

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS E EXTRATOS FIXOS DE *Croton sacaquinha* CROIZAT

JEANE LUIZE PEREIRA KIENEN

MANAUS - AM

2022

JEANE LUIZE PEREIRA KIENEN

**ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS E EXTRATOS FIXOS DE *Croton sakaquinha* CROIZAT**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia na área de concentração saúde.

Orientador: **Dr. Adrian Martin Pohlit**

Coorientadores: **Dr. Francisco Celio Maia Chaves**

Dra. Zelina Estevam dos Santos Torres

MANAUS-AM

2022

Ficha Catalográfica

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

K47a Kienen, Jeane Luize Pereira
Atividade antiplasmódica e composição química de óleos essenciais e extratos fixos de Croton sacaquinha Croizat / Jeane Luize Pereira Kienen . 2022
79 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Adrian Martin Pohlit
Coorientador: Francisco Celio Maia Chaves
Coorientadora: Zelina Estevam dos Santos Torres
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Ácido 3-acetil aleuritólico. 2. Epatulenol. 3. Linalol. 4. Malária. 5. Plasmodium falciparum. I. Pohlit, Adrian Martin. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe, sua força e determinação sempre me levaram e levam a buscar mais e a nunca desistir.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar meus primeiros agradecimentos a minha família, pelo apoio e suporte, pela paciência e incentivos.

A minha mãe por cuidar de mim e passar comigo por tudo isso, minha eterna gratidão.

Aos meus irmãos e tias que sempre estiveram ao meu lado.

Ao meu namorado Robson Andrei, que foi muito importante durante todo esse período, desde que estava estudando pra passar no mestrado ele sempre acreditou que eu seria capaz e mesmo nas horas que eu não achei que fosse conseguir ele acreditou e isso me deu forças pra continuar.

Ao professor Dr. Adrian Martin Pohlit, pela orientação nesse trabalho e contribuição na minha formação.

Aos meus coorientadores pelo suporte e conselhos.

Ao Dr. Humberto Bizzo, pelo apoio nas análises de CG-DIC e CG-EM e aos técnicos da CALTQPN, MSc. Magno Muniz e Dra. Sabrina Moraes, pelo apoio nas análises de RMN.

Aos meus colegas de laboratório do LAPAAM, Edizon, Marlene, Laís, Ronei, Djalma, pelas orientações durante a pesquisa e risadas nas horas de descanso.

A todos meus amigos, de perto ou longe, por me ouvirem e passarem por isso comigo.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao Instituto de Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), onde este trabalho foi desenvolvido;

Ao órgão de fomento CAPES, pelo financiamento do projeto e da bolsa de mestrado concedida.

“Só Deus sabe o quanto eu corri,

E o que fiz pra chegar aqui.

Pra quem tem pensamento forte,

O impossível é só questão de opinião”

(Ferrera e Rocha; Chorão;)

RESUMO

Devido à frequente aquisição de resistência dos parasitos da malária aos fármacos atuais, é de imprescindível importância a descoberta de novas substâncias que possam dar origem a novos tratamentos para esta doença que acomete milhões de pessoas por ano. O estudo de plantas medicinais é uma alternativa promissora como fonte de substâncias antimaláricas e a Amazonia é uma fonte inestimável para tal. Este trabalho investigou a composição química e o potencial antimalárico (antiparasitário) da planta Amazônica *Croton sakaquinha* Croizat. Óleos essenciais (OEs) das folhas, caules e cascas de *C. sakaquinha* foram preparados por hidrodestilação e sua composição química foi caracterizada qualitativamente por cromatografia gasosa com detecção de ionização de chama (CG-DIC) e espectrometria de massas (CG-EM). Foram identificadas 50, 55 e 56 substâncias, respectivamente, nos OEs das cascas (11-15% da área total dos picos: espatulenol, óxido de cariofileno; 5%: ledol, linalol), dos caules (8-12%: cipereno, espatulenol, óxido de cariofileno) e das folhas (8-11%: β -elemeno, germacreno D, linalol, selin-11-en-4- α -ol). Os extratos dessa espécie foram preparados utilizando diversos solventes e os extratos foram avaliados para atividade inibitória *in vitro* frente à cepa K1 (resistente à cloroquina e à pirimetamina) de *Plasmodium falciparum* Welch (espécie causadora da forma mais letal da malária). Inicialmente a triagem do potencial antiplasmódico de 13 extratos da folha e da casca de *C. sakaquinha* foi realizada em duas concentrações (5,0 e 50 $\mu\text{g/mL}$). Nessa triagem os extratos hexânico, de acetato de etila (AcOEt), etanólico e hidroetanólico da casca e os extratos hexânico e etanólico da folha mostraram potencial antiplasmódico (inibição $\geq 80\%$). Devido ao seu potencial antiplasmódico e perfil de cromatografia em camada delgada (CCD), o extrato de AcOEt da casca foi preparado em maior escala e fracionado por cromatografia em coluna, levando ao isolamento do ácido 3-acetil aleuritólico, identificado com base nos resultados da ressonância magnética nuclear (RMN). As determinações das CI_{50} foram realizadas utilizando 7 concentrações de extrato (de 100 a 1,56 $\mu\text{g/mL}$). O extrato etanólico da casca foi ativo ($\text{CI}_{50} = 4,92 \mu\text{g/mL}$), o de AcOEt da casca parcialmente ativo ($\text{CI}_{50} = 16,3 \mu\text{g/mL}$) e o de AcOEt da folha inativo (23,4 $\mu\text{g/mL}$). São resultados inéditos deste estudo: 1) a própria existência de OEs na casca e no caule e a sua composição química; 2) a presença do triterpeno, o ácido 3-acetil aleuritólico, nas cascas e 3) a atividade antiplasmódica das cascas de *C. sakaquinha*, utilizadas na medicina tradicional.

Palavras chaves: ácido 3-acetil aleuritólico; cipereno; espatulenol; linalol; malária; óxido de cariofileno; *Plasmodium falciparum*; selin-11-en-4- α -ol.

ABSTRACT

Due to the frequent acquisition of resistance by parasites to current drugs, it is important to discover new substances that can give rise to new treatments for this disease that affects millions of people every year. The study of medicinal plants is a promising alternative as a source of antimalarial substances and the Amazon is an invaluable source for this. This work investigated the chemical composition and antimalarial (antiparasitic) potential of the Amazonian plant *Croton sacaquinha* Croizat. Essential oils (EOs) from the leaves, stems and bark of *C. sacaquinha* were prepared by hydrodistillation and their chemical composition was qualitatively characterized by gas chromatography using flame ionization detection (GC-FID) and mass spectrometry (GC-MS). Fifty, fifty-five and fifty-six substances were respectively identified in the EOs of the bark (11-15% of the total peak area: caryophyllene, spathulenol; 5%: ledol, linalool), stems (8-12%: caryophyllene oxide, cyperene, spathulenol) and leaves (8-11%: β -elemene, germacrene D, linalool, selin-11-en-4- α -ol). Extracts of this species were prepared using various solvents and the extracts were evaluated for *in vitro* inhibitory activity against the K1 strain (chloroquine and pyrimethamine resistant) of *Plasmodium falciparum* Welch (the species that causes the most lethal form of malaria). Initially, 13 extracts from the leaf and bark of *C. sacaquinha* were screened for antiplasmodial potential in two concentrations (5.0 and 50 $\mu\text{g/mL}$). Hexane, ethyl acetate (EtOAc), ethyl alcohol and ethyl alcohol-water extracts of the bark and hexane extract of the leaves exhibited antiplasmodial potential (inhibition $\geq 80\%$). Due to the antiplasmodial potential and thin layer chromatography (TLC) profile, the bark EtOAc extract was prepared on a larger scale and fractionated by column chromatography, resulting in the isolation of 3-acetyl aleuritolic acid, identified on the basis of its nuclear magnetic resonance (NMR) data. For IC_{50} determinations, 7 concentrations of extract (from 100 to 1.56 $\mu\text{g/mL}$) were used. The bark ethanol and EtOAc extracts were respectively active ($\text{IC}_{50} = 4.92 \mu\text{g/mL}$) and partially active ($\text{IC}_{50} = 16.3 \mu\text{g/mL}$) while the leaf EtOAc extract was inactive ($\text{IC}_{50} = 23.4 \mu\text{g/mL}$). The following are unprecedented results of this study: 1) the very existence of OEs in the bark and stem and their chemical composition; 2) the presence of the triterpene, 3-acetyl aleuritolic acid, in the bark and 3) the antiplasmodial activity of the bark of *C. sacaquinha*, used in traditional medicine.

Keywords: 3-acetyl aleuritolic acid; caryophyllene oxide; cyperene; linalool; malaria; *Plasmodium falciparum*; selin-11-en-4- α -ol; spatulenol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa do Brasil que destaca as áreas de risco para malária, de acordo com os diferentes níveis de incidência parasitária anual – IPA 2019.	19
Figura 2: Mapa da distribuição do <i>Anopheles darlingi</i> no Brasil.	20
Figura 3: Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	23
Figura 4: Antimaláricos quinolínicos: quinina (A), cloroquina (B), mefloquina (C), primaquina (D), tafenoquina (E), bem como a lumefantrina (F).	25
Figura 5: Estrutura da artemisinina e seus derivados.	26
Figura 6: Evolução da resistência de <i>P. falciparum</i> à cloroquina ao redor do mundo até 2006.	27
Figura 7: <i>Trans</i> -desicrotonina (A), clerodano da casca de <i>C. cajucara</i> ; ácido 3-acetil aleuritólico (B), triterpeno de <i>C. cajucara</i> e <i>C. urucurana</i> ; vitexina (C), C-glicosídeo flavonoídico comum a diversas plantas do gênero; glaucina (D), alcaloide isolado de <i>C. lechleri</i>	29
Figura 8: <i>Croton sacaquinha</i> em área de observação e cultivo na Embrapa - CPAA(Manaus-AM).	30
Figura 9: Principais moléculas do OE das folhas de <i>C. sacaquinha</i> . β -elemeno (A), germacreno D (B), linalol (C), β -cariofileno (D).	32
Figura 10: Processamento pós-coleta do material vegetal proveniente da <i>Croton sacaquinha</i> ; A. Raspagem da casca; B. Casca seca.	36
Figura 11: A. Primeiro extrato da casca; B. Último extrato da casca; C. Primeiro extrato da folha; D. Último extrato da folha.	37
Figura 12: Sub-fração cromatográfica J1 (substância isolada) da fração CHCl ₃ do extrato de AcOEt das cascas de <i>C. sacaquinha</i>	44
Figura 13: Estrutura molecular do ácido 3-acetil aleuritólico.	45
Figura 14: Espectro de RMN de ¹ H do ácido 3-acetil aleuritólico em CHCl ₃ (300 MHz).	45
Figura 15: Ampliação do espectro HMBC para o H-3 (δ_H 4,47) e H-15 (δ_H 5,5).	47
Figura 16: Ampliação do espectro HMBC para o H-24 (δ_H 0,89).	47
Figura 17: Ampliação do espectro HMBC para o H-25 (δ_H 0,96a) e H-26.	48
Figura 18: Atribuições das correlações heteronucleares no HMBC para H-27 (δ_H 0,94) e H-16 (β 1,93; α 2,38).	48
Figura 19: Algumas atribuições das correlações observadas no COSY da substância isolada.	49

Figura 20: Estrutura química das principais substâncias dos OEs: espatulenol (A), óxido de cariofileno (B), cipereno (C), β -elemeno (D), linalol (E) e germacreno D (F)..... 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ano de introdução e primeiros registros da resistência do <i>P. falciparum</i> aos antimaláricos mais utilizados.	27
Tabela 2: Rendimentos dos extratos das cascas e das folhas.	43
Tabela 3: Rendimentos das extrações em maior escala.	43
Tabela 4: Dados de RMN 1D e 2D da substância isolada (^1H -300/ ^{13}C -75 MHz; ppm; CDCl_3).	50
Tabela 5: Dados de RMN de ^{13}C da substância isolada e dados da literatura para o ácido 3- acetil aleuritólico.....	51
Tabela 6: Inibição do crescimento <i>in vitro</i> de <i>P. falciparum</i> dos extratos da casca.	52
Tabela 7: Inibição do crescimento <i>in vitro</i> de <i>P. falciparum</i> dos extratos da folha.....	52
Tabela 8: Inibição <i>in vitro</i> de <i>P. falciparum</i> por extratos de <i>Croton sacaquinha</i>	53
Tabela 9: Rendimentos das extrações dos OEs de <i>C. sacaquinha</i>	54
Tabela 10: Composição química do OE da casca de <i>C. sacaquinha</i>	54
Tabela 11: Substâncias com área de pico > 5% do total de área do OE da casca.....	55
Tabela 12: Total dos componentes por classe química do OE da casca de <i>C. sacaquinha</i>	55
Tabela 13: Composição química do OE do caule de <i>C. sacaquinha</i>	56
Tabela 14: Substâncias com valores acima de 5% do total do OE do caule.	57
Tabela 15: Total dos componentes por classe química do OE do caule de <i>C. sacaquinha</i>	57
Tabela 16: Composição química do OE da folha de <i>C. sacaquinha</i>	58
Tabela 17: Comparação com a literatura para substâncias com valores >5% do total do óleo.	59
Tabela 18: Total dos componentes por classe química do OE da folha de <i>C. sacaquinha</i>	59
Tabela 19: Principais componentes químicos dos OEs de <i>C. sacaquinha</i>	60

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1: Partição realizada para o extrato de cascas <i>C. sacaquinha</i> (JK10B).....	38
Fluxograma 2: Fracionamento cromatográfica da fração CHCl ₃ e isolamento da substância (sub-fração J1) de <i>C. sacaquinha</i>	39

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1: Espectro de RMN de ^1H do ácido 3-acetil aleuritólico em CHCl_3 (300 MHz).....	72
ANEXO 2: Ampliação do espectro de RMN de ^1H do ácido 3-acetil aleuritólico em CHCl_3 (300 MHz).....	73
ANEXO 3: Espectro de RMN de ^{13}C do ácido 3-acetil aleuritólico em CHCl_3 (300 MHz).....	74
ANEXO 4: Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do ácido 3-acetil aleuritólico em CHCl_3 (300 MHz).....	75
ANEXO 5: Espectro de DEPT 135 do ácido 3-acetil aleuritólico em CHCl_3 (300 MHz).....	76
ANEXO 6: Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HSQC do ácido 3-acetil aleuritólico em CHCl_3 (300 MHz).....	77
ANEXO 7: Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HMBC do ácido 3-acetil aleuritólico em CHCl_3 (300 MHz).....	78
ANEXO 8: Espectro de correlação ^1H - ^1H COSY do ácido 3-acetil aleuritólico em CHCl_3 (300 MHz).....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D – Unidimensional

2D – Bidimensional

AcOEt – Acetato de etila

BRS - Bactérias redutoras de sulfato

CA - Central Analítica

CCD - Cromatografias de camada delgada

CG - Cromatografia gasosa

CI₅₀ - Concentração inibitória de 50%

COSY - *Correlation spectroscopy*

CPAA - Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Ocidental

CTA - Conhecimento tradicional associado

d - Dubleto

dd - Duplo dubleto

DMSO - Dimetilsulfóxido

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

F. CHCl₃ – Fração clorofórmica

FMT- HVD - Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado

G6PD - Glicose-6-fosfato desidrogenase

HMBC - *Heteronuclear multiple bond coherence*

HSQC - *Heteronuclear single quantum correlation*

IC - Intervalo de confiança

INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

IPA - Incidência parasitária anual

J - Constante de acoplamento

K1 - Cepa de *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina e pirimetamina

LTQPN - Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais

m - Multiplete

MS – Ministério da Saúde

NIST - National Institute of Standards and Technology

OEs - Óleos essenciais

OMS - Organização Mundial de Saúde

RMN - Ressonância magnética nuclear

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

s - Singleto

SGM - Sub-região do Grande Mekong

sl - Singleto largo

TCA - Tratamento combinado à base de artemisinina

TDRs - Testes de diagnósticos rápidos

UV - Ultravioleta

δ - Deslocamento químico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1. Malária	18
2.1.1 Vetores da malária de relevância nacional.....	19
2.1.2 Sintomas e diagnóstico.....	20
2.1.3 Ciclo biológico do parasito	21
2.2 Plantas medicinais e a malária	23
2.2.1 Quinina de <i>Cinchona</i> L. e análogos sintéticos	24
2.2.2 Artemisinina de <i>Artemisia annua</i> L. e seus derivados	25
2.2.3 Resistência a antimaláricos	26
2.3 Família Euphorbiaceae Juss. e gênero <i>Croton</i> L.....	28
2.3.1 <i>Croton sacaquinha</i> Croizat	29
2.4 Atividades biológicas de constituintes encontrados nos OE e <i>C. sacaquinha</i>	31
3. OBJETIVOS.....	33
3.1. Geral	33
3.2 Específicos	33
4. MATERIAL E METODOS	34
4.1 Procedimentos experimentais gerais	34
4.1.2 Equipamentos e aparelhos analíticos.....	34
4.3.3 Ressonância magnética nuclear (RMN).....	35
4.1.3 Coleta e processamento do material vegetal	35
4.2 Preparação dos extratos.....	35
4.2.1 Extração em escala menor.....	35
4.2.2 Preparação de extratos por decocção e infusão	37
4.2.3 Extração em escala maior.....	37

4.3 Isolamento da substância de <i>C. sacaquinha</i>	38
4.3.1 Partição líquido/líquido: extração com hexanos e clorofórmio	38
4.3.4 Fracionamento cromatográfico.	39
4.4 Testes antimaláricos	39
4.4.1 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Plasmodium falciparum</i>	39
4.4.2 Microteste de suscetibilidade <i>in vitro</i>	40
4.4.3 Análise estatística dos dados	41
4.5 Análise dos óleos essenciais (OEs) de <i>C. sacaquinha</i>	41
4.5.1 Extração dos OEs	41
4.5.2 Caracterização dos OEs.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Rendimentos de extratos	43
5.1.1 Rendimentos dos extratos preparados em menor escala	43
5.1.2 Rendimentos extratos em maior escala	43
5.2 Identificação da substância isolada (sub-fração J1) de <i>C. sacaquinha</i>	44
5.2.1 Elucidação estrutural da substância isolada por RMN.....	44
5.3 Testes antiplasmódicos.....	51
5.3.1 Resultado da triagem inicial dos extratos.....	51
5.3.2 CI ₅₀ dos extratos	53
5.4 Óleos essenciais (OEs).....	53
5.4.1 Rendimentos dos OEs	53
5.4.5 Substâncias de maior relevância nos OEs de <i>C. sacaquinha</i>	60
6. CONCLUSÃO	62
7. ANEXOS.....	72

1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença causada por parasitas do gênero *Plasmodium* que causou no ano de 2020 aproximadamente 241 milhões de casos, levando a óbito 627.000 vítimas. Essa doença apresenta um grave problema de saúde pública que acomete principalmente países de regiões tropicais e subtropicais do globo. No Brasil, a região Amazônica concentra 99,9% de todos os casos (OMS, 2021; MS, 2021a).

A recorrente obtenção de resistência dos plasmódios aos antimaláricos disponíveis no mercado atual tem sido fonte de grande preocupação. O parasito vem adquirindo resistência a esses medicamentos desde as suas implantações, mostrando ter uma grande capacidade adaptativa. A partir de vários estudos já foi confirmada a resistência aos tratamentos combinados à base de artemisinina (TCAs), terapia indicada atualmente para o tratamento em primeira e segunda linha da doença (OMS, 2021).

Atualmente a busca por fármacos que tenham efeito antimalárico ainda encontra nas plantas uma grande fonte para novos princípios ativos. Estima-se que mais de 90% das classes terapêuticas derivam de protótipos naturais (BARREIRO *et al.*, 2015). A floresta Amazônica apresenta, nesse âmbito, uma variedade inestimável de plantas com propriedades medicinais não estudadas. Através de estudos catalográficos de plantas que já são usadas no tratamento de sintomas da malária por comunidades tradicionais da região (OLIVEIRA *et al.*, 2015) foi possível afunilar a nossa busca na seleção da espécie a ser investigada.

A *Croton sakaquinha* Croizat é uma planta nativa da Amazônia, utilizada por comunidades tradicionais remanescentes de quilombos no município de Oriximiná no estado do Pará para tratar os sintomas comuns da malária. O objetivo foi avaliar o potencial da atividade antimalárica *in vitro* de extratos preparados a partir dessa planta e purificar moléculas antimaláricas a partir desses extratos. Também foi feita a caracterização da composição química dos óleos essenciais da folha, casca e caule.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Malária

A malária é uma doença causada por protozoários do gênero *Plasmodium* Marchiafava & Celli e acomete milhões de pessoas por ano. Em 2020 foram estimados 241 milhões de casos e um gasto de 2,7 bilhões de dólares do fundo de recursos para o tratamento dessa doença. As mortes por malária durante o período de 2000-2020 foram de 896.000 em 2000 para 558.000 em 2019, com um aumento no ano de 2020 em 12%. Na região das Américas, os casos de malária foram reduzidos em 56% e a taxa de mortalidade em 66% durante esse mesmo período de tempo (OMS, 2021).

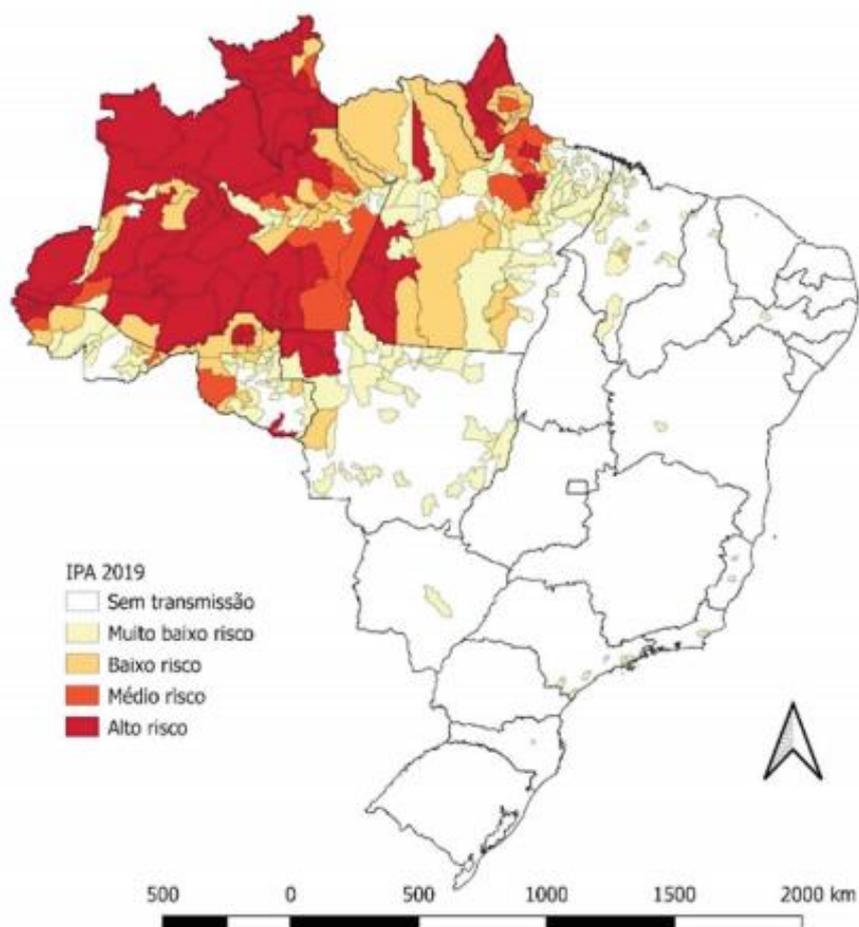
As espécies associadas à malária humana são: *P. falciparum* Welch, *P. malariae* Grassi & Feletti, *P. ovale* Stephens, *P. simium* Fonseca, *P. knowlesi* Sinton e Mulligan e *P. vivax* Grassi & Feletti. No Brasil já houve registro da ocorrência da malária causada por todas essas espécies, porém para *P. ovale* foram casos importados de países do continente africano, não havendo registro de transmissão autóctone deste (MS, 2021b).

Nas Américas, cerca de 138 milhões de pessoas em 19 países e territórios estão em regiões onde há risco para malária. Quase 80% das infecções de malária nessa parte do mundo são causadas por *P. vivax*. Três países – Brasil, Colômbia e Venezuela (República Bolivariana) – respondem por 86% de todos os casos estimados. A Venezuela teve um grande aumento no número de casos desde 2000, passando de 35.500 casos para mais de 467.000 em 2019. A maioria das mortes nesta região foi em adultos (77%) (OMS, 2021).

No Brasil ocorreram 145.188 casos de malária em 2020, sendo que 89,3% foram infecções causados pelo *P. vivax* e 10,7% pelo *P. falciparum* (10% do total de casos envolvem infecções mistas, por ambas as espécies ao mesmo tempo). Os casos de malária por *P. falciparum* e malária mista estão frequentemente associados aos quadros mais graves de malária. A região Amazônica, onde se concentra a malária no Brasil (99,9% dos casos), é formada pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (MS, 2021a).

A incidência parasitária anual (IPA) é utilizada como o indicador de risco para infecção por malária no Brasil. A estratificação de IPA de malária contempla quatro categorias: municípios em muito baixo risco (IPA < 1 caso/1.000 habitantes), baixo risco (IPA entre 1 e 10 casos/1.000 habitantes), médio risco (IPA entre 10 e 50 casos/1.000 habitantes) e alto risco (IPA \geq 50 casos/1.000 habitantes). Na figura 1 está representado o mapa do IPA para todo o país. O estado do Amazonas concentra a maior parte dos registros de casos e contribuiu com 41,1% do total de casos de da região Amazônica no ano de 2020 (MS, 2021a).

Figura 1: Mapa do Brasil que destaca as áreas de risco para malária, de acordo com os diferentes níveis de incidência parasitária anual – IPA 2019.



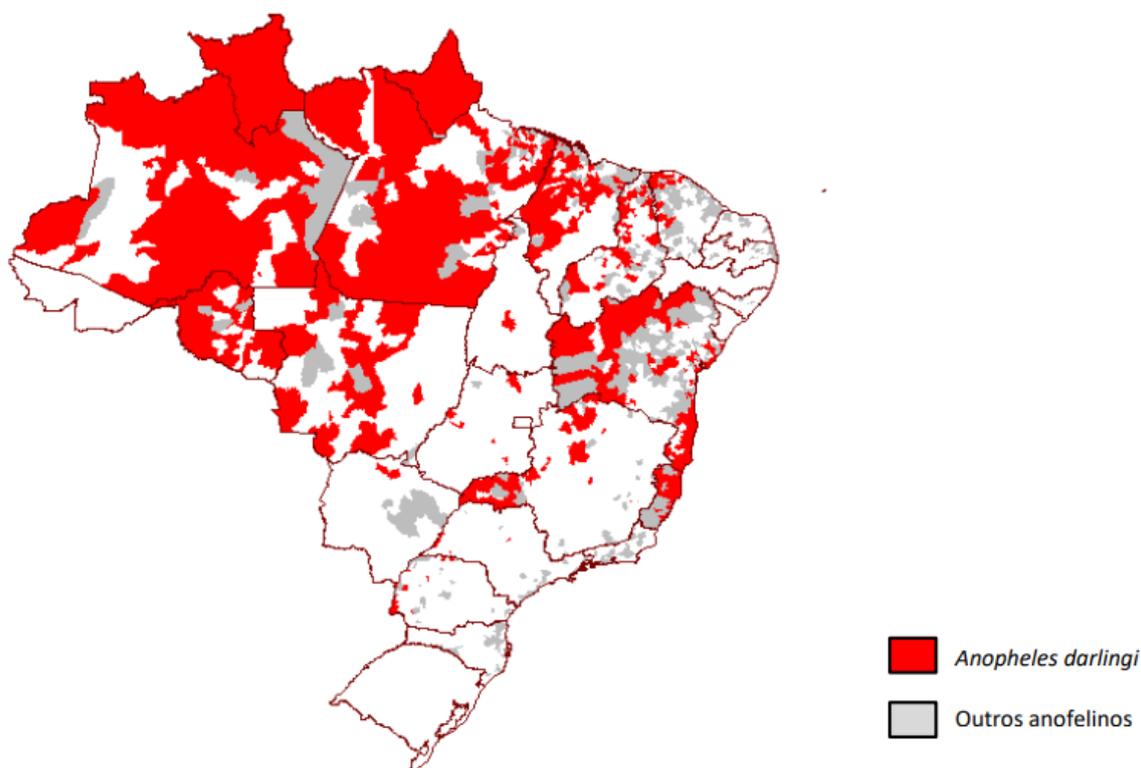
Fonte: Sivep – Malária (2020).

2.1.1 Vetores da malária de relevância nacional

A malária humana é transmitida pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles* Meigen

infectada por *Plasmodium*. Existem mais de 400 espécies de *Anopheles*, mas somente cerca de 40 dessas são capazes de transmitir aos humanos o parasito da malária (BHATT *et al.*, 2015). No Brasil o *Anopheles darlingi* Root é o principal vetor da doença. Vive em regiões tropicais e subtropicais, na América Central e na América do Sul, em áreas de baixas altitudes, preferindo grandes corpos d'água onde tenha pouca ou nenhuma correnteza (Figura 2). Embora o *A. darlingi* esteja presente em 80% do país, a incidência de malária no Brasil é quase que exclusivamente na região amazônica (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010).

Figura 2: Mapa da distribuição do *Anopheles darlingi* no Brasil.



Fonte: Sivep - MS (2014).

2.1.2 Sintomas e diagnóstico

Os primeiros sintomas da malária são comuns a muitas outras infecções virais e parasitárias. As manifestações clínicas variam de acordo com a espécie do parasito, da quantidade de parasitos circulantes (parasitemia), do tempo de doença e do nível de imunidade adquirida pelo paciente. Os sintomas iniciais dessa doença são dor de cabeça, dores musculares, náuseas e tonturas, acompanhados de calafrios, tremores, febre alta e suor (MS, 2021b).

Se o paciente não receber terapêutica específica, adequada e oportuna, os sintomas poderão evoluir para formas graves e complicadas. São sinais de malária grave e complicada: anemia grave, acidose metabólica, hiperlactatemia, hiperparasitemia ($> 250.000/\text{mm}^3$ para *P. falciparum*), hipoglicemia e insuficiência renal. As formas graves podem causar alteração de consciência, delírio e coma e estão relacionadas à parasitemia elevada, acima de 2% das hemácias parasitadas, podendo atingir até 30% dos eritrócitos (MS, 2021b).

O diagnóstico é por meio da técnica de gota espessa de sangue, colhida por punção digital e corada pelo método de Walker, seguida de análise microscópica visando encontrar os parasitos no sangue. Esse exame é considerado padrão ouro na detecção e identificação dos parasitos permitindo até diferenciar as espécies e identificar o estágio de evolução do parasito circulante (MS, 2021b). Outro diagnóstico bastante utilizado são os testes de diagnósticos rápidos (TDRs), que detectam antígenos dos parasitos no sangue por meio de métodos imunocromatográficos.

A malária grave é frequentemente causada pelo *P. falciparum*, porém há casos de malária grave causadas por *P. vivax*, espécie mais frequente no Brasil, e *P. knowlesi*, espécie responsável por malária em humanos no Sudeste Asiático (Oliveira-Ferreira, 2010). Mulheres grávidas, crianças e portadores de comorbidades, como doenças hepáticas crônicas, doenças cardiovasculares, comprometimento imune e deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) são mais propensos a complicações. Um diagnóstico rápido e correto é imprescindível para o tratamento adequado da doença (MS, 2021).

2.1.3 Ciclo biológico do parasito

O ciclo biológico do *Plasmodium* ocorre nos humanos, entre outros hospedeiros vertebrados, e nos mosquitos, hospedeiro invertebrado. A infecção inicia-se quando a fêmea do mosquito anofelino inocula a forma infectante do protozoário, o esporozoíto, que cai na corrente sanguínea do seu novo hospedeiro e em aproximadamente 1 hora, 70% dos esporozoítos alcançam os vasos sanguíneos e 30% os vasos linfáticos. Ao invadirem as células hepáticas (hepatócitos) inicia-se a formação de um vacúolo parasitóforo onde os esporozoítos irão se reproduzir assexuadamente por meio da esquizogonia, ficando repleto de esquizontes teciduais que mais tarde se transformarão em milhares de merozoítos que serão liberados diretamente na corrente sanguínea pelos merossomos. Essa primeira fase do ciclo é

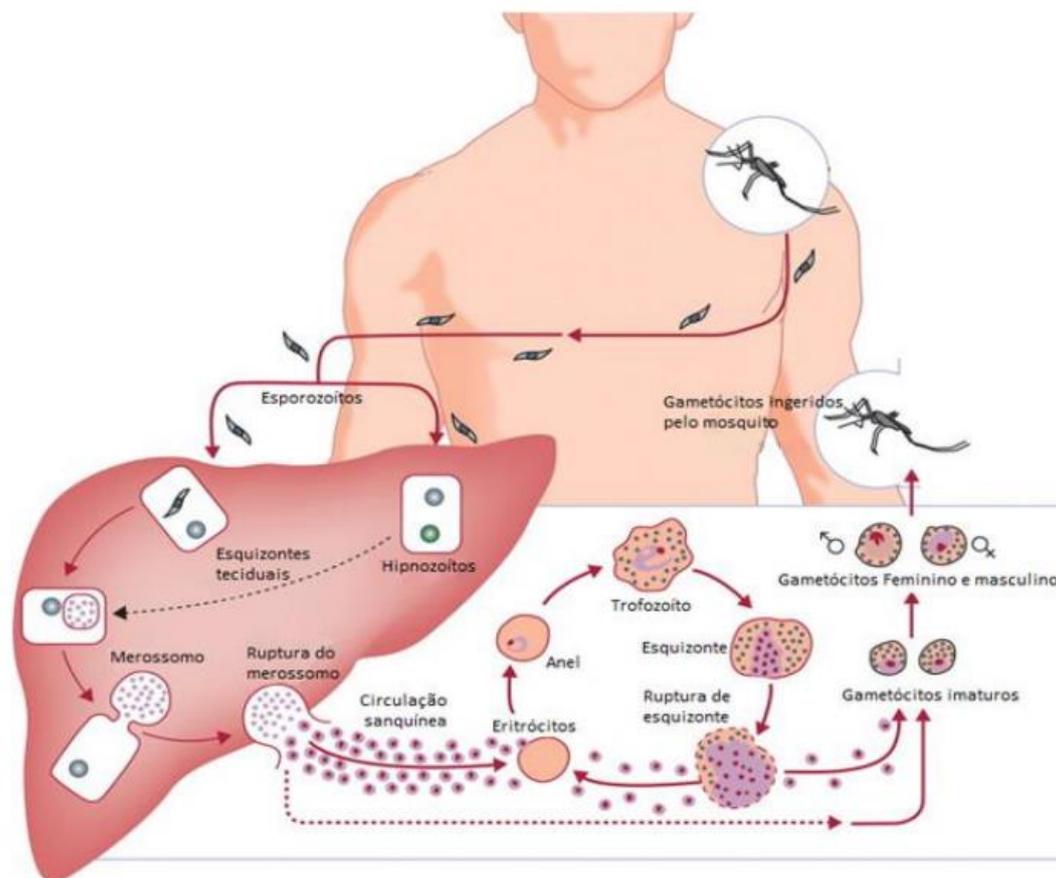
denominada exoeritrocítica ou pré-eritrocítica pois precede o ciclo sanguíneo do parasito (ERIKA e NEVES, 2016).

Os merozoítos invadem os eritrócitos e multiplicam-se assexuadamente por esquizogonia, levando a formação (esquizontes) de novos merozoítos que, após romper e lisar a célula onde se localizavam, irão cair na corrente sanguínea e invadir novos eritrócitos saudáveis e assim continuar o ciclo eritrocítico. O ciclo sanguíneo se repete sucessivas vezes, a cada 48 horas, nas infecções por *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, e a cada 72 horas, nas infecções pelo *P. malariae*. Além da diferença do tempo das infecções os protozoários também se diferenciam no momento da infecção dos eritrócitos. Por exemplo *P. falciparum* invade hemácias em qualquer estágio de maturação, *P. malariae* tem preferência por hemácias já maduras e *P. vivax* invade apenas reticulócitos, que são hemácias imaturas (jovens) (ERIKA e NEVES, 2016).

Após alguns ciclos eritrocíticos ocorre a diferenciação dos merozoítos na forma sexuada, os gametócitos, que não se dividem e que seguirão o seu desenvolvimento no mosquito vetor. É importante ressaltar que infecções por *P. vivax* apresentam gametócitos circulantes desde o primeiro dia da infecção clínica, enquanto a infecção por *P. falciparum* apresenta gametócitos na circulação periférica apenas tardiamente, após 7 dias de infecção (MS, 2021).

A infecção do mosquito ocorre quando a fêmea do *Anopheles* se alimenta em um hospedeiro durante o período de viremia, ingerindo dessa forma o sangue contaminado (Figura 3). Apenas os gametócitos serão capazes de dar continuidade do ciclo no mosquito. Esses gametócitos, já no trato digestivo do mosquito se diferenciam em macrogametas (gametócitos femininos) e microgametas (gametócitos masculinos). Em 20-30 minutos, um microgameta fecundará um macrogameta, formando o ovo ou zigoto (diploide). Dentro de 24 horas após a fecundação, o zigoto passa a movimentar-se por contrações do corpo, sendo denominado oocineto. Esse oocineto, após atingir a parede do intestino médio do mosquito, se transforma em um cisto, o oocisto, que se divide em esporozoítos e dentro de 9 a 14 dias rompe e libera os esporozoítos (haploides) que migram pelo corpo do mosquito até as glândulas salivares onde se alojam à espera do próximo repasto sanguíneo da fêmea para infectar um novo hospedeiro vertebrado (ERIKA e NEVES, 2016).

Figura 3: Ciclo de vida do *Plasmodium*.



Fonte: Adaptado de Mueller *et al.* (2009).

2.2 Plantas medicinais e a malária

Apesar dos medicamentos disponíveis para o tratamento da malária, por razões econômicas, geográficas e até culturais, remédios à base de plantas são amplamente utilizados. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que em torno de 80% da população mundial nos países em desenvolvimento utilizam medicamentos vegetais tradicionais para cuidados de saúde, dos quais uma grande proporção corresponde aos extratos de plantas ou aos seus princípios ativos (MS, 2016).

Em um estudo recente feito por Pimentel e colaboradores (2015), chegou-se à conclusão que pelo menos 27% de novas entidades químicas registradas no mundo nos últimos trinta anos (1981-2010) têm clara relação com a biodiversidade e incluem produtos naturais, fitoterápicos (extratos não isolados) ou fitoquímicos, e substâncias purificadas extraídas diretamente do

metabolismo de seres vivos encontrados na natureza e 24% de sintéticos oriundos de produtos naturais.

Oliveira *et al.* (2015) realizou um estudo na comunidade quilombola de Oriximiná no Pará, para catalogar as plantas utilizadas pela comunidade para tratar os sintomas da malária. Da entrevista com 35 membros da comunidade foram listadas 40 plantas de 37 gêneros como antimaláricas. Das 40 plantas listadas consta a espécie *Croton sacaquinha* Croizat. A parte utilizada pela comunidade são as cascas e foi indicada para tratamento do fígado, da malária e para enxaqueca. Das 11 plantas selecionadas por Oliveira *et al.* para serem testadas contra o *Plasmodium* em seu estudo, *C. sacaquinha* não foi escolhida, sendo selecionada no presente trabalho, para maiores investigações sobre suas propriedades químicas e atividade biológica.

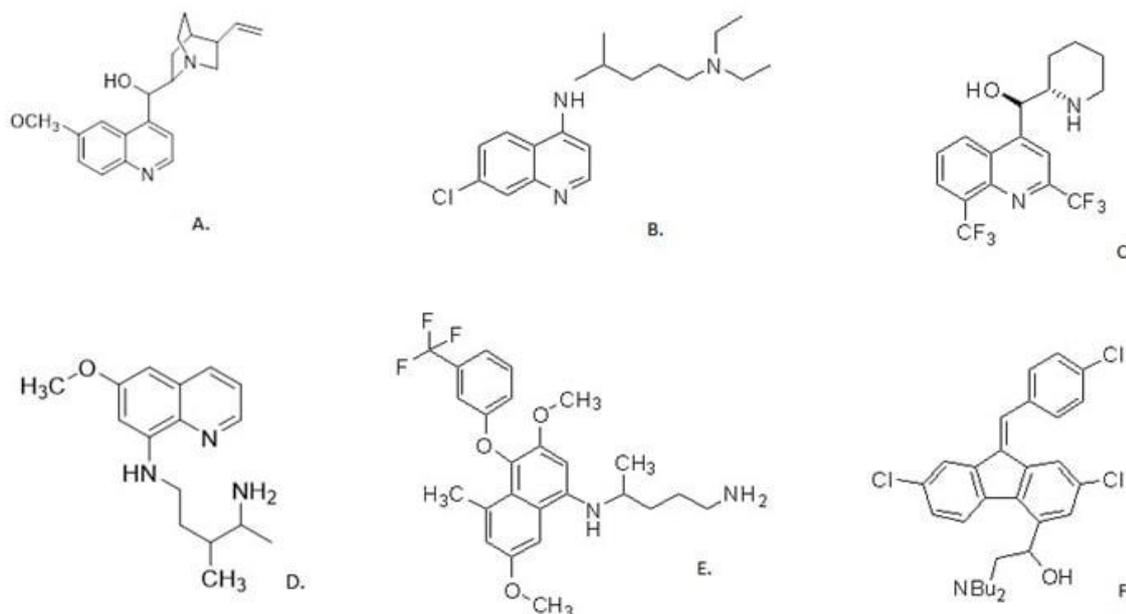
2.2.1 Quinina de *Cinchona* L. e análogos sintéticos

No século XVII no Peru foi registrado o uso da infusão das cascas de várias árvores pertencentes a espécies de *Cinchona* L. (Rubiaceae) para fazer extratos que eram usados para tratar a febre alta e outros sintomas conhecidos da malária. Este tipo de tratamento ficou famoso pela sua eficácia e foi levado a outros países, se difundindo no mundo. Muitos anos depois, em 1820 os pesquisadores franceses Pelletier e Caventou isolaram e identificaram da casca dessas plantas, a quinina (figura 4.A) que foi a primeira substância (fármaco) usada para o tratamento da malária, doença que matava milhares na época (BOULOS *et al.*, 1997). Esta droga apresenta ação esquizontocida exercendo pouco efeito sobre esporozoítos ou as formas pré-eritrocíticas dos parasitas da malária (BUTLER *et al.*, 2010).

A quinina serviu de modelo para síntese de novas drogas para o tratamento da malária. Ela faz parte da família das quinolinas que incluem também a cloroquina (**B**), que é uma 4-aminoquinolina, ativas contra formas eritrocíticas, e um importante fármaco, previamente caracterizada pela sua eficácia, baixa toxicidade, baixo custo e uma síntese relativamente simples (OGUNGBAMIGBE *et al.*, 2008). Foi desenvolvida em 1940 e utilizada amplamente como monoterapia. Seu uso indiscriminado levou ao surgimento de cepas de *P. falciparum* resistentes a essa droga, e apesar da prevalência da resistência a cloroquina, esta droga continua sendo extensamente utilizada, devido a seu custo reduzido e disponibilidade nos países afetados (GUERIN *et al.*, 2002).

Outros análogos sintéticos da quinina são a mefloquina (C), um 4-quinolinometano e, a lumefantrina (F), um álcool arilamínico. Esses últimos possuem atividade esquizotóxica potente, porém, de curta duração. A primaquina (D) e a tafenoquina (E) são do grupo das 8-aminoquinolinas e são as únicas da classe capazes de eliminar os hipnozoítos dormentes no fígado causados pelas infecções por *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*. As 8-aminoquinolinas são utilizadas em combinação com algum esquizotóxica potente (cloroquina, mefloquina ou lumefantrina), onde o esquizotóxica age contra as formas eritrocitárias assexuadas e gametocíticas, controlando os sintomas clínicos e a parasitemia, e a primaquina e tafenoquina atuam como hipnozoitocidas (MS, 2021b).

Figura 4: Antimaláricos quinolínicos: quinina (A), cloroquina (B), mefloquina (C), primaquina (D), tafenoquina (E), bem como a lumefantrina (F).



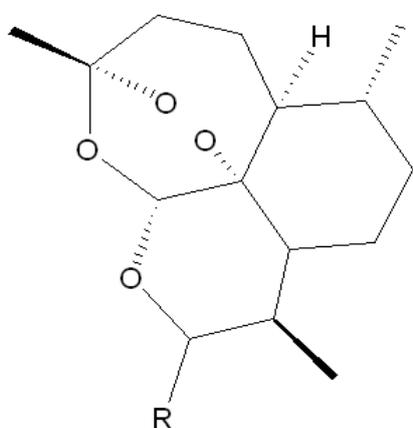
2.2.2 Artemisinina de *Artemisia annua* L. e seus derivados

A artemisinina (figura 5) foi isolada em 1971 a partir da *Artemisia annua* L., uma planta cujas infusões são utilizadas na China por mais de um século e meio para febres severas como a da malária. Posteriormente foi comprovada a eficiência dessa planta diante as cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina (TU, 2011). A partir da artemisinina foram sintetizados cinco derivados, sendo eles, a diidroartemisinina, o artemeter, o arteeter, o artesunato de sódio e a 10-deoxoartemisinina (Figura 5), que atuam mais rapidamente que outros antimaláricos,

tanto na morte dos parasitas quanto na inibição de processos metabólicos importantes (KRISHNA *et al.*, 2004).

A OMS recomenda um tratamento combinado à base de artemisinina (TCA) como tratamento de primeira e segunda linha para malária por *P. falciparum* não complicada, bem como para malária por *P. vivax* resistente à cloroquina. Os TCAs combinam um derivado da artemisinina com um medicamento parceiro como a lumefantrina, a mefloquina, a amodiaquina ou a sulfadoxina-pirimetamina (ADAM *et al.*, 2010).

Figura 5: Estrutura da artemisinina e seus derivados.



R	Composto
=O	Artemisinina
OH	Dihidroartemisinina
OCH ₃	Artemeter
OC ₂ H ₅	Arteeter
OCO(CH ₂) ₂ COONa	Artesunato de sódio

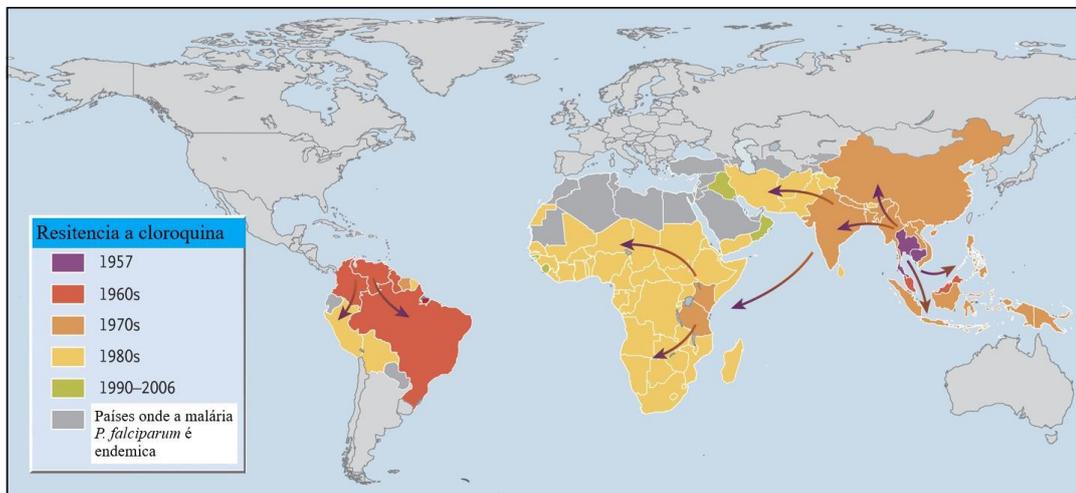
2.2.3 Resistência a antimaláricos

A ocorrência de mutações gênicas espontâneas e a pressão seletiva desenvolvida pelos medicamentos sobre as populações de parasitos fez surgir cepas resistentes a medicamentos antimaláricos (MACKINNON, 2005). O primeiro caso de resistência à cloroquina registrado ocorreu na Tailândia em 1957, para cepas de *P. falciparum*, e se espalhou por outros lugares do mundo, como mostra a figura 6. Logo em seguida na década 60 já foi possível observar cepas de *P. falciparum* resistentes a cloroquina na região amazônica e nordeste do Brasil (REYES, 1981).

Atualmente, três das seis espécies de parasitos causadores de malária humana apresentam resistência às drogas antimaláricas: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malarie*. O primeiro relato de resistência de *P. vivax* à cloroquina e mefloquina no Brasil surgiu no final

dos anos 1990 em Manaus (ALECRIM *et al.*, 1999). A resistência tem emergido para todas as classes de medicamentos antimaláricos mais utilizadas atualmente, como mostra a tabela 1.

Figura 6: Evolução da resistência de *P. falciparum* à cloroquina ao redor do mundo até 2006.



Fonte: Packard (2014)

Tabela 1: Ano de introdução e primeiros registros da resistência do *P. falciparum* aos antimaláricos mais utilizados.

Fármaco	Introduzido em	Primeiro registro de resistência
Quinina	1632 †(1822)‡	1910
Cloroquina	1945	1957
Sulfadoxina-Pirimetamina	1967	1967
Mefloquina	1977	1982
Artemisinina	1971	1998

†em infusos de *Cinchona* spp. ‡quinina em forma pura de *Cinchona* sp.

Fonte: adaptado de OMS (2010).

Quando introduzidos, os TCAs foram altamente eficazes e contribuíram para a diminuição acentuada da malária nas últimas décadas. No entanto, parasitas com menor suscetibilidade aos artemisininos surgiram na Sub-região do Grande Mekong (GMS), seguido pela falha dos TCAs, devido tanto à diminuição da suscetibilidade à artemisinina quanto à resistência aos medicamentos parceiros (NSANZABANA, 2019).

O parasito tem demonstrado grande capacidade de adaptação e a resistência dos parasitas aos antimaláricos representa um grande obstáculo para a eliminação e contenção da

malária. É de grande importância que as pesquisas por novas substâncias antimaláricas continuem em desenvolvimento em busca de tratamentos alternativos que possam vir a auxiliar no combate à doença.

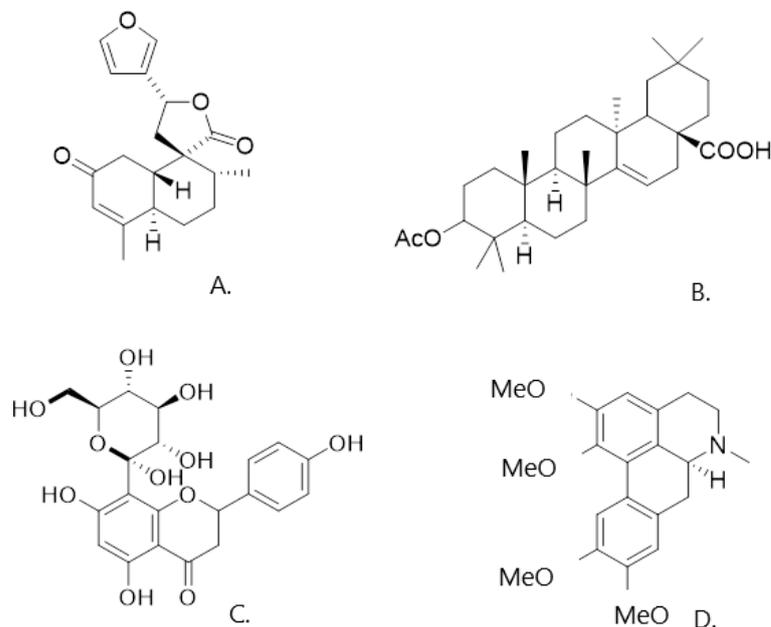
2.3 Família Euphorbiaceae Juss. e gênero *Croton* L.

As Euphorbiaceae constituem uma família que se caracteriza por apresentar uma grande variedade morfológica, ocorrendo nas formas arbóreas, arbustivas, subarbustos, ervas, lianas (trepadeiras) e as vezes suculentas ou com aspectos de cactos. São encontradas em ambientes variados, mas preponderantemente em regiões tropicais. É composta por aproximadamente 334 gêneros, 8.000 espécies (CARUZO *et al.*, 2022).

O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) encontra-se amplamente distribuído em todo o mundo, com concentração significativa na África, Brasil e México. Possui cerca de 1.300 espécies de árvores, arbustos e ervas. São muito conhecidas por seus usos na medicina popular como tratamento para os mais diversos problemas de saúde como o câncer, constipação intestinal, diarreia, diabetes, dor, febre, feridas externas, hipercolesterolemia, hipertensão, inflamação, malária, úlceras e vermes intestinais (SALATINO *et al.*, 2007). Em relação às plantas desse gênero, estudos comprovam a eficácia de uma espécie da África no tratamento contra a malária, a *C. pseudopulchellus* Pax com concentração inibitória de 50% (CI₅₀) igual 3,45 µg/mL (PROZESKY *et al.*, 2001) e a *C. lobatus*, comum nas Américas, da Flórida (EUA) à Argentina, com um CI₅₀ igual a 2,80 µg/mL que são consideradas amostras ativas no intervalo $10 \mu\text{g/mL} \geq \text{CI}_{50} > 1,0 \mu\text{g/mL}$ (WENIGER *et al.*, 2004).

O gênero é rico em constituintes com atividades biológicas, principalmente os terpenóides como os diterpenóides, triterpenóides e esteroides. *Croton* também é rico em alcalóides ativos, fato que aumenta consideravelmente a importância do gênero do ponto de vista medicinal. Substâncias fenólicas, que atuam como antioxidantes combatendo os radicais livres, têm sido frequentemente relatadas, dentre as quais predominam flavonóides, linhóides e proantocianidinas (XU *et al.*, 2018). Algumas substâncias ativas de diferentes classes do gênero são ilustradas na figura 7.

Figura 7: *Trans*-desicrotonina (A), clerodano da casca de *C. cajucara*; ácido 3-acetil aleuritólico (B), triterpeno de *C. cajucara* e *C. urucurana*; vitexina (C), C-glicosídeo flavonoídico comum a diversas plantas do gênero; glaucina (D), alcaloide isolado de *C. lechleri*.



Fontes: A-Sampson *et al.* (2000), B-Maciel *et al.* (2000) e Peres *et al.* (1998), C-Krebs e Ramiarantsoa (1997) e D-Milanowski *et al.* (2002).

2.3.1 *Croton sacaquinha* Croizat

Croton sacaquinha é uma árvore de médio porte, endêmica da Região Amazônica, encontrada no Amazonas, Pará e Mato Grosso. Popularmente conhecida como sacaquinha por sua semelhança com a sacaca (*C. cajucara*) tem como principal foco o estudo dos seus óleos essenciais (OE) que tem em sua composição substâncias de interesse comercial (Figura 8 (KALIL *et al.*, 2000).

2.3.1.1 Atividade biológica dos OE e extratos de *C. sacaquinha*

Almeida *et al.* (2011) testaram o OE das folhas de *C. sacaquinha* para a inibição da atividade proteásica de *Rhizopus oryzae*, fungo causador da mucormicose, apresentado como resultado uma total inibição enzimática deste. De Souza (2015) testou o OE das folhas frente a cepas de bactérias redutoras de sulfato (BRS), causadoras de poluição nos oceanos, obtendo uma inibição completa do crescimento dessas. De Souza Chagas (2016) testou a eficácia do OE das folhas de *C. sacaquinha* contra larvas de carrapatos bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, obtendo resultados insatisfatórios (inativo) para os parâmetros aplicados. Por fim,

Chagas (2018) testou o OE contra a espécie de nematódeo *Haemonchus contortus*, parasito do trato intestinal das ovelhas, obtendo um desempenho insatisfatório (sem atividade) nestes testes. O extrato hidroalcolico de folhas e galhos de *C. sacaquinha* foi testado por Sousa (2010) para uma avaliação da atividade antinociceptiva e o efeito sobre a migração leucocitária, utilizando para este propósito camundongos suíços machos, tendo resultados satisfatórios neste trabalho, o que pode indicar mecanismos anti-inflamatórios da *C. sacaquinha* justificando seu uso na medicina popular por suas propriedades analgésicas.

Figura 8: *Croton sacaquinha* em área de observação e cultivo na Embrapa - CPAA(Manaus-AM).



2.3.1.2 Importância de OEs e composição química do OE da folha de *C. sacaquinha*

Óleos essenciais se originam do metabolismo secundário das plantas, sendo extraído de flores, botões, folhas, ramos, cascas, sementes, frutos, raízes e rizomas. São misturas complexas de substâncias voláteis, com baixo peso molecular, geralmente odoríferas e líquidas, constituídos por moléculas de natureza terpênica (DE MORAIS, 2009). Seus usos são variados sendo de grande valor para as indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias. Segundo o Global Market Insights Inc., até 2026 o mercado de OE deverá ultrapassar USD 15,54 bilhões.

Uma pesquisa feita por Araújo *et al.* (1971) em busca por fontes alternativas de linalol (Figura 9), matéria prima de várias fragrâncias, revelou boas quantidades deste na espécie *C. cajucara* e a partir daí para a continuação dos estudos químicos e agrônômicos, várias espécies de *Croton* são mantidas em cultivo na Embrapa Amazonia Ocidental. Um estudo feito por Lopes *et al.* (2003) catalogou pela primeira vez por cromatografia gasosa (CG) a composição química dos OEs das folhas da *C. sacaquinha*. Neste estudo foi possível identificar 49 constituintes do OE, representando 78,4% do total dos componentes detectados. Os constituintes majoritários foram β -elemeno (12,0%), germacreno D (10,1%), linalol (5,8%) e β -cariofileno (5,7%) (Figura 8).

2.4 Atividades biológicas de constituintes encontrados nos OE e *C. sacaquinha*

Nessa parte, são resumidas algumas das atividades biológicas atribuídas a componentes voláteis presentes nos OEs de *C. sacaquinha*. É importante ressaltar que os estudos abaixo não tratam de substâncias isoladas dos OEs de *C. sacaquinha*, mas de outras espécies vegetais. Relembrando da existência de estereoisômeros (excesso enantiomérico, diastereômeros, etc.) das estruturas discutidas (Figura 9) as informações são sugestivas de atividades biológicas que precisam de confirmação no caso de *C. sacaquinha*.

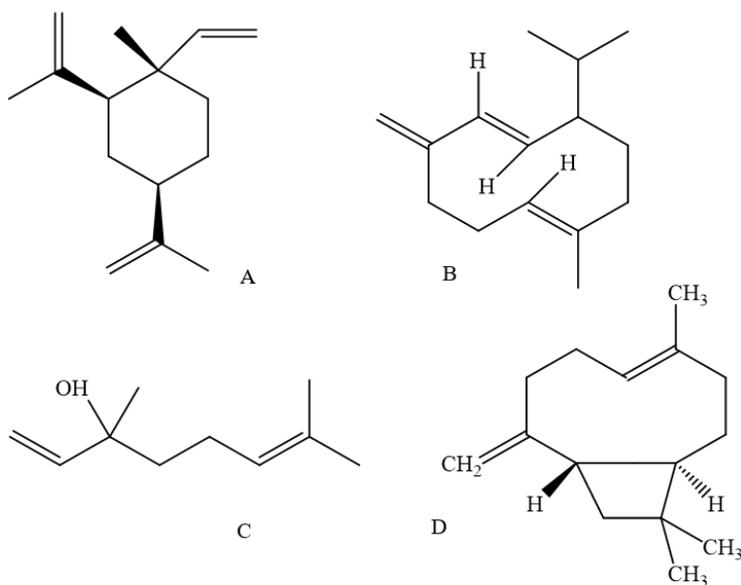
O β -elemeno é um sesquiterpeno com propriedades anticancerígenas. Estudos recentes *in vitro* e *in vivo*, combinados com métodos moleculares, mostraram que o β -elemeno pode inibir a proliferação celular, interromper o ciclo celular e induzir a apoptose celular (ZHAI *et al.*, 2019). O germacreno D é considerado um precursor biogenético de muitos hidrocarbonetos sesquiterpênicos. Ele atua como defesa das plantas contra herbívoros. Já foi relatado que possui atividade inseticida contra mosquitos (RAVI KIRAN & SITA DEVI, 2007), atividade repelente contra pulgões (BRUCE *et al.*, 2005) e carrapatos (BIRKETT *et al.*, 2008).

O linalol é uma substância muito procurada na indústria de aromas e fragrâncias. É um álcool monoterpênico que ocorre naturalmente em muitas plantas aromáticas. É usado em formulações cosméticas para a produção dos mais variados produtos que possuem fragrâncias, como perfumes e produtos de limpeza. Exibe várias atividades biológicas, como propriedades anticancerígenas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes e vários estudos *in vivo*

confirmaram efeitos do linalol sobre o sistema nervoso central (KAMATOU e VILJOEN, 2008).

O β -cariofileno é um sesquiterpeno bicíclico natural que exerce ação anti-inflamatória. Muitos estudos, *in vitro* e *in vivo*, sugerem que o tratamento com β -cariofileno melhora o tratamento de patologias inflamatórias, como doenças do sistema nervoso (doença de Parkinson, doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla e acidente vascular cerebral), aterosclerose e tumores (câncer de cólon, mama, pâncreas, linfoma, melanoma e glioma) (FRANCOMANO *et al.*, 2019).

Figura 9: Principais moléculas do OE das folhas de *C. sacaquinha*. β -elemeno (A), germacreno D (B), linalol (C), β -cariofileno (D).



3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar a atividade antiplasmódica *in vitro* e composição química de *Croton sacaquinha*.

3.2 Específicos

Preparar extratos ativos a partir das folhas e cascas de *Croton sacaquinha*

Avaliar a atividade antiplasmódica *in vitro* dos extratos e fração frente à cepa K1 de *Plasmodium falciparum*.

Isolar substâncias antiplasmódicas de extratos da *C. sacaquinha* através de meios cromatográficos.

Caracterizar e elucidar a estrutura das substâncias isoladas por ressonância magnética nuclear (RMN).

Caracterizar qualitativamente a composição dos OEs das folhas, caules e casca de *C. sacaquinha*.

4. MATERIAL E METODOS

4.1 Procedimentos experimentais gerais

Este estudo foi desenvolvido nas dependências do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA e da Embrapa Amazônia Ocidental/Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Ocidental - CPAA junto à Universidade Federal do Amazonas - UFAM pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC.

4.1.1 Registro no SISGEN-MMA

Croton sacaquinha Croizat faz parte de um grupo de etnoespécies utilizadas por comunidades remanescentes de quilombos do município de Oriximiná – PA (OLIVEIRA *et al.*, 2015), reconhecidas como detentoras de conhecimento tradicional associado (CTA) identificável sobre o uso desta espécie de planta medicinal no tratamento da malária e ou os sintomas dessa doença. O estudo foi registrado junto ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado do Ministério de Meio Ambiente (MMA), onde recebeu o número de cadastro **A172C55**.

4.1.2 Equipamentos e aparelhos analíticos

Os seguintes equipamentos foram utilizados durante a realização das análises no Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM) na condução dos experimentos desse trabalho: balança analítica, marca Master, modelo AY220, com limite máximo de 220 g e mínimo de 0,0001 g; balança semi-analítica, marca Master, modelo ARC120, com limite de peso de 3.100 g e mínimo de 0,01 g; banho de ultrassom, marca Unique, modelo USC-1800A; lâmpada de UV, marca UVP, modelo CC-10 (ondas longas: 365 nm; e curtas: 254 nm); moinho de facas, marca Marconi, modelo MA340 e rotaevaporador, marca Fisatom, modelo 804.

4.3.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Na cromatografia em camada delgada (CCD), utilizou-se cromatoplaças com suporte de alumínio com camadas de sílica gel e espessura de 0,25 mm com indicador de fluorescência F₂₅₄ da marca Merck. Como eluentes utilizaram-se solventes puros ou misturas de solventes de

grau de pureza analítica, escolhidos em diferentes proporções de acordo com a polaridade das amostras. Para as revelações utilizaram-se lâmpadas UV, nos comprimentos de onda em 254 e 365 nm e como revelador químico foi utilizado o *p*-anisaldeído, com posterior aquecimento.

4.3.3 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear unidimensionais (1D) de RMN ^1H , RMN ^{13}C , DEPT 135° e DEPT 90° e bidimensionais (2D) de COSY, HSQC e HMBC foram registrados utilizando o espectrômetro Bruker, operando a 300 e 75 MHz para as frequências de ^1H e ^{13}C , respectivamente, na CA-LTQPN do INPA. O solvente deuterado para análises foi o clorofórmio. Os deslocamentos químicos foram registrados em ppm (δ).

4.1.3 Coleta e processamento do material vegetal

A coleta de *Croton sacaquinha* foi realizada dia 22 de maio de 2019 na Embrapa Amazônia Ocidental, localizado no município de Manaus – AM, compreendida entre as coordenadas - 2,8931793; -59,9729705. Foram coletados por meio de corte os galhos de alguns exemplares das espécies em cultivo (Figura 8) e separados as folhas e o caule. Do caule da planta foram retirados manualmente as cascas, por meio de raspagem (Figura 10). Estes materiais, folhas, caules e cascas, foram levadas à estufa a 40°C para secagem até atingirem peso constante. Após secas, as amostras foram trituradas em moinho de facas. As partes lenhosas foram moídas em moinho industrial no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia - INPA. Após a moagem as amostras foram pesadas, embaladas e armazenadas na geladeira até a extração.

4.2 Preparação dos extratos

4.2.1 Extração em escala menor

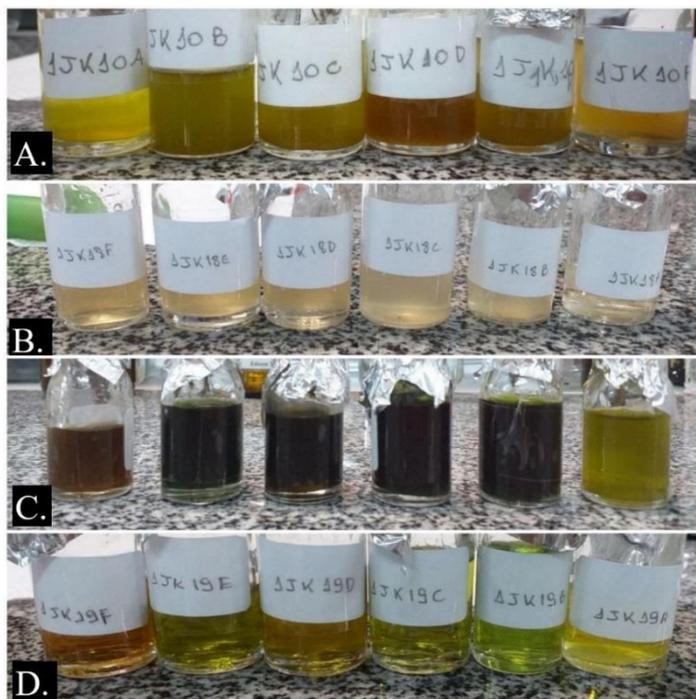
Para extração de substâncias ativas das folhas e cascas foi feita a maceração com solventes de polaridades baixa, média e alta adaptado do trabalho de Oliveira *et al.* (2015). Também foram realizadas extrações a quente (decoção e infusão), por serem métodos comumente usados por populações tradicionais.

Figura 10: Processamento pós-coleta do material vegetal proveniente da *Croton sacaquinha*; A. Raspagem da casca; B. Casca seca.



Os extratos foram então preparados a partir dos seguintes solventes orgânicos: hexano, clorofórmio, acetato de etila, acetona, etanol e etanol mais água (na proporção 1:1), sendo as extrações realizadas em uma proporção de 1:5 (g de material vegetal seco e moído/mL de solvente). Foi pesado aproximadamente 1 g com uma balança analítica de cada amostra seca da folha em cada um dos seis vidros de âmbar e o mesmo foi feito para a casca seca. Em cada frasco contendo folha seca foi adicionado 5 mL de um dos solventes citados e o mesmo foi feito para a casca seca. Após isso os frascos foram colocados em agitação em banho de ultrassom (UNIQUE) por 1 h a 45°C e deixados descansando por 24 h na bancada e então foi realizada a filtração por uma bolinha de algodão em pipetas de Pasteur de vidro e os filtrados de cada extração foram colocados para evaporar em areia quente. Esse processo de extração-filtração-evaporação foi repetido seis vezes para cada amostra de planta seca, visando obter o máximo de extrato ativo de cada amostra de material vegetal (Figura 11). Após a evaporação dos solventes, os extratos foram pesados e acondicionados em refrigerador para posteriores análises.

Figura 11: A. Primeiro extrato da casca; B. Último extrato da casca; C. Primeiro extrato da folha; D. Último extrato da folha.



4.2.2 Preparação de extratos por decocção e infusão

Para extração por decocção, foi pesado 1,0 g da folha seca e moída ou da casca seca e moída para cada 25,0 mL de água deionizada. Essa mistura foi levada ao fogo até atingir a temperatura de ebulição (100°C). As misturas foram então mantidas por 10 min nessa temperatura e depois disso foram filtradas e o filtrado foi colocado para evaporar na areia quente (45°C).

Na infusão, a água (25,0 mL) foi fervida (100°C) e depois adicionada 1,0 g da amostra seca da casca ou da folha e cada mistura foi deixada em descanso por 30 min. Após esse tempo, as misturas foram filtradas e os filtrados foram deixados para evaporar na areia quente.

4.2.3 Extração em escala maior

Na extração em escala maior por maceração foram utilizados dois solventes diferentes, o acetato de etila (AcOEt) e o etanol. Em dois Erlenmeyers de 1 L, foi adicionado o material vegetal da casca (181,6 g) em cada um e em seguida foi adicionado 500 mL de AcOEt no primeiro Erlenmeyer e 500 mL de etanol no segundo. Em um terceiro Erlenmeyer de 1 L foi

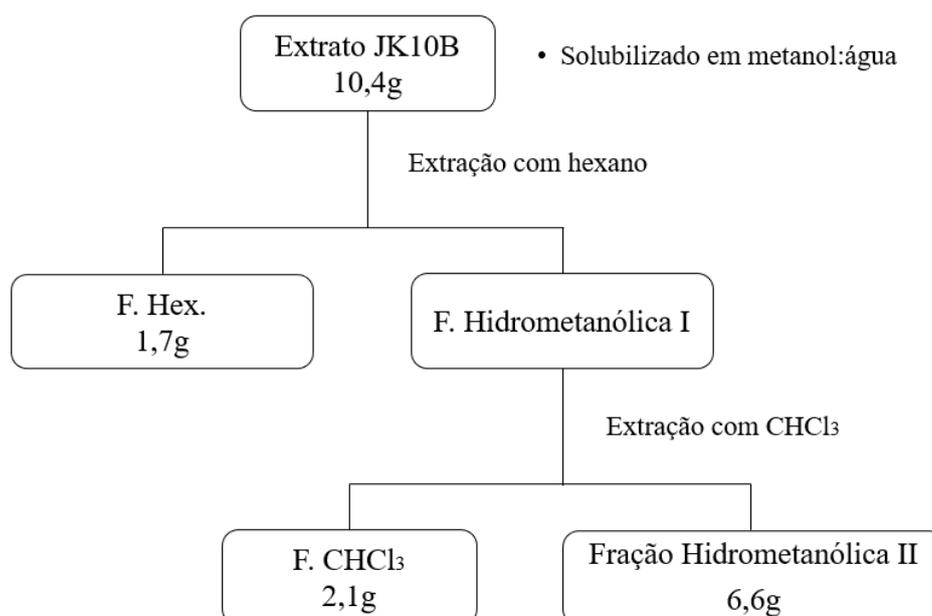
colocado a folha seca (55,7 g) com 500 mL de AcOEt. Os Erlenmeyer foram levados para agitação em banho de ultrassom (UNIQUE) por 1 h a 45°C e deixados descansando por 24 h. Após esse tempo foi realizada a filtração das misturas e os filtrados de cada extração foram colocados em frascos de amostra em areia quente para a evaporação dos solventes. O extrato de AcOEt da casca, de código JK10B, segundo a análise da cromatografia em camada delgada CCD, foi o que teve o melhor nível de separação dos componentes e esse extrato foi escolhido para realizar o fracionamento.

4.3 Isolamento da substância de *C. sacaquinha*

4.3.1 Partição líquido/líquido: extração com hexanos e clorofórmio

Para a extração líquido-líquido, o extrato de AcOEt da casca de *C. sacaquinha* JK10B (10,4 g) foi dissolvido em uma mistura de água e metanol (3:7) e agitado em banho de ultrassom por 25 min. Após dissolução completa, foram realizadas as extrações em funil de separação com os solventes hexanos e depois clorofórmio, conforme o fluxograma 1. Cada extração foi repetida por três vezes com cada solvente.

Fluxograma 1: Partição realizada para o extrato de cascas *C. sacaquinha* (JK10B).

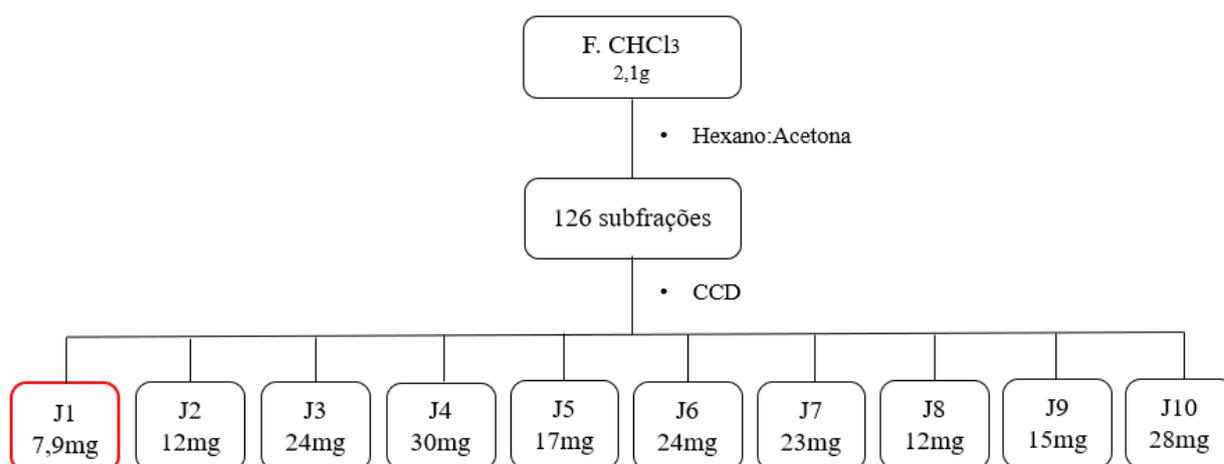


Após a partição líquido-líquido, as frações foram evaporadas em banho de areia para posteriormente serem pesadas. As frações foram analisadas por CCD para visualizar os perfis cromatográficos e dar prosseguimento ao fracionamento para o isolamento de substâncias.

4.3.4 Fracionamento cromatográfico.

O fracionamento foi realizado utilizando 2,1 g da fração F. CHCl_3 (oriunda da partição líquido-líquido do extrato JK10B) em coluna cromatográfica aberta, com sílica gel (0,063-0,200 mm, Merck) empacotada com 100% de hexano. A coluna foi eluída com 100 mL de hexano, seguida de uma mistura binária de hexano e acetona (95:5), aumentando a polaridade em 5% (95:5 a 0:100). Foram obtidas 126 subfrações, as quais foram reunidas em 10 frações, conforme seus perfis cromatográficos visualizados em CCD (fluxograma 2). A fração J1 (7,9 mg) apresentou um bom nível de pureza e foi levada a análise de RMN (1D e 2D).

Fluxograma 2: Fracionamento cromatográfica da fração CHCl_3 e isolamento da substância (sub-fração J1) de *C. sacaquinha*.



4.4 Testes antimaláricos

4.4.1 Cultivo *in vitro* de *Plasmodium falciparum*

A cultura *in vitro* de *P. falciparum* e os bioensaios com este parasita foram realizados no Laboratório de Cultivo de *P. falciparum* (COSAS/INPA). O método utilizado é uma modificação da técnica de Trager e Jensen (1976), adaptado pela Gerência de Malária da FMT-

HVD (DE ANDRADE - NETO *et al.*, 2007), o qual baseia-se no desenvolvimento *in vitro* dos estágios eritrocitários de *P. falciparum*.

Neste estudo foi utilizada a cepa K1 de *P. falciparum* (MRA-159, MR4, ATCC, Manassas Virginia), resistente à cloroquina e pirimetamina, cultivada em eritrócitos humanos do tipo A+ a 37°C, em frascos de poliestireno de 50 mL hermeticamente fechados, sob uma atmosfera de baixa tensão de oxigênio (5% de CO₂, 5% de O₂ e N₂ balanceado). Nos frascos foram adicionados cerca de 500 µL de eritrócitos parasitados e 4,5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco®) suplementado com NaHCO₃ (32 mM), HEPES (25 mM), hipoxantina (37 mM), glutamina (2 mM), glicose (10 mM), 0,4 mL de gentamicina e 10% de plasma humano inativado tipo A+. A troca do meio de cultura e a adição de mistura carbogênica foram realizadas diariamente, bem como a adição de eritrócitos, sempre que necessário. O crescimento dos parasitas foi acompanhado durante a troca do meio de cultura, por meio de esfregaços sanguíneos corados em panótico® e observados em microscópio óptico. A parasitemia foi calculada e expressa em porcentagem a partir da contagem de 2000 eritrócitos. Os ensaios foram realizados com culturas sincrônicas no estágio anel, trofozoítos jovens, obtidas após tratamentos com uma solução de 5% de sorbitol, conforme descrito por Lambros e Vanderberg (1979).

4.4.2 Microteste de suscetibilidade *in vitro*

O ensaio antimalárico foi realizado de acordo com o método descrito por Rieckmann *et al.* (1978), com adaptações por De Andrade-Neto *et al.* (2007), para condições semelhantes à cultura do parasita. Para avaliação da atividade antiplasmódica, as amostras foram submetidas a testes em duas concentrações: 50 e 5,0 µg/mL. As amostras que apresentaram um percentual de inibição da parasitemia de $\geq 80\%$ foram consideradas potencialmente ativas e selecionadas para avaliação em sete concentrações de 100 a 1,56 µg/mL, para determinação da concentração capaz de reduzir o crescimento do parasita em 50% (CI₅₀).

As amostras (1,0 mg) foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) em soluções estoque na concentração de 10 mg/mL, e posteriormente diluídas em série com meio de cultura RPMI 1640 para obtenção das concentrações para o teste *in vitro*. As amostras foram testadas em triplicata na triagem e duplicata para o cálculo de CI₅₀, em microplaca de 96 poços. Um experimento foi conduzido para a triagem e um experimento foi conduzido para determinação

de CI₅₀. Como controle foram utilizadas as suspensões de hemácias parasitadas e DMSO 1% o que corresponde à concentração máxima de DMSO utilizada nas amostras de extratos.

As amostras foram então adicionadas aos poços com a suspensão de hemácias parasitadas com parasitemia inicial de 1% e a predominância de trofozoítos jovens (anéis) no meio de cultura, tendo um volume final de 200 µL em cada poço. A placa foi incubada em câmara acrílica na estufa a 37°C por 48 h.

Após o período de incubação foi preparado um esfregaço sanguíneo para cada poço, e os esfregaços foram corados com panótico® e observados em microscópio para contagem dos parasitas. A parasitemia das amostras investigadas foi expressa em percentagem a partir da contagem de 2000 eritrócitos, conforme a equação:

$$\text{Parasitemia \%} = \frac{N^{\circ} \text{ total de parasitas} \times 100}{N^{\circ} \text{ total de hemácias}}$$

4.4.3 Análise estatística dos dados

A CI₅₀ dos extratos foi calculada com o auxílio do software GraphPad Prism 9.4.0, onde o efeito antiparasitário das amostras foi medido em relação ao controle livre de drogas, em um intervalo de confiança de 95% (IC 95).

4.5 Análise dos óleos essenciais (OEs) de *C. sacaquinha*

4.5.1 Extração dos OEs

As extrações de OE foram realizadas por hidrodestilação durante 4 h em aparelho graduado tipo Clevenger (WASICKY, 1963), utilizando-se 400 g da casca, 400 g da folha e 400 g da madeira para gerar o respectivo OE, na Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus/AM). Após cada extração, o OE foi coletado e armazenado no refrigerador. As amostras foram enviadas para a Embrapa Agroindústria de Alimentos do Rio de Janeiro, onde foram refrigerados até o momento das análises.

4.5.2 Caracterização dos OEs

As análises dos OEs foram realizadas pelo Dr. Humberto Bizzo, inicialmente em um cromatógrafo gasoso Agilent 7890A equipado com um detector de ionização de chama (CG-DIC), usando uma coluna capilar fundida HP-5MS (5% fenil - 95% metil silicone) (30 m × 0,25 mm x 0,25 µm). O hidrogênio foi usado como gás de arraste a uma vazão de 1,5 mL/min. Um microlitro de uma solução a 0,1% de cada óleo em hexano foi injetado em modo *split* (1:20). A temperatura do forno foi programada de 60 a 240°C a 3°C/min, e mantida a 240°C por 10 min. A temperatura do injetor foi de 250°C e a temperatura do detector foi de 280°C. Um padrão interno (octanoato de metila) foi adicionado a todas as amostras. As áreas brutas dos picos de CG-DIC foram normalizadas usando a área do padrão interno (BICCHI *et al.*, 2008) e corrigidas com o uso de fatores de resposta previstos (CACHET *et al.*, 2016). Todos os cálculos foram realizados usando uma série de planilhas eletrônicas de Excel pré-programadas (BIZZO *et al.*, 2020; Bizzo, comunicação particular). As injeções foram realizadas em triplicata.

As análises dos OEs também foram realizadas com um cromatógrafo gasoso Agilent 7890A acoplado a um detector seletivo de massa Agilent 5975C (CG-EM), operando no modo de ionização eletrônica (70 eV), com as mesmas condições de coluna e temperatura descritas acima, mas usando hélio como gás de arraste (1 mL/min). Os índices de retenção linear foram calculados de acordo com Van Den Dool e Kratz (1963), após a injeção de uma série (C₇-C₂₆) de n-alcenos. Os componentes químicos dos OEs foram identificados por comparação de seus índices de retenção linear com os de Adams (2007) e os espectros de massa com os das bases de dados espectrais da Wiley 6ª edição e do NIST 2011 (BABUSHOK *et al.*, 2011; BIZZO, comunicação pessoal).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimentos de extratos

5.1.1 Rendimentos dos extratos preparados em menor escala

Os rendimentos dos extratos preparados em menor escala (seção 4.2.1) tiveram bons valores extrativos, sendo os maiores teores para as extrações com etanol da casca (Tabela 2) e com água e etanol da folha. Os rendimentos dos extratos foram maiores para a folha devido a concentração de clorofila e outros pigmentos nestes. Os rendimentos mais baixos, tanto para casca como para folha, foram obtidos a partir da extração com hexano. Todos os valores são demonstrados na tabela 3.

Tabela 2: Rendimentos dos extratos das cascas e das folhas.

Extrações das cascas		Extrações das folhas	
Solvente	Teor extrativos (%)	Solvente	Teor extrativos (%)
Hexanos	2,2	Hexanos	6,3
AcOEt	7,1	AcOEt	10,2
Acetona	8,0	Acetona	22,8
CHCl ₃	7,5	CHCl ₃	11,3
EtOH	13,2	EtOH	24,2
EtOH: H ₂ O	9,3	EtOH: H ₂ O	25,9
H ₂ O (infusão)	8,0	H ₂ O (infusão)	12,9
H ₂ O (decoção)	11,3	H ₂ O (decoção)	19,7

5.1.2 Rendimentos extratos em maior escala

Para os rendimentos da extração em maior escala obteve-se os seguintes valores apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Rendimentos das extrações em maior escala.

Código	Extrato (parte + solvente)	Material vegetal extraído (g)	Rendimento	
			Massa (g)	% (massa/massa)
JK10B	Cascas + AcOEt	181,6	10,4	5,7
JK10E	Cascas + EtOH	181,6	20,4	11,2
JK11B	Folhas + AcOEt	55,7	4,6	8,2

5.2 Identificação da substância isolada (sub-fração J1) de *C. sacaquinha*

A pureza da substância isolada (sub-fração J1; 7,9 mg) foi avaliada utilizando CCD e apresentou-se como um sólido amorfo de coloração branca (figura 12), solúvel em CHCl_3 .

Figura 12: Sub-fração cromatográfica J1 (substância isolada) da fração CHCl_3 do extrato de AcOEt das cascas de *C. sacaquinha*.



5.2.1 Elucidação estrutural da substância isolada por RMN

A estrutura molecular foi elucidada utilizando métodos espectrométricos de RMN de 1D (^1H , ^{13}C e DEPT) e 2D (HSQC, HMBC e COSY). Como citado no levantamento bibliográfico, o gênero trabalhado pode apresentar várias classes de metabólitos secundários onde uma dessas classes são os triterpenos pentacíclicos. Baseado nas análises dos dados de RMN apresentadas mais abaixo e comparação desses dados de RMN com os da literatura (Melo, 2013), a substância isolada foi identificada como o ácido 3-acetil aleuritólico (Figura 13).

5.2.1.1. Análise do espectro de RMN de ^1H da substância isolada (Sub-fração J1)

O espectro de hidrogênio (^1H) apresentou dois duplos dupletos, em δ_{H} 5,52 ($J = 7,7$ e 3,2 Hz) atribuído ao H-15 e em δ_{H} 4,47 ($J = 9,6$ e 6,8 Hz) correspondente ao H-3, respectivamente. O espectro de ^1H também apresentou dois duplos dubletos em δ_{H} 2,38 ($J = 14,7$ e 7,7 Hz) ao H-16 e 2,29 ($J = 13,8$ e 3,3 Hz) referente ao hidrogênio H-18. Ao analisar as integrais e o perfil do espectro foi possível identificar oito sinais de metila, sendo sete singletos,

na faixa de δ_H 0,85 a 0,96 referentes aos hidrogênios das metilas 23 a 30, além de uma metila em δ_H 2,05, sinal característico de grupo acetila ($OCCH_3$) (Figura 14, Tabela 4).

Figura 13: Estrutura molecular do ácido 3-acetil aleuritólico.

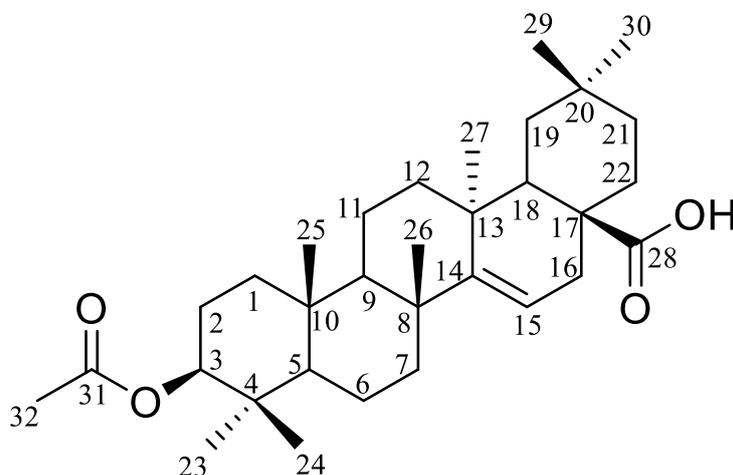
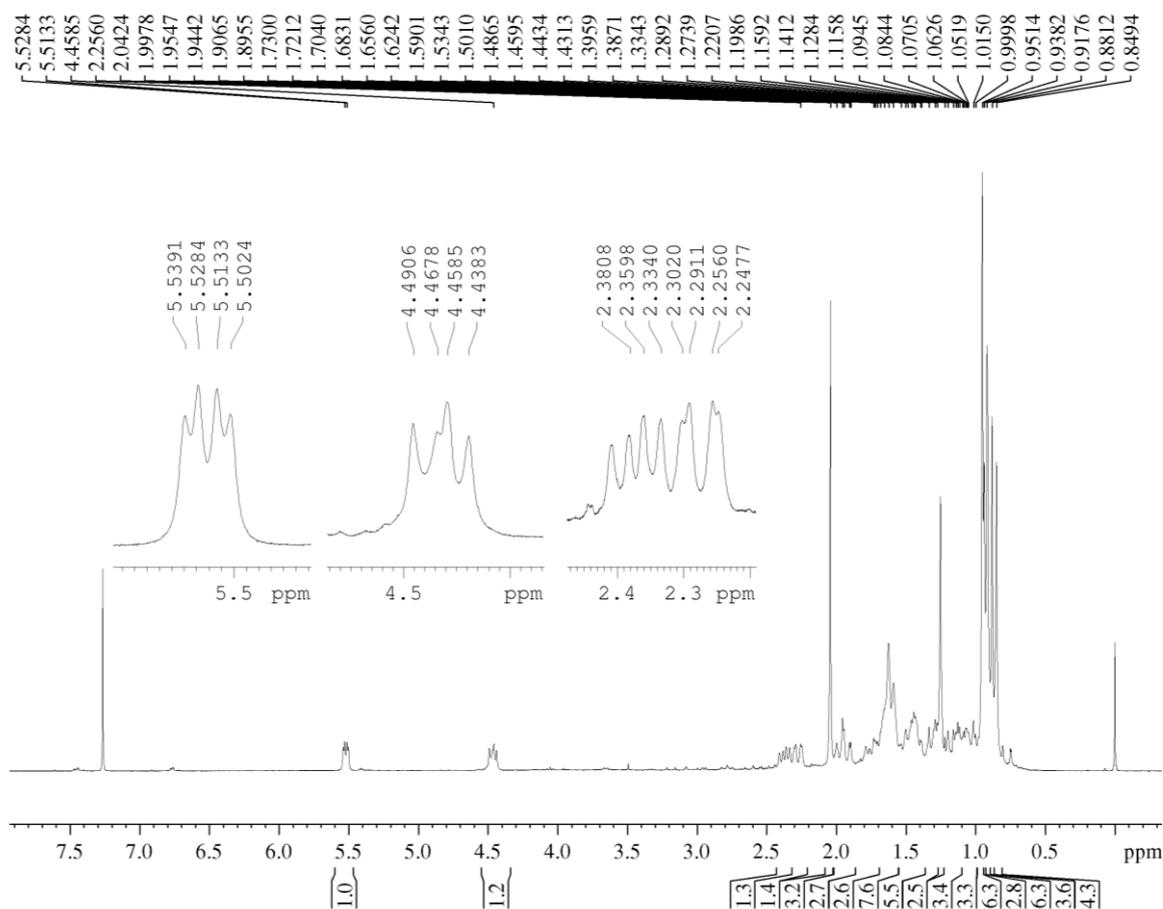


Figura 14: Espectro de RMN de 1H do ácido 3-acetil aleuritólico em $CHCl_3$ (300 MHz).

Jeane21_IJKF1 (1H; $CDCl_3$; 7.9 mg)31/03/2021 Op. Magno



5.2.1.2 Análise dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT/HSQC

O espectro de carbono apresentou 32 linhas espectrais consistente com um derivado de um triterpeno pentacíclico, podendo apresentar três grupos funcionais pois o mesmo apresentou duas linhas espectrais bem deslocado em δ_{C} 184,2 e δ_{C} 171,0 regiões de ácidos carboxílicos e seus derivados, além de sinais em δ_{C} 116,9 e 160,5, região de olefinas. Nas análises de DEPT e HSQC foi possível observar que a substância apresentava oito metilas (CH_3), 10 carbonos metilênicos (CH_2), 5 carbonos metínicos (CH) e 9 carbonos quaternários (C) (Anexos 3, 4 e 5).

5.2.1.3 Análise do espectro de HMBC

Na análise do espectro de correlação bidimensional heteronuclear C-H (HMBC) à longa distância foi possível observar que o hidrogênio com deslocamento químico em δ_{H} 4,47 (H-3), apresentou correlação com C-2, C-4, C-23, C-24 e o carbono da carbonila do grupo acetato e os hidrogênios da metila 24 (δ_{H} 0,89) apresentaram correlação com os carbonos C-3, C-10 e C-23. Os hidrogênios com deslocamento δ_{H} 0,96^a (H-25) correlacionam-se com C-5 e C-9. Os hidrogênios da metila 26 δ_{H} 0,96^b apresentaram correlação com os carbonos C-9 e C-8 (Figura 15, 16 e 17; Anexo 7).

Os hidrogênios da metila 27 δ_{H} 0,94 (junção dos anéis C e D), apresentaram correlação com C-12, C-13 e C-19 no HMBC. Os H-16 (δ_{H} β 1,93; α 2,38) apresentaram correlação com C-14, C-15, C-17, C-18 e C-28 referente a carbono do ácido carboxílico (Figura 18). O hidrogênio vinílico (δ_{H} 5,5; H-15; anel D) apresentou correlação com C-13, C-16 e C-17 (Figura 15). O H-19 correlacionou-se com os carbonos nas posições 17, 18 e 20 (Anexo 7).

Figura 15: Ampliação do espectro HMBC para o H-3 (δ_H 4,47) e H-15 (δ_H 5,5).

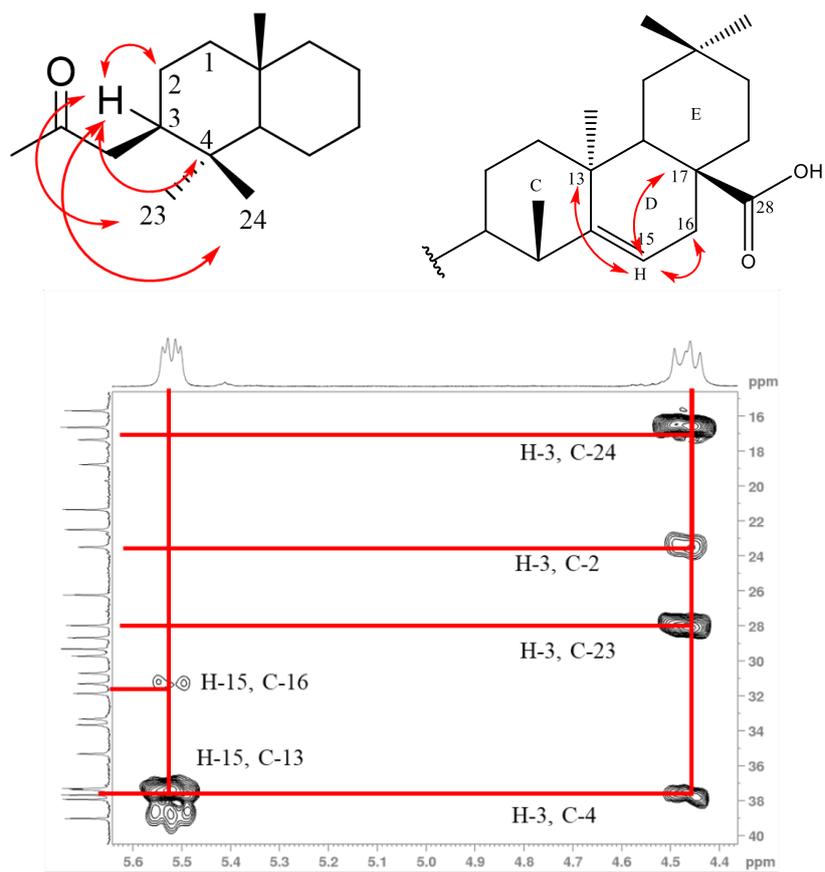


Figura 16: Ampliação do espectro HMBC para o H-24 (δ_H 0,89).

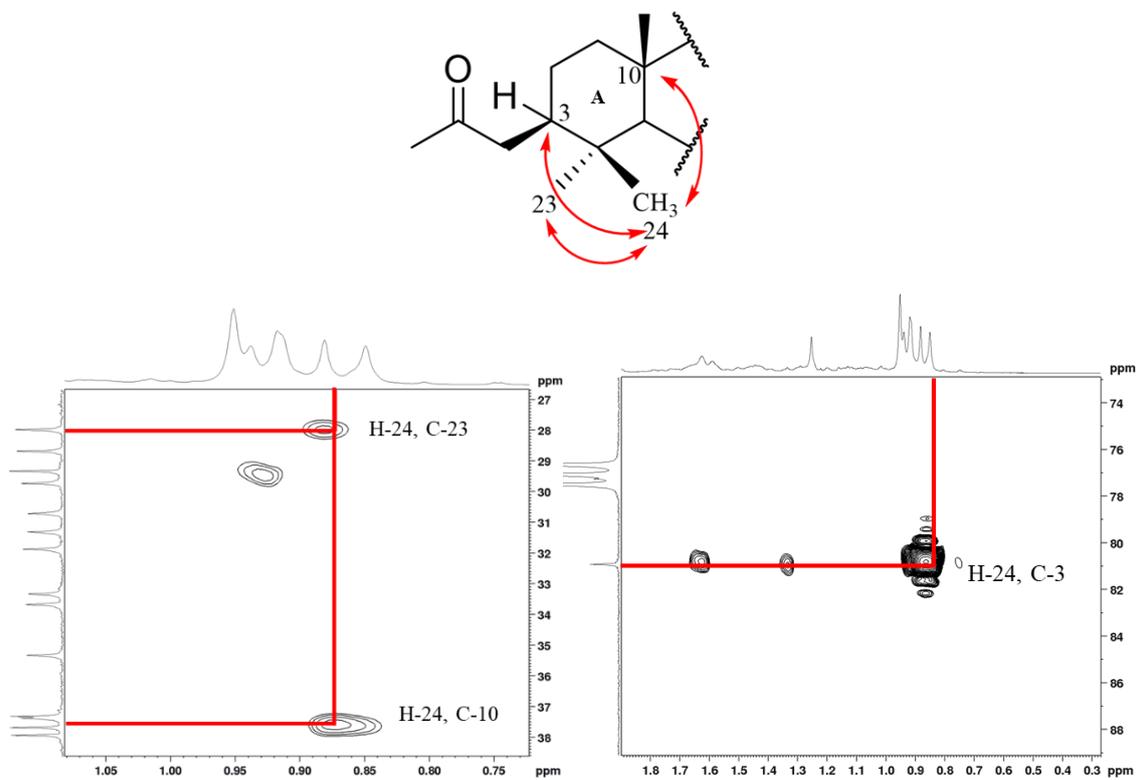


Figura 17: Ampliação do espectro HMBC para o H-25 (δ_H 0,96a) e H-26

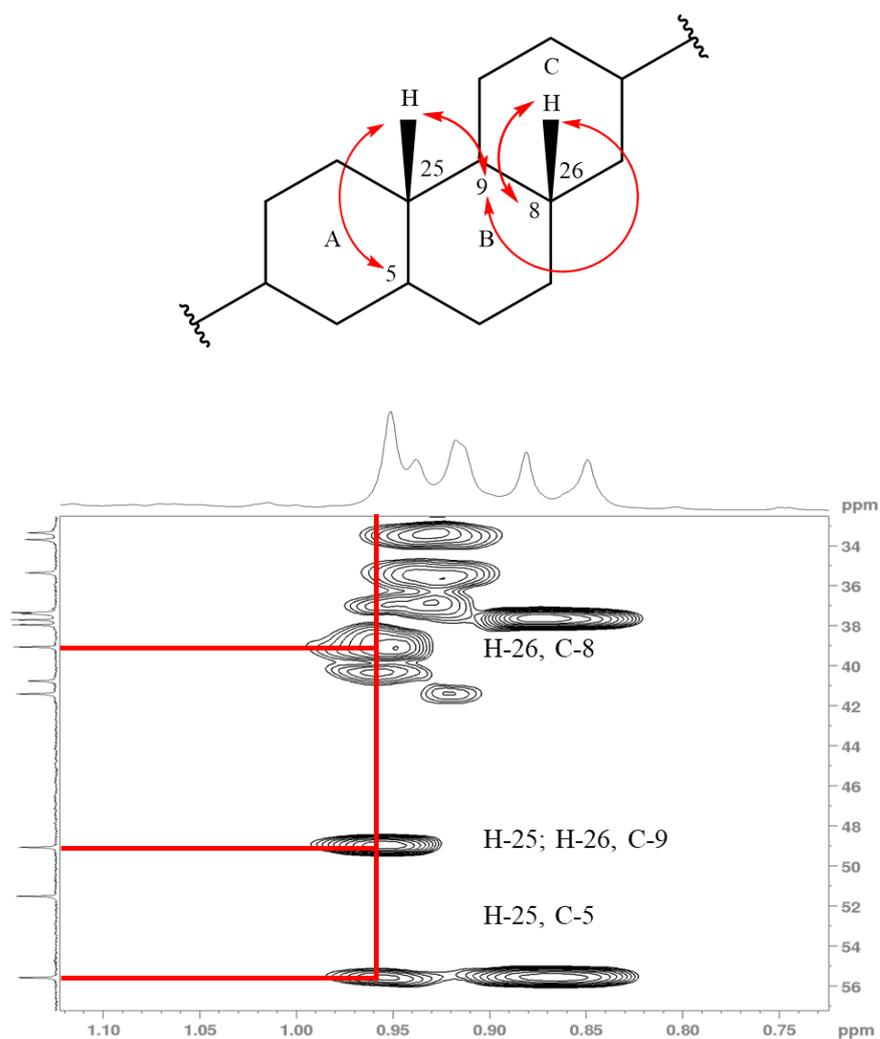
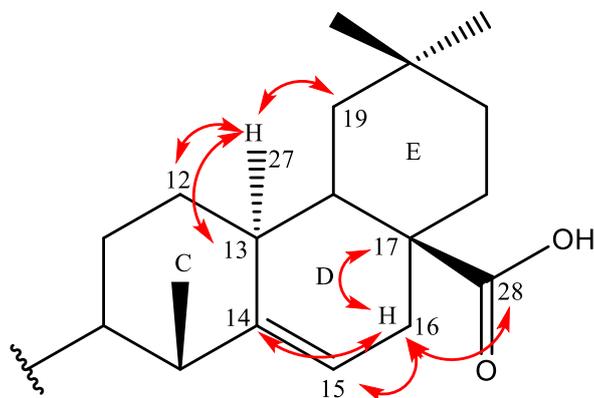


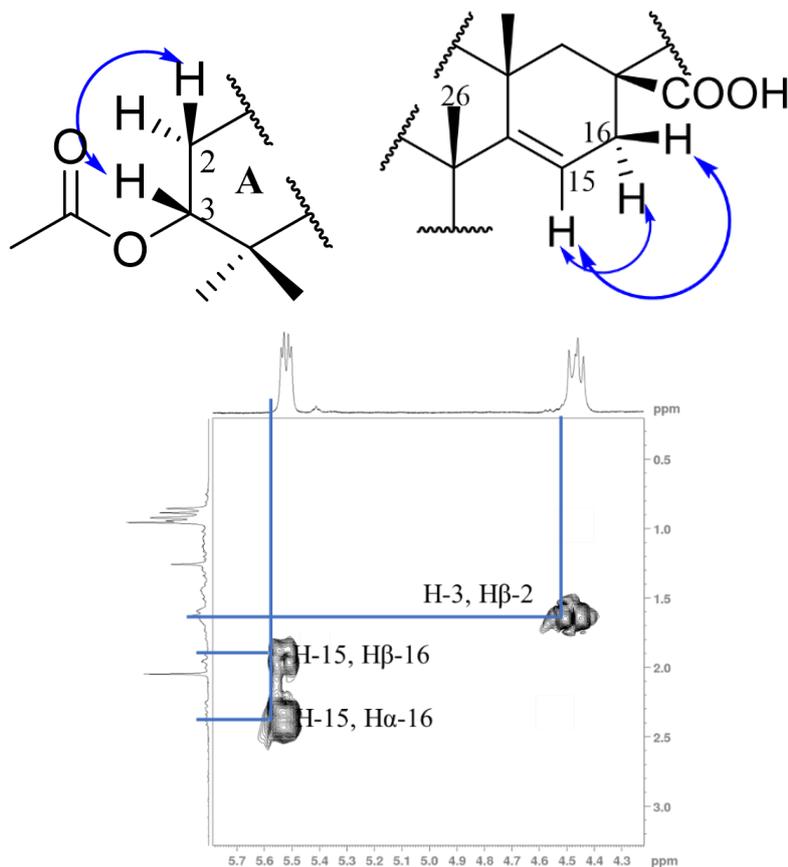
Figura 18: Atribuições das correlações heteronucleares no HMBC para H-27 (δ_H 0,94) e H-16 (β 1,93; α 2,38).



5.2.1.4 Análise do espectro de COSY

No espectro de COSY, o H-3 (δ_H 4,47) está acoplado com o H-2 (δ_H 1,64). O H-15 apresentou um forte acoplamento com os H-16 (δ_H β 1,93; α 2,38; figura 19; anexo 8).

Figura 19: Algumas atribuições das correlações observadas no COSY da substância isolada.



Aqui foram apresentadas as principais análises dos espectros de RMN uni- e bidimensionais e os deslocamentos químicos e correlações estão apresentadas na tabela 4. Os dados de RMN obtidos nesse trabalho foram comparados com os da literatura como mostrado na tabela 5 (MELO *et al.*, 2013) de onde foi possível concluir que a substância isolada se tratava do ácido 3-acetil-aleurítico (figura 13).

Tabela 4: Dados de RMN 1D e 2D da substância isolada (^1H -300/ ^{13}C -75 MHz; ppm; CDCl_3).

RMN de ^{13}C (δ_{C})			RMN de ^1H (δ_{H})		
C	Obs.	DEPT	HSQC	HMBC	COSY
1	37,3	CH_2	1,60; 1,05		
2	23,4	CH_2	1,64	4,47 (H-3)	4,47
3	80,9	CH	4,47	0,89; 1,60; 1,64	
4	37,6	C	-	4,47; 0,89	
5	55,5	CH	0,89	0,96; 0,89	
6	18,7	CH_2	1,50; 1,60		0,89 ^a
7	40,7	CH_2	1,29; 2,00		
8	39,0	C	-	0,97	
9	49	CH	1,44	0,96; 0,97	
10	37,9	C	-		
11	17,3	CH_2	1,50; 1,63		1,78
12	33,3	CH_2	1,63; 1,78	0,94	
13	37,9	C	-	0,94; 5,5	
14	160,5	C	-	1,93; 2,38	
15	117,1	CH	5,5	1,93; 2,38	
16	31,3	CH_2	1,93; 2,38	5,5	5,5
17	51,5	C	-	1,24; 5,5; 1,93; 2,38	-
18	41,3	CH	2,29	1,24; 1,93; 2,38	
19	35,1	CH_2	1,10; 1,24	0,94	2,29
20	29,3	C	-	1,24	
21	33,6	CH_2	1,05; 1,14		
22	30,7	CH_2	1,43; 1,69		
23	27,9	CH_3	0,86;	4,47; 0,89;	
24	16,6	CH_3	0,89;	4,47; 0,86	
25	15,6	CH_3	0,96		
26	26,2	CH_3	0,97		
27	22,4	CH_3	0,94		
COOH	184,5	C	-	1,93; 2,38; 1,43	
29	31,8	CH_3	0,95		
30	28,6	CH_3	0,93		
<u>CO</u> CH_3	171	C	-	4,47; 2,05	
<u>CO</u> CH_3	21,3	CH_3	2,05		

Tabela 5: Dados de RMN de ^{13}C da substância isolada e dados da literatura para o ácido 3-acetil aleuritólico.

C	RMN de ^{13}C (δ_{C})		RMN de ^1H (δ_{H})	
	Obs.	Lit.	^1H (δ_{H}) / (HSQC)	Lit.
1	37,3	37,6	α 1,6 β 1,05	α 1,60 (<i>t</i> ; 2H)
2	23,4	23,7	1,64	1,63 (<i>t</i> ; 2H)
3	80,9	81,1	4,47 (<i>dd</i>)	α 4,47 (<i>dd</i> ; 1H)
4	37,6	37,5	-	-
5	55,5	55,8	α 0,89	α 0,86 (<i>s</i> ; 1H)
6	18,7	18,9	α 1,50; 1,60	α 1,65 β 1,50
7	40,7	41	1,29; 2,00	α 1,96
8	39	39,2	0,96	-
9	49	49,3	α 1,41	α 1,41 (<i>d</i> , 1H)
10	37,9	37,64	-	-
11	17,3	17,55	α 1,50; β 1,63	α 1,63; β 1,44
12	33,3	33,3	α 1,63; β 1,78	α 1,78; β 1,63
13	37,9	38,1	-	-
14	160,5	160,7	-	-
15	117,1	117,9	5,5 (<i>dd</i>)	5,53 (<i>m</i> , 1H)
16	31,3	31,5	α 1,93; β 2,38	α 2,38 β 1,92
17	51,5	51,7	-	-
18	41,3	41,6	2,29	2,26 (<i>d</i> , 1H)
19	35,1	35,5	1,10; 1,24	1,25 (<i>t</i> , 1Ha); 1,14 (<i>m</i> ; 1Hb)
20	29,3	29,5	-	-
21	33,6	33,9	1,05; 1,14	1,18 (<i>m</i> ; 1Ha); 1,44 (<i>m</i> ; 1Hb)
22	30,7	30,9	α 1,43; β 1,69	α 1,69 β 1,44
23	27,9	28,1	0,85 (<i>s</i>)	0,86 (<i>s</i> ; 3H)
24	16,6	16,8	0,89 (<i>s</i>)	0,88 (<i>s</i> ; 3H)
25	15,6	15,8	0,96;	0,96 (<i>s</i> ; 3H)
26	26,2	26,4	0,97	0,97 (<i>s</i> ; 3H)
27	22,4	22,7	0,94	0,93 (<i>s</i> ; 3H)
COOH	184,5	184,4	-	-
29	31,8	32,1	0,95	0,95 (<i>s</i> ; 3H)
30	28,6	28,88	0,93	0,92 (<i>s</i> ; 3H)
<u>CO</u> CH ₃	171	171,2	-	-
CO <u>C</u> H ₃	21,3	21,5 (<i>s</i>)	2,05	2,04 (<i>s</i> ; 3H)

Literatura (lit.): Melo *et al.*, (2013)

5.3 Testes antiplasmódicos

5.3.1 Resultado da triagem inicial dos extratos

Foram avaliados 13 extratos de cascas e das folhas de *C. sacaquinha* frente à cepa K1 de *P. falciparum*, em uma triagem inicial em duas concentrações, para avaliação da atividade

antiplasmódica *in vitro*. O resultado da triagem para a casca é mostrado na tabela 6 e a triagem para a folha na tabela 7.

Tabela 6: Inibição do crescimento *in vitro* de *P. falciparum* dos extratos da casca.

Extrato Casca*	Redução do crescimento do parasita (%)	
	50 (µg/mL)*	5,0 (µg/mL)
Hexano	91	0
AcOEt	96	43
Acetona	66	0
EtOH	97	0
EtOH : H₂O	99	50

*Extratos com potencial antiplasmódico (inibição $\geq 80\%$) em negrito.

Tabela 7: Inibição do crescimento *in vitro* de *P. falciparum* dos extratos da folha.

Extrato Folha*	Redução do crescimento do parasita (%)	
	50 (µg/mL)*	5,0 (µg/mL)
Hexano	98	0
AcOEt	73	35
Acetona	0	0
CHCl ₃	65	0
EtOH	80	33
EtOH : H ₂ O	26	11
Infusão	25	19
Decocção	0	0

*Extratos com potencial antiplasmódico (inibição $\geq 80\%$) em negrito.

Como critério da triagem dos resultados *in vitro* foi estabelecido que os extratos que inibirem o crescimento dos parasitos (frente aos controles ou brancos de crescimento) de: 80 a 100% exibiam potencial antiplasmódico; < 80% não exibiam potencial antiplasmódico.

Dentre as amostras avaliadas os extratos de AcOEt da casca, de EtOH da casca e de AcOEt da folha foram escolhidos para dar prosseguimento aos testes. As amostras escolhidas foram então submetidas à avaliação das suas CI_{50} frente a *P. falciparum*. O extrato de AcOEt da casca foi preparado em escala maior (seção 4.2.3) para o trabalho de fracionamento e isolamento da substância detalhada acima.

5.3.2 CI₅₀ dos extratos

Os critérios utilizados para classificação da atividade dos extratos brutos estão de acordo com os utilizados por Oliveira *et al.* (2015) onde: CI₅₀ > 25 µg/mL = inativo (I); 25 µg/mL ≥ CI₅₀ > 10 µg/mL = parcialmente ativo (PA); 10 µg/mL ≥ CI₅₀ > 1,0 µg/mL = ativo (A) e CI₅₀ ≤ 1,0 µg/mL = muito ativo (MA)

A partir dos valores de CI₅₀ obtidos para o extrato etanólico da casca de *C. sacaquinha* (CI₅₀ = 4,9 µg/mL), pode-se considerar o extrato ativo. O extrato de AcOEt da casca (CI₅₀ = 16,3 µg/mL) foi considerado parcialmente ativo e o extrato de AcOEt da folha (CI₅₀ = 23,4 µg/mL) considerado inativo pelo seu intervalo de confiança (tabela 8). Esses são resultados inéditos já que nunca haviam sido feitos testes antimaláricos para esta espécie.

Tabela 8: Inibição *in vitro* de *P. falciparum* por extratos de *Croton sacaquinha*.

Amostra	Concentração que inibe 50% (CI ₅₀ ± IC µg/mL)		Classificação
	CI ₅₀	Intervalo de confiança (IC)	
Casca + AcOEt	16,3	12,4 a 21,3	Parcialmente ativo
Casca + EtOH	4,9	3,1 a 7,5	Ativo
Folha + AcOEt	23,4	13,3 a 38,8	Inativo

5.4 Óleos essenciais (OEs)

5.4.1 Rendimentos dos OEs

Na tabela 9 são apresentados os valores dos rendimentos obtidos da extração dos óleos essenciais da casca, do caule e da folha. Os OEs da folha e do caule foram gerados em maior e menor rendimentos, respectivamente.

5.4.2 OE da casca

Foram identificadas 50 substâncias do OE da casca, representando 77,5% do total do óleo. Essa foi a primeira vez que foi feita a caracterização dos OEs da casca e caule de *C. sacaquinha*. Em princípio, não se tinha o conhecimento de que essas últimas partes produziam OEs. Segue abaixo a tabela 10 com os percentuais da área total atribuídos a cada substância identificada no OE das cascas. Na tabela 11 estão as substâncias com um >5% do total da amostra e na tabela 12 estão identificadas as classes químicas encontradas na amostra e sua porcentagem total no OE.

Tabela 9: Rendimentos das extrações dos OEs de *C. sacaquinha*.

Rendimento dos OEs			
Parte	Material vegetal (g)	massa (g)	% (massa/massa)
Casca	400	0,156	0,39
Caule	400	0,950	0,23
Folha	400	0,177	0,42

Tabela 10: Composição química do OE da casca de *C. sacaquinha*.

OE <i>Croton sacaquinha</i> casca			
Pico	IRL lit.	Substância	Área (%)
1	924	α -tujeno	0,15
2	932	α -pineno	1,10
3	974	β -pineno	0,19
4	988	mirceno	0,05
5	1002	α -felandreno	0,08
6	1008	δ -3-careno	2,32
7	1014	α -terpineno	0,05
8	1020	<i>p</i> -cimeno	0,14
9	1022	<i>o</i> -cimeno	0,36
10	1025	silvestreno	0,55
11	1026	1,8-cineol	0,04
12	1054	γ -terpineno	0,08
13	1067	<i>cis</i> -óxido de linalol	0,10
14	1086	terpinoleno	0,28
15	1098	linalol	5,04
16	1174	terpinen-4-ol	0,38
17	1186	α -terpineol	0,09
18	1345	α -cubebeno	0,12
19	1374	α -copaeno	0,66
20	1387	β -cubebeno	0,09
21	1389	β -elemeno	0,69
22	1398	cipereno	3,41
23	1409	α -gurjuneno	0,12
24	1417	<i>trans</i> -cariofileno	3,64
25	1430	β -copaeno	0,37
26	1432	α - <i>trans</i> -bergamoteno	0,32
27	1442	6,9-guaiadieno	2,84
28	1448	<i>cis</i> -murola-3,5-dieno	0,17
29	1452	α -humuleno	1,36
30	1458	<i>allo</i> -aromadendreno	0,56
31	1475	<i>trans</i> -cadin-1(6),4-dieno	1,01
32	1478	γ -muroleno	0,31

OE <i>Croton sacaquinha</i> casca			
Pico	IRL lit.	Substância	Área (%)
33	1484	germacreno D	0,85
34	1493	<i>trans</i> -murola-4(14),5-dieno	0,60
35	1494	biciclogermacreno	1,86
36	1500	α -muuroleno	0,19
37	1515	cubebol	0,50
38	1522	δ -cadineno	3,37
39	1533	<i>trans</i> -cadina-1,4-dieno	0,32
40	1538	furopelargona A	0,37
41	1548	elemol	0,13
42	1561	<i>trans</i> -nerolidol	1,41
43	1577	espatulenol	15,10
44	1582	óxido de cariofileno	11,17
45	1592	viridiflorol	0,21
46	1602	ledol	5,07
47	1608	epóxido de humuleno II	2,75
48	1627	1- <i>epi</i> -cubenol	3,46
49	1645	cubenol	2,06
50	1644	α -muurolol	1,45
Total			77,5

Tabela 11: Substâncias com área de pico > 5% do total de área do OE da casca

Picos identificados com área (%) $\geq 5,0\%$			
Pico	IRL lit	Substância	Área (%)
56	1577	espatulenol	15,1
57	1582	óxido de cariofileno	11,1
61	1602	ledol	5,1
15	1098	linalol	5,0

Tabela 12: Total dos componentes por classe química do OE da casca de *C. sacaquinha*.

Classes químicas	Total (%)
Monoterpenos	5,4
Monoterpenos oxigenados	0,5
Sesquiterpenos	22,7
Sesquiterpenos oxigenados	43,3
Outros	28,4

5.4.3 OE do caule

Para o OE do caule foram identificadas 55 substâncias, totalizando com 69,63% das substâncias para esse óleo. Todas as substâncias identificadas e as áreas percentuais (%) dos seus picos estão representadas na tabela 13. Na tabela 14 são indicadas as principais substâncias encontradas, com áreas de picos acima de 5% do total. As principais classes químicas identificadas para esse OE foram os sesquiterpenos oxigenados e os sesquiterpenos, como demonstrado na tabela 15.

Tabela 13: Composição química do OE do caule de *C. sacaquinha*.

OE <i>C. sacaquinha</i> caule			
Pico	IRL lit	Substância	Área normalizada %
1	924	α -tujeno	0,32
2	932	α -pineno	1,37
3	974	β -pineno	0,25
4	1002	α -felandreno	0,05
6	1014	α -terpineno	0,06
7	1020	p-cimeno	0,12
8	1022	o-cimeno	0,47
9	1024	limoneno	0,50
10	1026	1,8-cineol	0,14
11	1054	γ -terpineno	0,10
12	1086	terpinoleno	0,13
13	1099	linalol	3,90
14	1112	<i>trans</i> -tujona	0,05
15	1122	α -canfolenal	0,06
16	1174	terpinen-4-ol	0,26
17	1232	metil-éter-timol	0,10
18	1374	α -copaeno	0,38
19	1379	β -patchouleno	0,33
20	1389	β -elemeno	0,56
21	1398	cipereno	9,04
22	1402	funebreno	0,14
23	1417	<i>trans</i> -cariofileno	1,57
24	1430	β -copaeno	0,13
25	1431	β -gurjuneno	0,54
26	1432	α - <i>trans</i> -bergamoteno	0,10
27	1437	α -guaieno	4,23
28	1439	aromadendreno	0,19
29	1452	α -humuleno	0,63
30	1458	<i>allo</i> -aromadendrene	0,42

OE <i>C. sacaquinha</i> caule			
Pico	IRL lit	Substância	Área normalizada %
31	1464	<i>trans</i> -9- <i>epi</i> -cariofileno	0,06
32	1475	<i>trans</i> -cadina-1(6),4-dieno	1,24
33	1478	γ -muroleno	0,26
34	1480	germacreno D	0,51
35	1489	β -selineno	0,11
36	1493	<i>trans</i> -murola-4(14),5-dieno	0,30
37	1493	<i>epi</i> -cubebol	0,45
38	1500	α -muroleno	0,15
39	1513	γ -cadineno	0,45
40	1523	δ -cadineno	2,25
41	1528	zonarene	0,44
42	1533	<i>trans</i> -cadina-1,4-dieno	0,20
43	1538	furopelargona	0,93
44	1548	elemol	0,07
45	1561	<i>trans</i> -nerolidol	1,11
46	1577	espatulenol	11,69
47	1582	óxido de cariofileno	8,63
48	1590	globulol	1,38
49	1592	viridiflorol	3,05
50	1608	epóxido de humuleno II	2,25
51	1627	1- <i>epi</i> -cubenol	3,22
52	1639	<i>allo</i> -epoxido de aromadendreno	0,27
53	1644	α -murolol	1,07
54	1658	<i>neo</i> -intermedeol	1,70
55	1675	cadaleno	1,34
Total:			69,63

Tabela 14: Substâncias com valores acima de 5% do total do OE do caule.

Picos identificados com área (%) $\geq 5,0\%$			
Pico	IRL lit	Substância	Área normalizada %
46	1577	espatulenol	11,69
21	1398	cipereno	9,04
47	1582	óxido de cariofileno	8,63

Tabela 15: Total dos componentes por classe química do OE do caule de *C. sacaquinha*.

Classes químicas	Total (%)
Monoterpenos	5,2
Monoterpenos oxigenados	4,4
Sesquiterpenos	25,0
Sesquiterpenos oxigenados	34,6
Outros	2,0

5.4.4 OE da folha

Foram identificadas 56 substâncias do OE da folha de *C. sacaquinha*, representando 89,2% do total do óleo, como demonstrado na tabela 16. Na pesquisa de Lopes (2003) foram identificadas 49 substâncias dando um total de 78,4% do óleo. Na tabela 17 podemos ver os valores obtidos neste estudo em comparação com os valores obtidos por Lopes (2003) para as substâncias com porcentagens maiores que 5% do valor total do OE. E por fim na tabela 18 são identificadas as principais classes químicas das substâncias encontradas para esse óleo.

Tabela 16: Composição química do OE da folha de *C. sacaquinha*.

OE <i>C. sacaquinha</i> folha			
Pico	IRL lit	Substância	Área (%)
1	924	α -tujeno	0,12
2	932	α -pineno	0,43
3	969	sabineno	0,07
4	974	β -pineno	0,04
5	988	mirceno	0,13
6	1002	α -felandreno	0,31
7	1008	δ -3-careno	3,44
8	1014	α -terpineno	0,06
9	1020	<i>p</i> -cimeno	0,14
10	1022	<i>o</i> -cimeno	0,29
11	1025	silvestreno	2,48
13	1032	β -cis-ocimeno	0,06
14	1044	β - <i>trans</i> -ocimeno	0,16
15	1054	γ -terpineno	0,08
16	1086	terpinoleno	1,06
17	1099	linalol	10,08
18	1174	terpinen-4-ol	0,29
19	1335	δ -elemeno	0,30
20	1374	α -copaeno	0,86
21	1387	β -bourboneno	0,81
22	1389	β -elemeno	11,31
23	1410	α -cedreno	0,96
24	1417	<i>trans</i> -cariofileno	5,07
26	1430	β -copaeno	0,19
27	1432	<i>trans</i> - α -bergamoteno	0,18
28	1437	α -guaieno	0,41
29	1448	<i>cis</i> -murola-3,5-dieno	0,09
30	1452	α -humuleno	1,36
31	1458	<i>allo</i> -aromadendreno	0,75
32	1478	γ -muroleno	0,10
33	1480	germacreno D	9,20

OE <i>C. sacaquinha</i> folha			
Pico	IRL lit	Substância	Área (%)
34	1493	<i>trans</i> -murolo-4 (14), 5-diene	0,65
35	1494	biciclogermacreno	4,82
36	1500	α -muroloeno	0,18
37	1508	germacreno A	1,89
38	1522	γ -cadineno	0,00
39	1544	α -calacoreno	0,15
40	1548	elemol	0,62
41	1549	germacreno B	0,73
42	1561	<i>trans</i> -nerolidol	0,00
43	1577	espatulenol	4,45
44	1582	óxido de cariofileno	0,00
45	1600	guaiol	2,74
46	1602	ledol	2,59
47	1608	epóxido de humuleno II	0,25
48	1627	1- <i>epi</i> -cubenol	2,04
49	1636	gossonorol	0,86
50	1545	cubenol	1,92
51	1658	selin-11-en-4- α -ol	8,30
52	1670	bulnesol	0,93
53	1672	5- <i>iso</i> -cedranol	1,71
54	1685	α -bisabol	1,28
55	1692	acorenona	1,68
56	1699	β -sinensal	0,55
Total:			89,2

Tabela 17: Comparação com a literatura para substâncias com valores >5% do total do óleo.

Comparação com valores da literatura para valores >5%				
Posição	Substância observada	Área (%)	Substância na lit.*	Área (%)
1	β -elemeno	11,3	β -elemeno	12
2	linalol	10,1	germacreno D	10,1
3	germacreno D	9,2	linalol	5,8
4	selin-11-en-4- α -ol	8,3	β -cariofileno	5,7
5	<i>trans</i> -cariofileno	5,1		

*Literatura: Lopes (2003).

Tabela 18: Total dos componentes por classe química do OE da folha de *C. sacaquinha*.

Classes químicas	Total (%)
Monoterpenos	8,9
Monoterpenos oxigenados	10,4
Sesquiterpenos	45,5
Sesquiterpenos oxigenados	33,4
Outros	1,7

5.4.5 Substâncias de maior relevância nos OEs de *C. sacaquinha*

A tabela 19 apresenta as substâncias principais dos OE de *C. sacaquinha* e suas estruturas moleculares estão apresentadas na Figura 20.

Tabela 19: Principais componentes químicos dos OEs de *C. sacaquinha*.

OE	Substância	Total (%)
Casca	espatulenol	15,1
	óxido de cariofileno	11,1
Caule	espatulenol	11,69
	cipereno	9,04
Folha	β -elemeno	11,3
	linalol	10,1
	germacreno D	9,2

5.4.5.1 Atividade antiplasmódica e outras atividades dos componentes principais dos OEs

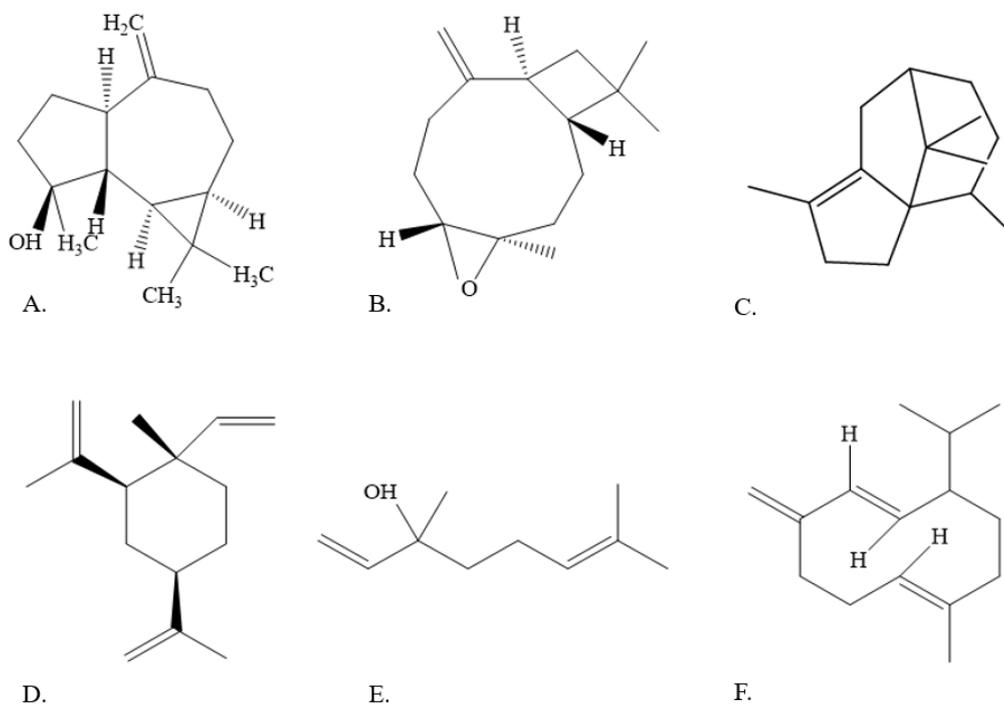
Estudos anteriores de OEs contendo espatulenol como substância majoritária relataram algumas atividades biológicas, como antiproliferativa (BENDAOU *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2006), anti-inflamatória (APEL *et al.*, 2010; DIB *et al.*, 2017) e antimicrobiana (TAN *et al.*, 2016), além de atividade repelente contra *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi* (CANTRELL *et al.*, 2005).

Os OEs de outras espécies que contém componentes encontrados nos OEs de *C. sacaquinha* foram estudados para atividade antiplasmódica com resultados interessantes. Um estudo feito por Boyom *et al.* (2003) testou OEs de 5 plantas que continham dentre seus maiores componentes o espatulenol e o óxido de cariofileno contra cepas de *P. falciparum* obtendo resultados positivos com CI_{50} igual a 2 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando potencial antiplasmódico. O óxido de cariofileno, grande constituinte (18%) do OE da planta *Alpinia zerumbet*, foi testado contra o *P. falciparum* obtendo resultados para o CI_{50} de $71,4 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$, demonstrando ausência de ação antiplasmódica (MENDIOLA *et al.*, 2015). O cipereno isolado em outro trabalho não demonstrou atividade antiplasmódica (WEENEN *et al.*, 1990). O OE das folhas de *Cedrelopsis grevei* contendo 6,96% de β -elemeno na sua composição foi considerado ativo contra o *P. falciparum* com $CI_{50} = 17,5 \text{ mg/L}$ (AFOULOUS, 2013).

O OE da planta *Xylopi frutescens* contendo 22,9% de germacreno D foi testado contra o parasita da doença de Chagas, o *Trypanosoma cruzi*, obtendo resultado antiparasitário satisfatório com um CI_{50} de 13,4 $\mu\text{g/mL}$ para as formas tripomastigotas e 22,7 $\mu\text{g/mL}$ para as formas epimastigotas.

O linalol foi avaliado como isca na captura dos mosquitos vetores da malária como isca sendo o linalol oxidado importante na vigilância e captura dos vetores (NYASEMBE *et al.* 2014). Porém não foi encontrado na literatura testes antimaláricos para esse OE.

Figura 20: Estrutura química das principais substâncias dos OEs: espatulenol (A), óxido de cariofileno (B), cipereno (C), β -elemeno (D), linalol (E) e germacreno D (F).



6. CONCLUSÃO

Nesse trabalho, foi isolado o triterpeno ácido 3-acetil aleuritólico da casca de *Croton sacaquinha* Croizat, o primeiro relato dessa substância nessa espécie.

Foram descritas pela primeira vez as composições químicas dos OEs e principais componentes das cascas (espatulenol, ledol, linalol, óxido de cariofileno) e dos caules (cipereno, espatulenol e óxido de cariofileno) dessa espécie pela primeira vez.

O extrato etanólico da casca mostrou-se ativo *in vitro* contra cepas K1 resistentes à cloroquina de *Plasmodium falciparum*, demonstrando pela primeira vez a atividade antiplasmódica dessa espécie que é utilizada na medicina tradicional no tratamento da malária.

No conjunto, os resultados alcançados representam contribuições relevantes para a etnofarmacologia regional e composição química dessa espécie Amazônica.

7. REFERENCIAS

ABU-SHANAB, B. *et al.* Antibacterial activities of some plant extracts utilized in popular medicine in Palestine. *Turkish Journal of Biology*, v. 28, n. 2, p. 99-102, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00187-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00187-7)

ADAM, I. *et al.* Dihydroartemisinin–piperazine versus artemether–lumefantrine, in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in central Sudan. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, v. 104, n. 4, p. 319-326, 2010. <https://doi.org/10.1179/136485910X12743554760144>

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry (Vol. 456, pp. 544-545). Carol Stream: Allured Publishing Corporation. 2007.

AFOULOUS, Samia *et al.* Chemical composition and anticancer, antiinflammatory, antioxidant and antimalarial activities of leaves essential oil of *Cedrelopsis grevei*. *Food and chemical toxicology*, v. 56, p. 352-362, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.008>

ALECRIM, M. G. C.; ALECRIM, W.; MACÊDO, V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 32, p. 67-68, 1999. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821999000100013>

ALEXANDER, I. C. *et al.* An insecticidal diterpene from *Croton linearis*. *Phytochemistry*, v. 30, n. 6, p. 1801-1803, 1991. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)85016-S](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)85016-S)

ALLISON, A. C. *et al.* Celastrol, a potent antioxidant and anti-inflammatory drug, as a possible treatment for Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 25, n. 7, p. 1341-1357, 2001.

ALMEIDA, C. A., *et al.* Inibição da atividade proteásica de *Rhizopus oryzae* pelos óleos de *Croton cajucara* e *Croton sakaquina*. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 26., 2011. Resumos. Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2011.

APEL, M. A. *et al.* Anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Myrciaria tenella* and *Calycorectes sellowianus*. *Pharmaceutical Biology*, v. 48, n. 4, p. 433-438, 2010. <https://doi.org/10.3109/13880200903164386>

ARAÚJO, V. *et al.* Óleos essenciais da Amazônia contendo linalol. *Acta Amazonica*, v. 1, p. 45-47, 1971.

BABUSHOK, V. I.; LINSTROM, P. J.; ZENKEVICH, I. G. Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, v. 40, n. 4, p. 043101, 2011. <https://doi.org/10.1063/1.3653552>

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos. Editora Artmed, Porto Alegre, Brasil. 2015.

BENDAOUD, Houcine et al. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. Journal of Food Science, v. 75, n. 6, p. C466-C472, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01711.x>

BEZERRA, A. J. N. et al. Antinociceptive effect of triterpene acetyl aleuritic acid isolated from *Croton zehntneri* in adult zebrafish (*Danio rerio*). Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 534, p. 478-484, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.056>

BHATT, S. et al. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. Nature, v. 526, n. 7572, p. 207-211, 2015. <https://doi.org/10.1038/nature15535>

BHAVNANI, S. M.; BALLOW, C. H. New agents for Gram-positive bacteria. Current Opinion in Microbiology, v. 3, n. 5, p. 528-534, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00134-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00134-X)

BICCHI, C. et al. Quantitative analysis of essential oils: a complex task. Flavour and Fragrance Journal, v. 23, n. 6, p. 382-391, 2008. <https://doi.org/10.1002/ffj.1905>

BIRKETT, M. A. et al. Antiektoparasitic activity of the gum resin, gum haggard, from the East African plant, *Commiphora holtziana*. Phytochemistry, v. 69, n. 8, p. 1710-1715, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.02.017>

BIZZO, H. R. et al. A set of electronic sheets for the identification and quantification of constituents of essential oils. Química Nova, v. 43, p. 98-105, 2020. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170458>

BLOCK, S. et al. Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. Phytochemistry, v. 65, n. 8, p. 1165-1171, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.02.023>

BOULOS, M. et al. The clinical evaluation of quinine for the treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 30, n. 3, p. 211-213, 1997. <https://doi.org/10.1590/s0037-86821997000300007>

BOYOM, F. F. et al. Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. Phytochemistry, v. 64, n. 7, p. 1269-1275, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.08.004>

BRUCE, T. J. A. et al. Response of economically important aphids to components of *Hemizygia petiolata* essential oil. Pest Management Science: formerly Pesticide Science, v. 61, n. 11, p. 1115-1121, 2005. <https://doi.org/10.1002/ps.1102>

BUTLER, A. R.; KHAN, S.; FERGUSON, E. A brief history of malaria chemotherapy. The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh, v. 40, n. 2, p. 172-177, 2010. <https://doi.org/10.4997/jrcpe.2010.216>

CACHET, T. *et al.* IOFI recommended practice for the use of predicted relative-response factors for the rapid quantification of volatile flavouring compounds by GC-FID. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 31, n. 3, p. 191-194, 2016. <https://doi.org/10.1002/ffj.3311>

CAI, Y.; CHEN, Z. P.; PHILLIPSON, J. D. Clerodane diterpenoids from *Croton lechleri*. *Phytochemistry*, v. 34, n. 1, p. 265-268, 1993. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90816-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90816-1)

CANTRELL, C. L. *et al.* Isolation and identification of mosquito bite deterrent terpenoids from leaves of American (*Callicarpa americana*) and Japanese (*Callicarpa japonica*) beautyberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 15, p. 5948-5953, 2005. <https://doi.org/10.1021/jf0509308>

CANTRELL, C. L.; FRANZBLAU, S. G.; FISCHER, N. H. Antimycobacterial plant terpenoids. *Planta Medica*, v. 67, n. 8, p. 685-694, 2001. <https://doi.org/10.1055/s-2001-18365>

CARUZO, M.B.R. *et al.* *Croton* em Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB35921>>. Acesso em: 01 jun. 2022

CHAGAS, A. C. S. *et al.* Efficacy of essential oils from plants cultivated in the Amazonian Biome against gastrointestinal nematodes in sheep. *Journal of Parasitic Diseases*, v. 42, n. 3, p. 357-364, 2018. <https://doi.org/10.1007/s12639-018-1007-x>

CRAVEIRO, A. A. *et al.* Sonderianin, a furanoid diterpene from *Croton sonderianus*. *Phytochemistry*, v. 20, n. 4, p. 852-854, 1981. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)85198-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)85198-9)

CRAVEIRO, A. A.; SILVEIRA, E. R. Two cleistanthane type diterpenes from *Croton sonderianus*. *Phytochemistry*, v. 21, n. 10, p. 2571-2574, 1982. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(82\)85259-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(82)85259-X)

DE ANDRADE-NETO, V. F. *et al.* *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, p. 359-366, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007000300016>

DE MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira*, Brasília, DF, v. 27, n. 2, p. S3299-S3302, 2009. CD-ROM. Suplemento. 49º Congresso Brasileiro de Olericultura, Águas de Lindóia, SP., 2009.

DE SOUZA CHAGAS, A. C. *et al.* Efficacy of 11 Brazilian essential oils on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 7, n. 3, p. 427-432, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.01.001>

DE SOUZA, P. M., *et al.* Essential oils from white and red sacaca (*Croton cajucara* Benth) and sacaquinha (*Croton sacaquinha*) with antimicrobial activities against sulfate-reducing bacteria (SRB). In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 28, 2015, Florianópolis. Anais. São

Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2015. Seção Microbiologia Ambiental. Cód 1752-1., 2015.

DIB, I. *et al.* Chemical composition, vasorelaxant, antioxidant and antiplatelet effects of essential oil of *Artemisia campestris* L. from Oriental Morocco. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 17, n. 1, p. 1-15, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1598-2>

ERIKA, M. B.; NEVES, D. P. *Parasitologia humana*. ed.13, Capítulo 17. Rio de Janeiro: Atheneu, 2016. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70177-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70177-X)

FRANCOMANO, F. *et al.* β -Caryophyllene: a sesquiterpene with countless biological properties. *Applied Sciences*, v. 9, n. 24, p. 5420, 2019. <https://doi.org/10.3390/app9245420>

GONÇALVES, L. A. *et al.* Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 6, n. 1, p. 8-14, 2003.

GRAND REVIEW RESEARCH INC. US. Disponível em: < <https://www.grandviewresearch.com> > . Acesso em 12 maio 2022.

GUERIN, P. J. *et al.* Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 2, n. 9, p. 564-573, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00372-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00372-9)

ICHIHARA, Y. *et al.* Cajucarinolide and isocajucarinolide: anti-inflammatory diterpenes from *Croton cajucara*. *Planta Medica*, v. 58, n. 6, p. 549-551, 1992. [DOI:10.1055/s-2006-961547](https://doi.org/10.1055/s-2006-961547)

KALIL FILHO, A. N.; KALIL, G. P. C.; LUZ, A. I. R. Conservação de germoplasma de plantas aromáticas e medicinais da Amazonia brasileira para uso humano. EMBRAPA. 2000. [comun-tec-50.PDF \(embrapa.br\)](https://www.embrapa.br/comun-tec-50.PDF)

KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M. Linalool—A review of a biologically active compound of commercial importance. *Natural Product Communications*, v. 3, n. 7, p. 1934578X0800300727, 2008. <https://doi.org/10.1177%2F1934578X0800300727>

KREBS, H. C.; RAMIARANTSOA, H. Clerodane diterpenes of *Croton hovarum*. *Phytochemistry*, v. 45, n. 2, p. 379-381, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00815-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00815-1)

KRISHNA, S.; UHLEMANN, A.-C.; HAYNES, R. K. Artemisinins: mechanisms of action and potential for resistance. *Drug Resistance Updates*, v. 7, n. 4-5, p. 233-244, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2004.07.001>

KUPCHAN, S. M. *et al.* Antileukemic principles isolated from Euphorbiaceae plants. *Science*, v. 191, n. 4227, p. 571-572, 1976. <https://doi.org/10.1126/science.1251193>

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. The Journal of Parasitology, p. 418-420, 1979. <https://doi.org/10.2307/3280287>.

LAURA, A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. (Ed.). Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability. John Wiley & Sons, New Delhi, India. 2009.

LOPES, D. *et al.* Essential oil from leaves of *Croton saccabarboreus* Benth. Journal of Essential Oil Research, v. 15, n. 1, p. 48-49, 2003. <https://doi.org/10.1080/10412905.2003.9712263>

MACIEL, M. A. M. *et al.* O gênero *Croton* e aspectos relevantes de diterpenos clerodanos. Revista Fitos v. 2, n. 3, 2006. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/18405>

MACIEL, M. A. M. *et al.* Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. Journal of Ethnopharmacology, v. 70, n. 1, p. 41-55, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00159-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00159-2)

MACKINNON, M. J. Drug resistance models for malaria. Acta Tropica, v. 94, n. 3, p. 207-217, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.04.006>

MARKET RESEARCH REPORTS, Consulting: Global Market Insights Inc. Disponível em: <https://www.gminsights.com> Acessado em 01/06/2022

MCLEAN, S. *et al.* Unambiguous structural and nuclear magnetic resonance spectral characterization of two triterpenoids of *Maprounea guianensis* by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. Canadian Journal of Chemistry, v. 65, n. 11, p. 2519-2525, 1987. <https://doi.org/10.1139/v87-420>

MELO, I. R. S. *et al.* FT-Raman and FTIR-ATR spectroscopies and DFT calculations of triterpene acetyl aleuritic acid. Journal of Molecular Structure, v. 1058, p. 221-227, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2013.11.023>

MENDIOLA, J. *et al.* Chemical composition and *in vitro* antiplasmodial activity of essential oils of leaves and flowers of *Alpinia zerumbet* grown in Cuba. Pharmacology Online, v. 2, p. 1-5, 2015. https://pharmacologyonline.silae.it/front/archives_2015_2

MILANOWSKI, D. J. *et al.* Geographic distribution of three alkaloid chemotypes of *Croton lechleri*. Journal of Natural Products, v. 65, n. 6, p. 814-819, 2002. <https://doi.org/10.1021/np000270v>

MS, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Assistência Farmacêutica. Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos/Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica - Brasília: Ministério da Saúde, 2016.190 p.

MS, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Imunizações e Doenças Transmissíveis. Boletim Epidemiológico Malária, 2021a. [Boletim Epidemiológico Especial - Malária 2021 — Português \(Brasil\) \(www.gov.br\)](#)

MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Guia de tratamento da Malária no Brasil, 2021b. [Guia de tratamento da malária no Brasil 2º edição 2021 — Português \(Brasil\) \(www.gov.br\)](#)

MUELLER, I. *et al.* Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. The Lancet Infectious Diseases, v. 9, n. 9, p. 555-566, 2009. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70177-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70177-X)

NSANZABANA, C. Resistance to artemisinin combination therapies (ACTs): do not forget the partner drug! Tropical Medicine and Infectious Disease, v. 4, n. 1, p. 26, 2019. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4010026>

NYASEMBE, V. O. *et al.* Development and assessment of plant-based synthetic odor baits for surveillance and control of malaria vectors. PLoS One, v. 9, n. 2, p. e89818, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089818>

NYASSE, B. *et al.* Antifilarial activity *in vitro* of polycarpol and 3-*O*-acetyl aleuritolic acid from cameroonian medicinal plants against *Onchocerca gutturosa*. Natural Product Research, v. 20, n. 04, p. 391-397, 2006. <https://doi.org/10.1080/14786410600661377>

OGUNGBAMIGBE, T. O. *et al.* Chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Osogbo Nigeria: efficacy of amodiaquine+ sulfadoxine-pyrimethamine and chloroquine+ chlorpheniramine for treatment. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 103, p. 79-84, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000100012>

OLIVEIRA, A. C. D. *et al.* Os dez anos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e os principais entraves da cadeia produtiva de extratos vegetais e medicamentos fitoterápicos no Brasil. 2016. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/19253>

OLIVEIRA, D. R. *et al.* Ethnopharmacological evaluation of medicinal plants used against malaria by quilombola communities from Oriximiná, Brazil. Journal of Ethnopharmacology, v. 173, p. 424-434, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.035>

OLIVEIRA-FERREIRA, J. *et al.* Malaria in Brazil: an overview. Malaria Journal, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2010. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-115>

OMS (WHO) - World malaria report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

OMS (WHO) World Malaria Report Geneva. 2020: World Health Organization; 2020. https://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report/en/. Acesso em: 21/03/2022

OMS (WHO). Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. WHO. Geneva. 2010.

PACKARD, R. M. The origins of antimalarial-drug resistance. *New England Journal of Medicine*, v. 371, n. 5, p. 397-399, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.08.006>

PERES, M. T. L. P. *et al.* Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmacological criteria used in their isolation. *Phytotherapy Research*, v. 12, n. 3, p. 209-211, 1998.

PERES, M. T. L. P. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 56, n. 3, p. 223-226, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(97\)00039-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(97)00039-1)

PIETERS, L. A. C.; BERGHE, D. A. V.; VLIETINCK, A. J. A dihydrobenzofuran lignan from *Croton erythrochilus*. *Phytochemistry*, v. 29, n. 1, p. 348-349, 1990. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)89073-I](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)89073-I)

PIMENTEL, V. *et al.* Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança? *Revista do BNDES*, v. 43, p. 41-89 2015.

PROZESKY, E. A.; MEYER, J. J. M.; LOUW, A. I. *In vitro* antiplasmodial activity and cytotoxicity of ethnobotanically selected South African plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 76, n. 3, p. 239-245, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00245-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00245-8)

RAVI KIRAN, S.; SITA DEVI, P. Evaluation of mosquitocidal activity of essential oil and sesquiterpenes from leaves of *Chloroxylon swietenia* DC. *Parasitology Research*, v. 101, n. 2, p. 413-418, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0485-z>

REYES, S. Infecções malaricas por *Plasmodium falciparum* resistente ao tratamento com cloroquina. Situação no Brasil (1960-1981). *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, p. 109-130, 1981.

RIECKMANN, K. H. *et al.* Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. *The Lancet*, v. 311, n. 8054, p.22-23, 1978.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, p. 11-33, 2007. <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532007000100002>

SAMPSON, J. H. *et al.* Ethnomedicinally selected plants as sources of potential analgesic compounds: indication of *in vitro* biological activity in receptor binding assays. *Phytotherapy Research*, v. 14, n. 1, p. 24-29, 2000. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(200002\)14:1%3C24::AID-PTR537%3E3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(200002)14:1%3C24::AID-PTR537%3E3.0.CO;2-9)

SIVEP-Malaria – Sistema De Informação da Vigilância Epidemiológica – Boletim Epidemiológico: Malária (2020). Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2020/boletim_especial_malaria_1dez20_final.pdf. Acessado em 28/9/2022.

SOUSA, R. H. da C. *et al.* Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico das folhas e galhos de *Croton sacaquinha* Croizat (euphorbiaceae). 2010. <http://repositorio.bc.ufg.br/handle/ri/15878>

TAN, N. *et al.* Antimycobacterial and antifungal activities of selected four *Salvia* species. 2016. <https://hdl.handle.net/11421/12719>

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, v. 193, n. 4254, p. 673-675, 1976. <https://doi.org/10.1126/science.781840>.

TU, Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nature medicine*, v. 17, n. 10, p. 1217-1220, 2011. <https://doi.org/10.1038/nm.2471>

VAN DEN DOOL, H. A. N. D.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 11, p. 463-471, 1963. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X)

WANG, W. *et al.* Antimicrobial activities of essential oil from *Artemisiae argyi* leaves. *Journal of Forestry Research*, v. 17, n. 4, p. 332-34, 2006. <https://doi.org/10.1007/s11676-006-0077-2>

WANG, P. *et al.* Oxidative stress induced by lipid peroxidation is related with inflammation of demyelination and neurodegeneration in multiple sclerosis. *European Neurology*, v. 72, n. 3-4, p. 249-254, 2014. <https://doi.org/10.1159/000363515>

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleos essenciais. *Revista Faculdade de Farmácia e Bioquímica*, v. 1, n. 1, p. 77-81, 1963.

WEENEN, H. *et al.* Antimalarial compounds containing an α , β -unsaturated carbonyl moiety from Tanzanian medicinal plants1. *Planta Medica*, v. 56, n. 04, p. 371-373, 1990. <https://doi.org/10.1055/s-2006-960985>

WENIGER, B. *et al.* Evaluation of ethnobotanically selected Benin medicinal plants for their in vitro antiplasmodial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 90, n. 2-3, p. 279-284, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.10.002>

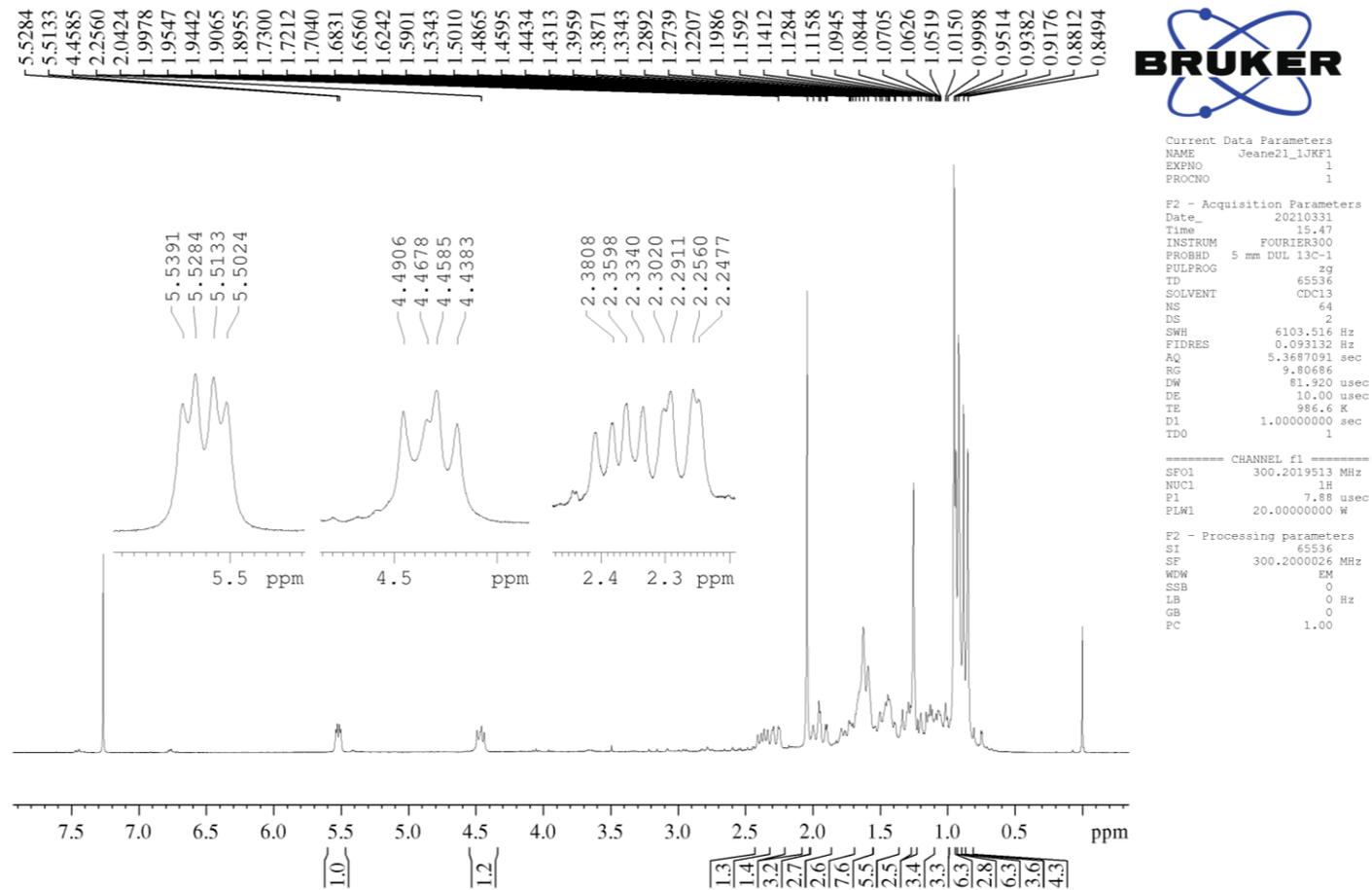
XU, W.-H.; LIU, W.-Y.; LIANG, Q. Chemical constituents from *Croton* species and their biological activities. *Molecules*, v. 23, n. 9, p. 2333, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23092333>

ZHAI, B. *et al.* Molecular targets of β -elemene, a herbal extract used in traditional Chinese medicine, and its potential role in cancer therapy: a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 114, p. 108812, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108812>

7. ANEXOS

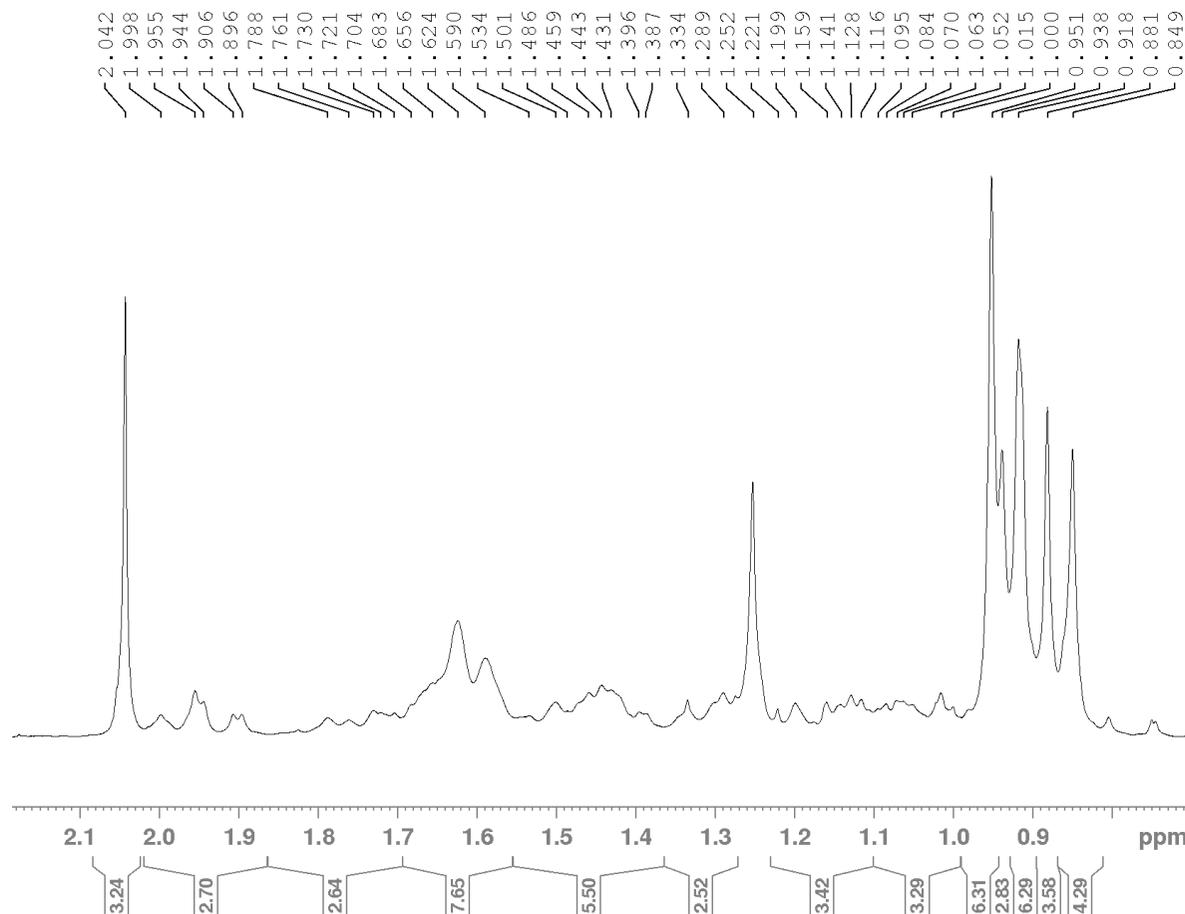
ANEXO 1: Espectro de RMN de ^1H do ácido 3-acetil aleuritólico em CHCl_3 (300 MHz).

Jeane21_1JKF1 (1H; CDC13; 7.9 mg)31/03/2021 Op. Magno



ANEXO 2: Ampliação do espectro de RMN de ^1H do ácido 3-acetil aleuritólico em CHCl_3 (300 MHz).

Jeane21_1JKF1 (1H; CDC13; 7.9 mg)
31/03/2021 Op. Magno

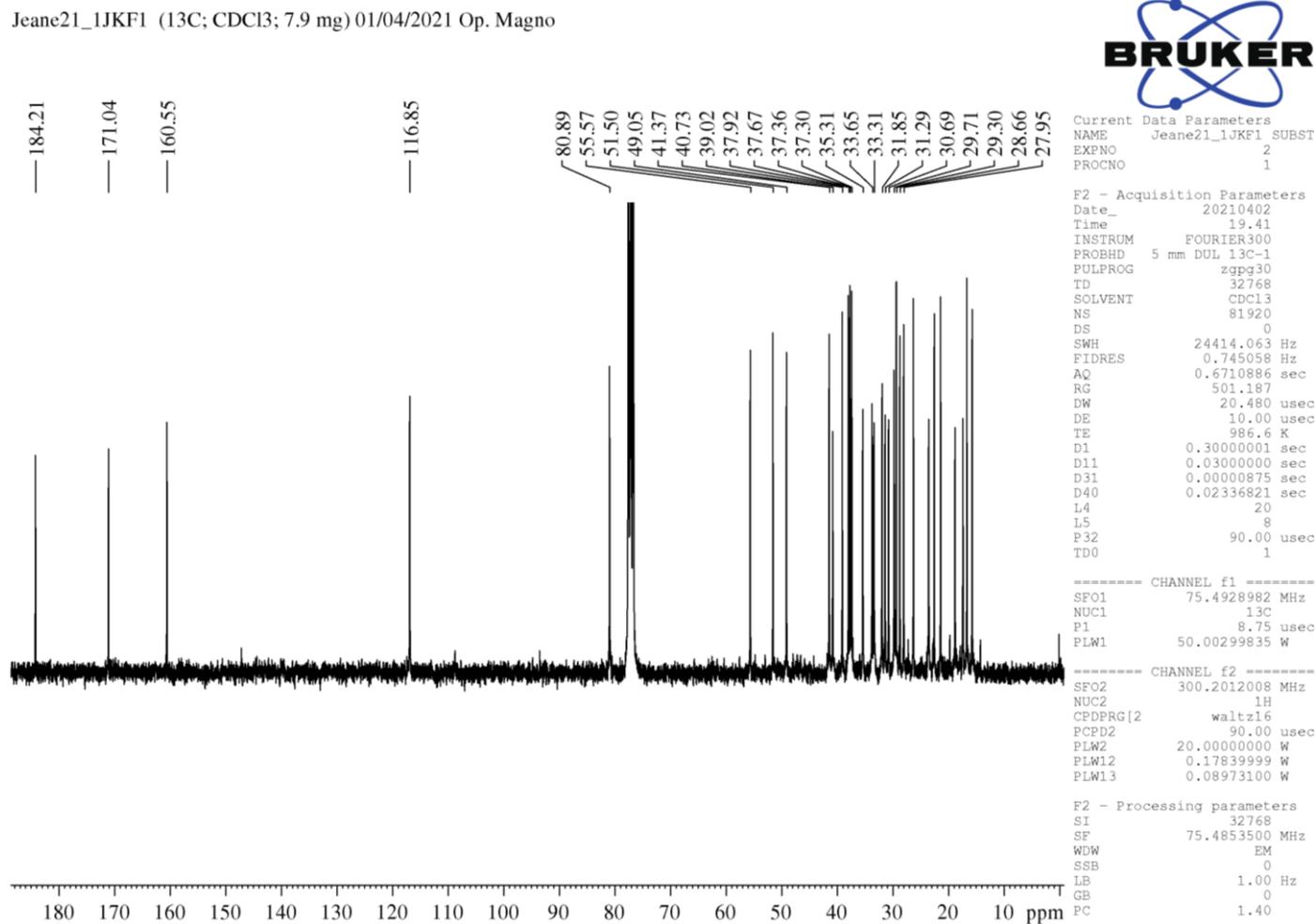


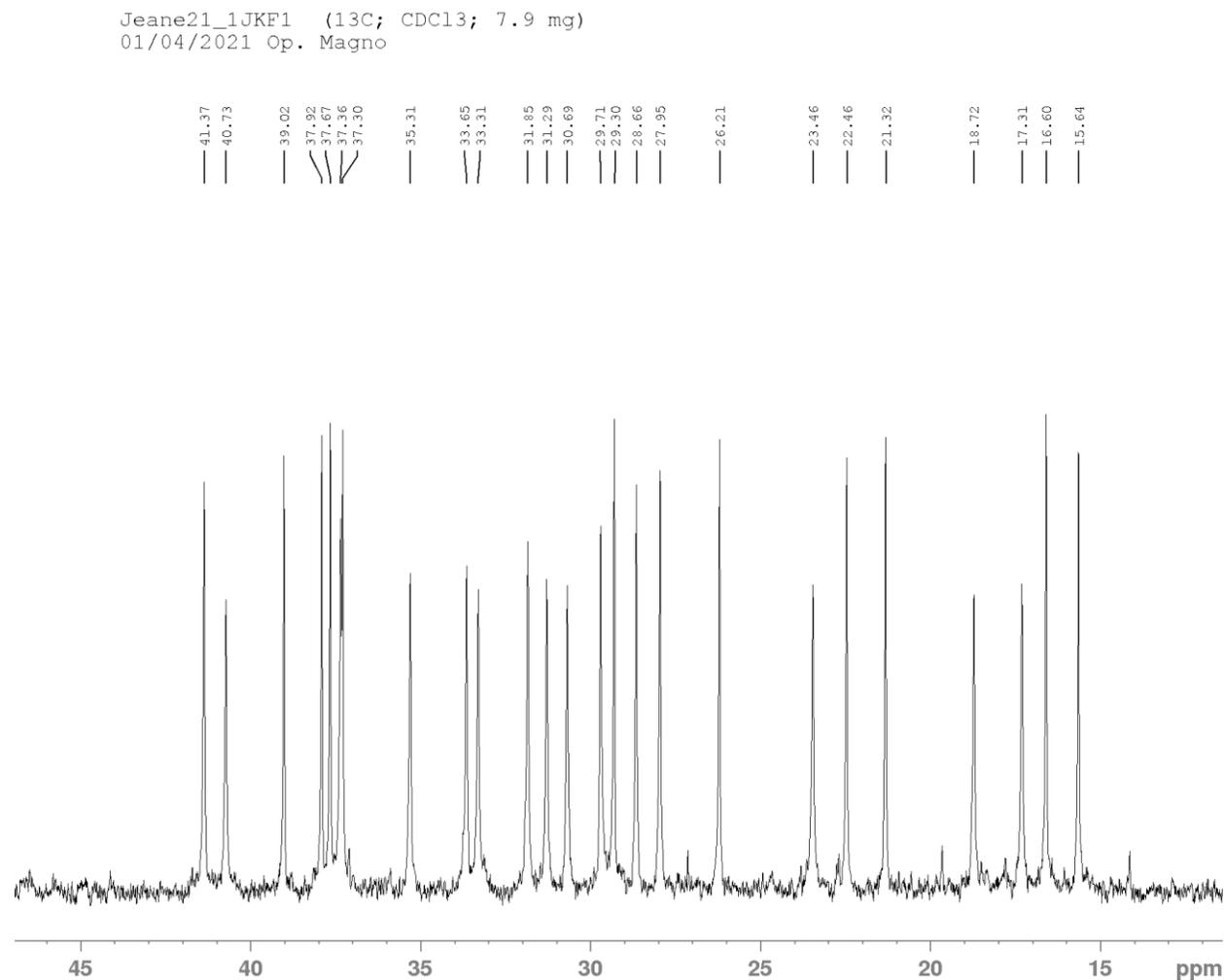
Current Data Parameters
NAME Jeane21_1JKF1
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20210331
Time 15.47
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zg
TD 65536
SOLVENT CDC13
NS 64
DS 2
SWH 6103.516 Hz
FIDRES 0.093132 Hz
AQ 5.3687091 sec
RG 9.80686
DW 81.920 usec
DE 10.00 usec
TE 986.6 K
D1 1.0000000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
SFO1 300.2019513 MHz
NUC1 1H
P1 7.88 usec
PLW1 20.0000000 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 300.2000026 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.00

ANEXO 3: Espectro de RMN de ^{13}C do ácido 3-acetil aleuritólico em CHCl_3 (300 MHz).

ANEXO 4: Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do ácido 3-acetil aleuritólico em CHCl_3 (300 MHz).

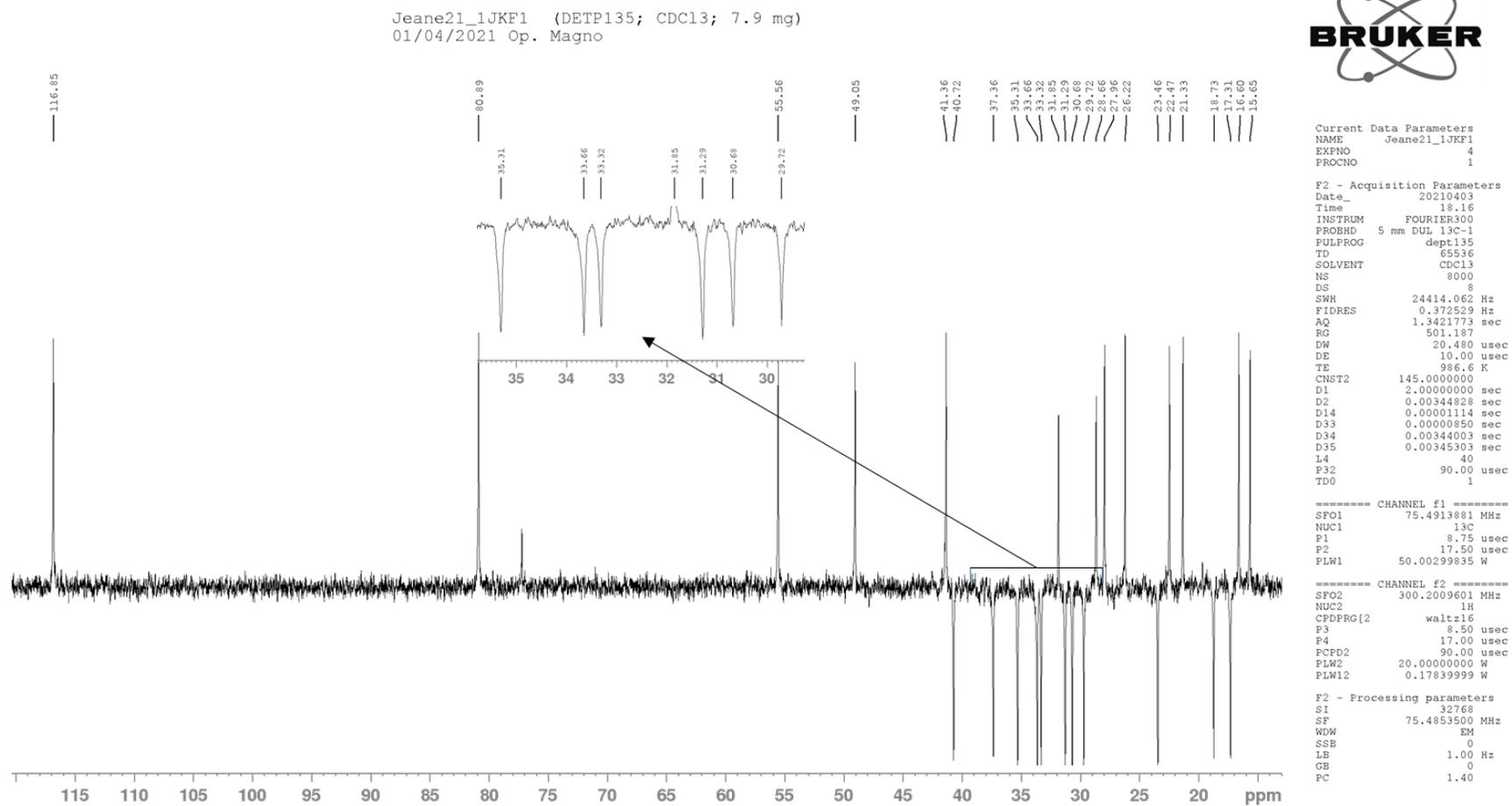
Current Data Parameters
NAME Jeane21_1JKF1
EXPNO 2
PROCNO 1

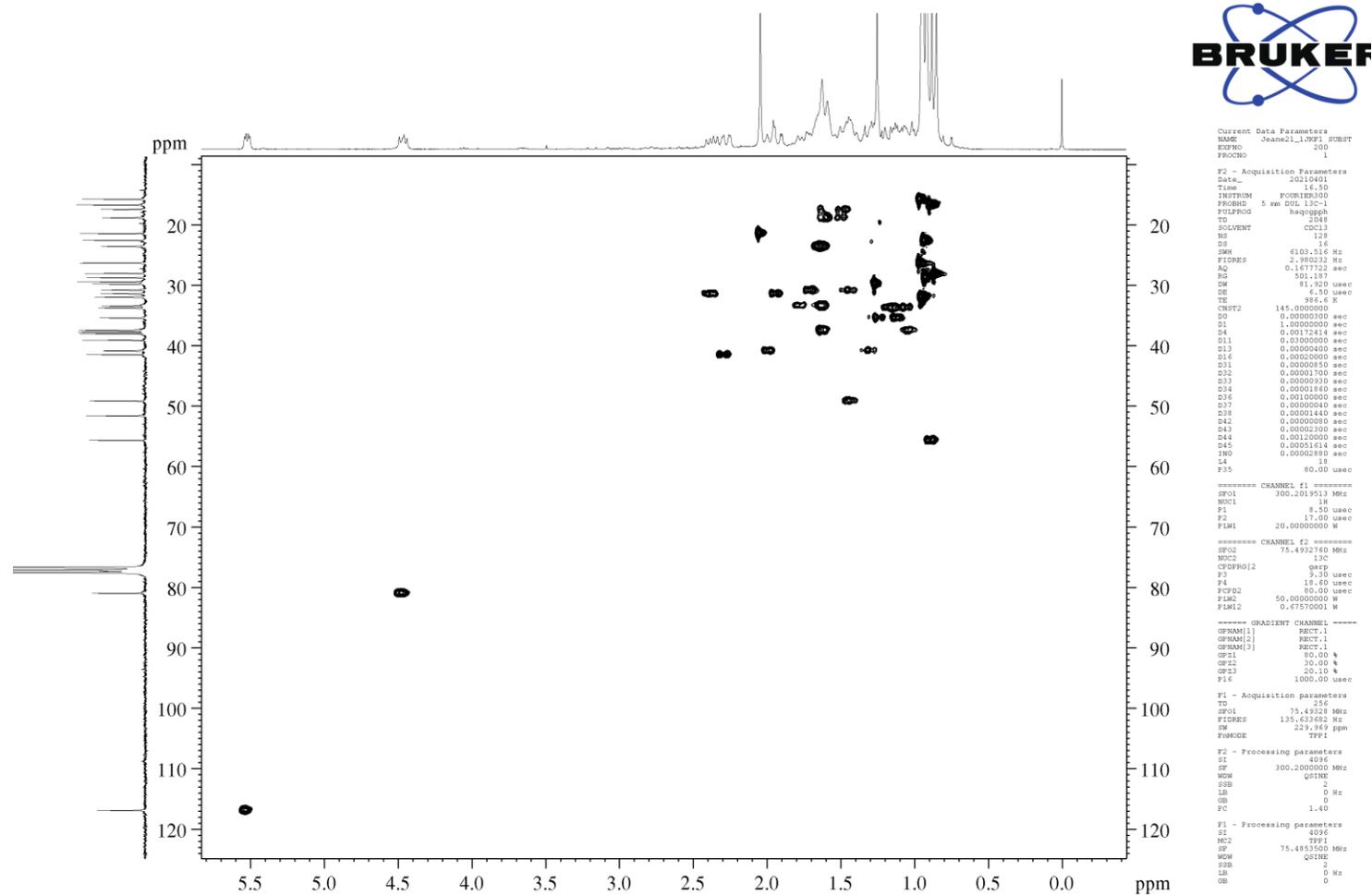
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20210402
Time 19.41
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT CDCl_3
NS 81920
DS 0
SWH 24414.062 Hz
FIDRES 0.745058 Hz
AQ 0.6710886 sec
RG 501.187
DW 20.480 usec
DE 10.00 usec
TE 986.6 K
D1 0.30000001 sec
D11 0.03000000 sec
D31 0.00000875 sec
D40 0.02336821 sec
I4 20
L5 8
P32 90.00 usec
TD0 1

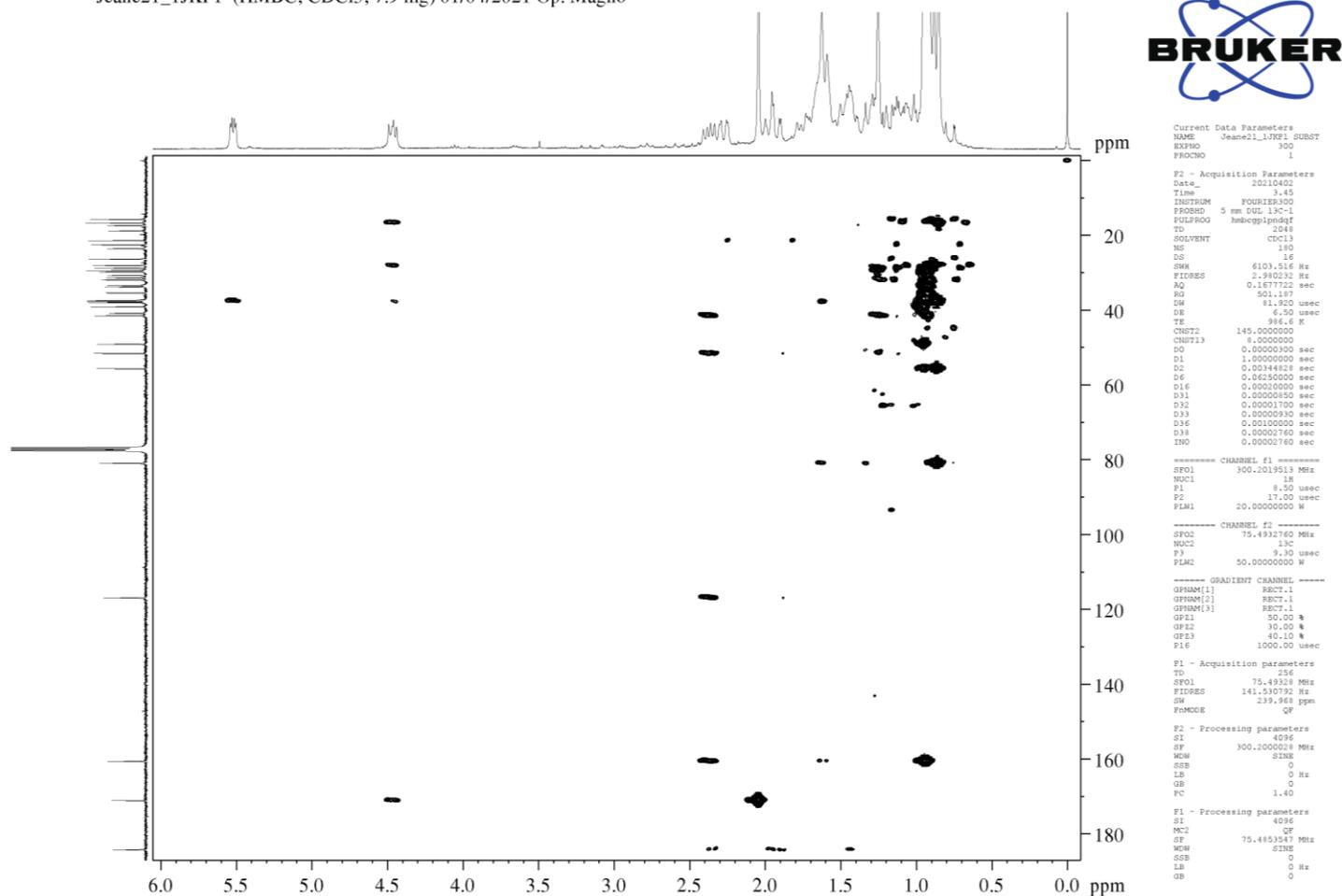
===== CHANNEL f1 =====
SFO1 75.4928982 MHz
NUC1 ^{13}C
P1 8.75 usec
PLW1 50.00299835 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2 300.2012008 MHz
NUC2 ^1H
CPDPRG[2] waltz16
PCPD2 90.00 usec
PLW2 20.00000000 W
PLW12 0.17839999 W
PLW13 0.08973100 W

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

ANEXO 5: Espectro de DEPT 135 do ácido 3-acetil aleuritólico em CHCl₃ (300 MHz).

ANEXO 6: Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HSQC do ácido 3-acetil aleuritólico em CHCl_3 (300 MHz).

ANEXO 7: Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HMBC do ácido 3-acetil aleuritólico em CHCl_3 (300 MHz).Jeane21_1JKF1 (HMBC; CDCl_3 ; 7.9 mg) 01/04/2021 Op. Magno

ANEXO 8: Espectro de correlação ^1H - ^1H COSY do ácido 3-acetil aleuritólico em CHCl_3 (300 MHz).Jeane21 1JKF1 (COSY: CDCl₃: 7.9 m θ) 05/04/2021 On. Sabrina

Current Data Parameters
 NAME Jeane21_1JKF1 SUBST
 EXPNO 100
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20210405
 Time 6.56
 INSTRUM FOURIER300
 PROBHD 5 mm DUL 13C-1
 PULPROG cosyppqf
 TD 2048
 SOLVENT CDCl₃
 NS 64
 DS 16
 SWH 6103.516 Hz
 FIDRES 2.980232 Hz
 AQ 0.1677722 sec
 RG 21.3333
 DW 81.920 usec
 DE 6.50 usec
 TE 986.6 K
 DO 0.00000300 sec
 D1 1.00000000 sec
 D13 0.00000400 sec
 D16 0.00020000 sec
 INO 0.00016380 sec

----- CHANNEL f1 -----
 SF01 300.2019513 MHz
 NUC1 1H
 P0 8.50 usec
 P1 8.50 usec
 PLW1 20.00000000 W

----- GRADIENT CHANNEL -----
 GPRAM[1] SINE.100
 GFZ1 10.00 %
 P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
 TD 256
 SF01 300.202 MHz
 FIDRES 47.695362 Hz
 SW 20.336 ppm
 FMODE QF

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

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

