



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Princípios Antimaláricos de *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae)

ABRAÃO ALEXANDRE DE SOUZA

Manaus-AM

Abril, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ABRAÃO ALEXANDRE DE SOUZA

Princípios Antimaláricos de *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae)

Orientador: Dr. Adrian Martin Pohlit

Coorientadora: Dra. Zelina Estevam dos Santos Torres

Manaus-AM
Abril, 2016

Ficha Catalográfica

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

S729p Souza, Abraão Alexandre de
Princípios Antimaláricos de Croton cajucara Benth.
(Euphorbiaceae) / Abraão Alexandre de Souza. 2014
136 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Adrian Martin Pohlit
Coorientador: Zelina Estevam dos Santos Torres
Dissertação (Mestrado em Química - Orgânica) - Universidade
Federal do Amazonas.

1. Fitoquímica. 2. malária. 3. Plasmodium. 4. substâncias
antimaláricas. 5. semissintético. I. Pohlit, Adrian Martin II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

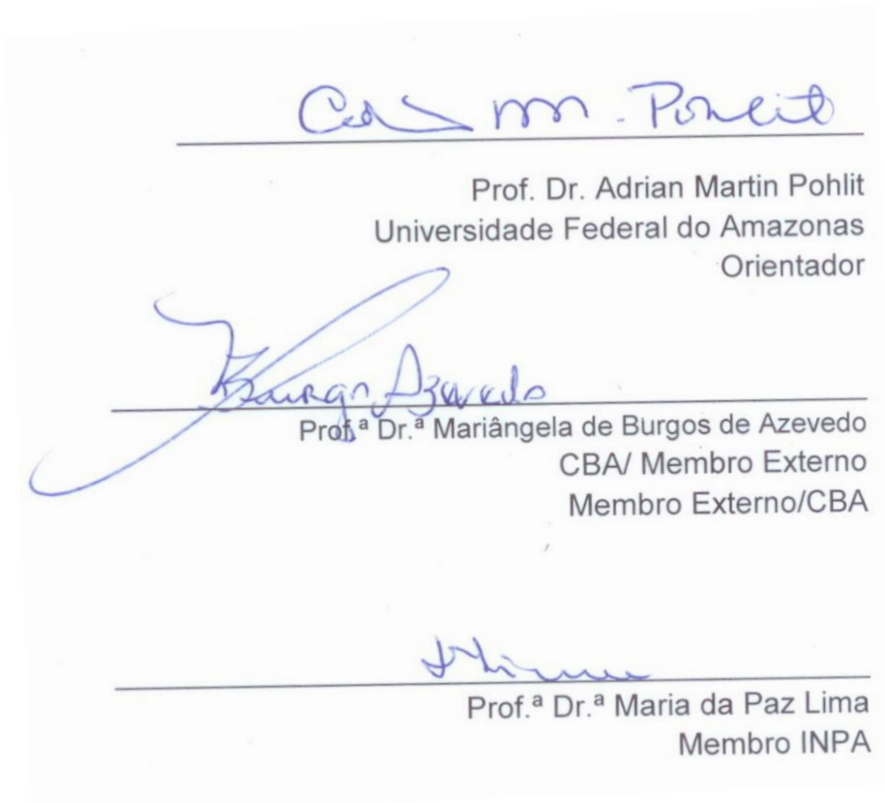
Princípios Antimaláricos de *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae)

ABRAÃO ALEXANDRE DE SOUZA

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisitos parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Parecer da banca examinadora: **APROVADO**

COMISSÃO EXAMINADORA



Universidade Federal do Amazonas

Manaus, 20 de Abril de 2016

“Pai, tu és a fonte de toda a Vida, as vezes me perco em meio as suas infinitudes maneiras que tens de ganhar formas entre nós. Acompanhas teus filhos em cada fechar e abrir de olhos, se delicia com as singela refeição que preparo, se entrete mesmo aos meus devaneios de pensamentos que me arrebatam de vez em quando, se estou com amigos a conversar sobre os assuntos mais inúteis, mesmo assim estás lá, em fim, OBRIGADO.

Aos meus pais: Francisco Alexandre de Souza e Maria do Socorro Saraiva de Souza, agradeço pelos esforços em oferecer-me sabedoria para subir os degraus da vida. Às minhas filhas por serem a razão que me fazem vencer as dificuldades com força e coragem e me motivam a procurar sempre uma saída quando já não me parece haver nenhuma. Carrego vocês gravados no meu coração.

“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine. E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria. E ainda que distribuísse toda a minha fortuna para sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, e não tivesse amor, nada disso me aproveitaria... Quando eu era menino, falava como menino, sentia como menino, discorria como menino, mas, logo que cheguei a ser homem, acabei com as coisas de menino. Porque agora vemos por espelho em enigma, mas então veremos face a face; agora conheço em parte, mas então conhecerei como também sou conhecido. Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três, mas o maior destes é o amor.”

(1 Coríntios 13:1-3, 11-13.)

AGRADECIMENTOS

- A Deus por me tornar forte nos momentos difíceis da vida.
- Aos meus pais pelo apoio e incentivo.
- Ao meu orientador Dr. Adrian Martin Pohlit pela paciência e orientação.
- A minha coorientadora Dra. Zelina Torres pelo conhecimento repassado.
- Ao Dr. Orivaldo Lacerda Junior pela colaboração na obtenção de um derivado semissintético.
- Ao Dr. Luiz Francisco Rocha e Silva, pela análise *in vitro* da atividade antiplasmódica das substâncias isoladas neste trabalho.
- A Karla Lagos pela análise *in vivo* da atividade antiplasmódica de uma substância isolada neste trabalho.
- Aos colegas do LAPAAM, pela colaboração nas identificações das substâncias.
- Ao Curso de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
- Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), onde foi realizada a parte experimental do trabalho.
- À FAPEAM, pela bolsa concedida.
- Aos amigos do Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia-LAPAAM/INPA.
- A todos que ajudaram direta ou indiretamente na conclusão deste trabalho.

RESUMO

A malária é uma das doenças endêmicas mais relevantes nas regiões tropicais cujo o tratamento está baseado em substâncias descobertas a partir de plantas utilizadas tradicionalmente na medicina popular. Assim, diante da resistência do parasita (*Plasmodium* spp.), a busca por novas drogas se tornou fundamental. Entre as substâncias bioativas de espécies vegetais, os terpenóides apresentam-se com uma gama de atividades biológicas, dentre as quais se destacam a antimalárica. Diante disso, esta pesquisa teve por objetivo o isolamento de substâncias com potencial antimalárico. A espécie que têm indicação como antimalárica e que foi utilizada no presente estudo é facilmente encontrada e além disso é cultivada no Estado do Amazonas na EMBRAPA e INPA: 'sacaca' (*Croton cajucara* Benth). As cascas e folhas de 'sacaca' *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae) foram submetidos para preparo de extratos bioativos, com relevância na atividade antimalárica. Onde se observou boa atividade do extrato clorofórmico das folhas no bioensaio *in vitro* frente a cepa K1 de *P. Falciparum*, com $CI_{50} = 6,4 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$, seguida do extrato etanólico das cascas, com $CI_{50} = 17,2 \pm 6,6$. Os extratos foram investigados por meio de uma abordagem fitoquímica tradicional, baseada no fracionamento cromatográfico em coluna aberta, resultando no isolamento de sete substâncias. A substância natural **1** foi acetilado numa reação de anidrido acético (Ac_2O) e piridina ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$), resultando no composto **2**. Estes oito compostos foram identificados principalmente por meio de análises de RMN ^1H e ^{13}C 1D e 2D e CL-EMAR. Em seguida as oito substâncias passaram por *screening* para avaliar suas atividade antiplasmódica em duas concentrações (50 e 5 $\mu\text{g/mL}$): Os resultados revelam que apenas três compostos apresentaram inibição acima de 50% (**1**, **2** e **6**), mas o composto (**6**) apresentou melhor atividade ao inibir mais de 80% do crescimento *in vitro* da cepa K1 de *P. Falciparum*: 70,5-68,0 (**1**); 63,9-55,6 (**2**); 57,6-0 (**3**); 41,8-37,2 (**4**); 18,6-23,2 (**5**); 92,7-75,6 (**6**); 34,9-23,2 (**7**) e 37,2-11,6 (**8**). O **1** e **6** tiveram suas CI_{50} calculadas, onde apresentaram atividades moderadas *in vitro* contra cepa de *P. Falciparum*, com $CI_{50} = 23,7$ e $23,0 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. O composto **1** foi o único a ser testado *in vivo*, no entanto não apresentou atividade frente ao *P. berghei*, por via oral e subcutânea durante o período de sete dias de tratamento.

Palavras – chave: Fitoquímica, malária, *Plasmodium*, substâncias antimaláricas, semissintético.

ABSTRACT

Malaria is one of the most important endemic diseases in tropical regions whose treatment is based on substances discovered from plants traditionally used in folk medicine. Thus, faced with the resistance of the parasite (*Plasmodium* spp.), The search for new drugs has become fundamental. Among the bioactive substances of plant species, terpenoids have a range of biological activities, among which antimalarial. Therefore, the objective of this research was the isolation of substances with antimalarial potential. The species that are indicated as antimalarial and that was used in the present study is easily found and is also cultivated in the State of Amazonas in EMBRAPA and INPA: 'sacaca' (*Croton cajucara* Benth). *Croton* cashews and leaves of Benth (*Euphorbiaceae*) were submitted for the preparation of bioactive extracts, with relevance in the antimalarial activity. In the *in vitro* bioassay of the *P. falciparum* K1 strain, $IC_{50} = 6.4 \pm 1.2 \mu\text{g} / \text{mL}$, followed by the ethanolic extract of the bark, with $IC_{50} = 17.2 \pm 6.6$. The extracts were investigated by means of a traditional phytochemical approach, based on the open column chromatographic fractionation, resulting in the isolation of seven substances. Natural substance 1 was acetylated in a reaction of acetic anhydride (Ac_2O) and pyridine ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$), resulting in compound 2. These eight compounds were identified primarily by ^1H and ^{13}C 1D and 2D and CL-EMAR NMR analyzes. The results showed that only three compounds had inhibition above 50% (1, 2 and 6), but the compound (1) and (2) 6 showed better activity by inhibiting more than 80% of *in vitro* growth of *P. falciparum* strain K1: 70.5-68.0 (1); 63.9-55.6 (2); 57.6-0 (3); 41.8-37.2 (4); 18.6-23.2 (5); 92.7-75.6 (6); 34.9-23.2 (7) and 37.2-11.6 (8). 1 and 6 had their IC_{50} calculated, where they presented moderate *in vitro* activity against *P. falciparum* strain, with $IC_{50} = 23.7$ and $23.0 \mu\text{g} / \text{mL}$, respectively. Compound 1 was the only one to be tested *in vivo*, however it did not show activity against *P. berghei*, orally and subcutaneously during the seven day treatment period.

LISTA DE ABREVIACOES

Aubl.	Aublet
SbFrC ₃ -B-E ₃	Código do composto 7-hidroxicalameneno (1)
SbFrC ₃ -B-E ₃ Ac	Código do composto 7-acetilcalameneno (2)
SbFrC ₃ -C-G ₃	Código do composto <i>trans</i> -desidrocrotonina (3)
SbFrC ₃ -E-D ₃ P	Código do composto <i>cis</i> -desidrocrotonina (4)
SbFrC ₃ -E-D ₃	Código do composto <i>trans</i> -cajucarina B (5)
SbFrC ₃ -E-C ₃	Código do composto <i>cis</i> -cajucarina B (6)
SbFrC ₃ -G-A ₃	Código do composto espiro[furano-3(2H),1'(2'H)-naftaleno] (7)
SbFrC ₂ -C-B ₂ Rc	Código do composto 3,7,4'-tri- <i>O</i> -metilcanferol (8)
CCD	Cromatografia de camada delgada
CCDP	Cromatografia de camada delgada preparativa
CCD-RP	Cromatografia de camada delgada de fase reversa
CDCl ₃	Clorofrmio deuterado
CE ₅₀	Concentração efetiva de 50%
CHCl ₃	Clorofrmio
CI ₅₀	Concentração inibitria de 50%
D6	Cepa do <i>Plasmodium falciparum</i> sensvel  cloroquina
DCM	Diclorometano
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (ionizao por <i>electrospray</i>)
FCR-3	Cepa do <i>Plasmodium falciparum</i> sensvel  cloroquina
HPLC	Cromatografia lquida de alta eficincia
HRMS	<i>High resolution mass spectrometry</i> (espectrometria de massas de alta resolução)
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amaznia
IPA	Indice parasitrio anual
K1	Cepa do <i>Plasmodium falciparum</i> resistente  cloroquina
<i>P. berghei</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
sp.	Espécie
TOF	<i>Time of flight</i> (Tempo de vo)
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
W2	Cepa do <i>Plasmodium falciparum</i> resistente  cloroquina
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)
WRAIR	Walter Reed Army Institute of Research
	Deslocamento químico

FIGURAS

Figura 1. Distribuição mundial da malária.	19
Figura 2. Distribuição da malária na America do Sul/Brasil.....	19
Figura 3. Estruturas de compostos antimaláricos.	22
Figura 4. Distribuição da do gênero <i>Croton</i> no globo terrestre.....	23
Figura 5. Estruturas química de substâncias isolados de <i>Croton cajucara</i> Benth.....	26
Figura 6. Constituintes quimicos isolados das folhas e cascas do caule de <i>Croton cajucara</i> Benth.....	44
Figura 7. Atribuições das correlações das metilas no HMBC do composto 1.	46
Figura 8. Esquema da reação de acetilação do composto 1 para formação do comosto 2.	48
Figura 9. Atribuições das correlações das metilas no HMBC do composto 2.	49
Figura 10. Diterpenóides 19-nor-clerodano <i>trans</i> (3) e <i>cis</i> (4) - desidrocrotonina (<i>t e c</i> -DCTN)	52
Figura 11. Diterpenóides 19-nor-clerodano <i>trans</i> (5) e <i>cis</i> (6) - cajucarina B.	56
Figura 12. Estrutura do diterpenóide 19-nor-clerodano 7.	60
Figura 13. Flavonóide Kaempferol-3,4,7-trimetil éter.	63

FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Coluna cromatográfica do extrato CHCl ₃	35
Fluxograma 2. Coluna cromatográfica da fração FrC ₁ -B.....	35
Fluxograma 3. Coluna cromatográfica da subfração SbFrC ₂ -B-B ₂ , e isolamento do composto 1.	36
Fluxograma 4. Coluna cromatografica da fração FrC ₁ -C.....	37
Fluxograma 5. Coluna cromatografica da fração de SbFrC ₂ -C-D ₂ e isolamento por placa preparativa do composto 4 a partir da subfração SbFrC ₃ -E-D ₃	37
Fluxograma 6. Obtenção do composto 2, a partir da acetilação do composto 1.	38
Fluxograma 7. Coluna cromatográfica do extrato EtOH.....	39
Fluxograma 8. Coluna cromatográfica da fração SbFrC ₁ -E.....	39
Fluxograma 9. Coluna cromatográfica da fração SbFrC ₂ -E-E ₂	40
Fluxograma 10. Coluna cromatográfica da fração FrC ₁ -G.....	41
Fluxograma 11. Coluna cromatográfica da fração SbFrC ₂ -G-C ₂	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade <i>in vitro</i> contra cepas do <i>P. falciparum</i> de extratos obtidos a partir de 2 quimiotipo da planta <i>Croton cajucara</i> Benth.	28
Tabela 2. Testes antiplasmódicos de substâncias presentes em <i>Croton cajucara</i> , isoladas a partir de outras espécies, ver figura 5.	29
Tabela 3. Descrição sobre a espécie estudada.	33
Tabela 4. Partes da planta e solventes utilizados para o preparo dos extratos.	33
Tabela 5. Rendimento dos extratos de folhas de sacaca vermelha em soxleth.	34
Tabela 6. Rendimento dos extratos de casca de sacaca branca em soxleth.	34
Tabela 7. Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 1.	47
Tabela 8. Dados de RMN 1D e 2D do derivado 2 e da substância natural 1.	50
Tabela 9. Dados de RMN 1D e 2D da substância 3.	53
Tabela 10. Dados de RMN 1D e 2D da substância 4.	54
Tabela 11. Dados de RMN 1D e 2D da substância 5.	57
Tabela 12. Dados de RMN 1D e 2D da substância 6.	58
Tabela 13. Dados de RMN 1D e 2D da substância 7.	61
Tabela 14. Dados de RMN 1D e 2D substância 8.	64
Tabela 15. Atividade <i>in vitro</i> contra cepas do <i>P. falciparum</i> de extratos obtidos a partir de cascas e folhas de <i>Croton cajucara</i> Benth.	66
Tabela 16. Inibição do crescimento <i>in vitro</i> da cepa K1 de <i>P. falciparum</i> frente às substâncias: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 (Figura 6).	67
Tabela 17. Concentração inibitória 50% (IC50) <i>in vitro</i> de 02 (duas) substâncias frente à cepa K1 de <i>P. falciparum</i>	68
Tabela 18. Supressão <i>in vivo</i> <i>P. berghei</i> NK65 em roedores fêmeas do terpenoide 7-hidroxicalameneno (1).	69

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Espectro de HRMS; $[\text{M}+\text{H}]^+$ do 7-hidroxicalameneno (composto 1).	80
Anexo 2. Espectro de RMN de ^1H do 7-hidroxicalameneno (composto 1), 300 MHz, CDCl_3 80	
Anexo 3. Espectro de RMN de ^{13}C do 7-hidroxicalameneno (composto 1), 75 MHz, CDCl_3 82	
Anexo 4. Espectro de DEPT135 do 7-hidroxicalameneno (composto 1), 75 MHz, CDCl_3	83

Anexo 5. Espectro de correlação ^1H - ^1H (COSY) do 7-hidroxicalameneno (composto 1), 300 MHz, CDCl_3	83
Anexo 6. Espectro de correlação de ^{13}C - ^1H (HSQC) do 7-hidroxicalameneno (composto 1), em CDCl_3 , ^{13}C : 75 MHz e ^1H : 300 MHz.....	85
Anexo 7. Espectro de correlação de ^{13}C - ^1H (HMBC) do 7-hidroxicalameneno (composto 1), em CDCl_3 , ^{13}C : 75 MHz e ^1H : 300 MHz.....	86
Anexo 9. Espectro de RMN de ^1H do 7-acetilcalameneno (composto 2), 300 MHz, CDCl_3 .	86
Anexo 8. Espectro de IR do 7-hidroxicalameneno (composto 1).	87
Anexo 10. Espectro de RMN de ^{13}C do 7-acetilcalameneno (composto 2), 75 MHz, CDCl_3 ...	88
Anexo 11. Espectro de correlação ^1H - ^1H (COSY) do 7-acetilcalameneno (composto 2), 300 MHz, CDCl_3	90
Anexo 12. Espectro de correlação de ^{13}C - ^1H (HSQC) do 7-acetilcalameneno (composto 2), em CDCl_3 , ^{13}C : 75 MHz e ^1H : 300 MHz.....	91
Anexo 13. Espectro de correlação de ^{13}C - ^1H (HMBC) do 7-acetilcalameneno (composto 2), em CDCl_3 , ^{13}C : 75 MHz e ^1H : 300 MHz.....	91
Anexo 14. Espectro de IR do 7-acetilcalameneno (composto 2).	93
Anexo 15. Espectro de HRMS; $[\text{M}+\text{H}]^+$ do <i>trans</i> -desidrocrotonina composto 3.	94
Anexo 16. Espectro de RMN de ^1H do <i>trans</i> -desidrocrotonina composto 3, 300 MHz, CDCl_3	94
Anexo 17. Espectro de RMN de ^{13}C do <i>trans</i> -desidrocrotonina composto 3, 75 MHz, CDCl_3	95
Anexo 18. Espectro de DEPT135 do <i>trans</i> -desidrocrotonina composto 3, 75 MHz, CDCl_3 ...	96
Anexo 19. Espectro de correlação ^1H - ^1H (COSY) do <i>trans</i> -desidrocrotonina composto 3, 300 MHz.....	98
Anexo 20. Espectro de correlação de ^{13}C - ^1H (HSQC) do <i>trans</i> -desidrocrotonina composto 3, em CDCl_3 , ^{13}C : 75 MHz e ^1H : 300 MHz.....	99
Anexo 23. Espectro de HRMS; $[\text{M}+\text{H}]^+$ do <i>cis</i> -desidrocrotonina composto 4, 300 MHz, CDCl_3	100
Anexo 21. Espectro de correlação de ^{13}C - ^1H (HMBC) do <i>trans</i> -desidrocrotonina composto 3, em CDCl_3 , ^{13}C : 75 MHz e ^1H : 300 MHz.....	100
Anexo 22. Espectro de IR de <i>trans</i> -desidrocrotonina composto 3.....	101
Anexo 24. Espectro de RMN de ^1H do <i>cis</i> -desidrocrotonina composto 4, 300 MHz, CDCl_3	102
Anexo 25. Espectro de RMN de ^{13}C do <i>cis</i> -desidrocrotonina composto 4, 75 MHz, CDCl_3 .	103

Anexo 26. Espectro de DEPT135 do <i>cis</i> -desidrocrotonina composto 4, 75 MHz, CDCl ₃	104
Anexo 27. Espectro de correlação ¹ H- ¹ H (COSY) do <i>cis</i> -desidrocrotonina composto 4, 300 MHz, CDCl ₃	106
Anexo 28. Espectro de correlação de ¹³ C- ¹ H (HSQC) do <i>cis</i> -desidrocrotonina composto 4, em CDCl ₃ , ¹³ C: 75 MHz e ¹ H: 300 MHz	106
Anexo 29. Espectro de correlação de ¹³ C- ¹ H (HMBC) do <i>cis</i> -desidrocrotonina composto 4, em CDCl ₃ , ¹³ C: 75 MHz e ¹ H: 300 MHz.....	107
Anexo 30. Espectro de HRMS; [M+H] ⁺ do <i>trans</i> -cajucarina B (SbFrC ₃ -E-D ₃).	108
Anexo 31. Espectro de RMN de ¹ H do <i>trans</i> -cajucarina B composto 5, 300 MHz, CDCl ₃ . ..	109
Anexo 32. Espectro de RMN de ¹³ C do <i>trans</i> -cajucarina B composto 5, 75 MHz, CDCl ₃ ..	110
Anexo 33. Espectro de DEPT135 do <i>trans</i> -cajucarina B composto 5, 75 MHz, CDCl ₃	111
Anexo 34. Espectro de correlação ¹ H- ¹ H (COSY) do <i>trans</i> -cajucarina B composto 5, 300 MHz, CDCl ₃	113
Anexo 35. Espectro de correlação de ¹³ C- ¹ H (HSQC) do <i>trans</i> -cajucarina B composto 5, em CDCl ₃ , ¹³ C: 75 MHz e ¹ H: 300 MHz	114
Anexo 37. Espectro de HRMS; [M+H] ⁺ do <i>cis</i> -cajucarina B composto 6.	115
Anexo 36. Espectro de correlação de ¹³ C- ¹ H (HMBC) do <i>trans</i> -cajucarina B composto 5, em CDCl ₃ , ¹³ C: 75 MHz e ¹ H: 300 MHz.	115
Anexo 38. Espectro de RMN de ¹ H do <i>cis</i> -cajucarina B composto 6, 300 MHz, CDCl ₃	117
Anexo 39. Espectro de RMN de ¹³ C do <i>cis</i> -cajucarina B composto 6, 75 MHz, CDCl ₃	118
Anexo 40. Espectro de DEPT135 do <i>cis</i> -cajucarina B composto 6, 75 MHz, CDCl ₃	119
Anexo 41. Espectro de correlação ¹ H- ¹ H (COSY) do <i>cis</i> -cajucarina B composto 6, 300 MHz, CDCl ₃	120
Anexo 42. Espectro de correlação de ¹³ C- ¹ H (HSQC) do <i>cis</i> -cajucarina B composto 6, em CDCl ₃ , ¹³ C: 75 MHz e ¹ H: 300 MHz	121
Anexo 43. Espectro de correlação de ¹³ C- ¹ H (HMBC) do <i>cis</i> -cajucarina B composto 6, em CDCl ₃ , ¹³ C: 75 MHz e 1H: 300 MHz.....	122
Anexo 44. Espectro de HRMS; [M+H] ⁺ do composto 7.....	123
Anexo 45. Espectro de RMN de ¹ H do composto 7.	124
Anexo 46. Espectro de RMN de ¹³ C do composto 7, 75 MHz, CDCl ₃	124
Anexo 47. Espectro de DEPT135 do composto 7, 75 MHz, CDCl ₃	124
Anexo 48. Espectro de correlação 1H-1H (COSY) do composto 7, 300 MHz, CDCl ₃	124

Anexo 49. Espectro de correlação de ^{13}C - ^1H (HSQC) do composto 7, em CDCl_3 , ^{13}C : 75 MHz e ^1H : 300 MHz.....	124
Anexo 50. Espectro de correlação de ^{13}C - ^1H (HMBC) do composto 7.	124
Anexo 51. Espectro de HRMS; $[\text{M}+\text{H}]^+$ do composto 8.....	124
Anexo 52. Espectro de RMN de ^1H do composto 8, em CDCl_3 , 300 MHz, CDCl_3	124
Anexo 53. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8, em CDCl_3 , ^{13}C : 75 MHz, CDCl_3	124
Anexo 54. Espectro de DEPT135 do composto 8, em CDCl_3 , ^{13}C : 135 MHz.....	124
Anexo 55. Espectro de correlação ^1H - ^1H (COSY) do composto 8, em CDCl_3 , ^{13}C : 75 MHz e ^1H : 300 MHz.....	124
Anexo 56. Espectro de correlação de ^{13}C - ^1H (HSQC) do composto 8, em CDCl_3 , ^{13}C : 75 MHz e ^1H : 300 MHz.....	124
Anexo 57. Espectro de correlação de ^{13}C - ^1H (HMBC) do composto 8, em CDCl_3 , ^{13}C : 75 MHz e ^1H : 300 MHz.....	124

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1	Malária.....	19
2.2	O cenário das principais drogas antimaláricas no mundo	20
2.3	Considerações gerais sobre a família euphorbiaceae e o genero <i>croton</i>	23
2.4	Considerações gerais sobre <i>Croton cajucara</i> Benth.	24
2.5	Constituintes químicos encontrados no <i>Croton cajucara</i> Benth.....	24
2.6	Atividade biológica da <i>C. cajucara</i> Benth.	27
3.	OBJETIVO.....	30
3.1	Geral	30
3.2	Específico	30
4.	PARTE EXPERIMENTAL.....	31
4.1	Material e métodos	31
4.1.1	Equipamentos	31
4.1.2	Solventes	31
4.2	Métodos	31
4.2.1	Cromatografia em camada delgada (CCD)	31
4.2.2	Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)	32
4.2.3	Cromatografia em coluna (CC)	32
4.2.4	Coleta do material vegetal	32
4.2.5	Método de extração	33
4.2.6	Cálculo do teor de extração	33
4.3	Estudo fitoquímico	34
4.3.1	Fracionamento cromatografico.....	34
4.3.2	Fracionamento cromatográfico do extrato CHCl ₃ das folhas de sacaca vermelha	34
4.3.3	Reação de acetilação de SbFrC ₃ -B-E ₃	38
4.3.4	Fracionamento cromatográfico do extrato EtOH das cascas do caule de sacaca branca.....	38
4.4	Ensaio de atividade antiplasmódica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	42
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	Substâncias identificadas.....	44
5.2	Identificação das substâncias.....	45
5.2.1	Identificação estrutural da substância 1.....	45

5.2.2	Identificação do derivado semissintético (2).....	48
5.2.1	Identificação estrutural das substâncias 3 e 4.....	51
5.2.2	Identificação estrutural de 5 e 6	55
5.2.3	Identificação estrutural da substância 7.....	59
5.2.4	Identificação estrutural da substância 8.....	62
5.3	Atividade antiplasmódica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> em células normais dos terpenóides naturais e semissintético.....	65
6.	CONCLUSÃO	70
7.	BIBLIOGRAFIA.....	71
8.	ANEXO.....	79

1. INTRODUÇÃO

A malária ainda é um dos mais sérios problemas de saúde pública do mundo. Isso se deve a vários fatores, dentre estes a sua extensa distribuição geográfica. Essa doença é um fator limitante ao crescimento econômico em várias áreas do globo, particularmente nos países tropicais, onde essa enfermidade continua sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade. Ocorre aproximadamente em 100 países, principalmente em regiões de clima subtropical e tropical. Atualmente as situações mais graves se concentram na África Subsaariana (WHO, 2016).

Em todo mundo, cerca de 214 milhões de pessoas foram infectadas por *Plasmodium* spp. no ano de 2016. Destas, 438 mil vieram a óbito, das quais a maioria eram crianças menores de cinco anos. A Organização Mundial da Saúde afirma que 3,4 bilhões de pessoas continuam vivendo em áreas de risco de contrair a doença, principalmente na África e no sudeste da Ásia. Cerca de 80% dos casos de malária aconteceram no continente africano (WHO, 2016).

No Brasil, aproximadamente 99% dos casos de malária registrados se encontram na Região Amazônica. Isto acontece devido a região apresentar características climáticas, ambientais e ecológicas extremamente favoráveis à proliferação do mosquito transmissor (CONFALONIERI, 2005).

Esse fato se agrava frente à dificuldade do controle dessa doença, devido à resistência adquirida pelo parasita (*Plasmodium* spp.) frente às drogas utilizadas no tratamento da malária (GINSBURG e DEHARO, 2011; WELLS, 2011; ANTHONY *et al.*, 2012). Essa resistência adquirida pelo parasita tem incentivado a busca por novos agentes quimioterapêuticos em espécies vegetais, incluindo as tradicionalmente utilizadas como antimaláricas, a exemplo da *Cinchona officinalis* e *Artemisia annua*, das quais foram descobertas a quinina (**4**) (Figura 1) e artemisinina (**12**) (Figura 1), respectivamente (BERO *et al.*, 2009; RUKUNGA *et al.*, 2009; ADEBAYO e KRETTLI, 2011).

No Brasil, a biodiversidade Amazônica, ainda em grande parte desconhecida, impulsiona a busca por novas drogas, principalmente a partir de plantas. Porém, nesta região, a investigação por princípios ativos por meio de estudos químicos e farmacológicos ainda é considerada incipiente, contrastando com o que ocorre em outros países e em outras regiões (POHLIT *et al.*, 2013).

O *Croton cajucara* Benth. (quimiotipo branca e vermelha) é uma planta comumente indicada na literatura como antimalárica possuindo uma ampla variedade de atividades biológicas. Em estudos farmacológicos observou-se o efeito hiporlipidêmico a partir dos extratos hidroalcoólicos das folhas (FARIAS *et al.*, 1996), assim também como propriedades antimutagenicida e antiulcerogênica (SANTOS *et al.*, 2006; VIEIRA *et al.*, 2008; SOUZA-BRITO *et al.*, 2008).

Extratos preparados das folhas apresentaram ação antinociceptiva (CAMPOS *et al.*, 2002) e no combate ao estresse oxidativo (TIEPPO *et al.*, 2006). Em estudos anteriores o extrato clorofórmico da folha da variedade vermelha exibiu boa atividade *in vitro* contra *P. falciparum*, com $CI_{50} = 6,4 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$, LIMA *et al.*, 2015.

Estudos fitoquímicos com espécies do gênero *Croton* a classifica como uma rica fonte em metabólitos secundários, principalmente terpenóides (BERRY *et al.*, 2005; SALATINO *et al.*, 2007). O presente trabalho avaliou o potencial antimalárico de *Croton cajucara* a partir de substâncias isoladas de extratos clorofórmico e etanólico, obtenção de um novo composto via semissíntese e teste da atividade antimalárica *in vitro* contra *P. falciparum* e *in vivo* frente ao *Plasmodium berghei*.

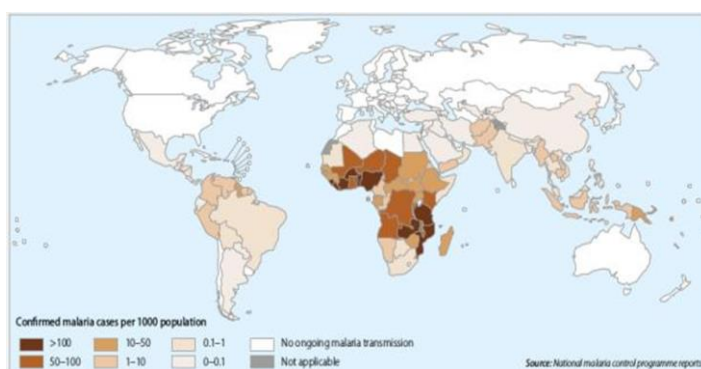
2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Malária

Não obstante o número de infecções está diminuindo, a malária ainda é considerada uma das piores doenças infecciosas transmitidas por vetores no mundo. Em 2014, ocorreram 438 mil óbitos no mundo. Dessas, cerca de 70% foram acometidas com crianças com idade inferior a cinco anos (WHO, 2015).

Essa doença está amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, no entanto, mais de 88% dos casos e 90% das mortes ocorrem na África, e o restante se concentra na Índia, Sudeste Asiático e América do Sul (WHO, 2015; CRUZ *et al.*, 2013).

Figura 1. Distribuição mundial da malária.



Fonte: WHO 2016

Na América, apesar da tendência para a diminuição do número de casos (de 1,2 milhões em 2000 para 390 mil casos em 2014), os dados ainda são considerados preocupantes. Nessa região, três países são responsáveis por 77% dos casos, dentre eles o Brasil, que lidera o ranking com 37%, seguido pela Venezuela (23%) e Colômbia (17%) (WHO, 2015).

Figura 2. Distribuição da malária na América do Sul/Brasil.



Fonte: WHO 2016

No Brasil, aproximadamente 99,9% dos casos ocorrem na região Amazônica. Nessa região, o risco de contaminação não é uniforme, por isso é estimado pela incidência parasitária anual (IPA), calculada por número de casos dividido pela população sob-risco e expresso em casos por mil habitantes. Essa incidência classifica as áreas como de alto (≥ 50), médio (< 50 e ≥ 10) e baixo risco (< 10). Dos 5.565 Municípios do Brasil, 156 foram classificados como em fase de controle, 38 em pré-eliminação, 447 em fase de eliminação e 4.924 em fase de prevenção da reintrodução, quanto à transmissão do *P. vivax* (BRASIL, 2014). As principais espécies de mosquitos transmissores da malária no país são do gênero *Anopheles*: *A. darlingi*, *A. aquasolis*, *A. albitarsis*. Conhecidos popularmente como “carapanã”, “muriçoca”, “sovela”, “mosquito prego” e “bicuda” (LOIOLA, *et al.*, 2002; BRASIL, 2009).

Os sintomas da malária variam de acordo com a espécie do parasita, assim como cada hospedeiro pode responder de forma diferente. Em geral, os sintomas são dor de cabeça, dores musculares, náuseas e tonturas, bem como a sensação de frio, acompanhada de tremor, febre e suor e em alguns casos mais severos podem ocorrer dores abdominais fortes, sonolência e redução da consciência e até coma, como no caso da malária cerebral. A malária durante a gravidez está associada com aumento do risco de anemia materna, aborto espontâneo, redução do peso da criança, parto prematuro e outros efeitos adversos sobre a saúde (ADITYA *et al* 2013; LUZ *et al.*, 2013).

O parasita da malária é do gênero *Plasmodium*. E dentre as espécies desse gênero que parasitam de forma natural os seres humanos, o *P. falciparum* apresenta uma diversidade genética que permite uma maior resistência às drogas antimaláricas, o que faz com que essa espécie seja responsável pelo maior número de casos e o maior número de mortes relacionadas a essa doença, no mundo (BANNISTER e MITCHELL, 2003; KAUR *et al.*, 2009; MACHADO *et al.*, 2010).

2.2 O cenário das principais drogas antimaláricas no mundo

Os principais medicamentos disponíveis para combater as doenças infecciosas, e em particular para a malária têm origem nas plantas. A quinina (4) (Figura 3) é o composto mais importante utilizado contra a malária e foi isolada em 1820 a partir de casca de uma planta do gênero *Cinchona*, utilizada, havia muito tempo, por índios peruanos, como antitérmico. A partir da descoberta dessa substância, novos compostos que apresentam em sua estrutura o

esqueleto quinolínico foram sintetizados e utilizados como fármacos antimaláricos como a cloroquina (**3**), mefloquina (**11 a e b**) e amodiaquina (**5**) (Figura 3) (SILVA *et al.*, 2005a).

A cloroquina ainda é o antimalárico mais amplamente prescrito nos trópicos. No entanto, o seu uso tem perdido a viabilidade em razão do elevado nível de resistência do parasita. A resistência é adquirida devido a mutações gênicas espontâneas e/ou à seleção dos parasitas mais resistentes em virtude da utilização indiscriminada dos medicamentos (MACKINNON, 2005; NOEDL *et al.*, 2008).

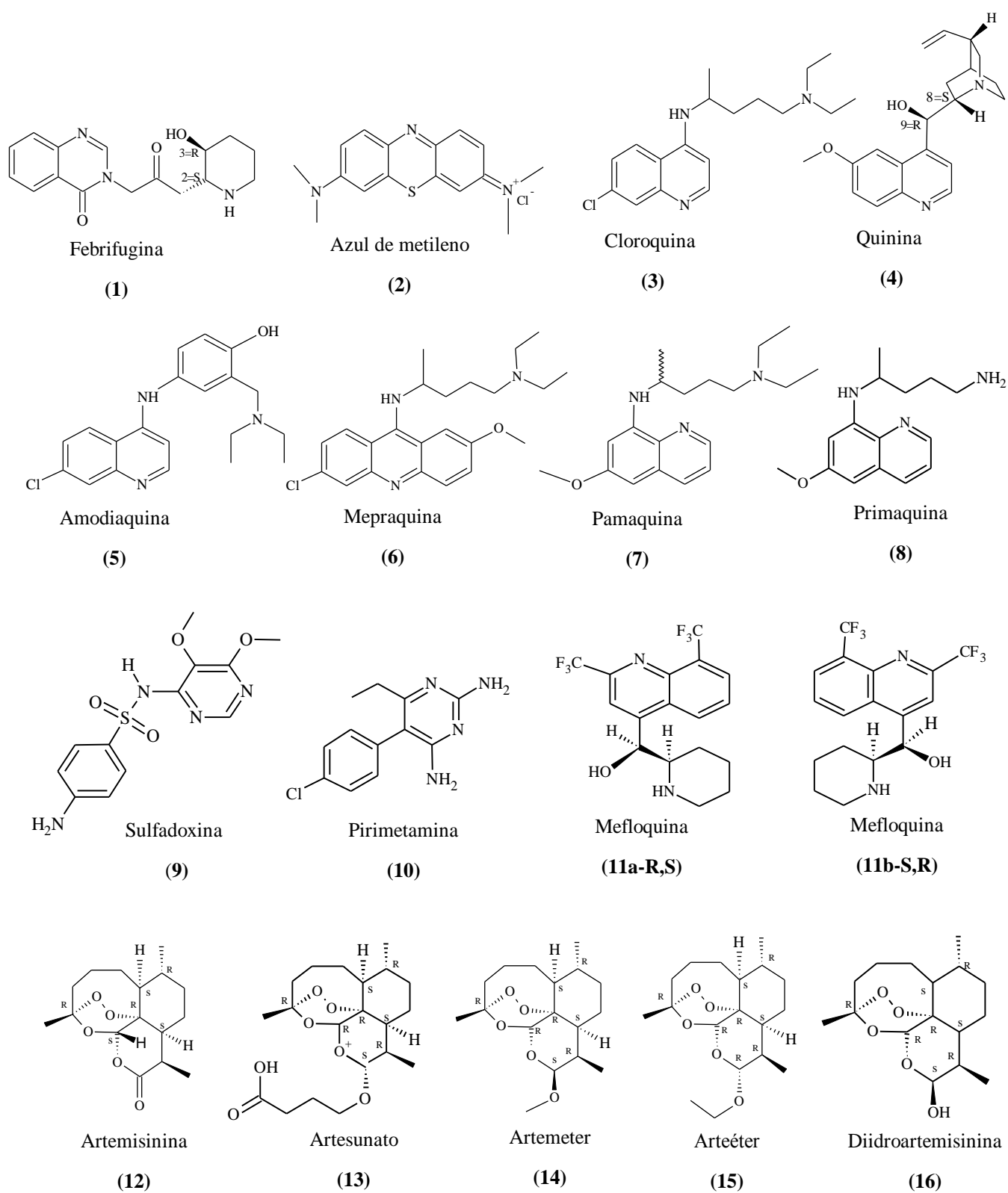
O primeiro registro de resistência do *P. falciparum* frente a quinina ocorreu no ano de 1910, contra a cloroquina em 1957, proguanil em 1949, sulfoxina-pirimetamina em 1967 e mefloquina em 1982 (CRAVO e ROSÁRIO, 2003). Para o *P. vivax* também já existem relatos de resistência frente à cloroquina, sendo o primeiro caso descrito em 1989 na Nova Guiné e a partir daí em muitos locais foi observada, inclusive no Brasil (GARAVELLI e CORTI, 1992; ALECRIM *et al.*, 1999).

Na década de 70, outra substância com grande potencial antimalárico foi isolada, a artemisinina (**12**) (Figura 3), obtida a partir da planta *Artemisia annua*, erva utilizada pela medicina tradicional chinesa a mais de 2.000 anos na forma de infusão para o tratamento de febre e malária. Essa substância se destacou pela rápida eliminação do parasita, com boa evolução clínica do paciente. A artemisinina é uma lactona sesquiterpênica e apresenta em sua estrutura uma ligação endoperóxido, que segundo estudos parece ser crucial para sua atividade antimalárica (FRANCISCO e VARGAS, 2010).

Durante décadas se conviveu com o problema da dificuldade de se produzir sinteticamente a artemisinina (**12**), assim a indústria farmacêutica contava com poucos artemisinínicos sintéticos, os quais somente alguns possuíam estabilidade estrutural, biodisponibilidade oral e potência terapêutica. Apenas recentemente, a síntese e a entrada da artemisinina semissintética para a produção comercial foi possível, demonstrando ser um grande avanço para o desenvolvimento e produção de agentes farmacêuticos contra a malária. (SCHWIKKARD e HEERDEN, 2002; PADDON e KEASLING, 2014).

Assim, diante da recente introdução de derivados semissintéticos da artemisinina e devido à resistência do parasita frente a essa substância já relatada na literatura, foi introduzido o tratamento da malária com a junção de diferentes drogas, a chamada terapia combinada à base de artemisinina (ACTs), (EGAN, 2009; DOUGLAS *et al.*, 2010; HUNJA *et al.*, 2013; PHYO *et al.*, 2012; WEATHERS e TOWLER, 2014).

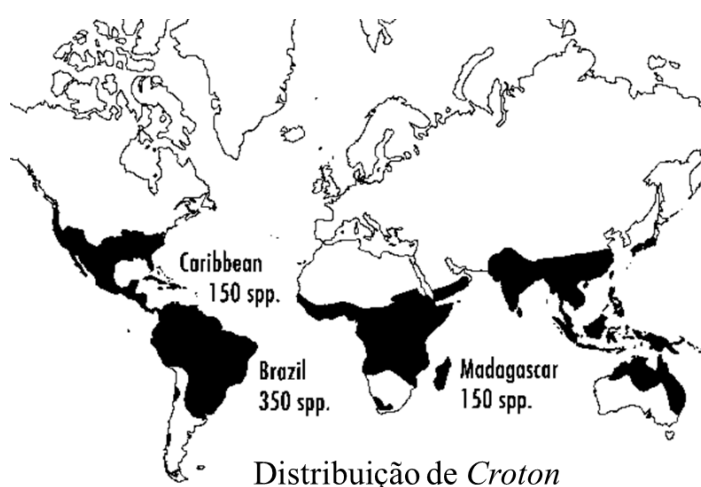
Figura 3. Estruturas de compostos antimaláricos.



2.3 Considerações gerais sobre a família euphorbiaceae e o genero *Croton*.

A família Euphorbiaceae é uma família de plantas amplamente distribuídas em regiões tropicais e temperadas de todo o mundo, possuindo aproximadamente 300 gêneros e 8000 espécies, sendo o gênero *Croton* o segundo com maior número de espécies desta família, apresentando cerca de 700 espécies, na sua maioria encontradas no Brasil (BERRY *et al.*, 2005).

Figura 4. Distribuição da do gênero *Croton* no globo terrestre.



FONTE: BERRY *et al.*, 2005.

O gênero *Croton* tem representantes tanto medicinais quanto tóxicos, extratos etanólico das folhas de *Croton mubango* e *C. leptostachyus* Kunth, apresentaram CI_{50} de 3,2 $\mu\text{g/ml}$ e $2,1 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (MESIA *et al.*, 2005; GARAVITO *et al.*, 2006). *In vivo* a atividade antimalárica de *C. mubango* foi avaliada contra o *P. berghei*, e o extrato aquoso apresentou inibição entre 60 e 80% a uma dose oral diária de 200 mg/kg (MESIA *et al.*, 2005).

Okokon e Nwafor (2009) em estudo *in vivo* com extratos obtidos a partir das raízes de *C. zambesicus* por diferentes solventes, observou-se inibição entre 58 a 75% a uma dose de 57 mg/kg Mohammed *et al.* (2014) observaram um efeito significativo de dose dependência na supressão do *P. berghei* em camundongos utilizando várias doses (200; 400 e 600 mg/kg) dos extrato aquoso e metanólico de *C. macrostachyus* hocsht. Resultados semelhantes foram observados por Bantie *et al.* (2014) para esse mesma espécie tanto no extrato bruto quanto

para as frações testadas (clorofórmica, metanólica e aquosa), sendo os melhores resultados obtidos pela fração clorofórmica.

Uma das espécies mais conhecidas no Norte do Brasil é o *Croton cajucara* Benth. (ABREU *et al.*, 2001; MACIEL *et al.*, 2002; CONCEIÇÃO *et al.*, 2002). Vários autores relatam que a sacaca apresenta propriedades antidiarréica, antiinflamatória, antilítica, antitumoral, antiulcerogênica, emagrecedora, estomáquica, hipoglicêmica, além de ser utilizada contra hepatite, febre e para tratar anemia e para controlar índices de colesterol (ICHIARA *et al.*, 1992; FARIAS *et al.*, 1997). Para tratar a malária, a sacaca tem sido indicada por meio da infusão das folhas e da casca do caule (ODONNE *et al.*, 2013).

2.4 Considerações gerais sobre *Croton cajucara* Benth.

O *C. cajucara* é conhecido popularmente como ‘sacaca’, é um arbusto de folhas lanceoladas, dotadas de pecíolo, de até 14 cm de comprimento por 5 cm de largura, de coloração verde ou pardacenta e suas flores em racimos terminais de 6 a 9 cm de comprimento, apresenta ainda casca pulverulenta e aromática (SECCO, 1990; CHAUDHURRY, 1995; MACIEL *et al.*, 1998). Essa espécie corresponde a uma das plantas mais conhecidas no norte do Brasil e tem sido utilizada há muito tempo como fitoterápico (COSTA *et al.*, 2007). A Embrapa Amazônia Ocidental apresenta experiência de cultivo e do estudo fitoquímico de dois morfotipos denominados sacaca branca e vermelha, definidos principalmente pela diferença na coloração das folhas quando jovens (CHAVES *et al.*, 2006).

2.5 Constituintes químicos encontrados no *Croton cajucara* Benth.

Na região amazônica o *Croton cajucara* conhecido como sacaca, possui grande importância farmacológica sendo detentora de um histórico uso na medicina popular. Porém estudos de caracterização fitoquímica tiveram como base, primeiramente a avaliação dos componentes químicos presentes no óleo essencial das folhas e cascas do caule. Investigações dos constituintes químicos do óleo essencial extraídos das folhas classificou como produto majoritário o linalol (66%), detectando outros compostos em quantidades bem inferiores, 1,8-cineol (2,55%) e 1,65% de outros terpenóides (CAMPBELL *et al.*, 1972). O óleo essencial da casca do caule detectou a presença de vários sesquiterpenos como: cadineno, mirceno, α -humuleno, α -pineno, β -cariofileno (HIRUMA-LIMA *et al.*, 2002).

Trabalhos pioneiros investigaram os componentes químicos de extratos da casca do

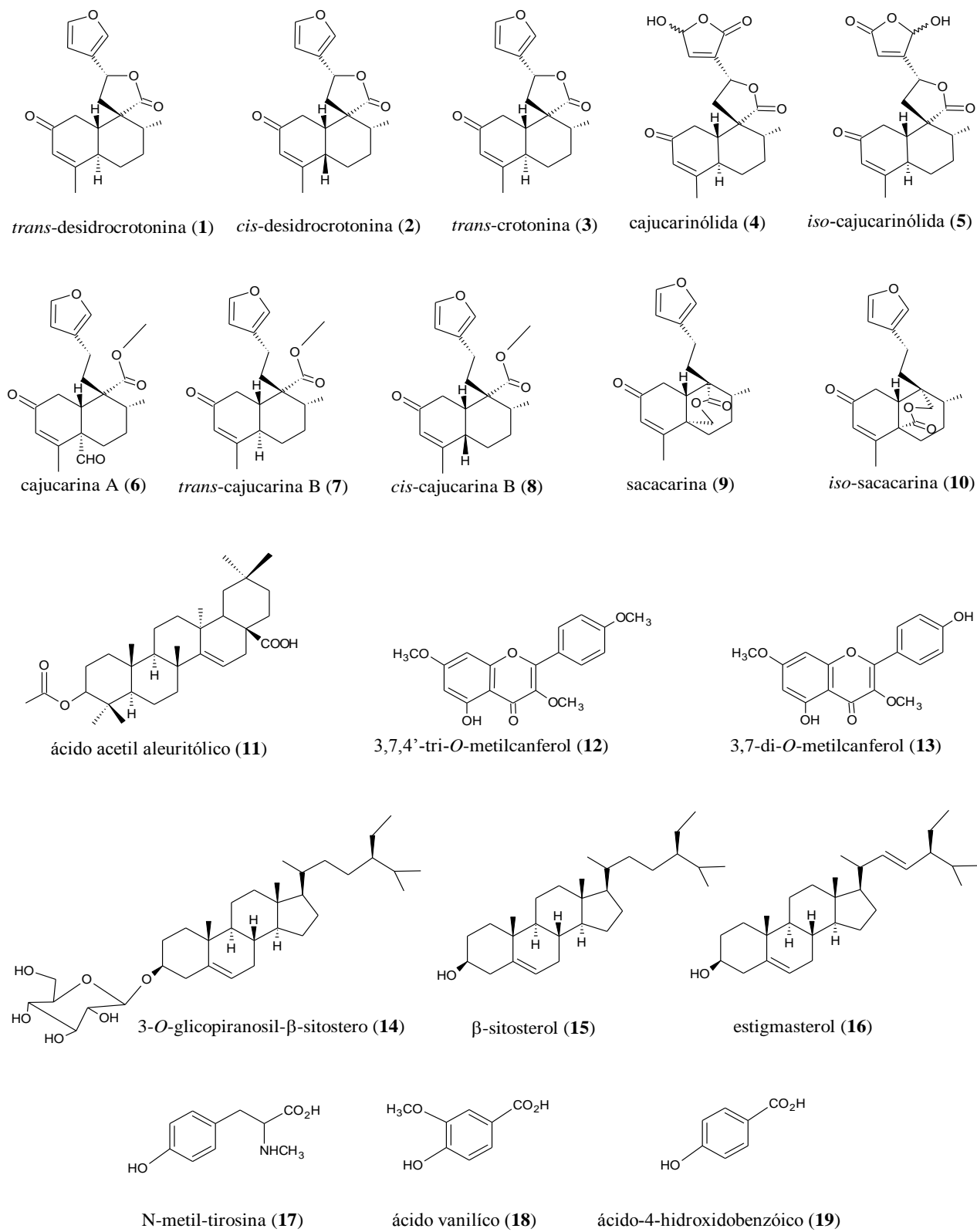
caule da sacaca, foi isolado primeiramente o composto de fórmula molecular C₁₉H₂₂O₄ identificado como um diterpeno da classe dos *nor*-clerodano, chamado de *trans*-desidrocrotonina (**1**), ver (figura 3) (ITOKAWA *et al.*, 1989; ITOKAWA *et al.*, 1990; ICHIHARA *et al.*, 1992; KUBO e ASAKA, 1991; MACIEL *et al.*, 2000).

Depois que foi observado o alto rendimento do diterpenos **1**, alavancou-se uma corrida de investigações buscando novos compostos do *Croton cajucara*. Trabalhando também com cascas do caule, partindo de uma metodologia clássica (6 Kg) pesquisadores obtiveram os seguintes compostos isolados, diterpenos cajucarina A (**6**), *cis*-cajucarina B (**8**), cajucarinolida (**4**) e *iso*-cajucarinolida (**5**) (ITOKAWA *et al.*, 1990; ICHIHARA *et al.*, 1992; MACIEL *et al.*, 1998).

Estudos fitoquímicos realizados a partir dos extratos das folhas identificaram os principais constituintes químicos, estes são os esteróides (β -sitosterol (**15**), Estigmasterol (**16**) e 3-*O*-glicopiranosil- β -sitostero (**14**), e também dois flavanóides (3,7,4'-tri-*O*-metilcanferol (**12**) e 3,7-di-*O*-metilcanferol (**13**)) e um diterpeno da classe dos *nor*-clerodanos cajucarinolida (**4**) (CAMPOS *et al.*, 2002; MACIEL *et al.*, 2003).

Pesquisas comprovaram que o composto majoritário em plantas com até um ano de idade, não é o composto **1** como é relatado por Maciel *et al.*, 1998 para plantas de 4-6 anos de idade. Em plantas bem jovens quem tem maior rendimento é o ácido acetil aleuritólico (**11**). Foi feito estudo de (**11**), por modelagem molecular do estado sólido através de RMN de ¹³C, para caracterização estrutural desta substância (SAN GIL *et al.*, 2008). Este composto (**11**) também foi isolado de extratos obtidos a partir de hexano e metanol das cascas do caule do *C. cajucara*, dois novos diterpenos *t*-cajucarina B (**7**) e sacarina (**9**) além dos já conhecidos *nor*-clerodanos, *t*-crotonia (**3**), *t*-desidrocrotonina (**1**), *c*-cajucarina B (**7**), cajucarina A (**6**) e cajucarinolida (**4**) (MACIEL *et al.*, 1998).

Figura 5. Estruturas química de substâncias isolados de *Croton cajucara* Benth.



2.6 Atividade biológica da *C. cajucara* Benth.

A população se utiliza da “sacaca” (*Croton cajucara*) para a obtenção de remédios caseiros, conhecidos como chás. A partir do conhecimento comum a população passou a produzir pílulas artesanalmente, e as partes utilizadas são as folhas e cascas do caule. As aplicações mais tradicionais são no tratamento do diabetes, controle do mau colesterol, diarreia, problemas renais, inflamação da vesícula, febre, problemas estomacais, inflamações do fígado e malária (SILVA *et al.*, 2005b; BIGHETTI *et al.*, 2004; DI STASI, 1989; DI STASI *et al.*, 1994; DI STASI e HIRUMA, 2002).

Na cidade de Belém-PA pode-se facilmente encontrar cascas do caule pulverizado de sacaca, sendo comercializada na forma de cápsulas. Nas feiras o atrativo principal são as folhas, estas têm como foco de ação os problemas de distúrbios do fígado e auxilia na digestão, pois esta é comercializada como detentora de uma potente ação hepatoprotetora, mas suas ações não param por aí, além do diabetes é também usada como suplemento em dietas de emagrecimento (MACIEL *et al.*, 1998; MACIEL *et al.*, 2000; VEIGA JR *et al.*, 2005).

A razão do uso das folhas da sacaca no combate ao colesterol foi fortalecido mediante observação do efeito hiporlipidêmico a partir do extrato hidroalcolólicas, e este efeito está diretamente relacionado à diminuição do índice de colesterol, (FARIAS *et al.*, 1996), assim também como propriedades antimutagenicida e antiulcerogenica (SANTOS *et al.*, 2006; VIEIRA *et al.*, 2008; SOUZA-BRITO *et al.*, 2008). Extratos preparados das folhas (hexânicos, clorofórmico e metanólico), tiveram ação bioativa antinociceptiva (CAMPOS *et al.*, 2002), e possui atividade no combate ao estresse oxidativo (TIEPPO *et al.*, 2006).

Partindo do pressuposto que folhas e cascas de *Croton cajucara* são utilizadas na medicina popular por suas ações farmacológicas, substâncias majoritárias são isoladas, para realização de ensaios biológicos em pesquisas científicas acadêmicas, o ácido acetil aleurítico (**11**) foi testado para diversas doenças, se mostrando possuir grande atividade antinociceptiva, antiespasmódica e anti-inflamatória. (PERAZZO *et al.*, 2007; MACIEL *et al.*, 2000; MACIEL *et al.*, 1998).

Outra substância que possui acentuado grau de atividade é o diterpeno *trans*-crotonina (**3**), porém seu baixo rendimento, não contribui para realização de testes biológicos, mas reações de hidrogenação por meio de catálise partindo do composto majoritário *trans*-desidrocrotonina (**1**), foi possível testar para doenças da qual a substância **1** demonstrou

atividade, e para algumas o *trans*-crotonina (**3**) apresentou potente ação como: atividade antiulcerogênica (MACIEL *et al.*, 2000; MACIEL *et al.*, 1998; ALMEIDA *et al.*, 2003), porém foi ineficaz no teste para células tumorais (GRYNBERG *et al.*, 1999).

A sacaca é uma planta também comumente indicada na literatura como antimalárica. Em estudo anterior, os extratos de ambos os quimiotipo apresentaram atividade ou atividade moderada *in vitro*, (Tabela 1). O extrato clorofórmico da folha do quimiotipo vermelha exibiu o melhor resultado, com $CI_{50} = 6,4 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$, (LIMA *et al.*, 2015). Com base nesses resultados, a sacaca se mostra com grande importância para a busca de antimaláricos.

Tabela 1. Atividade *in vitro* contra cepas do *P. falciparum* de extratos obtidos a partir de 2 quimiotipo da planta *Croton cajucara* Benth.

Espécie	Parte da planta	Solvente ^a	% de inibição por Microscopia (<i>Pf</i> K1) ^b		CI_{50} HRP2 (<i>Pf</i> W2) ^b $\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$	Classificação da atividade
			50 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$		
<i>Croton cajucara</i> (quimiotipo: branca)	Casca	CHCl ₃	86	5	29,1 \pm 6,3	I
		EtOH	99,1	26,3	17,2 \pm 6,6	AM
		H ₂ O(i)	39,7	27,9	>50	I
	Folha	CHCl ₃	98,3	34,8	11,3 \pm 3,4	AM
		EtOH	98	25	16,3 \pm 4,5	AM
		H ₂ O(i)	17,2	0	>50	I
<i>Croton cajucara</i> (quimiotipo: vermelha)	Casca	CHCl ₃	99,3	32,9	32,2 \pm 5,7	I
		EtOH	61	0	>50	I
		H ₂ O(i)	100	20,4	>50	I
	Folha	CHCl ₃	97,8	74,9	6,4 \pm 1,2	A
		EtOH	99	86,8	13,3 \pm 2,3	AM
		H ₂ O(i)	29,7	15,2	>50	I

LIMA *et al.*, 2016

*Como critério de atividade *in vitro* foi estabelecido que as amostras com IC_{50} de:

< 1 $\mu\text{g/mL}$ - Muito Ativo (MA)

1 a 15 $\mu\text{g/mL}$ – Ativo (A)

16 a 30 $\mu\text{g/mL}$ - Parcialmente Ativo (PA)

> 30 $\mu\text{g/mL}$ – Inativo (I)

O extrato clorofórmico de folha da sacaca apesar de ter sido ativo *in vitro*, apresentou baixa atividade *in vivo* (19%) (LIMA *et al.*, 2015). De acordo com Muthaura *et al.* (2011) a presença de mistura complexa de vários compostos em extratos poderia explicar a alta atividade de extratos *in vitro* devido ao potencial sinérgico. *In vivo* os constituintes químicos ativos poderiam ser inibidos devido à biotransformação de componentes ou devido a sua baixa biodisponibilidade. Além disso, os resultados podem também ser influenciados por outros fatores fisiológicos do hospedeiro.

Algumas substâncias que estão presentes na composição química da sacaca (*Croton*

cajucara), anteriormente foram isolados de outras espécies e testados contra *Plasmodium falciparum*, (tabela 1, ver figura 5).

Tabela 2. Testes antiplasmódicos de substâncias presentes em *Croton cajucara*, isoladas a partir de outras espécies, ver figura 5.

SUBSTÂNCIA	CLASSIFICAÇÃO DA ATIVIDADE	REFERENCIA
Ácido acetil aleurítico (11)	EC ₅₀ < 12.5 (<i>Plasmodium falciparum</i> cepa 3D7 e K1)	HADI <i>et al.</i> , 2013
3,7,4'-tri- <i>O</i> -metilcanferol (12)	inativo	YENJAI <i>et al.</i> , 2004
3,7-di- <i>O</i> -metilcanferol (13)	IC ₅₀ = 7,2 (em 10 µM) (<i>P. falciparum</i> FcB1)	MAI <i>et al.</i> , 2015
β-Sitosterol (15)	IC ₅₀ > 200 (<i>P. falciparum</i> , D10)	GRAZIOSE <i>et al.</i> , 2012
Estigmasterol (16)	IC ₅₀ > 50 (cepas (D6) e (W2))	OCHIENG <i>et al.</i> , 2013

3. OBJETIVO

3.1 Geral

Descobrir substâncias antimaláricas de *Croton cajucara* Benth. (sacaca).

3.2 Específico

- Descobrir substâncias com atividade antimalárica:
 - *in vitro* contra *Plasmodium falciparum*
 - e *in vivo* frente ao *P. berghei*;
- Contribuir para a fitoterapia regional com a identificação das substâncias antimaláricas presentes em sacaca.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Material e Métodos

4.1.1 Equipamentos

- Balança analítica: marca Ohaus, modelo Adventurer, carga máxima: 210 g com precisão de 0,0001 g;
- Balança semianalítica: marca Ohaus, modelo Adventurer, carga máxima: 3,10 kg com precisão de 0,01g;
- Rotaevaporador: Marca Fisatom 802;
- Banho de ultrassom: Marca Unique, modelo USC 1400;
- Manta aquecedora, marca Fisatom, modelo 752A
- Liofilizador, marca Christ, modelo 5804R;
- Triturador de Forragem, marca Trapp, modelo Trf 300;
- Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas-LC-MS, (CLAE (SHIMADZU) e EM marca BRUKER Daltonics, Modelo MicrOTOF-QII com analisador Time-of-Flight de alta resolução e Fonte ESI);
- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Ressonância Magnética Nuclear (RMN) – Equipamento (RMN da marca BRUKER Biospin , Modelo Fourier 300, de 7,0 Tesla).

4.1.2 Solventes

Os solventes serão tratados para a retirada de impurezas comuns, depois secos com Na_2SO_4 quando necessário. Todos os solventes utilizados neste trabalho serão de grau técnico e previamente purificados utilizando destilação fracionada. A água utilizada em todas as etapas será deionizada.

4.2 Métodos

4.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises por CCD foram efetuadas utilizando placas de alumina de 20×20 cm recoberta com sílica gel 60 impregnada com indicador de fluorescência (sílica, Merck, F₂₅₄) e sílica gel 60-C18 impregnada com indicador de fluorescência (CCD-RP-18, fase reversa, Merck, F₂₅₄). Com o uso de um capilar de vidro foram aplicados volumes dos extratos

preparados, dissolvidos em solvente apropriado. Em seguida, as substâncias foram eluídas através de placa de CCD ou CCD-RP-18 eluída em uma cuba previamente saturada com uma mistura de solventes pré-determinados.

As placas foram reveladas com luz de ultravioleta de 254 nm, vapores de iodo em temperatura ambiente e solução de anisaldeído seguidos de aquecimento a 80 °C por alguns minutos.

4.2.2 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

As placas de CCDP foram preparadas utilizando a proporção de 15 g de sílica gel 60 PF₂₅₄ por placa. Utilizando um bastão de vidro, misturaram-se a sílica gel 60 PF₂₅₄ e água destilada e com a ajuda do ultrassom retiraram-se as bolhas de ar contidas na mistura sílica/água. Placas de vidro (20 × 20 cm) foram previamente limpas e desengorduradas com água da torneira, água destilada, etanol e acetona. Em seguida laminaram-se, com a sílica PF₂₅₄ com espessura de 0,5 cm as placas de vidro. As placas de vidro com sílica secaram à temperatura ambiente no período de 24 h e foram ativadas na estufa a 90 °C por aproximadamente 3h.

4.2.3 Cromatografia em coluna (CC)

Para a realização de fracionamento por cromatografia em colunas cromatográficas foram utilizadas sílicas *flash* gel 60 (0,040-0,063 mm) e sílica gel 60 (0,063-0,200 mm) ambas da Merck.

4.2.4 Coleta do material vegetal

As partes vegetativas de *Croton cajucara* Benth. foram coletadas entre os meses de maio e outubro de 2014. As coletas foram realizadas no Campus da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Amazônia Ocidental. O material passou por limpeza, separação e secagem, em seguida levada à estufa de circulação de ar, em temperatura controlada em torno de 40°C, por uma semana. Após esse período os materiais foram triturados em moinho de facas, pesados, embalados e armazenados em geladeira (temperatura média de -20°C). Para a identificação botânica, exemplares férteis (exsicatas) destas plantas foram depositados no Herbário do INPA para comparação com os exemplares já existentes, (tabela 2).

Tabela 3. Descrição sobre a espécie estudada.

Nome científico (popular)	Família	Tipo de vegetação	Herbário	Local da coleta
<i>Croton cajucara</i> Benth (Sacaca)	Euphorbiaceae	Arbusto	EAFM 315	EMBRAPA

4.2.5 Método de extração

Os extratos preparados foram: clorofórmicos, etanólicos e aquoso (tabela 3). Os extratos aquosos por infusão foram obtidos a partir da imersão do material seco em água deionizada fervente (100°C) durante 15 min por três vezes. Os extratos clorofórmicos e etanólicos, foram obtidos por meio da extração sólido líquido em aparelho de Soxhlet (3 x 6 horas).

Tabela 4. Partes da planta e solventes utilizados para o preparo dos extratos.

Espécies	Parte da planta coletada	Solvente escolhido*
<i>Croton cajucara</i>	Casca e Folha	EtOH, CHCl ₃ e H ₂ O _(i)

* Legenda: EtOH – Etanol; CHCl₃ – Clorofórmio; H₂O_(i) – Infusão; H₂O_(d).

Os solventes das extrações foram removidos por evaporação rotativa sob vácuo e temperatura branda (aproximadamente 40°C). Após esses procedimentos, os extratos aquosos (sem solventes orgânicos) passaram por congelamento em freezer a -20 ° C, liofilizados e pesados para o cálculo do teor de extrativos (T.E). As extrações com os diferentes solventes orgânicos ocorrerão de modo sucessivo um após o outro para o mesmo material vegetal e não contínua sendo para cada extração pesado uma parte nova do material biológico (folha, galho, casca).

4.2.6 Cálculo do teor de extração

Após secagem dos extratos foram determinados os respectivos teores extrativos, seguindo o algoritmo abaixo, os valores obtidos estão resumidos nas tabelas 4 e 5. O teor de extrativos (T.E) para cada extração foi calculado utilizando o seguinte algoritmo:

$$T.E = \frac{\text{massa do extrato seco}}{\text{massa do material vegetal}} \times 100$$

Tabela 5. Rendimento dos extratos de folhas de sacaca vermelha em soxleth.

EXTRATO	MATERIAL Vg./(g)	RENDIMENTO Ext. (g)	TEOR EXTRATIVO (%)
Clorofórmico	402,45	27,33	6,79
Etanólico	106,45	17,30	16,25
H ₂ O	90,12	8,26	9,17

Tabela 6. Rendimento dos extratos de casca de sacaca branca em soxleth.

EXTRATO	MATERIAL Vg./(g)	RENDIMENTO Ext./(g)	TEOR EXTRATIVO (%)
Clorofórmico	33,42	1,58	4,73
Etanólico	147,75	11,12	7,51
H ₂ O	120,84	14,63	12,11

4.3 Estudo fitoquímico

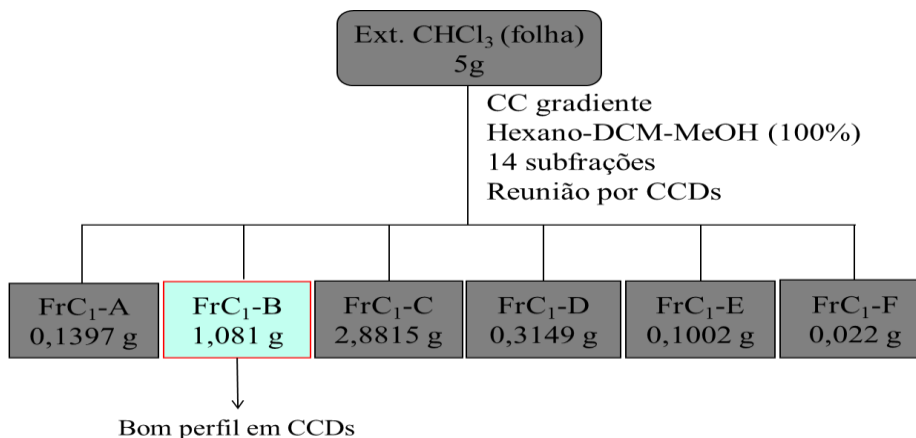
4.3.1 Fracionamento cromatografico

O extrato clorofórmico da folha de sacaca do quimiotipo vermelha e extratos etanólico da casca de sacaca do quimiotipo branca, foram escolhidos para serem submetidos aos fracionamentos cromatográficos baseado no prévio conhecimento de suas atividades antiplasmodica *in vitro* (LIMA *et al.*, 2015).

4.3.2 Fracionamento cromatográfico do extrato CHCl₃ das folhas de sacaca vermelha

As folhas (0,14 Kg) poverizadas de *Croton cajucara* Benth. Variedade vermelha cultivada na Embrapa da Amazonia ocidentetal, em Manaus, Amazonas-Brasil, foram extraídas com clorofórmio em Soxhlet por 18 horas, obtendo-se 6,8g de extrato. Posteriormente realizou-se uma filtrante de 5 g do extrato, por cromatografia em coluna com silica gel (63-200 µm (70-230)) (20 cm: 4,2 cm) rendendo 5 frações eluidas com C₆H₁₄ (FrA), CH₂Cl₂ (FrB), EtOAc (FrC), EtOAc/MeOH (FrD) e MeOH (FrE e F), (Fluxograma 1).

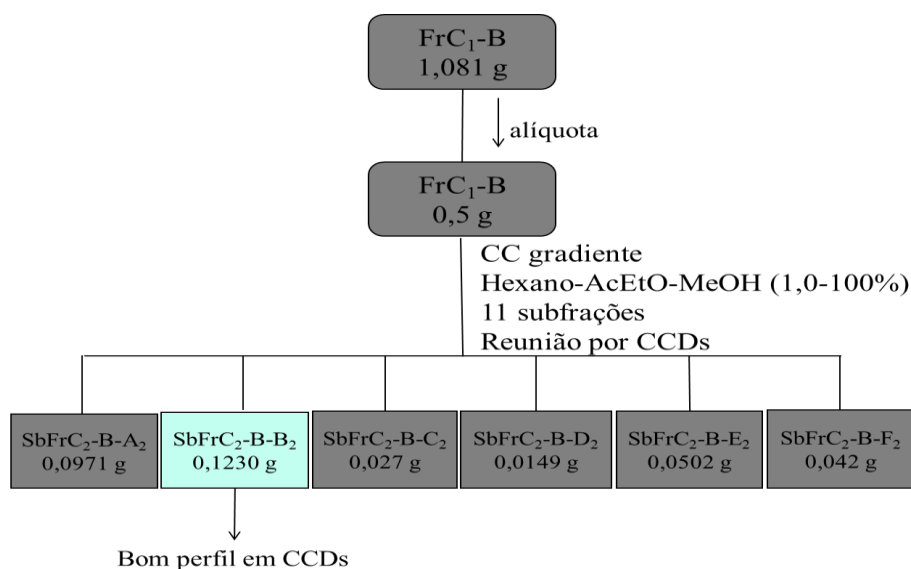
Fluxograma 1. Coluna cromatográfica do extrato CHCl_3 .



Na fração $\text{FrC}_1\text{-B}$, durante a evaporação do solvente, formou-se mistura oleosa laranja. A fração foi analisada por CCD e o óleo continha mistura de substâncias com boa separação. A fração foi submetida a análises por CCD com uma variedade de sistemas de eluentes com o intuito de obter o melhor perfil cromatográfico.

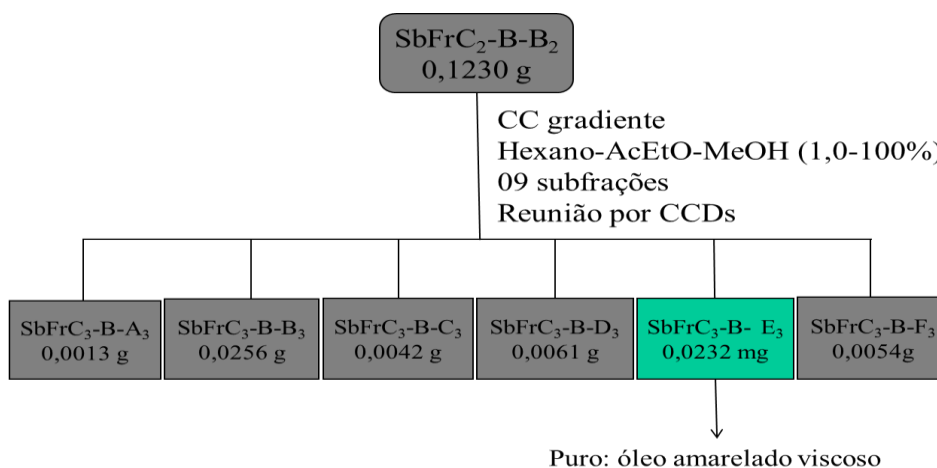
Uma alíquota da $\text{FrC}_1\text{-B}$ de (0,5 g) foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel *flash* 60 (d × h de 2,3 × 20 cm, 0,063-0,200 mm) empregando-se como eluente Hex:AcOEt (9:1) em gradiente e para finalizar na coluna foi passado MeOH (100%). A CC da $\text{FrC}_1\text{-B}$ gerou 11 sub-frações as quais baseadas nas suas características em CCDs, foram reunidas em seis frações (Fluxograma 2).

Fluxograma 2. Coluna cromatográfica da fração $\text{FrC}_1\text{-B}$.



A partir do (fluxograma 2) a $SbFrC_2-B-B_2$ foi escolhida por apresentar um óleo com coloração vinho escuro com bom grau de pureza a mediante as análises por CCD. Em seguida submeteu-se a sub-fração ($SbFrC_2-B-B_2$) a coluna cromatográfica de sílica *flash* gel 60 (d × h de 3 × 15 cm) (0,063-0,200 mm) com os seguintes sistemas de eluentes: Hex:AcOEt (9:1) em gradiente de polaridade, até 100% AcOEt). A lavagem da coluna foi feita com MeOH 100%. A CC *flash* na $SbFrC_2-B-B_2$ gerou 9 frações que foram concentradas e analisadas em CCD comparativa. As frações foram reunidas conforma as semelhanças dos perfis cromatográficos, resultando em 6 frações reunidas.

Fluxograma 3. Coluna cromatográfica da subfração $SbFrC_2-B-B_2$, e isolamento do composto 1.



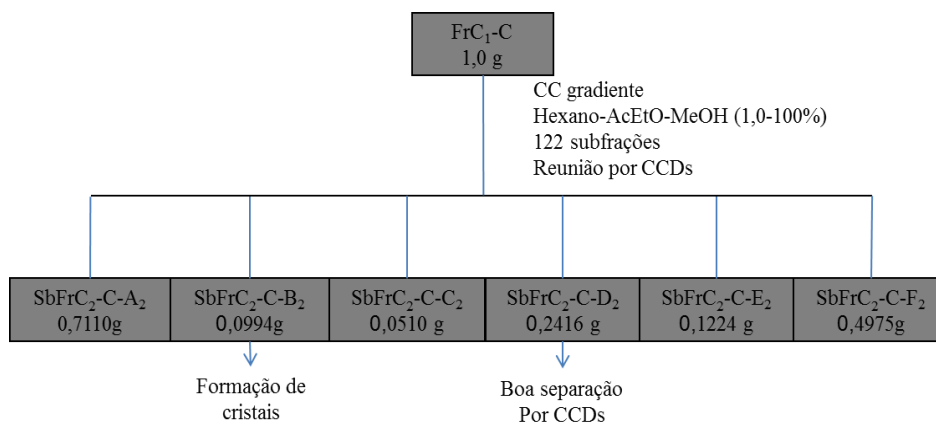
O fracionamento por CC de $SbFrC_2-B-B_2$ (fluxograma 3) levou à obtenção do óleo amarelado com auto grau de pureza em análise por CCD. A $SbFrC_3-B-E_3$ teve um R_f de 0,5 no eluente Hex:AcOEt (9,5:0,5). Em seguida foi submetida a análise por RMN de 1H , ^{13}C e LC-MS.

A fração FrC_1-C (fluxograma 1), após a evaporação do solvente apresentou-se com uma forma de graxa esverdeada. A fração foi analisada por CCD e continha sequencia de poucos constituintes com boa separação, porém muita clorofila que dificultou a separação por CC tradicional e impossibilitou o fracionamento direto. Diante disso, esta foi filtrada em celite. Após filtrante a mesma foi submetida a análises por CCDs com uma variedade de sistemas de eluentes com o intuito de obter o melhor perfil cromatográfico.

A fração FrC_1-C (1,0 g) filtrada foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel *flash* 60 (d × h de 4,2 × 20 cm, 0,063-0,200 mm) empregando-se como eluente Hex:AcOEt:MeOH (8:1,5:0,5) em gradiente e para finalizar a coluna foi eluída

com MeOH (100%). A CC da fração FrC₁-C gerou 122 sub-frações (10 mL) as quais foram reunidas em seis frações baseado nas suas características por CCD analítica (Fluxograma 4).

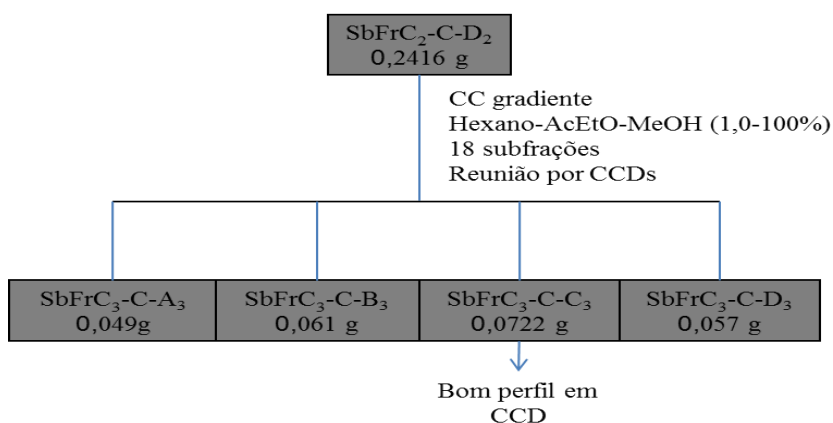
Fluxograma 4. Coluna cromatografica da fração FrC₁-C



A sub-fração (SbFrC₂-C-B₂ – fluxograma 4), apresentou a formação de cristais verde limão em forma de agulhas após aquecimento em hexano/acetato de etila 90:10, em seguida levado ao freezer, usando uma pipeta pasteur e algodão separou-se a parte solúvel, e obteve-se o cristal em forma de agulhas de cor verde limão (composto **8**) com auto grau de pureza por CCDs. Em seguida o composto **8** recristalizado em hexano/acetato de etila 90:10) foi submetido a análise por RMN de ¹H, ¹³C e LC-MS.

A sub-fração (SbFrC₂-C-D₂ – fluxograma 4) apresentou um sólido laranja e grau de pureza médio a partir das análises por CCDs. Em seguida submeteu-se a sub-fração (SbFrC₂-C-D₂) a fracionamento em coluna cromatográfica de sílica flash gel 60 (d × h de 3 × 15 cm) (0,063-0,200 mm) com os seguintes solventes: Hex:AcOEt:MeOH (3:5:2) em gradiente de polaridade, até 100% MeOH), (fluxograma 5).

Fluxograma 5. Coluna cromatografica da fração de SbFrC₂-C-D₂ e isolamento por placa preparativa do composto 4 a partir da subfração SbFrC₃-E-D₃.

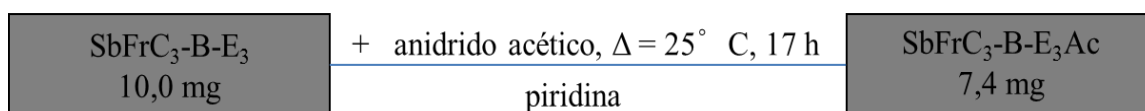


A CC de SbFrC₂-C-D₂ (fluxograma 5) gerou 18 frações que foram reunidas e analisadas em CCD comparativa. As frações foram reunidas conforme as semelhanças dos perfis cromatográficos em CCDs, resultando em 4 frações. A subfração SbFrC₃-E-D₃ passou por uma CCDP (Cromatografia em camada delgada preparativa), onde se obteve o composto 4. O composto 4 foi obtido em forma de sólido branco, apresentando R_f de 0,5 no eluente Hex:AcOEt:MeOH (4:5:1). Em seguida foi submetida a análise de RMN¹H, ¹³C e LC-MS.

4.3.3 Reação de acetilação de SbFrC₃-B-E₃

A reação de acetilação foi descrita por KIJOA (1980), foi feita pela adição de Ac₂O e C₅H₅N, deixando-se sob agitação e nitrogênio por 17 h. O tratamento pós-reacional foi feito pela adição de 3 mL de água destilada ao meio reacional seguida de extração com hexano (2 × 5 mL), lavagem da fase orgânica com solução de HCl 0,1 N (2 × 5 mL), solução saturada de Na₂HCO₃ (2 × 5 mL), H₂O destilada (5 mL) e solução saturada de NaCl (2 × 5 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e concentrou-se em rotaevaporador. Após esse procedimento, obteve-se o derivado na forma bruta. O derivado acetilado (7Ac-C), identificado por RMN e LC-HRMS.

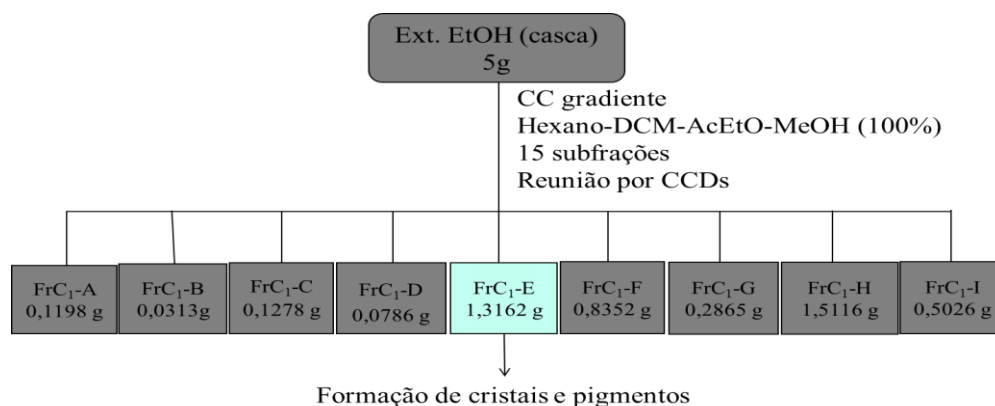
Fluxograma 6. Obtenção do composto 2, a partir da acetilação do composto 1.



4.3.4 Fracionamento cromatográfico do extrato EtOH das cascas do caule de sacaca branca.

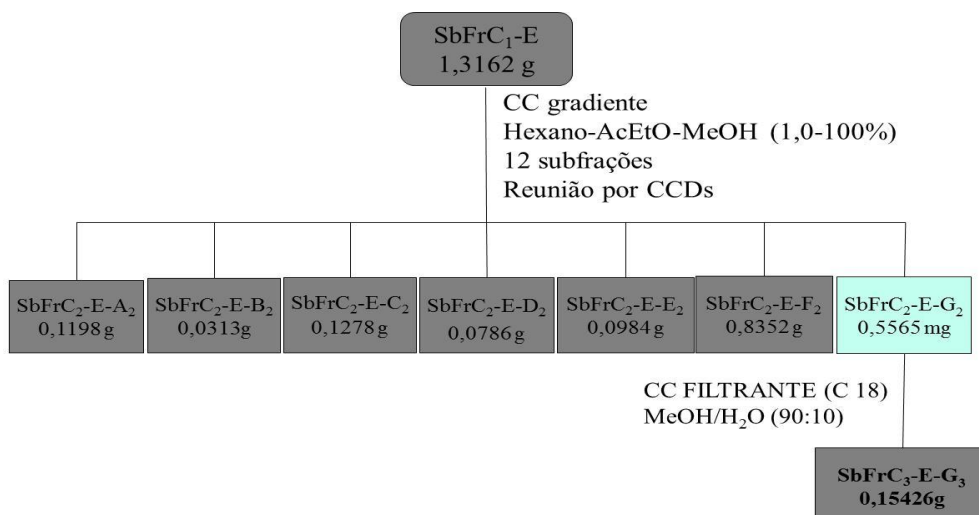
As cascas do caule (0,14 kg) poverizadas de *Croton cajucara* Benth. variedade branca cultivada na Embrapa da Amazonia ocidentetal, em Manaus, Amazonas-Brasil, foram extraídas com etanol em Soxhlet por 18 horas, obtendo-se 12,8g de extrato. Posteriormente realizou-se o fracionamento por cromatografia filtrante de 5g do extrato, por cromatografia em coluna com sílica gel flash (20 cm: 4,2 cm) rendendo 4 frações eluídas com C₆H₁₄ (FrA), C₆H₁₄:CH₂C₁₂ (FrB), CH₂C₁₂ (FrC) CH₂C₁₂:EtOAc (FrD), EtOAc (FrE), EtOAc:MeOH (FrF), MeOH (FrG), MeOH (FrH) e MeOH (FrI), (Fluxograma 7).

Fluxograma 7. Coluna cromatográfica do extrato EtOH.



A fração (FrC₁E) foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel eluidas com misturas de hexano:EtOAc (9:1) com aumento de polaridade. No final a coluna foi lavada com MeOH 100%, obtendo-se 12 sub-frações das quais a fração (SbFrC₂-E-G₂) apresentou apenas duas substâncias, onde uma delas era uma clorofila, então esta mesma foi filtrada em sílica de fase reversa (C 18) 5g a fim de separação da clorofila, obtendo 152,6 mg de (SbFrC₃-E-G₃), (Fluxograma 8). A fração SbFrC₃-E-G₃ passou por análise em CCD e apresentou auto grau de pureza, em seguida sua identificação foi baseada nas análises espectroscópicas por RMN de ¹H, ¹³C e LC-MS.

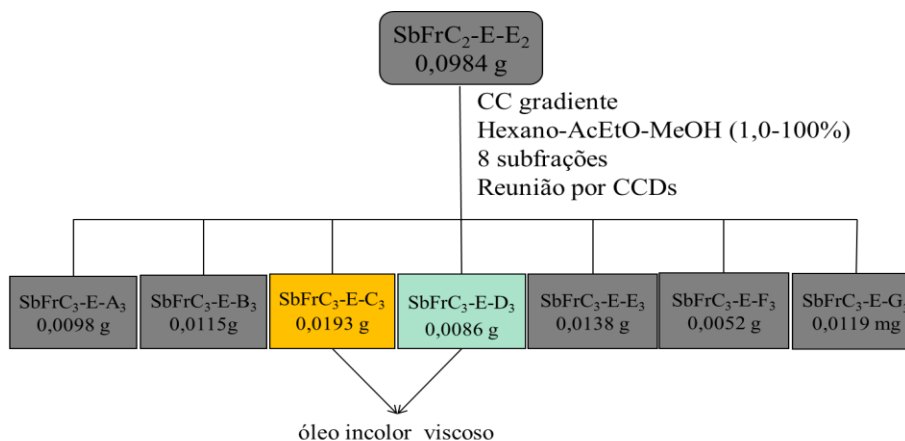
Fluxograma 8. Coluna cromatográfica da fração SbFrC₁-E.



A fração SbFrC₂-E-E₂ (fluxograma 8) passou por CC em sílica flash gel 60 (d × h de 3 × 15 cm) (0,063-0,200 mm) com os seguintes gradientes: Hex:AcOEt (9:1), até 100% AcOEt), a lavagem da coluna foi feita com MeOH 100%, (fluxograma 9). Obtendo 19,3 mg

de SbFrC₃-E-C₃. A fração SbFrC₃-E-C₃ passou por análise em CCD e apresentou auto grau de pureza, em seguida sua identificação foi baseada nas análises espectroscópicas de RMN ¹H, ¹³C e LC-MS.

Fluxograma 9. Coluna cromatográfica da fração SbFrC₂-E-E₂.

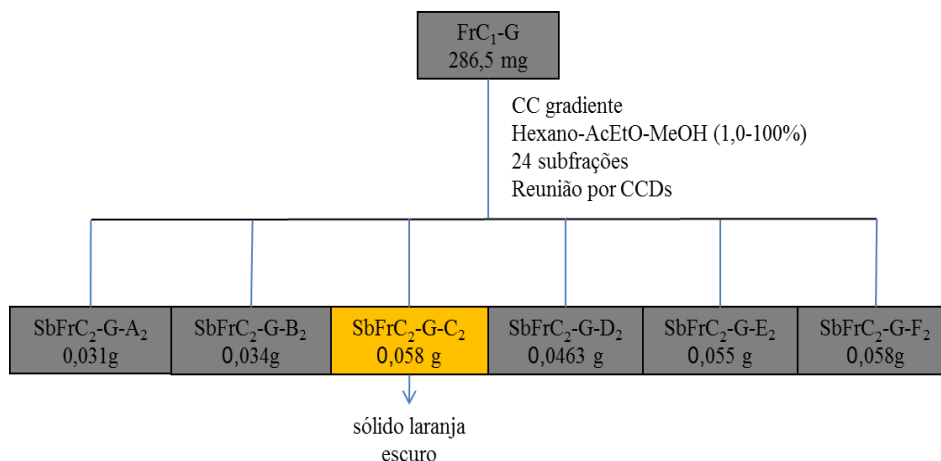


A fração SbFrC₃-E-D₃ passou por análise em CCD e apresentou impureza, em seguida foi analisada em HPLC para purificação, o que possibilitou as análises espectroscópicas de RMN de ¹H, ¹³C e LC-MS.

A fração FrC₁-G (Fluxograma 7), após a evaporação do solvente apresentou formação de um graxa ou látex marrom. A fração foi analisada por CCD, continha uma sequencia de poucos constituintes com boa separação. A mesma foi submetida a análises por CCD com uma variedade de sistemas de eluentes com o intuito de obter o melhor perfil cromatográfico.

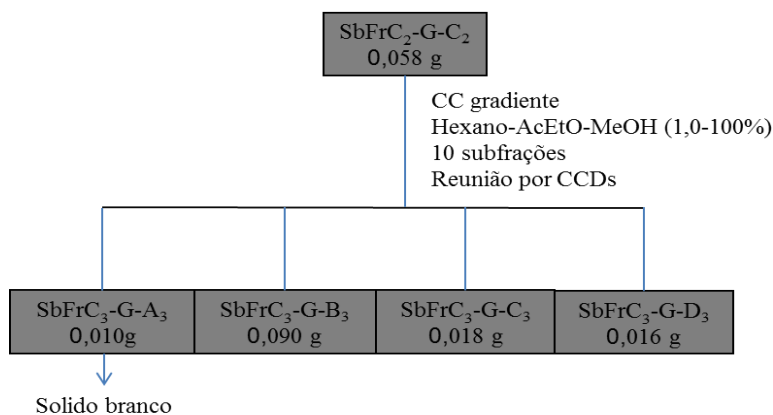
A fração FrC₁-G (286,5 mg) foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel *flash* 60 (d × h de 3,2 × 20 cm, 0,063-0,200 mm) empregando-se como eluente Hex:AcOEt:MeOH (4:4:2) em gradiente e para finalizar na coluna foi passado MeOH (100%). A CC da fração FrC₁-G gerou 24 sub-frações as quais foram reunidas em seis frações baseado nas suas características de CCD analítica (Fluxograma 10).

Fluxograma 10. Coluna cromatográfica da fração FrC₁-G.



A sub-fração (SbFrC₂-G-C₂) apresentou um sólido laranja e grau de pureza médio a partir das análises por CCDs. Em seguida submeteu-se a sub-fração (SbFrC₂-G-C₂) a fracionamento em coluna cromatográfica de sílica flash gel 60 (d × h de 3 × 15 cm) (0,063-0,200 mm) com os seguintes solventes: Hex:AcOEt:MeOH (3:5:2) em gradiente de polaridade, até 100% MeOH), (fluxograma 11).

Fluxograma 11. Coluna cromatográfica da fração SbFrC₂-G-C₂



A CC de SbFrC₂-G-C₂ gerou 10 frações que foram reunidas e analisadas em CCD comparativa. As frações foram reunidas conforme as semelhanças dos perfis cromatográficos em CCDs, resultando em 4 frações (fluxograma 11). O fracionamento por CC de SbFrC₂-G-C₂ levou à obtenção de um sólido branco com auto grau de pureza em análise por CCD. A SbFrC₃-G-A₃ teve um R_f de meio no eluente Hex:AcOEt:MeOH (5:4:1). Em seguida foi submetida a análise por RMN de ¹H, ¹³C e LC-MS.

4.4 Ensaio de atividade antiplasmódica *in vitro* e *in vivo*

O teste antimalárico *in vitro* foi realizado no Laboratório de malária e dengue do INPA sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luiz Francisco Rocha e Silva e colaboradores. No ensaio foram testadas 8 substâncias isoladas **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8** (Figura 4), sendo a cloroquina o controle positivo. Dentre estas apenas quatro apresentaram atividade, *in vitro* da cepa K1 de *P. falciparum*. Na etapa seguinte somente os compostos **1 e 6** foram calculada o CI_{50} (Concentração que inibe 50% do crescimento do *P. falciparum in vitro*). As substâncias SbFrC₃-B-E₃ e SbFrC₃-E-C₃, foram testadas frente à cepa multi-resistente K1 de *P. falciparum* (MRA-159, MR4, ATCC Manassas Virginia) mantida em cultivo contínuo segundo método de Trager e Jensen (1976).

O período de incubação do parasita com as drogas foi de 48 h a temperatura de 37 °C. Os controle positivo usado no teste foram a cloroquina. Para microteste foi utilizado uma parasitemia inicial de 1-2% e hematócritos de 3%. As substâncias foram dissolvidas em DMSO, na concentração estoque de 5 mg/mL, e posteriormente diluída em meio completo para obtenção das concentrações de teste que variaram até 100 µg/mL.

O teste foi realizado como descrito por Andrade-Neto e colaboradores (2007). As diluições das amostras foram aplicadas em poços de micro-placa contendo hemácias parasitadas. Cada concentração foi testada em triplicada. Após a incubação, o conteúdo dos poços foram avaliados pela porcentagem de inibição do crescimento do protozoário. A inibição do crescimento do parasita foi determinado pela comparação com os controles de crescimento sem amostra, segundo a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{parasitemia do controle} - \text{parasitemia com amostra})}{\text{parasitemia do controle}} \times 100$$

Os testes *in vivo* foram realizados seguindo as orientações do Comitê de Ética de Uso de Animais do INPA (CEUA/INPA 029/2015). Esse ensaio foi realizado usando a cepa NK65 do *P. berghei*. Esta estirpe foi mantida por sucessivas passagens de formas sanguíneas de camundongo para camundongo. O protocolo teste é baseado nos quatro dias de teste supressivo descrito por Peters (1965). Fêmeas, balb/C., pesando 25 ± 3 g foram utilizadas nesse experimento. Os animais foram infectados intraperitonealmente com 0,2 mL de suspensão de sangue infectados contendo 1×10^5 de eritrócitos parasitados e foram divididos

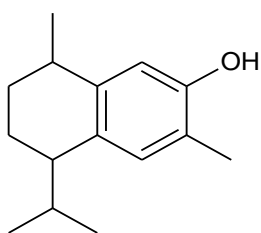
aleatoriamente em grupos de cinco indivíduos. Os grupos testes foram tratados oralmente com doses de 10 e 250 mg/kg/dia. O grupo de controle positivo recebeu a dose de 5 mg/kg/dia oralmente e o grupo de controle negativo recebeu oralmente a dose de 250 µL do veículo.

Os animais foram tratados por 4 dias começando 24 h após a inoculação com *P. berghei*. Nos 5º e 7º dias após a infecção com o parasita, foram preparados esfregaços de sangue de todos os camundongos, corados com sistema panótico®, e depois foram examinados microscopicamente (1000 × magnificação). A parasitemia foi determinada em esfregaços de sangue codificados por contagem aleatória 2000 – 4000 de eritrócitos no caso de baixa parasitemia ($\leq 10\%$) ou até 1000 eritrócitos em casos de maior parasitemia. A mortalidade geral foi monitorada diariamente em todos os grupos durante um período de 4 semanas após a inoculação. A diferença entre os grupos de controle de parasitemia médios (100%) e os grupos de teste foi calculada como a percentagem de supressão do crescimento do parasita (PGS) tendo em conta a equação $PGS = 100 \times (A - B) / A$, onde A é a parasitemia média do grupo de controle negativo e B corresponde à parasitemia do grupo teste.

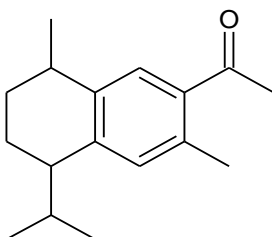
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Substâncias identificadas

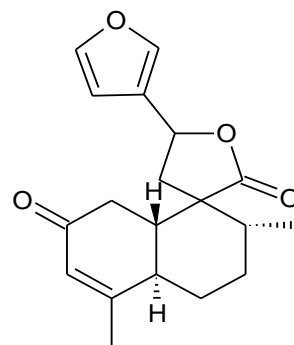
Figura 6. Constituintes químicos isolados das folhas e cascas do caule de *Croton cajucara* Benth.



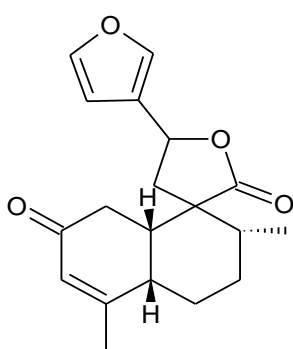
1 - 7-hidroxicalameneno



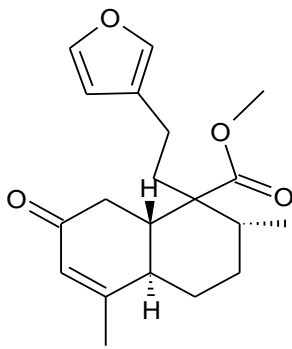
2 - 7-acetilcalameneno



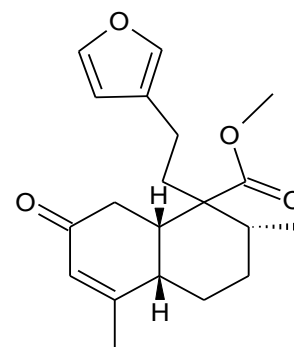
3 - *trans*-desidrocrotonina



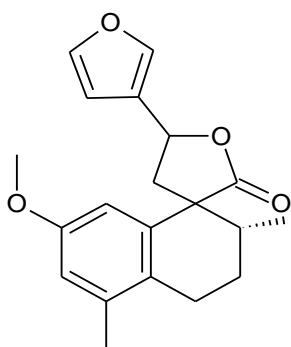
4 - *cis*-desidrocrotonina



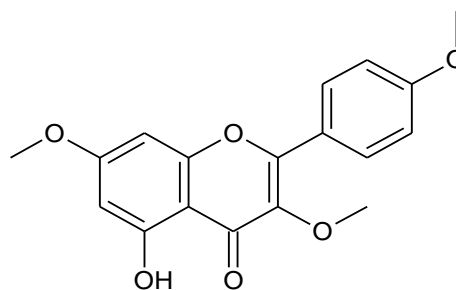
5 - *trans*-cajucarina B



6 - *cis*-cajucarina B



7 - espiro[furano-3(2H),1'(2'H)-naftaleno]



8 - 3,7,4'-tri-*O*-metilcanferol

5.2 Identificação das substâncias

Todas as substâncias obtidas nesse trabalho foram caracterizadas por técnicas de RMN uni e bi-dimensionais, cujos espectros estão incluídos nos anexos de acordo com a ordem de enumeração da figura 4.

5.2.1 Identificação estrutural da substância 1

O composto **1** (Figura 6), foi obtida de acordo com o fluxograma 3, e apresentou-se como óleo amarelo, revelando-se com coloração roxo em anisaldeído, com R_f de 0,5 no eluente Hex:AcOEt (9,5:0,5). Em seguida foi submetida à análise de CL-EMAR (Anexo 1) fornecendo o íon aduto $[M+H]^+$ de m/z 219,1739. A fórmula molecular foi calculada para $[M+H]^+$, $C_{15}H_{23}O$ 219,1743; $\Delta=2,0$ ppm). Com base no cálculo do IDH (SILVERSTEIN *et al.*, 2007), este composto apresenta cinco graus de insaturação. O espectro IV de **1** mostrou uma banda forte de absorção em 3424 cm^{-1} (anexo 8), sugerindo a presença de grupo hidroxila.

$$\text{Erro } (\Delta) = \frac{\text{massa teórica} - \text{massa experimental} * 10^6 \text{ ppm}}{\text{massa teórica}}$$

A determinação estrutural foi realizada principalmente através de análises de RMN 1H e ^{13}C 1D e 2D (RMN 1H e ^{13}C , DEPT135, COSY, HSQC e HMBC), os tópicos importantes discutidos estão listados nas (Tabela 7 e Anexos 2, 3, 4, 5, 6, 7).

No espectro de RMN de 1H (anexo 2) é possível observar dois singletos em δ_H 6,97 e 6,59, tipicamente de hidrogênios olefínicos. Notou-se a presença de dois duplos dubletos em δ_H 2,83 e 2,56, cujas constantes de acoplamento estão dispostas na tabela 7. Um singleto e um multipeto, com integração para 4 hidrogênios, foram observados em δ 2,24. O espectro exhibe, ainda, multipeto na região δ_H 1,80-1,60, característicos de hidrogênios metilênicos. Por fim, observa-se a presença de metilas na região entre δ_H 1,22-0,79 (tabela 7). O espectro de ^{13}C (Anexo 3) apresentou 15 sinais de carbonos, sugerindo que a substância **1** é um sesquiterpeno. A análise do RMN para a obtenção do DEPT 135 (anexo 4) apresentou 11 sinais de carbono, dos quais dois são sinais de carbonos metilênicos, cinco de carbonos metínicos e quatro carbonos metílicos, e por diferença com os sinais de RMN de ^{13}C foram encontrados quatro sinais de carbonos a mais que o DEPT135 (Tabela 7).

O espectro de COSY (anexo 5), apresentou acoplamento do hidrogênio δ_H 2,22 com os hidrogênios δ_H 0,79 e 1,05, sugerindo a forma de u grupo isopropílico referente ao hidrogênio do carbono (C-10) com os hidrogênios de duas metilas, atribuidos aos carbonos nas posições 11 e 12, respectivamente. Também é observado correlação entre os hidrogênios δ_H 2,83 e 1,22, referente aos hidrogênios dos carbonos nas posições 1 e 9, respectivamente.

O mapa de contorno HMBC (tabela 7, anexo 7) confirma a posição dos hidrogênios δ_H 2,23 com os carbonos δ_C 2J 120,8 (C), 3J 130,6 (CH) e 3J 151,4 (C) correspondendo aos carbonos nas posições 5, 6 e 7, respectivamente (figura 7). Também correlações entre os hidrogênios δ_H 0,79 da metílico com os carbonos δ_C 21,4 (CH₃) e 31,2 (CH) e 42,9 (CH) atribuidos aos carbonos 12, 10 e 4 respectivamente, e os hidrogênios metílicos δ 1,05 correlacionando-se com os carbonos δ_C 17,6 (CH₃); 31,2 (CH) e 42,9 (CH), referentes aos carbonos 11, 10 e 4, respectivamente. Os hidrogênios metílicos δ 1,23 correlaciona-se com os carbonos δ_C 28,6 (CH₂), 32,6 (CH) e 141,9 (C), referentes aos carbonos 2, 1 e 8a, respectivamente (figura 7).

Mediante todas as observações levantadas dos dados obtidos por meio das técnicas de LC-MS e RMN de 1H e ^{13}C e em comparação com os dados da literatura (PEREIRA *et al.*, 2011), pode-se concluir que a substância **1**, é o sesquiterpeno 7-hidroxcalameneno (figura 7). Os dados de RMN 1H e ^{13}C da substância **1** obtidos no presente trabalho e os dados da literatura descrito por Pereira *et al.*, 2011, estão listados na (Tabela 7).

Figura 7. Atribuições das correlações das metilas no HMBC do composto **1**.

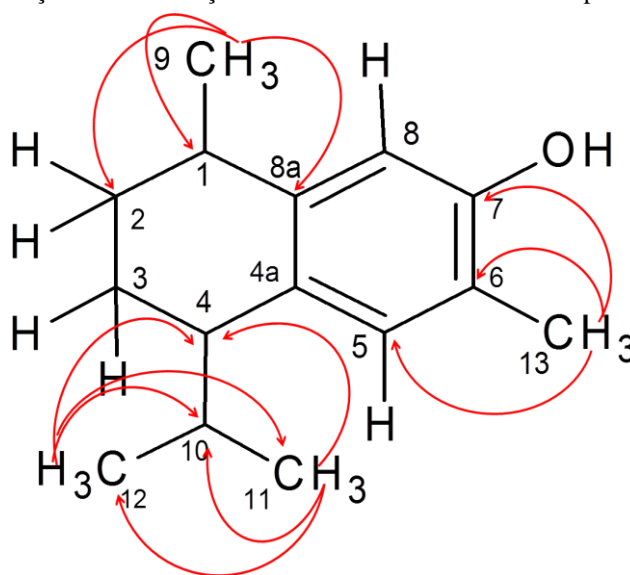


Tabela 7. Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **1**.

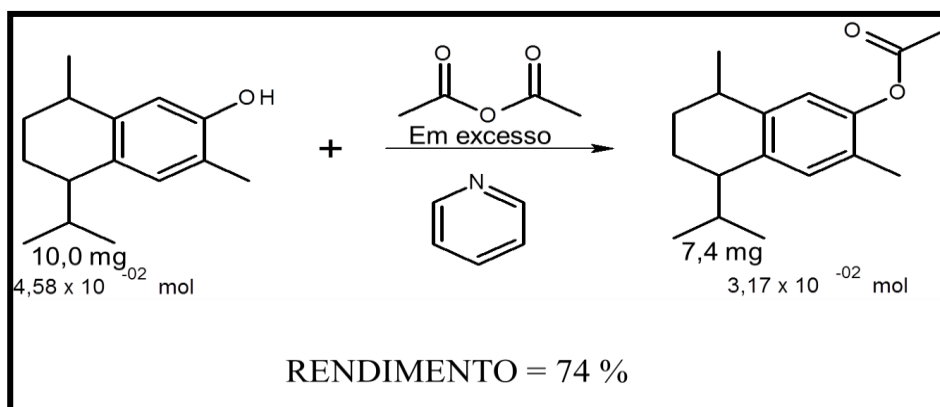
C/H	Substância 1 , CDCl_3 , 300 MHz (^1H), 75 MHz (^{13}C)				Literatura, CDCl_3 , 300 MHz (^1H), 75 MHz (^{13}C)	
	HSQC		HMBC	DEPT	HSQC	
	δC	$\delta\text{H}[\text{mult.}, \text{J}(\text{Hz})]$	$[\text{}^2\text{J}_{\text{CH}} \text{ e } \text{}^3\text{J}_{\text{CH}}]$		$\delta\text{H}[\text{mult.}, \text{J}(\text{Hz})]$	δC
1	32,4	2,83 <i>m</i>	2, 3, 4a, 8, 9	CH	2,78 <i>m</i>	32,6
2	28,5	1,62; 1,80 <i>m</i>	1, 3, 4, 8a, 9	CH2	1,62; 1,82 <i>m</i>	28,6
3	19,8	1,65; 1,76 <i>m</i>	1, 2, 4, 4a, 10	CH2	1,68; 1,73 <i>m</i>	19,7
4	42,9	2,56 <i>dd</i> ($J=5,6$ e $7,1$)	2, 3, 4a, 5, 10, 11	CH	2,52 <i>dd</i> ($J = 5,6$ e $7,4$)	42,9
4a	132,0	-	-	C	-	131,9
5	130,6	6,97 <i>s</i>	4, 7, 8a, 13	CH	6,94 <i>s</i>	130,6
6	120,8	-	-	C	-	121,0
7	151,4	-	-	C	-	151,5
8	114,4	6,59 <i>s</i>	1, 4a, 6, 7	CH	6,56 <i>s</i>	114,4
8a	141,7	-	-	C	-	141,8
9	23,3	1,22 <i>d</i> ($J=7,1$)	1, 2, 8a	CH3	1,22 <i>d</i> ($J = 7,1$)	23,3
10	31,1	2,22 <i>m</i>	3, 4, 10, 11	CH	2,19 <i>m</i>	31,1
11	17,5	0,79 <i>d</i> ($J=6,8$)	4, 10, 12	CH3	0,76 <i>m</i> , <i>d</i> ($J = 6,8$)	17,5
12	21,4	1,05 <i>d</i> ($J=6,8$)	4, 10, 11	CH3	1,01 <i>d</i> ($J = 6,8$)	21,4
13	15,7	2,22 <i>s</i>	5, 6, 7	CH3	2,20 <i>s</i>	15,7

Fonte: Pereira *et al.* 2011

5.2.2 Identificação do derivado semissintético (2)

A presença do grupo hidroxila reativo do anel aromático do composto **1** possibilitou a obtenção do derivado semissintético por um tipo de reação de acetilação (fluxograma 6 e figura 8). O derivado obtido se apresentou em forma de óleo pastoso de cor amarelo com 74% de rendimento. A identificação foi com base nas análises de espectroscopia de IV infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC (Anexo 9, 10, 11, 12, 13 e 14), respectivamente.

Figura 8. Esquema da reação de acetilação do composto **1** para formação do composto **2**.



O espectro IV de **2** mostrou bandas de absorções em 1761 e 1711 cm^{-1} , proporcionando evidência para a presença do grupo carbonílico, (Anexo 14), o que é esperado para o produto da reação. Comparando o espectro de RMN de ^1H de **2** com **1** (Tabela 78), este apresentou os mesmos sinais característicos de hidrogênios olefínicos, metínicos, metilênicos e metílicos. A diferença está em um novo sinal de hidrogênio em δ_{H} 2,31. O espectro de RMN de ^{13}C de **2** apresentou 17 sinais (Anexo 10), com dois novos sinais: em δ_{C} 169,6 (C) e 20,9 (CH_3) característicos dos carbonos metilênicos do grupo acetil.

O mapa de contorno HSQC, apresenta correlação do sinal de ^1H em δ_{H} 2,31 com o carbono δ_{C} 20,9 (CH_3), referente a metila do grupo acetil. No mapa de contorno HMBC, se observa uma correlação do carbono δ_{C} 169,6 (C) (carbonílico) com hidrogênios em δ_{H} 2,3, sugerindo que esta metila está ligada ao carbono carbonílico. Os dados espectrais: RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC, HSQC, da substância **2** foram comparados com os sinais de RMN de ^1H e ^{13}C de **1**, estão listados na Tabela 8. Diante dos dados obtidos da substância **2** e em comparação com os dados de RMN apresentado para **1**, levaram a identificação do produto

acetilado (Figura 7, Tabela 8), que é inédito na literatura, e esta foi denominada como 7-acetilcalameneno.

Figura 9. Atribuições das correlações das metilas no HMBC do composto **2**.

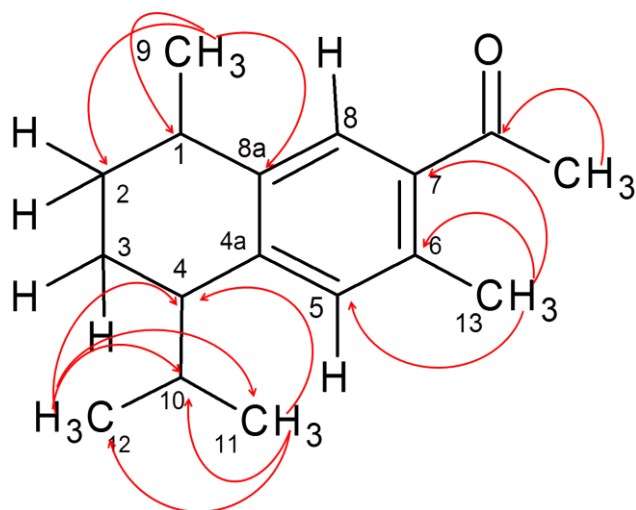


Tabela 8. Dados de RMN 1D e 2D do derivado **2** e da substância natural **1**.

C/H	2, CDCl ₃ , 300 MHz (¹ H), 75 MHz (¹³ C)				1, CDCl ₃ , 300 MHz (¹ H), 75 MHz (¹³ C)	
	HSQC		HMBC	DEPT	HSQC	
	δC	δ _H [mult., J(Hz)]	[² J _{CH} e ³ J _{CH}]		δ _H [mult., J(Hz)]	δC
1	32,6	2,85 <i>m</i>	2, 3, 8, 8a, 9	CH	2,83 <i>m</i>	32,4
2	28,4	1,61; 1,80 <i>m</i>	1, 3, 4, 8a, 9	CH ₂	1,62; 1,80 <i>m</i>	28,5
3	19,7	1,71 <i>m</i>	1, 2, 4, 4a, 10	CH ₂	1,65; 1,76 <i>m</i>	19,8
4	43,2	2,57 <i>q</i> (<i>J</i> = 5,6 e 7,1)	2, 3, 4a, 5, 10, 11	CH	2,56 <i>dd</i> (<i>J</i> =5,6 e 7,1)	42,9
4a	137,6	-	-	C	-	132,0
5	130,7	7,05 <i>s</i>	4, 7, 8a, 13	CH	6,97 <i>s</i>	130,6
6	126,5	-	-	C	-	120,8
7	147,6	-	-	C	-	151,4
8	121,1	6,79 <i>s</i>	1, 4a, 6, 7, 13	CH	6,59 <i>s</i>	114,4
8a	141,6	-	-	C	-	141,7
9	23,1	1,24 <i>d</i> (<i>J</i> = 7,1)	1, 2, 8a	CH ₃	1,22 <i>d</i> (<i>J</i> =7,1)	23,3
10	31,1	2,22 <i>m</i>	3, 4, 8a, 11, 12	CH	2,22 <i>m</i>	31,1
11	17,7	0,79 <i>d</i> (<i>J</i> = 6,8)	4, 10, 12	CH ₃	0,79 <i>d</i> (<i>J</i> =6,8)	17,5
12	21,4	1,03 <i>d</i> (<i>J</i> = 6,8)	4, 10, 11	CH ₃	1,05 <i>d</i> (<i>J</i> =6,8)	21,4
13	15,9	2,12 <i>s</i>	5, 6, 7	CH ₃	2,22 <i>s</i>	15,7
14	20,9	2,31 <i>s</i>	7, 15	CH ₃	-	-
15	169,6	-	-	C	-	-

5.2.1 Identificação estrutural das substâncias 3 e 4

As substâncias **3** e **4** (Figura 6) foram obtidas segundo fluxograma 8 e 5, a partir de extratos de casca e folha respectivamente, e apresentaram-se como sólidos brancos, revelando-se com coloração marrom em anisaldeído, com R_f de 0,5 no eluente Hex:AcOEt (7 : 3). Em seguida **3** e **4** foram submetidas à análises de CL-EMAR (Anexo 15) fornecendo os íons adutos $[M+Na]^+$ de m/z 337,1405 e $[M+H]^+$ 315,1598, respectivamente. A fórmula molecular foi calculada para $C_{19}H_{22}NaO_4 = 337,1410$ e $C_{19}H_{23}O_4 = 315,1591$, $\Delta = 1,4$ e $2,4$ ppm, respectivamente. Com base no cálculo do IDH (SILVERSTEIN *et al.*, 2007), os compostos apresentaram nove graus de insaturação. O espectro de IV foi realizado somente para o composto **3** e mostrou bandas fortes em 1750 e 1667 cm^{-1} (Anexo 22), proporcionando evidência para a presença de grupos carbonílico cetônica e lactônica. A determinação estrutural de **3** e **4** foi realizada principalmente através de análises de CL-EMAR, IV (infravermelho), RMN 1D (1H , ^{13}C , DEPT135) e 2D (COSY, HSQC e HMBC), alguns dados estão listados nas Tabelas 9 e 10, ver Anexos 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 22 para **3** e 23, 24, 25, 26, 27, 28 e 29 para **4**.

Os espectros de RMN de 1H (Anexos 16 e 23) de **3** e **4**, respectivamente, apresentaram três sinais entre δ_H 7,5-6,40 característicos de hidrogênios olefínicos. São observados dois duplos dubletos de hidrogênios metílicos, em δ_H 1,96 e 1,15. Apresenta sinais entre δ_H 5,9-5,4 característicos de hidrogênios α e β carbonílicos e olefínicos. No espectro de ^{13}C (Anexo 17 e), observou-se 19 sinais de carbonos, o que indica que pode se tratar de um *nor*-diterpeno. Os espectros de DEPT135 (Anexos 18 e 26, Tabela 9 e 10) das substâncias **3** e **4** mostraram dois sinais de carbonos metílicos, quatro sinais de carbonos metilênicos, oito sinais de carbonos metínicos, e por diferença com os sinais de RMN de ^{13}C foram encontrados cinco sinais de carbonos não hydrogenados, assim como o sinal acima de δ_C 195, típico de carbono cetônico com dupla ligação conjugada (carbonila α e β insaturada).

Nos mapas de contorno COSY (anexo 19 e 27), foram observadas correlações entre os hidrogênios δ_H 2,31 e δ_H 2,73-3,37, referentes aos hidrogênios dos carbonos nas posições 10 e 1, respectivamente, assim também como correlação geminal entre os hidrogênios δ_H 2,73 e 3,37. Os hidrogênios da metila δ_H 1,25 correlacionam-se com o hidrogênio δ_H 2,13, referentes aos carbonos 17 e 8, respectivamente. Foi também observado correlação entre o hidrogênio δ_H 5,38 com os hidrogênios δ_H 2,09 e 2,85, referentes ao hidrogênio do carbono 12 com os hidrogênios do carbono 11, respectivamente, assim também como correlação geminal entre os

hidrogênios δ_H 2,09 e 2,85. Pode-se também observar um acoplamento entre os hidrogênios δ_H 7,44 e 6,41, referente ao hidrogênio do carbono 15 e 14, respectivamente.

O mapa de contorno HMBC (Anexo 21, tabela 12) foi utilizado para montar o primeiro fragmento da estrutura que chamamos de anel A, observamos as correlações entre os hidrogênios δ_H 3,73-2,18 com os carbonos δ_C 2J 197,9 (carbonila α e β insaturada); 3J 126,7; 3J 39,6; 3J 51,5; 2J 46,0; correspondente aos carbonos nas posições, 2, 3, 5, 9 e 10 respectivamente. A outra parte a chamamos de anel B onde os hidrogênios entre δ_H 2,23-1,18 apresentou correlações com os sinais de carbonos δ_C 166,2; 39,6; 30,2; 41,8 e 46,1, correspondentes aos carbonos nas posições, 4, 5, 7, 8 e 10, respectivamente. As correlações das duas metilas auxiliaram nas suas respectivas localizações nos anéis A e B. Os hidrogênios da metila em δ_H 1,96 correlacionam-se com os sinais dos carbonos δ_C 126,7; 166,2 e 39,6, correspondentes aos carbonos nas posições 3, 4, e 5, respectivamente. Os hidrogênios da metila em δ_H 1,25-1,15 correlacionam-se com os carbonos δ_C 30,2; 41,8 e 51,46, correspondentes aos carbonos nas posições, 7, 8 e 9, respectivamente.

Mediante as análises dos espectros de RMN de 1H e ^{13}C , DEPT135, COSY, HMBC, HSQC de **3** e **4**, e bem como comparação dos deslocamentos e multiplicidades com dados de RMN da literatura (tabela x e x), concluiu-se que a substancia **3** e **4** correspondem aos diterpenoides 19-nor-clerodano *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) e *cis*-desidrocrotonina (*c*-DCTN) ver figura 10, (MACIEL *et al.*, 1998; 2003b).

Figura 10. Diterpenóides 19-nor-clerodano *trans* (**3**) e *cis* (**4**) - desidrocrotonina (*t* e *c*-DCTN)

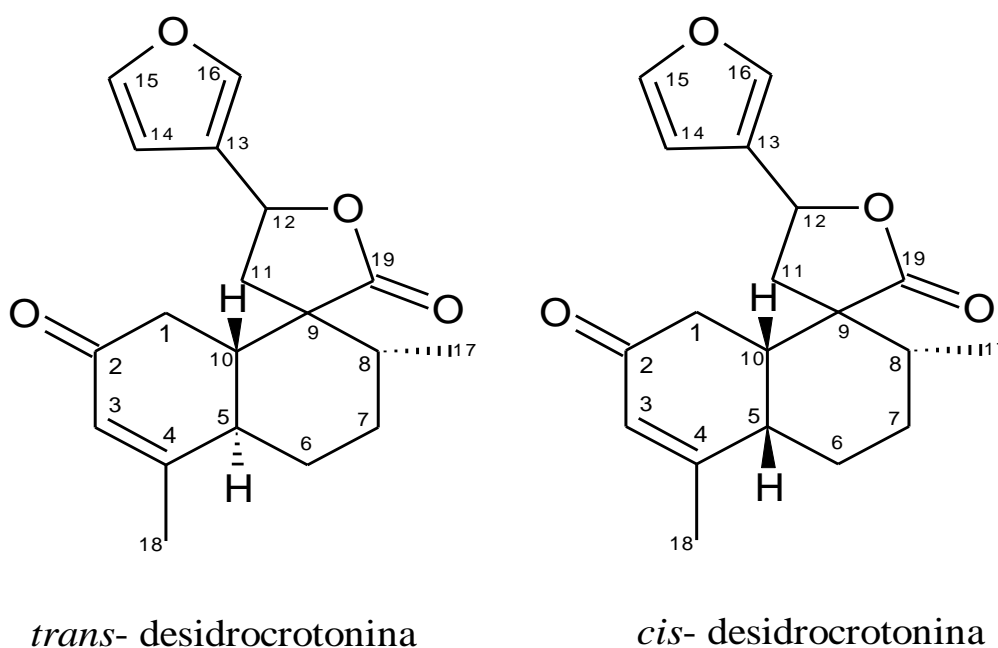


Tabela 9. Dados de RMN 1D e 2D da substância **3**.

3, CDCl ₃ , 300 MHz (¹ H), 75 MHz (¹³ C)					Literatura, CDCl ₃ , 300 MHz (¹ H), 150 MHz (¹³ C)	
C/H	HSQC		HMBC	DEPT	HSQC	
	δC	δ _H [mult., J(Hz)]	[² J _{CH} e ³ J _{CH}]		δ _H [mult., J(Hz)]	δC
1	39,8	2,18 <i>dd</i> (15,60; 13,81) 2,54 <i>dd</i> (15,60; 2,81)	2; 3; 5; 9; 10	CH ₂	2,19 <i>dd</i> (15,61; 13,80) 2,54 <i>dd</i> (15,61; 2,80)	39,8
2	197,9	-	-	C	-	197,5
3	126,7	5,89 <i>m</i> (1,26; 1,17)	1; 5; 18	CH	5,89 <i>m</i> (1,27; 1,19)	126,7
4	166,2	-	-	C	-	165,7
5	39,6	3,17 <i>m</i> (12,47; 10,67; 3,35; 1,19; 1,17)	-	CH	3,18 <i>m</i> (12,50; 10,70; 3,35; 1,20; 1,19)	39,6
6	28,2	1,17 <i>dddd</i> (12,87; 12,69; 12,47; 3,63) 2,23 <i>dddd</i> (12,87; 3,63; 3,35; 3,31)	4, 5, 7; 8; 10	CH ₂	1,18 <i>dddd</i> (12,89; 12,70; 12,50; 3,61) 2,27 <i>dddd</i> (12,89; 3,60; 3,35; 3,30)	28,2
7	30,1	1,86 <i>dddd</i> (13,81; 12,69; 12,30; 3,63) 1,65 <i>dddd</i> (13,81; 3,63; 3,55; 3,31)	5; 6; 8; 9; 17	CH ₂	1,88 <i>dddd</i> (13,80; 12,70; 12,31; 3,60) 1,66 <i>dddd</i> (13,80; 3,61; 3,58; 3,30)	30,1
8	41,7	1,68 <i>m</i> (12,30; 6,79; 3,55)	6; 7; 8; 11; 17; 20	CH	1,69 <i>m</i> (12,31; 6,80; 3,58)	41,7
9	51,5	-	-	C	-	51,4
10	46,0	1,80 <i>ddd</i> (13,81; 10,67; 2,81)	1; 2; 4; 6; 8; 9; 11; 20	CH	1,81 <i>ddd</i> (13,80; 10,70; 2,80)	46,1
11	40,5	2,42 <i>dd</i> (13,91; 8,60) 2,39 <i>dd</i> (13,91; 8,62)	8; 9; 10; 12; 13; 20	CH ₂	2,42 <i>dd</i> (13,95; 8,62) 2,37 <i>dd</i> (13,95; 8,65)	40,5
12	72,4	5,42 <i>ddd</i> (8,62; 8,60; 0,70)	11; 13; 14; 16; 20	CH	5,43 <i>ddd</i> (8,65; 8,62; 0,72)	72,3
13	125,0	-	-	C	-	125,1
14	108,0	6,40 <i>dd</i> (1,80; 0,86)	13; 15; 16	CH	6,41 <i>bdd</i> (1,83; 0,89)	107,9
15	144,3	7,44 <i>t</i> (1,80; 1,54)	13; 16	CH	7,45 <i>dd</i> (1,83; 1,66)	144,3
16	139,4	7,45 <i>t</i> (1,54; 0,86; 0,70)	14; 15	CH	7,46 <i>ddd</i> (1,66; 0,89; 0,72)	139,9
17	17,7	1,15 <i>d</i> (6,63)	7; 8	CH ₃	1,16 <i>d</i> (6,80)	17,6
18	22,1	1,96 <i>dd</i> (1,26; 1,19)	3; 4; 5	CH ₃	1,97 <i>dd</i> (1,27; 1,20)	21,9
20	177,2	-	-	C	-	176,9

Fonte: MACIEL *et al.*, (2003b)

Tabela 10. Dados de RMN 1D e 2D da substância 4.

4, CDCl ₃ , 300 MHz (¹ H), 75 MHz (¹³ C)					Literatura, CDCl ₃ 300 MHz (¹ H), 75 MHz (¹³ C)	
C/H	HSQC		HMBC	DEPT	HSQC	
	δ _C	δ _H [mult., J(Hz)]	[² J _{CH} e ³ J _{CH}]		δ _H [mult., J(Hz)]	δ _C
1	35,6	2,73 (<i>dd</i> , J= 17,1; 4,39) 3,37 (<i>dd</i> , J= 17,1; 14,2)	2; 3; 5; 10	CH ₂	3,36 <i>dd</i> (17,0; 4,5) 2,72 <i>dd</i> (17,0; 14,0)	35,7
2	198,8	-	-	C	-	198,3
3	126,4	5,86 (<i>s</i>)	1; 5; 18	CH	5,89 <i>s</i>	126,6
4	164,8	-	-	C	-	164,0
5	40,2	2,17 (<i>dd</i> , J= 9,0; 4,39)	6; 18	CH	2,16 <i>dd</i> (9,0; 4,5)	31,5
6	20,6	1,76 (<i>m</i>)	7	CH ₂	1,7-1,8 <i>m</i>	28,8
7	28,8	1,79-1,96 (<i>m</i>)	5; 6	CH ₂	1,9-2,0 <i>m</i>	20,8
8	31,2	2,13 (<i>m</i>)	17	CH	2,13 <i>m</i>	42,6
9	50,1	-	-	C	-	50,0
10	42,4	2,31 (<i>dt</i> , J= 14,2; 4,39)	1; 2; 5; 6; 8; 9; 11	CH	2,29 <i>dt</i> (14,0; 4,5)	45,1
11	44,9	2,09 (<i>dd</i> , J= 13,3; 10,2) 2,85 (<i>dd</i> , J= 13,3; 6,45)	8; 9; 10; 12; 13; 20	CH ₂	2,08 <i>dd</i> (13,0; 10,0) 2,83 <i>dd</i> (13,0; 6,5)	40,3
12	70,8	5,38 (<i>dd</i> , J= 10,2; 6,45)	11; 13; 14; 16	CH	5,36 <i>dd</i> (10,0; 6,5)	70,7
13	124,1	-	-	C	-	124,3
14	108,2	6,41 (<i>dd</i> , J= 1,75; 10,2)	13; 15; 16	CH	6,40 <i>dd</i> (1,8; 10,0)	108,2
15	144,1	7,44 (<i>d</i> , J= 1,75)	13; 16	CH	7,43 <i>d</i> (1,8)	144,1
16	140,0	7,48 (<i>s</i>)	14; 15	CH	7,47 <i>s</i>	139,9
17	16,9	1,25 (<i>d</i> , J= 7,3)	7; 8; 9	CH ₃	1,25 <i>d</i> (7,0)	16,9
18	22,7	1,99 (<i>s</i>)	3; 4; 5	CH ₃	1,96 <i>s</i>	22,6
20	176,4	-	-	C	-	176,1

Fonte: KUBO *et al.*(1991)

5.2.2 Identificação estrutural de 5 e 6

As substâncias **5** e **6** foram obtidas (fluxograma 9), e apresentava-se como óleo incolor, revelando-se com coloração verde em anisaldeído, com R_f de 0,5 no eluente Hex:AcOEt (7:3). Em seguida **5** e **6** foram submetidas à análises de CL-EMAR (Anexo 1) fornecendo os íons adutos $[M+H]^+$ de m/z 331,1916 e 331,1896, respectivamente. As fórmulas moleculares foram calculadas para **5** $C_{20}H_{27}O_4$ e **6** $C_{20}H_{27}O_4$: 331,1904 e 331,1707; Erro (Δ) = 3,5 e 2,7 ppm, respectivamente. Com base no cálculo do IDH (SILVERSTEIN *et al.*, 2007), os compostos apresentam nove graus de insaturação. A determinação estrutural foi realizada principalmente através de análises de CL-EMAR, RMN 1H e ^{13}C , DEPT135, 1D e 2D (COSY, HSQC e HMBC). Os tópicos importantes discutidos para **5** e **6** estão listados nas (Tabelas 9 e 10, Anexos 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 e Anexos 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43), respectivamente.

Os espectros de 1H (Anexo 31 e 38) de **5** e **6**, respectivamente, mostrou sinais característicos de hidrogênios (metílicos, metilênicos, metínicos) e olefínicos, entre δ_H 3,75-0,96 e 7,40-5,90, respectivamente. Foi observado um singlete de metóxila em δ_H 3,69, um dubleto em δ_H 1,98 e um dubleto em δ_H 0,96 (3H). No espectro de ^{13}C (Anexos 32 e 39) observou-se sinais de 20 carbono. O espectro de DEPT135 de **5** e **6** (Tabela 11 e 12, Anexos 33 e 40, respectivamente) mostraram sinais de quinze carbonos hidrogenados sendo: três sinais metílicos, cinco sinais metilênicos, sete sinais de metínicos e por comparação com o RMN de ^{13}C comprovou-se a presença de cinco carbonos desidrogenados em δ_C 198,9 (C); 174,5 (C); 166,5 (C), 124,4 (C) e 52,4 (C). O mapa de contorno HSQC de **5** e **6** (Anexos 35 e 42), apresentam correlações dos hidrogênios em δ_H 7,37, 7,26, 6,29 com os sinais de carbonos em δ_C 142,9 (CH), 138,7 (CH) e 110,9 (CH), respectivamente. O sinal de carbono desidrogenado em δ_C 124,5 (C), apresenta correlação com hidrogênios em δ_H 2,32 (2H).

O mapa de contorno HMBC de **5** e **6** (Anexos 36 e 43, Tabela 11 e 12, respectivamente) foram utilizados para montar os primeiros fragmentos das estruturas chamado de anel A. Começando pelas correlações de hidrogênios entre δ 2,73-2,18 (2H, geminais) com os carbonos δ_C 2J 198,99 (carbonila α e β insaturada); 3J 126,60; 3J 40,08; 3J 52,38; 2J 42,80; correspondente aos carbonos nas posições, 2, 3, 5, 9 e 10 respectivamente. Os hidrogênios da metila em δ 1,98 (3H) correlacionam-se com os sinais dos carbonos δ_C 3J 126,6; 2J 166,5 e 3J 40,1, correspondentes aos carbonos nas posições 3, 4, e 5, respectivamente. Para o anel B observou-se correlações entre os hidrogênios δ_H 2,24-1,14

com os carbonos δ_C 166,5; 40,1; 30,6; 35,1 e 42,8, correspondentes aos carbonos nas posições, 4, 5, 7, 8 e 10, respectivamente. Os hidrogênios da metila em δ_H 1,15 correlacionam-se com os carbonos δ_C 30,6; 35,1, e 52,4 correspondentes aos carbonos nas posições, 7, 8 e 9, respectivamente.

Mediante as análises dos espectros de RMN de 1H e ^{13}C , DEPT135, COSY, HMBC, HSQC de **5** e **6**, bem como comparação com dados de RMN da literatura (tabela 11 e 12, respectivamente), concluiu-se que a substancia **5** e **6** correspondem aos diterpenóides 19-*nor*-clerodano *trans*- cajucarina B (*t*-CJNB) e *cis*- cajucarina B (*c*-CJNB) ver figura 11, (MACIEL et al., 1998; 2003b).

Figura 11. Diterpenóides 19-*nor*-clerodano *trans* (**5**) e *cis* (**6**) - cajucarina B.

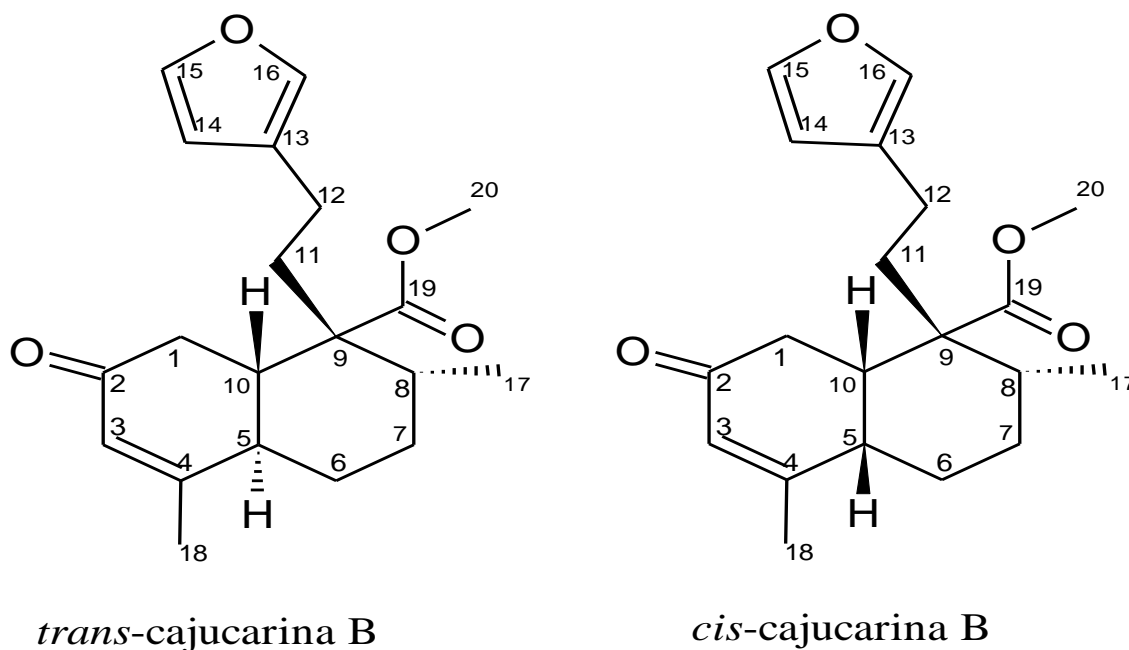


Tabela 11. Dados de RMN 1D e 2D da substância 5.

C/H	5, CDCl ₃ , 300 MHz(¹ H), 75 MHz (¹³ C)				Literatura, CDCl ₃ , 600 MHz(¹ H), 150 MHz (¹³ C)	
	HSQC		HMBC	DEPT	HSQC	
	δ _C	δ _H [mult., J(Hz)]	[² J _{CH} e ³ J _{CH}]		δ _C	δ _H [mult., J(Hz)]
1	39,1	2,18 (<i>dd</i> , J= 16,16; 14,16) 2,55 (<i>ddd</i> , J= 16,16; 3,26)	2, 3, 5, 9, 10	CH ₂	39,6	2,17 <i>dd</i> (16,25; 14,26) 2,53 <i>ddd</i> (16,25; 3,35)
2	199,0	-	-	C	199,3	-
3	126,6	5,90 (<i>m</i> , 1,24, 1,15)	5, 18	CH	127,2	5,88 <i>m</i> (1,22, 1,16)
4	166,5	-	-	C	166,7	-
5	40,1	3,01 (<i>m</i> , J= 12,83; 10,56; 3,06; 1,21; 1,14)	-	CH	40,6	2,98 <i>m</i> (12,86; 10,58; 3,09; 1,18;1,16)
6	28,9	1,15 (<i>dddd</i> , J= 13,25; 12,83; 12,77; 3,60) 2,25 (<i>dddd</i> , J= 13,25; 3,74; 3,46, 3,06)	5, 7, 8, 10	CH ₂	29,4	1,14 <i>dddd</i> (13,21; 12,86; 12,79; 3,62) 2,24 <i>dddd</i> (13,21; 3,79; 3,41, 3,09)
7	30,6	1,82 (<i>dddd</i> , J= 13,23; 12,77; 12,54; 3,74) 1,69 (<i>dddd</i> , J= 13,24; 3,60; 3,46; 3,39)	8, 17	CH ₂	31,2	1,82 <i>dddd</i> (13,27; 12,79; 12,55; 3,79) 1,67 <i>dddd</i> (13,27; 3,62; 3,41; 3,41)
8	35,1	1,77 (<i>m</i> , J= 12,54; 6,63; 3,45)	7, 9, 10, 17, 20	CH	35,7	1,76 <i>m</i> (12,55; 6,65; 3,41)
9	52,4	-	-	C	52,9	-
10	42,8	1,96 (<i>ddd</i> , J= 14,16; 10,56; 3,26)	2, 4, 5, 6, 8, 9, 20	CH	43,4	1,94 <i>ddd</i> (14,26; 10,58; 3,35)
11	30,9	2,12 (<i>ddd</i> , J= 15,33; 12,05; 4,65) 2,06 (<i>ddd</i> , J= 15,33; 13,84; 4,57)	8, 9, 10, 12, 13, 20	CH ₂	31,5	2,11 <i>ddd</i> (15,34; 12,09; 4,61) 2,03 <i>ddd</i> (15,34; 13,80; 4,58)
12	18,2	2,32 (<i>ddd</i> , J= 14,23; 12,05; 4,57) 2,27 (<i>ddd</i> , J= 14,23; 13,84; 4,65)	9, 11, 13, 14, 16	CH ₂	18,8	2,33 <i>ddd</i> (14,20; 12,09; 4,58) 2,28 <i>ddd</i> (14,20; 13,80; 4,61)
13	124,4	-	-	C	124,9	-
14	110,9	6,29 (<i>bdd</i> , J= 1,73; 0,85)	13, 15, 16	CH	111,4	6,27 <i>bdd</i> (1,78; 0,82)
15	143,0	7,37 (<i>t largo</i> , J= 1,73; 1,65)	13, 14, 16	CH	143,5	7,35 <i>dd</i> (1,78; 1,60)
16	138,7	7,26 (<i>m</i>)	13, 14, 15	CH	139,3	7,24 <i>dd</i> (1,60; 0,82)
17	17,2	0,96 (<i>d</i> , J= 6,21)	7, 8, 9	CH ₃	17,7	0,95 <i>d</i> (6,65)
18	22,1	1,98 (<i>t largo</i> , J= 1,24; 1,25)	3, 4, 5	CH ₃	22,5	1,95 <i>dd</i> (1,20; 1,20)
20	174,5	-	-	C	174,9	-
21	51,3	3,69 (<i>s</i>)	20	CH ₃	51,7	3,67 <i>s</i>

Fonte: Maciel, *et. al* (1998).

Tabela 12. Dados de RMN 1D e 2D da substância 6.

C/H	6, CDCl ₃ 300 MHz(¹ H), 75 MHz (¹³ C)				Literatura, CDCl ₃ , 600 MHz(¹ H), 150 MHz (¹³ C)	
	HSQC		HMBC	DEPT	HSQC	
	δ _C	δ _H [mult., J(Hz)]	[² J _{CH} e ³ J _{CH}]		δ _C	δ _H [mult., J(Hz)]
1	37,5	2,59 (x) 2,63 (x)	2, 9, 10	CH ₂	37,4	2,57 2,63
2	199,1	-	-	C	197,5	-
3	126,1	5,85 (x)	5, 18	CH	126,1	5,85
4	165,8	-	-	C	165,6	-
5	39,1	2,40 (x)	1, 11	CH	39,0	2,49
6	21,0	1,60 (x) 1,72 (x)	5, 8	CH ₂	21,0	1,62 (β) 1,72 (α, <i>dq</i> , <i>J</i> = 14,0; 3,9; 3,7)
7	27,6	1,61 (x) 1,91(x)	5, 6, 8, 9, 17	CH ₂	27,5	1,56-1,65 1,84-2,08
8	31,7	2,25 (x)	9, 17	CH	31,7	2,18-2,30
9	52,5	-	-	C	52,5	-
10	38,5	2,52 (x)	6, 8, 9, 12	CH	38,5	2,38
11	37,7	2,09 (x)	9, 10, 12, 20	CH ₂	37,7	1,84-2,08
12	19,9	2,26 (x)	9, 11, 13, 14, 16	CH ₂	19,9	2,18-2,30
13	124,3	-	-	C	124,3	-
14	110,8	6,23 (<i>dd</i> , <i>J</i> =1,73; 0,86)	13, 15, 16	CH	110,7	6,20 (<i>dd</i> , <i>J</i> =1,7; 0,7)
15	142,9	7,35 (<i>t</i> , <i>J</i> =1,60)	13, 16	CH	142,8	7,32 (<i>t</i> , <i>J</i> =1,7)
16	138,7	7,19 (x)	14, 15	CH	138,6	7,17 (<i>t</i> , <i>J</i> = 1,2)
17	18,3	1,15 (<i>d</i> , <i>J</i> =7,20)	7, 8	CH ₃	18,3	1,12 (<i>d</i> , <i>J</i> =7,1)
18	22,9	1,99 (<i>s</i> , <i>J</i> = 1,05)	3, 4, 5	CH ₃	22,7	1,96 (<i>s</i> largo, <i>J</i> = 1,2)
20	174,8	-	-	C	174,7	-
21	51,4	3,69 (<i>s</i>)	20	CH ₃	51,3	3,64

Fonte: Maciel, *et. al* (1998b)

5.2.3 Identificação estrutural da substância 7

A substância **7** (fluxograma 11) foi obtido na forma de um sólido amarelado. A análise por CL-EMAR (Anexo 44) de **7**, exibiu íon com m/z 327,1607 $[M+H]^+$. A fórmula molecular de **7** foi $C_{20}H_{22}O_4$, com o erro cauculado de $\Delta = 0,1$ ppm. O IDH da substância apresenta dez graus de insaturação (SILVERSTEIN *et al.*, 2007). A determinação estrutural foi realizada principalmente através de análises de RMN 1D (1H e ^{13}C , DEPT135) e 2D (COSY, HSQC e HMBC), os dados importantes discutidos encontram-se (Tabela 13 e Anexos 44 a 50).

O espectro de RMN de 1H (Anexo 45) mostrou sinais característicos de hidrogênios metóxico, metílico, metilênicos e metínicos olefínicos. Foi observado presença de três sinais típicos de hidrogênios metílicos. Dois singletos, sendo um em δ_H 3,68 (metóxila), δ_H 2,21 e um dubleto em δ_H 1,11, todos com integral para 3 hidrogenios, respectivamente. Também se observou seis sinais de hidrogênios entre δ_H 7,70-5,50, característicos de hidrogênios aromáticos e olefínicos, todos com integrais para um hidrogênio. No espectro de ^{13}C observou-se 20 sinais de carbonos (Anexo 46). O espectro de DEPT¹³⁵ (anexo 47) mostrou treze sinais, três metílicos, dois metilênicos, oito metínicos e por comparação com o RMN de ^{13}C comprovou-se a presença de sete carbonos desidrogenados, (Tabela 19).

O mapa de contornos HSQC (Anexo 49), mostrou correlação entre os hidrogênios δ_H 6,40 e 6,69 com os carbonos δ_C 110,8 e 114,6, são deslocamentos característicos de hidrogênios e carbonos arílicos, outra correlação importante foi de um hidrogênio em δ_H 5,67 ligado ao carbono δ_C 71,82 deslocamentos característicos de hidrogênio e carbono do anel lactônico já vistos anteriormente. Destacam-se sinais de carbonos e hidrogênios com deslocamentos em campos altos, típicos de anéis aromáticos em: δ_H 7,57; 7,66 e 6,59 apresentando correlações com carbonos δ_C 144,3, 140,4 e 108,0, respectivamente.

O mapa de contorno HMBC (Anexo 50, tabela 20) foi utilizado para montar o primeiro fragmento da estrutura do qual chamamos de anel A. Começamos pelas correlações dos hidrogênios δ_H 6,40 e 6,69 com o carbono em δ_C 2J 157,7 que também é visto em 3J pelos hidrogênios δ_H 3,68, referente aos hidrogênios da metóxila. O hidrogênio δ_H 6,40 também apresenta correlação com os carbonos em δ_C 3J 114,6 e 3J 53,9, correspondentes aos carbonos nas posições 3 e 10 respectivamente. O espectro mostra correlações do hidrogênio δ 6,69, com carbonos δ_C 2J 127,4; 3J 110,8 e 3J 18,6, correspondentes aos carbonos nas posições 1, 4 e 18, respectivamente. Os hidrogênios metílicos δ_H 2,21 correlacionam-se com os carbonos δ_C 127,4; 114,6 e 137,5, correspondentes aos carbonos nas posições 3, 4, e 5 respectivamente.

Junto ao anel A foi montado outro fragmento no qual chamamos de anel B, este apresenta correlações do hidrogênio δ_H 2,62 com os carbonos δ_C 2J 137,5; 3J 127,4; 2J 26,2 e 3J 33,6, correspondentes aos carbonos nas posições, 4, 5, 7, 8, respectivamente. Os hidrogênios metílicos δ 1,11 correlacionam-se com os carbonos δ_C 3J 53,9; 2J 33,6e 3J 26,2, correspondentes aos carbonos nas posições, 9, 8 e 7, respectivamente.

Mediante todas as observações levantadas dos dados obtidos por meio das técnicas de RMN de 1H e ^{13}C e a comparação com os dados da literatura, pode-se concluir que a substância **7** corresponde ao composto isolado por Chan *et al.*, 1968. Consistentes com um diterpenóide da classe dos 19-*nor*-clerodanos (17, 19- Dinorlabda- 1, 3, 5 (10), 13 (16), 14-pentaeno-9-carboxílico, 15,16- epoxi- 12-hidroxi-2-metoxi-, γ -lactona (8CI)) derivado do diterpeno crotonina isolada a partir dos extratos das folhas de *Croton lucidus* (Figura 7).

Figura 12. Estrutura do diterpenóide 19-*nor*-clerodano **7**.

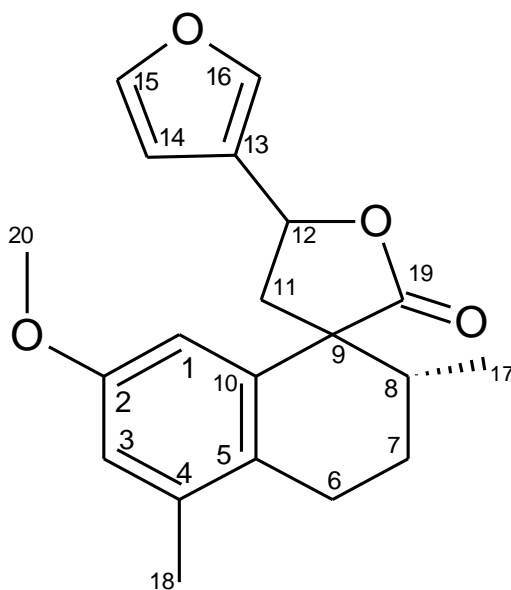


Tabela 13. Dados de RMN 1D e 2D da substância 7.

7, CDCl ₃ , 300 MHz(¹ H), 75 MHz (¹³ C)					
C/H	HSQC		HMBC	COSY	DEPT
	δ _C	δ _H [mult., J(Hz)]	[² J _{CH} e ³ J _{CH}]	¹ H x ¹ H	
1	110,8	6,40 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,50)	2, 3, 4	6,69	CH
2	157,7	-	-	-	C
3	114,6	6,69 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,50)	1, 2, 4, 18	6,40	CH
4	127,4	-	-	-	C
5	137,5	-	-	-	C
6	22,3	2,62 (<i>m</i>)	4, 5, 7, 8	1,97	CH ₂
7	26,2	1,97 (<i>m</i> , <i>J</i> = 12,06; 5,73)	4, 6, 8, 17	2,62; 2,26	CH ₂
8	33,6	2,26 (<i>m</i> , <i>J</i> = 11,99; 6,69)	6, 10, 11, 17, 20	1,11; 1,97	CH
9	53,9	-	-	-	C
10	137,6	-	-	-	C
11	47,5	2,56 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 13,67 ;9,57) 2,98 (<i>q</i> , <i>J</i> = 13,67; 6,99)	4, 7, 8, 10, 12, 13, 20	5,67	CH ₂
12	71,8	5,67 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 9,57; 6,99)	11, 13, 14, 16	2,56; 2,98	CH
13	124,8	-	-	-	C
14	108,0	6,59 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 0,69;1,71)	13, 15, 16	7,58	CH
15	144,2	7,58 <i>t</i> largo, <i>J</i> = 1,58; 1,71)	13, 16	6,59	CH
16	140,4	7,69 (<i>m</i>)	13, 14, 15	-	CH
17	14,9	1,11 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,93)	7, 8	2,26	CH ₃
18	18,6	2,21 (<i>s</i>)	3, 4, 5	-	CH ₃
20	179,8	-	-	-	C
21	54,1	3,68 (<i>s</i>)	2	-	CH ₃

5.2.4 Identificação estrutural da substância 8

A substância **8** foi obtido (fluxograma 4) como cristais de cor verde claro em forma de agulhas. O CL-EMAR (Anexo 51) de **8** exibiu íon com m/z 329,1041 $[M+H]^+$. A fórmula molecular foi calculado para $C_{18}H_{17}O_6$: $m/z = 329,1019$, $\Delta = 2,1$ ppm. Com base no cálculo do IDH, a substância apresenta onze graus de insaturação, (SILVERSTEIN *et al.*, 2007). A determinação estrutural foi realizada principalmente através de análises de RMN 1D (1H e ^{13}C , DEPT135) e 2D (COSY, HSQC e HMBC), os tópicos importantes discutidos encontram-se (Tabela 14 e Anexos 52 a 57 ,respectivamente).

No espectro de RMN de 1H (Anexo 52) é possível identificar a presença de 4 sinais de hidrogênios característicos de sistemas aromáticos. Um par de dubletos em δ_H 6,45 (d ; $J = 2,1$ Hz) e em δ_H 6,36 (d ; $J = 2,2$ Hz) evidencia um acoplamento em meta, sendo compatível com anéis A de flavonoides 5,7,9,10-tetrassubstituídos. Foi observado também dois duplos dubletos em δ_H 8,09 (dd ; 9,0 Hz), δ_H 7,03 (dd ; 9,0 Hz; 2,0 Hz), apresentaram integrais dobradas surgindo um sistema simétrico, que corroboram com o padrão 1', 4'-dissubstituído de um anel B flavonoídico. Os três sinais observados em δ_H 3,87; 3,89 e 3,91, atribuídos a metóxilas, deixando evidente que a substância **8** é um flavonoide trimetoxilado.

O mapa de contorno HSQC (Anexo 56), mostra as correlações dos hidrogênios do anel A em δ_H 6,45 e 6,36 com os carbonos δ_C 92,2 e 97,8, respectivamente. O mapa de contorno HMBC (Anexo 57, Tabela 14) mostra correlação do hidrogênio em δ_H 6,45 com os carbonos δ_C 3J 97,9; 2J 165,4; 2J 156,7 e 3J 106,1; correspondente aos carbonos nas posições, 6, 7, 9, e 10 respectivamente. O hidrogênio em δ_H 6,36 correlaciona-se no mapa de contornos HMBC com os carbonos δ_C 2J 162,0; 2J 165,4; 3J 92,2 e 3J 106, 0; correspondente aos carbonos nas posições, 5, 7, 8, e 10 respectivamente.

Para o anel B, o mapa de contornos HSQC apresentou correlações entre os hidrogênios em δ_H 8,09 e 7,03, correlacionando com carbonos δ_C 130,2 (C-2', C6') e 114,1 (C-3', C5'), respectivamente. O mapa de contorno HMBC (Anexo 57, Tabela 14) mostra correlações dos hidrogênios em δ_H 7,03 com carbonos em δ_C 161,7, 114,1 e 122,8, correspondentes aos carbonos nas posições, 4', 2', 6', e 1', respectivamente. Os hidrogênios também simétricos δ_H 8,09 correlacionam-se com os carbonos δ_C 130,2 (C3' e C5'), 161,7 e 155,9, correspondentes aos carbonos nas posições 3'e 5', 4', 2, respectivamente. Os hidrogênios metóxicos δ_H 3,89 (C-7-OMe), 3,87 (C-3-OMe) e 3,91 (C-4'-OMe) correlacionam-se com os carbonos δ_C 165,4; 138,9 e 161,7, correspondentes aos carbonos nas posições, 7, 3 e 4', respectivamente.

Mediante todas as observações levantadas dos dados obtidos por meio das técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C e a comparação com os dados da literatura, pode-se concluir que a substância **8** corresponde ao composto isolado por Maciel *et al.*, 2009. Consistentes com o flavonoide Kaempferol-3,4,7-trimetil éter, (Figura 13).

Figura 13. Flavonóide Kaempferol-3,4,7-trimetil éter.

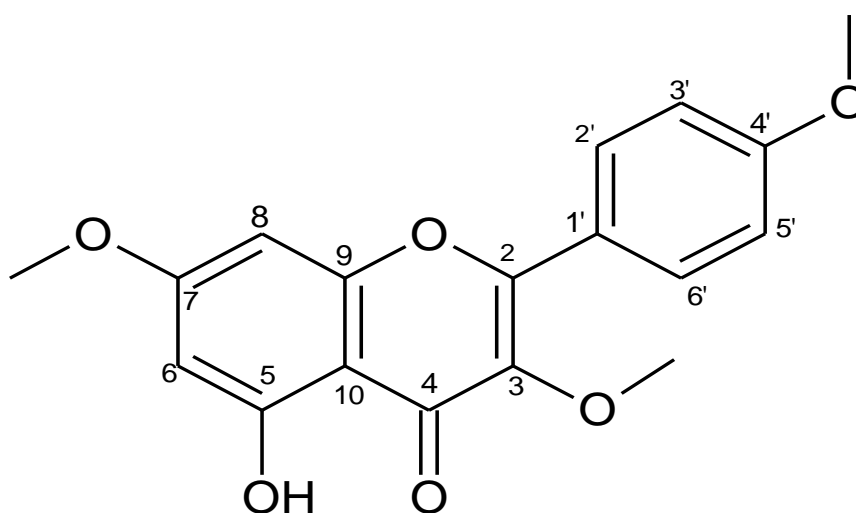


Tabela 14. Dados de RMN 1D e 2D substância 8.

C/H	8, CDCl ₃ , 300 MHz (¹ H), 75 MHz (¹³ C)				Literatura, CDCl ₃ , 300 MHz (¹ H), 75 MHz (¹³ C)	
	HSQC		HMBC	DEPT	HSQC	
	δ _C	δ _H [mult., J(Hz)]	[² J _{CH} e ³ J _{CH}]		δ _C	δ _H [mult., J(Hz)]
2	155,9	-		C	155,8	-
3	138,8	-		C	138,8	-
4	178,8	-		C	178,7	-
5	162,0	-		C	162,0	-
6	97,8	6,36 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,1)	5, 7, 8, 10	CH	97,7	6,36 <i>d</i> (<i>J</i> = 2,2)
7	165,4	-		C	165,4	-
8	92,2	6,45 (<i>d</i> <i>J</i> = 2,1)	6, 7, 9, 10	CH	92,1	6,45 <i>d</i> (<i>J</i> = 2,2)
9	156,8	-		C	156,7	-
10	106,1	-		C	106,0	-
1'	122,8	-		C	122,8	-
2'	130,2	8,09 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,0)	2, 6', 4'	CH	130,1	8,10 <i>d</i> (<i>J</i> = 9,2)
3'	114,1	7,03 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,0)	1', 4', 5'	CH	114,0	7,03 <i>d</i> (<i>J</i> = 9,2)
4'	161,7	-		C	161,6	-
5'	114,1	7,03 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,0)	1', 3', 4'	CH	114,0	7,03 <i>d</i> (<i>J</i> = 9,2)
6'	130,2	8,09 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,0)	2, 2', 4'	CH	130,1	8,10 <i>d</i> (<i>J</i> = 9,2)
C-3-OMe	60,2	3,87 (<i>s</i>)	3	CH ₃	60,0	-
C-7-OMe	55,5	3,91 (<i>s</i>)	4'	CH ₃	55,3	3,90 (3 x OCH ₃ , <i>s</i>)
C-4'-OMe	55,8	3,89 (<i>s</i>)	7	CH ₃	55,7	-

Fonte: MACIEL, *et. al* (2009).

5.3 Atividade antiplasmódica *in vitro* e *in vivo* em células normais dos terpenóides naturais e semissintético.

O estudo fitoquímico foi baseado em 2 tipos de extratos obtidos a partir de dois morfotipos, sacaca-branca, extrato etanólico (EtOH) das cascas e sacaca-vermelha extrato clorofórmico (CHCl₃) das folhas. Os extratos foram testados por Lima *et al.*, (2015), em duas concentrações 5 e 50 µg/mL e, apresentaram-se ativos ou moderadamente ativos na concentração de 50 µg/mL, inibindo mais de 50% do crescimento *in vitro* da cepa K1 de *P. falciparum*, (Tabela 15). Diante disso foi produzido extratos semelhantes a estes, onde que por fracionamento em coluna cromatográfica aberta foram isolados 13 substâncias, e produzido um semissintetizado (**2**), somando 14 substâncias. Destas, oito foram identificadas e submetidas à testes antiplasmódico *in vitro* da cepa K1 de *P. falciparum*, (figura 4, tabela 16). Dessas, duas apresentaram atividade moderada, inibindo mais de 50% do crescimento *in vitro* da cepa K1 de *P. falciparum* (Tabela 23). Em seguida as substâncias (**1**) e (**6**) (Figura 4, Tabela 16), foram testadas para determinação de suas CI₅₀ (Concentração que inibe 50% do crescimento do *P. falciparum in vitro*) frente à cepa multi-resistente K1 de *P. falciparum* (MRA-159, MR4, ATCC Manassas Virginia) segundo método de Trager e Jensen (1976). A concentração da média inibitória (CI₅₀) das substâncias **1** e **6**, estão resumidas na Tabela 17. As CI₅₀ foram de 23,7 µg/mL para (**1**) e o terpenóide mais ativo (**6**) com o CI₅₀ de 23,0 µg/mL. A substância **1** foi submetido a teste *in vivo* em roedores fêmeas infectado com *P. berghei* NK65. A supressão *in vivo* foi observado para o composto **1** via oral na dose de 200 mg/Kg/dia com a inibição de 21% da parasitemia e subcultânea 19 ± 3 %, sendo considerado não ativo, o resultado foi resumido na tabela 18.

Tabela 15. Atividade *in vitro* contra cepas do *P. falciparum* de extratos obtidos a partir de cascas e folhas de *Croton cajucara* Benth.

Espécie	Parte da planta	Solvente ^a	% de inibição por Microscopia (<i>Pf</i> K1) ^b		CI ₅₀ HRP2 (<i>Pf</i> W2) ^b	Classificação da atividade*
			50 µg/mL	5 µg/mL	µg/mL ± DP	
<i>Croton cajucara</i> (variedade: Branca)	Casca	EtOH	99,1	26,3	17,2 ± 6,6	AM
<i>Croton cajucara</i> (variedade: vermelha)	Folha	CHCl ₃	97,8	74,9	6,4 ± 1,2	A

LIMA *et al.*, 2016

*Como critério de atividade *in vitro* foi estabelecido que as amostras com IC₅₀ de:

< 1 µg/mL - Muito Ativo (MA)

1 a 15 µg/mL – Ativo (A)

16 a 30 µg/mL - Parcialmente Ativo (PA)

> 30 µg/mL – Inativo (I)

Tabela 16. Inibição do crescimento *in vitro* da cepa K1 de *P. falciparum* frente às substâncias: **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8** (Figura 6).

Espécie	Substância	Classificação* da atividade	Redução do crescimento do parasito (%)	
			50 (µg/mL)	5 (µg/mL)
<i>Croton cajucara</i> (variedade: Vermelha)	1	PA	70,5	68,0
Semissintético	2	PA	63,9	55,6
<i>Croton cajucara</i> (variedade: Branca)	3	PA	57,6	0
<i>Croton cajucara</i> (variedade: Vermelha)	4	I	41,86	37,21
<i>Croton cajucara</i> (variedade: Branca)	5	I	18,60	23,26
<i>Croton cajucara</i> (variedade: Branca)	6	A	92,7	75,6
<i>Croton cajucara</i> (variedade: Branca)	7	I	34,88	23,26
<i>Croton cajucara</i> (variedade: Vermelha)	8	I	37,21	11,63

*Como critério de atividade *in vitro* foi estabelecido que as amostras que inibirem o crescimento dos parasitos de:

80 a 100% = ativas (A)

50 a 79% = parcialmente ativas (PA)

< 50% = inativa (I)

Tabela 17. Concentração inibitória 50% (IC₅₀) in vitro de 02 (duas) substâncias frente à cepa K1 de *P. falciparum*.

Espécie	Códigos	Classificação da atividade	IC₅₀ (µg/mL)
<i>Croton cajucara</i> (variedade: Vermelha)	1	PA	23,7
<i>Croton cajucara</i> (variedade: Branca)	6	PA	23,0
Controle	Cloroquina (difosfato)		0,012

*Como critério de atividade *in vitro* foi estabelecido que as amostras com IC₅₀ de:

< 1 µg/mL - Muito Ativo (MA)

1 a 15 µg/mL – Ativo (A)

16 a 30 µg/mL - Parcialmente Ativo (PA)

> 30 µg/mL – Inativo (I)

Tabela 18. Supressão *in vivo* *P. berghei* NK65 em roedores fêmeas do terpenoide 7-hidroxicalameneno (1).

Dose (mg/kg/day)	% Parasite \pm SEM ^b (% inhibition of parasite growth) ^c				Average survival time \pm SD (days)	
	Oral		Subcutaneous		Oral	Subcutaneous
	Day 5	Day 7	Day 5	Day 7		
1						
200	4,22 \pm 0,93 (-61,07)	1,64 \pm 0,33 (-32,26)	3,74 \pm 0,95 (-42,75)	1,84 \pm 0,62 (-26,09)	21 \pm 0,5	19 \pm 3
Chloroquine diphosphate						
10	0,06 \pm 0,05	0,03 \pm 0,03	0,05 \pm 0,04	0,04 \pm 0,02	> 40	> 40
OC						
10%	2,62 \pm 0,51	1,24 \pm 0,27	2,62 \pm 0,47	1,38 \pm 0,71	20 \pm 2	17 \pm 1

6. CONCLUSÃO

Nesta investigação fitoquímica dos extratos das cascas e folhas da *Croton cajucara* Benth., foi concluído com a obtenção de 14 substâncias, sendo um composto semissintético, no entanto foi possível caracterizar somente 8 compostos, sendo 7 terpenoides e um flavonoide. Diante disso as substâncias que tiveram suas estruturas identificadas foram: 7-hidroxicalameneno, 7-acetilcalameneno (derivado), *trans*-desidrocrotonina, *cis*-desidrocrotonina, *trans*-cajucarina B, *cis*-cajucarina B, espiro[furano-3(2H),1'(2'H)-naftaleno] e um flavonoide 3,7,4'-tri-*O*-metilcanferol. Através de reação de acetilação, converteu-se o 7-hidroxicalameneno a 7-acetilcalameneno, tratando-se de uma estrutura inédita na literatura.

Estes compostos foram submetidos ao teste *in vitro*. Destas somente quatro apresentaram atividades antimaláricas contra a cepa de *Plasmodium falciparum* tipo K1. No entanto foram selecionadas apenas duas dentre as mais ativas a obtenção da CI₅₀. Os compostos conhecidos como *trans*-cajucarina B e 7-hidroxicalameneno apresentaram atividades moderada.

Nesta pesquisa 50 % das 8 substâncias isoladas apresentaram atividade *in vitro* contra o parasita da malária, variando na classificação entre ativo e com atividade moderada, conforme critérios descritos anteriormente. Esses resultados ressaltam a importância de seguir o estudo com base no conhecimento tradicional para a escolha de plantas como fontes de substâncias antimaláricas.

A importância de pesquisas com plantas utilizadas na região Amazônica não reside apenas em promover o valor da flora quanto à descoberta de novos compostos antimaláricos, mas também na necessidade de cuidados com a saúde dos povos tradicionais que utilizam essas plantas em seu dia-a-dia, uma vez que muitos compostos podem apresentar toxicidade.

Com os resultados obtidos neste trabalho, novos estudos fitoquímicos biomonitorados serão realizados com os extratos de *Croton cajucara* na busca do isolamento de compostos ativos, sendo ainda necessária a realização, em futuros trabalhos de novos testes *in vitro* e *in vivo* e de citotoxicidade, para estas substâncias.

7. BIBLIOGRAFIA

- ABREU, A.S.; BARBOSA, O. S.; MULLER, A. H.; GUILHON, G. M. S.P. *Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA*. 2001.
- ADEBAYO, J. O.; KRETTLI, A. U. Potential antimalarials from Nigerian plants: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 133(2):289-302.
- ADITYA, N.P.; VATHSALA, P.G.; VIEIRA, V.; MURTHY, R.S.R.; SOUTO, E.B. Advances in nanomedicines for malaria treatment. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2013, 201–202:1–17.
- ALECRIM, M. das 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*, 1999, 32: 67-8.
- ALMEIDA, A. B. A. ; MELO, P. S; HIRUMA-LIMA, C. A; GRACIOSO, J. S.; CARLI, L.; NUNES, D. S.; HAUN, M.; SOUZA BRITO, A. R. M. ‘Antiulcerogenic Effect and Cytotoxic Activity of Semi-Synthetic Crotonin Obtained from *Croton cajucara* Benth.’, *European Journal of Pharmacology*, 472, 2003: 205–212.
- ANDRADE-NETO VF, POHLIT AM, PINTO ACS, SILVA ECC, NOGUEIRA KL, MELO MRS, HENRIQUE MC, AMORIM RCN, ROCHA E SILVA LF, COSTA MRF, NUNOMURA RCS, NUNOMURA SM, ALECRIM WD, ALECRIM MGC, CHAVES FCM, VIEIRA PPR: *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2007, 102:359-365.
- ANTHONY, M.P.; BURROWS, J.N.; DUPARC, S.; JMOEHRLE, J.; WELLS, T.N.C. The global pipeline of new medicines for the control and elimination of malaria. *Malaria Journal*, 2012, 11:316.
- BANNISTER, L.; MITCHELL, G. The ins, outs and roundabouts of malaria. *Trends in Parasitology*, 2003, 19(5):209-13.
- BANTIE, L.; ASSEFA, S.; TEKLEHAIMANOT, T.; ENGIDAWORK, E. *In vivo* antimalarial activity of the crude leaf extract and solvent fractions of *Croton macrostachyus* hocsht. (Euphorbiaceae) against *Plasmodium berghei* in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 1(14):79.
- BERO, J.; FREDERICH, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antimalarial compounds isolated from plants used in traditional medicine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2009, 61:1401-1433.
- BERRY, P. E.; HIPPI, A. L.; WURDACK, K. J.; VAN EE; B. RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and TRNL-TRNF DNA sequence data. *American Journal of Botany*, 2005, 92(9):1520-1534.

BIGHETTI, E. J. B.; HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO, J. S.; SOUZA-BRITO, A. R. M. 'Anti-Inflammatory and Antinociceptive Effects in Rodents of the Essential Oil of *Croton cajucara* Benth.', *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51 (1999): 1447–1453.

BRASIL. *Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde: Guia de Vigilância em Saúde* – Brasília. Ministério da Saúde, 2014. 812 p.

BRASIL. *Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde: Guia de vigilância epidemiológica*. Ministério da Saúde, 7 ed. Brasília, 2009.

CAMPBELL, A. V.; CORREA, R. G. C.; GOTTLIEB, O. R.; LEO M. S.; MARX, M. C.; MAIA, J. G. S.; MAGALHAES, M. T., 'Linalool-containing amazonian essential oils', *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 44, 1972: 317–19.

CAMPOS, A. R.; ALBUQUERQUE, F. A. A.; RAO, V. S. N.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. 'Investigations on the Antinociceptive Activity of Crude Extracts from *Croton cajucara* Benth. Leaves in Mice', *Fitoterapia*, 73 2002: 116–20.

CHAUDHURRY, R.R. Natural medicinal agents. In: MUNSON, P.L.; MUELLER, RA; BREESE, G.R. *Principles of Phannacology*. New York, Chapman & Hall, 1995, 1529-33.

CHAVES, F.C.M.; BIZZO, H.R.; ANGELO, P.C.S.; XAVIER,J.J.B.N.; SÁ SOBRINHO, A.F. Rendimento e composição química do óleo essencial de folhas de dois morfotipos de sacaca (*Croton cajucara* Benth.) *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 2006, 8(4): 117-119.

CONCEIÇÃO, C.C.C.; MOTA, M.G.C.; NASCIMENTO, M.E.; VIEIRA, I.M.S. 'Morfologia das flores, frutos, sementes e plântulas de sacaca -*Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae)', *Euphorbiaceae. Acta Horticulturae*, 2002: 167–171.

CONFALONIERI, U.E.C. Saúde na Amazônia: um modelo conceitual para análise de paisagem e doenças. *Estudos Avançados*, v.19, n.53, p 221-236, 2005.

COSTA, M.P.; MAGALHÃES, N.S.S.; GOMES, F.E.S.; MACIEL, A.M. Uma revisão das atividades biológicas da trans-desidrocrotonina,um produto natural obtido de *Croton cajucara*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2007, 17(2), p.275-286.

CRAVO, P.; ROSÁRIO, V. *Aspectos de genética molecular da resistêmcia aos fármacos antimaláricos*, 2003.

CRUZ, L.R.;SPANGENBERG, T.; LACERDA, M.V.G.; WELLS, T.N.C. Malaria in South America: a drug Discovery perspective. *Malaria Journal*, 2013, 12:168.

DI STASI, L. C.; HIRUMA C. A.; *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. 2. ed. rev. e ampl. - São Paulo: Editora UNESP, 2002.

DI STASI, L. C.; HIRUMA, C. A.; GUIMARAES, E. M.; SANTOS, C. M. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. *Fitoterapia*. 1994: LXV (6), 529.

DI STASI L. C., SANTOS E. M. C., MOREIRA DOS SANTOS C., HIRUMA C. A., "Plantas Medicinais da Amazônia," Editora UNESP, São Paulo, 1989: 127—128.

DOUGLAS, N.M.; ANSTEY, N.M.; ANGUS, B.J.; NOSTEN, F.N.; PRICE, R. Artemisinin combination therapy for vivax malaria. *The lancet infectious diseases*, 2010, 10(6):405-416.

EGAN, T.J. Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*: can the genie be put back in the bottle? *Future Microbiology*, 2009, 4:637–639.

FARIAS, R. A F; NETO, M. F. O.; VIANA, G. S. B.; RAO, V. S. N. ‘Effects of Croton Cajucara Extract on Serum Lipids of Rats Fed a High Fat Diet’, *Phytotherapy Research*, 10, 1996: 697-99.

FARIAS, R. A F; RAO, V. S N; VIANA, C. S B; SILVEIRA, E. R.; MACIEL, M. A M; PINTO, A. C. ‘Hypoglycemic Effect of Trans Dehydrocrotonin, a nor-Clerodane Diterpene from *Croton cajucara*’, *Planta Medica*, 1997, 63: 558-60.

FRANCISCO A. I.; VARGAS, M. D. Ferroquina: o antimalárico do futuro. *Revista Virtual de Química*, 2010, 2: 118-129.

GARAVELLI, P.L., CORTI, E. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*: the first case in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene*, 1992, 86:128.

GARAVITO, A.G.; RINCON, J.; ARTEAGAA, L.; HATAA, H.; BOURDYB, G.; GIMENEZC, A.; PINZON, A.; DEHAROB, E. Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 107, 2006: p. 460-462.

GINSBURG, H., DEHARO, E. A call for using natural compounds in the development of new antimalarial treatments—an introduction. *Malaria Journal*, 2011, 10 (Suppl 1):S1.

GRAZIOSE, R.; SILVA, P. R.; RATHINASABAPATHY, T.; DEKOCK, C.; GRACE, M. H.; POULEV, A.; LILA, M. A.; SMITH, P.; RASKIN, I. Antiparasitic compounds from *Cornus florida* L. with activities against *Plasmodium falciparum* and *Leishmania tarentolae*. *Journal of Ethnopharmacology*, 142, 2012: p. 456–461.

GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A.; LIMA, J. E.; PAMPLONA, S. S. R.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. ‘Anti-Tumour Activity of Two 19-Nor-Clerodane Diterpenes, Trans-Dehydrocrotonin and Trans-Crotonin, from *Croton cajucara*’, *Planta Medica*, 65, 1999: p. 687–689.

HADI, V.; HOTARD, M.; LING, T.; SALINAS, Y. G.; PALACIOS, G.; CONNELLY, M.; RIVAS, F. Evaluation of *Jatropha isabelli* natural products and their synthetic analogs as potential antimalarial therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 65, 2013: p. 376-380.

HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO, J. S.; BIGHETTI, E. J. B.; GRASSI-KASSISSE, D. M.; NUNES, D. S.; SOUZA BRITO, A. R. M. ‘Effect of Essential Oil Obtained from *Croton Cajucara* Benth. on Gastric Ulcer Healing and Protective Factors of the Gastric Mucosa.’, *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 9, 2002: p. 523–29.

HUNJAA, C.W.; UNGER, H.; FERREIRAE, P.E.; RICHARD, L.; SHEILA, M.; RASHID, A.; CLAIRE, A.; TOSHIHIRO M.; RICHARD, C. Travellers as sentinels: Assaying the

worldwide distribution of polymorphisms associated with artemisinin combination therapy resistance in *Plasmodium falciparum* using malaria cases imported into Scotland. *International Journal for Parasitology*, 43, 2013: p. 885-889.

ICHIARA, Y.; TAKEYA, K.; HITOTSUYANAGI, Y.; MORITA, H.; OKUYAMA, S.; SUGANUMA, M.; FUJIKI, H.; MOTILLOME, M.; ITOKA, W. A. H. Cajucarinolide and iso-cajucarinolide: antiinflammatory diterpenes from *Croton cajucara*. *Planta Medica*, 58(6), 1992: p. 549-51.

ITOKAWA, H.; ICHIHARA, Y.; KOJIMA, H.; WATANABE, K.; TAKEYA, K. 'Nor-clerodane diterpenes from croton', *Phytochemistry*, 28, 1989: 1667-1669.

ITOKAWA, H.; ICHIHARA, Y.; SHIMIZU, M.; TAKEYA, K.; MOTIDOME, M. 'Cajucarins A and B, New Clerodanes from Croton Cajucara, and Their Conformations', *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 1990: 701-705.

JUSSIEU, A. L. Genera plantarum. *Herissant & Barrois, Paris*. 1789.

KAUR, K.; JAIN, M.; KAUR, T.; JAIN, R. Antimalarials from nature. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 2009: 3229-3256.

KIJOA, A., GIESBRECHT, A. M., AKISUE, M. K. GOTLLIEB, O. R. 4-neroldylcatechol from Pothomorphe. *Planta Medica*, v.39, 1980: p.85-87.

KUBO, I.; ASAKA, Y. 'Insect growth inhibitory nor-diterpenes , dehydrocrotonin and trans-dehydrocrotonin , from', *Phytochemistry*, 30, 1991: 2545-46.

LIMA, R. B. S.; ROCHA-SILVA, L. F.; MELO, M. R. S.; COSTA, J. S.; LIMA, E. S.; VASCONCELLOS, M. C.; AMORIM, R. C. N.; CHAVES, F. C. M.; COUTINHO, J. P.; KRETTLI, A. U.; TADEI, W. P.; POHLIT, A. M.. *In vitro* and *in vivo* anti-malarial activity of extracts of Amazonian plants used to treat malaria and its symptoms. *Malaria Jornal*, 14, 2015: p. 508.

LOIOLA, C. C. P.; SILVA, C. J. M.; TAUILL, P. L. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. *Revista Panamericana de Salud Pública/ Pan American Journal of Public Health*, v. 11, n. 4, 2002: p. 235-243.

LUZ, T.C.B.; SUÁREZ-MUTISB, M.C.; MIRANDAC, E.S.; MORITZD, A.F.E.; FREITASD, L.F.; BRASILE, J.C.; OSORIO-DE-CASTRO, C.G.S. Uncomplicated malaria among pregnant women in the Brazilian Amazon: Local barriers to prompt and effective case management. *Acta Tropica*, 125, 2013:137-142.

MACHADO, P.; MENDES, C.; ROSÁRIO, V.E.; AREZ, A.P. A contribuição dos polimorfismos humanos do eritrócito na proteção contra a malária. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 2010, 1(4).

MACIEL, M.A.M.; ANJOS, G.C.; GOMES, F.E.S.; DANTAS, T.N.C.; PINTO, A. C.; KAISER, C. R.; MIRANDA, A.F.; ECHEVARRIA, A. Estudo fitoquímico de folhas de *Croton cajucara* Benth e determinação da sua propriedade antioxidante. *Revista Fitos*, v. 4, n. 2, 2009, p. 71-89.

- MACIEL, M. A. M; PINTO, A. C.; ARRUDA, A. C.; PAMPLONA, S. G. S. R.; VANDERLINDE, F. A.; LAPA, A. J. and others, 'Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology: A Successful Combination in the Study of *Croton cajucara*', *Journal of Ethnopharmacology*, 70 2000: 41–55
- MACIEL, M. A. M; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. 'Plantas Mediciniais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares', *Quimica Nova*, 25, 2002: 429–438.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; BRABO, S.N.; DA SILVA, M.N. Terpenoides from *Croton cajucara*. *Phytochemistry*, 1998, 49(3):823-8.
- MACIEL, M. A. M; PINTO, A. C.; KAISER, C. R.; 'Spectral Assignments and Reference Data NMR and Structure Review of Some Natural Furoclerodanes', *magnetic resonance in chemistry*, 41, 2003b: 278–282.
- MACKINNON, M.J. Drug resistance models for malaria. *Acta Tropica*, 94, (3):207-17, 2005.
- MAI, L. H.; CHABOT, G. G.; GRELLIER, P.; QUENTIN, L.; DUMONTET, V.; POULAIN, C.; ESPINDOLA, L. S.; MICHEL, S.; VO, H. T. B.; DEGUIN, B.; GROUGNET, R. Antivascular and anti-parasite activities of natural and hemisynthetic flavonoids from New Caledonian *Gardenia* species (Rubiaceae). *European Journal of Medicinal Chemistry*, 93, 2015: 93-100.
- MESIA, G.K.; TONA, G.L.; PENGE, O.; LUSAKIBANZA, M.; NANGA, T.M.; CIMANGA, R.K.; APERS, S.; VAN-MIERT, S.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J. Antimalarial activities and toxicities of three plants used as traditional remedies for malaria in the Democratic Republic of Congo: *Croton mubango*, *Nauclea pobeguinii* and *Pyrenacantha staudtii*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 2005, (99) :345.
- MOHAMMED, T.; ERKO, B.; GIDAY, M. Evaluation of antimalarial activity of leaves of *Acokanthera schimperi* and *Croton macrostachyus* against *Plasmodium berghei* in Swiss albino mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2014, (14) :314.
- MUTHAURA, C. N.; RUKUNGA, G. M.; CHHABRA, S. C.; OMAR, S. A.; GUANTAI, A. N.; GATHIRWA, J. W.; TOLO, F. M.; MWITARI, P. G.; KETER, L. K.; KIRIRA, P. G.; KIMANI, C. W.; MUNGAI, G. M.; NJAGI, E. N. M. Antimalarial activity of some plants traditionally used in treatment of malaria in Kwale district of Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, (112), 2007: 545–551.
- NOEDL, H.; SE, Y.; SCHAECHER, K.; SMITH, B.L.; SOCHEAT, D.; FUKUDA, M.M. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *New England Journal of Medicine*, 2008, 359:2619-2620.
- OCHIENG, C. O.; MANGURO, L. A. O.; OWUOR, P. O.; AKALA, H. Voulkensin C–E, new 11-oxocassane-type diterpenoids and steroid glycoside from *Caesalpinia volkensii* stem bark and their antiplasmodial activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 23 2013: 3088–3095.

ODONNE, G.; VALADEAU, C.L.; ALBAN-CASTILLO, J.; STIEN, D.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G. Medicaethnobotany of the Chayahuita of the Parapapua basin (Peruvian Amazon). *Journal of Ethnopharmacology*, 2013, 146:127-153.

OKOKON, J.E.; NWAFOR, P.A. Antiplasmodial activity of root extract and fractions of *Croton zambesicus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 121:74–78.

PADDON, C.J.; KEASLING, J.D. Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12: 355-367.

PERAZZO, FABIO F, JOSÉ CARLOS T CARVALHO, MARCELO RODRIGUES, ELLEN KADJA L MORAIS, MARIA APARECIDA M MACIEL, FABIO F PERAZZO, and others, 'Artigo Terpenoids and an Aqueous Extract Obtained from *Croton cajucara*'. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17 2007: 521–528.

PETERS, W. Drug resistance in *Plasmodium berghei* Vincke and Lips, 1948. I. Chloroquine resistance. *Experimental Parasitology*, 1965, 17:80-89.

PHYO, A.P.; NKHOMA, S.; K. STEPNIEWSKA, E.A. ASHLEY, S. NAIR, R. MCGREADY, C.L. MOO, S. AL-SAAI, A.M. DONDORP, K.M. LWIN, P. SINGHASIVANON, N.P. DAY, N.J. WHITE, T.J. ANDERSON, F. NOSTEN. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Lancet*, 2012, 6736: 1-7.

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

RUKUNGA, G. M.; GATHIRWA, J. W.; OMAR, S. A.; MUREGI, F. W.; MUTHAURA, C. N.; KIRIRA, P. G.; MUNGAI, G. M.; KOFI-TSEKPO, W. M. Kenya Anti-plasmodial activity of the extracts of some Kenyan medicinal plants Medical Research Institute. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 121(2):282-5.

SALATINO, A.; FARIA-SALATINO, M. L.; NEGRI, G.; 'Traditional Uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* Species (Euphorbiaceae)', *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18 2007: 11–33.

SAN GIL, R. A. S.; ALBUQUERQUE, M. G.; ALENCASTRO, R. B.; PINTO, A. C.; GOMES, F. E. S.; DANTAS, T. N. C. Solid-State ¹³C NMR and Molecular Modeling Studies of Acetyl Aleuritolic Acid Obtained from *Croton cajucara* Benth. *Journal of Molecular Structure*, 885 2008: 82–88.

SANTOS, F. V.; MESQUITA, S. F. P.; FARIA, M. J. S. S.; POERSH, A.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. Absence of Mutagenicity in Somatic and Germ Cells of Mice Submitted to Subchronic Treatment with an Extract of *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae). *Genetics and Molecular Biology*, 29 2006: 159–65.

SCHWIKKARD, S.; HEERDEN, F.R. Antimalarial activity of plant metabolites. *Natural Product Reports*, 2002, (19):675- 692.

SECCO, R.S. Produtos naturais: alternativa segura? *Ciência e Cultura*, 1990, 42 (10):807-10.

SILVA, R. M.; OLIVEIRA, F. A.; CUNHA, K. M. A.; MAIA, J. L.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. 'Cardiovascular Effects of Trans-Dehydrocrotonin, a Diterpene from *Croton cajucara* in Rats'. *Vascular Pharmacology*, 43 2005b: 11–18.

SILVA, T.H.A.; OLIVEIRA, M.T.; SANTOS, H.F.; OLIVEIRA, A.B.; LMEIDA, W.B. Molecular modeling study of complexes between ferriprotoporphyrin IX and antimalarial 4-quinolinecarbinolamines: a proposal of pharmacophore. *Química Nova*, 2005a: 28(2).

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. Espectrometria de Massas, p. 15. In: SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7a ed., LTC - *Livros Técnicos e Científicos*, Editora S.A., RJ, Brasil. 2007.

SOUZA-BRITO, A. R. M.; CARNEIRO, E. M.; GRACIOSO, J. S.; HIRUMA-LIMA, C. A.; DE PAULA A. C. B.; TOMA, W. 'The Antiulcer Effect of *Croton cajucara* Benth in Normoproteic and Malnourished Rats', *International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology.*, 15(10) 2008: 815.

TIEPPO, M.; PORAWSKI, M.; SALVADOR, M.; MOREIRA, A. J.; COLLADO, P. S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; 'Croton cajucara Benth. Leaf Extract Scavenges the Stable Free Radical DPPH and Protects against Oxidative Stress Induced by Paraquat.', *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29 2006: 161–65.

TRAGER, W.; JENSEN, J.B. Human Malaria Parasites in Continuous Culture. *Science*, 1976, (193):673-675.

VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A.M. 'Plantas Mediciniais: Cura Segura?', *Química Nova*, 28, 2005: 519–28

VIEIRA, F.; JAQUELINE, V.; FARIAS, M. J.; FÁTIMA, S.; MESQUITA, P.; MACIEL, M. A. M. 'Mutagenicity and Antimutagenicity of *Croton cajucara*'. *Section Cellular and Molecular Biology*, 2008, 327–31.

WEATHERS, P. J.; TOWLER, M.J. Changes in key constituents of clonally propagated *Artemisia annua* L. during preparation of compressed leaf tablets for possible therapeutic use. *Industrial Crops and Products*, 2014, 62:173-178.

WELLS, T.N.C. Natural products as starting points for future anti-malarial therapies: going back to our roots? *Malaria Journal*, 2011, 10 (Suppl 1):S3.

WHO: Guidelines for the treatment of malaria. *World Health Organization*. 2013.

WHO: World malaria report. Geneva: *World Health Organization*; 2014.

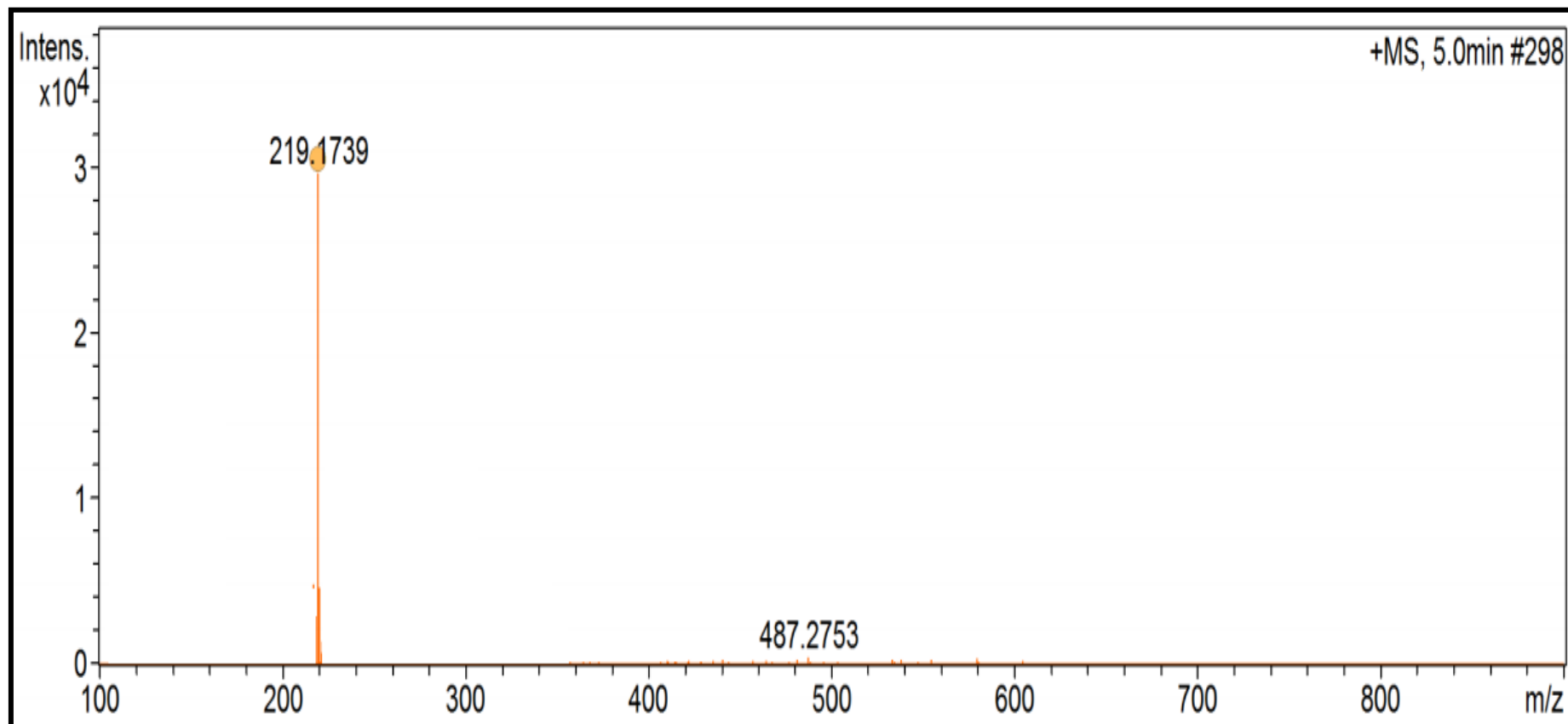
WHO: Guidelines for the treatment of malaria. *World Health Organization*. 2015.

YENJAIA, C.; PRASANPHEN, K.; DAODEE, S.; WONGPANICH, V.; KITTAKOOP, P.
Bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*. *Fitoterapia*. 75 2004: 89–92.

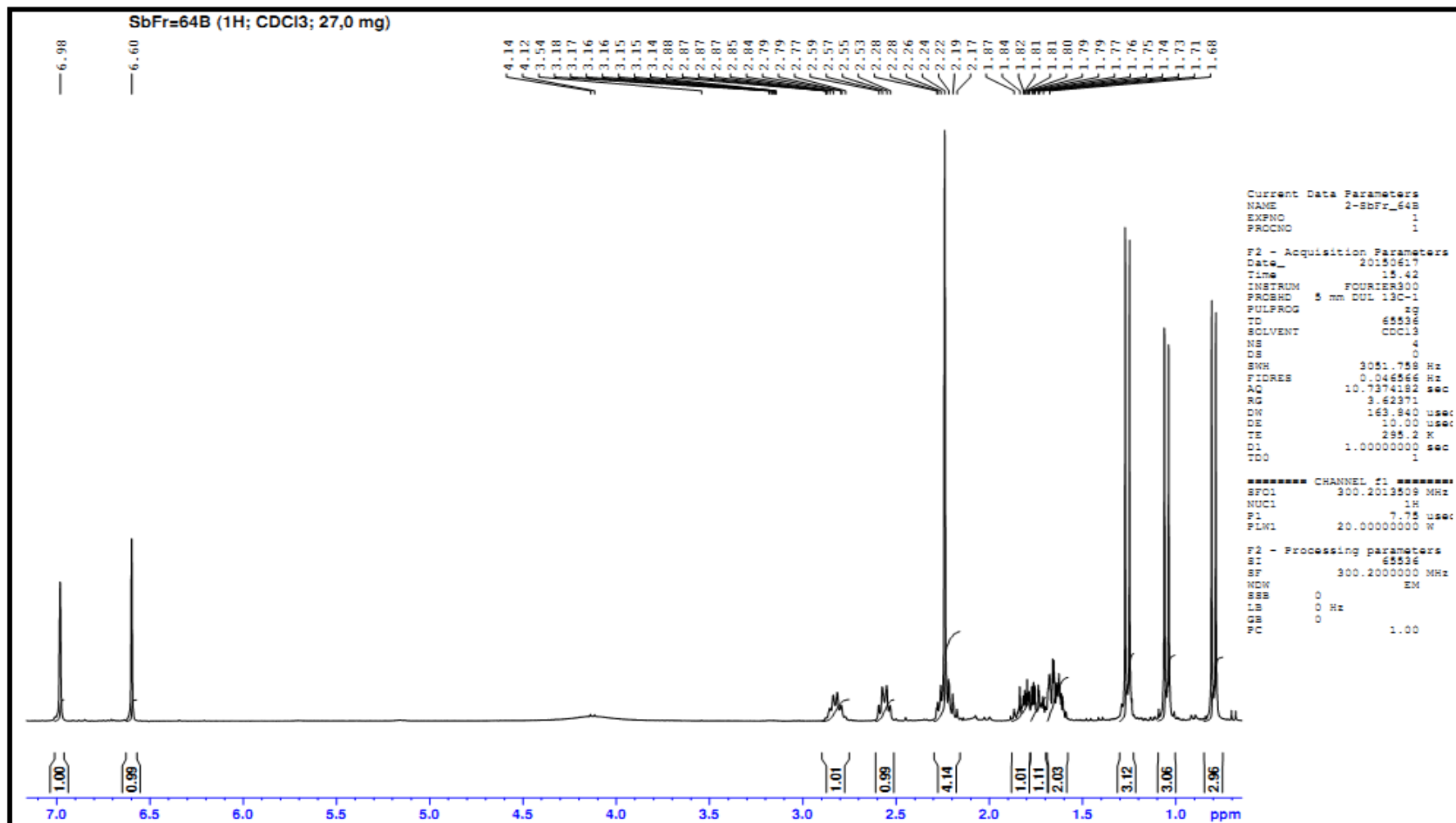
8. ANEXO

ANEXO

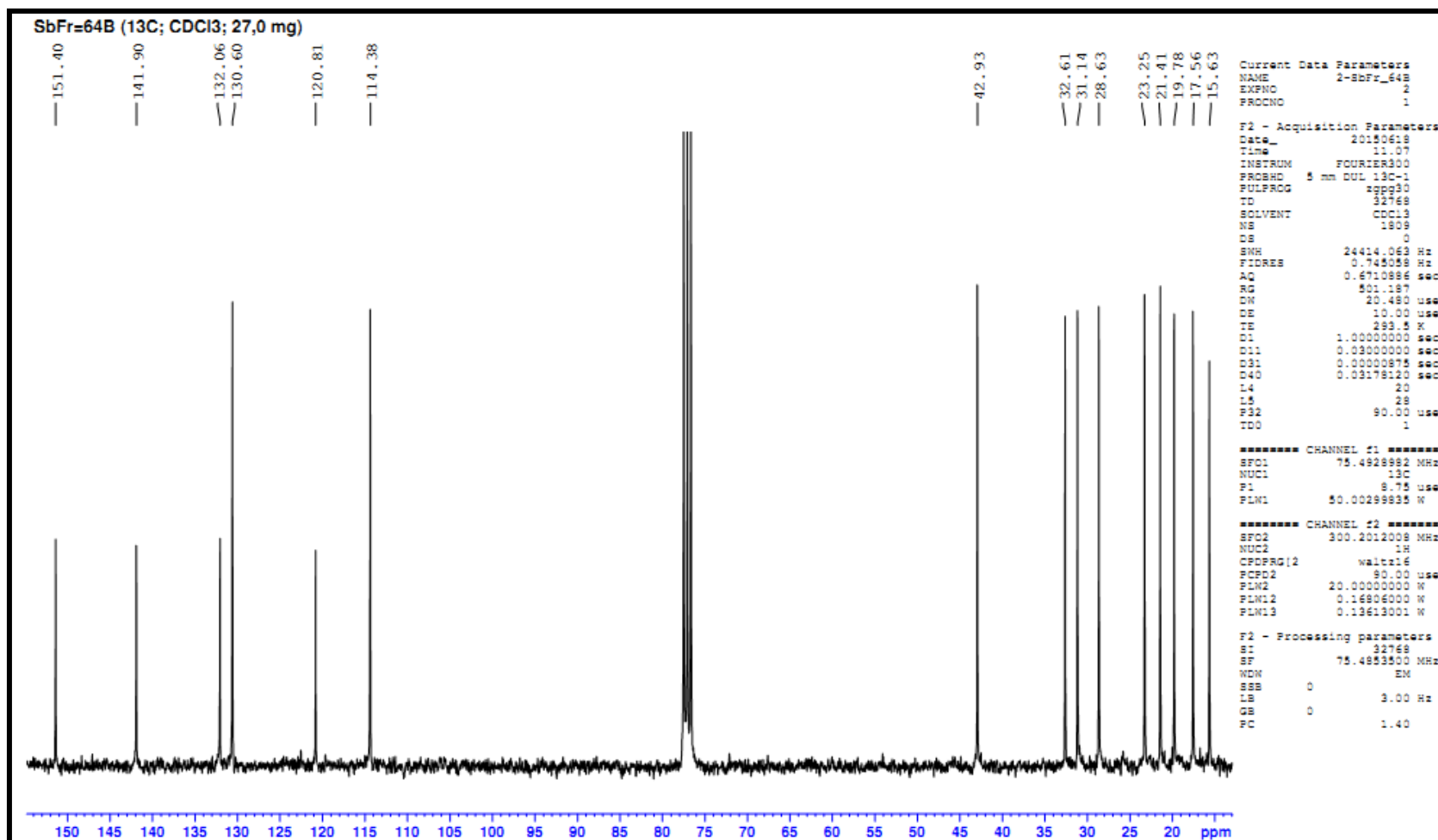
Anexo 1. Espectro de HRMS; $[M+H]^+$ do 7-hidroxicalameneno (composto 1).



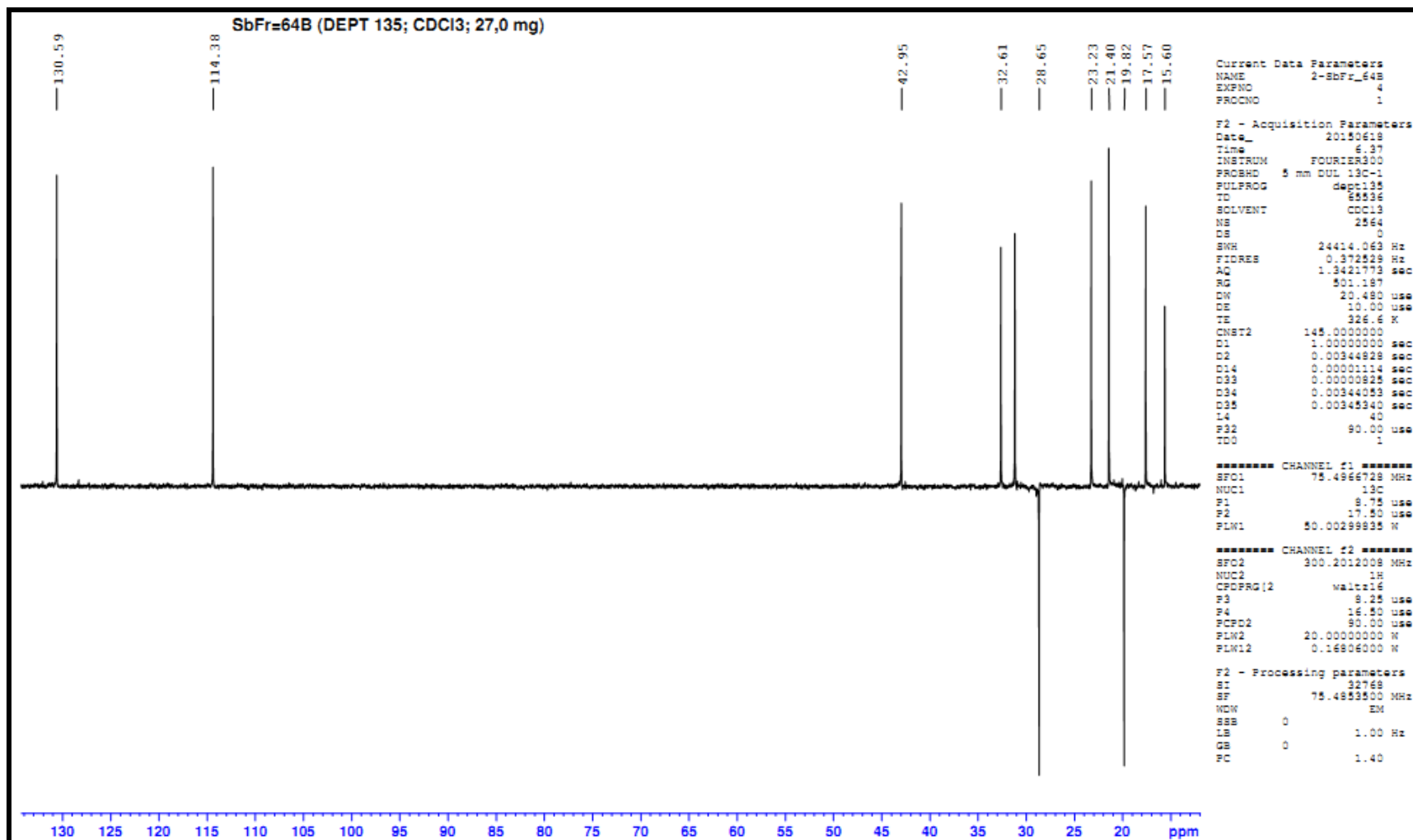
Anexo 2. Espectro de RMN de ^1H do 7-hidroxicalameneno (composto **1**), 300 MHz, CDCl_3



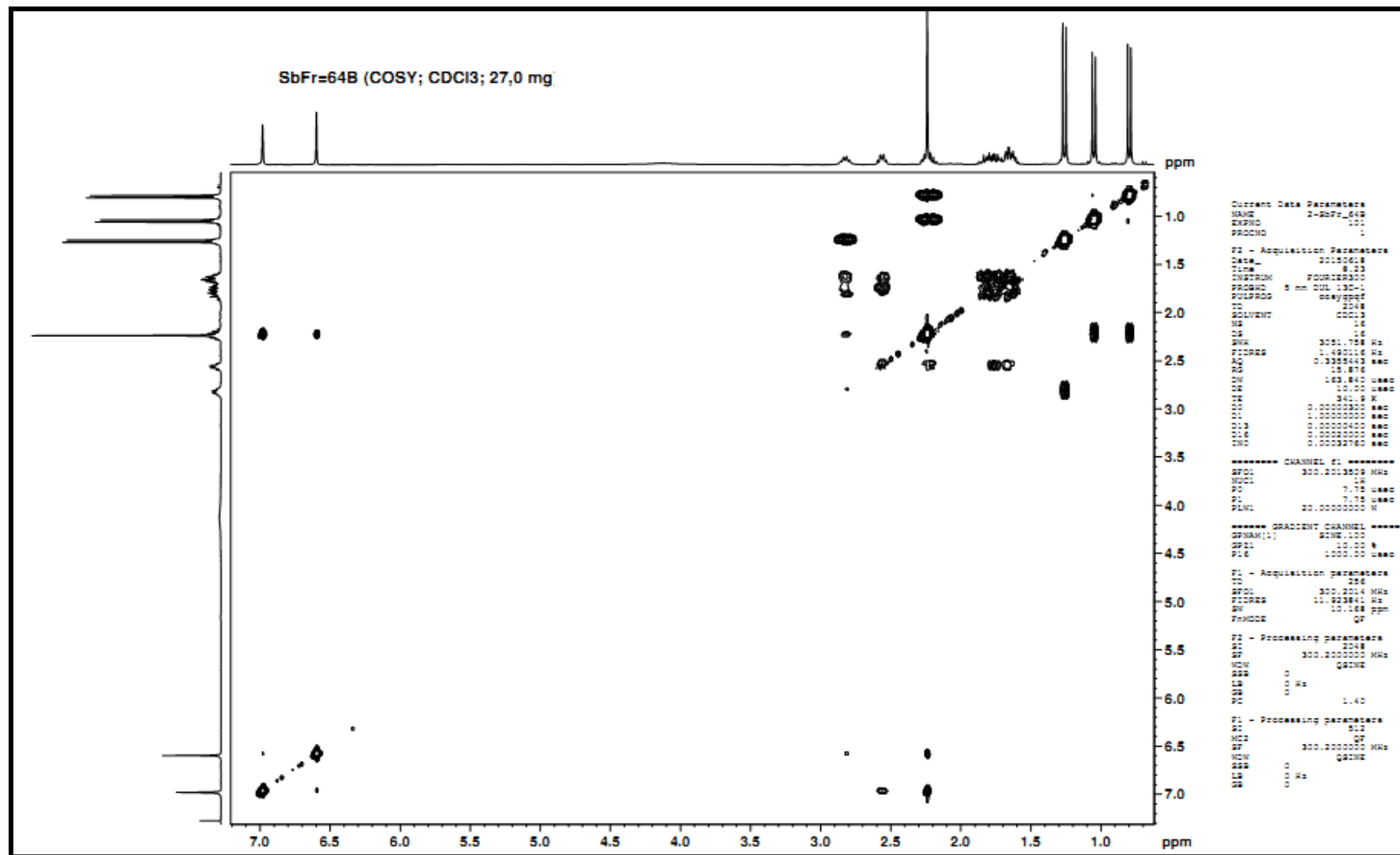
Anexo 3. Espectro de RMN de ^{13}C do 7-hidroxicalameneno (composto **1**), 75 MHz, CDCl_3



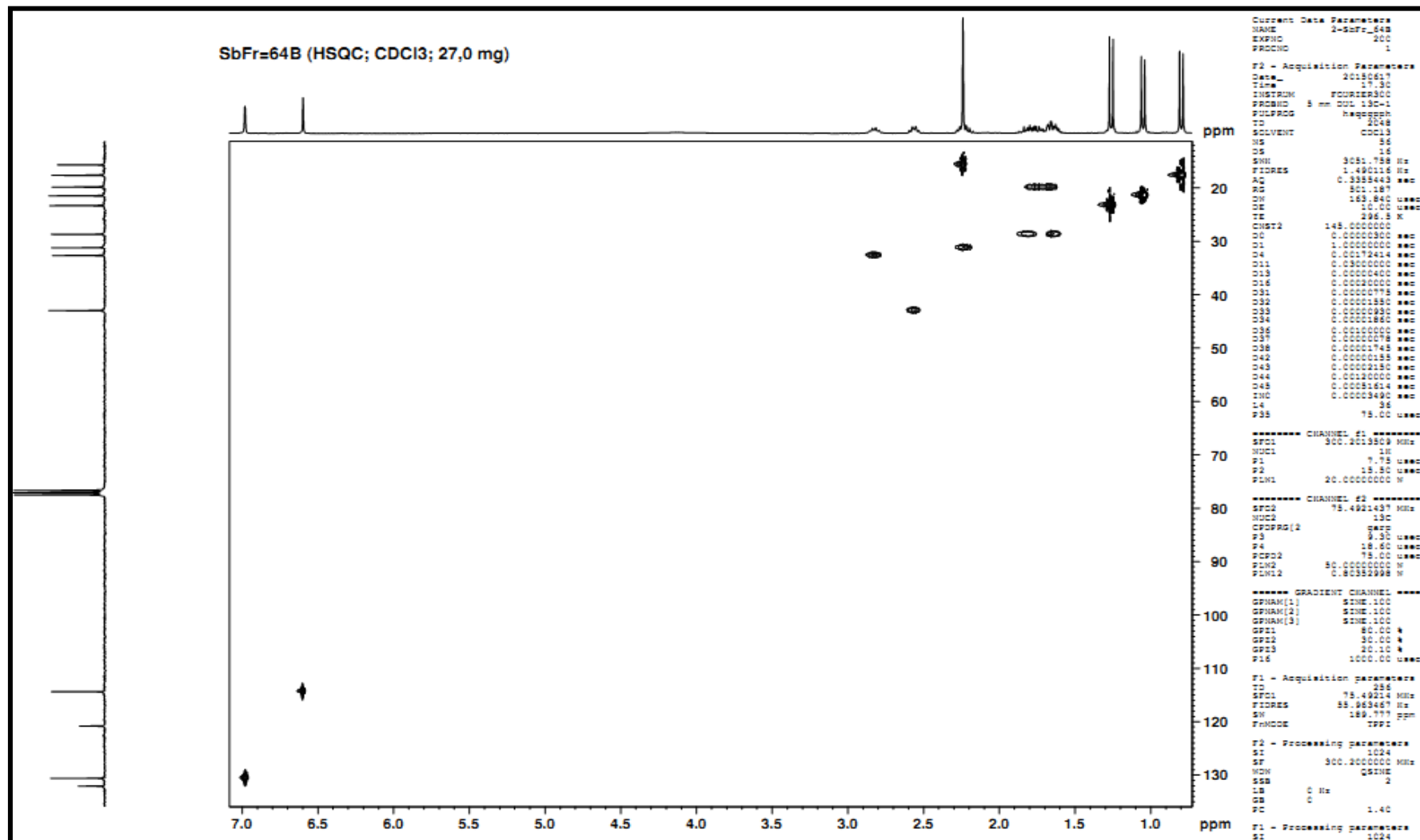
Anexo 4. Espectro de DEPT135 do 7-hidroxicalameneno (composto 1), 75 MHz, CDCl₃



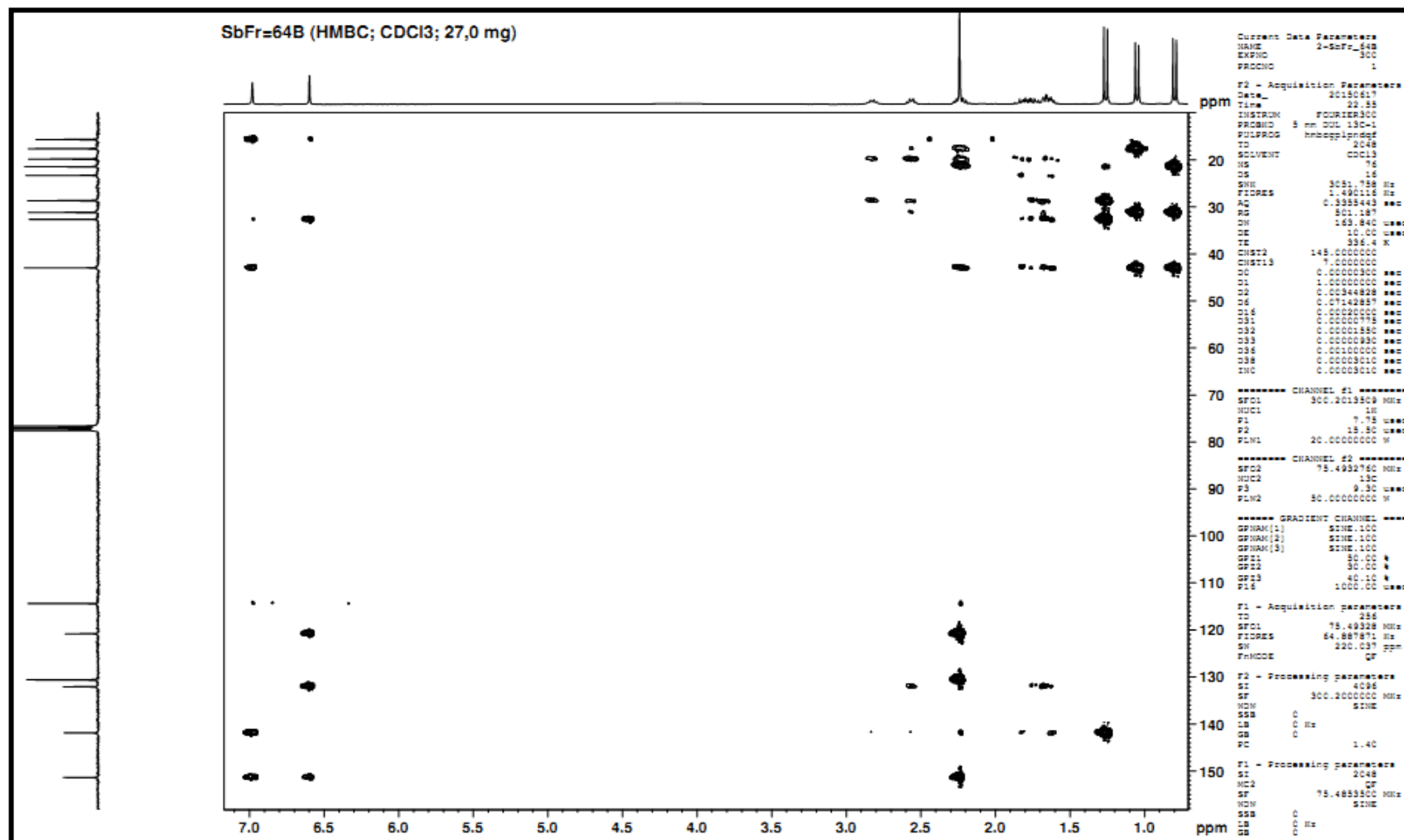
Anexo 5. Espectro de correlação ^1H - ^1H (COSY) do 7-hidroxicalameneno (composto 1), 300 MHz, CDCl_3



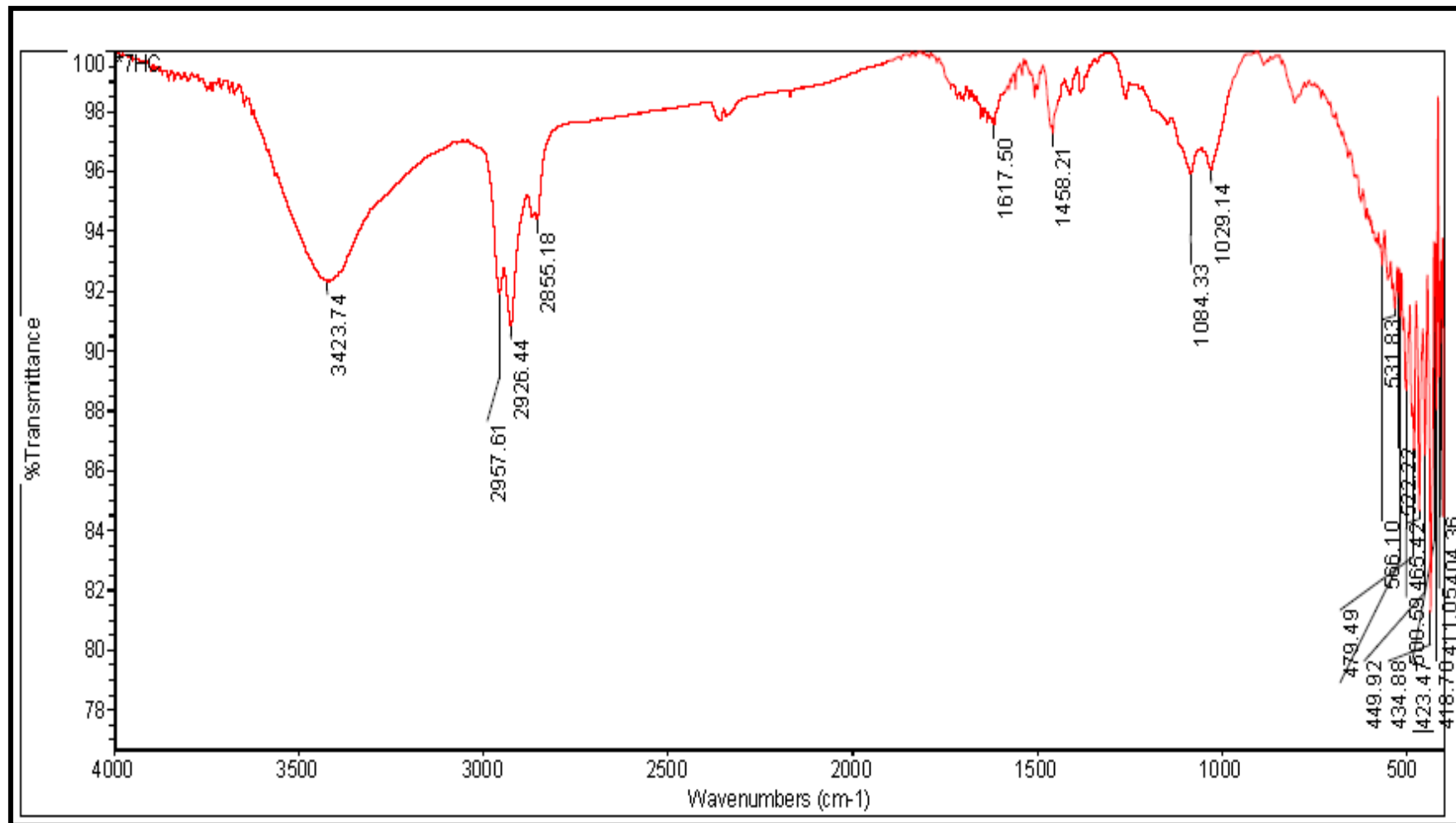
Anexo 6. Espectro de correlação de ^{13}C - ^1H (HSQC) do 7-hidroxicalameneno (composto **1**), em CDCl_3 , ^{13}C : 75 MHz e ^1H : 300 MHz



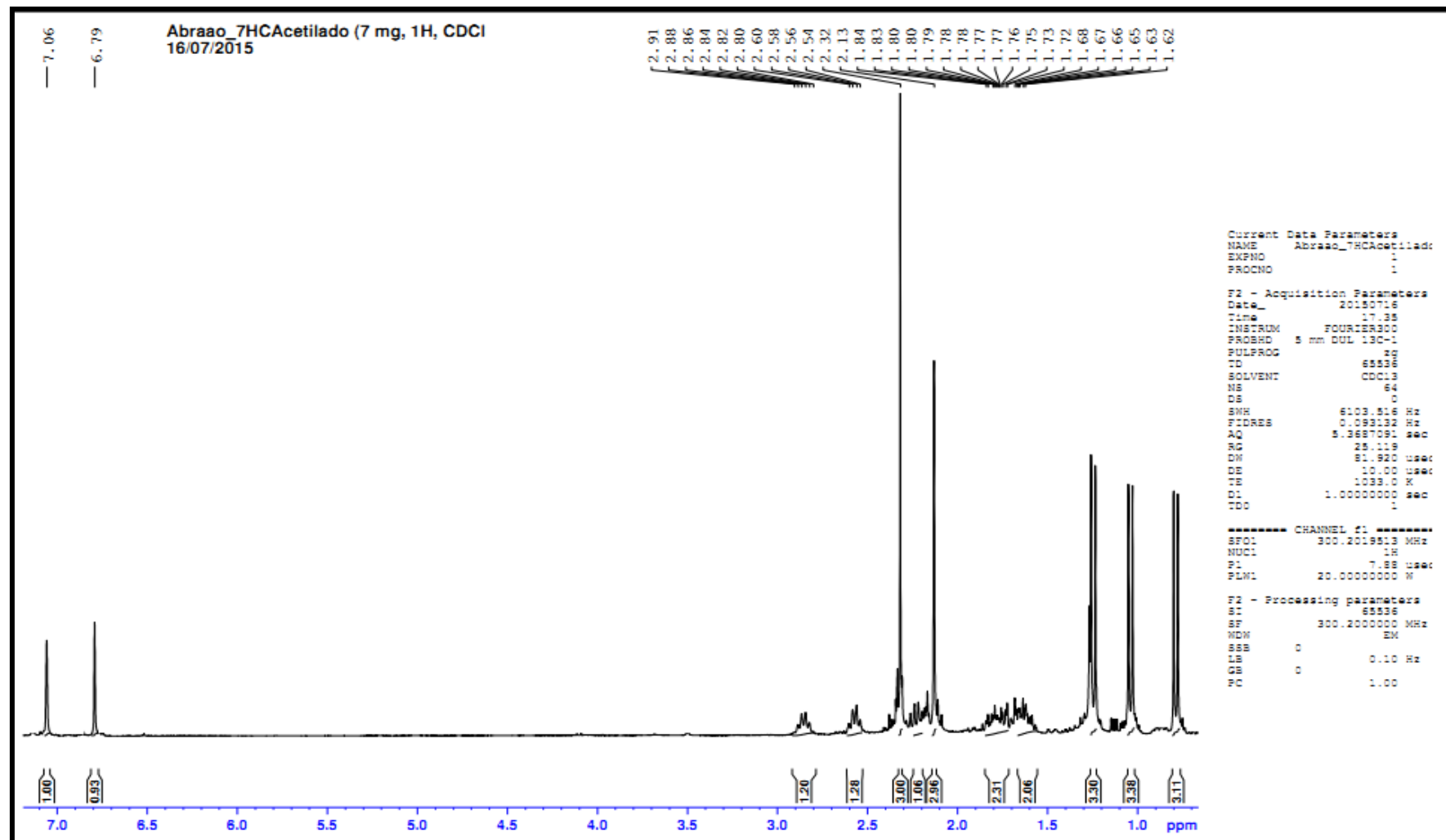
Anexo 7. Espectro de correlação de ^{13}C - ^1H (HMBC) do 7-hidroxicalameneno (composto **1**), em CDCl_3 , ^{13}C : 75 MHz e ^1H : 300 MHz



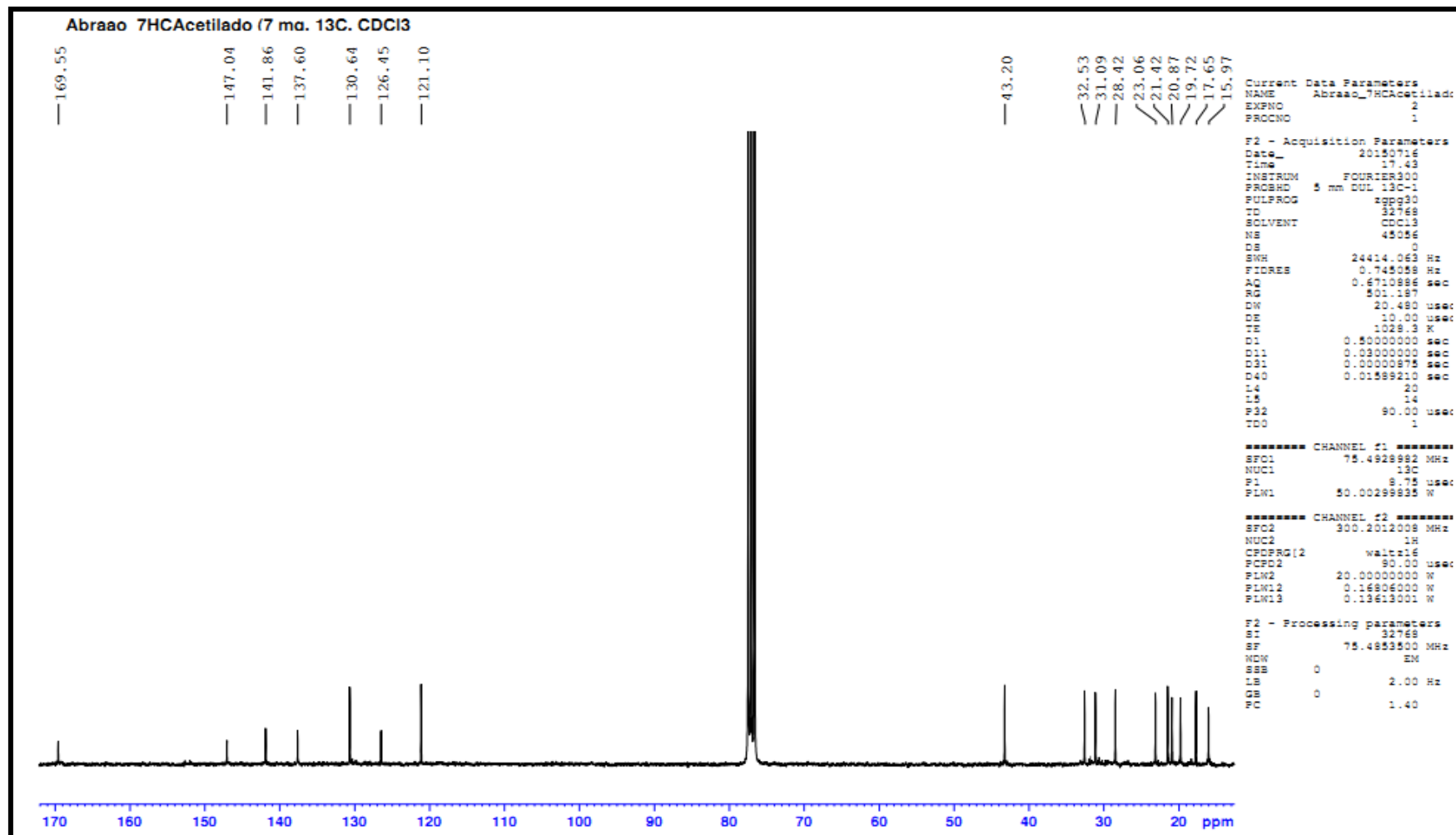
Anexo 8. Espectro de IR do 7-hidroxicalameneno (composto 1).



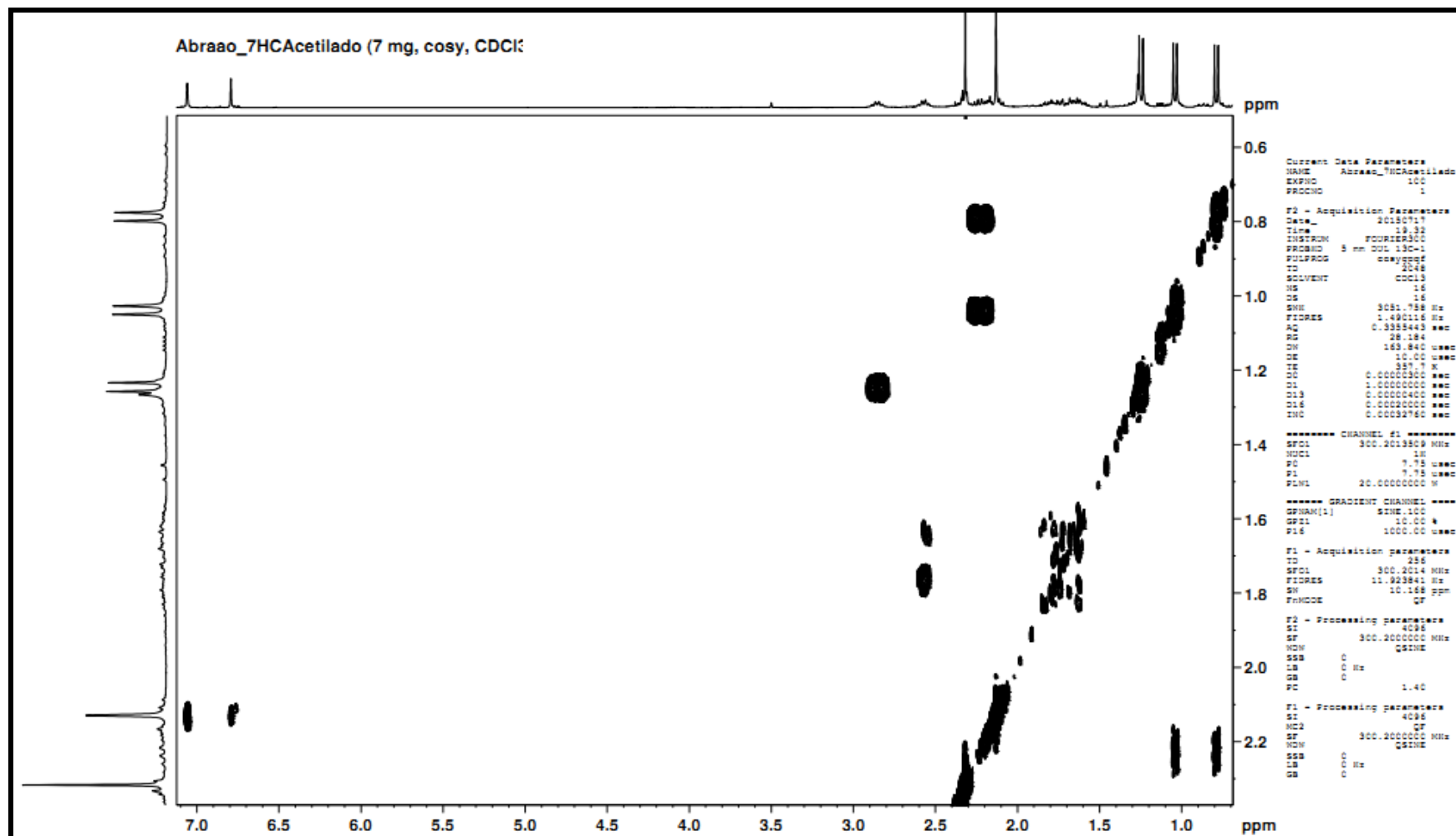
Anexo 9. Espectro de RMN de ^1H do 7-acetilcalameneno (composto 2), 300 MHz, CDCl_3 .



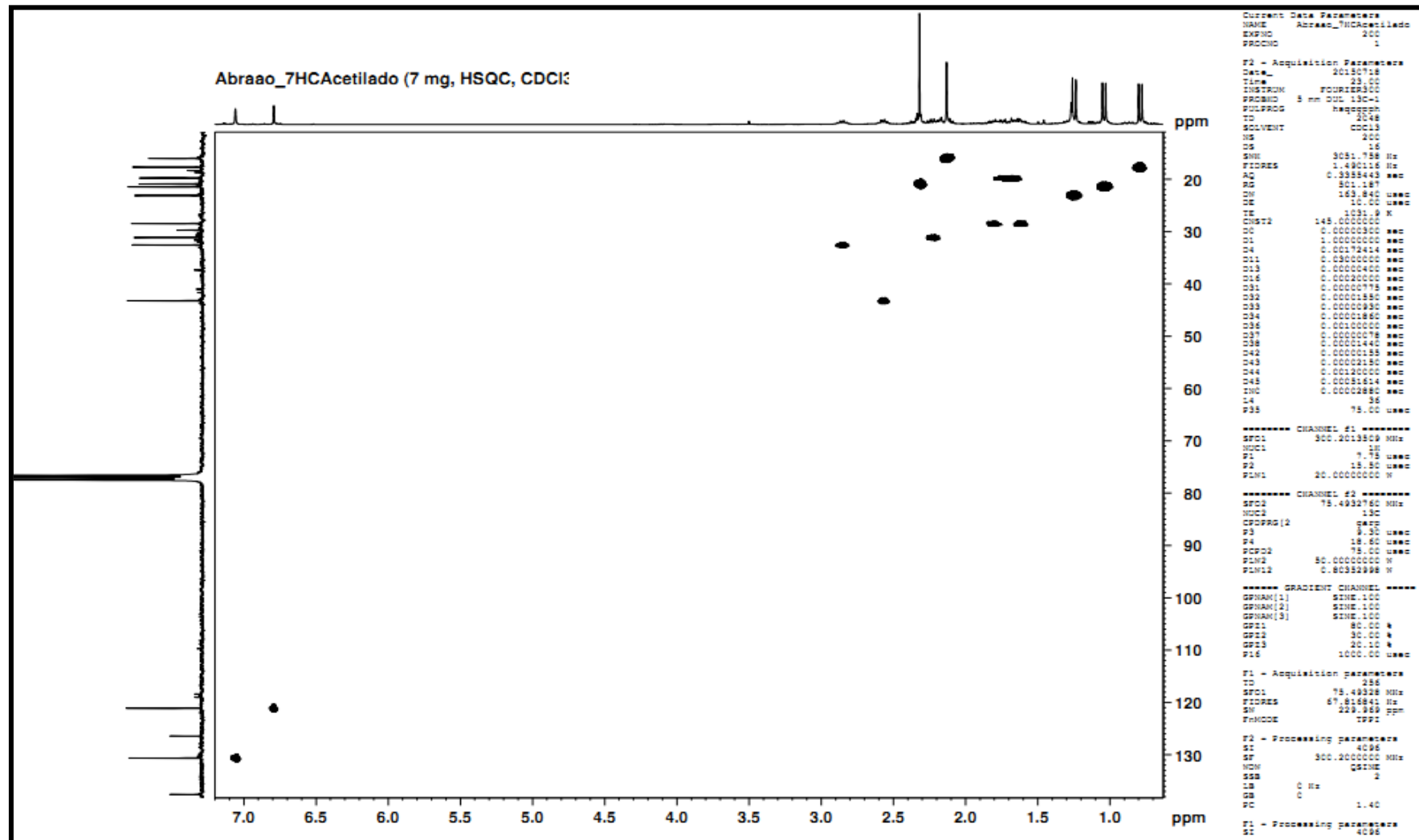
Anexo 10. Espectro de RMN de ^{13}C do 7acetilcalameneno (composto 2), 75 MHz, CDCl_3



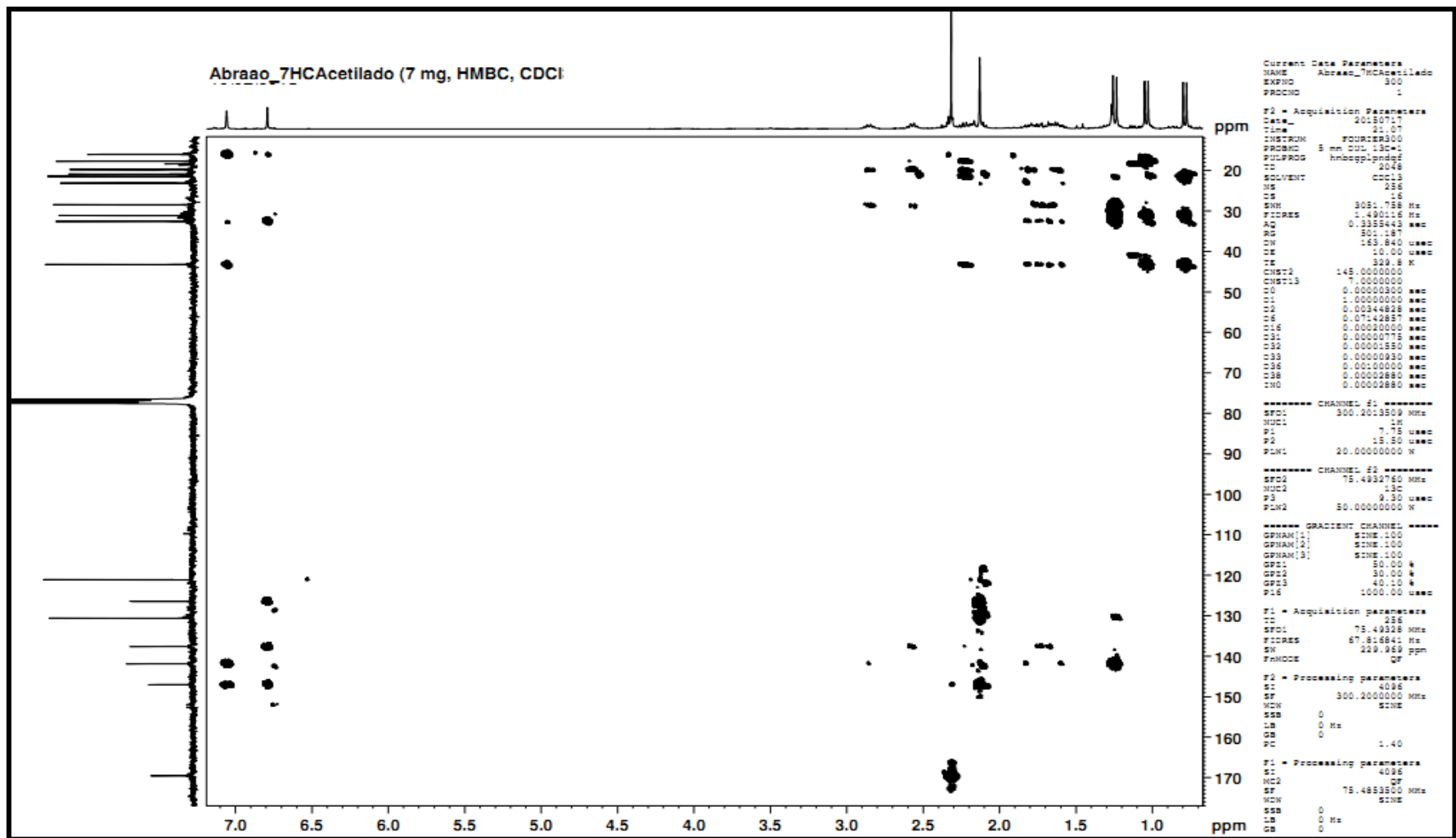
Anexo 11. Espectro de correlação ^1H - ^1H (COSY) do 7-acetilcalameneno (composto 2), 300 MHz, CDCl_3



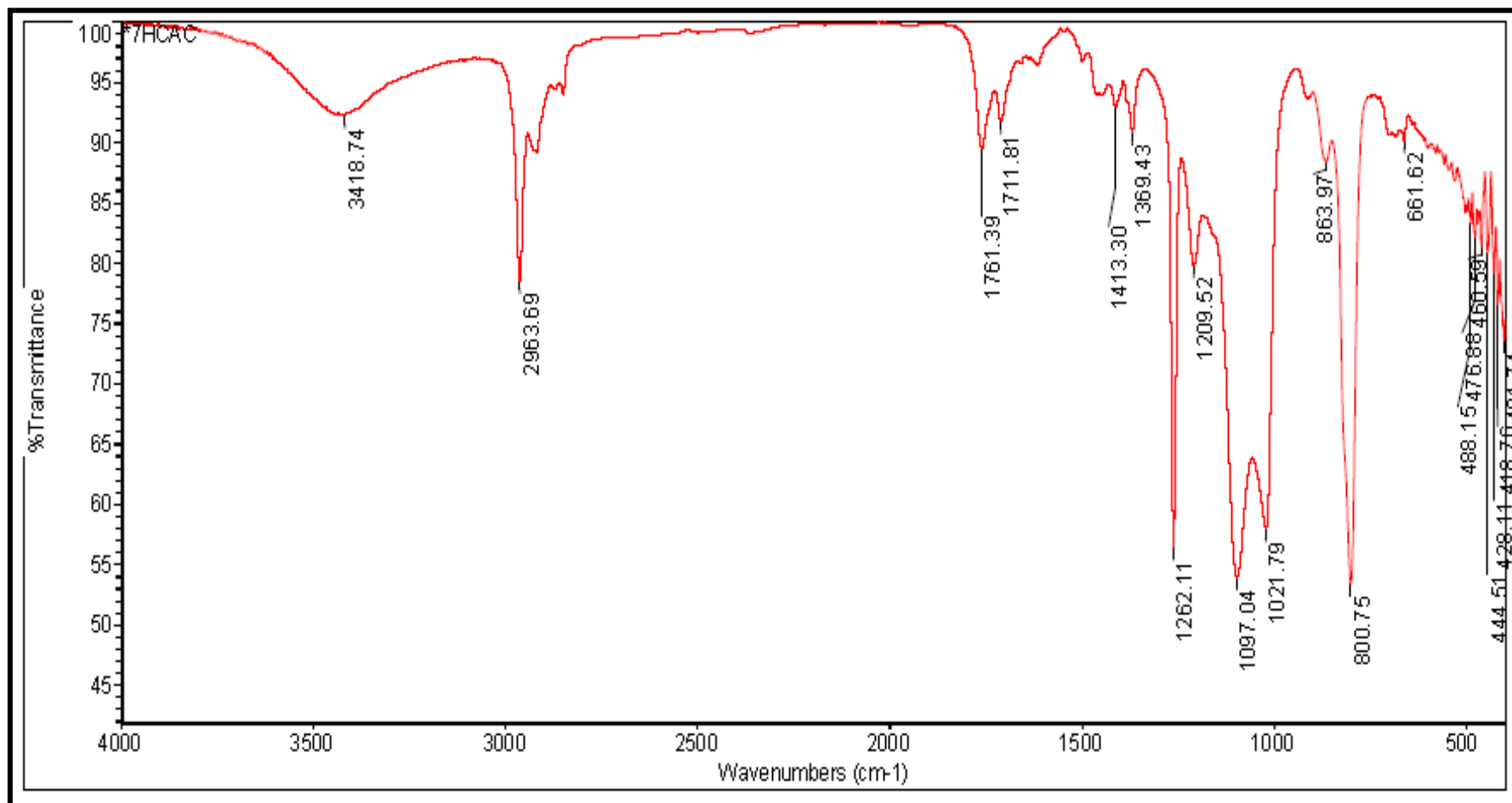
Anexo 12. Espectro de correlação de ^{13}C - ^1H (HSQC) do 7-acetilcalameneno (composto 2), em CDCl_3 , ^{13}C : 75 MHz e ^1H : 300 MHz



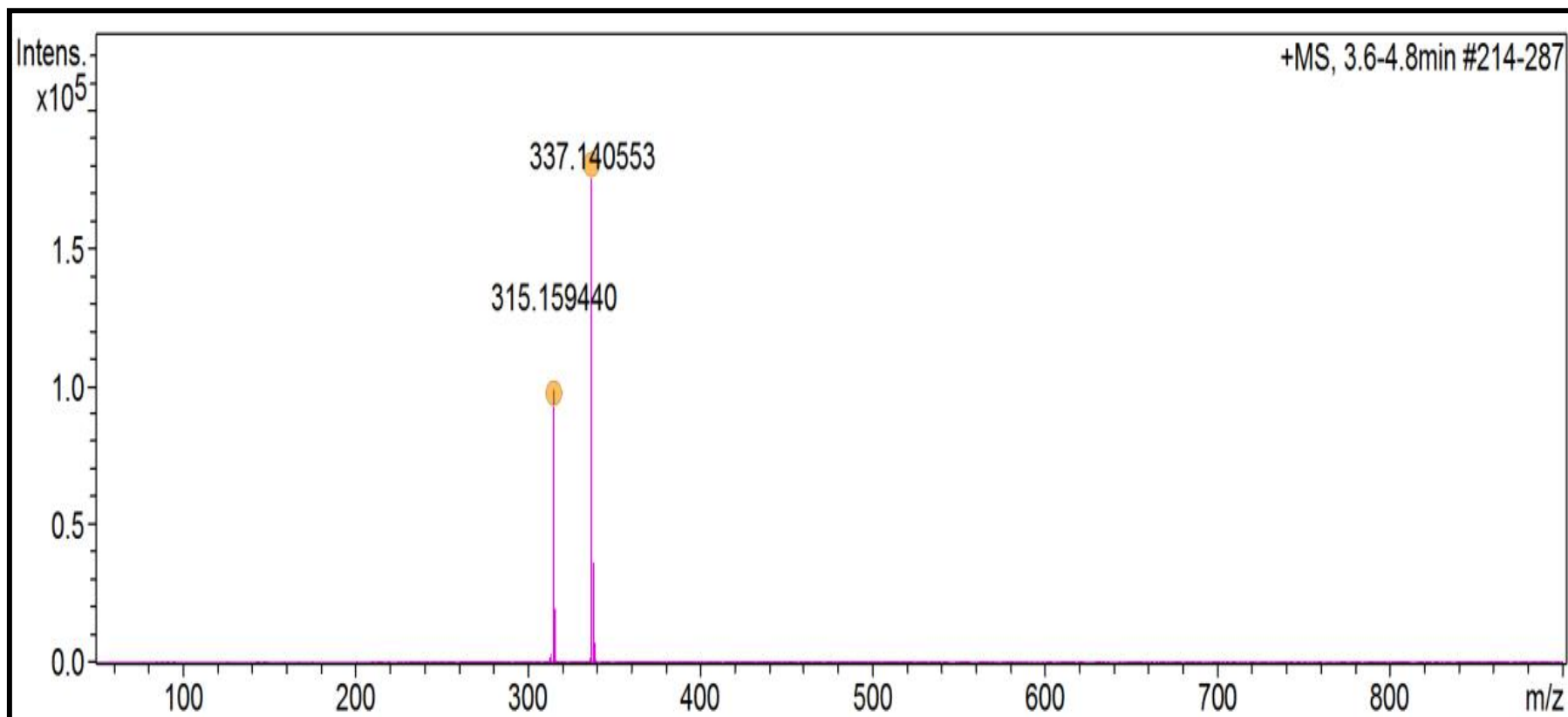
Anexo 13. Espectro de correlação de ^{13}C - ^1H (HMBC) do 7-acetilcalameneno (composto 2), em CDCl_3 , ^{13}C : 75 MHz e ^1H : 300 MHz



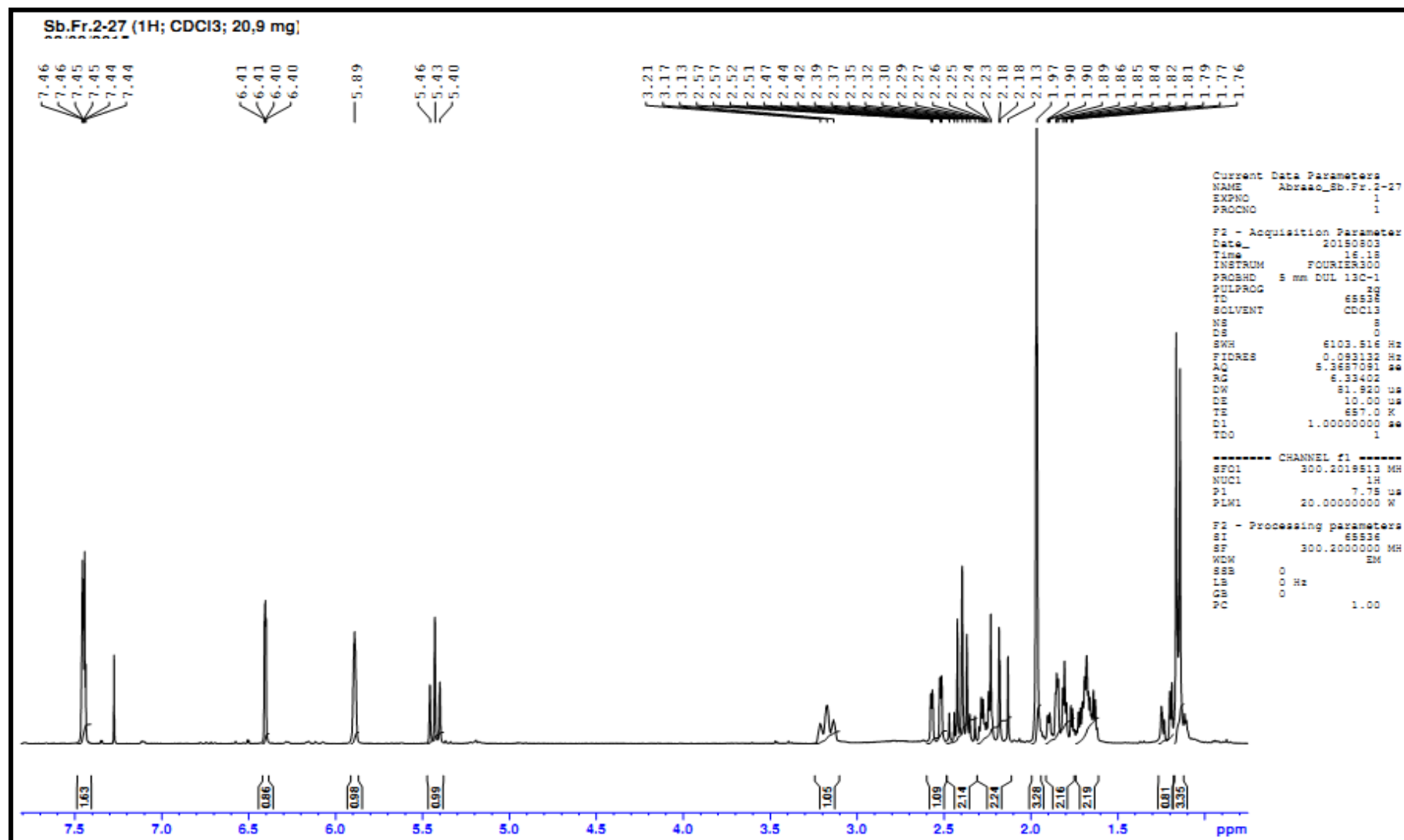
Anexo 14. Espectro de IR do 7-acetilcalameneno (composto 2).



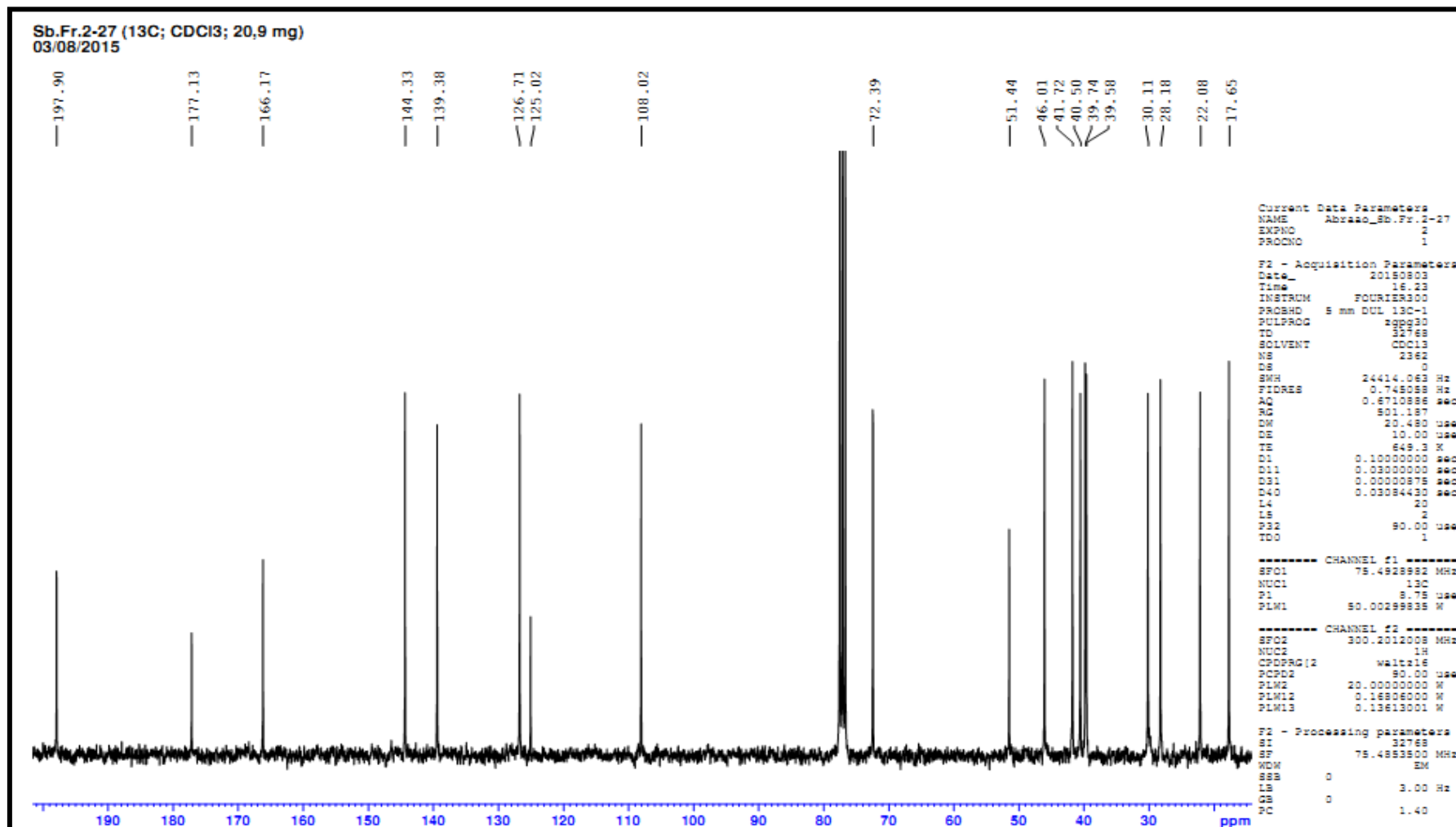
Anexo 15. Espectro de HRMS; $[M+H]^+$ do *trans*-desidrocrotonina composto 3.



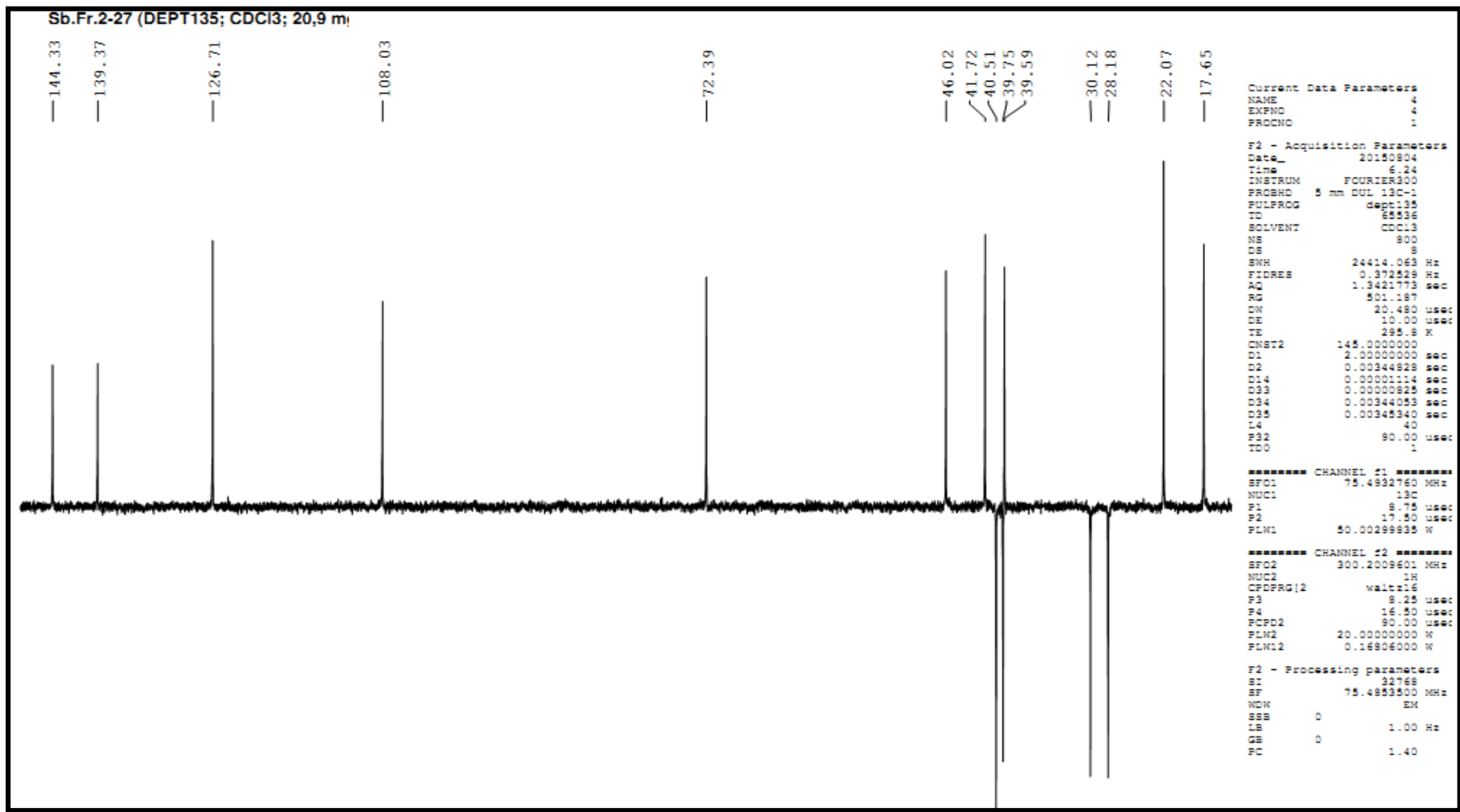
Anexo 16. Espectro de RMN de ^1H do *trans*-desidrocrotonina composto **3**, 300 MHz, CDCl_3



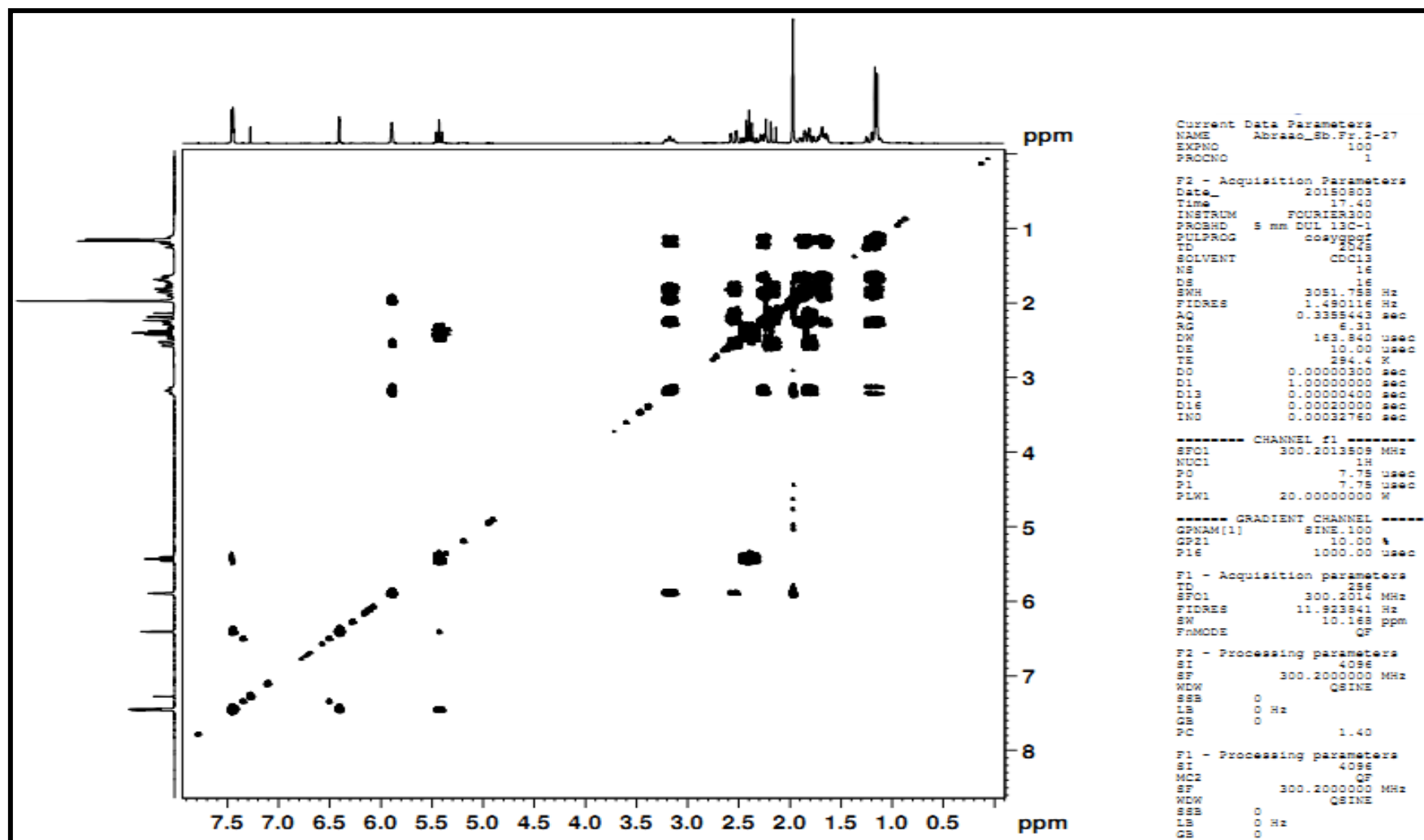
Anexo 17. Espectro de RMN de ^{13}C do *trans*-desidrocrotonina composto **3**, 75 MHz, CDCl_3



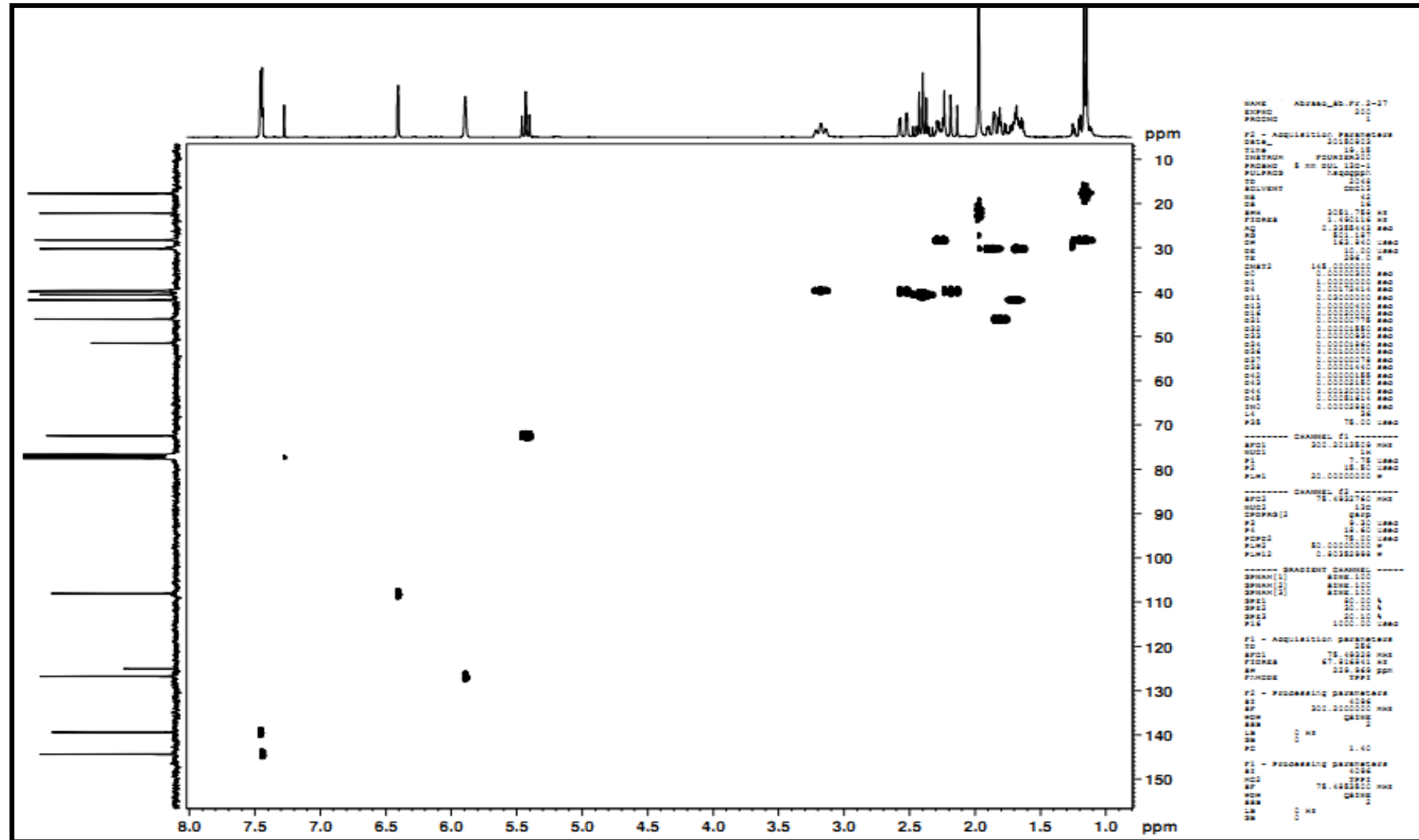
Anexo 18. Espectro de DEPT135 do *trans*-desidrocrotolina composto 3, 75 MHz, CDCl₃



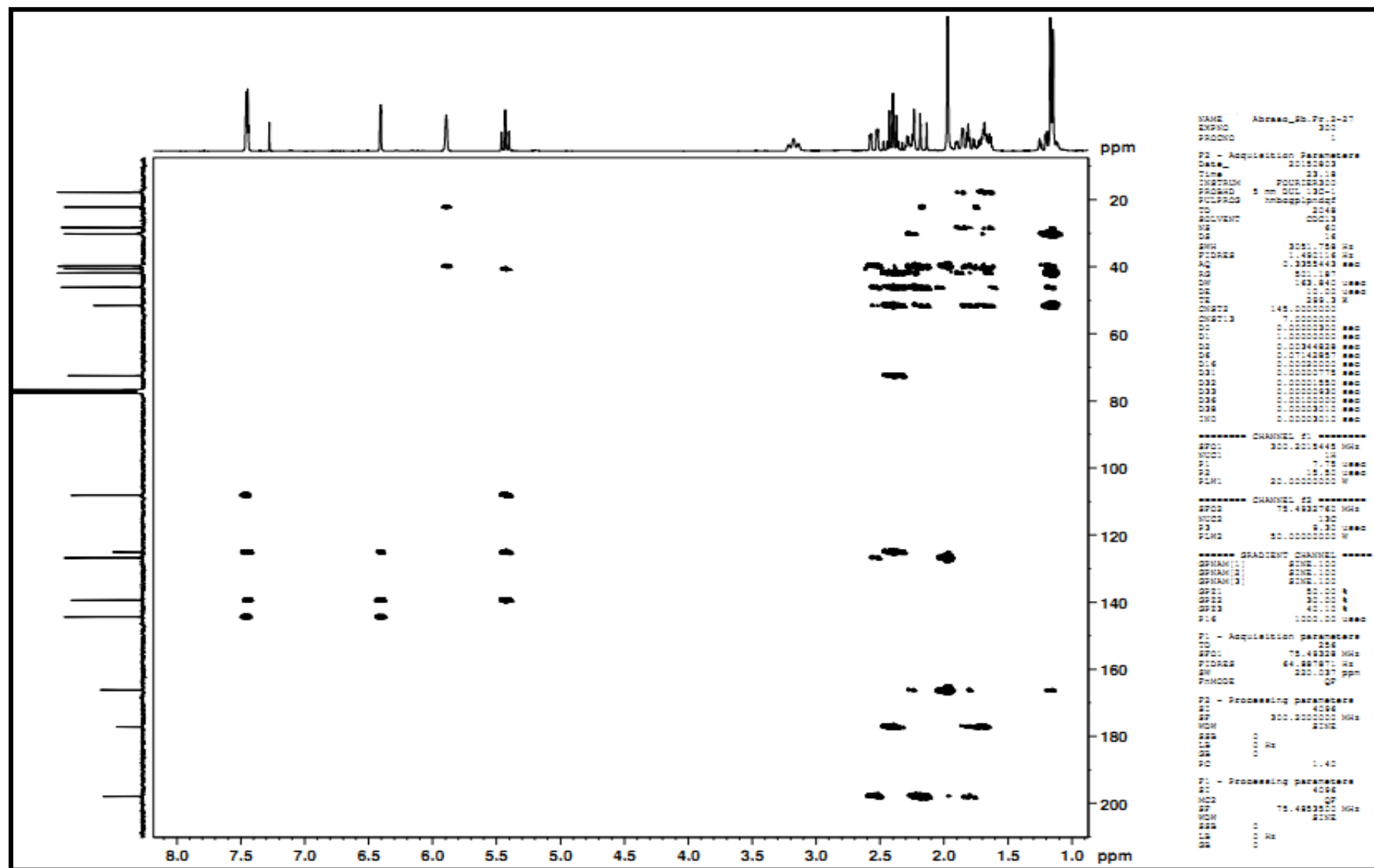
Anexo 19. Espectro de correlação ^1H - ^1H (COSY) do trans-desidrocrotolina composto 3, 300 MHz.



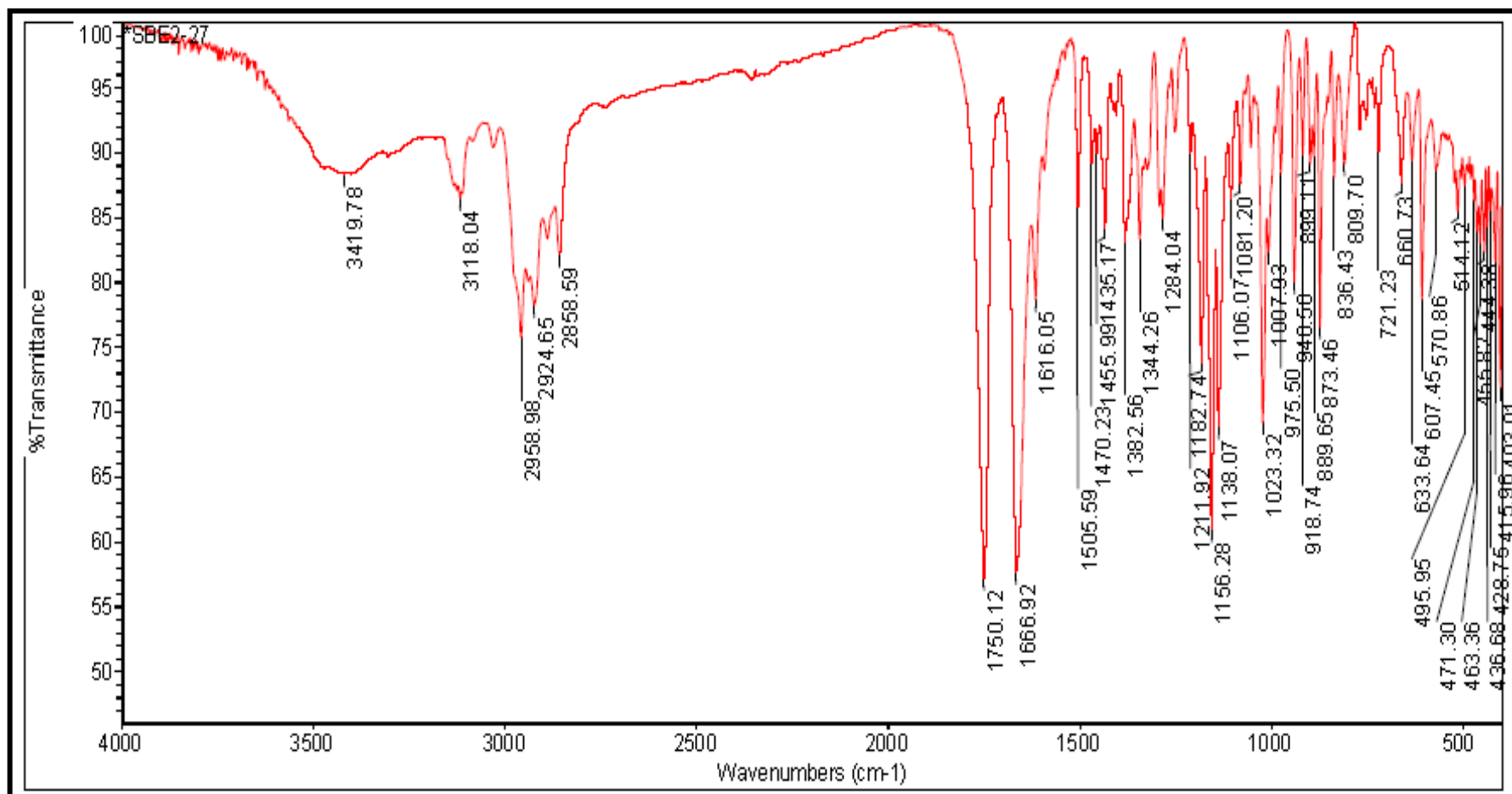
Anexo 20. Espectro de correlação de ^{13}C - ^1H (HSQC) do *trans*-desidrocrotolina composto **3**, em CDCl_3 , ^{13}C : 75 MHz e ^1H : 300 MHz



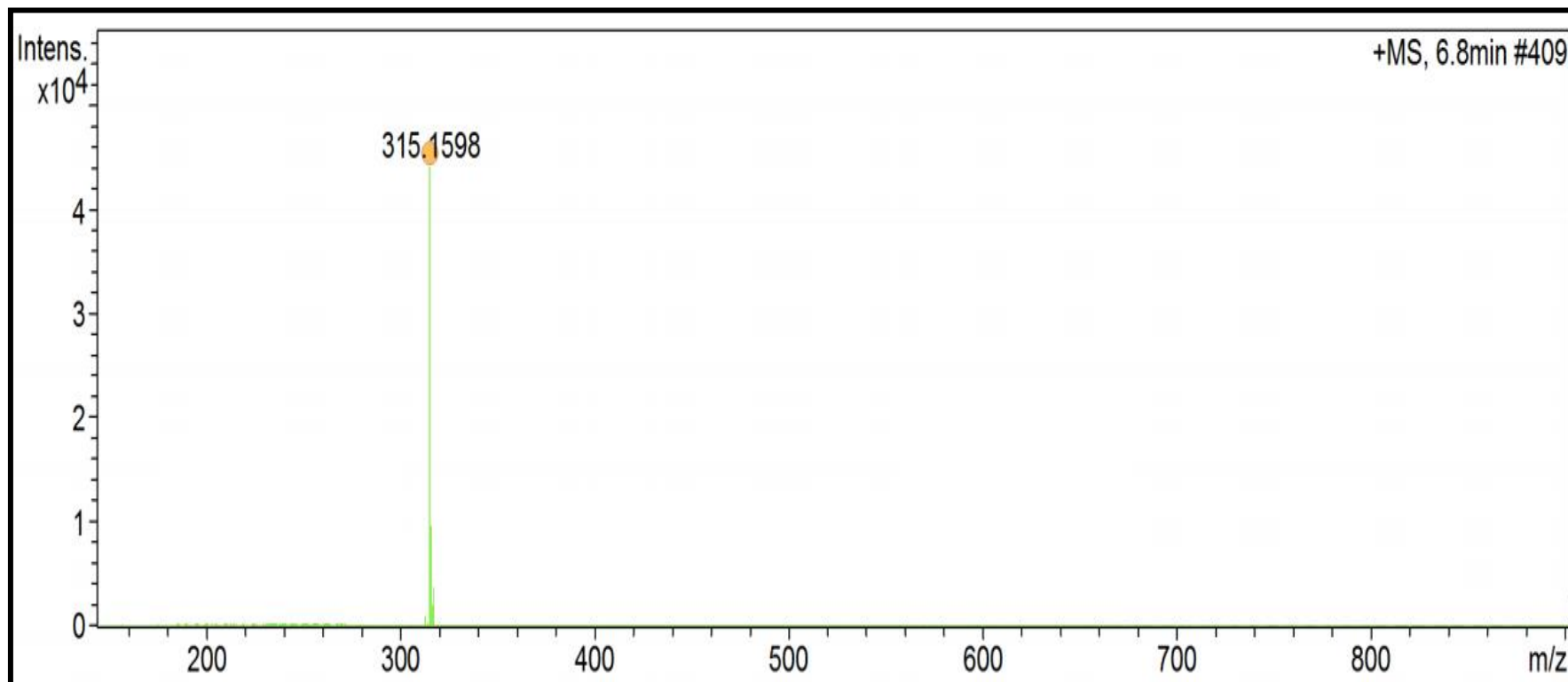
Anexo 21. Espectro de correlação de ^{13}C - ^1H (HMBC) do *trans*-desidrocrotolina composto 3, em CDCl_3 , ^{13}C : 75 MHz e ^1H : 300 MHz



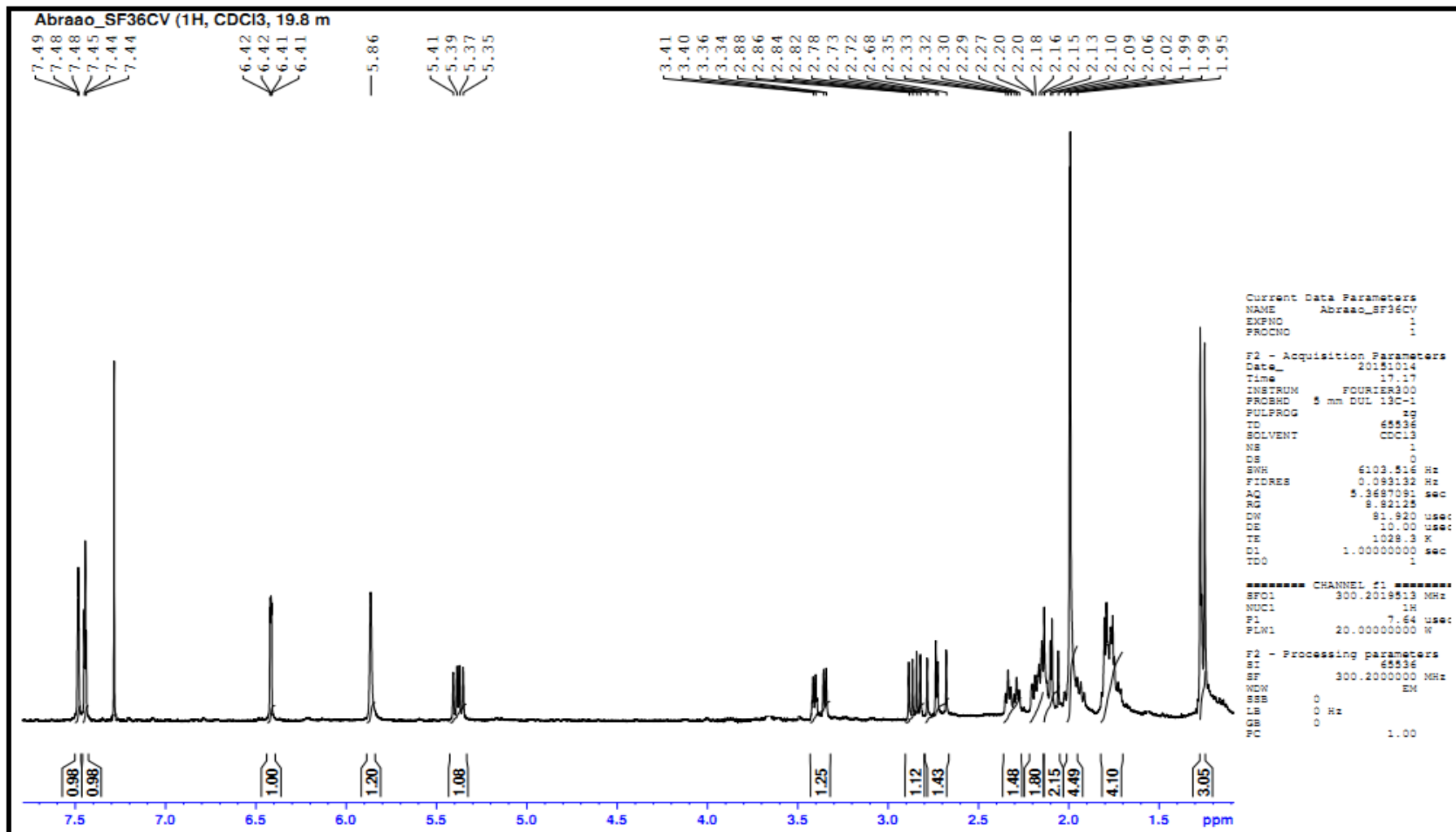
Anexo 22. Espectro de IR de *trans*-desidrocrotonina composto 3.



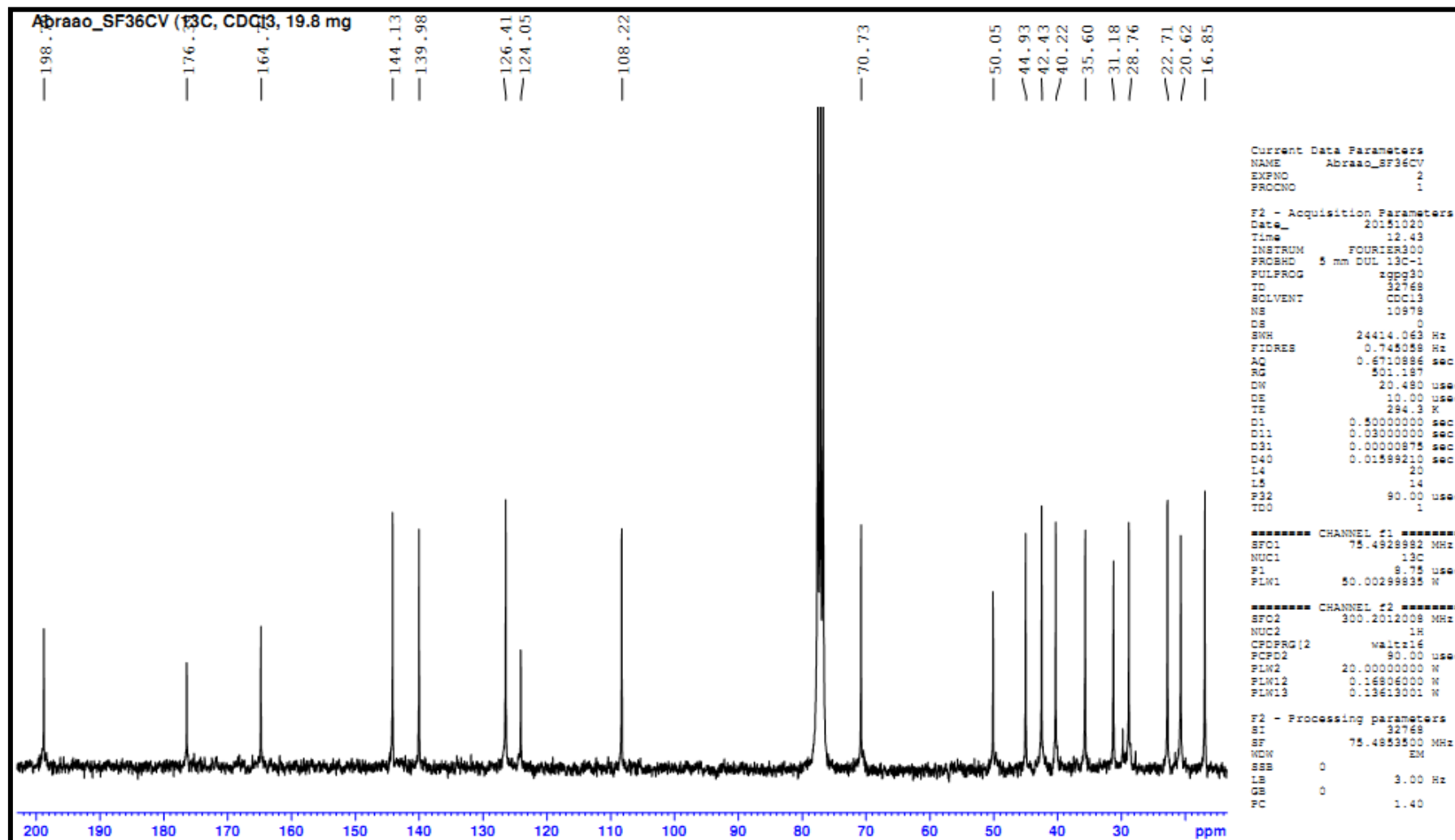
Anexo 23. Espectro de HRMS; $[M+H]^+$ do *cis*-desidrocrotonina composto 4, 300 MHz, $CDCl_3$



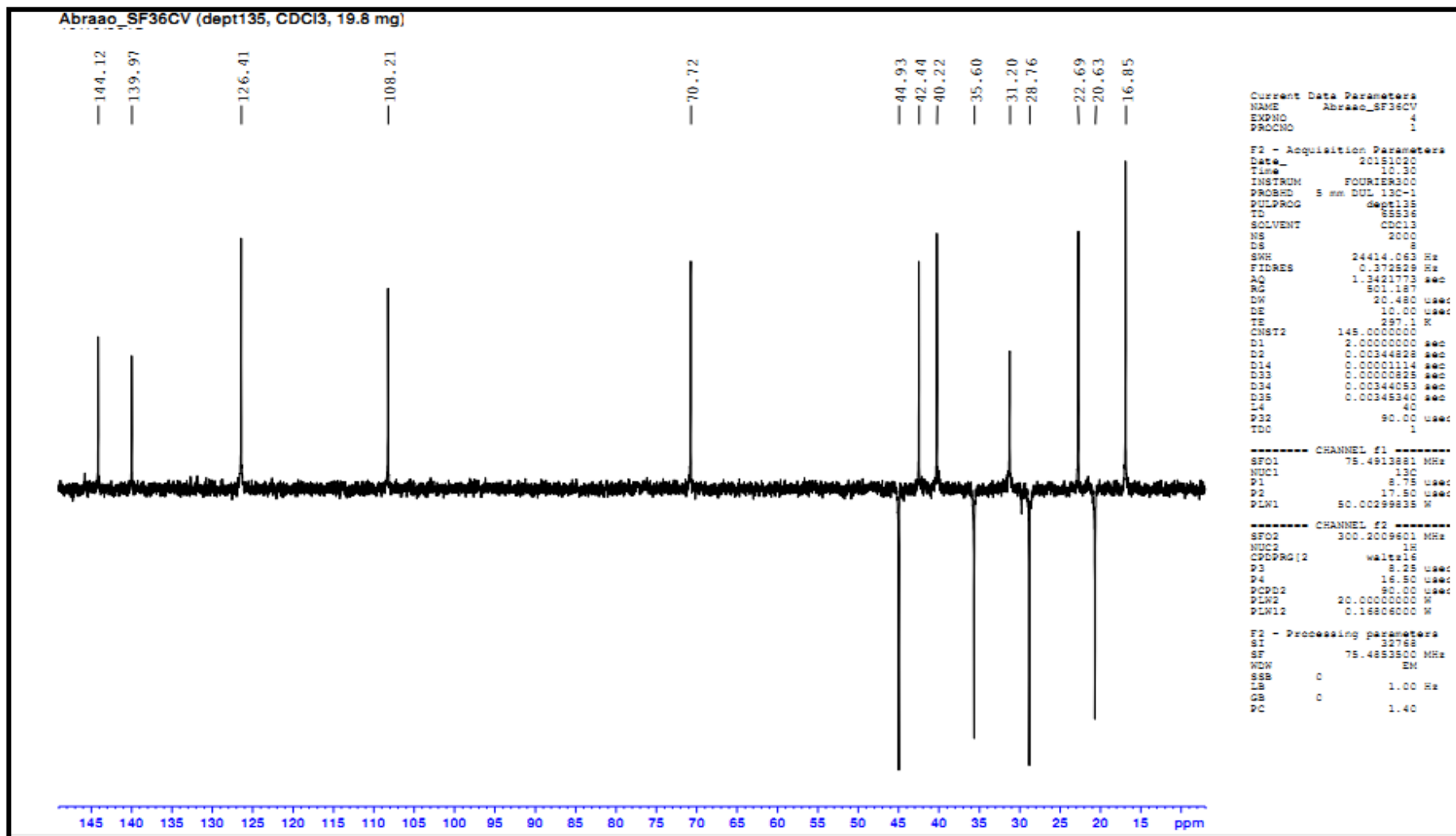
Anexo 24. Espectro de RMN de ^1H do *cis*-desidroacetonina composto 4, 300 MHz, CDCl_3



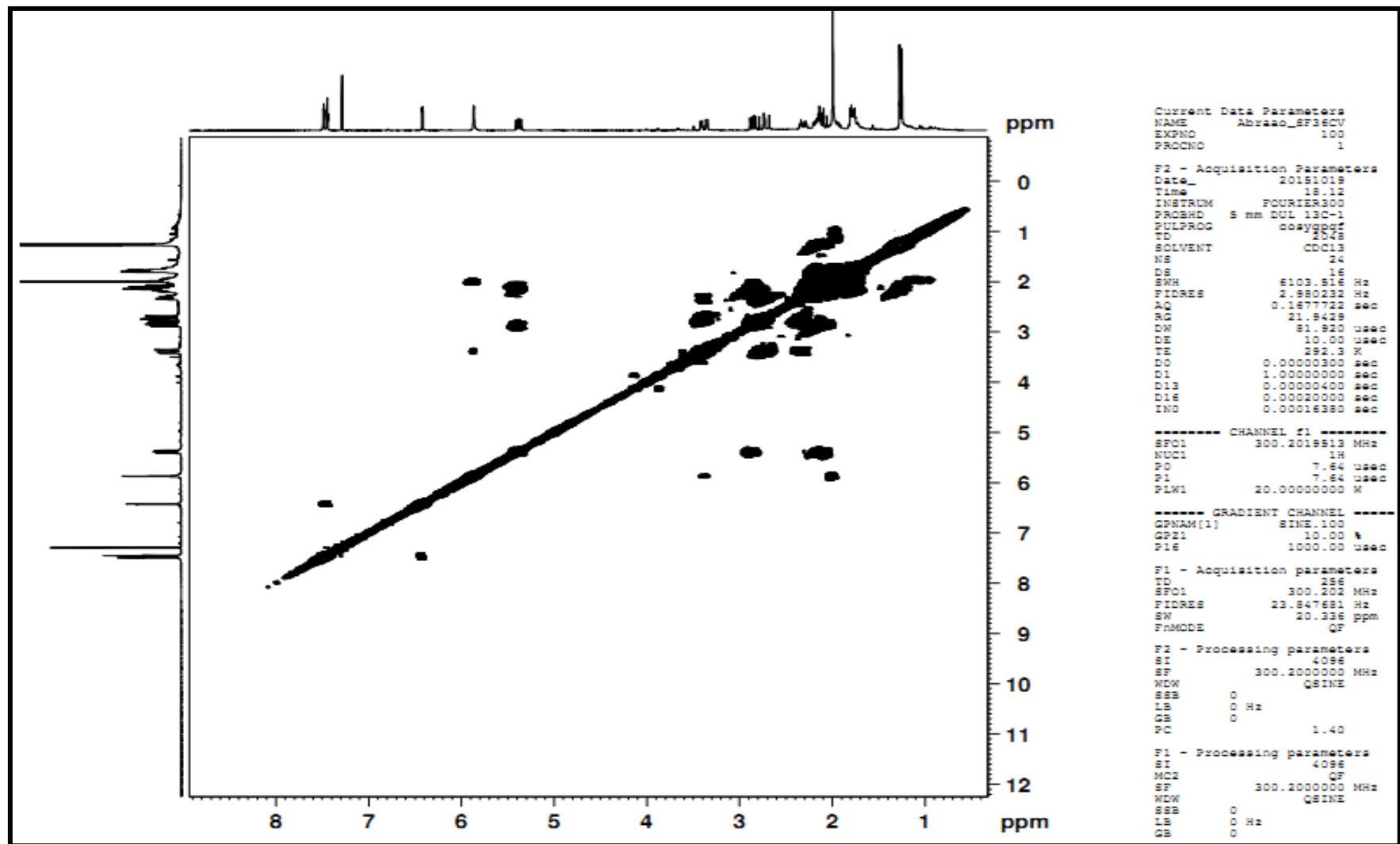
Anexo 25. Espectro de RMN de ^{13}C do *cis*-desidrocrotolina composto 4, 75 MHz, CDCl_3 .



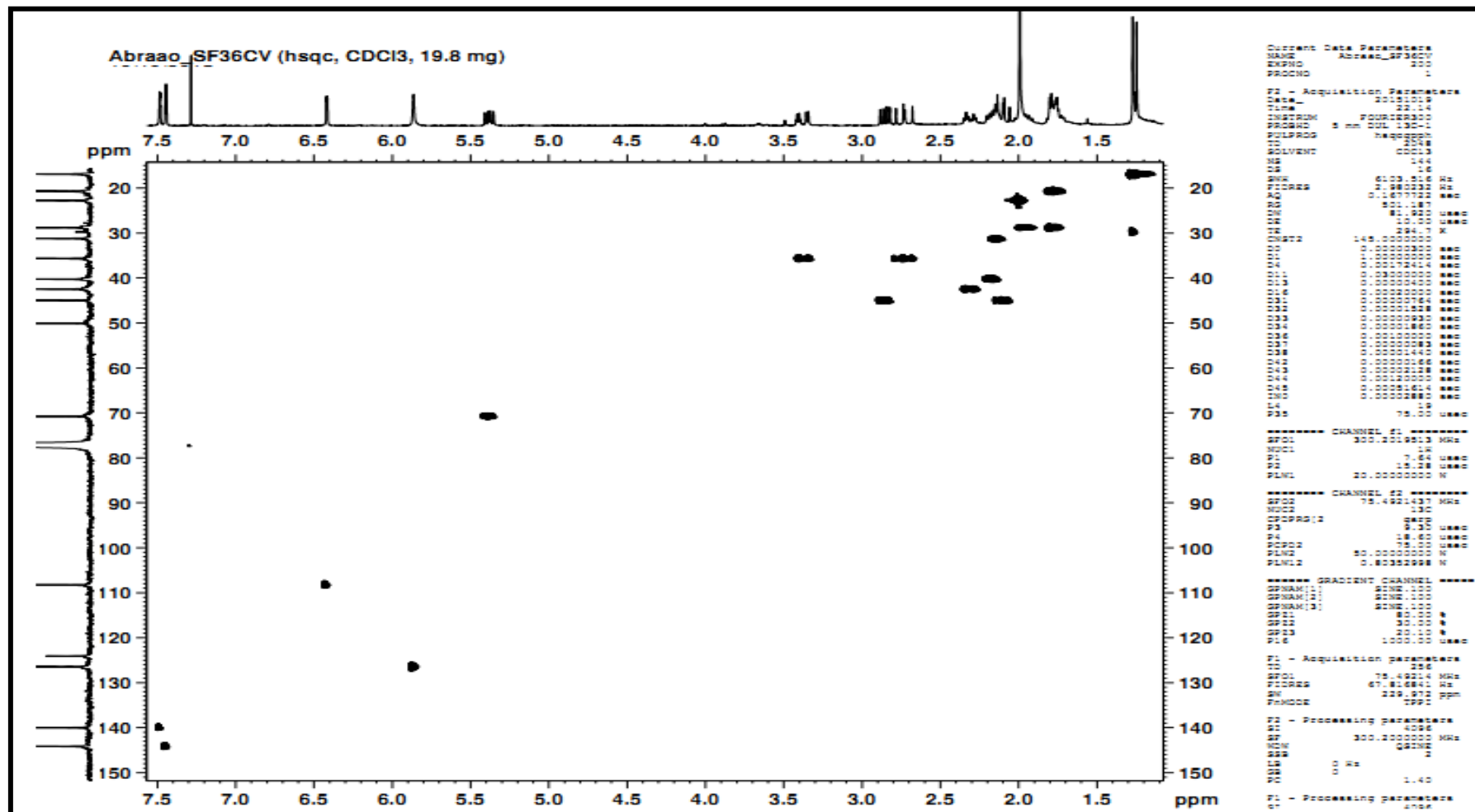
Anexo 26. Espectro de DEPT135 do *cis*-desidrocrotolina composto 4, 75 MHz, CDCl₃



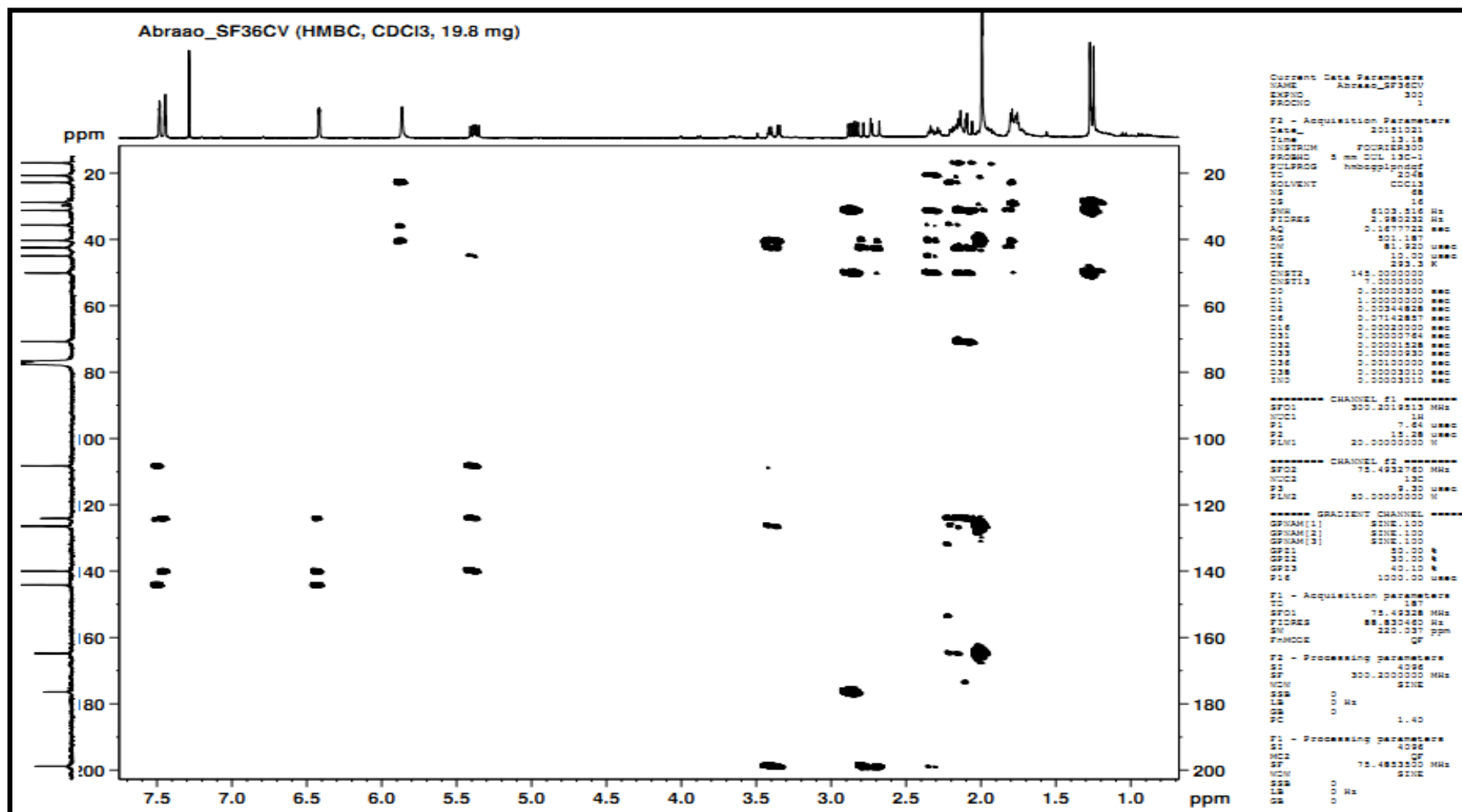
Anexo 27. Espectro de correlação ^1H - ^1H (COSY) do cis-desidrocrotolina composto 4, 300 MHz, CDCl_3 .



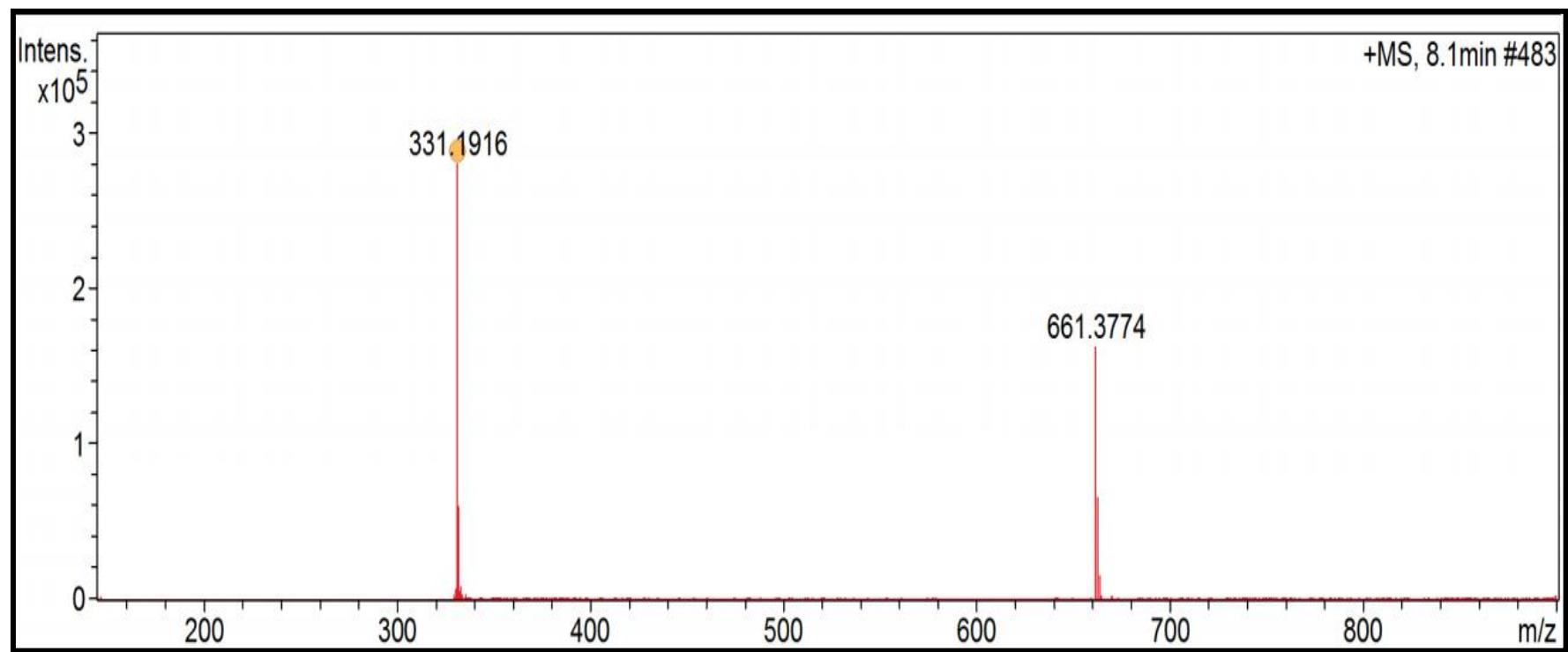
Anexo 28. Espectro de correlação de ^{13}C - ^1H (HSQC) do *cis*-desidrocrotolina composto 4, em CDCl_3 , ^{13}C : 75 MHz e ^1H : 300 MHz



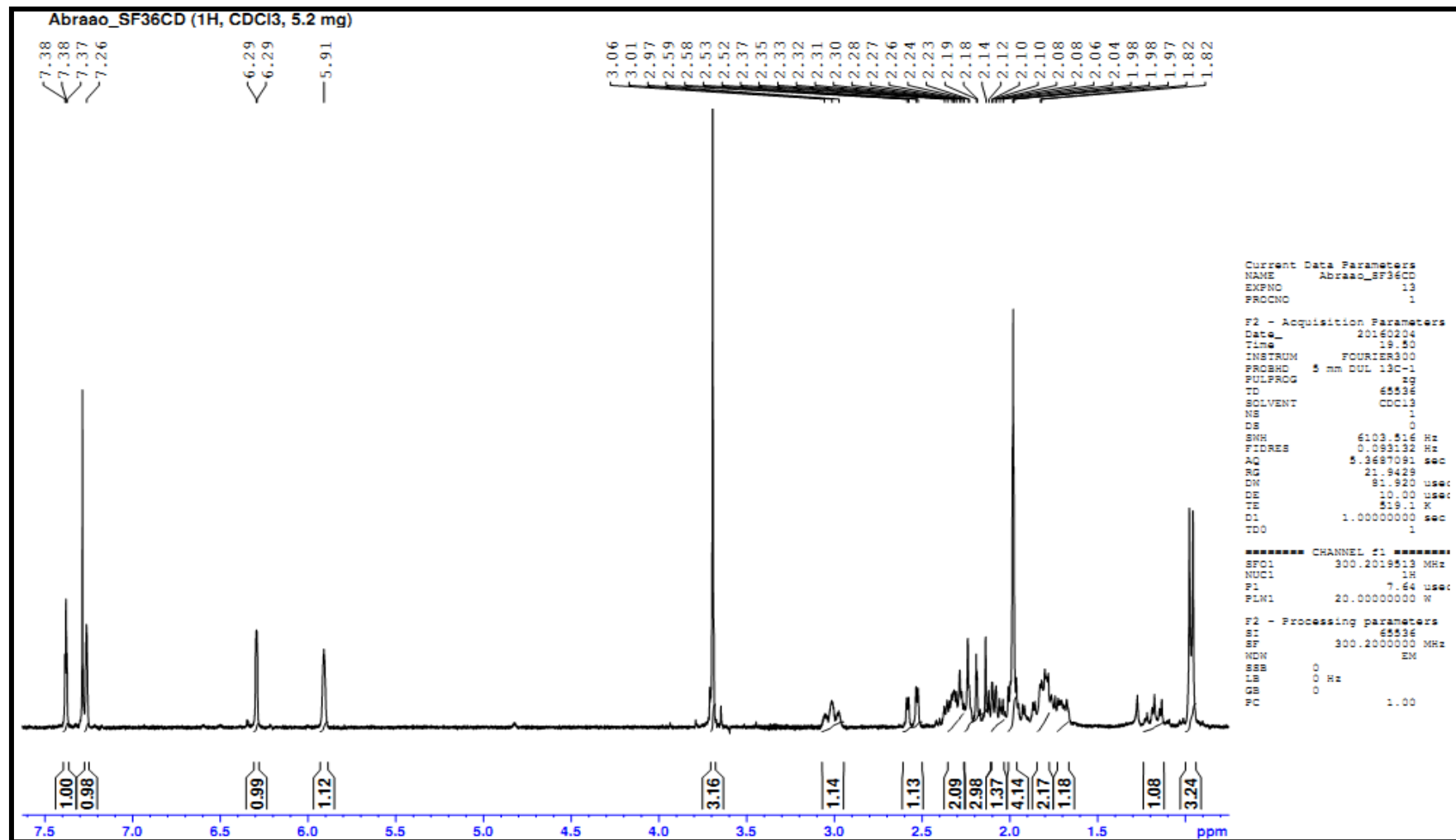
Anexo 29. Espectro de correlação de ^{13}C - ^1H (HMBC) do *cis*-desidrocrotonina composto 4, em CDCl_3 , ^{13}C : 75 MHz e ^1H : 300 MHz.



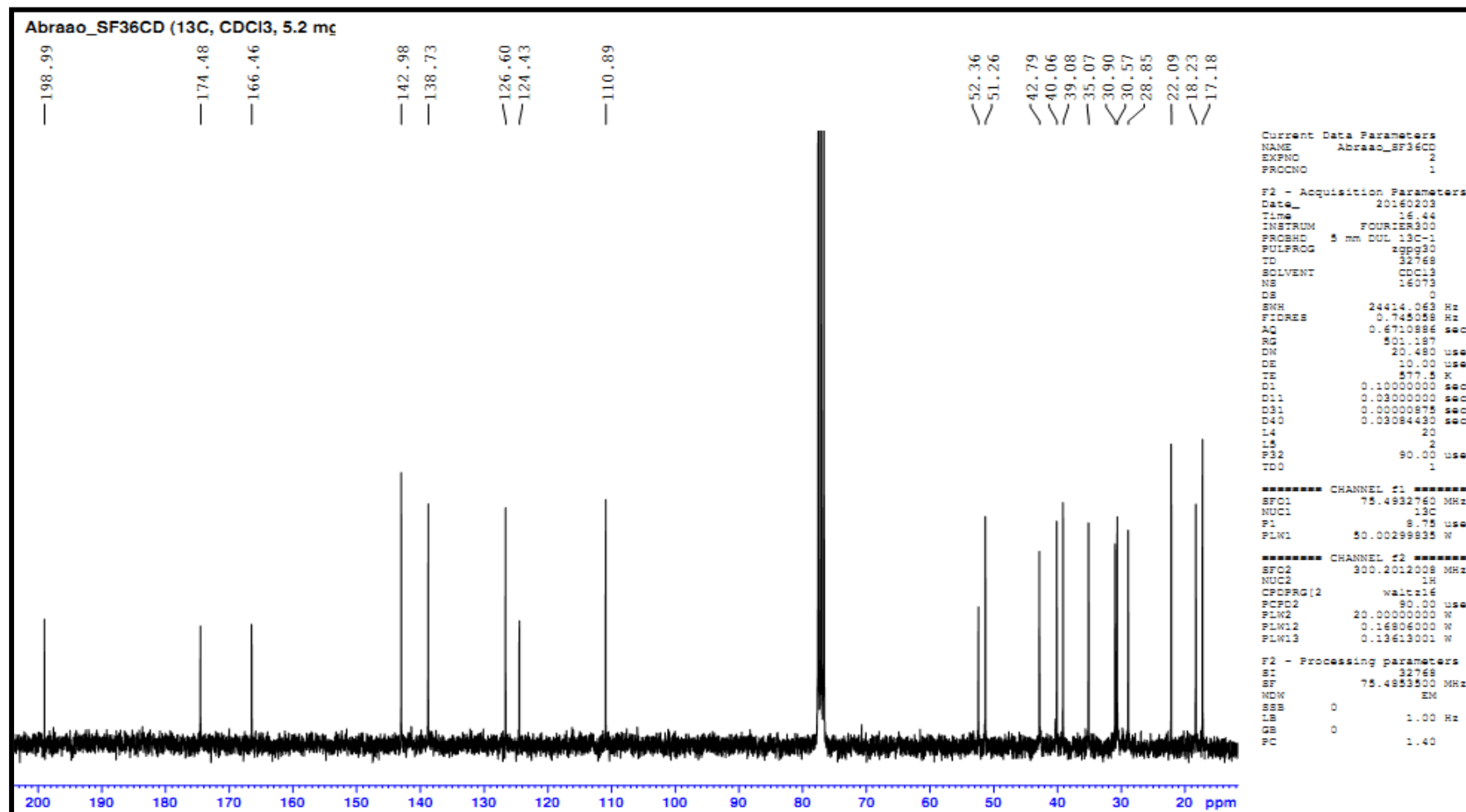
Anexo 30. Espectro de HRMS; $[M+H]^+$ do *trans*-cajucarina B ($SbFrC_3-E-D_3$).



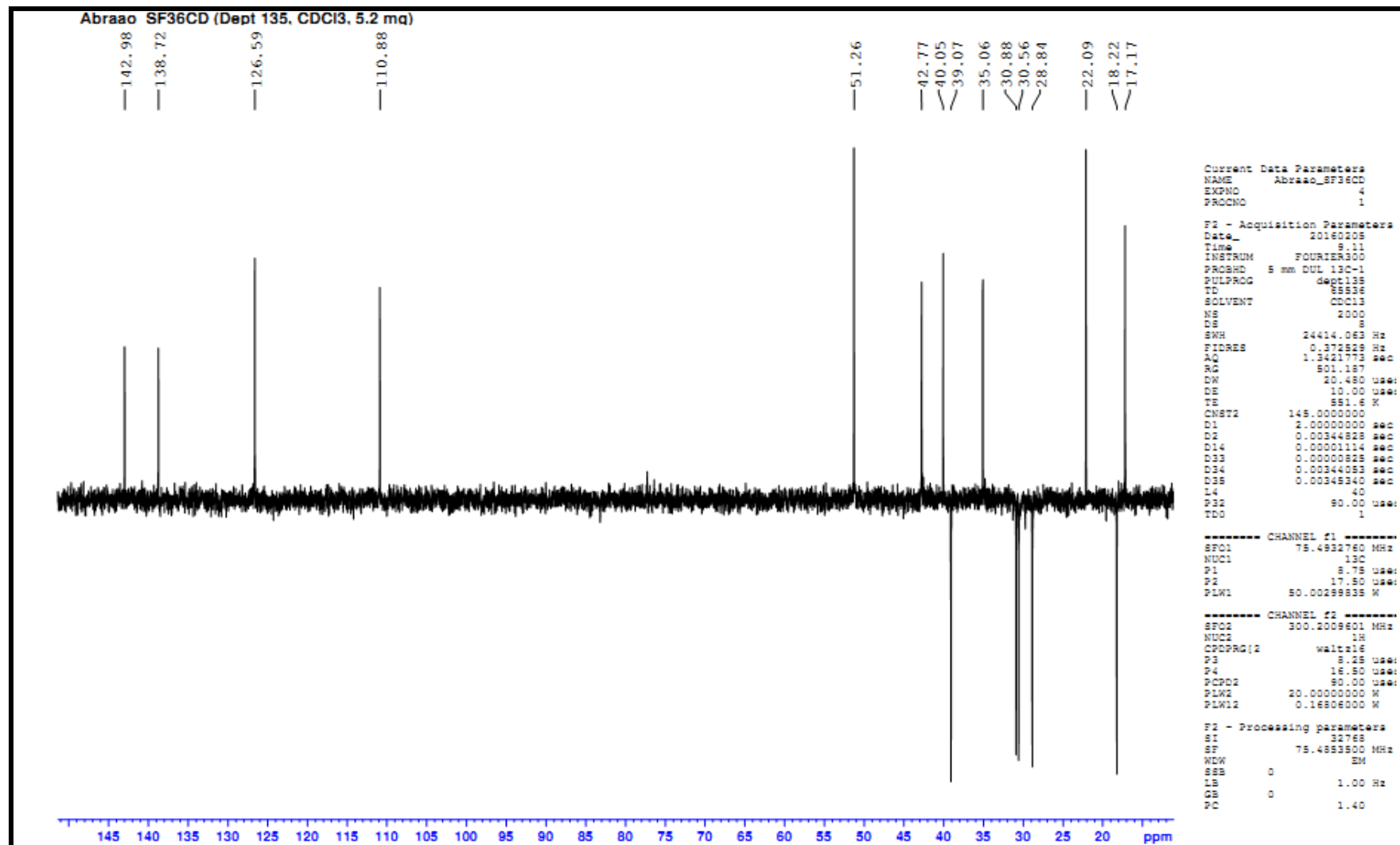
Anexo 31. Espectro de RMN de ^1H do *trans*-cajuarina B composto 5, 300 MHz, CDCl_3 .



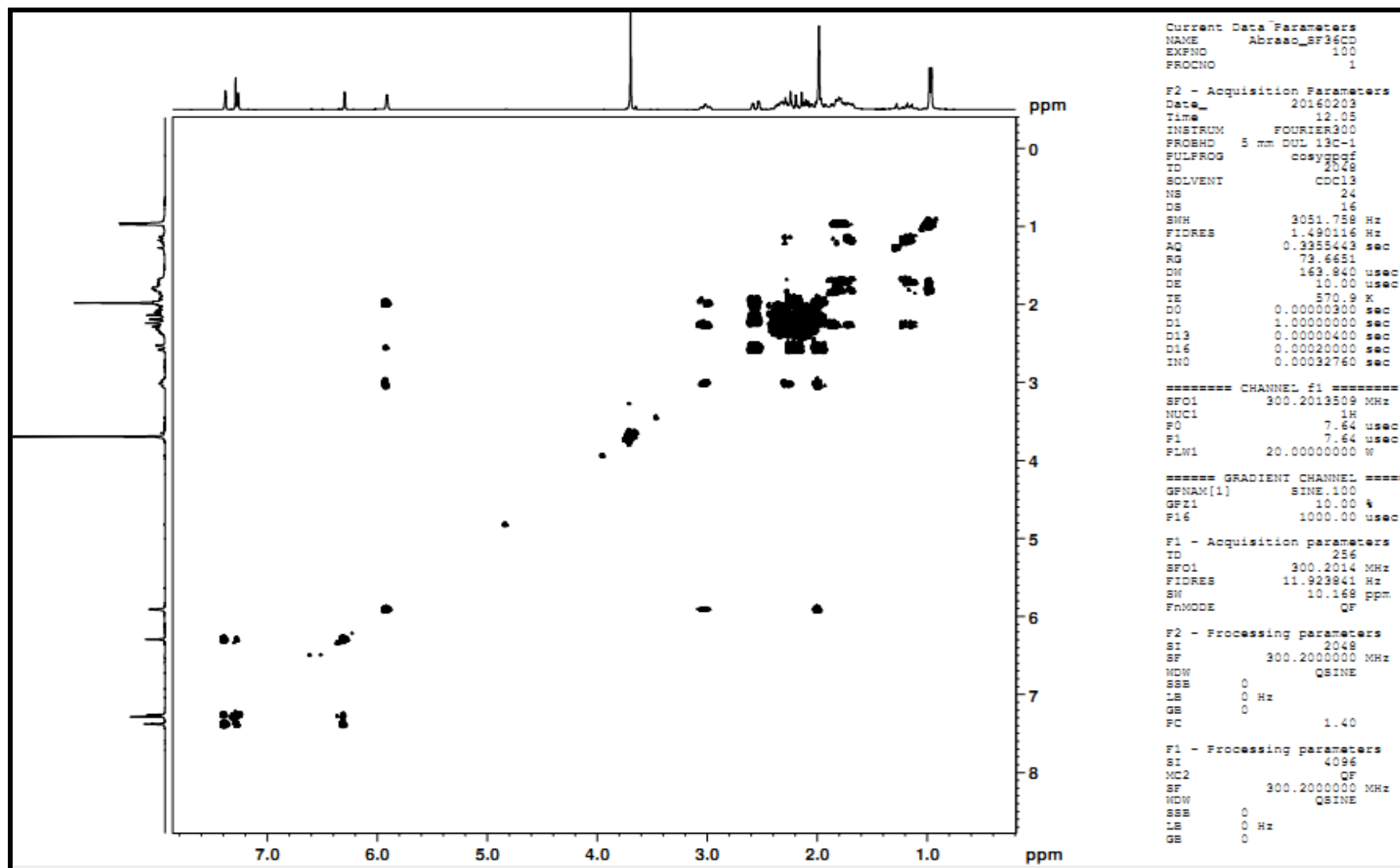
Anexo 32. Espectro de RMN de ^{13}C do *trans*-cajuarina B composto 5, 75 MHz, CDCl_3 .



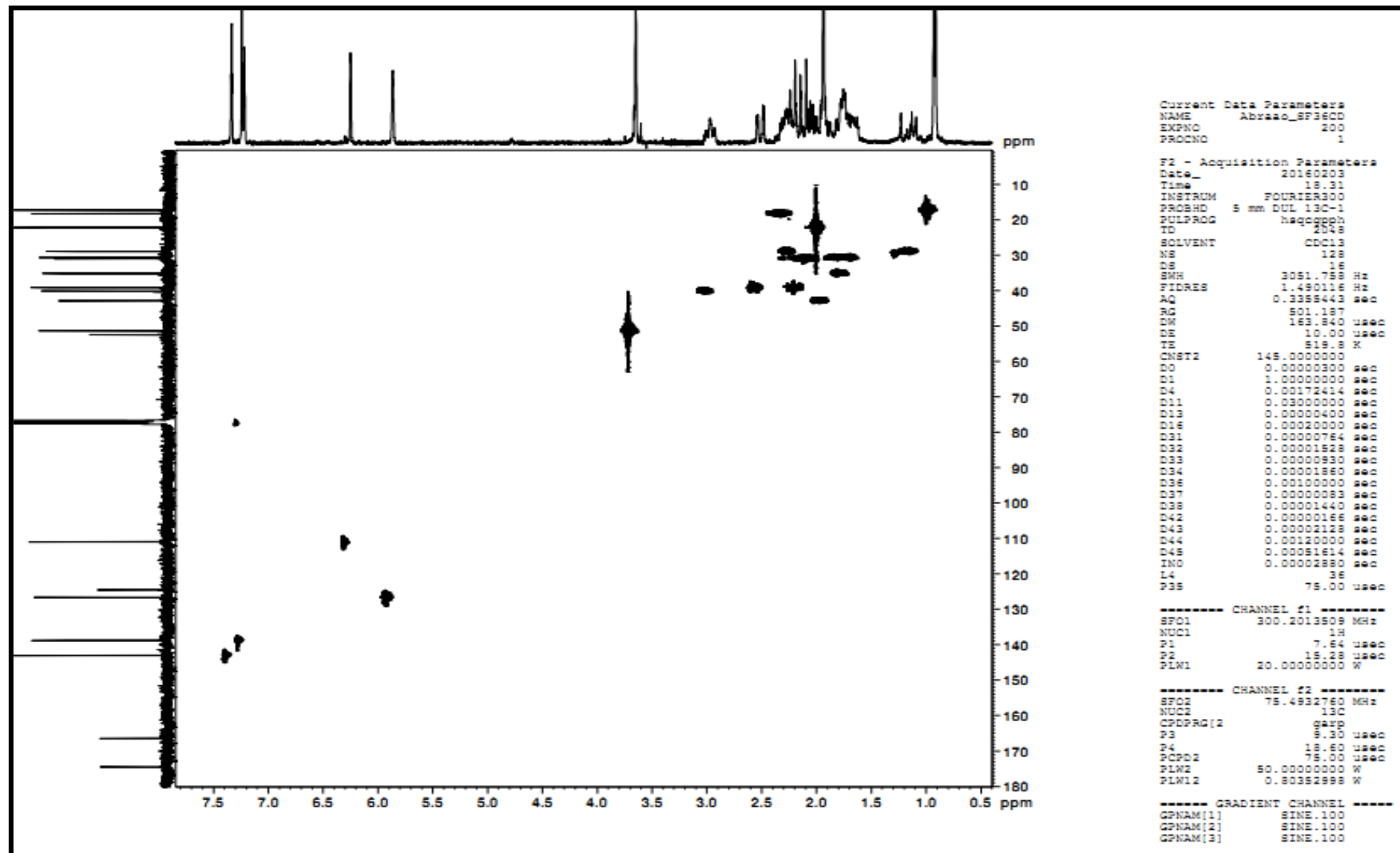
Anexo 33. Espectro de DEPT135 do *trans*-cajuarina B composto 5, 75 MHz, CDCl₃.



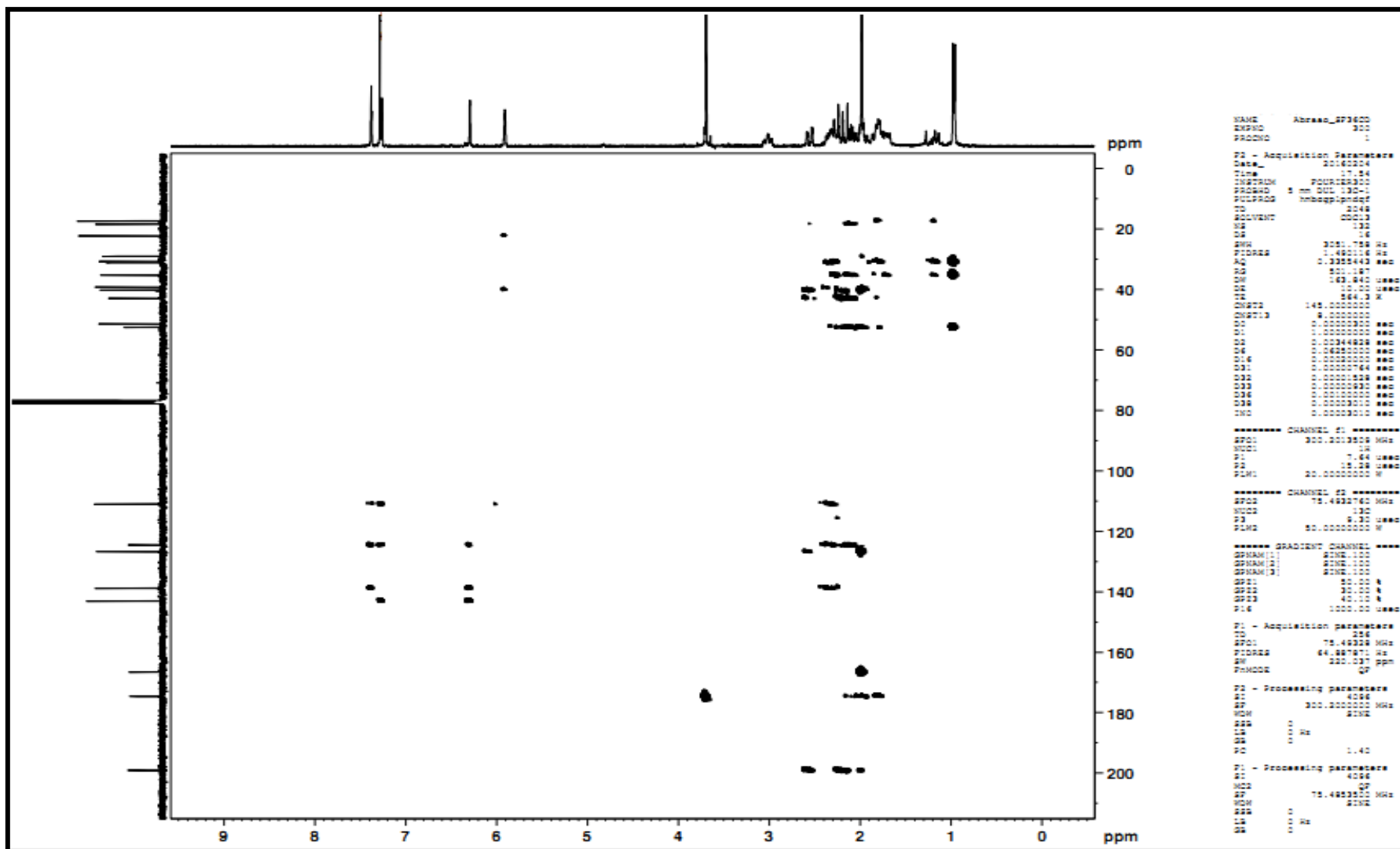
Anexo 34. Espectro de correlação ^1H - ^1H (COSY) do trans-cajuarina B composto 5, 300 MHz, CDCl_3



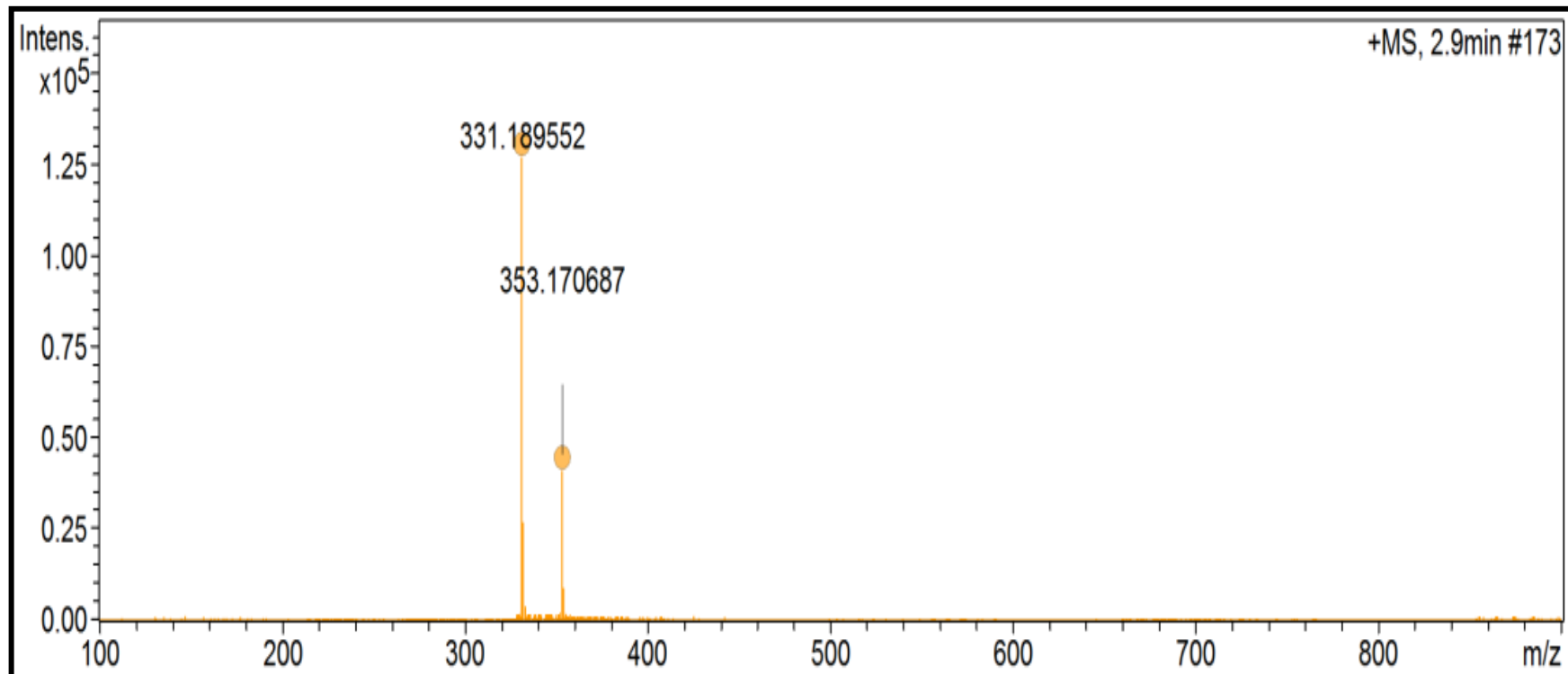
Anexo 35. Espectro de correlação de ^{13}C - ^1H (HSQC) do trans-cajuarina B composto 5, em CDCl_3 , ^{13}C : 75 MHz e ^1H : 300 MHz



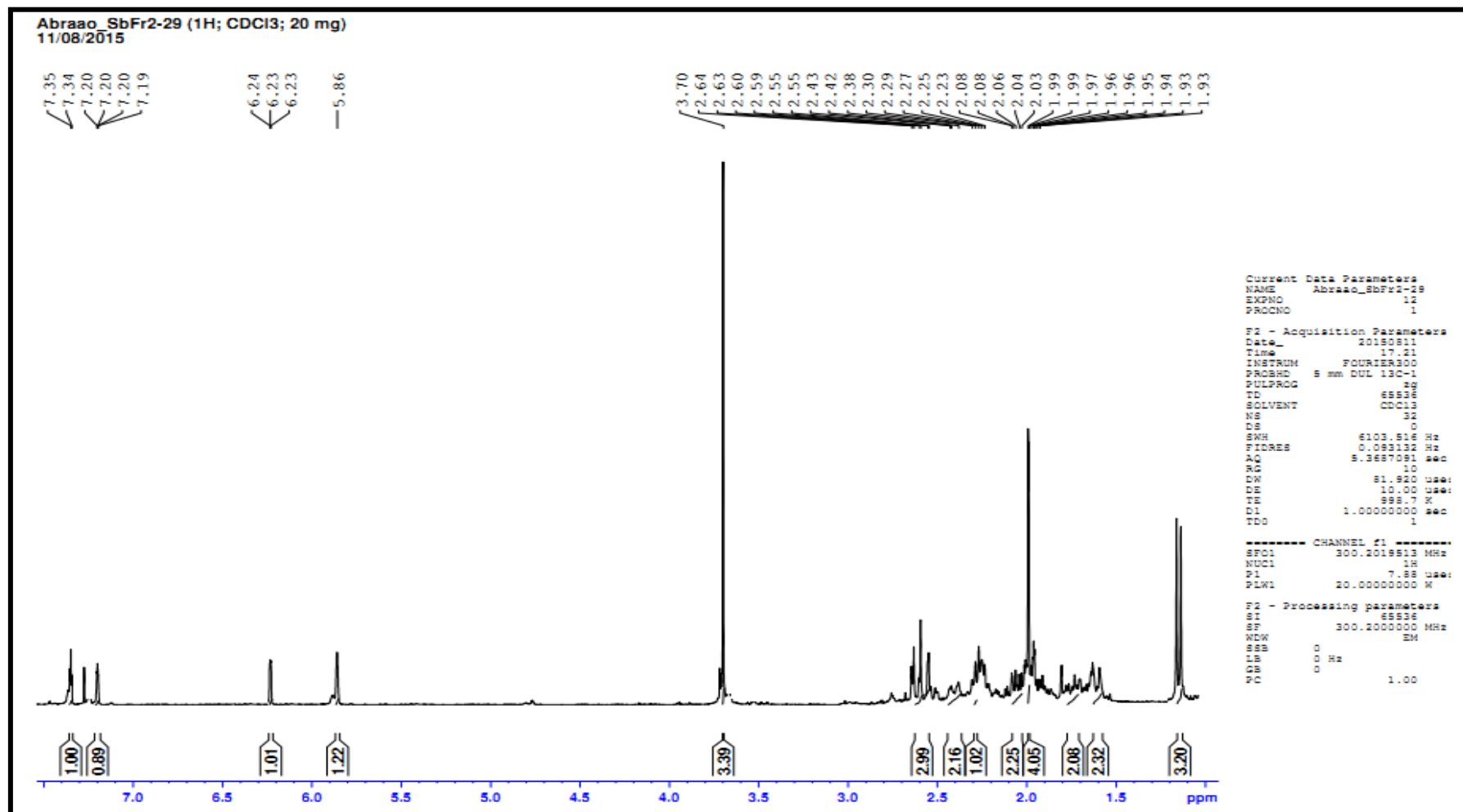
Anexo 36. Espectro de correlação de ^{13}C - ^1H (HMBC) do *trans*-cajuarina B composto 5, em CDCl_3 , ^{13}C : 75 MHz e ^1H : 300 MHz.



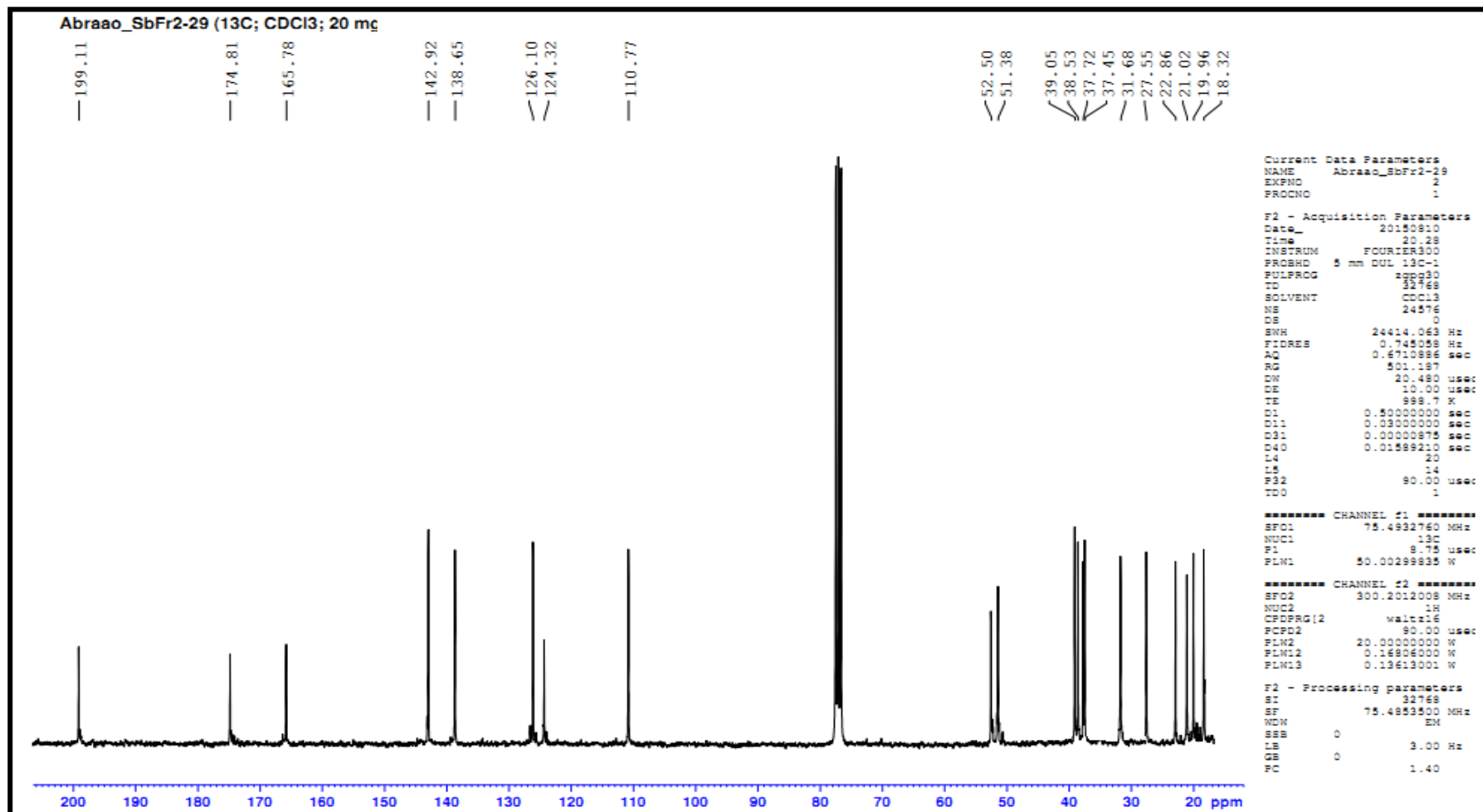
Anexo 37. Espectro de HRMS; $[M+H]^+$ do *cis*-cajuarina B composto 6.



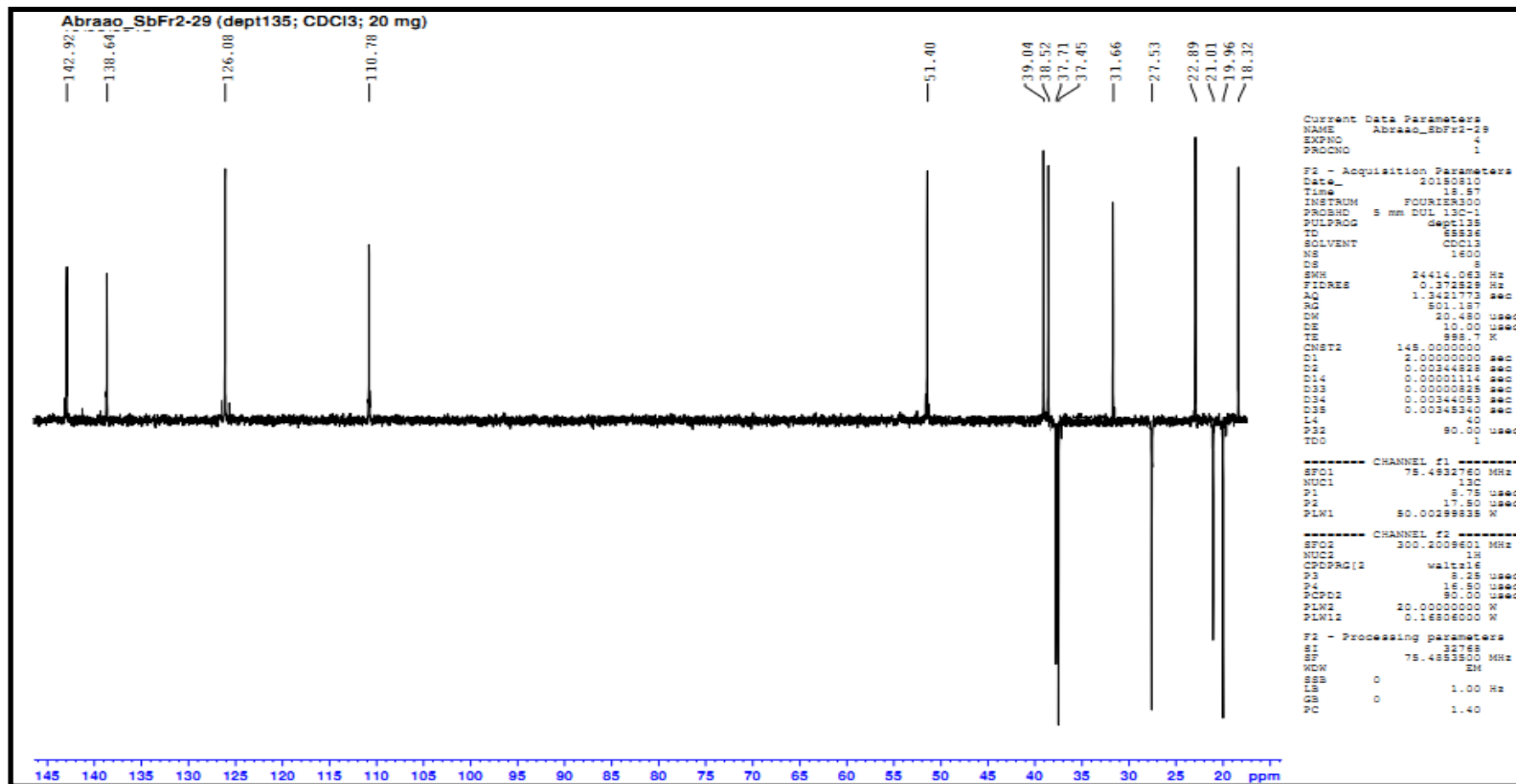
Anexo 38. Espectro de RMN de ^1H do *cis*-cajuarina B composto 6, 300 MHz, CDCl_3 .



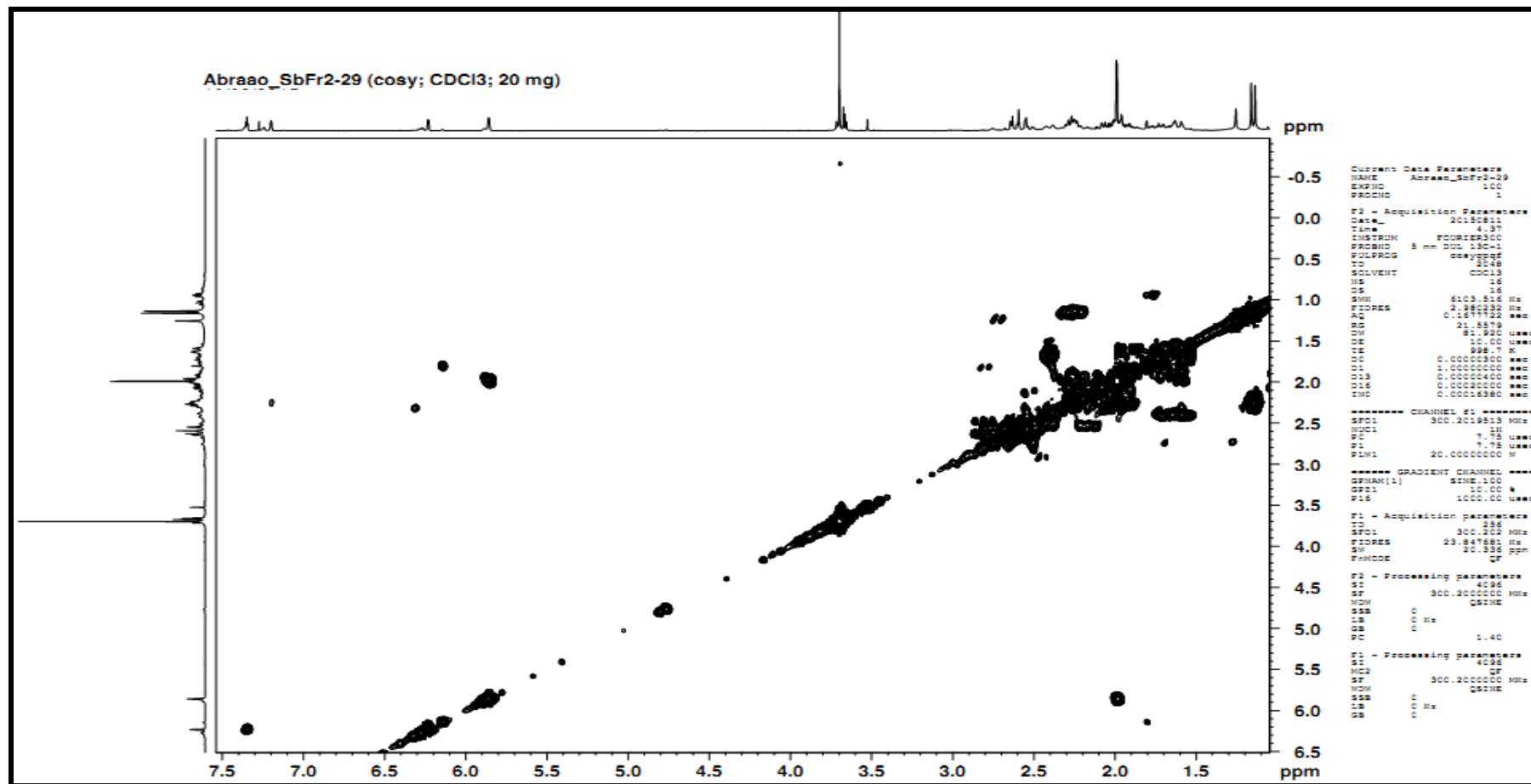
Anexo 39. Espectro de RMN de ^{13}C do *cis*-cajuarina B composto 6, 75 MHz, CDCl_3 .



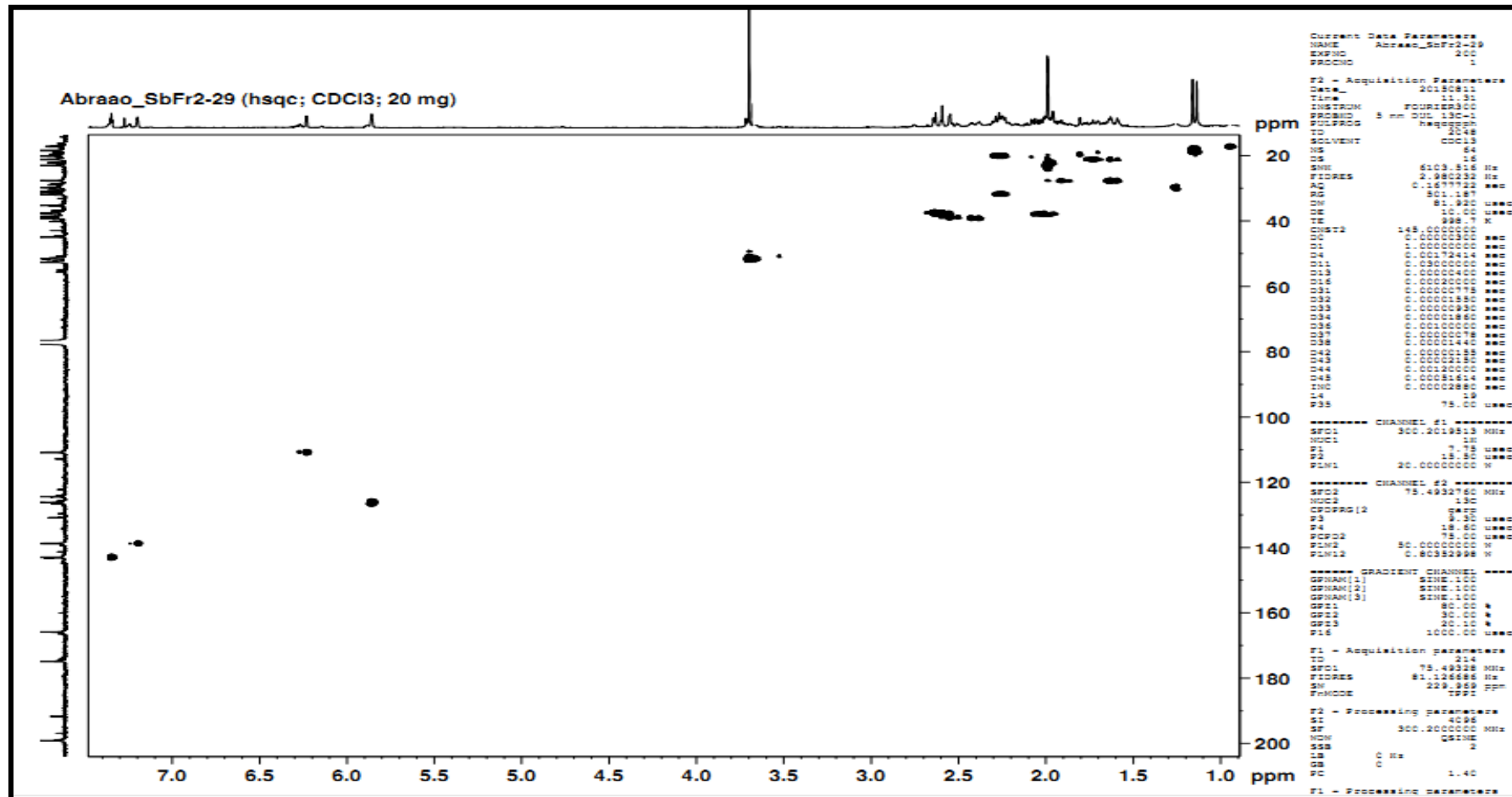
Anexo 40. Espectro de DEPT135 do cis-cajucarina B composto 6, 75 MHz, CDCl₃.



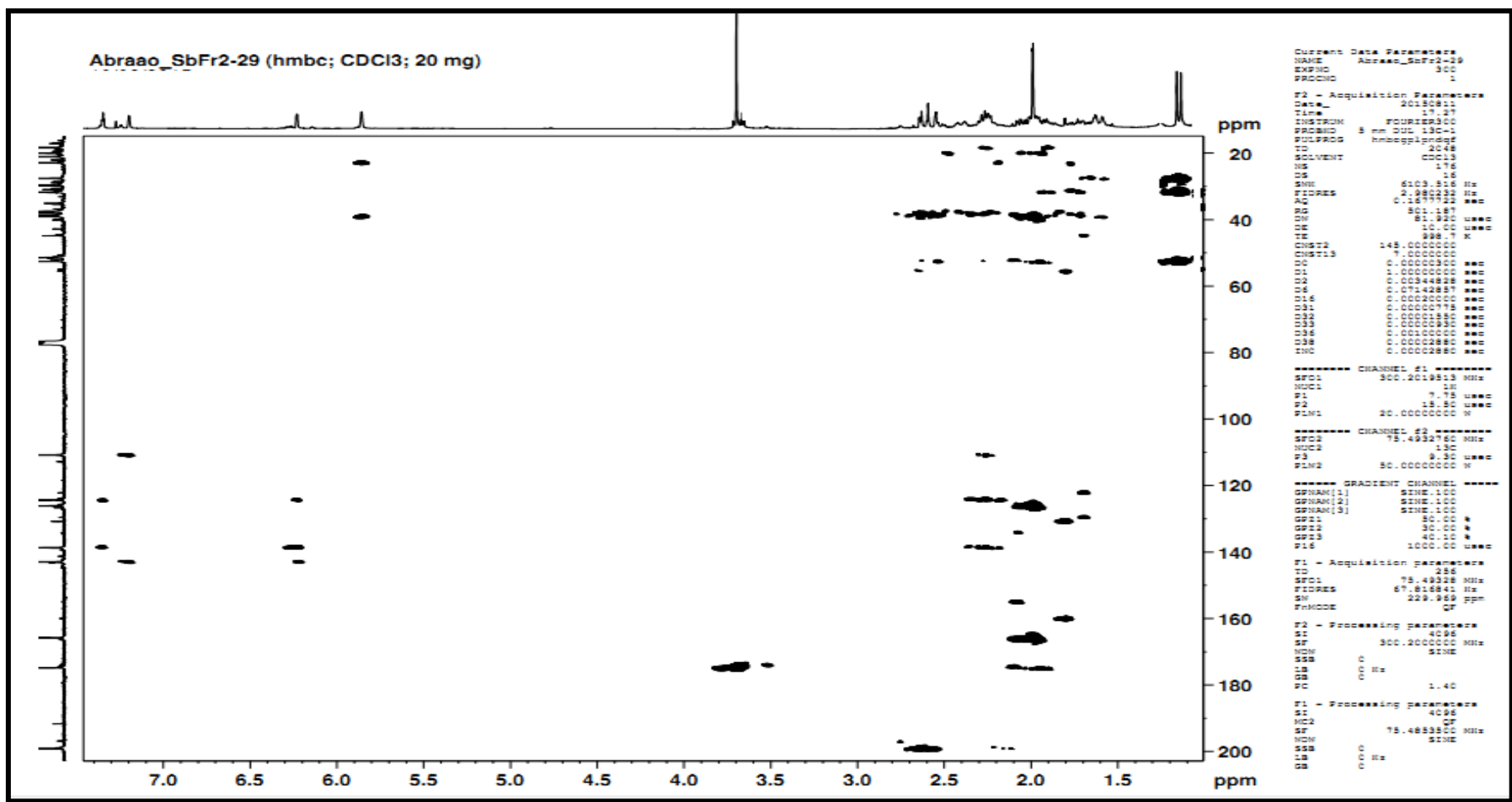
Anexo 41. Espectro de correlação ^1H - ^1H (COSY) do *cis*-cajuarina B composto 6, 300 MHz, CDCl_3



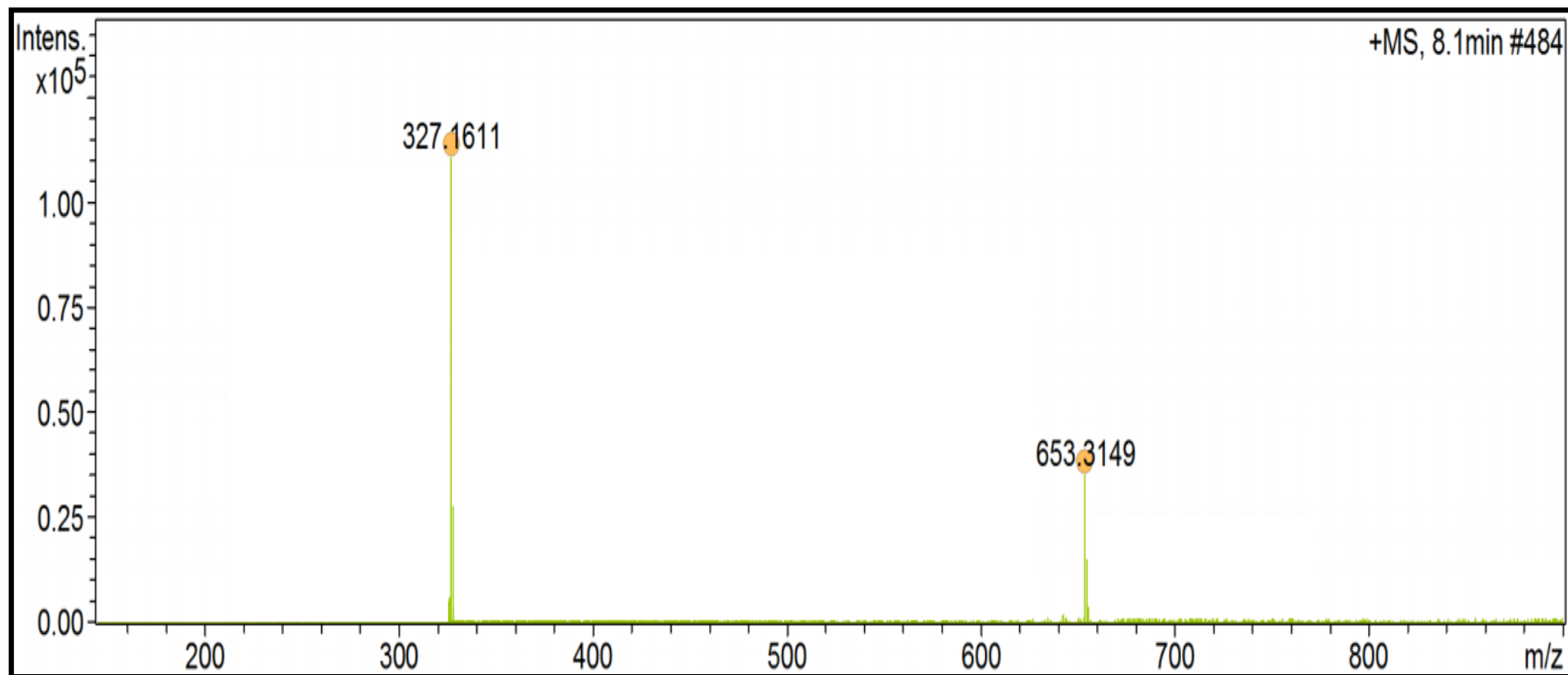
Anexo 42. Espectro de correlação de ^{13}C - ^1H (HSQC) do *cis*-cajucarina B composto 6, em CDCl_3 , ^{13}C : 75 MHz e ^1H : 300 MHz



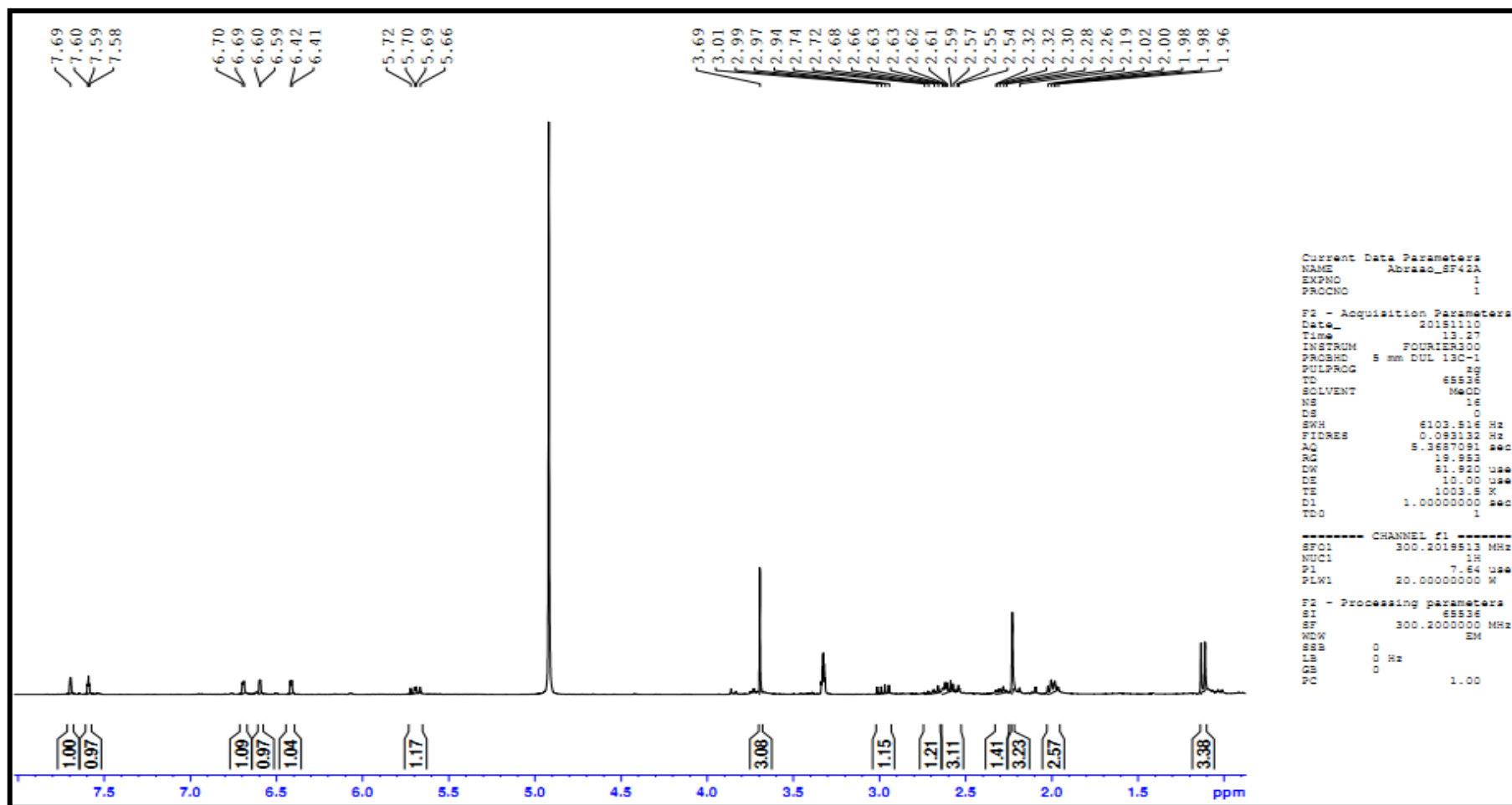
Anexo 43. Espectro de correlação de ^{13}C - ^1H (HMBC) do cis-cajucarina B composto **6**, em CDCl_3 , ^{13}C : 75 MHz e ^1H : 300 MHz



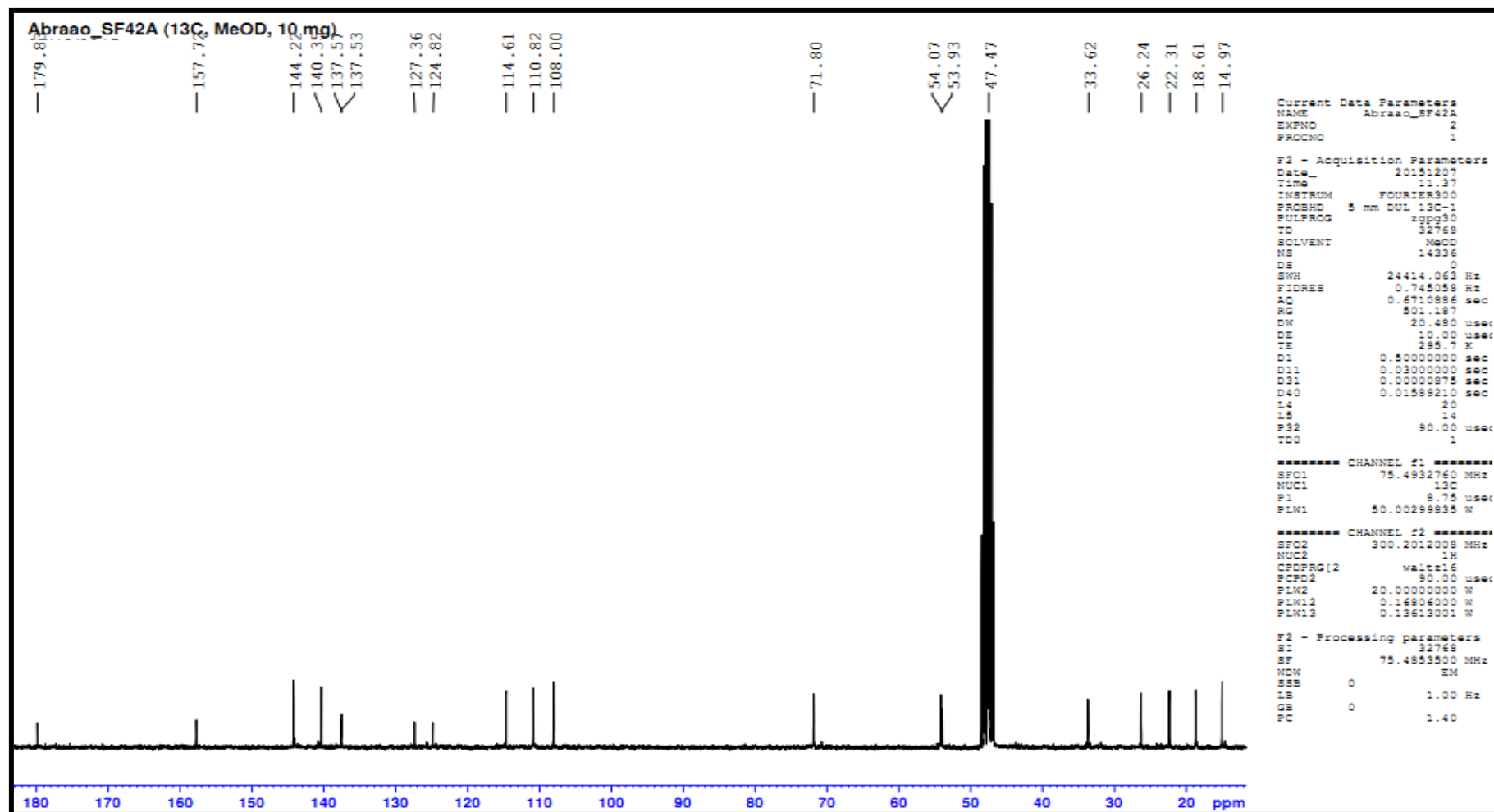
Anexo 44. Espectro de HRMS; $[M+H]^+$ do composto 7.



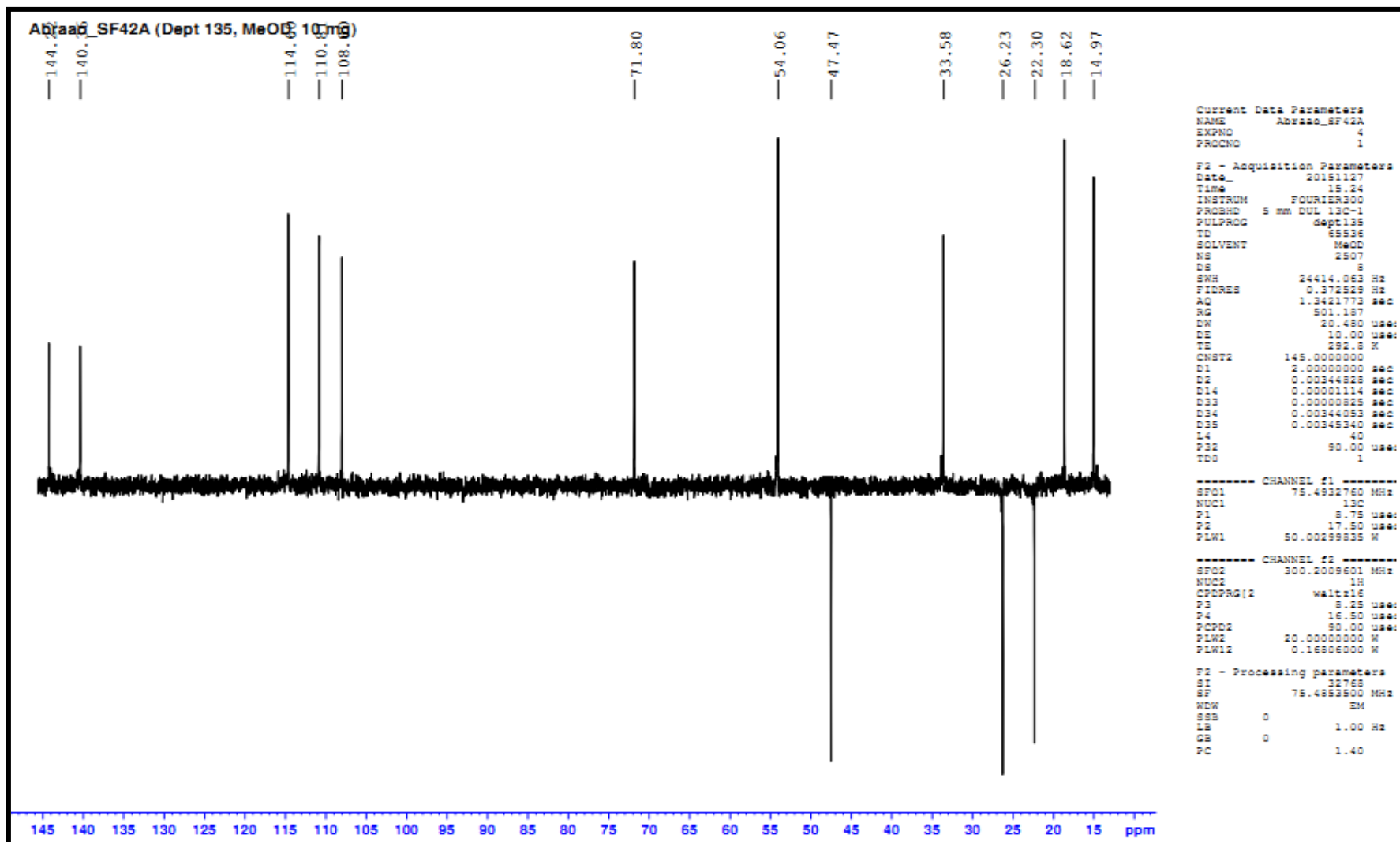
Anexo 45. Espectro de RMN de ^1H do composto 7.



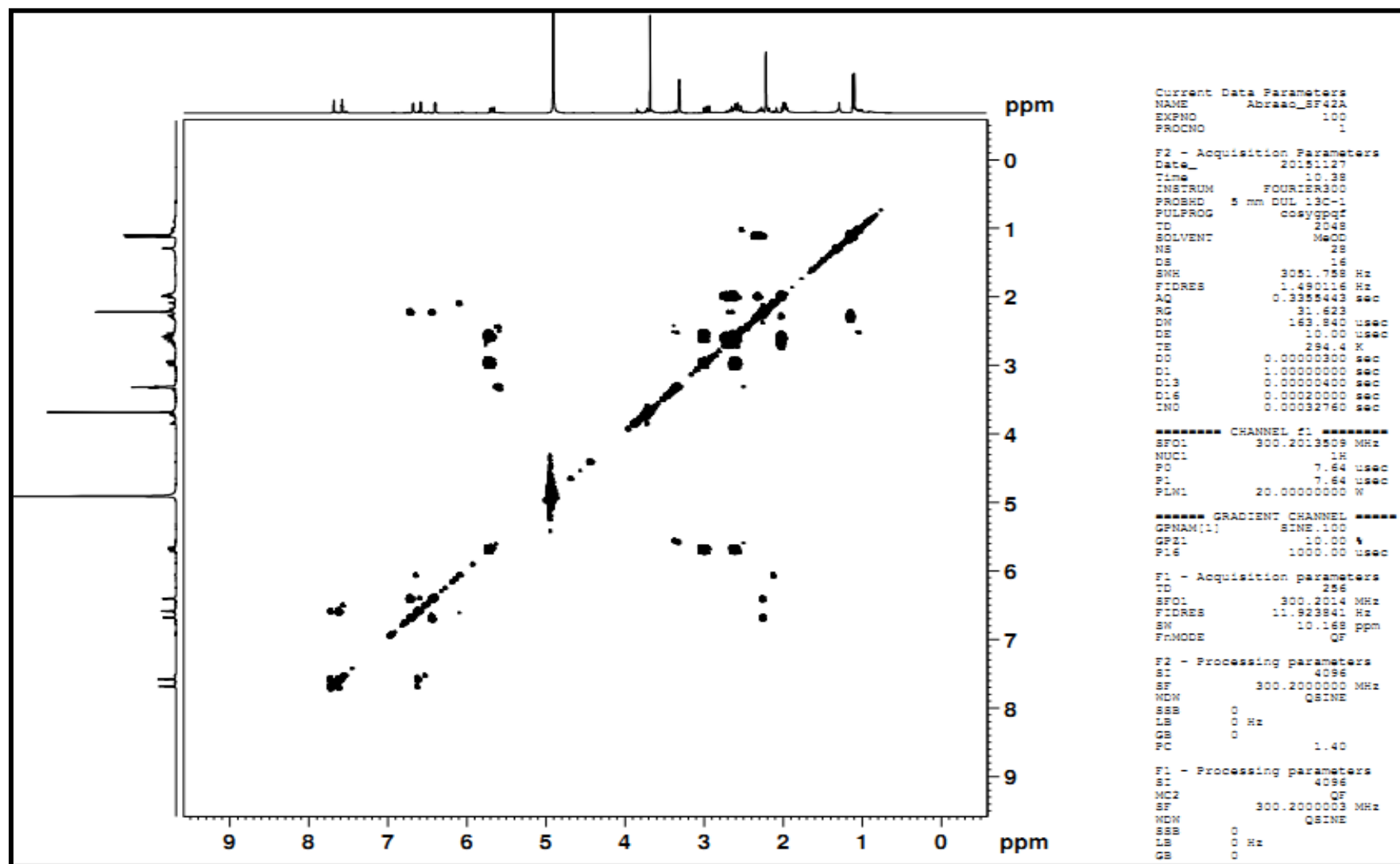
Anexo 46. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **7**, 75 MHz, CDCl_3



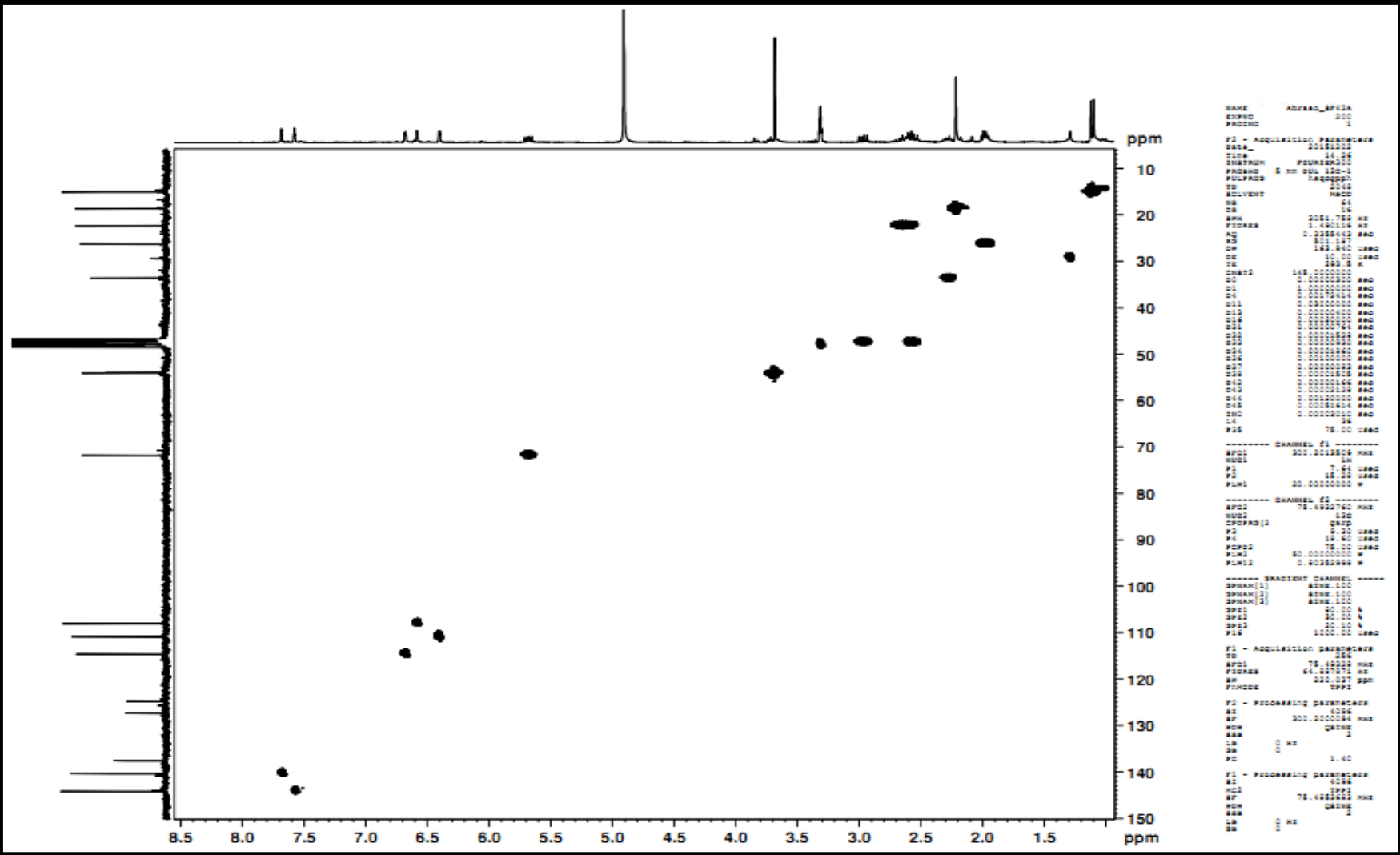
Anexo 47. Espectro de DEPT135 do composto 7, 75 MHz, CDCl₃.



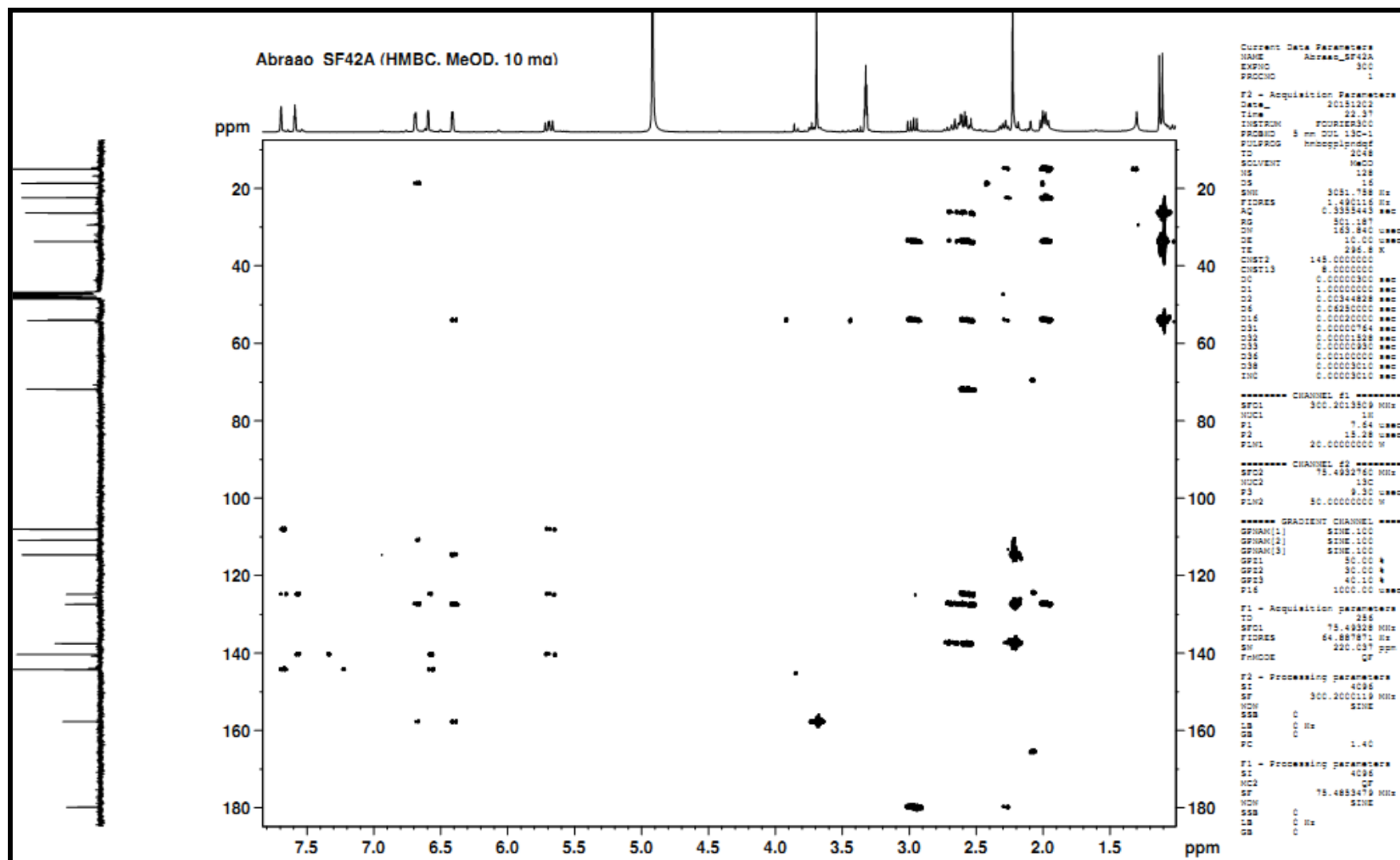
Anexo 48. Espectro de correlação 1H-1H (COSY) do composto 7, 300 MHz, CDCl3



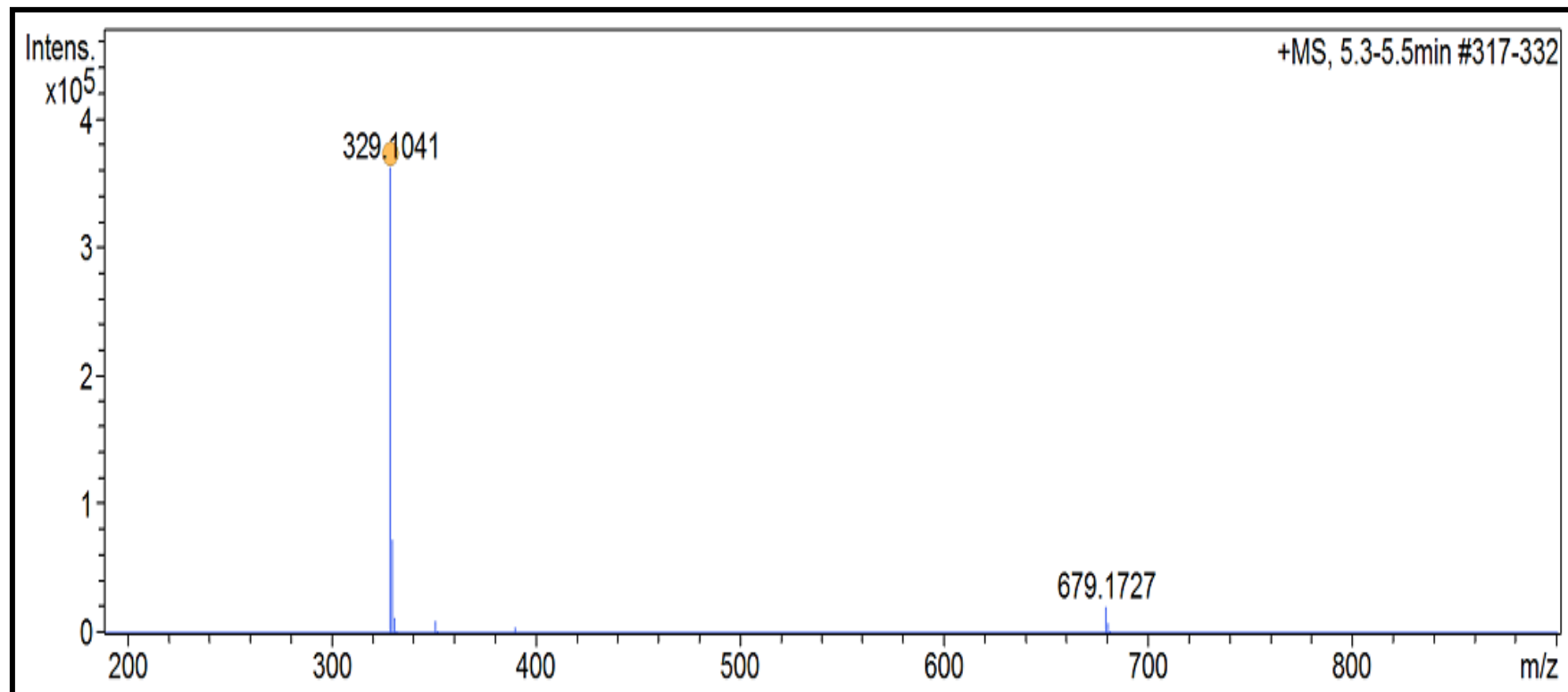
Anexo 49. Espectro de correlação de ¹³C-¹H (HSQC) do composto 7, em CDCl₃, ¹³C: 75 MHz e ¹H: 300 MHz



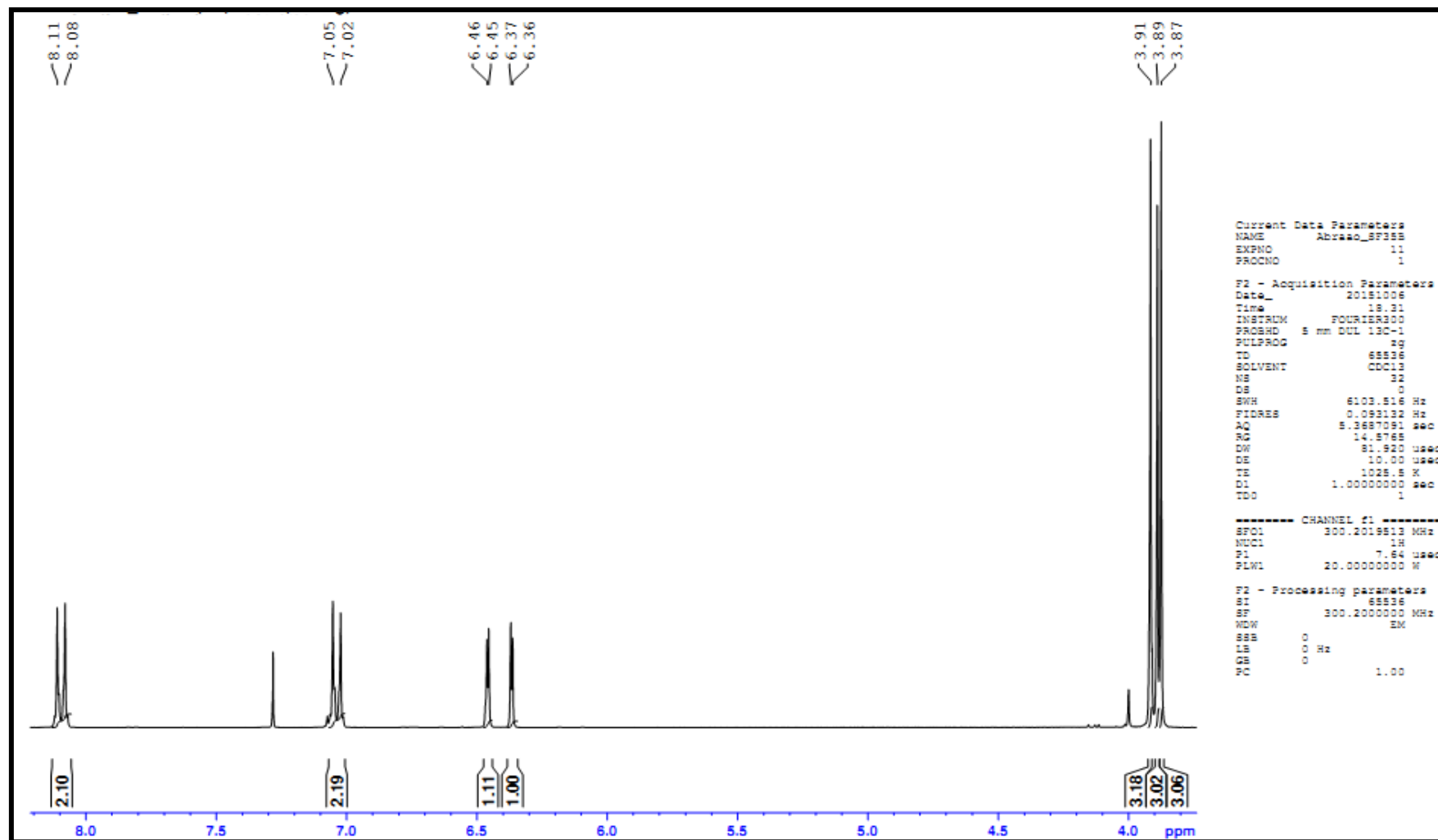
Anexo 50. Espectro de correlação de ^{13}C - ^1H (HMBC) do composto 7.



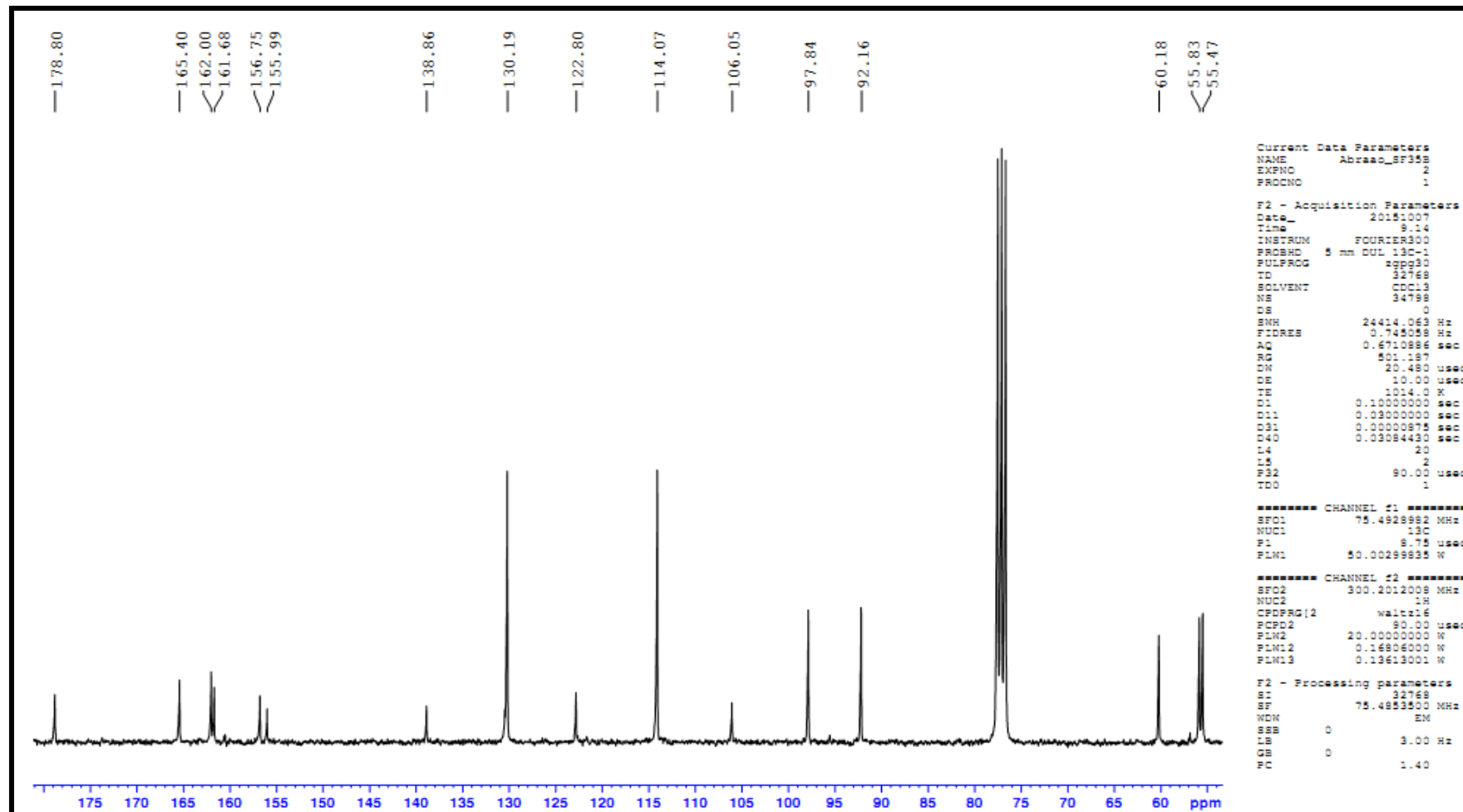
Anexo 51. Espectro de HRMS; $[M+H]^+$ do composto 8



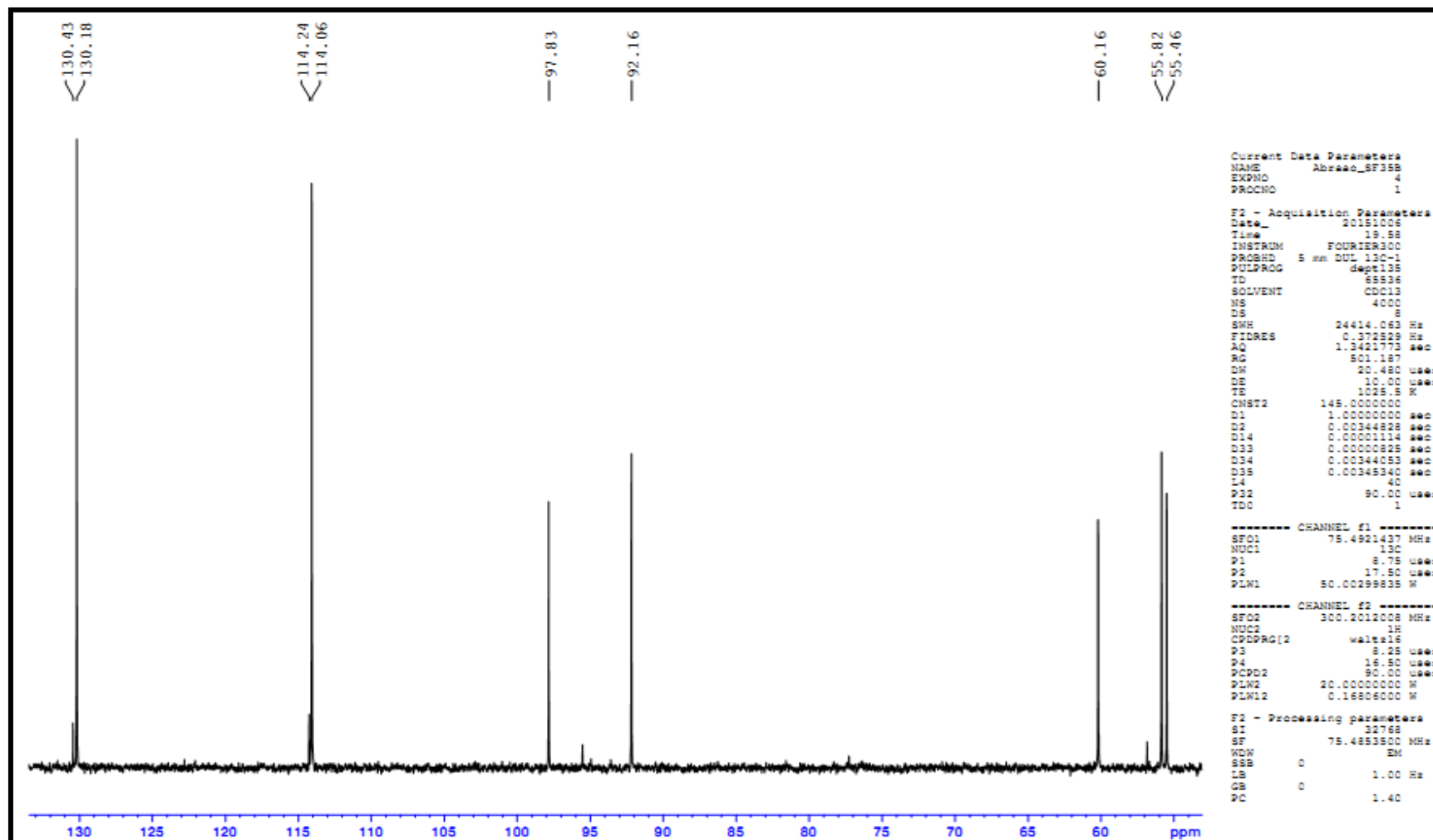
Anexo 52. Espectro de RMN de ^1H do composto **8**, em CDCl_3 , 300 MHz, CDCl_3



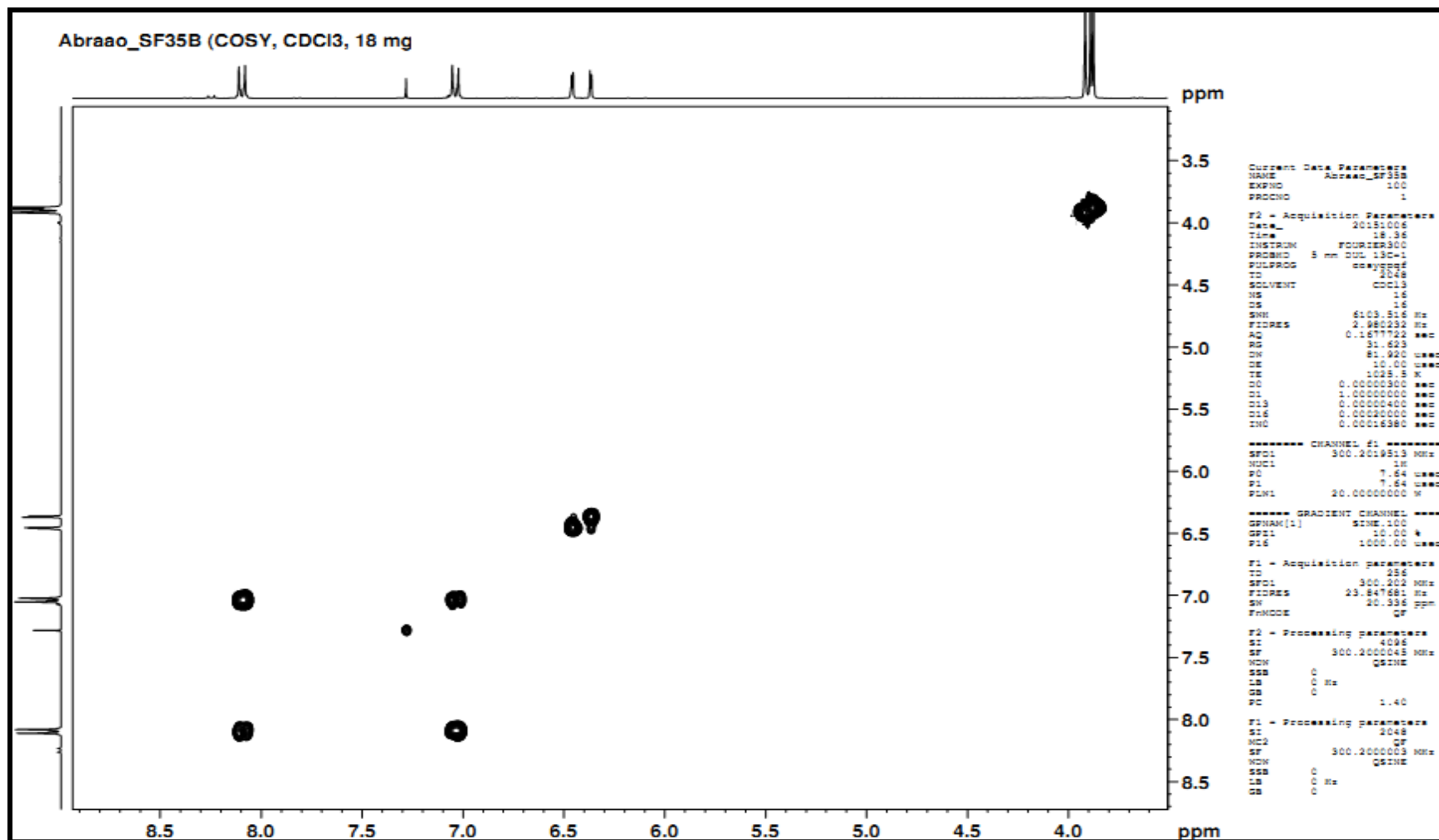
Anexo 53. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **8**, em CDCl_3 , ^{13}C : 75 MHz, CDCl_3



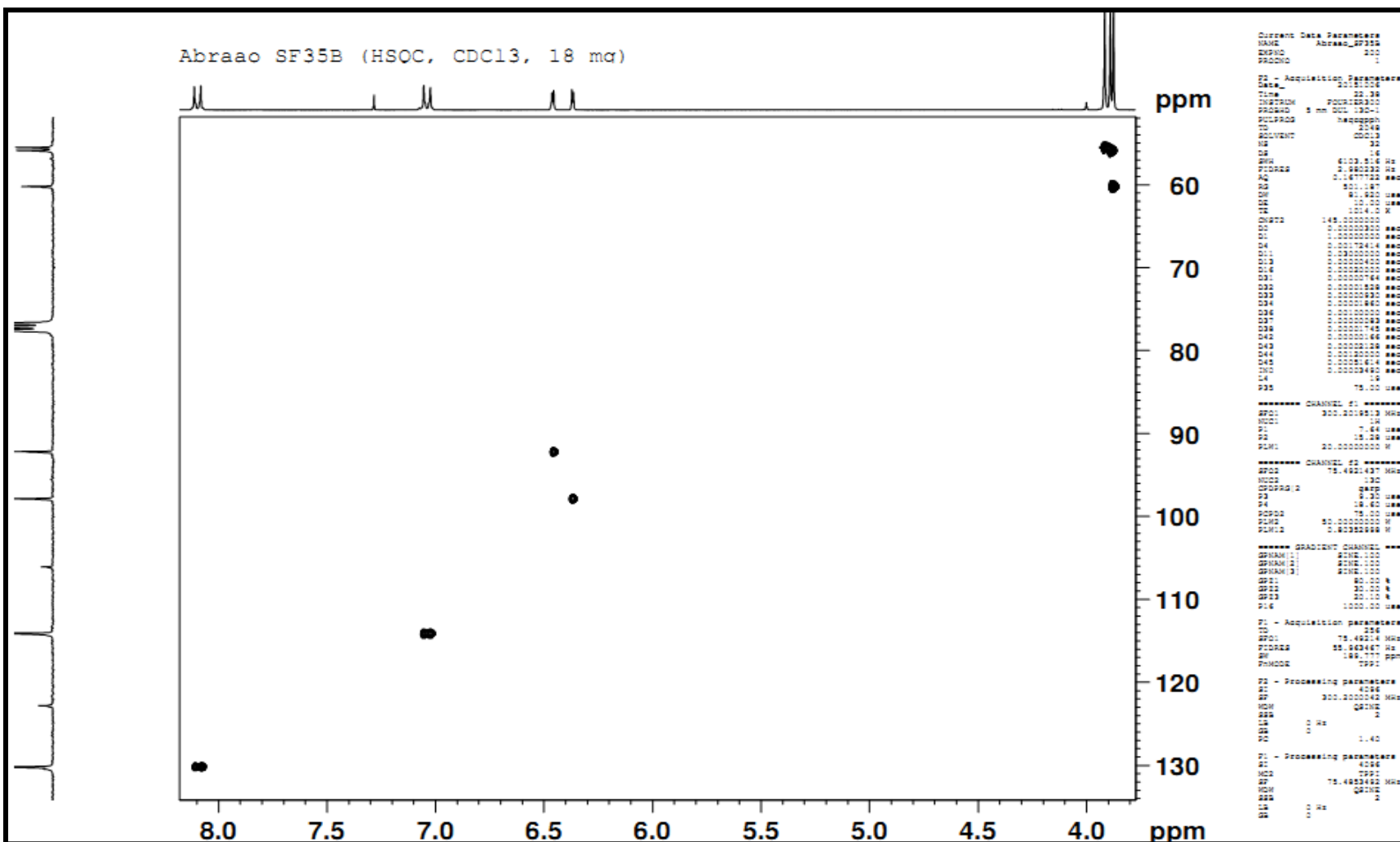
Anexo 54. Espectro de DEPT135 do composto **8**, em CDCl_3 , ^{13}C : 135 MHz.



Anexo 55. Espectro de correlação 1H-1H (COSY) do composto **8**, em CDCl₃, ¹³C: 75 MHz e ¹H: 300 MHz



Anexo 56. Espectro de correlação de ^{13}C - ^1H (HSQC) do composto **8**, em CDCl_3 , ^{13}C : 75 MHz e ^1H : 300 MHz



Anexo 57. Espectro de correlação de ^{13}C - ^1H (HMBC) do composto **8**, em CDCl_3 , ^{13}C : 75 MHz e ^1H : 300 MHz

