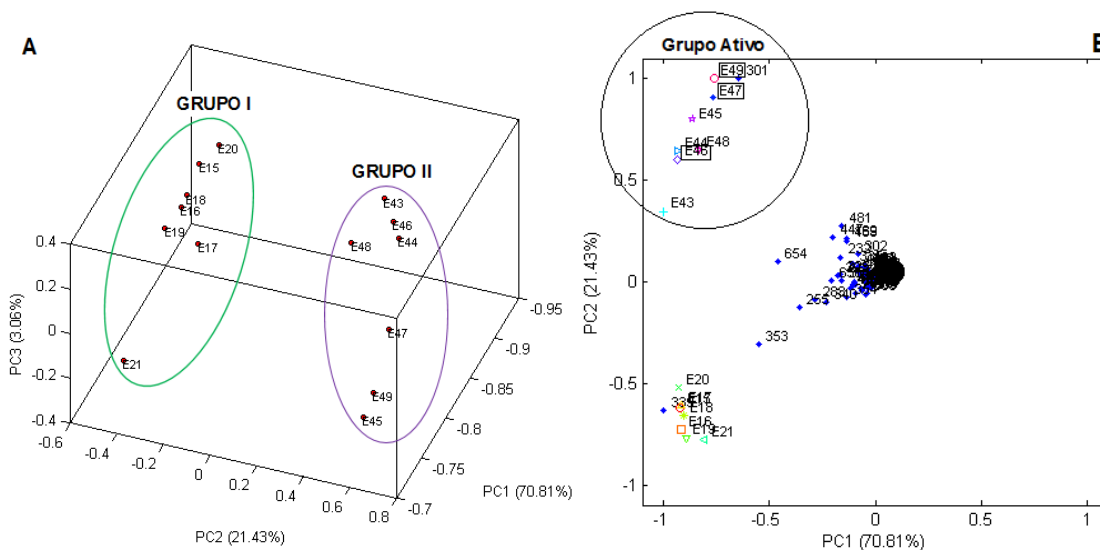


Figura 21. Gráfico de *score* de ACP (A) e *biplot* (B) para os dados da casca do caule de *B. excelsa*



Nos extratos obtidos a partir das raízes de *B. excelsa* foram observados dois grupos principais no dendrograma de AAH (Figura 22), sendo Grupo A e Grupo B claramente diferenciadas. Este agrupamento confirma-se no gráfico de ACP (Figura 23) onde observam-se dois grupos principais que possuem amostras que correlacionam entre si, onde o Grupo A é composto apenas por extratos E1, E3, E4 e E6 (Grupo I, Tabela 4) e o Grupo B é composto por extratos E2, E5, E7 (Grupo I, Tabela 4), E29, E30, E31, E32, E33, E34 e E35 (Grupo II, Tabela 4).

Quando correlacionamos estas amostras com os resultados do teste de atividade *in vitro*, observamos que os valores de CI_{50} obtidos no grupo A, são maiores a $10 \mu\text{g/mL}$, classificando-se como extratos parcialmente ativos. Por outro lado, 8 dos 10 extratos que compõem o Grupo B apresentaram CI_{50} menor a $10 \mu\text{g/mL}$. De acordo com a figura 23 os picos que estão correlacionando os extratos do Grupo B são m/z 469 e 301, sendo E31 e E34 os extratos mais ativos de este grupo contra a cepa K1 de *P. falciparum in vitro*.

Figura 22. Dendrograma de AAH da raiz de *B. excelsa*

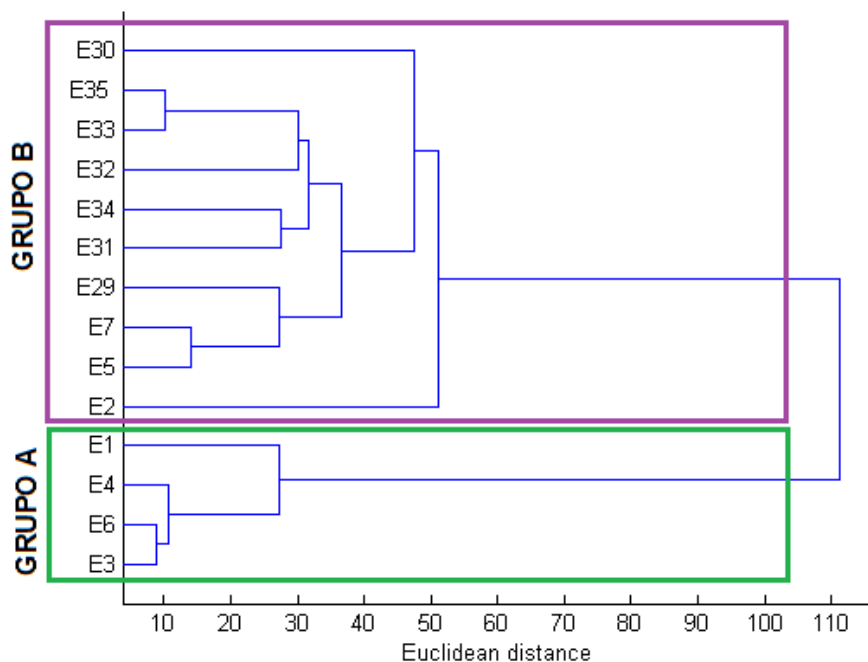
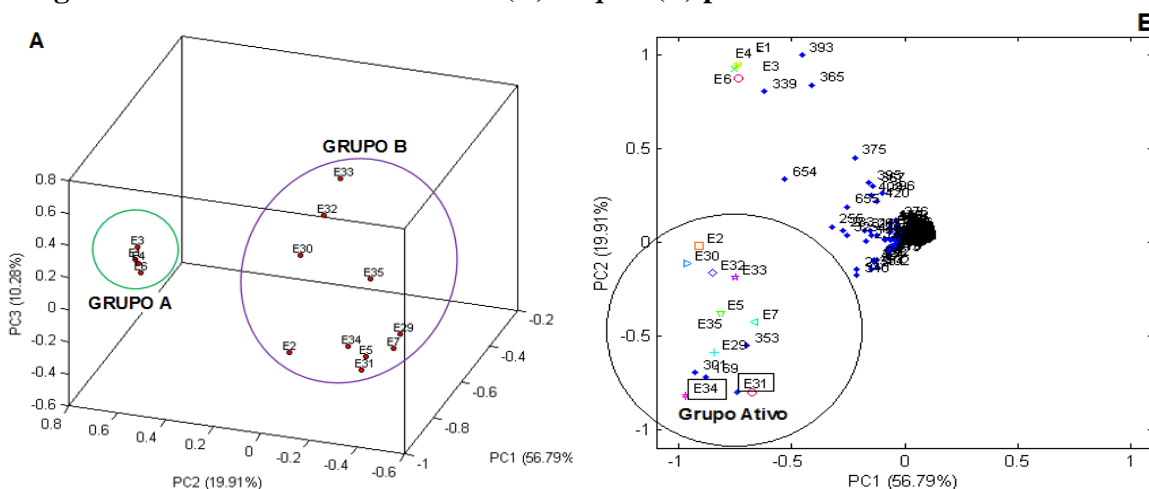


Figura 23. Gráfico de score de ACP (A) e biplot (B) para os dados da raiz de *B. excelsa*



A quimiometria aplicada aos dados coletados por EM dos extratos permitiu a diferenciação das amostras em relação à informação química extraída por cada mistura de solvente extrator. Por meio dos grupos formados, foi possível perceber as características das misturas extratoras e reconhecer o poder de interação entre os solventes.

A análise de componentes principais aplicada aos dados cromatográficos do extrato bruto permitiu a discriminação das amostras com relação à informação química extraída por cada mistura de solvente extrator. Através dos grupos formados foi possível perceber as características das misturas extratoras e reconhecer o poder de interação entre os solventes. De forma geral, cada grupo se destaca por ser mais específico na identificação de alguns picos, enquanto outros permitem a identificação de todos os picos importantes com atividade biológica. No grupo de solventes apolares, identificaram-se os extratos com íons majoritários em m/z 399, 279, 353, 255, 283, 654, 365, 375, evidenciando assim a facilidade de extração destes componentes em solventes de baixa e mediana polaridade. Por outro lado, com acetona, etanol e água (solventes polares), todos solventes polares, identificaram-se os extratos com íons em m/z 301, 447, 469 classificados como “grupo ativo” no processamento quimiométrico e que foram de fato as substâncias majoritárias obtidas em este estudo. Efetivamente os sistemas de solventes utilizados, foram capazes de triar os extratos obtidos na parte da quimiometria. É importante ressaltar que estas informações somente podem ser obtidas com o pré-processamento correto dos dados.

5.3. Análises químicas e fracionamento do extrato

Na tabela 7, observa-se que dos dez extratos mais ativos nos testes *in vitro* contra *P. falciparum* associados aos dados quimiométricos, e com base no percentual de rendimento, definiu-se que o melhor método de extração, foi o extrato obtido na mistura Acetona/EtOH/H₂O da entrecasca da *B. excelsa* (E56). Pois no grupo obtido de AAH e ACP, está considerada como a amostra mais ativa (possui menor CI₅₀) e de forma geral, apresenta o segundo maior rendimento entre as 56 extrações. Sendo então o extrato E56, o escolhido para separação por CLAE.

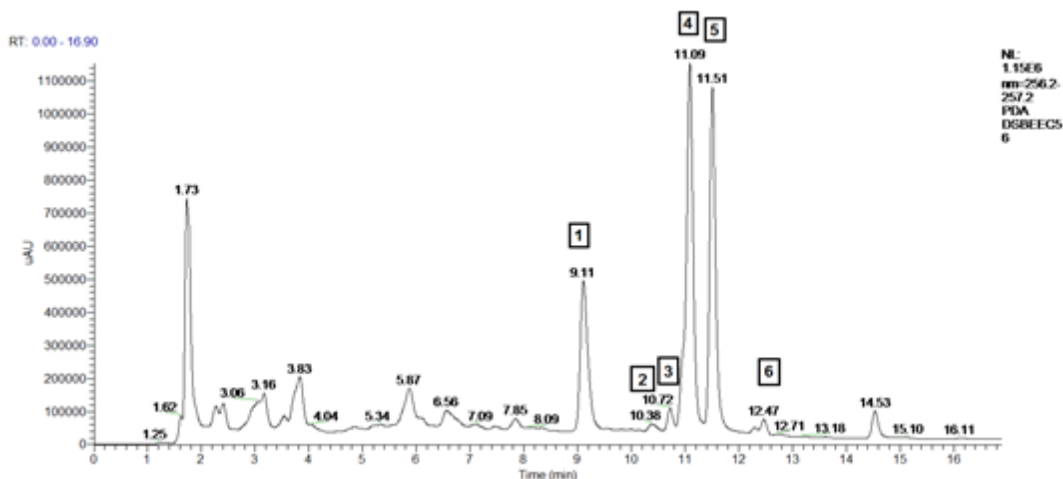
Tabela 7. Extratos de *B. excelsa* mais ativos *in vitro* contra *P. falciparum* e seus íons (*m/z*) associados e teores extrativos

Extrato	CI ₅₀ (µg/mL)	Teor %	<i>m/z</i>
E31	2,0	15,6	301, 469
E34	3,2	14,1	301, 469
E38	2,0	20,1	301, 469, 447
E46	2,2	36	301
E47	1,7	33,9	301
E49	1,9	38,4	301
E51	2,3	29,9	301, 469, 447
E52	2,0	30	301, 469, 447
E53	3,1	32	301, 469, 447
E56	1,7	40,5	301, 469, 447

5.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para a análise de CLAE, foram realizadas 5 corridas utilizando 200 mg no total da fração metanólica E57B. O cromatograma observado na figura 24 mostra os picos correspondentes a seis substâncias que nomeamos de E57B-1, E57B-2, E57B-3, E57B-4, E57B-5 e E57B-6. As substâncias correspondentes a esses picos foram recolhidas em frascos identificados e posteriormente foram liofilizadas e pesadas.

Figura 24. Cromatograma de CLAE semi-preparativo com os picos correspondentes às substâncias obtidas da fração metanólica (E57B)



E57B-1 e E57B-4 foram injetadas novamente no CLAE nas mesmas condições, com a finalidade de aumentar a sua pureza. Na tabela 8, são apresentados os rendimentos das subfrações obtidas da CLAE semi-preparativa. Em seguida foram conduzidos experimentos para caracterizar cada substância por RMN e EM.

Tabela 8. Massa das subfrações obtidas por CLAE semi-preparativo.

Nº pico	Código substância	Tempo de retenção (min)	Massa (mg)
1	E57B-1	9,1	9,6
2	E57B-2	10,4	2,0
3	E57B-3	10,7	3,1
4	E57B-4	11,1	10,3
5	E57B-5	11,5	8,6
6	E57B-6	12,5	3,5

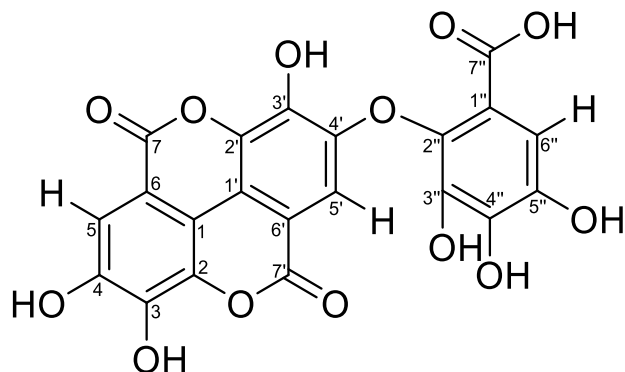
5.5. Identificação das substâncias obtidas

A identificação/caracterização das frações obtidas foi realizada por meio das análises dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (mono e bidimensionais) e EMAR, conforme as características estruturais. Os espectros estão incluídos nos anexos. Os íons associados à atividade antimalárica foram fragmentados utilizando DIC e estão de acordo com as estruturas reportadas em trabalho recente publicado por Silva *et al.*, (2019). A partir de dados espectrais foi observado também que os sinais característicos correspondem a derivados do ácido elágico (AE). No entanto, somente as subfrações E57B-1, E57B-2, E57B-3, E57B-4, E57B-5 e E57B-6 foram identificadas por comparação com a literatura.

5.5.1. Identificação da substância E57B-1

A substância E57B-1 apresentou-se como sólido amorfo, de cor amarela pálida com solubilidade baixa em metanol e água; e solubilidade boa em DMSO. No espectro de massa por *electrospray* de alta resolução (EMAR) modo negativo (Anexo 6) o íon da molécula precursora foi identificado em m/z 469,0053 $[\text{M-H}]^-$, o software (Bruker compass data analysis 4.2) propôs a fórmula $\text{C}_{21}\text{H}_9\text{O}_{13}$ (calculado m/z 469,0049), com um erro de $\Delta = 0,85$ ppm, estando assim dentro da margem de erro para substâncias conhecidas (até 20 ppm) e nova (até 10 ppm). Com estes dados obtidos e junto com os dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , HSQC, HMBC e EM2 encontrados na tabela 9 (espectros nos anexos 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8), levaram a propor a estrutura do ácido valoneico dilactona (**47**), (Figura 25) com valores semelhantes aos descritos em outros trabalhos na literatura (BARAKAT *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2007 e SILVA *et al.*, 2019).

Figura 25. Estrutura proposta para E57B-1



(47) ácido valoneico dilactona

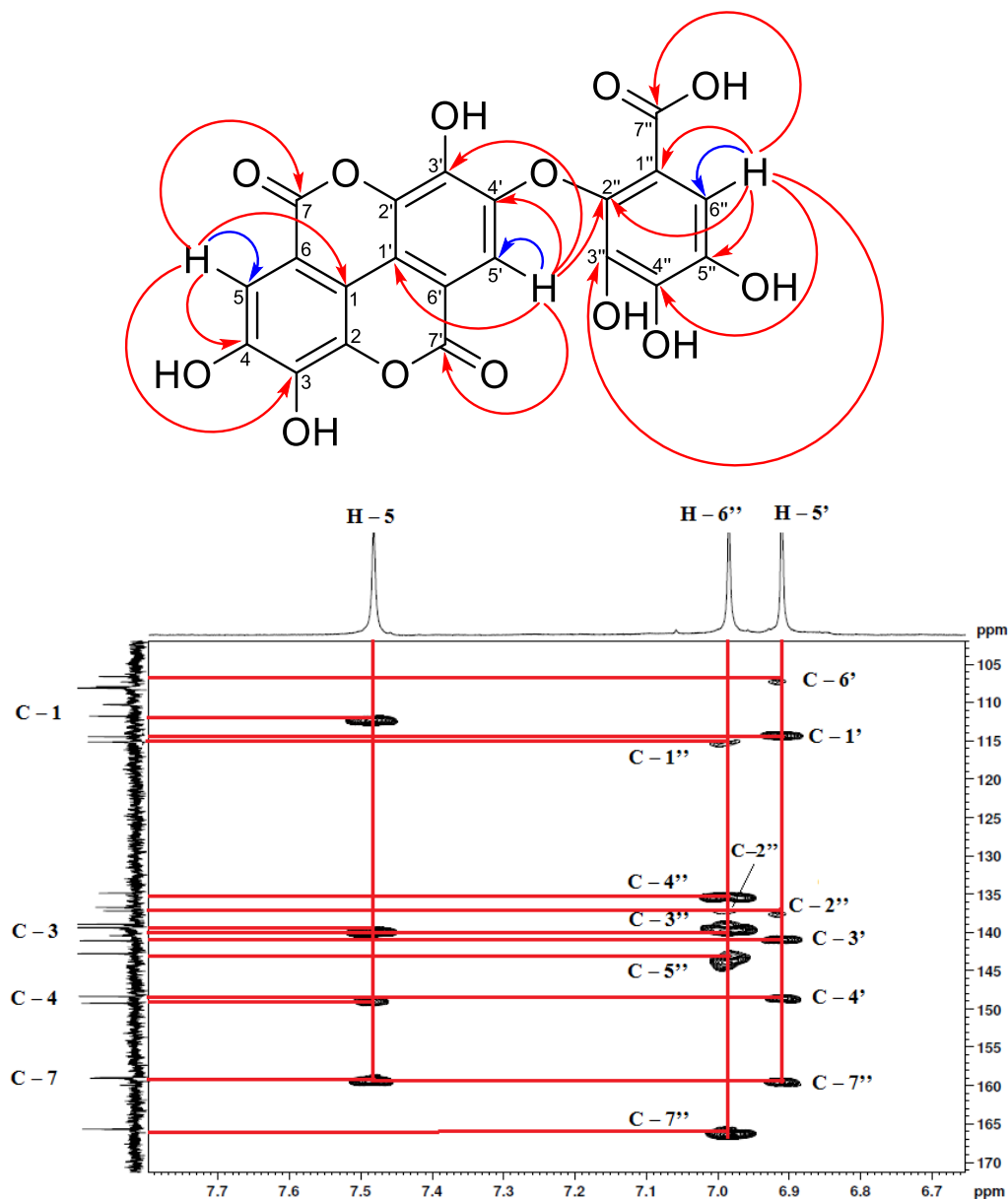
O espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ de E57B-1 (Anexo 2) apresentou três singletos em δ_{H} 7,48 (H-5); δ_{H} 6,87 (H-5') e δ_{H} 6,97 (H-6'') na região de aromáticos, consistente com a presença de três unidades de ácido gálico. Por comparação com dados da literatura, o sinal a δ_{C} 166,3 (C-7'') foi atribuído à carbonila do agrupamento galoiloxi, o que pode ser confirmado pela sua correlação no espectro HMBC a δ_{H} 6,98, atribuído a H-6''.

Os deslocamentos químicos dos sinais observados no espectro de RMN ^{13}C , ao serem comparados com a literatura, apresentaram-se consistentes com os relatados por Silva *et al.*, (2007), (Tabela 9), o que permitiu a identificação de E57B-1 como o ácido valoneico dilactona (47). No EMAR é observado também um íon em m/z 425 $[\text{M}-\text{H}-44]^-$, consistente com uma perda de CO_2 e um íon em m/z 299 $[\text{M}-\text{H}-170]^-$, pela perda do agrupamento galoiloxi (Anexo 8) (CHISTÉ E MERCADANTE 2012; SILVA *et al.*, 2007; BARAKAT *et al.*, 1997; WYREPKOWSK 2014), consistente com um derivado do ácido elágico (AE) (SEERAM *et al.*, 2006).

Tabela 9. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C , HSQC e HMBC da substância E57B-1, comparação com a literatura para ácido valoneico dilactona.

E57B-1					SILVA <i>et al.</i> , 2007	
DMSO- d_6 ; 300 MHz					DMSO- d_6 ; 500 MHz	
N° C	^{13}C	^1H	^1H - ^{13}C -HSQC	HMBC	^{13}C	^1H
C - 1	112,3				111,9	
C - 2	136,6				136,6	
C - 3	139,5				139,5	
C - 4	149,8				149,4	
C - 5	110,8	7,48 (s,1H, CH)	H - 5 (1J)	112,3; 139,5; 149,8; 159,6	110,5	7,49
C - 6	108,4				108,1	
C - 7	159,6				159,1	
C - 1'	114,3				113,8	
C - 2'	136,5				136,2	
C - 3'	141,0				140,6	
C - 4'	148,9				148,5	
C - 5'	108,5	6,91 (s,1H, CH)	H - 5' (1J)	114,3; 141,0; 148,9; 159,5; 137,0	108,4	6,91
C - 6'	107,2				106,8	
C - 7'	159,5				159,0	
C - 1''	114,9				114,7	
C - 2''	137,0				139,1	
C - 3''	139,9				139,4	
C - 4''	135,5				135,2	
C - 5''	143,4				142,9	
C - 6''	108,7	6,98 (s,1H, CH)	H - 6'' (1J)	135,5; 139,9; 166,3; 114,9; 143,4; 137,0	108,4	6,99
C - 7''	166,3				165,7	

Figura 26. Algumas correlações de HSQC (azul) e HMBC (vermelho) da substância E57B-1 (ácido valoneico dilactona, 47).

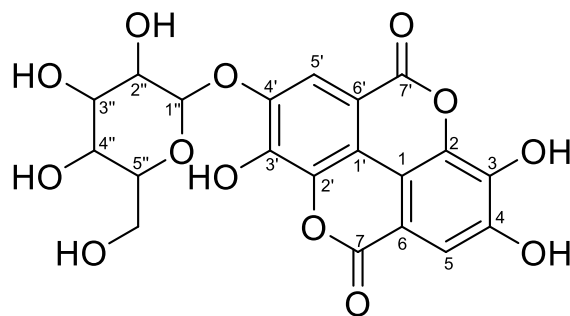


Este derivado de elagitanino não é de ocorrência comum, tendo sido relatado também nas cascas do caule de *Cenostigma macrophyllum* (Leguminosae) (SILVA *et al.*, 2007), no extrato de ervas de *Epilobium hirsutum* (Onagraceae) (BARAKAT *et al.*, 1997), *Shorea laevifolia* (Dipterocarpaceae) (HIRANO *et al.*, 2003), *Mallotus japonicus* (Euphorbiaceae) (HATANO *et al.*, 1988), espécies de *Quercus* (Fagaceae) e *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. (Lythraceae) (KAKUDA *et al.*, 2004).

5.5.2. Identificação da substância E57B-2

Esta substância apresentou-se como sólido amorfo, de cor amarela pálida com solubilidade baixa em metanol e água; e solubilidade boa em DMSO. A substância E57B-2, não foi isolada em quantidade suficiente para estudar as suas estruturas através dos espectros uni e bidimensionais. Porém, foi suficiente para análises de EMAR. No espectro de massa por *electrospray* de alta resolução (EMAR) em modo negativo (Anexo 9), o íon da molécula precursora foi identificado em m/z 463,0540 $[M - H]^-$ onde se sugere a fórmula $C_{20}H_{15}O_{13}$ (calculado m/z 463,0518), com um erro de $\Delta = 0,47$ ppm. A molécula do íon precursor a m/z 463 $[M-H]^-$, seguido de um íon em m/z 301 (ácido elágico) $[M-H-162]^-$, referente à perda de uma unidade de hexose, permitindo propor um ácido elágico hexosídeo (**48**), figura 27 (Anexo 10) (SANTOS *et al.*, 2013; TEXEIRA *et al.*, et al 2015, ANDRADE NEVES *et al.*, 2018; GIL, TOMÁS-BARBERÁN, HESS-PIERCE, HOLCROFT, KADER, 2000; FRACASSETTI, COSTA, MOULAY, TOMÁS-BARBERÁN, 2013; SANTOS, VILELA, FREIRE, NETO, SILVESTRE, 2013). Esta proposta é reforçada principalmente com base aos dados de HPLC-DAD-MS/MS semelhantes registrados por Silva *et al.*, 2019, que relatam a presença desta substância em extratos aquosos da entrecasca de *B. excelsa*.

Figura 27. Estrutura proposta para E57B-2

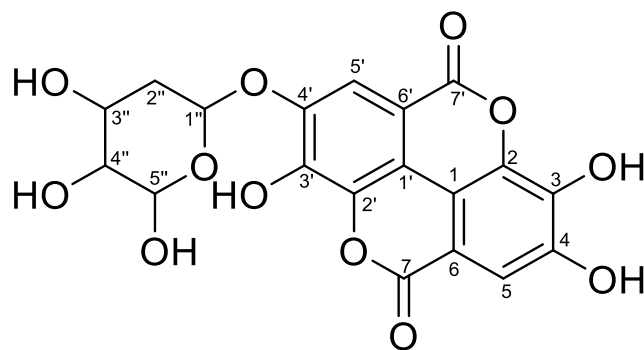


(48) Ácido elágico hexosídeo

5.5.3. Identificação da substância E57B-3

A substância E57B-3 eluiu em CLAE em colunas de fase reversa com um tempo de retenção ligeiramente mais curto que o do ácido elágico, mostrando que este composto é mais polar. Apresentou-se como uma substância amorfa, de cor amarela pálida, pouco solúvel até nos solventes mais polares, com baixa solubilidade em metanol e água; e boa solubilidade em DMSO. No espectro de massa por *electrospray* de alta resolução (EMAR) modo negativo (Anexo 14) o íon da molécula precursora foi identificado em m/z 433,0415 $[M-H]^-$, o software (Bruker compass data analysis 4.2) propôs a fórmula $C_{19}H_{13}O_{12}$ (calculado m/z 433,0412), com um erro de $\Delta = 0,69$ ppm. Estes dados e junto com os dados obtidos dos espectros de RMN de 1H , HSQC, HMBC e EM2 encontram-se na Tabela 10 (espectros nos anexos 11, 12, 13, 14 e 15) levam a propor a estrutura do ácido elágico pentosídeo (**49**) (Figura 28) com valores semelhantes aos descritos em outros trabalhos na literatura (SILVA *et al.*, 2019; DEL BUBBA *et al.*, 2012; MATTHEW *et al.*, 2007; MULLEN *et al.*, 2013).

Figura 28. Estrutura proposta para E57B-3



(49) Ácido elágico pentosídeo

A análise de RMN de 1H mostrou a presença de singletos em δ_H 7,60 e δ_H 7,46 correspondendo aos dois hidrogênios aromáticos do núcleo do ácido elágico (H5 e H5'), e um singlete largo em δ_H 5,58. A análise de RMN de 1H do ácido elágico nas mesmas condições mostrou um singlete em δ_H 7,45 com uma integral para dois hidrogênios correspondendo a H5 e H5' do núcleo do ácido elágico. No caso do ácido elágico (AE), apenas um singlete é observado, por se tratar de uma molécula simétrica. Estes resultados

confirmam a natureza assimétrica da substância E57B-3, visto que a pentosila está ligada a uma das hidroxilas fenólicas do núcleo do ácido elágico. Esta ligação seria responsável pela mudança de campo da resposta de H5 (de δ_H 7,45 para δ_H 7,60) e sugeriria que o resíduo de pentosila deveria ser ligado à hidroxila na posição 4 do ácido elágico.

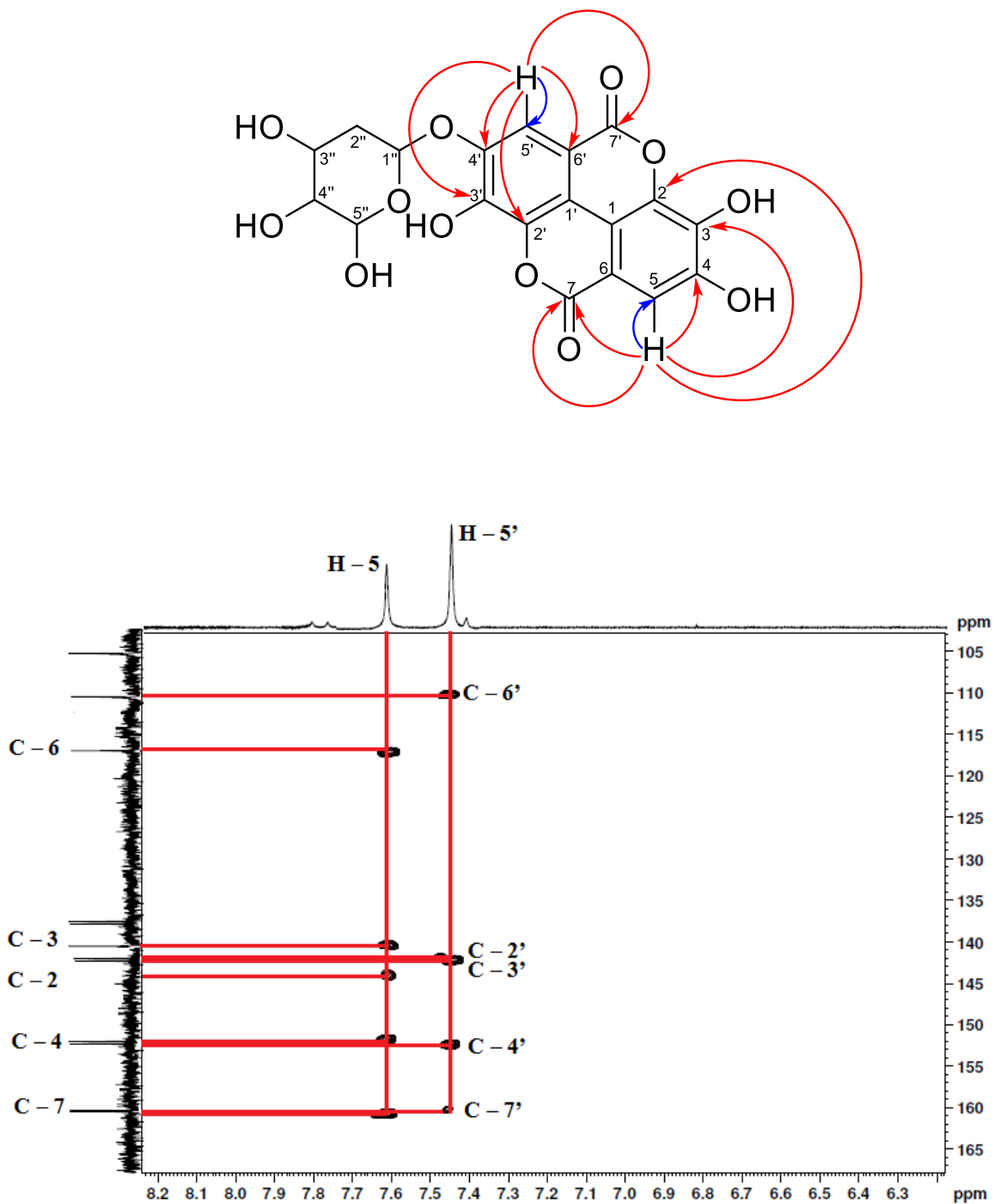
Através do HMBC podemos evidenciar a presença dos demais δ_C 144,0 (C-2); 140,6 (C-3); 151,9 (C-4); 116,7 (C-6) e 160,8 (C-7) correlacionado com um hidrogênio em δ_H 7,60 (1H, s; H-5); δ_C 141,8 (C-2'); 143,4 (C-3'); 152,7 (C-4'); 110,1 (C-6') e 160,4 (C-7') correlacionado com um hidrogênio em δ_H 7,46 (1H, s; H-5'). Estes dados ao serem comparados com a literatura, apresentaram-se consistentes com os relatados por Zafrilla *et al.*, (2001), (Tabela 10), o que permitiu a identificação de E57B-3 como o ácido elágico pentosídeo (**49**). No EMAR é observado também um íon em m/z 433 [M-H]⁻, seguido de um íon em m/z 301 (ácido elágico) [M-H-132]⁻, referente à perda de uma unidade de pentose (Anexo 14). (DEL BUBBA *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2013; FERRERES *et al.*, *et al* 2013; ANDRADE NEVES *et al.*, 2018). Esta substância foi encontrada também em suco de romã (FISCHER *et al.*, 2011) e uva (SANDHU; GU, 2010), e já foi isolada também em frutos de *Rubus idaeus* (framboesa) por Zafrilla, Ferreres, & Tomás-Barberán em 2001.

Tabela 10. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C , HSQC e HMBC da substância E57B-3, comparação com a literatura para ácido elágico pentosídeo.

E57B-3					ZAFRILLA <i>et al.</i> , 2001	
DMSO- <i>d</i> ₆ ; 300 MHz					DMSO- <i>d</i> ₆ ; 300 MHz	
N° C	^{13}C	^1H	^1H - ^{13}C -HSQC	HMBC	^{13}C	^1H
C - 1					112,8	
C - 2	144,0				142,4	
C - 3	140,6				141,3	
C - 4	151,9				151,9	
C - 5	113,0	7,60 (<i>s</i> ,1H)	H - 5 (1J)	144,0; 140,6; 151,9; 116,7; 160,8	113,0	7,69
C - 6	116,7				114,7	
C - 7	160,8				159,3	
C - 1'					113,9	
C - 2'	141,8				141,8	
C - 3'	143,4				143,1	
C - 4'	152,7				152,9	
C - 5'	112,9	7,46 (<i>s</i> ,1H)	H - 5' (1J)	141,8; 143,4; 152,7; 110,1; 160,4	112,9	7,45
C - 6'	110,1				111,7	
C - 7'	160,4				159,2	
C - 1''	108,0	5,58 (<i>s</i> ,1H)				
C - 2''	18,5					
C - 3''						
C - 4''	73,6					
C - 5''	66,2					

*Atribuído com base dos espectros HSQC/HMBC

Figura 29: Algumas correlações no HSQC (azul) e HMBC (vermelho) da substância E57B-3 (ácido elágico pentosídeo, 49).

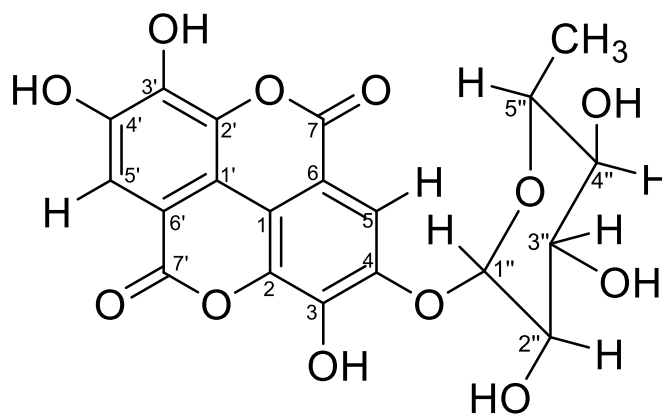


5.5.4. Identificação da substância E57B-4

A substância E57B-4 apresentou-se como sólido amorfo, de cor amarela pálida com baixa solubilidade em metanol e água; e boa solubilidade em DMSO. No espectro de massa por *electrospray* de alta resolução (EMAR) modo negativo (Anexo 21) o íon da molécula precursora foi identificado em m/z 447,0566 $[M-H]^-$, o software (Bruker compass data analysis 4.2) propôs a fórmula $C_{20}H_{15}O_{12}$ (calculado m/z 447,0569), com um erro de $\Delta = 0,67$ ppm.

Estes dados obtidos e junto com os dados a seguir dos espectros de RMN 1H e ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY e EM2 encontram-se na Tabela 11 (Anexos 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 e 23) levam a propor a estrutura do eschweilenol C (**50**), (Figura 30) com valores semelhantes aos descritos em outros trabalhos na literatura (LI *et al.*, 1999; DJOUKENG *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 1998).

Figura 30. Estrutura proposta para E57B-4



(**50**) eschweilenol C

No espectro de RMN de ^1H (Anexo 16) da amostra E57B-4, foram observados apenas dois singletos (δ_{H} 7,74 e δ_{H} 7,47) na região aromática e cinco hidrogênios ligados a carbonos, juntamente com um duplete de um grupo metila (δ_{H} 1,14) consistente com um 6-desoxissacarido.

A análise do mapa de correlação de HSQC permitiu observar um sinal de hidrogênio em δ_{H} 7,74 (1H, s; H-5), correlacionado com um carbono em δ_{C} 111,6, e outro sinal em δ_{H} 7,47 (1H, s; H-5'), correlacionado com um carbono em δ_{C} 110,4. Através do HMBC podemos evidenciar a presença dos demais δ_{C} (Figura 31, Tabela 11).

O espectro de massas de E57B-4, revelou também o íon a m/z 447 $[\text{M} - \text{H}]^-$, seguido de um pico a m/z 301 $[\text{M} - \text{H} - 146]^-$, pertencente ao fragmento do ácido elágico (AE), caracterizando a perda de uma molécula de hexose (CHISTÉ & MERCADANTE, 2012; SANTOS *et al.*, 2013). Estes dados ao serem comparados com a literatura, apoiam a proposta estrutural para esta amostra. Esta substância foi primeiramente isolada na planta *Eschweilera coriacea* (Lecythidaceae) em 1998 (YANG *et al.*, 1998).

Tabela 11. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C , HSQC e HMBC da substância E57B-4, comparação com a literatura para eschweilenol C.

E57B-4					YANG <i>et al.</i> , 1998	
DMSO- <i>d</i> ₆ ; 300 MHz					DMSO- <i>d</i> ₆ ; 400 MHz	
N° C	^{13}C	^1H	^1H - ^{13}C - HSQC	HMBC	^{13}C	^1H
C - 1	108,1				108,4	
C - 2	136,4				136,8	
C - 3	141,2				141,0	
C - 4	146,4				146,4	
C - 5	111,6	7,74 (s,1H)	H - 5 (1J)	141,2; 146,4; 159,2; 114,6; 107,5	111,7	7,72
C - 6	114,6				114,6	
C - 7	159,2				159,3	
C - 1'	107,5				107,8	
C - 2'	136,8				136,5	
C - 3'	139,8				139,5	
C - 4'	148,7				148,6	
C - 5'	110,4	7,47 (s,1H)	H - 5' (1J)	159,0; 148,7; 139,8; 111,9	110,5	7,46
C - 6'	111,9				112,0	
C - 7'	159,0				159,1	
C - 1''	100,2	5,46 (d, 1H)	H - 1'' (1J)	146,4; 69,9	100,3	5,44
C - 2''	70,0	3,99 (dd, 1H)	H - 2'' (1J)		69,9	3,98
C - 3''	69,9	3,83 (dd, 1H)	H - 3'' (1J)		70,1	3,82
C - 4''	71,8	3,32 (m, 1H)	H - 4'' (1J)	70,1; 69,9; 70,0	71,8	3,27
C - 5''	70,1	3,53 (dq, 1H)	H - 5'' (1J)		70,1	3,50
C - 6''	17,9	1,14 (d, 3H)	H - 6'' (1J)	71,8	18,0	1,12

Figura 31: Algumas correlações no HSQC (azul) e HMBC (vermelho) da substância E57B-4 (Eschweilenol C, 50).

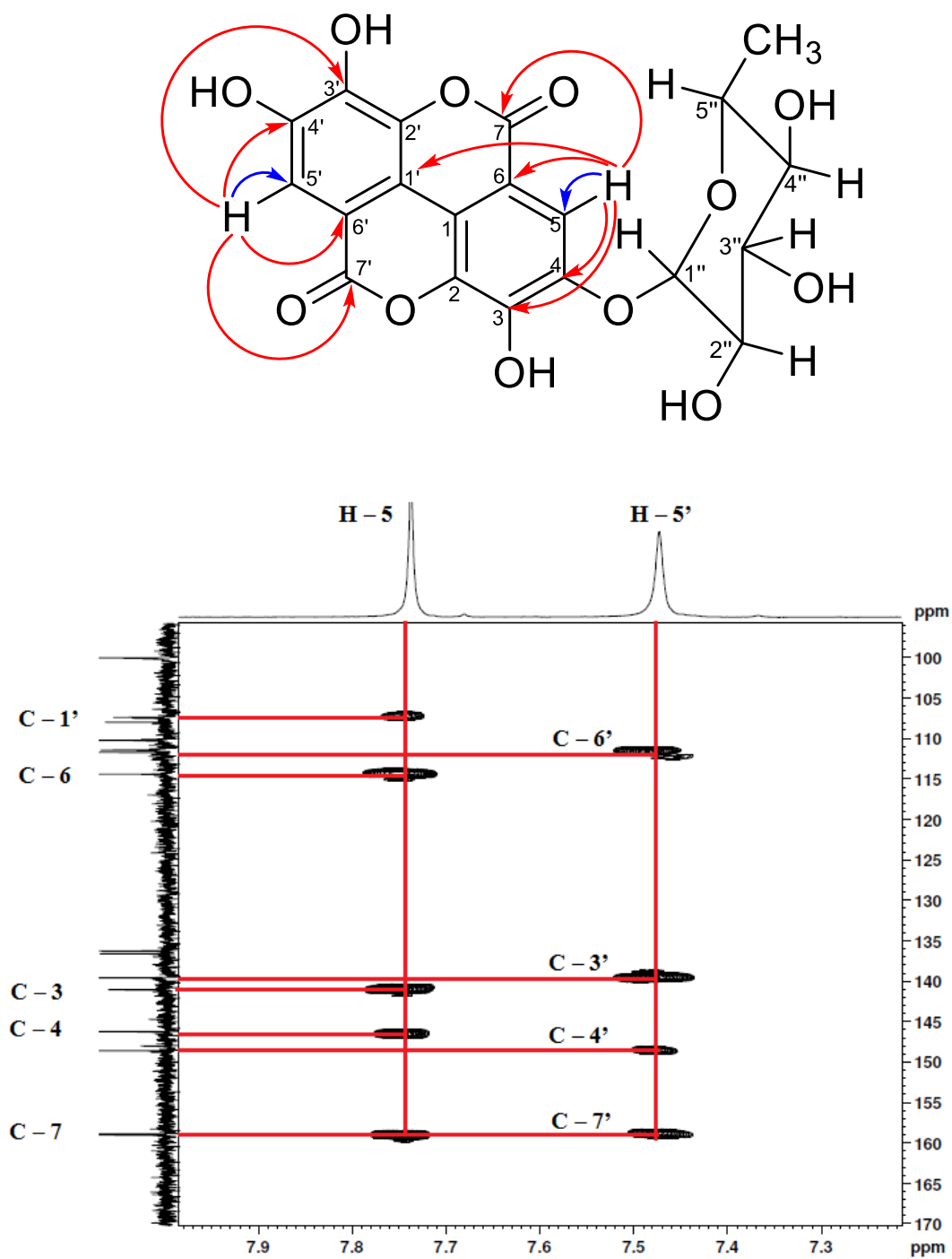
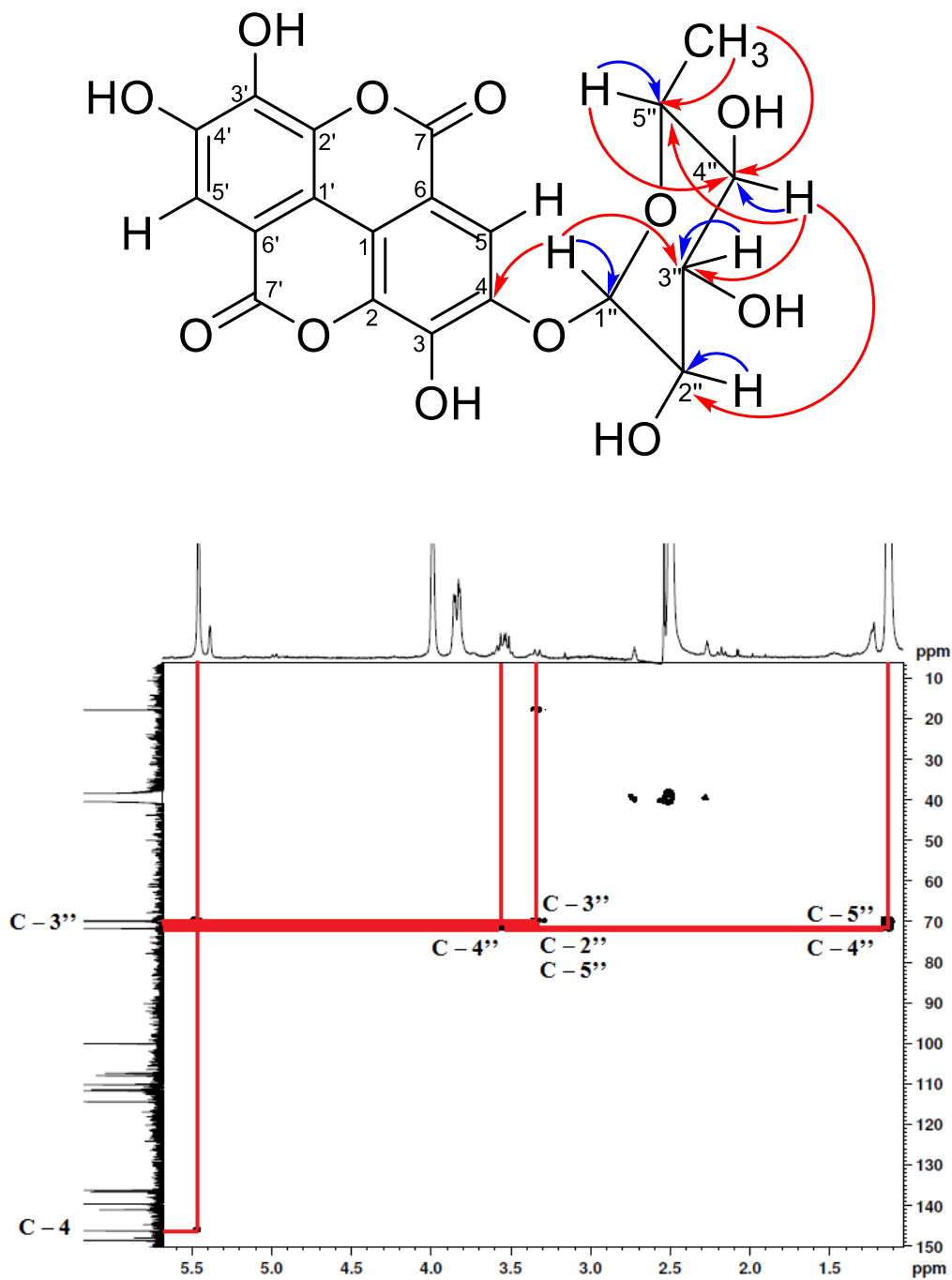


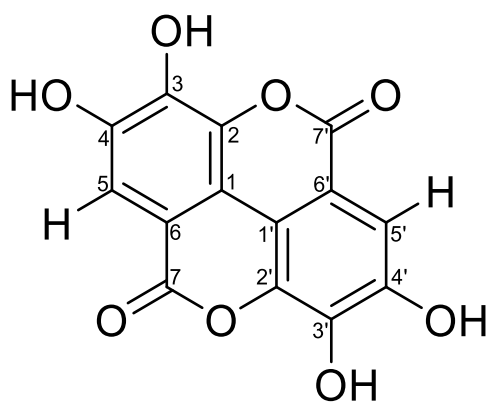
Figura 31: Algumas correlações no HSQC (azul) e HMBC (vermelho) da substância E57B-4 (Eschweilenol C, 50). Continuação.



5.5.5. Identificação da substância E57B-5

A substância E57B-5 apresentou aspecto de um pó amarelado pálido amorfo, com solubilidade baixa em metanol e água; e solubilidade boa em DMSO. No espectro de massa por *electrospray* de alta resolução (EMAR) modo negativo (Anexo 27) o íon da molécula precursora, foi identificado a m/z 300,9999 $[M-H]^-$, o software (Bruker compass data analysis 4.2) propôs a fórmula $C_{14}H_5O_8$ (calculado m/z 300,9990), com um erro de $\Delta = 0,29$ ppm. Com estes dados obtidos e junto com os dados dos espectros de RMN de 1H , HSQC, HMBC e EM2 encontrados na tabela 12 (Anexos 24, 25, 26, 27 e 28), levaram a propor a estrutura do ácido elágico (AE, **23**) (Figura 32) em comparação com valores semelhantes aos descritos em outros trabalhos na literatura (LI *et al.*, 1999; NAWWAR *et al.*, 1994, SILVA *et al.*, 2007).

Figura 32. Estrutura proposta para E57B-5



(23) Ácido elágico

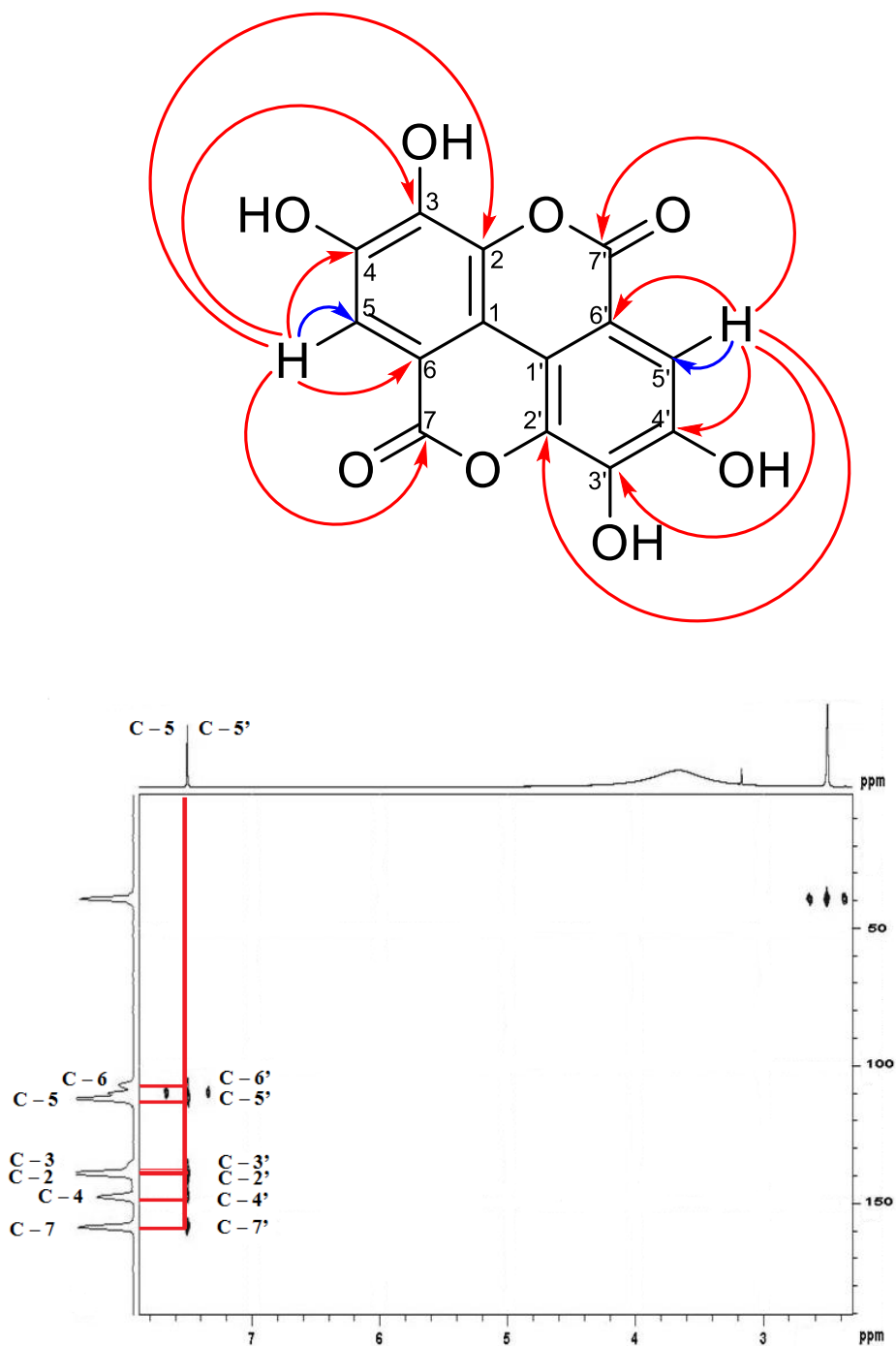
O espectro de RMN de 1H mostrou um sinal em δ_H 7,45 (H-5 e H-5'), correlacionando com δ_C 111,7. O Anexo 24 mostra dois sinais referentes à água e ao DMSO residual, que aparecem em δ_H 3,15 e δ_H 2,49, respectivamente (FULMER *et al.*, 2010), pelo espectro de HSQC, e através do HMBC podemos evidenciar a presença dos demais δ_C 126,1 (C-1 e C-

1'); 143,0 (C-2 e C-2'); 138,6 (C-3 e C-3'); 147,4 (C-4 e C-4'); 111,7 (C-5 e C-5); 107,1 (C-6 e C-6'); 158,4 (C-7 e C-7'). Estes dados ao serem comparados com a literatura, apoiam a proposta para esta amostra (Tabela 12).

Tabela 12. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância E57B-5, comparação com a literatura para ácido elágico.

Posição	LI et al., 1999		SILVA et al., 2007		E57B-5	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1		112,4		112,4		126,1
2		136,3		136,4		143,0
3 OH		139,4		139,7		138,6
4 OH		148,0		148,5		147,4
5	7,47 (s)	110,2	6,91 (s)	110,2	7,45 (s)	111,7
6		107,6		107,5		107,1
7		159,0		159,2		158,4
1'		112,4		112,4		126,1
2'		136,3		136,4		143,0
3' OH		139,4		139,7		138,6
4' OH		148,0		148,5		147,4
5'	7,47 (s)	110,2	6,91 (s)	110,2	7,45 (s)	111,7
6'		107,6		107,5		107,1
7'		159,0		159,2		158,4

Figura 33: Algumas correlações no HSQC (azul) e HMBC (vermelho) da substância E57B-5 (ácido elágico, 23).



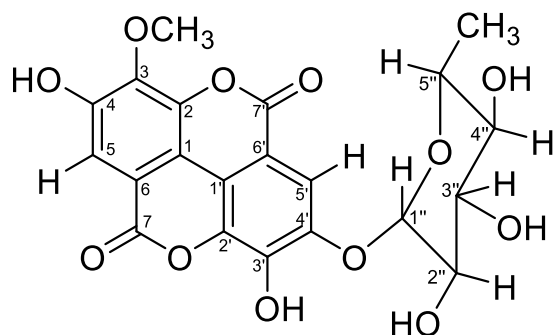
O espectro de massas EM2 de E57B-5 revelou fragmentos a m/z 229 $[M-H-72]^-$ e m/z 185 $[M-H-44]^-$ provenientes das perdas de duas unidades de CO_2 e uma unidade de CO (CHISTÉ E MERCADANTE, 2012; BOULEKBACHE-MAKHLOUF *et al.*, 2012; MENA *et al.*, 2012).

O AE já foi isolado anteriormente do jucá (*Libidibia ferrea*), uma planta de origem amazônica, a partir do extrato etanólico dos frutos (UEDA *et al.*, 2001), do extrato etanólico da casca (WYREPKOWSKI *et al.*, 2014) e nos extratos hidroalcoólicos dos frutos e folhas (VASCONCELOS *et al.*, 2011).

5.5.6. Identificação da substância E57B-6

A substância E57B-6 apresentou-se como sólido amorfo, de cor amarela escura com solubilidade baixa em metanol e água; e solubilidade boa em DMSO. No espectro de massa por *electrospray* de alta resolução (EMAR) modo negativo (Anexo 33) o íon da molécula precursora foi identificado em m/z 461,0723 $[M-H]^-$, o software (Bruker compass data analysis 4.2) propôs a fórmula $C_{21}H_{17}O_{12}^-$ (calculado m/z 461,0725), com um erro de $\Delta = 0,43$ ppm. Com estes dados obtidos e junto com os dados dos espectros de RMN de 1H , HSQC, HMBC, COSY e EM2 encontrados na tabela 13 (Anexos 29, 30, 31, 32, 33 e 34), levaram a propor a estrutura do ácido metil-elágico ramnopiranósideo (**51**) (Figura 34) com valores semelhantes aos descritos em outros trabalhos na literatura (DJOUKENG *et al.*, 2007; EL-TOUMY & RAUWALD, 2003).

Figura 34. Estrutura proposta para E57B-6



(51) ácido metil elágico ramnopiranósideo

No espectro de RMN de ^1H foram observados um total de nove sinais de hidrogênios (Tabela 13). Dois singletos na região de hidrogênios aromáticos (δ_{H} 7,50 e δ_{H} 7,62) foram atribuídos à porção de AE.

Um sinal de metoxila singleto (δ_{H} 4,01) e cinco hidrogênios de metina oxigenada foram observados, juntamente com um dubleto de metila (δ_{H} 1,12), indicando a presença de um açúcar.

Tabela 13. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C , HSQC e HMBC da substância E57B-6, comparação com a literatura para ácido metil-elágico ramnopiranosídeo.

E57B-6					DJOUKENG <i>et al.</i> ,2007	
DMSO- d_6 ; 300 MHz					DMSO- d_6 ; 300 MHz	
N° C	^{13}C	^1H	^1H - ^{13}C -HSQC	^1H - ^{13}C -HMBC	^{13}C	^1H
C - 1	114,0			H - 5 (3J)	113,9	
C - 2					142,7	
C - 3	140,8			H - 5 (3J)	140,9	
C - 4					153,5	
C - 5	112	7,50	H - 5 (1J)		112,2	7,53 (s, 1H)
C - 6					107,7	
C - 7	159,7		H - 7 (1J)	H - 5 (3J)	159,7	
C - 1'					115,2	
C - 2'					137,1	
C - 3'					142,7	
C - 4'	147,4				147,5	
C - 5'		7,62			112,7	7,69 (s, 1H)
C - 6'					112,0	
C - 7'					159,6	
C - 1''	100,43	5,48	H - 1'' (1J)	H - 5'' (3J)	100,8	5,47 (d, 1,4, 1H)
C - 2''	70,5	4,00	H - 2'' (1J)		70,7	4,00 (dd 1,8; 3,2, 1H)
C - 3''	70,0	3,97	H - 3'' (1J)		70,9	3,84 (dd 3,6; 9,8, 1H)
C - 4''	73,3	3,36	H - 4'' (1J)	H - 6'' (2J)	72,7	3,32 (m, 1H)
C - 5''	70,7	3,57	H - 5'' (1J)	H - 6'' (2J)	70,7	3,55 (dq, 1H)
C - 6''	18,5	1,12	H - 6'' (1J)		18,7	1,13 (d, 6,2, 3H)
OCH ₃ - 3	61,38	4,01	H - 3'' (1J)		61,8	4,03 (s, 3H)

Figura 35: Algumas correlações no HSQC (azul) e HMBC (vermelho) da substância E57B-6 (ácido metil elágico ramnopiranosídeo, **51**).

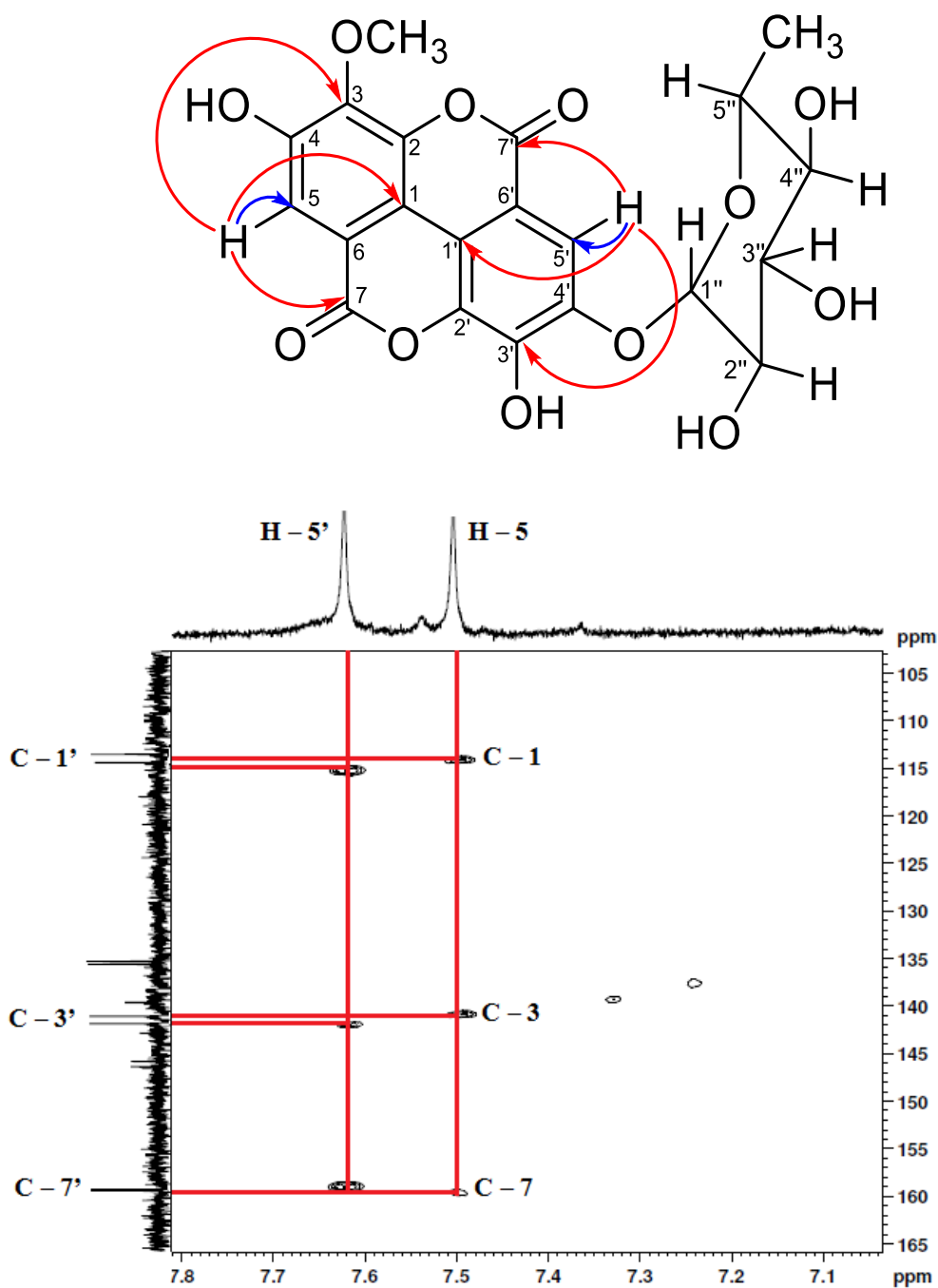
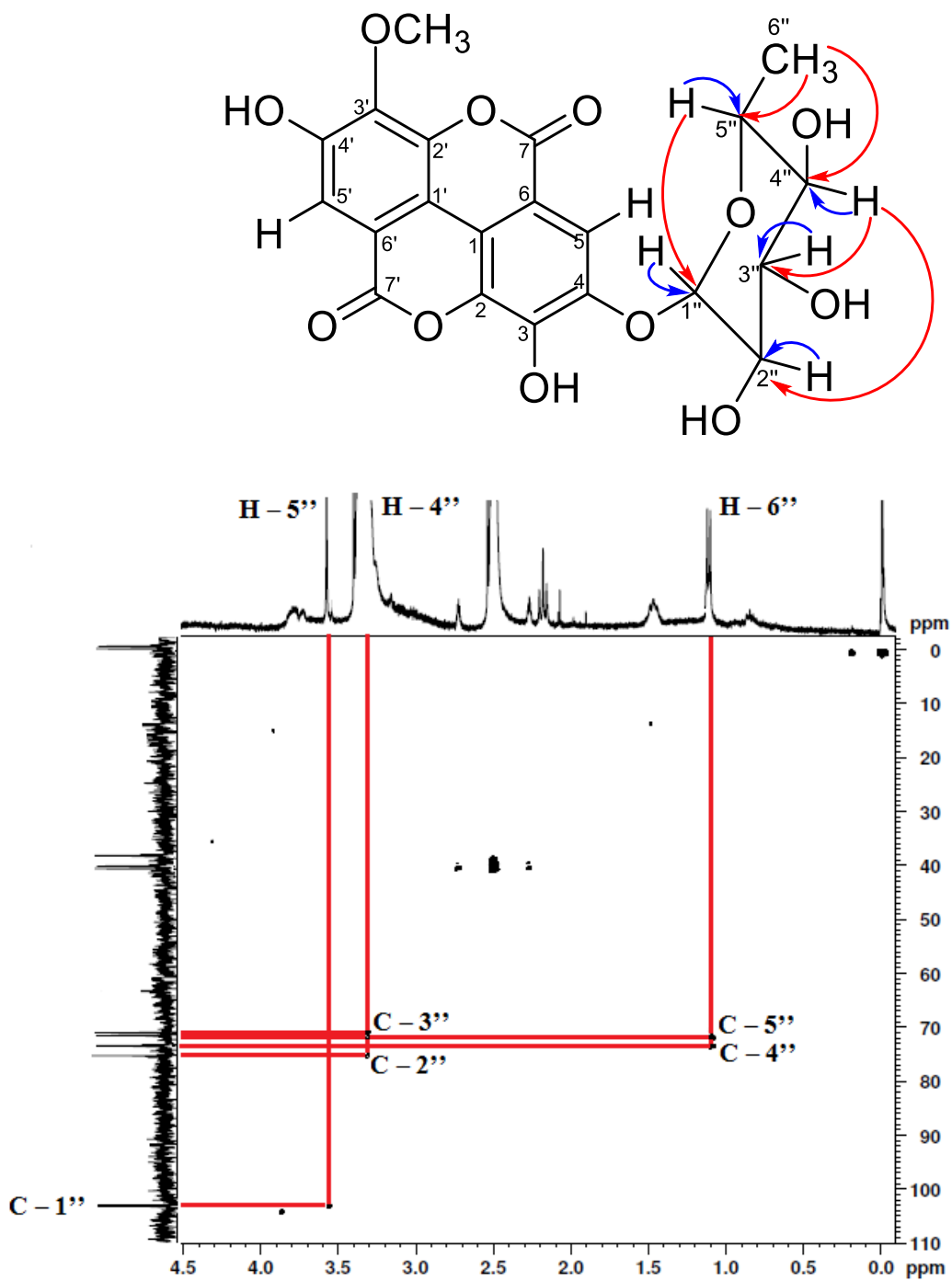


Figura 35: Algumas correlações no HSQC (azul) e HMBC (vermelho) da substância E57B-6 (ácido metil elágico ramnopiranosídeo, **51**). Continuação.



O espectro de massa EM2 de E57B-5 (Anexo 34) revelou fragmentos a m/z 461 [M - H]⁻, seguido de um pico a m/z 315 [M - H - 146]⁻, devido à perda de um resíduo de açúcar (ramnose) (CHISTÉ e MERCADANTE, 2012).

As substâncias identificadas até esta fase, correspondem aos m/z majoritários observados no tratamento quimiométrico dos extratos, onde a correlação entre os m/z e a atividade antimalárica *in vitro*, é evidenciada.

5.6. Resultado do teste antioxidante e antiplasmódico *in vitro* das substâncias

As substâncias foram avaliadas frente à cepa K1 (cloroquina resistente) de *P. falciparum* e os valores de CI_{50} estão apresentados na tabela 14. As classificações de atividade de CI_{50} para substâncias estão de acordo com Rocha e Silva (2014), onde valores de $CI_{50} > 20 \mu\text{M}$ são consideradas como inativas. $20 \mu\text{M} \geq CI_{50} > 5 \mu\text{M}$ são classificadas com atividade moderada. Valores de $5 \mu\text{M} \geq CI_{50} > 0,1 \mu\text{M}$ são consideradas como ativas e valores de $CI_{50} \leq 0,1 \mu\text{M}$ consideradas como muito ativo. São apresentados também os resultados do teste antioxidante das substâncias mediante a reação com DPPH e foram expressos em valores de CI_{50} , por meio da construção de curvas lineares entre a capacidade antioxidante da substância e sua concentração, obtendo-se regressão linear e a equação da reta para cálculo do CI_{50} . Os resultados dos testes são apresentados na tabela 14.

Tabela 14. Atividade antioxidante e antimalárica contra *Plasmodium falciparum* de substâncias isoladas de *B. excelsa*.

N° pico	Substância	DPPH		<i>P. falciparum</i> K1	
		CI ₅₀ (µM)	Atividade	CI ₅₀ e IC 95% (µM)	Atividade
1	ácido valoneico dilactona	20,28	A	9,47 (3,47 - 9,93)	AM
2	ácido elágico hexosídeo	NT	NT	NT	NT
3	ácido elágico pentosídeo	28,96	AM	3,57 (1,83 - 4,54)	A
4	eschweilenol C	35,47	AM	2,62 (0,71 - 3,85)	A
5	ácido elágico	15,58	A	2,08 (1,11 - 3,03)	A
6	ácido metil elágico ramnopiranosídeo	32,10	AM	3,07 (2,82 - 4,17)	A
	ácido gálico	17,05	A	-	-
	cloroquina difosfato	-	-	0,41 (0,40 - 1,01)	A

Nota: A (ativo), AM (atividade moderada), IC (intervalo de confiança), NT (não testado).

Relatos anteriores sobre o AE mostraram suas propriedades antioxidantes eficazes e efeitos biológicos, incluindo atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias, quimioprotetoras antimutagênicas, tumorais e antiplasmodial. (SEERAM et al., 2005; REDDY et al., 2007; FOTIE, 2010; RAMACHANDRAYYA, 2013).

Para atividade antimalárica, o ácido valoneico dilactona (**47**) apresentou CI₅₀ de 9,47 µM, sendo considerada como atividade moderada contra *P. falciparum*. As substâncias ácido elágico pentosídeo (**49**), eschweilenol C (**50**) e ácido metil elágico ramnopiranosídeo (**51**), apresentaram CI₅₀ iguais a 3,57; 2,62 e 3,07 µM, respectivamente, sendo consideradas ativas, por registrarem valores menores a 5 µM. O ácido elágico (**23**) apresentou CI₅₀ 2,8 µM, sendo a substância com maior atividade antiplasmodica entre as substâncias testadas.

De acordo com alguns autores como SOH *et al.* 2008, o AE apresenta alta atividade *in vitro* contra cepas de *P. falciparum*, independentemente de seus níveis de resistência à cloroquina e à mefloquina (concentrações inibitórias de 50%, variando de 0,11 a 0,33 μM). O primeiro relato de inibição do crescimento de *P. falciparum* pelo AE foi realizada por Verotta e colaboradores em 2001, a partir de *Tristaniopsis calobuxus* da Nova Caledônia. Eles obtiveram um CI_{50} de AE independentemente da resistência à cloroquina das cepas utilizadas, entre 103 e 145 ng/mL (0,33 e 0,48 μM). Resultados semelhantes foram encontrados por Banzouzi e colaboradores (2002) com AE de *Alchornea cordifolia* (planta da África Ocidental), com CI_{50} entre 0,20 e 0,50 μM sobre cepas K1. Esses valores estão próximos com o nosso resultado de CI_{50} de AE de 2,08 μM .

O teste utilizando o radical estável DPPH mede a capacidade das substâncias testadas em doar hidrogênio radicalar a este radical, assim, quanto maior o número de hidroxilas presentes na amostra, maior sua atividade antioxidante. A estabilidade do radical formado, é outro fator que influencia no potencial antioxidante, sendo maior nas substâncias que possuem maior capacidade de deslocalizar o radical pela estrutura (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). Em um estudo realizado por Ferreres e colaboradores (2012), descreveram ao AE como um potente limpador de radicais livres. Em este estudo, o ácido elágico (**23**) apresentou maior atividade antioxidante com CI_{50} de 15,58 μM , isto pode ser devido a que o AE é a única substância com dois agrupamentos diidroxila na sua estrutura, enquanto os demais derivados apresentaram apenas um agrupamento diidroxila, e talvez por isso sua atividade foi reduzida. Seguida do AE, o ácido valoneico dilactona (**47**) com CI_{50} de 20,28 μM , apresentou uma boa atividade antioxidante em comparação com as outras substâncias, isto pode ser devido ao número de hidroxilas presentes na sua estrutura, sendo superior aos outros derivados do AE obtidos neste trabalho.

Estes resultados são similares aos encontrados por Zafrilla *et al.* (2001), onde relatam que o AE apresentou a maior atividade antioxidante entre os derivados do ácido elágico isolados da framboesa vermelha, por possuir dois grupos dihidroxila, enquanto os demais derivados (glicosídeos) possuíam apenas uma. Esses autores concluíram que a atividade antioxidante era proporcional ao número de grupos hidroxila por molécula. Além disso, concluíram também que o grau de metilação influencia na atividade antioxidante dos

derivados. O AE apresentou a maior atividade antimalárica e antioxidante entre todos os derivados de AE isolados.

Este estudo revelou que a *B. excelsa* utilizada na medicina tradicional contra a malária contém pelo menos uma substância conhecida (ácido elágico) com atividade antiplasmodial e antioxidante anteriormente relatados. Por outro lado, não foram encontrados dados de *Plasmodium* e atividade antioxidante com as demais substâncias (derivados do ácido elágico) nos principais sites de busca (como Scifinder, Chemspider e Google acadêmico), com isso sugere-se que esta seja o primeiro relato de estas substâncias com estas atividades presentes em *B. excelsa*.

Apesar da atividade *in vitro* das substâncias avaliadas neste trabalho, estudos de citotoxicidade e principalmente estudos *in vivo*, priorizando as substâncias maioritárias (ácido valoneico dilactona, eschweilenol C e ácido elágico) assim como o material de partida, o extrato metanólico enriquecido (E57B) obtidos da *B. excelsa*, devem ser realizados por nosso grupo de pesquisa, para avaliar as substâncias em modelos experimentais, tendo em conta que o ensaio *in vitro* avalia apenas a ação direta das drogas sobre os parasitas sem considerar sua metabolização pelo organismo. Em ensaios *in vivo* é possível avaliar a absorção dessas substâncias, que após serem metabolizadas podem apresentar mudanças na atividade. Desde o ponto de vista farmacológico, os estudos *in vivo* são importantes na avaliação da ação das plantas de uso tradicional.

Com isso, este trabalho demonstra o potencial biológico desta espécie vegetal que, além da atividade antimalárica aqui descrita, apresenta substâncias com elevada atividade antioxidante, podendo apresentar outras atividades biológicas a serem descobertas.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho contribui para o conhecimento da composição química, atividades antiplasmódica e antioxidante da *B. excelsa*, que é a única espécie do gênero ainda sem muitos estudos anteriores. A partir de uma abordagem diferenciada, utilizando dados de EM e métodos quimiométricos, *screening* e atividade antiplasmódica, foi possível analisar diretamente os extratos brutos de resíduos de diferentes partes vegetais de *B. excelsa*, evidenciando-se como uma estratégia útil para relatar extratos ativos *in vitro* frente a *P. falciparum* assim como a identificação dos marcadores químicos presentes.

O resultado deste estudo permitiu o isolamento e identificação do ácido elágico e seus derivados, a partir de resíduos vegetais de *B. excelsa*, sendo considerada como uma fonte promissora de substâncias promotores da saúde, evidenciada em sua forte atividade antiplasmódica e antioxidante demonstrada em este estudo. Portanto, o resíduo da entrecasca tem um potencial importante como matéria-prima para as indústrias alimentícia, farmacêutica e química.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALECRIM, M. D. G. C.; ALECRIM, W.; MACEDO, V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 1, p. 67 – 68, 1999.

ALMEIDA, M. F. O.; MELO, A. C. R.; PINHEIRO, M. L. B.; ANDRADE SILVA, J. R. A.; SOUZA, A. D. L. Constituintes químicos e atividade leishmanicida de *Gustavia elliptica* (Lecythidaceae). **Química Nova**, v. 34, n.7, p. 1182-1187, 2011.

AMBROISE-THOMAS, P.; ROSSIGNOL, J. F. Chemotherapy of resistant falciparum malaria. **Parasitology Today**, v. 2, n. 3, p. 79 – 80, 1986.

ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; MAYA, J. G. S. The volatiles from flowers of *Couroupita guianensis* Aubl., *Lecythis usitata* Miers. var. *paraensis*, *Eschweilera coriacea* Mori (Lecythidaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, p. 163-166, 2000.

ANDRADE-NETO, V.F.; POHLIT, A.M.; PINTO, A.C.; SILVA, E.C.; NOGUEIRA, K.L.; MELO, M.R.; HENRIQUE, M.C.; AMORIM, R.C.; SILVA, L.F.; COSTA, M.R. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 102, p. 359–365, 2007.

ANJANEYULU, R. A new ketosteroid from the bark of *Couroupita guianensis* Aubl. **Indian Journal Chemistry Section B: Organic Chemistry**, v. 37, p. 382–386, 1998.

BAIRD, J. K.; BASRI, H.; PURNOMO; BANGS, M. J.; SUBIANTO, B.; PATCHEN, L. C.; HOFFMAN, S. L. Resistance to Chloroquine by *Plasmodium vivax* in Irian Jaya, Indonesia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 44, n. 5, p. 547–552, 1991.

BANZOZI, J. T.; R. PRADO; H. MENAN; A. VALENTIN; C. ROUMESTAN; M. MALLIE; Y. PELISSIER; Y. BLACHE. *In vitro* antiplasmodial activity of extracts of *Alchornea cordifolia* and identification of an active constituent: ellagic acid. **J. Ethnopharmacol.** n. 81, p. 399 – 401, 2002.

BARAKAT, H.H.; HUSSEIN, S.A.M.; MARZOUK, M.S.; MERFORT, I.; LINSCHIED, M.; NAWWAR, M.A.M. Polyphenolic metabolites of *epilobium hirsutum*. **Phytochemistry** n. 46, p. 935–941. 1997.

BARBOSA, V. DE F. **Caracterização do perfil da ação do ácido gálico e seus derivados sobre processos oxidativos in vitro e ex vivo.** 2010. 82 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2010.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, n. 29, p. 1401-1406, 2006.

BARUA, A. K.; CHAKRABARTI, P.; DUTTA GUPTA, A. S.; PAL, S. K.; BASAK, A.; BANERJEE, S. K.; BASIJ, K. Structure and stereochemistry of barrigenic acid, a new triterpene acid saMpogenin from *Barringtonia acutangula*. **Phytochemistry**. v. 15, n. 11, p. 1780-1781, 1976.

BATE-SMITH, E. C. Detection and determination of ellagitannins. **Phytochemistry**, v. 11, p. 1153-1156. 1972.

BERGMAN, J.; LINDSTROM, J.; TILSTAM, U. The structure and properties of some indolic constituents in *Couroupita guianensis* Aubl. **Tetrahedron**, v. 41, p. 2879-2881, 1995.

BIALONSKA, D.; KASIMSETTY, S. G.; KHAN, S. I.; FERREIRA, D. Urolithins, Intestinal Microbial Metabolites of Pomegranate Ellagitannins, Exhibit Potent Antioxidant

Activity in a Cell-Based Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 21, p. 10181–10186, 11 nov. 2009.

BILLET, D.; HEITZ, S. Triterpenes et acides des amandes de *Barringtonia butonica*. **Phytochemistry**, v. 15, n. 6, p. 1015, 1974.

BOLWELL, G. P. Plant Polyphenols: Vegetable tannins revisited By E. Haslam. Chemistry and Pharmacology of Natural Products (J. D. Phillipson, D. C. Ayres and H. Baxter, Eds). Cambridge University Press: Cambridge, Pp. 230. **BioEssays**, v. 12, n. 9, p. 453–453, 1990.

BONARTES, L. C. M.; ROCHA, J. S.; ABREU, F. J.; SILVA, A. J. P. Etnobotânica do Berimbau. I – Qualidade Industrial. *In*: Congresso Nacional de Botânica, Salvador. **Resumos do Congresso Nacional de Botânica**. Salvador, 1998. 150p.

BONELLI, P. R.; DELLA ROCCA, E. G.; CERELLA, E.G.; CUKIERMAN A. L. Effect of pyrolysis temperature on composition, surface properties and thermal degradation rates of Brazil nuts shells. **Bioresource Technology**, v. 76, n. 1, p. 15-22, 2001.

BORGES, W.N.; **Aplicação de métodos de reconhecimento de padrões para classificação de óleos vegetais**. 2011. 110 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeto de monitoramento da castanha-do-Brasil, Brasília, DF, 2011.

BOULEKBACHE-MAKHLOUF, L.; MEUDEC, E.; MAZAURIC, J. P.; MADANI, K.; CHEYNIER, V. Qualitative and semi-quantitative analysis of phenolics in *Eucalyptus globulus* leaves by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and electrospray ionisation mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v. 24, n. 2, p. 162-70, 2012.

BRAGA, L. F.; SOUSA, M. P.; GILBERTI, S.; CARVALHO, M. A. C. Caracterização morfométrica de sementes de castanha de Sapucaia (*Lecythis Pisonis* Cambess - Lecythidaceae). **Alta Floresta**. v. 5, p.111-116, 2007.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie**, v. 28, p. 25 – 30, 1995.

BRANDÃO, M. G. L., GRANDI, T. S. M., ROCHA, E. M. M., SAWYER, D. R., KRETTLI, A. U. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, p. 175 - 82, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. SIVEP-Malária: Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica: notificação de casos. Disponível em: http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/. Acesso em: 18 jun. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. SINAN Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Disponível em: <http://portalsinan.saude.gov.br/>. Acesso em: 18 jun. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de vigilância em saúde. Guia de Vigilância em Saúde [Internet]. Ministério da Saúde. Vol. único, 3 ed, 2019. Disponível em: <https://bit.ly/2Y5NbK2>.

BRASIL, A.; COSTA, G.; ALECRIM, W. D.; MACÊDO, V.; KORVES, C. T.; ROBERTS, D. R.; LI, J.; SULLIVAN, M.; MCCUTCHAN, T. F. Description of a possible clonal expansion of *Plasmodium vivax* in Manaus - Amazonas – Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 3, p. 303 – 305, 1999.

BRUNS, R. E., SCARMINIO, I. S.; DE BARROS NETO, B. Statistical desingn – Chemometrics; Organic Process Research & Development. **Editora Elsevier**, Amsterdam, v. 10, n. 5, p. 1082 – 1083, 2006.

CALÍN-SÁNCHEZ, Á.; FIGIEL, A.; HERNÁNDEZ, F.; MELGAREJO, P.; LECH, K.; CARBONELL-BARRACHINA, Á. A. Chemical Composition, Antioxidant Capacity, and Sensory Quality of Pomegranate (*Punica granatum L.*) Arils and Rind as Affected by Drying Method. **Food and Bioprocess Technology**, p. 1644 – 1654, 2012.

CAMPOS F. R.; JANUÁRIO A. H.; ROSAS L. V.; NASCIMENTO, S. K. R.; PEREIRA, P. S.; SUZELEI C. FRANÇA, S. C.; CORDEIRO M. S. C.; TOLDO M. P. A.; SÉRGIO, A. Trypanocidal activity of extracts and fractions of *Bertholletia excelsa*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 1, p. 26-29, 2005.

CARVALHO, M. G.; RINCON, V. J.; OLIVEIRA, L. F.; BEZERRA, F. B. Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae). **Química Nova.**, v. 21, p. 740-743, 1998.

CAO, H.; CHEN, X.; JASSBI, A. R.; XIAO, J. Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. **Biotechnology advances**, 4 nov. 2014.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99 - 105, 1998.

CERDÁ, B.; LLORACH, R.; CERÓN, J. J.; ESPÍN, J. C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. **European Journal of Nutrition**, v. 42, n. 1, p. 18 – 28, 2003.

CERDÁ, B.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ESPÍN, J. C. Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts, and oak-aged wine in humans: Identification of biomarkers and individual variability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 227–235, 2005.

CHIANG, H. M. et al., *Neonauclea reticulata* (Havil.) Merr stimulates skin regeneration after UVB exposure via ROS scavenging and modulation of the MAPK / MMPs / collagen pathway. *J. Evid. Based. Complementary Altern. Med.*, 2013.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CHISTÉ, R. S. & MERCADANTE, Z. M. Identification and quantification, by HPLC-DAD-MS/MS of carotenoids and phenolic compounds from the Amazonian fruit *Caryocar villosum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 5884 – 5892, 2012.

CHUNHIENG, T., HAFIDI, A., PIOCH, D., BROCHIER, J.; MONTET, D. Detailed study of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) oil microcompounds: phospholipids, tocopherols and sterols. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 7, p. 1374-1380. 2008.

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 1, p. 159 - 175, 2009.

COSTA, P. M.; CARVALHO, M. G. New triterpene isolated from *Eschweilera longipes* (Lecythidaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 75, p. 21-25, 2003.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids: chemistry, metabolism, cardio-protective effects, and dietary sources. **Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 66 - 76, 1996.

COWMAN, A. F.; HEALER, J.; MARAPANA, D.; MARSH, K. Malaria: Biology and Disease. Review. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 610 – 624, 2016.

COX-SINGH, J.; DAVIS, T. M. E.; LEE, K. S.; SHASUL, S. S. G.; MATUSOP, A.; RATMAN, S.; RAHMAN, H. A.; CONWAY, D. J.; SINGH, B. *Plasmodium knowlesi* malaria in human is widely distributed and potentially life treating. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, n. 2, p. 165 – 171, 2008.

DANIEL, E M.; KRUPNICK, A. S.; HEUR, Y. H.; BLINZLER, J. A.; NIMS, R. W.; STONER, G. D. Extraction, stability and quantification of ellagic acid in various fruits and nuts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 2, p. 338 - 349, 1989.

DE SOUZA, J. Epidemiological distribution of *Plasmodium falciparum* drug resistance in Brazil and its relevance to the treatment and control of malaria. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 3, p. 343 – 348, 1992.

DE SOUZA, J.M. A phase II clinical trial of mefloquine in Brazilian male subjects. **Bull World Health Organ**, v. 61, n. 5, p. 815 – 820, 1983.

DEHARO, E.; GINSBURG, H. Analysis of additivity and synergism in the anti-plasmodial effect of purified compounds from plant extracts. **Malaria Journal**, v. 10, n. 5, p. 1 - 5, 2011.

DENADAI, B. S.; RUAS, V. D.; FIGUEIRA, T. R. Maximal lactate steady state concentration independent of pedal cadence in active individuals. **European Journal of Applied Physiology**. v. 96, p. 477-480, 2006.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2009.

DJOUKENG, J. D.; ABOU-MANSOUR, E.; TAPONDJOU, L.; LONTSI, D.; TABACCHI, R. Identification of ellagic acid derivatives from stem bark of *Syzygium guineense* (Myrtaceae). **Natural Product Communications**, v. 2, n. 0, p. 1-6, 2007.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J. Dos.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante, **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 26, p. 446-452, 2006.

DUKE, J.A.; VASQUEZ, R. 1994. *Amazonian ethnobotanical dictionary*. **CRC Press**, Boca Raton, Florida, USA. 215 p.

EKNAT, A. A.; SHIVCHANDRAJI, L. K. Beta - amirin palmitate isolation on from *Couroupita guianensis* Aubl. leaves. **Indian Drugs**, v. 39, p. 213-216, 2002.

EL-SEEDI, H. Coumarins, benzoic acids and terpenoids from *Palicourea demissa*. **Revista Latinoamericana de Química**. v. 27, p. 13-16, 1999.

EL-TOUMY SA, RAUWALD HW. Two new ellagic acid rhamnosides from *Punica granatum* heartwood. **Planta Medica**, 69: 682-684, 2003.

ELISABETSKY, E. Saber tradicional e repartição de benefícios: por quê? In: Direitos de recursos tradicionais: formas de proteção e repartição de benefícios, MING, L.C.; CARVALHO, I.; VASCONCELLOS, M.C.; RADOMSKI, M.I.; COSTA, M.A.G. (Orgs.), p.47-54, Botucatu: SBEE – Unesp. 2005.

ESPÍN, J. C.; GONZÁLEZ-BARRIO, R.; CERDÁ, B.; LÓPEZ-BOTE, C.; REY, A. I.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Iberian pig as a model to clarify obscure points in the bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 25, p. 10476 – 10485, 2007.

ESPÍN, J. C.; LARROSA, M.; GARCÍA-CONESA, M. T.; TOMÁS-BARBERÁN, F. Biological Significance of Urolithins, the Gut Microbial Ellagic Acid-Derived Metabolites: The Evidence So Far. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1 – 15, 2013.

FERGUSON, L. R.; HARRIS, P. J. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. **European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)**, v. 8, p. 17–25, 1999.

FERREIRA, M. M. C. Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações. Campinas: Unicamp, 2015.

FERRERES, F.; GROSSO, C.; GIL-IZQUIERDO, A.; VALENTÃO, A. P.; ANDRADE, P. B. Ellagic Acid and Derivatives from *Cochlospermum angolensis* Welw. Extracts: HPLC–DAD–ESI/MSn Profiling, Quantification and In Vitro Anti-depressant, Anti-cholinesterase and Anti-oxidant Activities. **Phytochemical Analysis**, v. 24, n. 6, p. 534-540, 2013.

FOTIE, J. The potential of ellagic acid as a possible antimalarial drug candidate. **Current Bioactive Compounds**, v. 6, n. 3, p. 161-177, 2010.

FRACASSETTI, D.; COSTA, C.; MOULAY, L.; TOMÁS-BARBERÁN, F. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, n. 139, v. 1 -4, p. 578–588, 2013.

FRANCO, L. L.; GOMES, P. R.; VALE, M. S.; ALMEIDA, M. V. Síntese de tetraoxanos, candidatos a antimaláricos. **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009.

FRANÇA, T. C. C. Santos, M.G., Figueroa-Villar, J.D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271 - 1278, 2008.

FRAUSIN, G.; HIDALGO A. F.; LIMA R. B. S.; KINUPPV. F.; MING L. C.; POHLIT A. M.; WILLIAM MILLIKEN W. An ethnobotanical study of anti-malarial plants among indigenous people on the upper Negro River in the Brazilian Amazon. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 174, p. 238 - 252, 2015.

FULMER, G.R.; MILLER, A. J. M.; SHERDEN, H. E. G.; NUDELMAN, A.; STOLTZ, B. M.; BERCAW, J. E.; GOLDBERG, K.I. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. **Organometallics**, v. 29, p. 2176-2179, 2010.

GIL, M.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; HESS-PIERCE, B.; HOLCROFT, D. M.; KADER, A. A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 48, v. 10, p. 4581 – 4589, 2000.

GREGSON, A.; PLOWE, C. V. Mechanisms of Resistance of Malaria Parasites to Antifolates. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 1, p. 117 – 145, 2005.

GRENAND, P.; MORETTI, C.; JACQUEMIN, H.; **Pharmacopées traditionnelles en Guyane, (Créoles, Palikur, Wayãpi)**. Paris: Institut François de Recherche Scientifique Pour Le Développement en Coopérat, 1987.

GRUNDHÖFER, P.; NIEMETZ, R.; SCHILLING, G.; GROSS, G. G. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins. **Phytochemistry**, v. 57, p. 915 – 927, 2001.

HATANO, T.; YASURARA, R.; YOSHIHARA, R.; AGATA, I.; NORO, T.; OKUDA, T.; *Chem. Pharm. Bull.* Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative

astringency and radical scavenging effects. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 6, p. 2090 - 2097, 1988.

FRANÇA, C. C. T; SANTOS, M. G; FUIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos histológicos e quimiometria. **Química Nova**, vol. 31, nº 5, SP, 2008.

HARINASUTA, T.; SUNTHARASAMAI, P.; VIRAVAN, C. Chloroquine-resistant falciparum malaria in Thailand. **The Lancet**, v. 286, n. 7414, p. 657 – 660, 1965.

HAY, S. I.; GUERRA, C. A.; TATEM, A. J.; NOOR, A. M.; SNOW, R. W. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. **Lancet Infect. Dis.**, v. 4, n. 6, p. 327 – 336, 2004.

HELDT, H.; Plant Biochemistry and Molecular Biology, **New Phytologist**. University Press: Oxford, v. 144, p. 209 – 211, 1999.

HENNING, S. M.; SEERAM, N. P.; ZHANG, Y.; LI, L.; GAO, K.; LEE, R.; WANG, D. C.; ZERLIN, A.; KARP, H.; THAMES, G.; KOTLERMAN, J.; LI, Z.; HEBER, D. Strawberry Consumption Is Associated with Increased Antioxidant Capacity in Serum. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 1, p. 116 – 122, 2010.

HENRIQUE, M.C.; NUNOMURA, S.M.; POHLIT, A.M. Alcalóides indólicos das cascas de *Aspidosperma vargasii* e *A. desmanthum*. **Química Nova**, v. 33, p. 2284-2287, 2010.

HIRANO, Y.; KONDO, R.; SAKAI, K.; J. 5α -Reductase inhibitory tannin-related compounds isolated from *Shorea leavifolia*. **Journal of Wood Science**, Japan, v. 49, p. 339 - 343, 2003.

JARDIM, M. A. G.; MEDEIROS, T. D. S. Plantas oleaginosas do estado do Pará: composição florística e usos medicinais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 87, p.124-127, 2006.

JOHN, J. A.; SHAHIDI, Fereidoon. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 3, p.196 - 209, 2010.

KAKUDA, T.; SUGIMOTO, A.; UNNO, T. Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, n. 2, p. 391-5. 2004.

KLAYMAN, D.L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. **Science** v. 228, p. 1049 – 1055. 1985.

KORNSTEINER, M.; WAGNER, K; ELMADFA, I. Tocopherols and total phenolic in 10 different nut types. **Food Chemistry**, n. 98, p. 381 - 387, 2006.

KRETTLI, A.; ADEBAYO, J.; KRETTLI, L. Testing of natural products and synthetic molecules aiming at new antimalarials. **Current Drug Targets**, v. 10, n. 3, p. 261 - 270, 2009.

KYRIAKIS, E.; STRAVODIMOS, G. A.; KANTSADI, A. L.; CHATZILEONTIADOU, D. S. M.; SKAMNAKI, V. T.; LEONIDAS, D. D. Natural flavonoids as antidiabetic agents. The binding of gallic and ellagic acids to glycogen phosphorylase b. **FEBS Letters**, v. 589, n. 15, p. 1787 – 1794, 2015.

LI, H.; DENG, Z.; LIU, R.; LOEWEN, S.; TSAO, R. Bioaccessibility, in vitro antioxidant activities and in vivo anti-inflammatory activities of a purple tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Food Chemistry**, v. 159, p. 353 – 360, 2014.

LI X. C.; HALA N.; ELSOHLY C. D.; HUFFORD A. M C. NMR assignments of ellagic acid derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, n. 37, p. 856 - 859, 1999.

LIN, Z.; LIN, C.; FU, C.; LU, F.; JIN, H.; CHEN, Q.; PAN, J. The Protective Effect of Ellagic Acid (EA) in Osteoarthritis: An in Vitro and in Vivo Study. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 125, p. 1 – 9, 2020.

LOCATELLI, M.; VIEIRA, A.H.; GAMA, M.G.R.; MARTINS, E.P.; FILHO, E.P.S.; SOUZA, V.F.; MACEDO, R.S. Cultivo da castanha-do-Brasil em Rondônia. Rondônia: **Embrapa Rondônia** (Sistemas de Produção, 7). 2011.

LOOAREESUWAN, S.; VIRAVAN, C.; VANIJANONTA, S.; WILAIRATANA, P.; SUNTHARASAMAI, P.; CHAROENLARP, P.; ARNOLD, K.; KYLE, D.; WEBSTER, K.; CANFIELD, C. Randomised trial of artesunate and mefloquine alone and in sequence for acute uncomplicated falciparum malaria. **The Lancet**, v. 339, n. 8797, p. 821 – 824, 1992.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: Manual de Identificação e cultivos de plantas arbóreas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 2002.

LORENZI, H. E.; MATOS, F.J. DE A. Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**. 512 p., 2002.

MAHATO, S. B.; DUTTA, N. L. Sterols from *Careya arborea*. **Phytochemistry**, v.11, n. 6, p. 2116 – 2117, 1972.

MAINIERI, C. Identificação das Principais Madeiras de Comércio do Brasil. **Boletim IPT**. v. 16, p. 1-189, 1983.

MANDAL, S. M.; CHAKRABORTY, D.; DEY, S. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 4, p. 359-368, 2010.

MANZALI, S. I. A resistência à cloroquina e a busca de antimaláricas entre as décadas de 1960 e 1980. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, v. 18, n. 2, p. 407 – 430, 2011.

MARTINELLI, G. & MORAES, M. A. (Orgs.). Livro Vermelho da Flora do Brasil. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Centro Nacional de Conservação da Flora, Rio de Janeiro. 1100 pp.

MARTINS, L. Malária e medicina popular: efeito da *Bertholletia excelsa* H. B. K. (castanha-do-Pará) em camundongos infetados com *Plasmodium berguei*. Belém, Pará, Tese de Doutorado, Universidade Federal do Pará/Programa De Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, 2013.

MARVALIN, C.; AZERAD, R. Microbial glucuronidation of polyphenols. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 73, n. 1 - 4, p. 43 – 52, 2011.

MASSART, D. L. et al., **Chemometrics: a textbook**, editora Elsevier, Amsterdam, 1988.

MENA, P.; CALANI, L.; DALL'ASTA, C.; GALAVERNA, G.; GARCIA-VIGUERA, C. BRUNI, R.; CROZIER, A.; DEL RIO, D. Rapid and comprehensive evaluation of (Poly)phenolic Compounds in Pomegranate (*Punica granatum L.*) Juice by UHPLC-MSn. **Molecules**, v. 17, p. 14821 - 14840, 2012.

MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, Teresina, v. 21, n. 4. p. 467 - 469, 1998.

MONTOIA, A. Semi-Síntese de derivados da elipticina e atividade antimalárica de isolados e infusão de *Aspidosperma vargasii*. Programa de Pós-graduação em Química. Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2013.

MOORE, D. V.; LANIER, J. E. Observations on Two *Plasmodium Falciparum* Infections with an Abnormal Response to Chloroquine. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 10, p. 5 – 9, 1961.

MORI, S. A. Lecythidaceae, In: HAMMEL, B. E.; GRAYUM, M. H.; HERRERA, C.; ZAMORA, M (Eds.). Manual de plantas de Costa Rica. Volume VI. Dicotiledóneas (Haloragaceae-Phytolaccaceae). **Missouri Botanical Garden Press**, St. Louis, Missouri. 173 - 186, 2007.

MORI, S.A.; SMITH, N.P.; CORNEJO, X. & PRANCE, G.T. The Lecythidaceae (<http://sweetgum.nybg.org/lp/index.php>). **The New York Botanical Garden**, Bronx, New York. 2010. Acesso: 14 de Agosto 2020.

MOORTHY, V. S.; GOOD, M. F.; HILL, A. V. Malaria vaccine developments. **The Lancet**, v. 363, n. 9403, p. 150 – 156, 2004.

NASCIMENTO, J. M.; CONCEIÇÃO, G. M. Plantas medicinais e indicações terapêuticas da comunidade quilombola olho d'água do raposo, Caxias, Maranhão. **Revista de Biologia e Farmácia**. v. 6, p. 138-151, 2011.

NAWWAR, M. A. M.; HUSSEIN, S. A. M.; MERFORT, I. NMR spectral analysis of polyphenols from *Punica granatum*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 3, p. 793 - 798, 1994.

NEIVA, A. Formação de raça do hematozoário do impaludismo resistente á quinina. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 2, n. 1, p. 131 – 140, 1910.

NETO, V. Q.; BAKKE, O. A.; RAMOS, C. M. P.; BORA, P. S.; LETELIER, J. C.; CONCEIÇÃO, M. M. Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K) seed kernel oil: characterization and thermal stability. **Revista Biologia de Farmacognosia.**, v. 3, p. 33-42, 2009.

NORONHA, E.; ALECRIM, M. G.; ROMERO, G. A. S.; MACÊDO, V. RIII mefloquine resistance in children with falciparum malaria in Manaus, AM, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 2, p. 201 – 205, 2000.

NOSTEN, F.; VAN VUGT, M.; PRICE, R.; LUXEMBURGER, C.; THWAY, K. L.; BROCKMAN, A.; MCGREADY, R.; TER KUILE, F.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N.J. Effects of artesunate-mefloquine combination on incidence of *Plasmodium falciparum* malaria and mefloquine resistance in western Thailand: a prospective study. **The Lancet** v. 356, n. 9226, p. 297 – 302, 2000.

NUNCIO-JÁUREGUI, N.; NOWICKA, P.; MUNERA-PICAZO, S.; HERNÁNDEZ, F.; CARBONELL-BARRACHINA, Á. A.; WOJDYŁO, A. Identification and quantification of major derivatives of ellagic acid and antioxidant properties of thinning and ripe Spanish pomegranates. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 354–364, 2015.

NUNES, C. A.; FREITAS, M. P.; PINHEIRO A. C. M.; BASTOS S. C. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, n. 23, p. 2003-2010, 2012.

OLIVEIRA, A. A.; FRANÇA, T. C. C. Lactato desidrogenase como alvo molecular para quimioterapia antimalarial. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**, n. 28, p. 24-39, 2011.

OLIVEIRA, D. R.; KRETTLI A. U.; AGUIAR A. C. C.; LEITÃO G. G.; VIEIRA M. N.; MARTINS K. S.; LEITÃO S. G. Ethnopharmacological evaluation of medicinal plants used against malaria by quilombola communities from Oriximiná, Brazil. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 424-434, 2015.

OLIVEIRA, J. P. C. **Estudo químico e farmacológico de *Lecythis pisonis* Camb. (Lecythidaceae)**. 2010. 120 f. Dissertação. (Mestrado em Química), Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2010.

OLIVEIRA, E. C. D. S. **Utilização da RMN Associada a Métodos Quimiométricos na Caracterização de Petróleos e Derivados**. 2016. 115 f. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Santa Catarina, 2016.

OTTO, M.; *Chemometrics – Statistics and Computer application in Analytical Chemistry*; Weinheim: **Wiley**, 1999.

PANERO F. S.; VIEIRA M. F. P.; CRUZ Â. M. F.; MOURA M. F. V.; DA SILVA H. E. B. Aplicação da análise exploratória de dados na discriminação geográfica do quiabo do Rio Grande do Norte e Pernambuco. **Eclética química**, v. 34, n. 3, p. 33 – 40, 2009.

PANT, P.; RASTOGI, R. P. The triterpenoids. **Phytochemistry**. v. 18, p. 1095-1108, 1979.

PARK, S. W.; KWON, M. J.; YOO, J. Y.; CHOI, H.-J.; AHN, Y.-J. Antiviral activity and possible mode of action of ellagic acid identified in *Lagerstroemia speciosa* leaves toward human rhinoviruses. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 171, 2014.

PETERS, W. Drug resistance in *Plasmodium berghei* Vincke and Lips, 1948. 3. Multiple drug resistance. **Experimental Parasitology**, v. 17, n. 1, p. 97 - 102, 1965.

PETTIR, G.R.; ZHANG, Q.; PINILLA, V.; HERALD, D.L.; DOUBEK, D.L.; DUKE, J. A. Isolation and structure of gustastatin from the Brazilian nut tree *Gustavia Hexapetala*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 6, p. 983 - 985, 2004.

PINTO, A.C.; SILVA, L.F.; CAVALCANTI, B.C.; MELO, M.R.; CHAVES, F.C.; LOTUFO, L.V.; DE MORAES, M.O.; DE ANDRADE-NETO, V.F.; TADEI, W.P.; PESSOA, C.O.; VIEIRA, P.P.; and POHLIT, A.M. New antimalarial and cytotoxic 4-nerolidylcatechol derivatives. *Eur J Med Chem*, v. 44, n. 6, p. 2731-2735, 2009.

POLLEY, S. D.; McROBERT, L.; SUTHERLAND, C. J. Vaccination for vivax malaria: targeting the invaders. **Trends Parasitol.**, v. 20, n. 3, p. 99 – 102, 2004.

POHLIT A. M.; LIMA R. B. S.; FRAUSIN G.; SILVA L. F. R. E.; LOPES S. C.; MORAES C. B.; CRAVO P.; LACERDA M. V. G.; SIQUEIRA A. M., FREITAS-JUNIOR L. H.; COSTA F. T. M. Amazonian plant natural products: perspectives for discovery of new antimalarial drug leads. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9219 – 9240, 2013.

PRANCE, G.T & JONGKIND, C.C.H. A revision of African Lecythidaceae. **Kew Bulletin** v. 70, n. 6, p. 1-68. 2015.

PRANCE, G.T & KARTAWINATA, E.K. Lecythidaceae. *In*: Nootboom, H.P. & Welzen, P.C. van. (eds.). Flora Malesiana. Series I: Seed Plants. Vol. 21. Lecythidaceae-Peraceae. **Naturalis Biodiversity Center**, Leiden. p. 1-118, 2013.

PRANCE, G. T. & S. A. MORI. Lecythidaceae - Part I. The actinomorphic-flowered New World Lecythidaceae (*Asteranthos*, *Gustavia*, *Grias*, *Allantoma* and *Cariniana*). **Flora Neotropica Monographs** 21: 1 - 270, 1979.

PRANCE, G. T.; MORI, S. A. Lecythidaceae. *In*: KUBITZKI, K. (Ed.). The Families and Genera of Vascular Plants. **Nova York: Springer-Verlag**, p. 221-232, 2004.

PRICE, R.; NOSTEN, F.; LUXEMBURGER, C.; TER KUILE, F.; PAIPHUN, L.; PRICE, R.; LUXEMBURGER, C.; CHONGSUPHAJASIDDHI, T.; WHITE, N.; PRICE, R.; NOSTEN, F.; WHITE, N.; TER KUILE, F. Effects of artemisinin derivatives on malaria transmissibility. **The Lancet**, v. 347, n. 9016, p. 1654 – 1658, 1996.

RAMACHANDRAYYA S. A.; SUNITHA V.; BHAT H. P.; PALATTY P. L ; BALIGA, S. Phytochemicals Are Effective in the Prevention of Ethanol-Induced Hepatotoxicity:

Preclinical Observations. **Bioactive Food as Dietary Interventions for Liver and Gastrointestinal Disease**. p. 743 - 758, 2013.

REDDY, M. K.; S. K. GUPTA; M. R. JACOB; S. I. KHAN; D. FERREIRA. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. **Planta Med**, n. 73, p. 461 – 467, 2007.

REYES, A. E. L. **Trilhas da ESALQ**. CIIAGRI-USP. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/trilhas/medicina/am12.htm?PHPSESSID=19bd21a234c17b180f3651070918e1c0>>. Acesso em: 04 de julho de 2020.

REVILLA, J. **Apontamentos para a cosmética amazônica**. Manaus: Sebrae/Am, Inpa, 2002.

RIECKMANN, K. H.; DAVIS, D. R.; HUTTON, D. C. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? **The Lancet**, v. 333, n. 8673, p. 1183 – 1184, 1989.

RIECKMANN, K.H.; CAMPBELL, G.H.; SAX, L.J.; and MREMA, J.E. Drug sensitivity of plasmodium falciparum. An in-vitro microtechnique. **The Lancet**, v. 1, n. 8054, p. 22-3, 1978.

ROCHA E SILVA, L. F.; Silva A. C. P.; Pohlit A. M; Quignard E. L. J.; Vieira P. P. R.; Tadei W. P.; Chaves F. C. M.; Samonek J. F.; Lima C. A. J. L.; Costa M. R. F.; Alecrim M. G. C.; Andrade-Neto V. F. *In vivo* and *in vitro* antimalarial activity of 4-nerolidylcatechol. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 8, p. 1181-1188, 2011.

ROSENTHAL, Philip J. **Antimalarial chemotherapy: mechanisms of action, resistance, and new directions in drug discovery**. Totowa: MD Humana Press. 2001.

ROW, L. R.; SANTRY, C. S. P.; SURYNAYANA, P. Chemical examination of *Couroupita guianensis*. **Current Science**, v. 35, p. 146-147, 1966.

RYAN, E.; GALVIN, K.; O'CONNOR, T.P.; MAGUIRE, A.R.; O'BRIEN, N.M. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of Brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, London, v. 57, n. 3, p. 219-228, 2006.

SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin like compounds nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1094-1117, 2000.

SANTOS, E. N. Triagem farmacológica de plantas medicinais usadas popularmente em Mato Grosso como anti-inflamatórias e validação pré-clínica de *Cariniana rubra* Gardner ex Miers (jequitibá-vermelho) como anti-inflamatória. 2000. Dissertação. Universidade Federal de Mato Grosso, 2000.

SANTOS, S. A. O., VILELA, C., FREIRE, C. S. R., NETO, C. P., & SILVESTRE, A. J. D. Ultrahigh performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry applied to the identification of valuable phenolic compounds from Eucalyptus wood. **Journal of Chromatography B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, v. 1, n. 938, p. 65 – 74, 2013.

SANZ-BISET J., CAMPOS-DE-LA-CRUZ J., EPIQUIÉN-RIVERA M. A. AND CAÑIGUERAL S. A first survey on the medicinal plants of the Chazuta Valley (Peruvian Amazon). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 2, p. 333-362, 2009.

SCHIOZER, A. L.; CABRAL, E. C.; GODOY, L. A. F.; CHAVES, F. C. M.; POPPI, R. J.; RIVEROS, J. M.; EBERLIN, M. N.; BARATA, L. E. S. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of extracts of the leaves of *Arrabidaea chica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 409-414, 2012.

SEERAM, N. P.; L. S. ADAMS; S. M. HENNING; Y. NIU; Y. ZHANG; M. G. NAIR; D. HEBER. *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. **J. Nutr. Biochem.**, n. 16, p. 360 – 367, 2005.

SEERAM, N. P.; LEE, R.; SCHEULLER, S.; HERBER, D. Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. **Food Chemistry**, v 97, p. 1-11, 2006.

SEN, A. K.; MAHATO, S. B.; DUTTA, N. L. A Couroupitine, A new alkaloid from *Couroupita guianensis*. **Tetrahedron Letters**, v. 7, p 609-610, 1974.

SEVERINI, C.; MENEGON, M. Resistance to antimalarial drugs: An endless world war against Plasmodium that we risk losing. **J. Glob. Antimicrob. Resist.**, v. 3, n. 2, p. 58 – 63, 2015.

SHARMA, A.; KHANDURI, U. How Bening is bening tertian malaria?. **J. Vector Borne Dis.**, v. 46, n. 2, p. 141 – 144, 2009.

SILVA, E. C.; CAVALCANTI, B. C.; AMORIM, R. C.; LUCENA, J. F.; QUADROS, D. S.; TADEI, W. P.; MONTENEGRO, R. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; NUNOMURA, R. C.; NUNOMURA, S. M.; MELO, M. R.; ANDRADE-NETO, V. F.; SILVA, L. F.; VIEIRA, P. P.; POHLIT, A. M. Biological activity of neosergeolide and isobrucein B (and two semi-synthetic derivatives) isolated from the Amazonian medicinal plant *Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 1, p. 48-56, 2009.

SILVA, H. R.; SILVA, C.C.M.; NETO, L.B.C.; LOPES, J.A.D.; CITÓ, A.M.G.L.; CHAVES, M.H. Constituintes químicos das cascas do caule de *Cenostigma macrophyllum*: Ocorrência de colesterol. **Química Nova**, v. 30, p. 1877–1881, 2007.

SILVA, F.; HANNA, A.; DE SOUZA, A.; DA SILVA FILHO, F.; CANHOTO, O.; MAGALHÃES A.; BENEVIDES, P.; AZEVEDO, M., SIANI, A.; POHLIT, A., SOUZA, A.; KOOLEN, H. Integrative analysis based on HPLC-DAD-MS/MS and NMR of *Bertholletia excelsa* bark biomass residues: Determination of ellagic acid derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 30, n. 4, p. 830 - 836, 2019.

SMITH, N.P.; MORI, S.A. & PRANCE, G.T. 2015. Lecythidaceae. In: Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Acesso em: 10 out. 2018.

SNYDER L. R. Classification of the solvent properties of common liquids. **Journal of Chromatography A**. v., 92, n. 2, p., 223-230, 1974.

SOH, P. N.; WITKOWSKI B.; OLAGNIER D.; NICOLAU M. L.; GARCIA-ALVAREZ M. C.; BERRY A.; BENOIT-VICAL F. *In vitro* and *in vivo* properties of ellagic acid in malaria treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 3, p. 1100-1106, 2008.

SOUZA, A. D. L.; ROCHA, A. F. I.; PINHEIRO, M. L. B.; ANDRADE, C. H. S.; GALOTTA, A. L. A. Q.; SANTOS, M. P. S. S. Constituintes químicos de *Gustavia augusta* L. (Lecythidaceae). **Química Nova**, v. 24, p. 439-442, 2001.

SOUZA, Caroline Iolanda Corsino do Carmo. **Avaliação da atividade antimalárica de bioprodutos da *Bertholletia excelsa* H.B.K.** 2013. 88 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Rondônia, Núcleo de Ciências e Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente. Porto Velho, 2013.

SOUZA, J.M.L.; CARTAXO, C.B.C.; LEITE, F.M.N.; REIS, F.S. 2004. Microbiological evaluation of the Brazil nut processing plants in Acre. Rio Branco, Acre. (Embrapa Acre, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 39). 39 pp. (in Portuguese, with abstract in English).

SOUZA, I. F. **Cadeia produtiva de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) no Estado de Mato Grosso**. 2006. 152 f. Dissertação, Universidade Federal do Mato Grosso, Campo Grande, 2006.

SOUZA, M. H.; MAGLIANO, M. M.; CAMARGOS, J. A. A. **Madeiras tropicais brasileiras**. Brasília: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 1997.

SOUZA, V. A. B.; CARVALHO, M. G.; SANTOS, K. S.; FERREIRA, C. S. Características físicas de frutos e amêndoas e características químico-nutricionais de amêndoas de acessos de sapucaia. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 30, p. 946-952, 2008.

SOUZA, V. & LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2 ed. São Paulo: Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 704 p.

STURM, N.; HU, Y; ZIMMERMANN, H; FRITZ-WOLF, K; WITTLIN, S; RAHLFS, S; BECKER, K. Compounds structurally related to ellagic acid show improved antiplasmodial activity. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 622-630, 2009.

THE PLANT LIST (2010). Version 1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (acessado 1 de fevereiro).

TOMÁS-BARBERÁN, F. A; GARCÍA-VILLALBA, R.; GONZÁLEZ-SARRÍAS, A.; SELMA, M. V; ESPÍN, J. C. Ellagic acid metabolism by human gut microbiota: consistent observation of three urolithin phenotypes in intervention trials, independent of food source,

age, and health status. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 28, p. 6535–8, 16 2014.

TSAO R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 2, n. 12, p. 1231-1246, 2010.

TOMCHINSKY, Bernardo. **Etnobotânica de plantas antimaláricas em Barcelos, Amazonas**. 2014. 189 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

TRAGER, W., JENSEN, J.B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, p. 673-675, 1976.

UEDA, H.; TACHIBANA Y.; MORIYASU M.; KAWANISHI K.; ALVES S. M. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 8, n. 5, p. 377–381, 2001.

TÜRK, G.; SÖNMEZ, M.; ÇERİBAŞI, A. O.; YÜCE, A.; ATEŞŞAHİN, A. Attenuation of cyclosporine A-induced testicular and spermatozoal damages associated with oxidative stress by ellagic acid. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 2, p. 177–182, 2010.

VAN DER PLUIJM R.W. IMWONG M.; HOANG CHAU, N.; HOA, N. T.; THUY-NHIEN, N. T.; THANH, N. V.; JITTAMALA, P.; HANBOONKUNUPAKARN, B.; CHUTASMIT, K.; SAELOW, CH.; RUNJARERN, R.; KAEWMOK, W.; TRIPURA, R. Determinants of dihydroartemisinin-piperaquine treatment failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia, Thailand, and Vietnam: a prospective clinical, pharmacological, and genetic study. **Lancet Infect Dis**, v. 19, p. 952 -961. 2019.

VALE, N.; MOREIRA, R.; GOMES, P. Quimioterapia da malária um século no desenvolvimento de antimaláricos. **Química Nova**, v. 99, p. 57 – 69, 2005.

VALLILO, M.; TAVARES, S.; AUED-PIMENTEL, E.; BADOLATO, S. G.; INOMATA, E. I. Caracterização química parcial de *Lecythis pisonis* Camb. (Sapucaia). **Acta Amazônica**, v. 28, p. 131-140, 1998.

VASCONCELOS C, MARANHÃO H, BATISTA T, CARNEIRO E, FERREIRA F, COSTA J. Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1533 – 1541, 2011.

VÁSQUEZ, S. P. F.; MENDONÇA, M. S. M.; NODA, S. N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta amazônica**, v. 44, n. 4, p. 457 – 472, 2014.

VEROTTA, L.; M. DELL'AGLI; A. GIOLITO; M. GUERRINI; P. CABALION; E. BOSISIO. *In vitro* antiplasmodial activity of extracts of *Tristania* species and identification of the active constituents: ellagic acid and 3,4,5-trimethoxyphenyl-(6-O-galloyl)-O-beta-D-glucopyranoside. **J. Nat. Prod.**, n. 64, p. 603 – 607, 2001.

VEKIARI, S. A.; GORDON, M. H.; GARCÍA-MACÍAS, P.; LABRINEA, H. Extraction and determination of ellagic acid content in chestnut bark and fruit. **Food Chemistry**, v. 110, n. 4, p. 1007–1011, 2008.

VICINANZA, R.; ZHANG, Y.; HENNING, S. M.; HEBER, D. Pomegranate Juice Metabolites, Ellagic Acid and Urolithin A, Synergistically Inhibit Androgen-Independent Prostate Cancer Cell Growth via Distinct Effects on Cell Cycle Control and Apoptosis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, n. 247504, p. 1-12, 2013.

WILLCOX, M. L.; BODEKER, G.; RASOANAIVO, P. Traditional medicinal plants and malária. Traditional medicines for modern times, **CRC Press**, London, UK. 2004.

WHO. World Malaria Report 2016 (WHO). (<http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/en/>), acessado em 27 de junho de 2020.

WHO. World Malaria Report 2018 (WHO). (<http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/en/>), acessado em 27 de junho de 2020.

WHO. World Malaria Report 2019 (WHO). (<http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2019/en/>), acessado em 28 de junho de 2020.

WONG, K. C.; TIE, D. Y. Volatile constituents of *Couroupita guianensis* Aubl. flowers, **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, p. 225-227, 1995.

WYREPKOWSKI, C. C.; Costa D. L.; Sinhoro A. P.; Vilegas W.; De Grandis R. A.; Resende F. A.; Varanda E. A.; dos Santos L. C. Characterization and quantification of the compounds of the ethanolic extract from caesalpinia ferrea stem bark and evaluation of their mutagenic activity. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16039–16057, 2014.

XIAO, J.; CHEN, T.; CAO, H. Flavonoid glycosylation and biological benefits. **Biotechnology advances**, p. 1 - 21, 2014.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. **Lwt - Food Science And Technology**, v. 42, n. 10, p. 1573-1580, 2009.

YANG, A. S. P.; BODDEY, J. A. Molecular mechanisms of host cell traversal by malaria sporozoites. Review. **International Journal for Parasitology**, v. 47, n. 2-3, p. 129-136, 2017.

YANG, S. W.; ZHOU, B. N.; WISSE, J. H.; EVANS, R.; VAN DER WERFF, H.; MILLER, J. S.; KINGSTON, D. G. I. Three New Ellagic Acid Derivatives from the Bark of *Eschweilera coriacea* from the Suriname Rainforest. **J. Nat. Prod.** v., 61, p. 901-906, 1998.

ZAFRILLA, P.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 49, n. 8, p. 3651 – 3655, 2001.

ZALIS, M. G.; PANG, L.; SILVEIRA, M. S.; MILHOUS, W. K.; WIRTH, D. F. Characterization of Plasmodium falciparum isolated from the Amazon region of Brazil: Evidence for quinine resistance. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, n. 5, p. 630 – 637, 1998.

ŻESŁAWSKA, E.; SKÓRSKA-STANIA, A. The Role of Solvent in Hydrogen Bonding Pattern of Ellagic Acid Crystals. **Journal of Chemical Crystallography**, v. 43, n. 6, p. 285–291, 2013.

ZHANG, J.; XIONG, Y.; PENG, B.; GAO, H.; ZHOU, Z. Density functional study on the bioactivity of ellagic acid, its derivatives and metabolite. **Computational and Theoretical Chemistry**, v. 963, n. 1, p. 148–153, 2011.

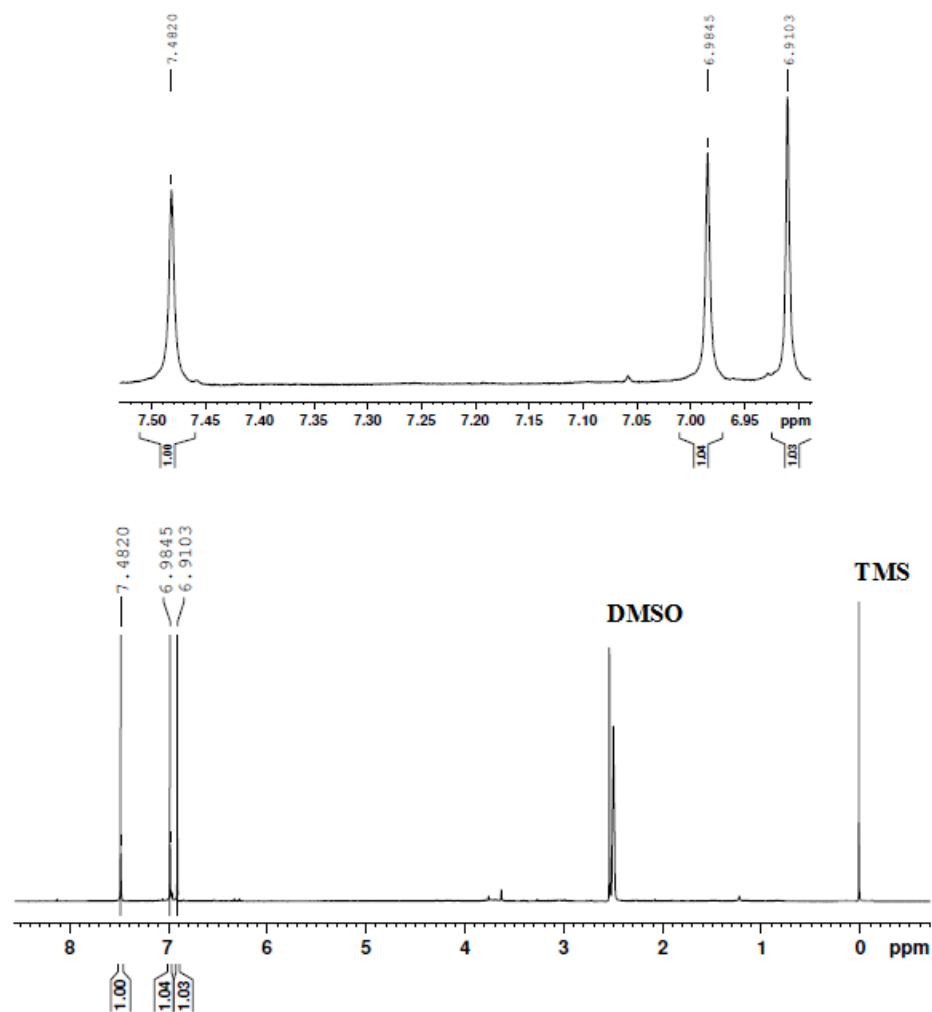
ANEXOS

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
1	m/z	E22	E23	E24	E25	E26	E27	E28	E50	E51	E52	E53	E54	E55	E56		
2	113	0	0	5.58	0	5.35	0	0	5.76	7.08	0	0	0	11.72	0		
3	115	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.41	0		
4	121	0	0	5.65	0	0	5.57	5.38	0	7.08	0	0	0	0	0		
5	125	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.49	7.36	6.07		
6	133	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.07	0	8.52	7.52		
7	147	0	0	5.4	0	5.63	0	0	0	6.11	0	0	0	6.63	0		
8	157	0	0	5.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
9	159	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.45	0		
10	163	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.64	0	0		
11	169	0	16.3	19.96	0	15.79	12.12	12.97	20.09	17.82	24.55	23.99	26.66	32.15	35.4		
12	171	0	9.1	8.78	0	9.04	6.79	9.11	0	0	0	0	0	0	0		
13	179	0	0	0	0	0	0	0	0	10.65	5.56	6.16	0	7.8	7.53		
14	183	0	0	7.33	0	0	0	0	15.14	20.68	0	10.74	9.38	18.83	15.73		
15	187	0	19.65	22.56	6.31	26.53	16.89	19.01	7.85	6.15	0	5.71	6.31	7.36	5.99		
16	191	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.17	5.55		
17	193	0	0	0	0	0	0	13.66	0	0	0	0	0	0	0		
18	195	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8.18	0	0	0	0		
19	197	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.61	0	0	10.3	0		
20	199	0	0	0	0	5.35	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
21	201	0	21.06	23.86	6.03	23.83	19.06	20.74	6.49	0	0	0	5.17	7.38	5.25		
22	205	0	0	0	0	0	0	0	6.99	5.67	9.36	10.38	7.94	11.09	13.46		
23	215	0	0	0	0	6.29	0	0	8.33	19.63	11.47	17.65	56.49	25.94	17.85		
24	217	0	0	0	0	0	0	0	0	9.56	0	8.54	20.55	14.17	8.47		
25	225	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.86	0		
26	227	0	0	6.08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
27	232	6.82	7.53	19.08	6.5	18.95	10.27	11.6	28.32	25.25	14.13	11.52	8.63	33.45	13.75		
28	233	0	0	5.77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8.04	0		
29	237	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.03	5.73		
30	241	0	0	5.44	0	5.63	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
31	242	0	0	0	0	0	0	0	8.62	12.52	6.78	7.66	0	13.1	7.86		
32	247	0	0	0	0	0	0	0	7.13	0	0	7.06	0	9.59	9.04		
33	248	0	0	0	0	0	0	0	6.6	5.6	0	0	0	7.86	0		
34	253	0	0	9.46	0	6.15	5.48	0	0	0	0	0	0	6.49	0		
35	255	30.48	40.06	70.59	26.3	62.14	53.49	49.13	19.18	64.54	17.03	15.53	8.77	41.49	20.95		
36	256	5.55	7.53	12.78	0	11.7	8.82	8.28	5.54	8.56	0	0	0	9.49	0		
37	265	5.99	9.52	14.11	0	10.39	16.67	7.23	7.94	13.6	5.73	7.55	0	10.62	8.5		
38	267	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.92	5.45		
39	269	0	0	5.55	0	0	0	0	0	8.61	0	0	0	6.76	0		

Nota: Extratos = E22 – E56
 $0 \leq 5\%$ do pico base.

Anexo 1. Construção da matriz de dados a partir dos espectros de massas das amostras.

Diana E57B-1 (1H sup giro; DMSO; 9 mg) 18/02/19
Op.: Magno



Cl
NAME Diana19_DSA1_56Ba
EXPNO 13
PROCNO 1

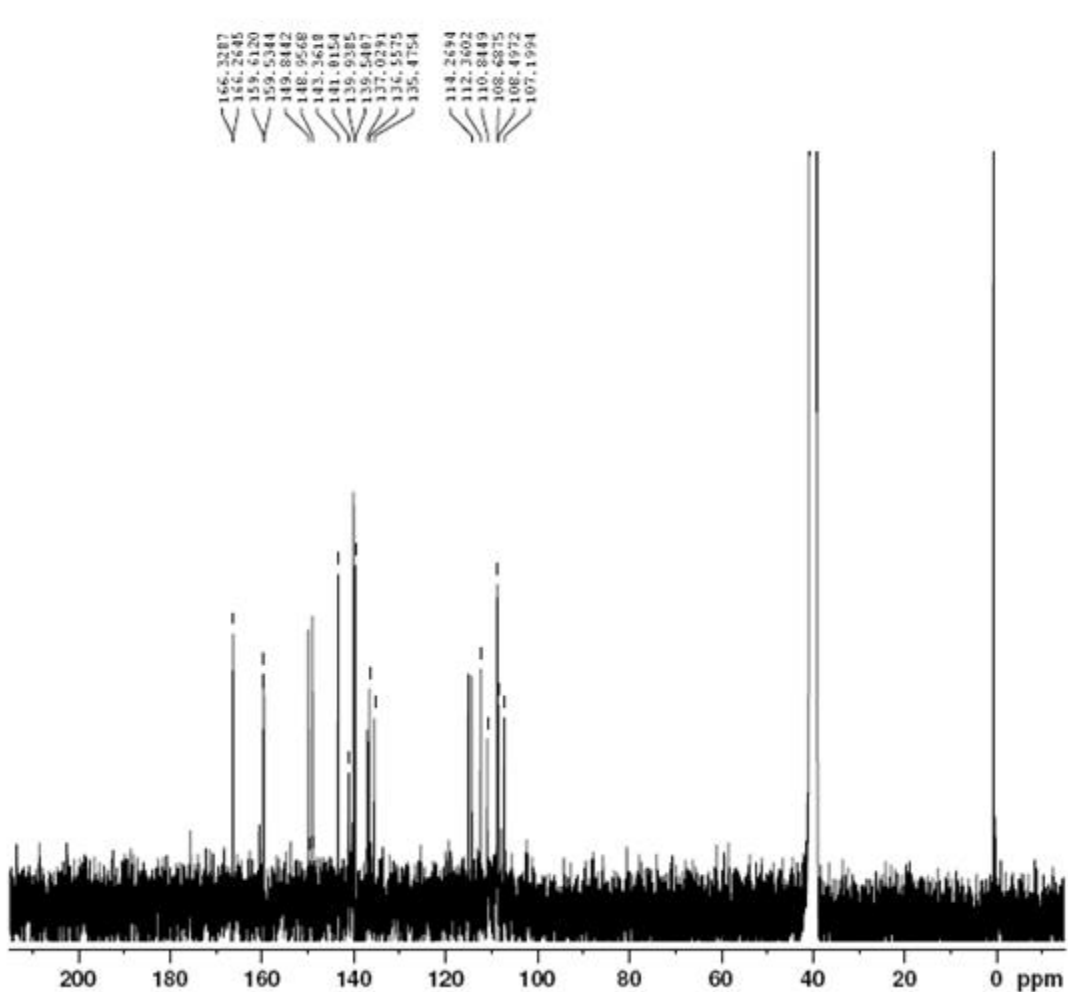
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20190218
Time 15.39
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zgpgpr
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 64
DS 4
SWH 6103.516 Hz
FIDRES 0.093132 Hz
AQ 5.3687091 sec
RG 60.2353
DW 81.920 usec
DE 10.00 usec
TE 291.9 K
D1 2.00000000 sec
D12 0.00002000 sec
F41 2000000.00 usec
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
SFO1 300.2010206 MHz
NUC1 1H
P1 7.88 usec
PLW1 20.00000000 W
PLW9 0.00001000 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 300.2000000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.00

Anexo 2. Espectro de RMN de ^1H da substância E57B-1 em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz).

E57B-1 (13C; DMSO-d6; 9 mg)26/02/19
 Op.: Sabrina



```

Current Data Parameters
NAME      Dianal9_DSAl_56ba
EXPNO     2
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20190225
Time      17.00
INSTRUM   FOURIER300
PROBHD    5 mm DUL 13C-1
PULPROG   zgpg30
TD         32768
SOLVENT   DMSO
NS         20975
DS         0
SWH        24414.063 KHz
FIDRES     0.745058 KHz
AQ         0.6710886 sec
RG         501.187
CW         20.480 usec
DE         10.00 usec
TE         293.2 K
D1         0.10000000 sec
D11        0.03000000 sec
D31        0.00000875 sec
D40        0.03094430 sec
L4         20
L5         2
P32        90.00 usec
TD0        1

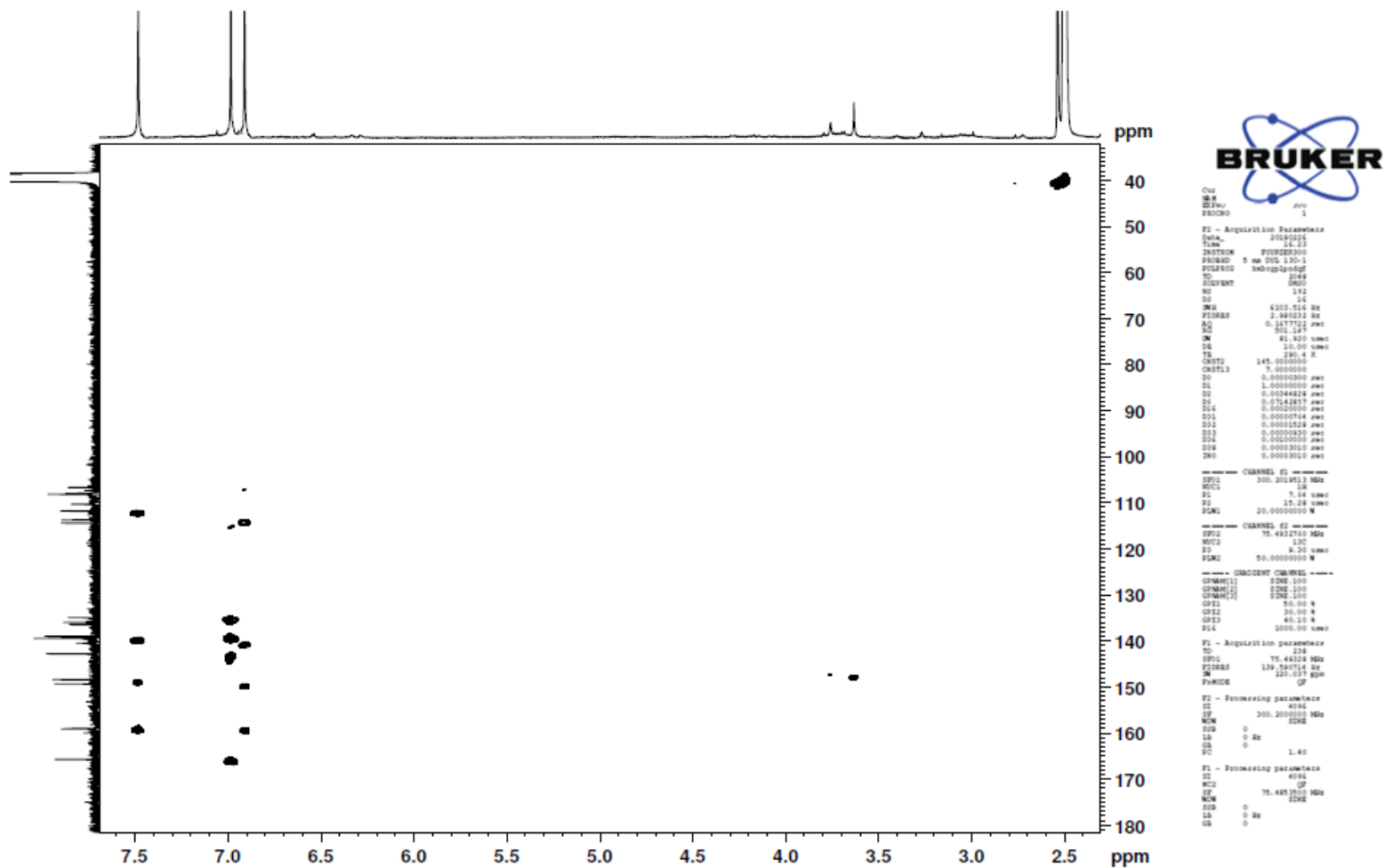
===== CHANNEL f1 =====
SF01       75.4928982 MHz
NUC1       13C
P1         8.75 usec
PLM1       50.00299835 W

===== CHANNEL f2 =====
SF02       300.2012008 MHz
NUC2       1H
CPDPRG2    waltz16
PCPD2      90.00 usec
PLW2       20.00000000 W
PLW12      0.16804000 W
PLW13      0.13613001 W

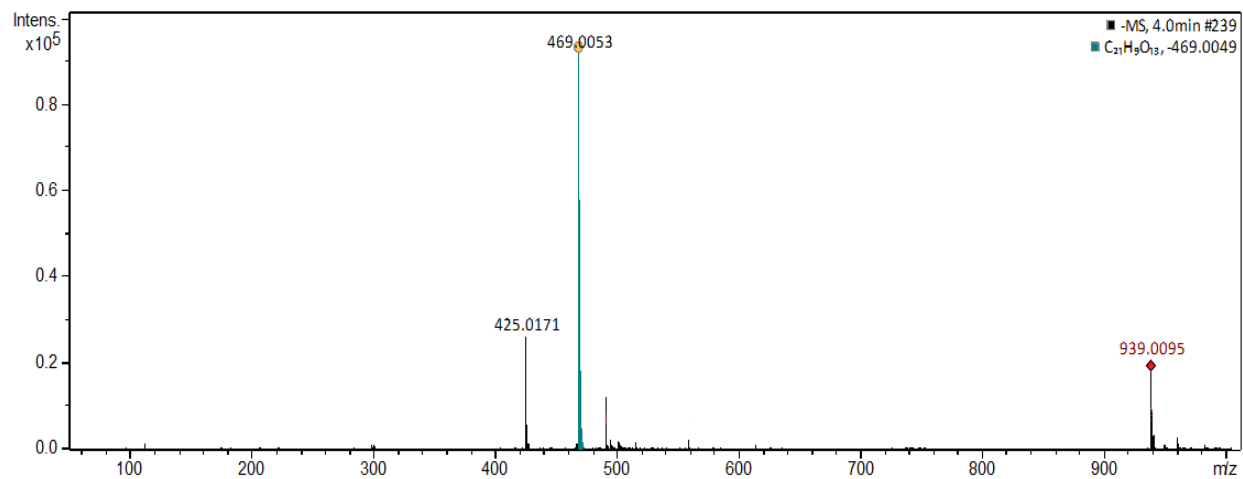
F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         75.4853500 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         1.00 Hz
GB         0
PC         1.40
  
```

Anexo 3. Espectro de RMN de ^{13}C da substância E57B-1 em $\text{DMSO-}d_6$ (75 MHz).

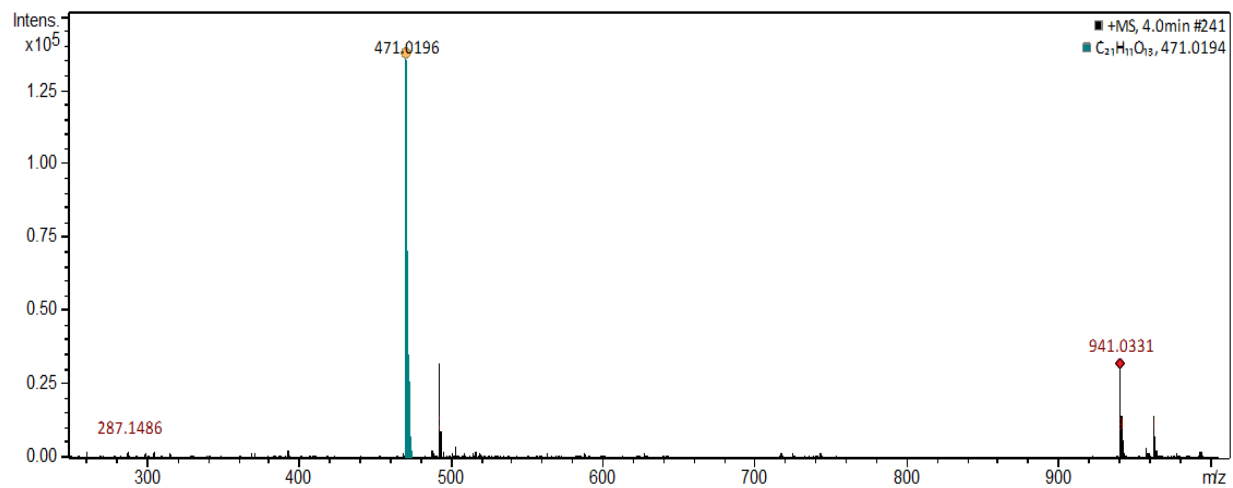
E57B-1 (HMBC; DMSO-d₆; 9 mg) 26/02/2019
 Op.: Sabrina



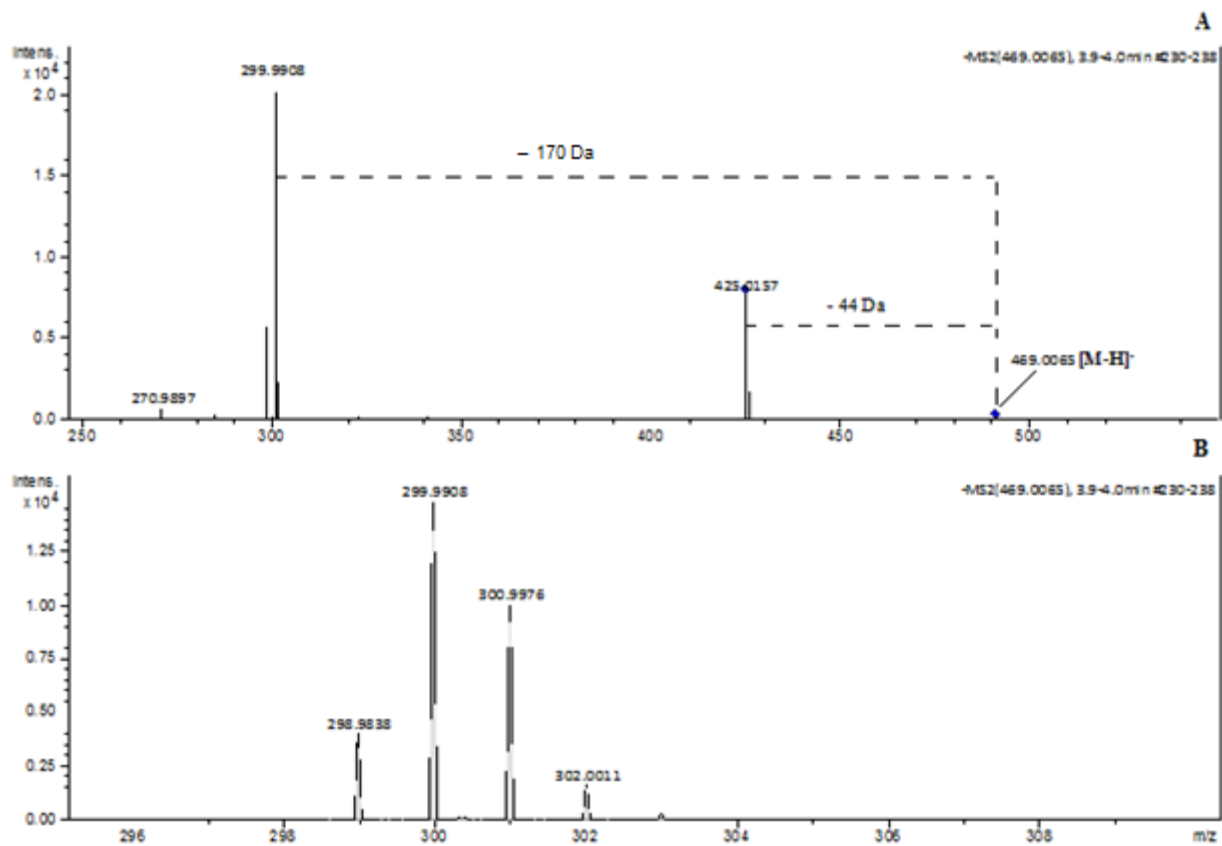
Anexo 5. Mapa de correlação ¹H - ¹³C (HMBC) da substância E57B-1 em DMSO-d₆ (75 MHz).



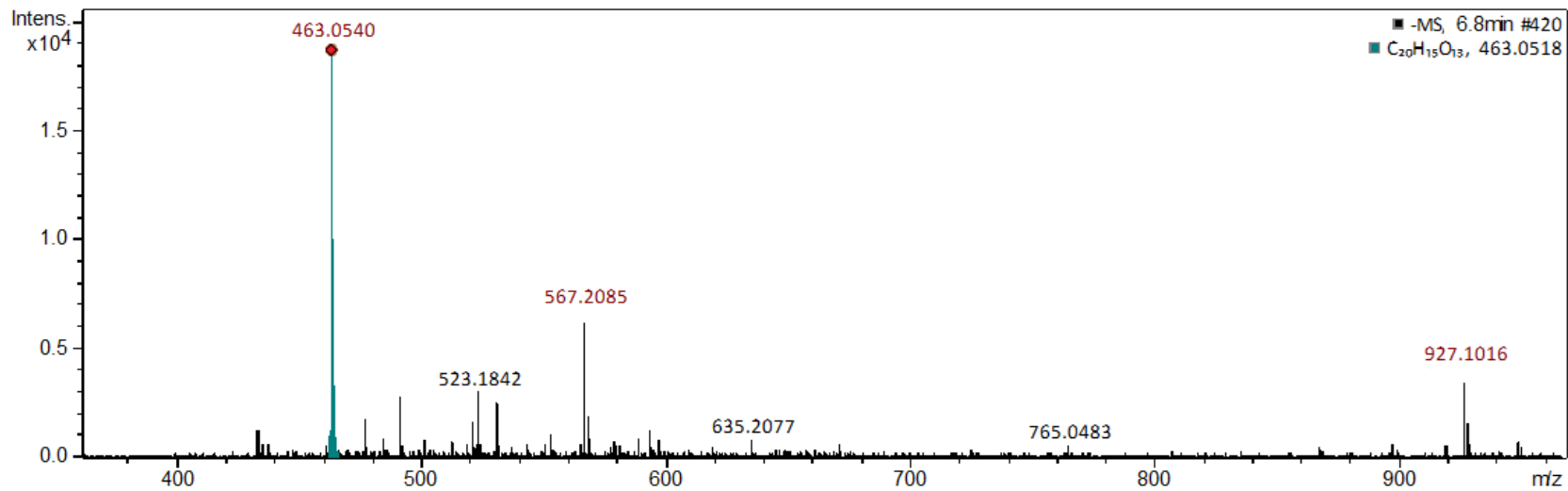
Anexo 6. Espectro ESI/EMAR da substância E57B-1 em modo negativo.



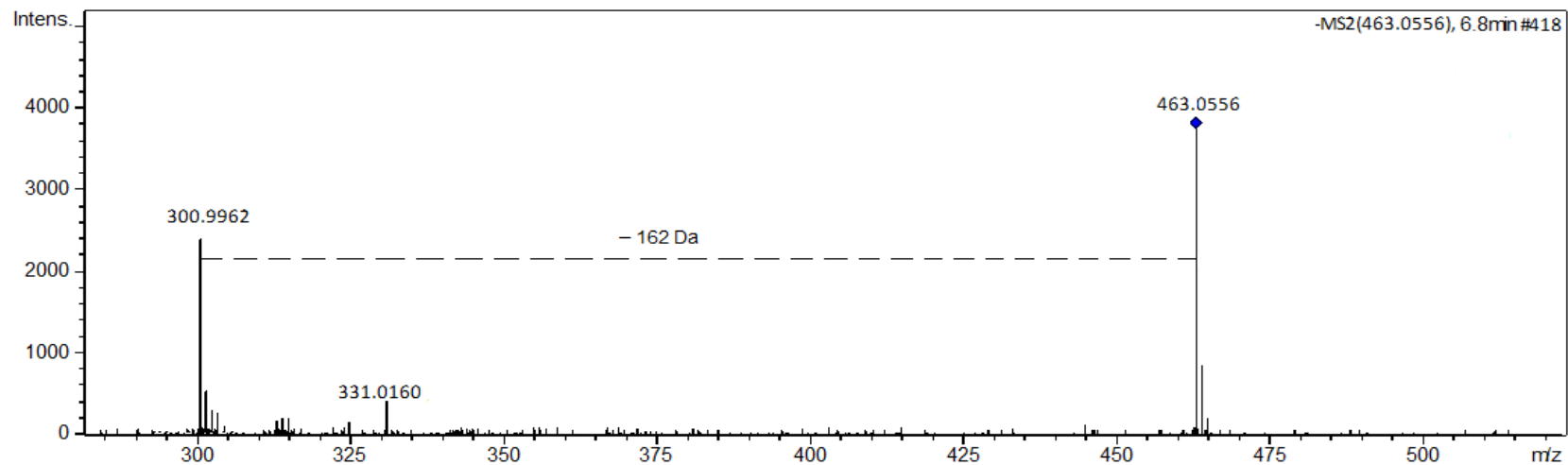
Anexo 7. Espectro ESI/EMAR da substância E57B-1 em modo positivo.



Anexo 8. Espectro de EM2 da substância E57B-1 (m/z 469) em modo negativo.

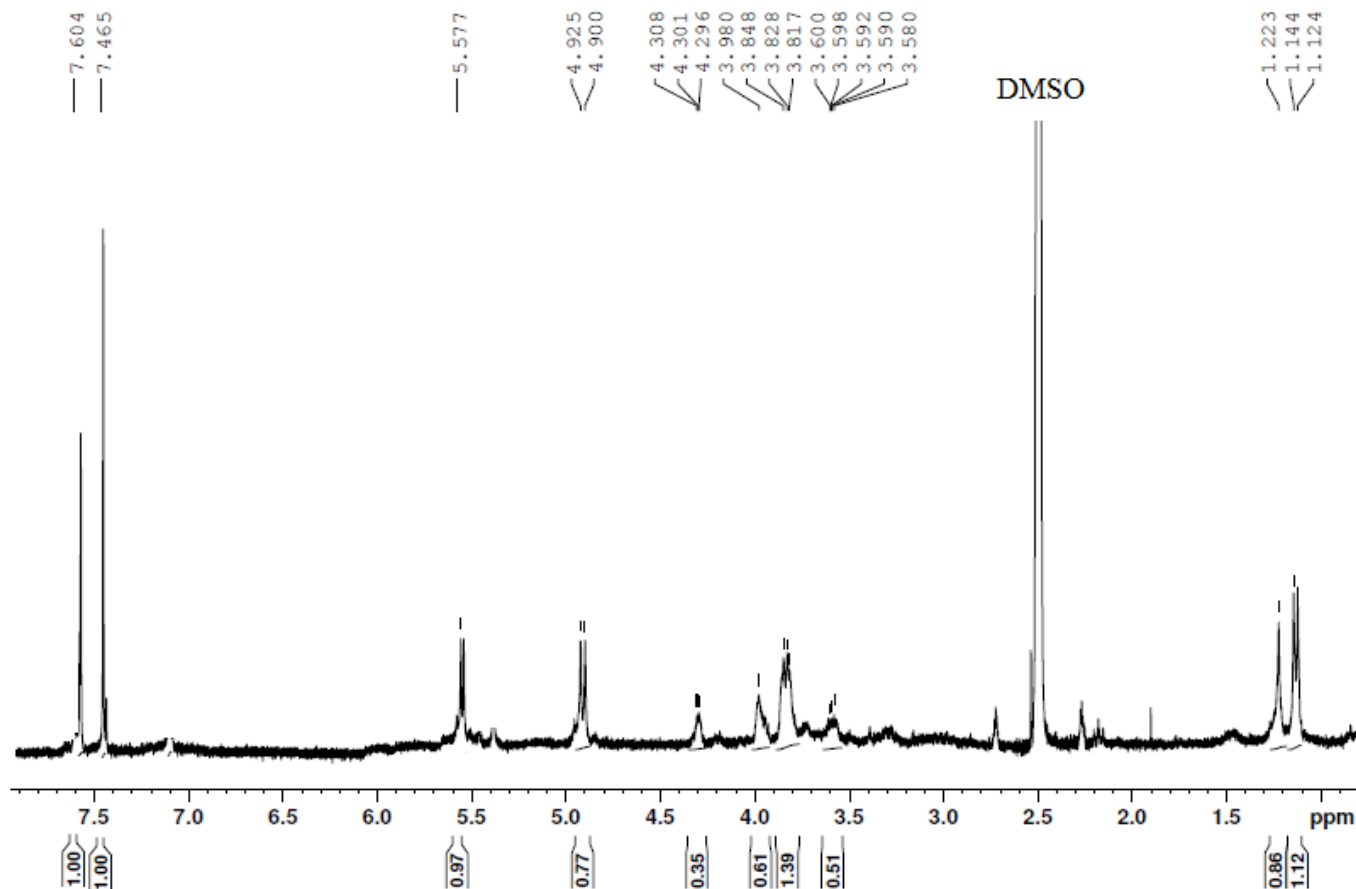


Anexo 9. Espectro ESI/EMAR da substância E57B-2 em modo negativo.



Anexo 10. Espectro de EM2 da substância E57B-2 (m/z 463) em modo negativo.

Diana E57B-3 (1H sup; DMSO; 8 mg)
16/07/2020 Op. Magno



Current Data Parameters
NAME Diana20_2E57B-3
EXPNO 11
PROCNO 1

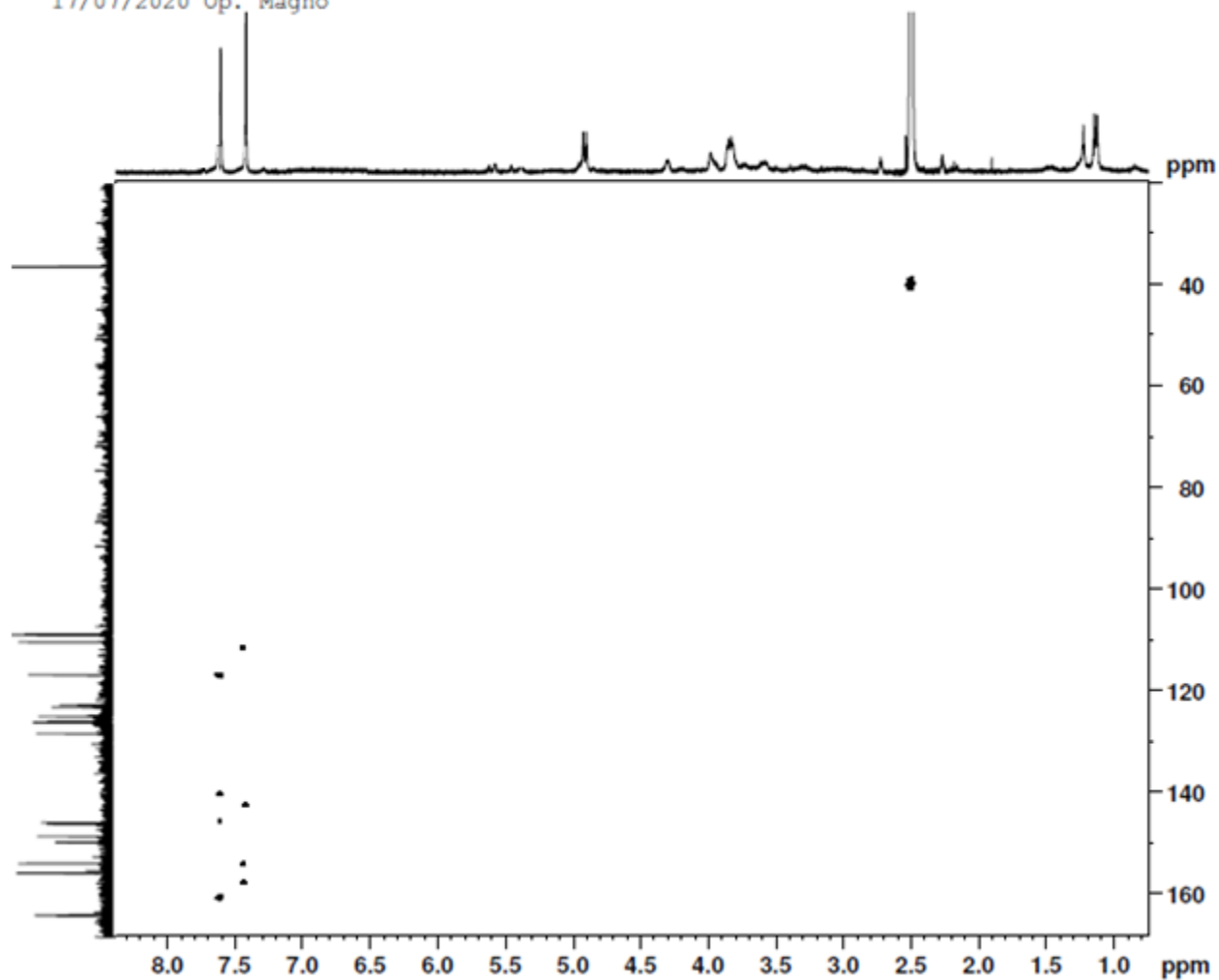
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20200716
Time 16.27
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zgpgpr
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 64
DS 4
SWH 6103.516 Hz
FIDRES 0.093132 Hz
AQ 5.3687091 sec
RG 81.3775
DW 81.920 usec
DE 10.00 usec
TE 292.9 K
D1 2.00000000 sec
D12 0.00002000 sec
P41 2000000.00 usec
TDO 1

==== CHANNEL f1 =====
SFO1 300.2010178 MHz
NUC1 1H
P1 7.88 usec
PLW1 20.00000000 W
PLW9 0.00001000 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 300.2000000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.00

Anexo 11. Espectro de RMN de ^1H da substância E57B-3 em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz).

Diana E57B-3 (HMBC; DMSO; 8 mg)
17/07/2020 Op. Magno



```

EXPNO      300
PROCNO     1

F2 - Acquisition Parameters
Date_      20200719
Time       4.25
INSTRUM    FOURIES300
PULPROG    5 ms DQF 13C-1
POLARPROG  hmcqplprod2
TD          32768
SOLVENT    DMSO
NS          360
DS          14
SWH         4103.514 Hz
FIDRES     2.480232 Hz
AQ          0.147722 sec
RG          501.187
AQ          41.420 usec
DE          15.00 usec
TE          294.2 K
CQDZ       145.000000
CQDZ13     0.000000
DQ         0.0000300 sec
DQ1        1.0000000 sec
DQ2        0.0014420 sec
DQ3        0.0010000 sec
DQ4        0.0002000 sec
DQ5        0.0000714 sec
DQ6        0.0000128 sec
DQ7        0.0000043 sec
DQ8        0.0010000 sec
DQ9        0.0000288 sec
DQ10       0.0000288 sec

----- CHANNEL f1 -----
NUC1       13C
P1         7.64 usec
P2         15.28 usec
PLW1       20.0000000 W

----- CHANNEL f2 -----
NUC2       13C
P3         8.30 usec
PLW2       50.0000000 W

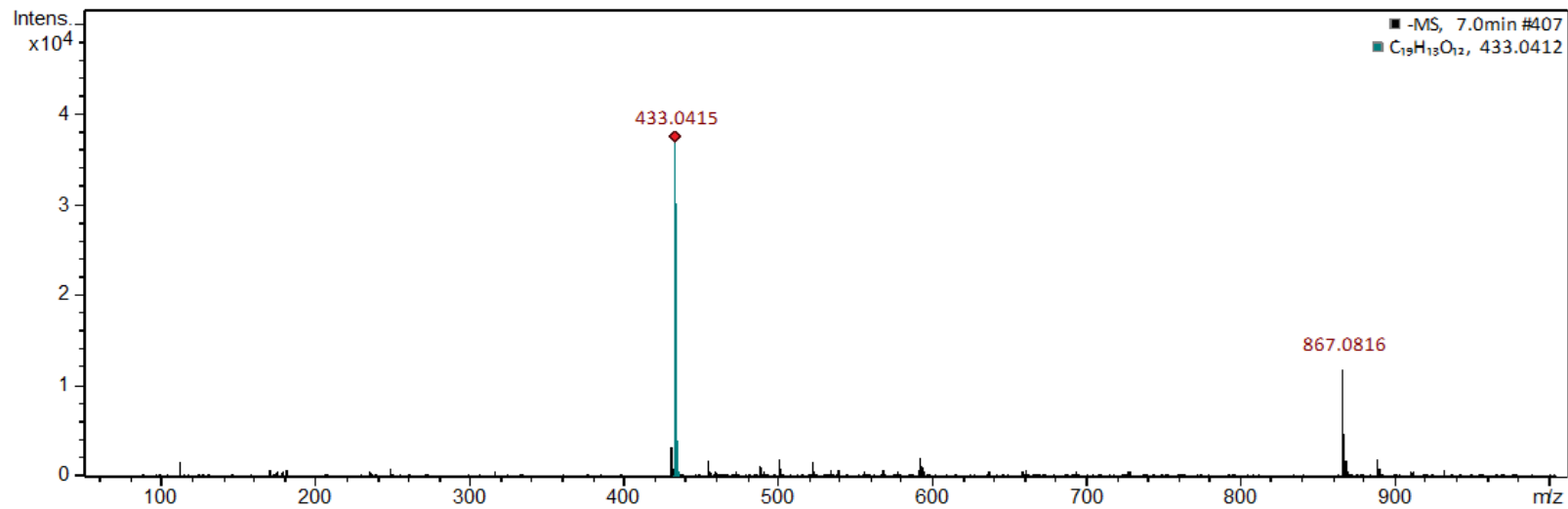
----- GRADIENT CHANNEL -----
CPHASE1[1] SINE.100
CPHASE2[2] SINE.100
CPHASE3[3] SINE.100
CP14       50.00 %
CP15       30.00 %
CP16       60.10 %
PL4        1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD         240
SFO1       75.4832160 MHz
FIDRES     139.444471 Hz
SW         229.944 ppm
PULPROG    GP

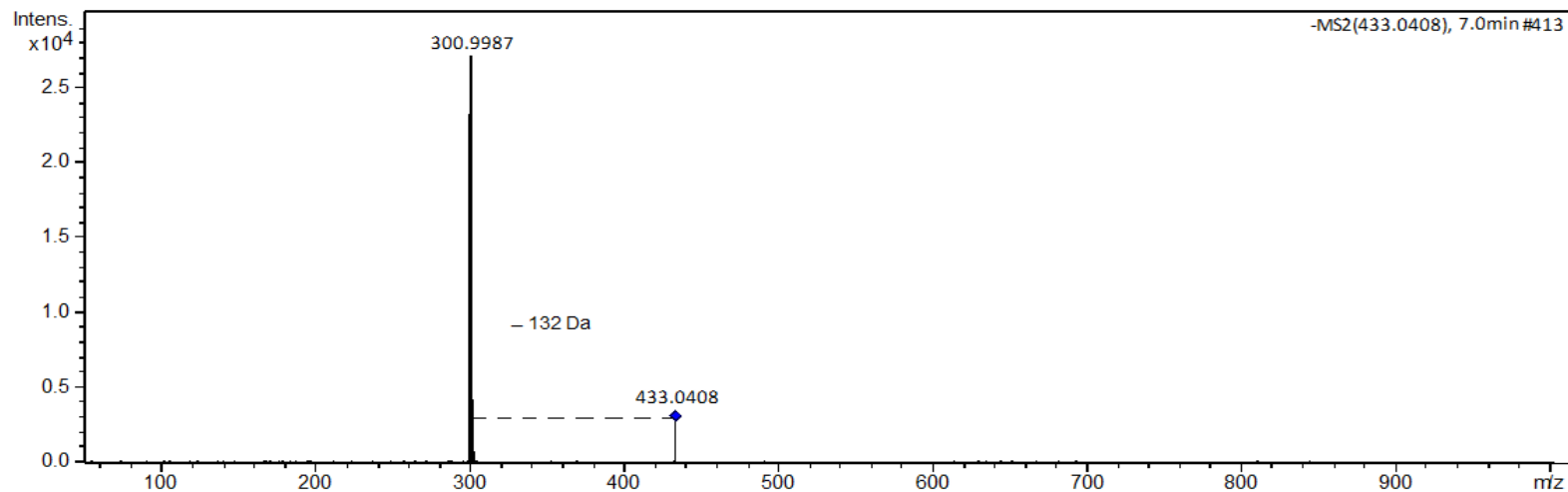
F2 - Processing parameters
SI         4094
SF         300.2000000 MHz
WDW        SINC
SSB        0 Hz
GB         0
PC         1.40

F1 - Processing parameters
SI         4094
SF         75.4832160 MHz
WDW        SINC
SSB        0 Hz
GB         0
PC         1.40
  
```

Anexo 13. Mapa de correlação ^1H - ^{13}C (HMBC) da substância E57B-3 em DMSO- d_6 (75 MHz).

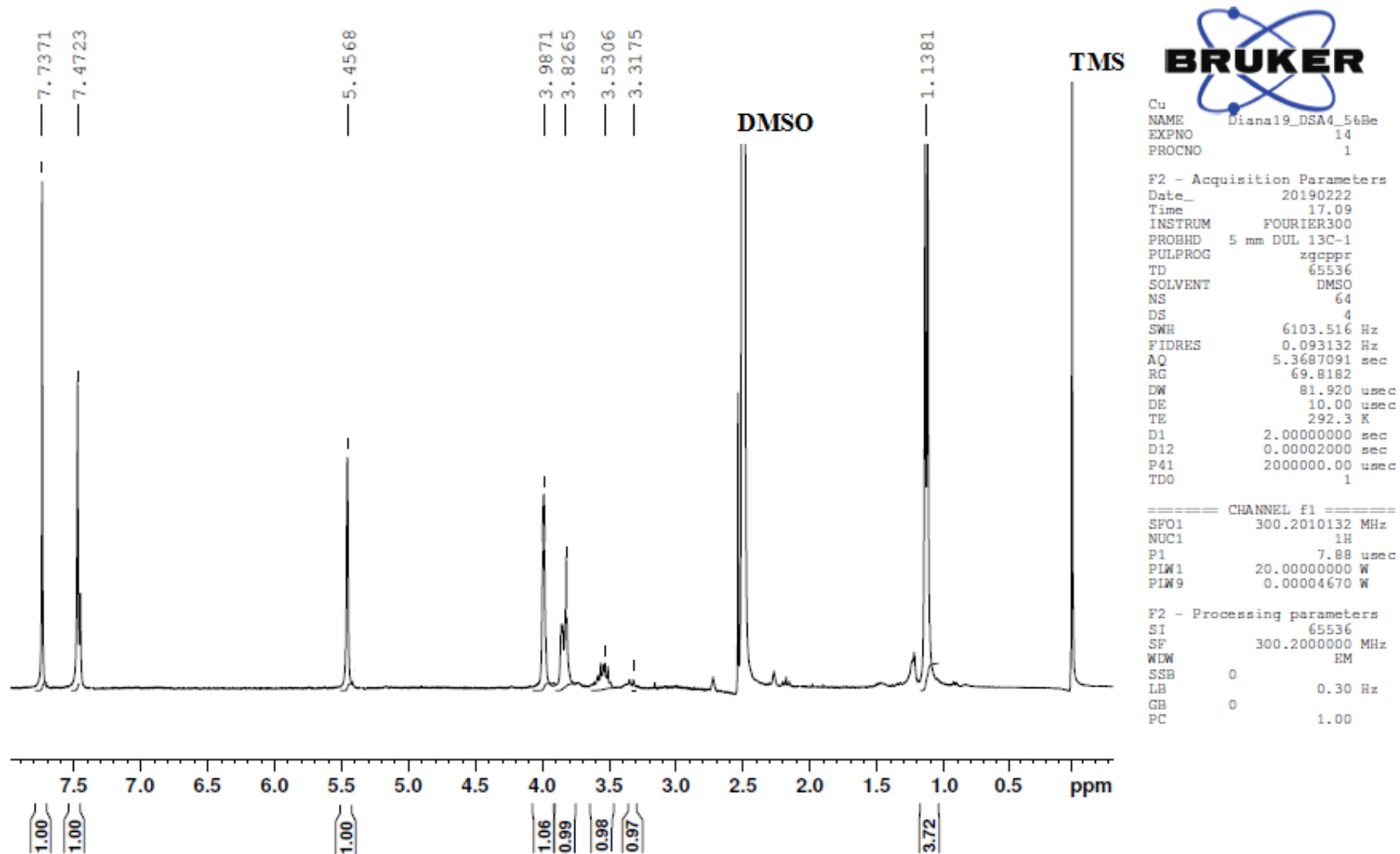


Anexo 14. Espectro ESI/EMAR da substância E57B-3 em modo negativo.



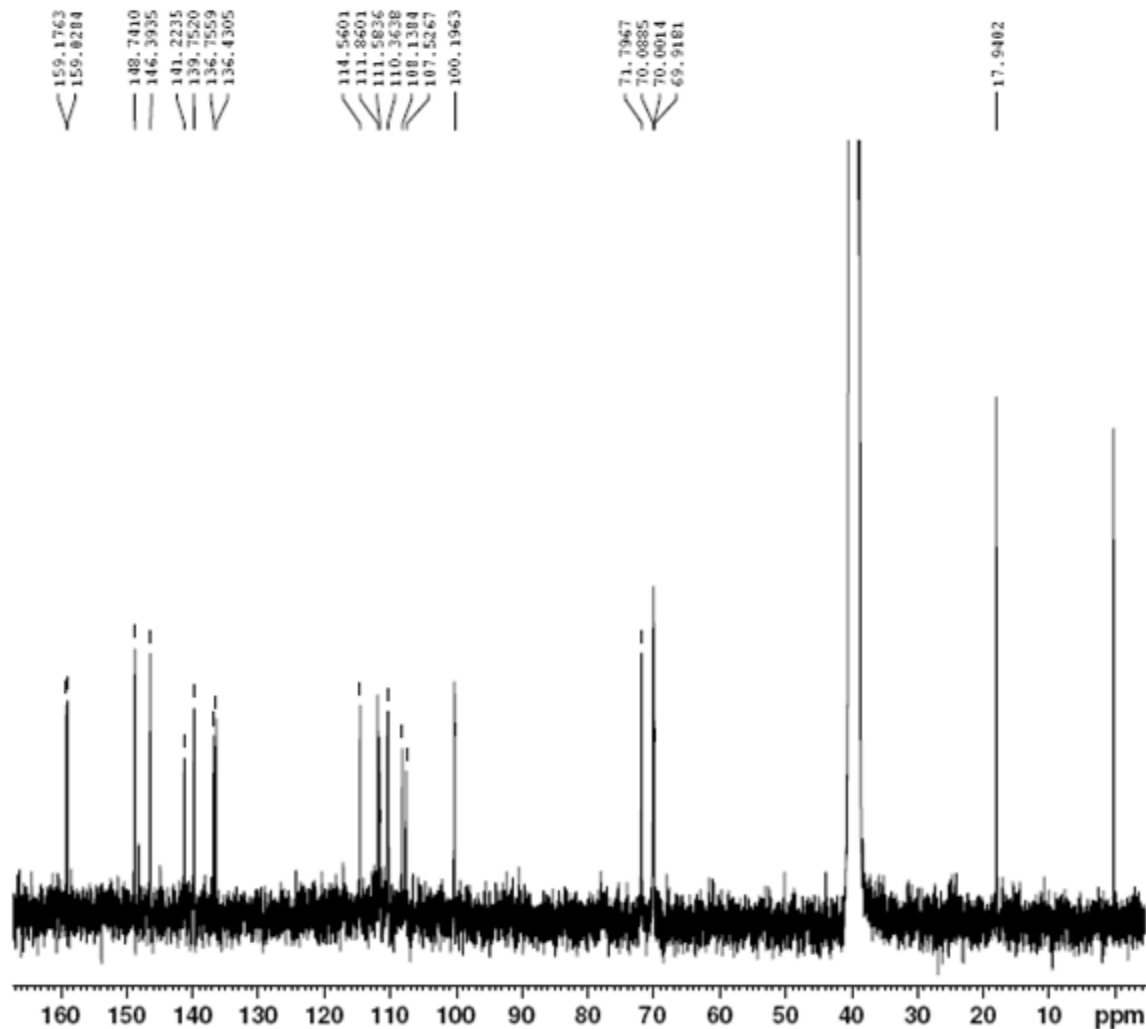
Anexo 15. Espectro de EM2 da substância E57B-3 (m/z 433) em modo negativo.

Diana E57B-4 (1H sup ; DMSO; 8 mg) 22/02/19
Op.: Magno



Anexo 16. Espectro de RMN de ^1H da substância E57B-4 em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz).

Diana E57B-4 (13C ; DMSO; 8 mg)
22/02/19. Op.: Zelina



```

C
NAME      Diana19_DSA4_56Be
EXPNO     2
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20190224
Time      18.30
INSTRUM   FOURIER300
PROBHD    5 mm DUL 13C-1
PULPROG   zgpg30
TD        32768
SOLVENT   DMSO
NS        62944
DS        0
SWH        24414.063 Hz
FIDRES     0.745058 Hz
AQ         0.6710896 sec
RG         501.187
IW         20.480 usec
DE         10.00 usec
TE         290.6 K
D1         0.20000000 sec
D11        0.03000000 sec
D31        0.00000875 sec
D40        0.02710625 sec
L4         20
L5         5
P32        90.00 usec
TD0        1

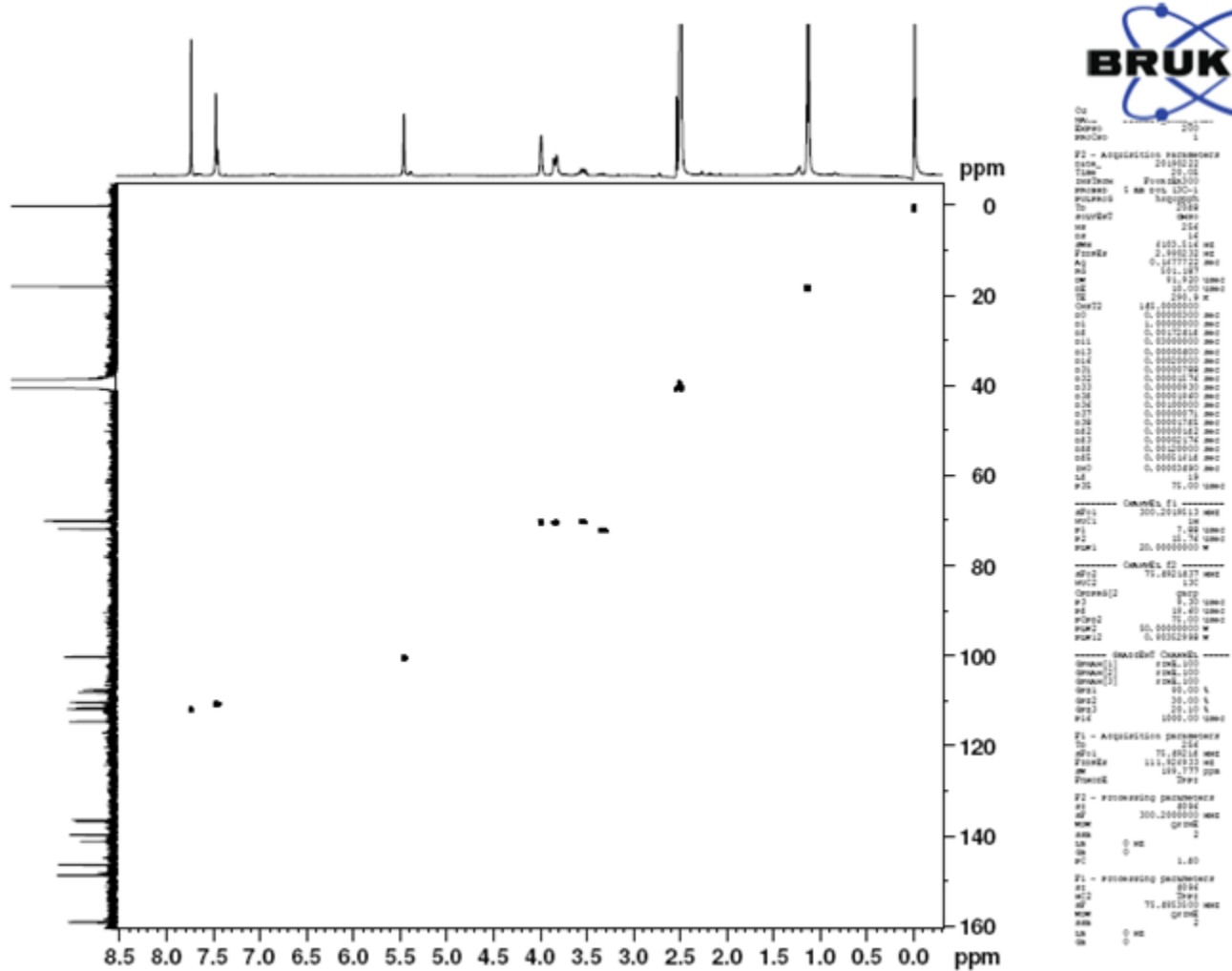
***** CHANNEL f1 *****
SFO1       75.4928982 MHz
NUC1       13C
P1         8.75 usec
P1M1      50.00299835 W

***** CHANNEL f2 *****
SFO2       300.2012008 MHz
NUC2       1H
CPCPRG[2]  waltz16
PCPD2      90.00 usec
P1M2       20.00000000 W
P1M12      0.16806000 W
P1M13      0.13613001 W

F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         75.4853805 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         1.00 Hz
GB         0
PC         1.40
  
```

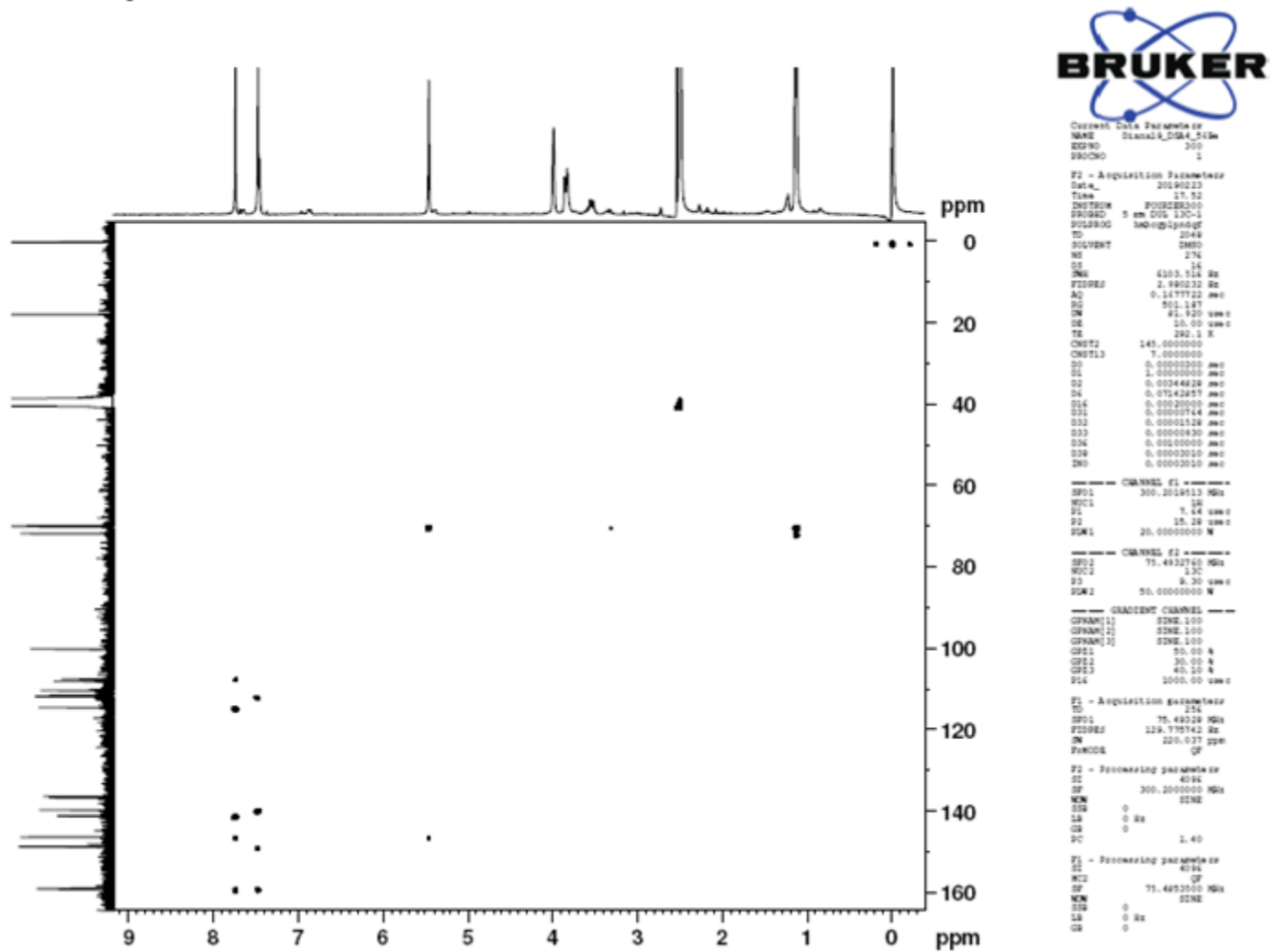
Anexo 17. Espectro de RMN de ^{13}C da substância E57B-4 em $\text{DMSO-}d_6$ (75 MHz).

Diana E57B-4 (HSQC ; DMSO; 8 mg)
22/02/19. Op.: Zelina



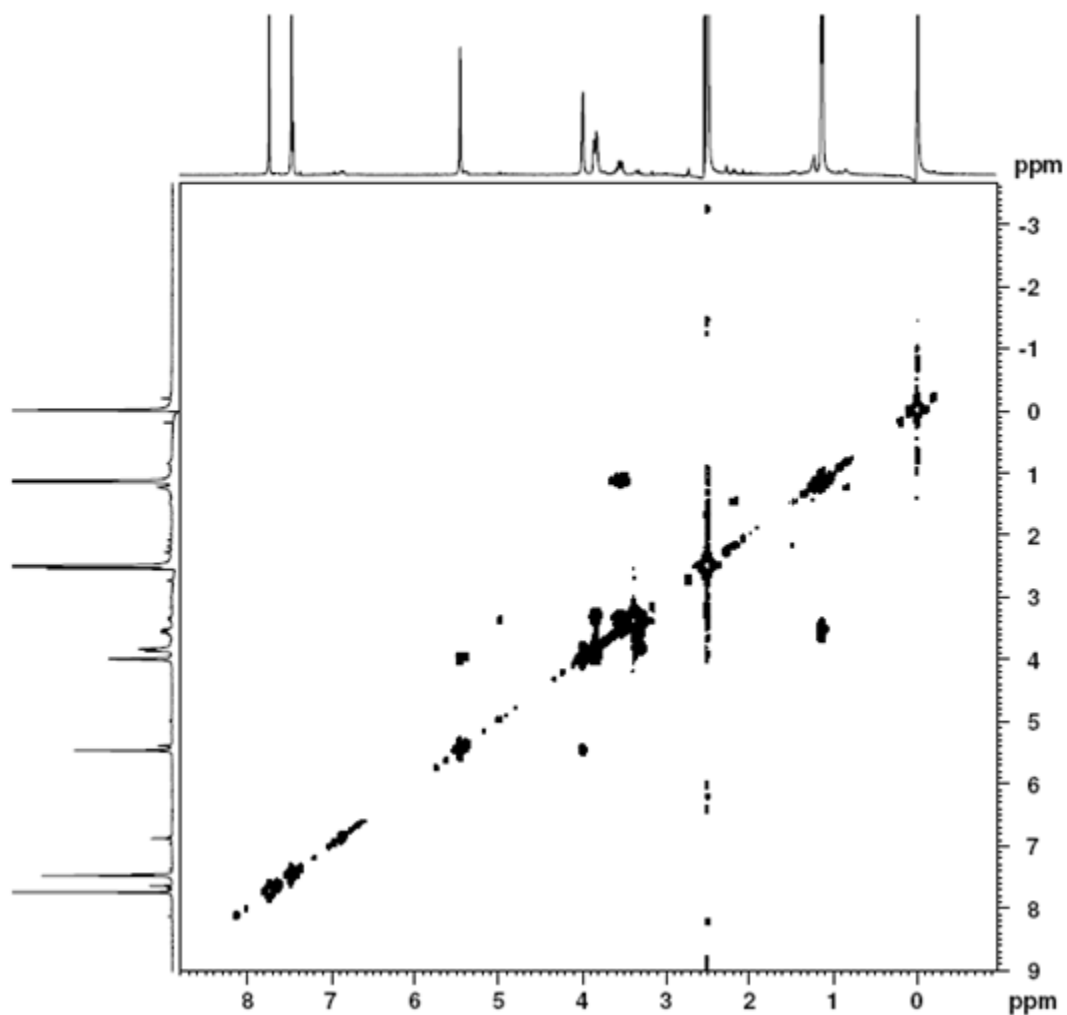
Anexo 18. Mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HSQC) da substância E57B-4 em DMSO- d_6 (75 MHz).

Diana E57B-4 (1HMBC ; DMSO; 8 mg)
 22/02/19. Op.: Zelina



Anexo 19. Mapa de correlação ^1H - ^{13}C (HMBC) da substância E57B-4 em DMSO- d_6 (75 MHz).

Diana E57B-4 (COsy; DMSO; 8 mg)
22/02/19. Op.: Zelina



```
Cus
NAME: D19019_0004_0100
EXPNO: 100
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_   : 20190222
Time    : 17.22
INSTRUM : FOURIER300
PROBHD  : 5 mm DUL 13C-1
PULPROG : cosyzgqf
TD       : 2048
SOLVENT : DMSO
NS       : 32
DS       : 16
SM      : 6103.516 Hz
FIDRES  : 2.980232 Hz
AQ      : 0.1677722 sec
RG      : 31.623
SM      : 81.920 usec
DE      : 10.00 usec
TE      : 292.1 K
D0      : 0.00000300 sec
D1      : 1.00000000 sec
D13     : 0.00000400 sec
D16     : 0.00020000 sec
IN0     : 0.00016360 sec

----- CHANNEL f1 -----
SFO1    : 300.2019513 MHz
NUC1    : 1H
P1      : 7.88 usec
P2      : 7.88 usec
PL1     : 20.00000000 W

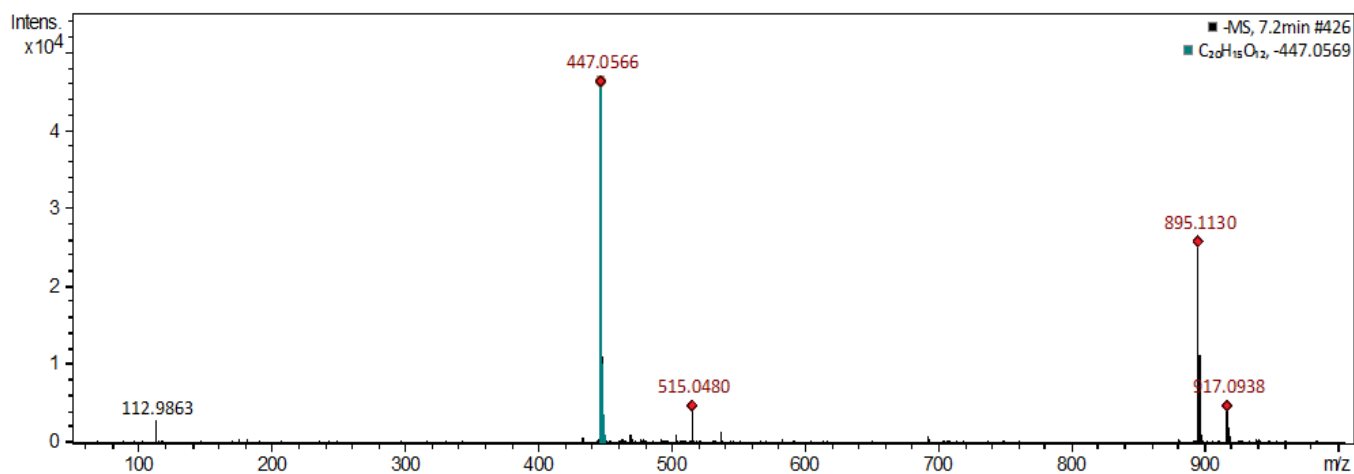
----- GRADIENT CHANNEL -----
GPNAM[1]: SINE.100
CPE1    : 10.00 %
P16     : 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD       : 256
SFO1    : 300.202 MHz
FIDRES  : 47.695362 Hz
SM      : 20.336 ppm
FbMGCE  : QF

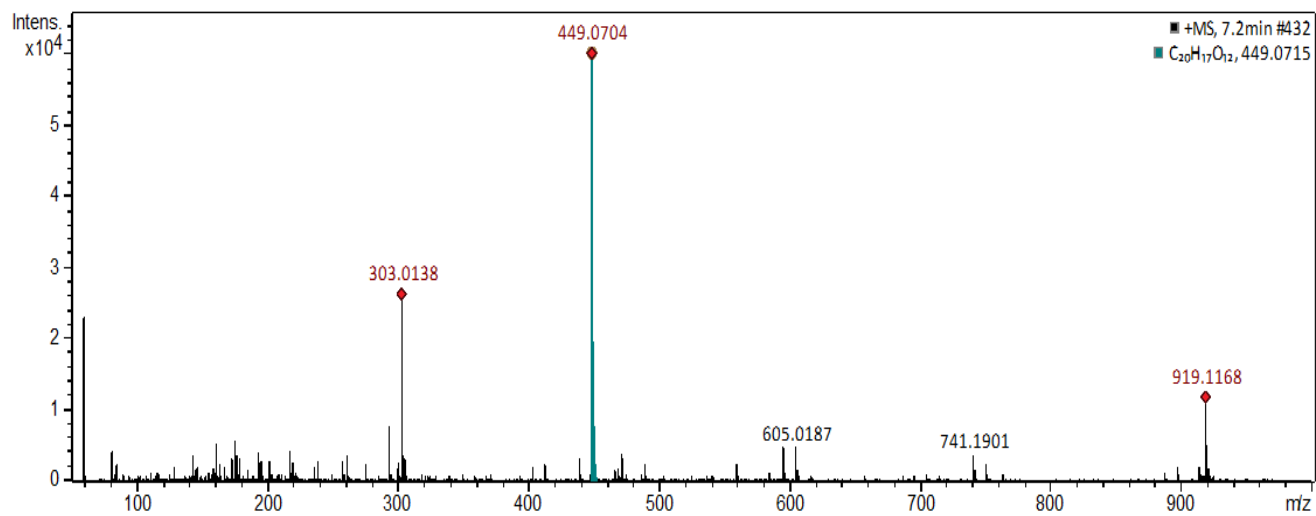
F2 - Processing parameters
SI       : 4096
SF       : 300.2000000 MHz
WDW      : QSINE
SSB      : 0
LB       : 0 Hz
GB       : 0
PC       : 1.40

F1 - Processing parameters
SI       : 4096
MC2     : QF
SF       : 300.2000000 MHz
WDW      : QSINE
SSB      : 0
LB       : 0 Hz
GB       : 0
```

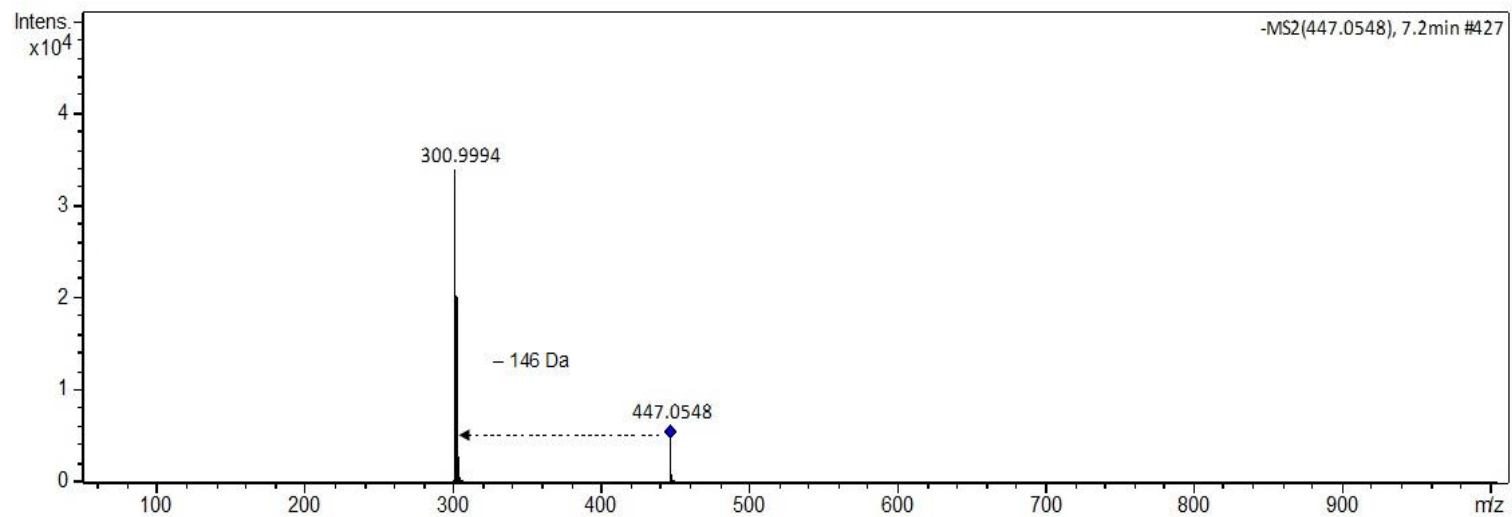
Anexo 20. Mapa de correlação $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (COSY) da substância E57B-4 em DMSO- d_6 (300 MHz).



Anexo 21. Espectro ESI/EMAR da substância E57B-4 em modo negativo.



Anexo 22. Espectro ESI/EMAR da substância E57B-4 em modo positivo.



Anexo 23. Espectro de EM2 da substância E57B-4 (m/z 447) em modo negativo.

Diana E57B-5 (1H ; DMSO; 8 mg)
29/3/2019 c/ pressat
Op.:Magno

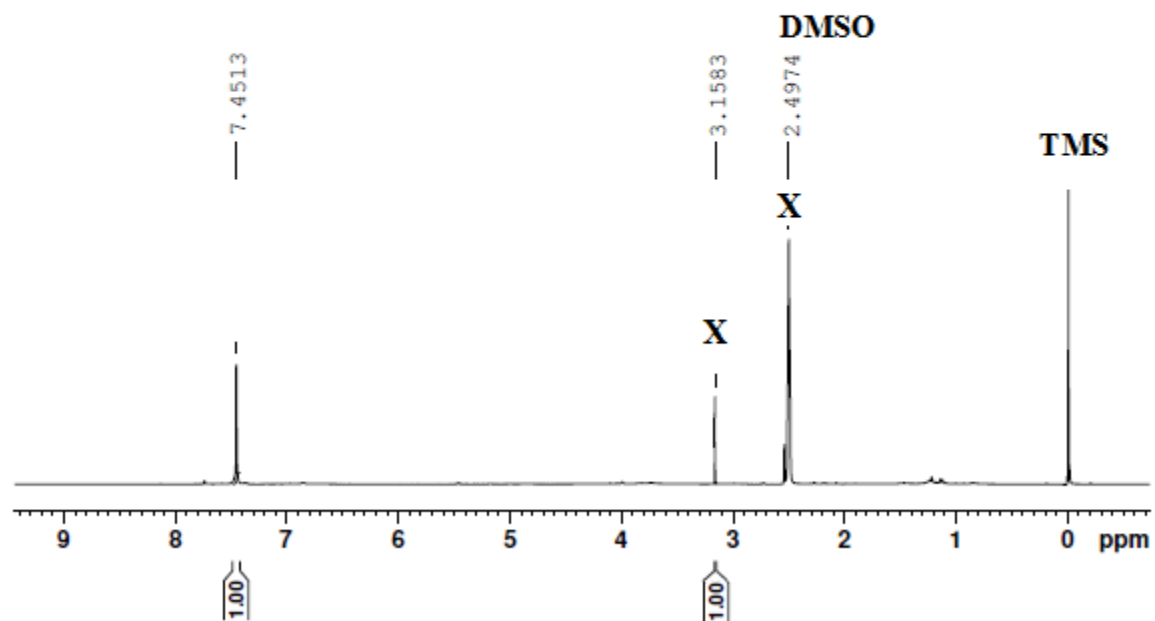


Cur:
NAME Diana19_DSA5_56Ba
EXPNO 15
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20190329
Time 17.43
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zgpgpr
ID 65536
SOLVENT DMSO
NS 64
DS 4
SWH 6103.516 Hz
FIDRES 0.093132 Hz
AQ 5.3687091 sec
RG 74.0241
DW 81.920 usec
DE 10.00 usec
TE 292.5 K
D1 2.00000000 sec
D12 0.00002000 sec
P41 2000000.00 usec
TD0 1

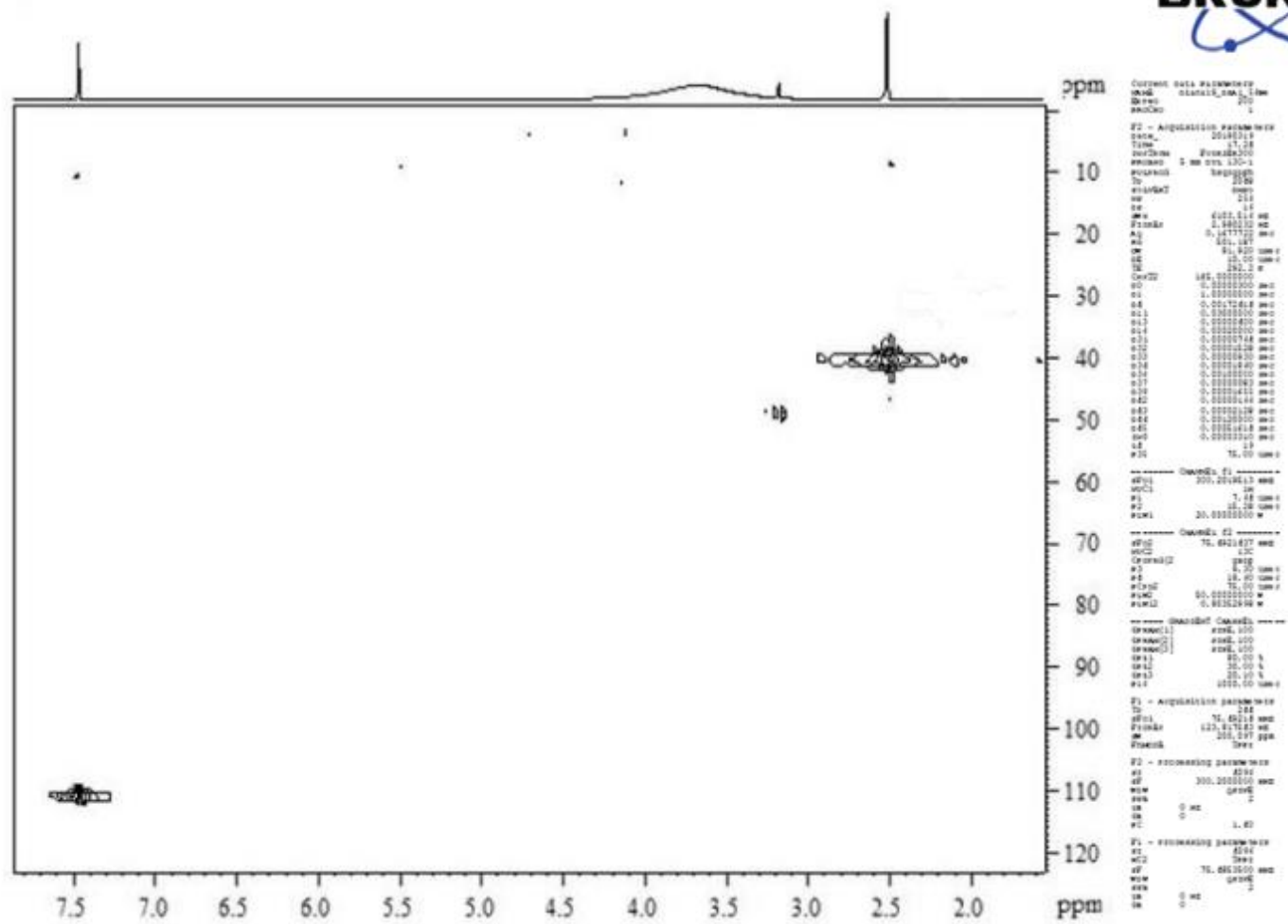
==== CHANNEL f1 =====
SFO1 300.2010195 MHz
NUC1 1H
P1 7.64 usec
PLW1 20.00000000 W
PLW9 0.00004670 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 300.2000000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



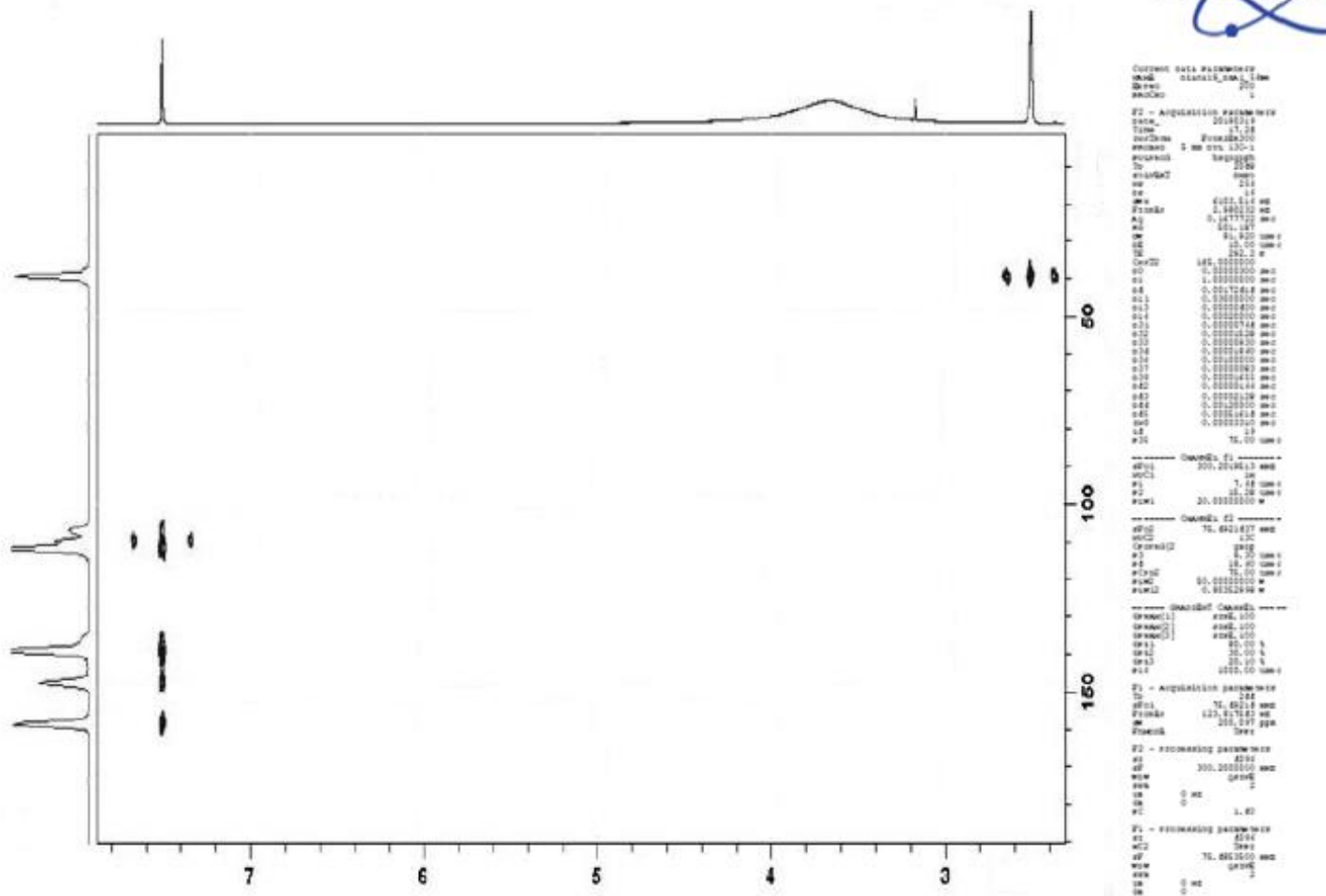
Anexo 24. Espectro de RMN de ^1H da substância E57B-5 em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz).

E57B-5 (HSQC; DMSO-d6; 8 mg) 06/03/2019
Op.: Zelina

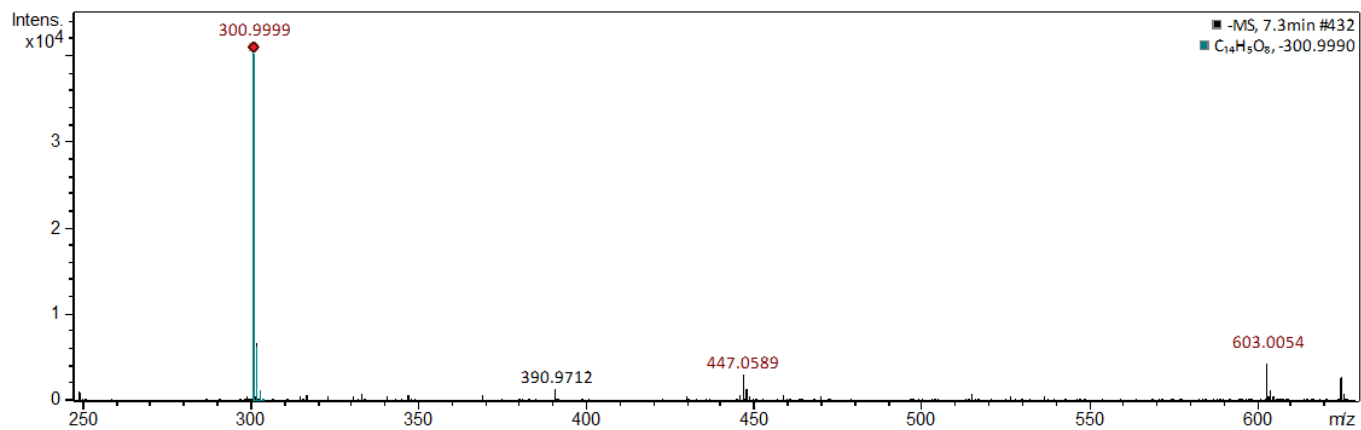


Anexo 25. Mapa de correlação ¹H - ¹³C (HSQC) da substância E57B-5 em DMSO-d₆ (75 MHz).

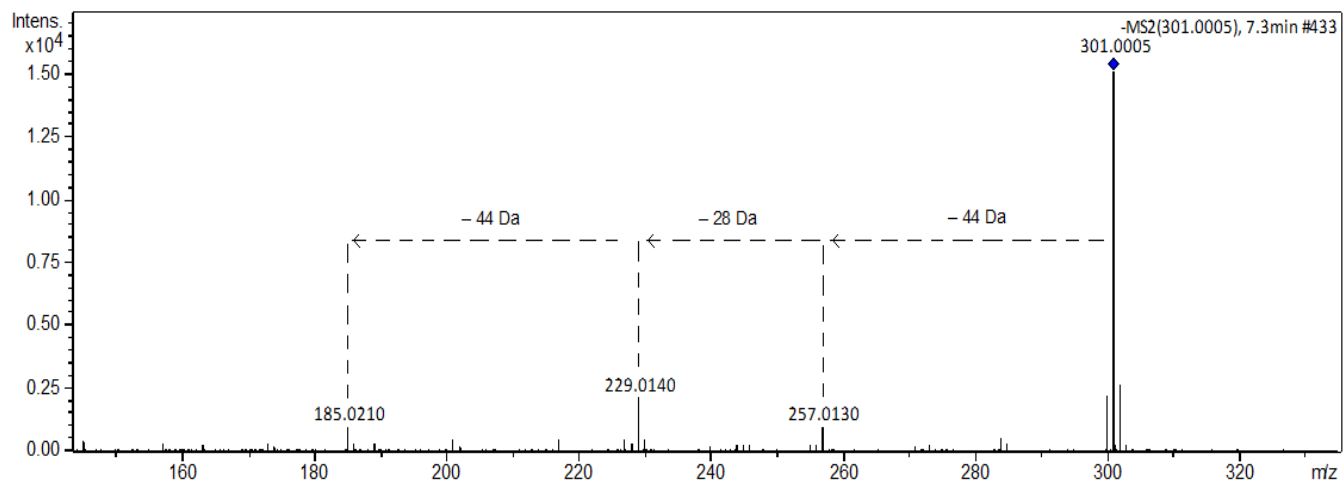
E57B-5 (HMBC; DMSO-d6; 8 mg)06/03/2019
Op.: Zelina



Anexo 26. Mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMBC) da substância E57B-5 em DMSO- d_6 (75 MHz).

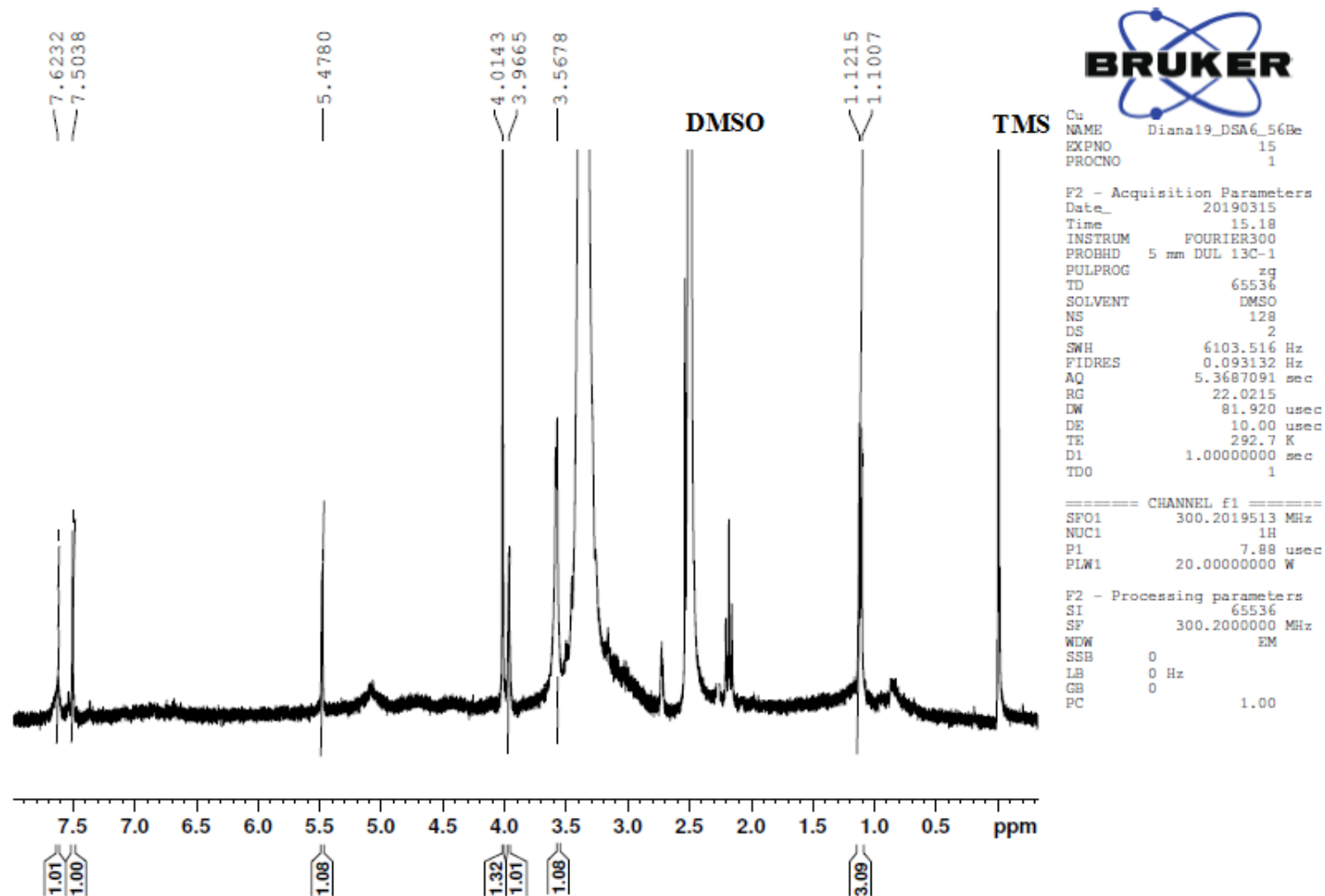


Anexo 27. Espectro ESI/EMAR da substância E57B-5 em modo negativo.



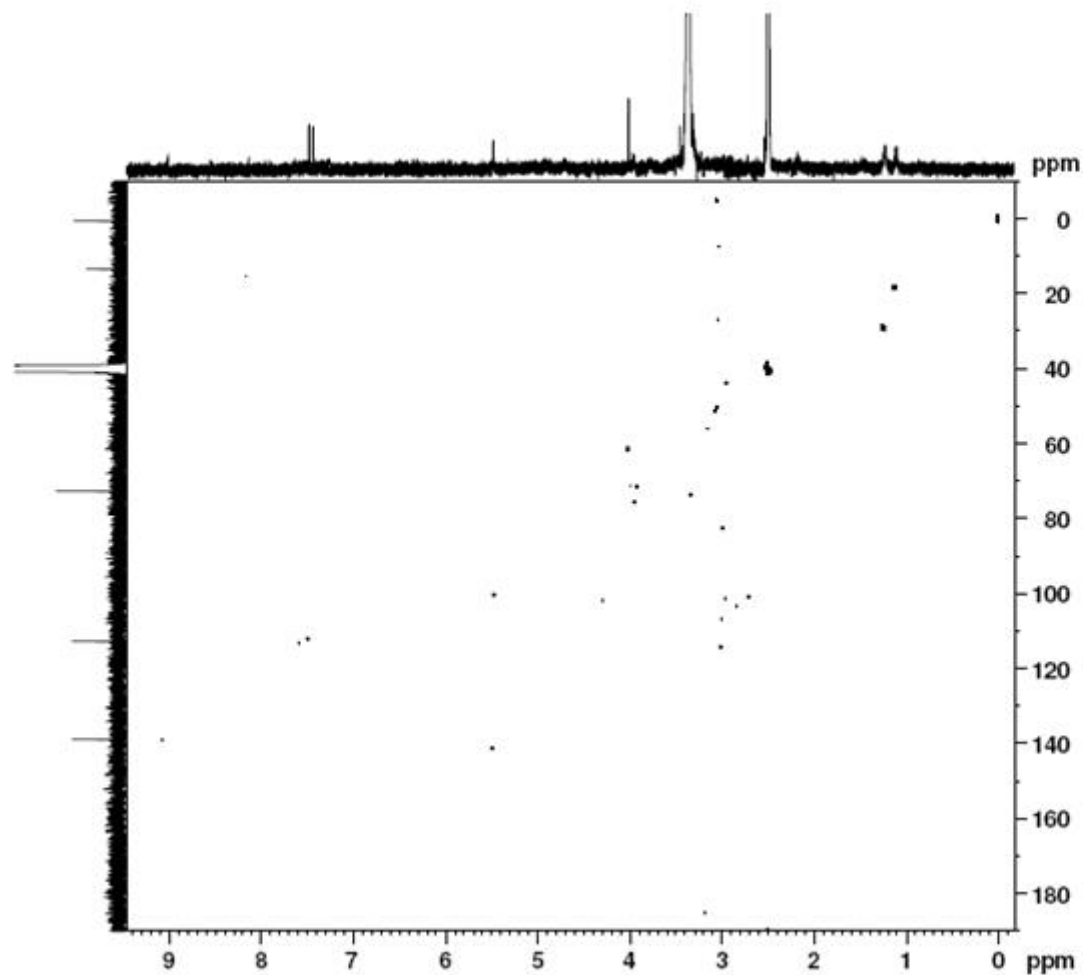
Anexo 28. Espectro de EM2 da substância E57B-5 (m/z 301) em modo negativo.

Diana E57B-6 (1H; DMSO; 3 mg) 15/03/2019
Op.:Zelina



Anexo 29. Espectro de RMN de ^1H da substância E57B-6 em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz).

Diana E57B-6 (HSQC; DMSO; 3 mg)
 15/03/2019. Op.:Zelina

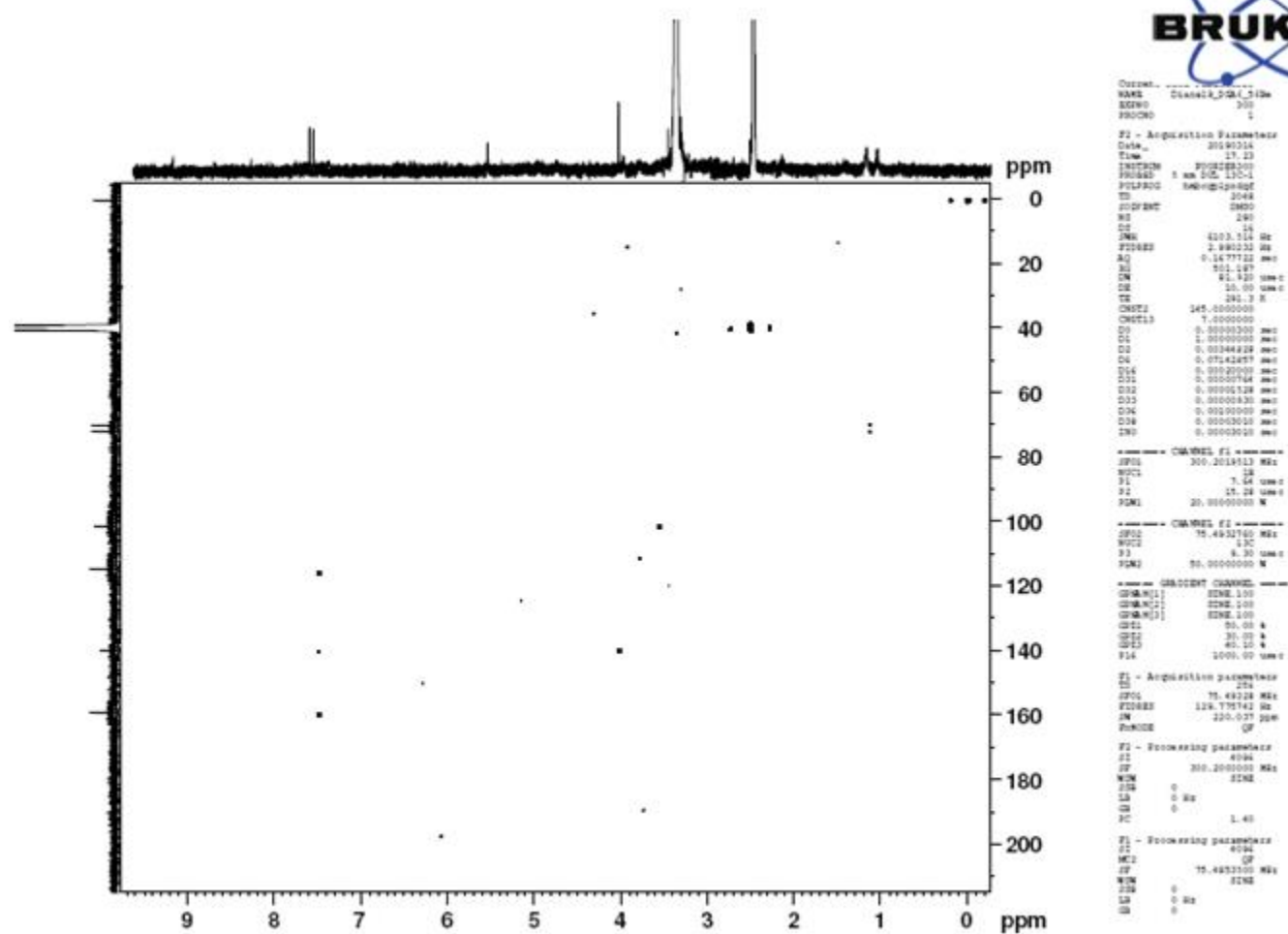


```

C1
NAME DianaE57B-6
EXPNO 2
PROCNO 2
F2 - Acquisition parameters
NAME_2 DianaE57B-6
TIME 20190315
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 130-1
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT dms
NS 204
DS 4
AQ 2.00000000 sec
FIDRES 0.177721 MHz
AQ 0.177721 MHz
SI 320
SF 400.146400 MHz
NUC1 13C
NUC2 1H
C1 - Processing parameters
SI 320
SF 400.146400 MHz
WDW EM
SSB 0
GB 0
PC 1.80
F1 - Acquisition parameters
TD 65536
SF 400.146400 MHz
WDW EM
SSB 0
GB 0
PC 1.80
F2 - Processing parameters
SI 320
SF 400.146400 MHz
WDW EM
SSB 0
GB 0
PC 1.80
  
```

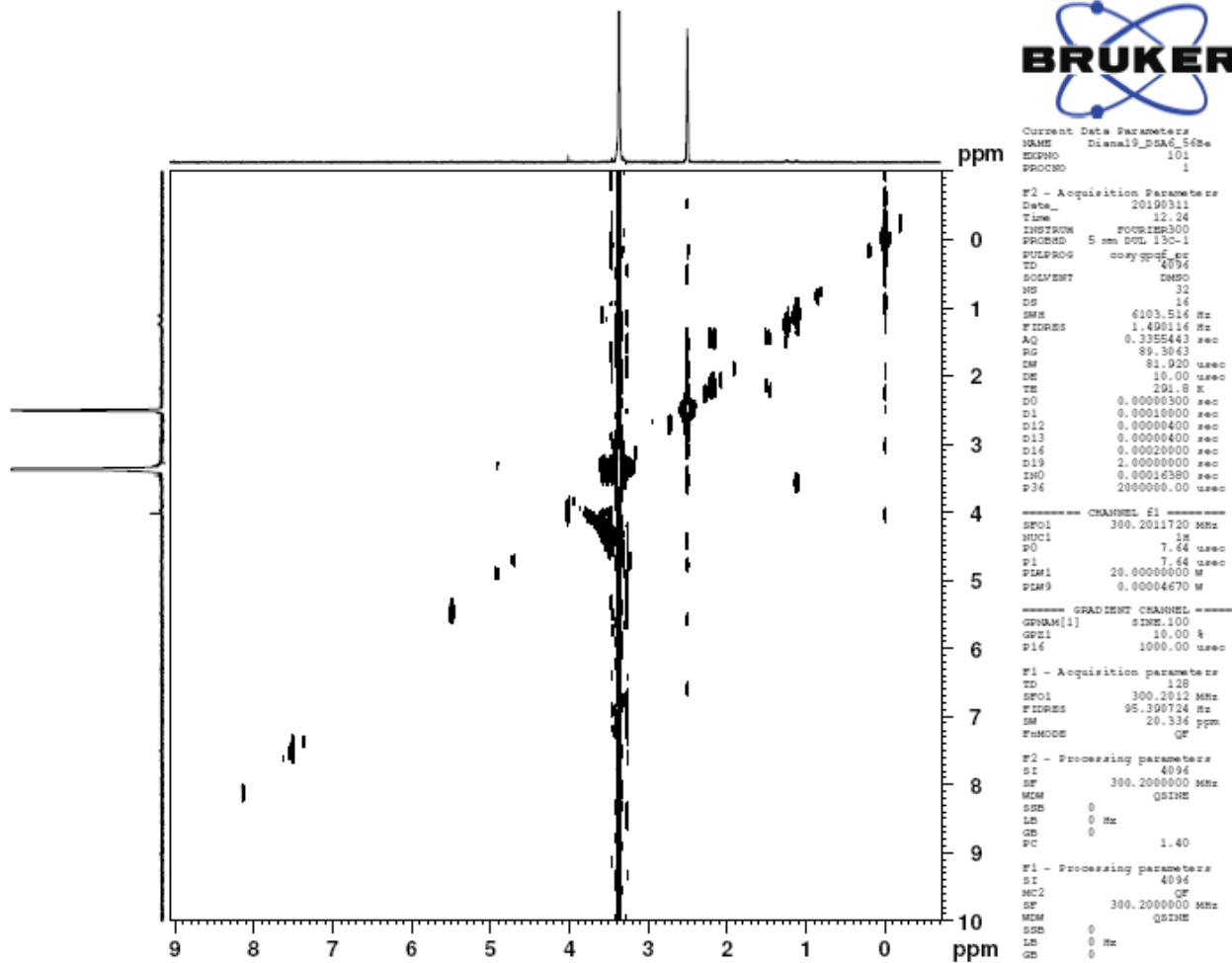
Anexo 30. Mapa de correlação ^1H - ^{13}C (HSQC) da substância E57B-6 em DMSO- d_6 (75 MHz).

Diana E57B-6 (HMBC; DMSO; 3 mg)
15/03/2019. Op.:Zelina

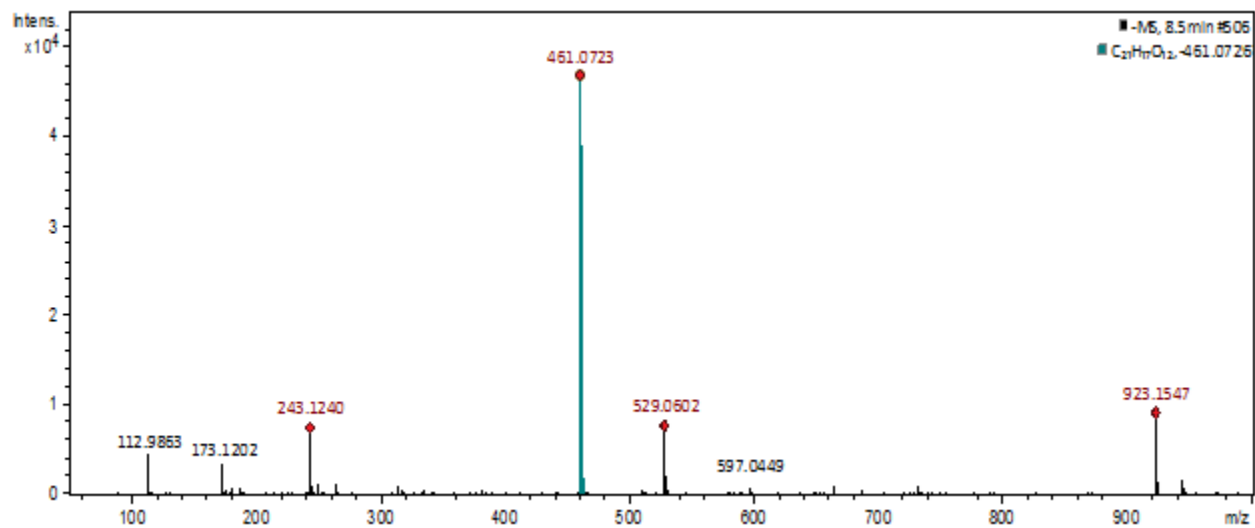


Anexo 31. Mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HMBC) da substância E57B-6 em DMSO- d_6 (75 MHz).

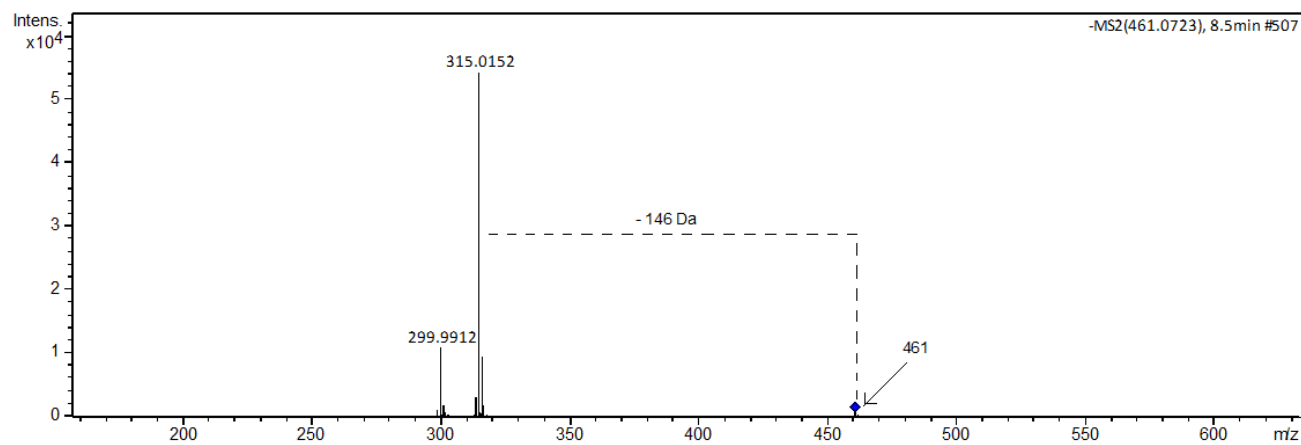
Diana E57B-6 (COSY_Pr_K; DMSO; 2 mg)
 11/03/2019. Op.:Zelina



Anexo 32. Mapa de correlação $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (COSY) da substância E57B-6 em DMSO- d_6 (300 MHz).



Anexo 33. Espectro ESI/EMAR da substância E57B-6 em modo negativo.



Anexo 34. Espectro de EM2 da substância E57B-6 (m/z 461) em modo negativo.