

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP
INSTITUTO DE QUÍMICA**

ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS ANTIULCEROGÊNICOS
DAS FOLHAS DE *Casearia sylvestris*: CONTRIBUIÇÃO PARA O
DESENVOLVIMENTO DE UM FITOTERÁPICO**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos necessários para a obtenção
do título de Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro

Araraquara-SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

S237i Santos, André Gonzaga dos
Identificação dos princípios ativos antiulcerogênicos das folhas de
Casearia sylvestris : contribuição para o desenvolvimento de um fitoterápico /
André Gonzaga dos Santos . - Araraquara : [s.n], 2008
361 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Alberto José Cavalheiro

1. Produtos naturais. 2. Fitoterápico. 3. Antiulcerogênico. 4. Diterpenos.
I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de
Araraquara

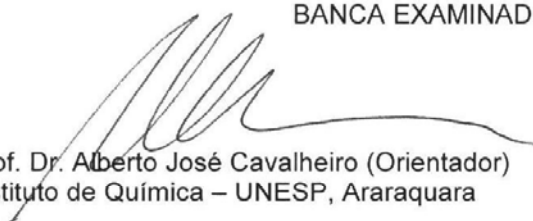
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Araraquara, 14 de março de 2008.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Ian Castro Gamboa
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Lúcia Maria Xavier Lopes
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Massuo Jorge Kato
Instituto de Química – USP, São Paulo



Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis

CURRÍCULO

ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS

DADOS PESSOAIS

Nascimento: 13/11/1972

Nacionalidade: brasileira

Naturalidade: São Paulo

Filiação: Darci Gonzaga dos Santos e Inês de Castro Gracia dos Santos

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Doutor em Química, Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista.

Título do trabalho: "Identificação dos princípios ativos antiulcerogênicos das folhas de *Casearia sylvestris* Sw: contribuição para o desenvolvimento de um fitoterápico "

Orientação: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro; Financiamento: CNPq

Início: março de 2004; conclusão: março de 2008.

Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica, Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista.

Título da Dissertação: "Desenvolvimento de metodologia para a análise de variabilidade intra-específica e dinâmica de casearinas em *Casearia sylvestris* Sw (FLACOURTIACEAE)" – 2001.

Orientação: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro; Financiamento: FAPESP (processo n. 98/12209-0)

Início: agosto de 1998; conclusão: dezembro de 2001.

Farmacêutico Bioquímico, modalidade indústria farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista.

Início: março de 1991; conclusão: julho de 1995.

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

Docência

1. Faculdade Santa Giúlia, Taquaritinga-SP – 2003/2004

Professor do curso de Farmácia: *Farmacognosia, Farmacobotânica e Introdução às Ciências Farmacêuticas*; supervisor do estágio em *Assistência Farmacêutica*.

Projeto desenvolvido: *Implantação do Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas*.

2. Centro Universitário de Votuporanga (UNIFEV) - 2001/2002

Professor do curso de Farmácia: *Farmacognosia e Deontologia e Legislação Farmacêutica*; supervisor do estágio em *Assistência Farmacêutica*. Professor do curso de Química: *Química Geral e Q. Orgânica*.

3. Centro Universitário de São José de Rio Preto (UNIRP) - 2001/2002

Professor do curso de Farmácia: *Farmacognosia e Deontologia e Legislação Farmacêutica*.

4. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - 2000

Professor colaborador do curso de Farmácia: *Deontologia e Legislação Farmacêutica*.

Indústria farmacêutica

1. Abbott Laboratórios do Brasil Ltda – maio/1996 a maio/1998
Representante de promoções e vendas (propagandista médico)
2. Medley S.A. Indústria Farmacêutica - agosto/1995 a maio/1996
Assistente na área regulatória

Estágios

1. Medley S.A. Indústria Farmacêutica – janeiro/1995 a junho/1995 (900 h)
Registro de medicamentos, desenvolvimento de métodos analíticos e produção
2. Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo-USP - janeiro/1994 e junho/1994 (540 h)
Serviço de farmácia de dispensação e setor industrial de produção de medicamentos

Trabalho voluntário

Comissão de Ética do Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo, 2000
Executiva Regional dos Estudantes de Farmácia-SP (EREFAR-SP), 1994
Centro Acadêmico de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – CACIF/UNESP, 1991 a 1993

PUBLICAÇÕES

SANTOS, A. G.; PEREZ, C. C.; TININIS, A. G.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J. Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz, **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1100-1103, 2007.

FAPESP; UNESP; USP (Brasil). SERTIÉ, J. A. A.; WOISKY, R. G.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SANTOS, A. G.; TININIS, A. G. **Processo de obtenção de extratos de *Casearia sylvestris*, processos de obtenção de frações ativas, extratos, frações ativas, uso de extratos e frações ativas, composição, unidade de dosagem, método para prevenir, tratar, combater ou suspender distúrbios gastrointestinais, medicamento e princípio ativo**. Patente depositada no INPI sob o n.º PI 0306167-1, 18 dez. 2003.

PUBLICAÇÕES EM CONGRESSOS DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO

1. CARVALHO, E. S.; SANTOS, A. G.; CAVALHEIRO, A. J. Diterpeno $\Delta^{13(16),14}$ – diênico do caule de *Casearia sylvestris* Swartz. In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 8º, 2007, São Paulo-SP, Anais, CD-ROM. **(APRESENTAÇÃO ORAL PREMIADA)**
2. CARVALHO, E. S.; SANTOS, A. G.; CAVALHEIRO, A. J. Perfil de diterpenos clerodânicos em diferentes órgãos de *Casearia sylvestris* Swartz. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FARMACOGNOSIA, 6º, 2007, Belém-PA, Anais, CD-ROM. **(APRESENTAÇÃO ORAL)**
3. FERREIRA, P. M.; CAVALCANTI, B. C.; MILITÃO, G. C. G.; JIMENEZ, P. C.; SANTOS, A. G.; CAVALHEIRO, A. J.; MONTENEGRO, R. C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C. Non specific cytotoxicity and DNA damage in leukemia and peripheral blood mononuclear cells by a new clerodane diterpenoid isolated from *Casearia sylvestris* Swartz. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA EXPERIMENTAL, 39º, 2007, Ribeirão Preto-SP, Anais, CD-ROM.
4. OLIVEIRA, A. M.; CALIRI, C. M.; SANTOS, A. G.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D.H.S.; SOARES, C. P. Rastreamento do efeito mutagênico do extrato etanólico da planta *Casearia sylvestris*, utilizando o ensaio de micronúcleo em inflorescência de *Tradescantia pallida* (TRAD-MCN). In: SIMPÓSIO PAULISTA DE FARMACOGNOSIA, 1º, 2007, Araraquara-SP, Anais, CD-ROM.

5. OLIVEIRA, A. M.; SANTOS, A. G.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; SOARES, C.P. Avaliação do efeito antimutagênico do extrato etanólico de *Casearia sylvestris* através do ensaio de micronúcleo em células sangüíneas de camundongos e células de inflorescência de *Tradescantia pallida*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 53º, 2007, Águas de Lindóia-SP, Anais, CD-ROM. **(PAINEL PREMIADO)**

6. BONFIM, G. C. C.; VIEIRA JUNIOR, G. M.; SANTOS, A. G.; BANDEIRA, K. F.; CAVALHEIRO, A. J. Extraction methodology of *Casearia sylvestris* using response surface. In: BRAZILIAN CONFERENCE ON NATURAL PRODUCTS & ANNUAL MEETING ON MICROMOLECULAR EVOLUTION, SYSTEMATICS AND ECOLOGY, 1st, XXVII, 2007, Abstract Book, CD-ROM.

7. OLIVEIRA, A. M.; CALIRI, C. M.; SANTOS, A. G.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D.H.S.; SOARES, C. P. Avaliação do efeito antimutagênico do extrato etanólico de *Casearia sylvestris* – Ensaio de micronúcleo em *Tradescantia pallida* (TRAD-MCN). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 19º, 2006, Salvador-BA, Anais, CD-ROM.

8. OLIVEIRA, A. M.; PERON, M. C. C.; CALIRI, C. M.; SANTOS, A. G.; REGASINI, L. O.; TELASCREA, M.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J.; SOARES, C. P. Rastreamento do efeito genotóxico de plantas do Cerrado e Mata Atlântica, utilizando o ensaio de micronúcleo em inflorescência de *Tradescantia pallida* (TRAD-MCN). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 19º, 2006, Salvador-BA, Anais, CD-ROM.

9. TININIS, A. G.; PEREZ, C. C.; ASSONUMA, M. M.; BANDEIRA, K. F.; SANTOS, A. G.; CAVALHEIRO, A. J. Development and chemometrics optimization of an HPLC-DAD method designed for casearin analysis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HIGH PERFORMANCE LIQUID PHASE SEPARATIONS AND RELATED TECHNIQUES, 29º, 2005, Estocolmo, Suécia, Abstract Book, p.383.

10. OLIVEIRA, A. M.; PERÓN, M. C. C.; SANTOS, A. G.; TININIS, A. G.; PEREZ, C. C.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; GIANNINI, M. J. S. M.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; SCORZONI, L.; SOARES C. P. Atividade antimutagênica de extrato etanólico de *Casearia sylvestris*, utilizando o ensaio de micronúcleo em *Tradescantia pallida*. In: SIMPÓSIO DO PROGRAMA BIOTA/FAPESP, 5º, 2005, Águas de Lindóia-SP, Anais, CD-ROM.

11. CAVALHEIRO, A. J.; SANTOS, A. G.; TININIS, A. G.; SOUZA, R. M. X.; BANDEIRA, K. F.; PEREZ, C. C.; CARVALHO, E. S.; BEDIM, D. U. Estudos fitoquímicos e atividades biológicas em *Casearia sylvestris* In: SIMPÓSIO DO PROGRAMA BIOTA/FAPESP, 5º, 2005, Águas de Lindóia-SP, Anais, CD-ROM.

12. FERREIRA, P. M. P.; RAMOS, S. O.; COSTA, P. M.; SANTOS, A. G.; PEREZ, C. C.; TININIS A. G.; CAVALHEIRO, A. J.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L.; PESSOA, C. In vitro cytotoxic activity of casearins from *Casearia sylvestris* Sw. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE FARMÁCIA DE RIBEIRÃO PRETO, 2005, Ribeirão Preto-SP, Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.41, supl.1, 2005.

13. TININIS, A. G.; PEREZ, C. C.; SANTOS, A. G.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J. Estudo de estabilidade de casearinas em solventes orgânicos deuterados utilizando RMN de ¹H. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 27ª, 2004, Salvador-BA, Livro de Resumos.

14. PEREZ, C. C.; TININIS, A. G.; SANTOS, A. G.; SILVA, G. H.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J. Casearina V: um novo diterpeno clerodânico de *Casearia sylvestris* Sw. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 27ª, 2004, Salvador-BA, Livro de Resumos.

PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO

1. VIII Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, 2007, São Paulo-SP.
2. VI Simpósio Brasileiro de Farmacognosia (SBF), 2007, Belém-PA.
3. VII Workshop de Plantas Mediciniais de Botucatu (IB e FCA-UNESP), 2006, Botucatu-SP.
4. V Simpósio do Programa BIOTA/FAPESP, 2005, Águas de Lindóia-SP.
5. 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004, Salvador-BA.

6. II Evento de Educação em Química (IQ-UNESP), 2004, Araraquara-SP

PARTICIPAÇÕES EM BANCAS EXAMINADORAS

1. Determinação da liberação do ácido acetilsalicílico no comprimido convencional e efervescente. Camila G. Damito, Mariana T. da Trindade e Natália C. Caruzo. Trabalho de conclusão de curso de Farmácia da UNIARA apresentado em 21/11/2006.
2. Estudo da toxicidade aguda da doxorubicina em microemulsões lipídicas estabilizadas com fosfatidilcolina de soja. Juliane Piovani, Lucélia Muniz e Thayana Ferreira Gomes. Trabalho de conclusão de curso de Farmácia da UNIARA apresentado em 21/11/2006.

CO-ORIENTAÇÕES – INICIAÇÃO CIENTÍFICA

1. Dieimes Uiliam Bedim.

"Investigação fitoquímica de metabólitos secundários polares presentes nas folhas de *Casearia sylvestris* Sw"; Orientação: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro; Financiamento: FAPESP

2. Elisângela Simões de Carvalho

"Estudo fitoquímico em diferentes órgãos de *Casearia sylvestris*"; Orientação: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro; Financiamento: FAPESP

Aos meus queridos pais, Inês e Darci, e à
minha querida irmã Mariana, pelo amor
incondicional em todos os momentos.

À Regiane, minha amada companheira.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alberto J. Cavalheiro pela orientação, conhecimento transmitido e amizade.

Aos docentes, funcionários, alunos de pós-graduação e estagiários de iniciação científica do Departamento de Química Orgânica pelo companheirismo, bom convívio e troca de experiências.

Aos alunos de iniciação científica Elisângela S. de Carvalho, Dieimes U. Bedim e Giovanni C. Bomfim pelas colaborações científicas e amizade.

Ao Dr. Nivaldo Borale pelos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Jaime Aboin Sertiè e ao Prof. Dr. Ricardo Gomide Woisky pela colaboração com a realização dos ensaios farmacológicos.

Ao Prof. Dr. Norberto Pepporine Lopes pelas análises de espectrometria de massas, discussões e amizade.

Ao Dr. Ricardo da Silva Sercheli da empresa Núcleo de Pesquisas Aplicadas (Jaboticabal) pelo empréstimo do extrator em escala piloto e amizade.

Ao colega de doutorado Gerardo Magela pelo auxílio nas análises de cromatografia gasosa, discussões e pela amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de doutorado concedida. Ao CNPq, à CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro ao nosso grupo de pesquisa e ao Instituto de Química da UNESP.

Ao Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, NuBBE, do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara-UNESP.

Ao Instituto Florestal do Estado de São Paulo, especialmente à unidade do Parque Estadual "Carlos Botelho" (São Miguel Arcanjo-SP), pela permissão da coleta do material vegetal e apoio.

Aqueles que seguem a ordem
natural fluem na corrente do *Tao*.

Huai Nan Tsé

RESUMO

O objetivo principal deste trabalho foi a caracterização dos princípios ativos do extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris* responsáveis pela ação antiulcerogênica. A estratégia para a identificação dos princípios ativos baseou-se no fracionamento biomonitorado. A metodologia de purificação consistiu de 3 etapas, incluindo uma extração em fase sólida utilizando sílica e carvão ativo, cromatografia em coluna de fase normal e cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa. Esta metodologia mostrou-se reprodutível e passível de escalonamento, apresentou melhor rendimento, utilizou solventes de menor toxicidade e foi realizada em menor número de etapas, comparando-se com outras utilizadas anteriormente. O extrato e a segunda fração da extração em fase sólida apresentaram atividade antiulcerogênica em ensaios de úlceras induzidas por etanol em ratos. A partir desta fração foram isoladas substâncias identificadas pelas análises espectrométricas como as casearinas B, D, H, U e a caseargrewiina F, além do norisoprenóide 9-hidróxi-4-megastimen-3-ona. A dose mínima efetiva 100% para a casearina U foi determinada: 1,68 mg/kg de peso corporal (ratos). Com a administração desta mesma dose as casearinas B, D, O e a caseargrewiina F também produziram inibição total da formação de úlceras. A caseargrewiina Fhb, um derivado da caseargrewiina F com o anel C lactônico, não apresentou atividade antiulcerogênica, sugerindo a importância do sistema diacetálico ou de um derivado biológico deste sistema (dialdeído ou diácido) para a ação farmacológica dos diterpenos. A casearina U não produziu nenhum tipo de alteração nos animais nos ensaios de toxicidade aguda via oral, mesmo com dose 100 vezes maior do que a dose mínima efetiva 100%. A partir de análises por cromatografia líquida de alta eficiência foram obtidos os teores de casearina U, caseargrewiina F e diterpenos totais do tipo das casearinas no extrato etanólico das folhas, cujos valores foram de 8,6, 4,0, e 18,1%, respectivamente. Estes resultados sugerem a viabilidade da produção de um fitoterápico a partir do extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris* ou de uma fração padronizada do mesmo, utilizando-se como marcadores os diterpenos do tipo das casearinas.

Palavras-chave: Fitoterápico. *Casearia sylvestris*. Diterpenos clerodânicos. Casearinas. Antiulcerogênico.

ABSTRACT

The main objective of this work was the identification of the antiulcerogenic compounds from the ethanolic extract of *C. sylvestris* leaves. The purification methodology used solid phase extraction (silica and active charcoal), column chromatography (normal phase) and high performance liquid chromatography (reversed phase). This methodology showed advantages as the use of less toxic solvents, smaller number of steps, and scaling-up feasibility. The extract and the second fraction of the solid phase extraction presented antiulcerogenic activity in ulcers induced by ethanol in rats. Casearins B, D, H, U and the caseargrewiin F (diterpenes), besides 9-hydroxy-4-megastimen-3-one (norisoprenoid) were isolated from this fraction and their structures were determined by spectrometric analysis. The 100% minimum effective dose for the casearin U was determined as 1.68 mg/kg of corporal weight (rat). The administration of this same dose of casearins B, D, O and caseargrewiina F also produced total inhibition for ulcers formation. Caseargrewiin Fhb, a derivate of caseargrewiin F, presented no antiulcerogenic activity, suggesting the importance of the diacetalic system or a metabolite derivative for the pharmacological action of the diterpenes. No alterations were observed in animals with oral administration of casearin U even at a dose of 100 times the 100% minimum effective dose. Quantitative analysis of casearin U, caseargrewiin F and total diterpenes in the ethanolic extract of the leaves have showed values of 4.0, 8.6 and 18.1%, respectively. These results suggest the viability of the production of a phytotherapeutic agent from the ethanolic extract of the leaves of *C. sylvestris* or from its standardized fraction, wich has been used diterpenos of casearin-type as markers.

Key-words: Phytotherapeutic agent. *Casearia sylvestris*. Clerodane diterpenes. Casearins. Antiulcerogenic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma de funcionamento do Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da CEME. Reproduzido, com adaptação, de: SANT`ANA & ASSAD (2004), 7

Figura 2: *Casearia sylvestris* Swartz. (a): indivíduo adulto; (b): aspecto geral do ramo; (c): detalhe de botões florais e flor; (d): frutos, 16

Figura 3: Anatomia da folha *Casearia sylvestris* Swartz, 19

Figura 4: Produtos à base de *C. sylvestris*, 25

Figura 5: Estruturas químicas da pitumbina e da casearina A, 26

Figura 6 (a-c): Esqueleto básico dos diterpenos *cis*-clerodânicos com anel diacetálico (anel C) presentes em espécies de *Casearia*, 35

Figura 7 (a-d): Esqueleto básico dos diterpenos *cis*-clerodânicos com anel diacetálico (anel C) presentes em espécies de *Casearia*, 36

Figura 8: Artefatos originados a partir da degradação ou abertura do anel diacetálico (C) de diterpenos clerodânicos isolados de *Casearia*, 37

Figura 9: Diterpenos clerodânicos sem o anel diacetálico, 37

Figura 10: Cromatograma da fração 32CSB e espectro no UV da casearina U, 56

Figura 11: Purificação de casearinas a partir do extrato EtOH de folhas de *C. sylvestris*, 69

Figura 12: Cromatogramas do extrato EtOH (1ª e 2ª etapas de extração) e da fração 32CSB, 71

Figura 13: Espectros no UV sobrepostos da casearina U obtidos a partir dos cromatogramas da fração 32CSB e do extrato EtOH, 72

Figura 14: Espectro de RMN de ^1H do extrato EtOH obtido à 200 MHz em CDCl_3 , 72

Figura 15: Cromatoplaça das frações EFS(A)1.0, 1.1, 2.0 e 2.1, EFS(B)1 e 2, EFS-teste2.1 e 32CSB, 77

Figura 16: Espectro de RMN de ¹H da fração EFS(A)2.0 obtido a 200 MHz em CDCl₃, 78

Figura 17: Cromatogramas das frações EFS(B)1, EFS(B)2 e EFS(B)3, 79

Figura 18: Cromatoplaças das frações FACT1 reunidas, 81

Figura 19: Cromatoplaças das frações FACT2, 81

Figura 20: Cromatogramas em CLAE-UV (gradiente exploratório) das frações 8, 15, 18 e 21FACT2, 82

Figura 21: Cromatoplaça das frações FA, 85

Figura 22: Cromatogramas (CLAE-DAD) das frações 2, 3(3-6), 7, 8(8-11), 12(12+13), 14, 15(15-19) e 20(20+21)FA, 86

Figura 23: Cromatogramas (CLAE-DAD) das frações 22(22+23), 24(24-26), 27(27-30), 31(31-36), 37(37+38), 39(39+40) e 41(41-46)FA, 87

Figura 24: Cromatogramas analíticos (gradiente exploratório e modo isocrático) e preparativo da fração 15FACT2, 89

Figura 25: Cromatogramas (CLAE-UV) das sub-frações 8FA2 e 15FACT2(G) e da co-injeção (1:1, v/v) de 8FA2+15FACT2(G), 91

Figura 26: Espectros de absorção no UV (CLAE-DAD) das sub-frações 8FA2, 9FA2 e 15FACT2(G), 91

Figura 27: Fluxograma do processo de isolamento de substâncias a partir do extrato EtOH das folhas de *C. sylvestris*, 92

Figura 28: Estrutura química geral dos diterpenos purificados, 93

Figura 29: Estrutura química da 9-hidróxi-4-megastimen-3-ona, 93

Figura 30: Principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC para a casearina U, 95

Figura 31: Principais correlações observadas nos mapas de contornos HMBC e COSY para a casearina B, 100

Figura 32: Principais correlações observadas nos mapas de contornos HMBC e COSY para a casearina D, 101

Figura 33: Principais correlações observadas nos mapas de contornos HMBC e COSY para a casearina H, 102

Figura 34: Principais correlações observadas nos mapas de contornos HMBC e COSY para a caseargreina F, 103

Figura 35: Principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC para 9-hidróxi-4-megastimen-3-ona, 107

Figura 36: Cromatogramas analíticos da caseargreina F e da caseargreina Fhb, 109

Figura 37: Principais correlações observadas nos mapas de contornos HMBC e COSY para a caseargreina Fhb, 111

Figura 38: Proposta mecanística da hidrólise básica da caseargreina F, 112

Figura 39: Fotografias dos estômagos dos ratos após ensaio de ação antiulcerogênica, 114

Figura 40: Gráfico das massas de casearina U relativas aos volumes injetados pelas áreas dos picos dos cromatogramas (curva de calibração), 116

Figura 41: Identificação e quantificação por CLAE-UV da casearina U no extrato EtOH: cromatogramas de 15FACT2(G) e do extrato EtOH, 117

Figura 42: Gráfico das concentrações de caseargreina F e das áreas dos picos dos cromatogramas (curva de calibração), 119

Figura 43: Análise quantitativa em CLAE-DAD de diterpenos totais em relação à caseargrewiina F no extrato EtOH, 121

Figura 44: Identificação de diterpenos por CLAE-DAD no extrato EtOH, 122

Figura 45: Cromatograma (TIC) de EFS(B)1 obtido em CG-EM (acima) e expansão com estruturas químicas dos sesquiterpenos identificados, 125

Figura 46: Espectros de massas das substâncias identificadas por CG-EM: β -elemeno, α -gurjuneno, *trans*-cariofileno e aromadendreno, 126

Figura 47: Espectros de massas das substâncias identificadas por CG-EM: α -humuleno, germacreno D, α -curcumeno e β -selineno, 127

Figura 48: Espectros de massas das substâncias identificadas por CG-EM: viridifloreno, biciclogermacreno, γ -cadineno e δ -cadineno, 128

Figura 49: Espectros de massas das substâncias identificadas por CG-EM: germacreno B, espatulenol e óxido de cariofileno, 129

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Informações etnofarmacológicas sobre *C. sylvestris* no Brasil, 24
- Tabela 2:** Diterpenos clerodânicos típicos em espécies de *Casearia*, 31
- Tabela 3:** Metabólitos secundários, exceto diterpenos clerodânicos, identificados e/ou isolados de extratos de espécies de *Casearia*, 39
- Tabela 4:** Composição do óleo essencial de folhas das espécies *C. grandiflora* e *C. sylvestris*, 40
- Tabela 5:** Condições utilizadas no processo de extração e informações sobre o extrato líquido, 55
- Tabela 6:** Condições de separação em CLAEprep (modo isocrático) de frações FACT2 e FA, 62
- Tabela 7:** Condições de análise em CLAE-UV de frações obtidas da separação por CLAEprep, 63
- Tabela 8:** Resultados das análises das frações da EFS-teste, 74
- Tabela 9:** Balanço de massas das frações EFS(A) e (B), 76
- Tabela 10:** Balanço de massas das frações reunidas FACT1 e FACT2, 82
- Tabela 11:** Balanço de massas da coluna FA, 85
- Tabela 12:** Informações sobre as substâncias purificadas por CLAEprep, 88
- Tabela 13:** Substituintes e massas obtidas dos diterpenos purificados, 93
- Tabela 14:** Dados espectrométricos de RMN obtidos para a casearina U a 500 MHz para ^1H e a 125 MHz para ^{13}C , em piridina-d₅, 98
- Tabela 15:** Dados espectrométricos de RMN de ^{13}C das casearinas B e D, e da caseargrewiina F obtidos a 125 MHz, em piridina-d₅, 104

Tabela 16: Dados espectrométricos de RMN de ^1H das casearinas B e D, e da caseargrewiina F obtidos a 500 MHz, em piridina-d₅, 105

Tabela 17: Dados espectrométricos de RMN obtidos para a 9-hidróxi-4-megastimen-3-ona a 500 MHz para ^1H e a 125 MHz para ^{13}C , em piridina-d₅, 107

Tabela 18: Dados espectrométricos de RMN obtidos para a caseargrewiina Fhb a 500 MHz para ^1H e a 125 MHz para ^{13}C , em piridina-d₅, 111

Tabela 19: Resultados dos ensaios de atividade antiulcerogênica, 113

Tabela 20: Dados obtidos das análises em CLAE-UV da casearina U para construção da curva de calibração, 115

Tabela 21: Dados obtidos na quantificação da casearina U no extrato EtOH, 116

Tabela 22: Dados obtidos das análises em CLAE-DAD da caseargrewiina F para construção da curva de calibração, 118

Tabela 23: Dados obtidos na quantificação de diterpenos totais do tipo das casearinas em relação à caseargrewiina F no extrato EtOH, 120

Tabela 24: Dados obtidos das análises por CG-EM da fração EFS(B)1, 124

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Etapas da produção de fitoterápicos, 9

Quadro 2: Etapas do controle de qualidade de fitoterápicos, 11

Quadro 3: Descrição morfológica de *C. sylvestris*, 15

Quadro 4: Chave para identificação das variedades de *C. sylvestris* segundo KLEIN e SLEUMER (1984), 17

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS - ácido acetilsalicílico
AcOEt - acetato de etila
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APG - *Angiosperm Phylogeny Group*
CEME - Central de Medicamentos
CC - cromatografia em coluna
CCDC - cromatografia em camada delgada comparativa
CG - cromatografia gasosa
CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD - cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos
CLAEprep - cromatografia líquida de alta eficiência preparativa
CLAE-UV - cromatografia líquida de alta eficiência com detector no UV/Vis
COSY – *Correlated Spectroscopy*
d - duplete
D - distância total de eluição
dd – duplo duplete
DE₅₀ - dose mínima efetiva 50%
DE₁₀₀ - dose mínima efetiva 100%
DL₅₀ - dose mínima letal 50%
DEPT – *Distortionless Enhancement Polarization Transfer*
d.i. - diâmetro interno
*d*l - duplete largo
DMSO - dimetilsulfóxido
DMSO-d₆ - dimetilsulfóxido deuterado
dt – duplo tripleto
EFS - extração em fase sólida
EM - espectrometria de massas
EtOH - etanol
FDA – *Food and Drug Administration*
FE - fase estacionária

FM - fase móvel
Hex - n-hexanos
HMBC - *Heteronuclear Multiple-Bond Correlation*
HMQC - *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*
HRTOF-ESIMS - *High Resolution Time-of-Flight Electrospray Ionisation Mass Spectrometry*
HTC - células de cultura de tecido do hepatoma
INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial
i-PrOH - isopropanol
IV - infravermelho
J - constante de acoplamento
m - multiplete
Me - metila
MeOH - metanol
NOESY - *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*
m/z - relação carga/massa
OAc - acetato
OBu - butanoato
OMe - metoxila
OMS - Organização Mundial de Saúde
P.A. - para análise
PEG - polietilenoglicol
piridina-d5 - piridina deuterada
PLA₂ - fosfolipase A₂
ppm – partes por milhão
PPPM - Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais
REA – relação estrutura-atividade
R_f - fator de retenção
RMN - ressonância magnética nuclear
s - singleto
s/ - singleto largo
t - tripleto
TIC - *total ion chromatogram*
t_R - tempo de retenção

UV - ultravioleta

V-79 – fibroblastos de pulmão de hamster chinês clonado

V_{eluyente} - volume de eluente

V_{inj} - volume de injeção

V_{m} - volume morto

LISTA DE SÍMBOLOS

$[\alpha]_D$ – rotação óptica específica, raia D de Na

δ - deslocamento químico

ϵ - absorvidade molar

$\lambda_{\text{máx}}$ - comprimento de onda com absorção máxima no ultravioleta

$\nu_{\text{máx}}$ – frequência de um máximo de absorção

SUMÁRIO

- 1. INTRODUÇÃO, 1**
- 2. OBJETIVOS DO TRABALHO, 2**
- 3. REVISÃO DA LITERATURA, 3**
 - 3.1. Desenvolvimento de fitoterápicos, 3
 - 3.2. Características botânicas de *Casearia sylvestris* Swartz, 13
 - 3.2.1. Morfologia externa, 15
 - 3.2.2. Anatomia da folha, 18
 - 3.2.3. Informações ecológicas, 20
 - 3.3. Informações etnobotânicas/etnofarmacológicas sobre *C. sylvestris*, 22
 - 3.4. Metabólitos secundários no gênero *Casearia*, 26
 - 3.4.1. Estudos fitoquímicos e farmacológicos sobre *C. sylvestris*, 41
 - 3.4.1.1. Atividades antiinflamatória e analgésica, 43
 - 3.4.1.2. Atividade antiofídica, 44
 - 3.4.1.3. Atividade cicatrizante, 45
 - 3.4.1.4. Atividade antiulcerogênica, 46
 - 3.4.1.5. Atividades farmacológicas do óleo essencial das folhas, 49
 - 3.4.1.6. Avaliação da toxicidade, 49
- 4. MATERIAIS E MÉTODOS, 51**
 - 4.1. Especificações dos materiais e equipamentos, 51
 - 4.2. Desenvolvimento e aplicação de método de purificação de casearinas, 54
 - 4.2.1. Obtenção e preparo do material vegetal, 54
 - 4.2.2. Extração do material vegetal, 54
 - 4.2.2.1. Análises do extrato EtOH para detecção de casearinas, 55
 - 4.2.3. Fracionamento do extrato EtOH através de extração em fase sólida, 57
 - 4.2.3.1. EFS-teste, 57
 - 4.2.3.2. EFS em maior escala, 57
 - 4.2.3.3. Análises das frações EFS-teste e EFS, 57
 - 4.2.4. Fracionamento por CC de fase normal da fração EFS2, 58
 - 4.2.4.1. Fracionamento de EFS2 por CC em pequena escala-FACT1, 58

- 4.2.4.2. Fracionamento de EFS2 por CC em pequena escala-FACT2, 59
 - 4.2.4.3. Fracionamento de EFS2 por CC em maior escala-FA, 59
 - 4.2.4.4. Análises das frações FACT1, FACT2 e FA, 59
 - 4.2.5. Isolamento de substâncias a partir de frações obtidas por CC (FACT2 e FA) com o emprego de CLAEprep de fase reversa, 60
 - 4.3. Técnicas espectrométricas utilizadas na determinação estrutural das substâncias purificadas e do derivado obtido, 63
 - 4.4. Hidrólise básica da caseargrewiina F, 64
 - 4.4.1. Análise da caseargrewiina Fhb por CLAE-DAD, 64
 - 4.5. Avaliação da atividade antiulcerogênica, 64
 - 4.6. Quantificação de diterpenos clerodânicos típicos de *Casearia* no extrato EtOH com o uso de CLAE, 65
 - 4.6.1. Quantificação da casearina U no extrato EtOH, 65
 - 4.6.2. Identificação e quantificação da caseargrewiina F e de diterpenos totais do tipo das casearinas ($\lambda_{\text{máx}} = 231\text{-}235\text{ nm}$) em relação à caseargrewiina F no extrato EtOH, 66
 - 4.7. Identificação de substâncias presentes na fração EFS1 por CG-EM, 66
 - 4.8. Dados físicos complementares dos constituintes químicos isolados de *C. sylvestris* e do derivado obtido, 67

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO, 69

- 5.1. Desenvolvimento e aplicação de método de purificação de casearinas, 69
 - 5.1.1. Extração, 70
 - 5.1.2. Fracionamento do extrato EtOH através de extração em fase sólida, 73
 - 5.1.2.1. EFS-teste, 73
 - 5.1.2.2. EFS em maior escala – EFS(A) e EFS(B), 75
 - 5.1.3. Fracionamento por CC de fase normal da fração EFS2, 80
 - 5.1.3.1. Otimização das condições – colunas FACT1 e FACT2, 80
 - 5.1.3.2. Coluna FA – maior escala, 83
 - 5.1.4. Isolamento de substâncias a partir de frações obtidas por CC (FACT2 e FA) com o emprego de CLAEprep de fase reversa, 88
- 5.2. Determinação estrutural das substâncias purificadas, 93
 - 5.2.1. Casearina U, 94

- 5.2.2. Casearina B, casearina D, casearina H e caseargrewiina F, 99
 - 5.2.2.1. (+)-casearina B, 99
 - 5.2.2.2. (+)-casearina D, 100
 - 5.2.2.3. (+)-casearina H, 101
 - 5.2.2.4. (+)-caseargrewiina F, 102
- 5.2.3. (+)-9-hidróxi-4-megastimen-3-ona, 106
- 5.3. Hidrólise básica da caseargrewiina F, 109
 - 5.3.1. Proposta mecanística da hidrólise básica da caseargrewiina F, 112
- 5.4. Avaliação da atividade antiulcerogênica, 113
- 5.5. Identificação e quantificação por clae de diterpenos clerodânicos típicos de *Casearia* no extrato EtOH, 115
 - 5.5.1. Identificação e quantificação da casearina U no extrato EtOH, 115
 - 5.5.2. Identificação e quantificação da caseargrewiina F e de diterpenos totais do tipo das casearinas em relação à caseargrewiina F no extrato EtOH, 118
- 5.6. Identificação de substâncias presentes na fração EFS1 por CG-EM, 123

6. CONCLUSÕES, 130

REFERÊNCIAS, 133

ANEXOS, 149

1. INTRODUÇÃO

A importância do desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos no Brasil é notória pela abundância de recursos vegetais existente em nosso país. Segundo a legislação brasileira, fitoterápicos devem atender aos padrões de eficácia, segurança e qualidade exigidos para medicamentos não fitoterápicos. O desenvolvimento de novos fitoterápicos envolve estudos etnofarmacológicos, botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, farmacotécnicos e o desenvolvimento de métodos analíticos para o controle de qualidade. A caracterização em dada espécie vegetal dos princípios ativos responsáveis por sua atividade farmacológica ou o estabelecimento de marcadores químicos é de fundamental importância para o desenvolvimento, a padronização e o controle de qualidade de fitoterápicos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; CALIXTO, 2000).

Casearia sylvestris Swartz (guaçatonga) é uma planta medicinal de uso tradicional, com grande ocorrência em todo território brasileiro. Estudos farmacológicos têm verificado as atividades antiulcerogênica, antiinflamatória, antiofídica, citotóxica em células tumorais, dentre outras, exibidas por extratos de suas folhas. Ensaio toxicológicos têm demonstrado baixa toxicidade via oral destes extratos. Foram isolados de folhas, caules e raízes de *C. sylvestris* diterpenos clerodânicos, típicos do gênero *Casearia*, que exibiram algumas atividades biológicas verificadas para os extratos, como as chamadas casearinas e as casearvestrinas (BASILE et al., 1990; ITOKAWA et al., 1990; OBERLIES et al., 2002). Num estudo de fracionamento biomonitorado com foco na ação antiulcerogênica, tanto o extrato etanólico como sua fração padronizada reduziram em até 100% o número de lesões gástricas agudas em úlceras induzidas por etanol em ratos. Verificou-se que a fração padronizada era constituída predominantemente por casearinas (FAPESP; USP; UNESP, 2003).

C. sylvestris é uma planta medicinal com possibilidades de tornar-se a base de um medicamento fitoterápico antiulcerogênico, devido a sua ampla distribuição, possibilidade de domesticação, grande uso popular, que não só estimulou investigações farmacológicas, como também contribuiu para a avaliação de sua segurança.

2. OBJETIVOS DO TRABALHO

Geral:

Contribuir para o desenvolvimento de um fitoterápico com ação antiulcerogênica a partir do extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris*.

Específicos:

- 1) Desenvolver método de purificação dos princípios ativos em quantidade suficiente para a realização de ensaios toxicológicos e farmacológicos pré-clínicos;
- 2) Determinar quais são os princípios ativos responsáveis pela ação antiulcerogênica do extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris*, através de fracionamento biomonitorado por ensaios farmacológicos utilizando o modelo de indução de úlcera gástrica em ratos;
- 3) Fornecer informações adicionais fitoquímicas e analíticas, importantes para a padronização do extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICOS

O Brasil é considerado um dos maiores mercados farmacêuticos do mundo, altamente concentrado, com apenas 23% da população consumindo 60% dos medicamentos. Nossa indústria importa três quartos dos insumos farmacêuticos. Apesar do considerável crescimento da produção científica brasileira nas últimas três décadas, não houve um reflexo tecnológico à altura, o que é demonstrado pelo baixo número de patentes depositadas no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) por brasileiros desde a aprovação da Lei Federal n. 9.279/1996. Na pesquisa e desenvolvimento de fármacos e medicamentos, o desafio para o Brasil passou a ser tornar-se um país inovador e alcançar um nível mais elevado de inventividade nas atividades científicas, tecnológicas e gerenciais nesse campo (MARQUES, 2000).

Desde a Pré-História até o século XIX, os recursos terapêuticos disponíveis eram predominantemente de origem vegetal. Somente a partir da segunda metade do século XIX, com o advento da síntese orgânica através de Friedrich Wöhler (1828), a terapêutica adentrou na *Era Sintética*. O ácido acetilsalicílico (AAS) foi o pioneiro dos fármacos sintéticos desenvolvidos a partir de um modelo natural. As propriedades analgésicas e antipiréticas das cascas do salgueiro (*Salix alba*) já eram conhecidas quando, em 1828, no Instituto de Farmacologia de Munique, J. A. Buchner isolou uma pequena quantidade de salicina e em 1860, H. Kolbe e seus alunos sintetizaram o ácido salicílico e seu sal sódico a partir do fenol; em 1898, F. Hofmann, descobriu o AAS, menos ácido que o ácido salicílico, mas mantendo as ações farmacológicas desejadas (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Seguindo o modelo do AAS, isto é, síntese química e ensaios farmacológicos para avaliar os resultados, o desenvolvimento de novos medicamentos sintéticos teve impulso com grandes êxitos quanto à eficácia, passando a dominar dentre as opções da terapêutica ocidental, apesar dos efeitos adversos associados. Nas décadas de 1940 e 1950 a Química Medicinal efetiva-se; na década de 1960 ocorreram avanços significativos na Bioquímica e nos anos 70 começaram a surgir as primeiras contribuições da Físico-Química Orgânica. Ainda, nas décadas de 1980 e 1990 a Química computacional e a Biologia Molecular tornam-se outros

importantes instrumentos no desenvolvimento de novos fármacos sintéticos (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

A preocupação com as reações adversas dos medicamentos produziu repercussão nos Estados Unidos já na década de 1930, devido a ocorrência de uma epidemia que causou mais de 100 mortes provocadas pelo emprego de dietilenoglicol como excipiente num xarope de sulfanilamida. Um desastre terapêutico, a epidemia de focomelia entre filhos de mães usuárias de talidomida durante a gravidez, reforçou a preocupação com a segurança dos medicamentos (TOGNONI; LAPORTE, 1989). Desde o final dos anos 60, com o movimento *hippie* e a influência da cultura oriental no ocidente, surge o ideal de modo de vida em harmonia com a natureza. Esta visão mais ecológica do mundo tem ampliado significativamente o interesse em produtos terapêuticos derivados de plantas como alternativa “natural” aos medicamentos sintéticos com sua lista de reações adversas (FERREIRA, 1998). Mais recentemente, a indústria farmacêutica, motivada pelo sucesso de quimioterápicos como vincristina e vimblastina, reativou o interesse pelos medicamentos de origem vegetal, especialmente pela busca de substâncias com estruturas moleculares complexas, difíceis de serem obtidas por síntese a custo racional (MONTANARI; BOLZANI, 2001). O uso de produtos à base de plantas para a saúde cresceu 380% nos Estados Unidos entre 1990 e 1997, enquanto estudo realizado com a população alemã mostrou que 70% das pessoas declaram recorrer à “medicina natural” como primeira escolha no tratamento de doenças menos graves ou pequenas disfunções (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), ainda hoje 65 a 80% da população dos países em desenvolvimento depende das plantas medicinais na atenção primária à saúde (CALIXTO, 2000). As plantas medicinais tornaram-se importantes instrumentos na prevenção, recuperação e promoção da saúde nesses países não só pela cultura medicinal dos seus povos, mas também em função da carência no acesso aos serviços de saúde e aos medicamentos (BUSCCHIAZZO, 2000).

Além do uso tradicional e empírico das plantas medicinais “in natura” ou processadas de maneira simples (chás, “garrafadas”, banhos, etc), elas são muito importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de novos medicamentos, quando suas partes ou seus constituintes químicos são utilizados

diretamente como agentes terapêuticos (fitoterápicos e medicamentos contendo fitofármacos), mas também como matéria-prima para a semi-síntese de fármacos ou ainda como modelo para o desenvolvimento de compostos farmacologicamente ativos. Entre 520 medicamentos aprovados no período de 1983 a 1994 pela agência americana Food and Drug Administration (FDA) e por outras similares em diversos países, 30 medicamentos eram derivados diretamente de produtos naturais, plantas em sua maioria, e 173 foram desenvolvidos a partir de fármacos semi-sintéticos ou utilizaram um produto natural como modelo para sua síntese (DE SMET, 1997).

O Reino *Plantae* fornece-nos grande diversidade de moléculas, com estruturas químicas únicas. São conhecidos cerca de 50.000 metabólitos secundários ou especiais isolados de angiospermas, cuja biossíntese é estereoespecífica em grande parte. Desta forma, a natureza é uma fonte de substâncias enantiomericamente puras, cuja síntese assimétrica em laboratório representa um grande desafio, característica dos metabólitos secundários que atende a uma demanda da indústria farmacêutica (MONTANARI; BOLZANI, 2001). Entre 1960 e 1970, 99,5% dos fármacos de origem natural ou semi-sintéticos eram constituídos por um enantiômero puro. Além disso, tal característica tem contribuído para a descoberta de novos mecanismos de ação a partir da pesquisa com produtos naturais (DE SMET, 1997).

O Brasil é um dos países considerados como detentores de megadiversidade, possuindo a maior diversidade vegetal genética do mundo, havendo mais de 55.000 espécies catalogadas; destas, estima-se que apenas 8% foi estudada em busca de compostos bioativos (NODARI et al., 1999). Ao invés de beneficiar-se desta situação, nosso país possui a balança comercial desfavorável na área de plantas medicinais e derivados, já que estes produtos não atendem aos padrões mínimos internacionais (PINTO et al., 2002). Agravando esta situação, nossa grande biblioteca de moléculas queima aos poucos juntamente com as florestas, enquanto não apenas as espécies são perdidas, mas também o conhecimento tradicional associado a elas.

Há poucos exemplos de fitoterápicos à base de plantas nativas brasileiras. Uma das razões é que os estudos com plantas medicinais ainda não receberam a atenção que o tema merece das agências financiadoras de ciência e tecnologia no Brasil, embora já exista uma massa crítica de pesquisadores qualificados nas áreas

de química e farmacologia, dentre outras. Até o momento não houve um processo coordenado de todos os atores - botânicos, farmacologistas, toxicologistas, fitoquímicos, químicos sintéticos, clínicos, indústria farmacêutica e farmoquímica, produtores de plantas medicinais, etc - visando o desenvolvimento de fármacos e medicamentos a partir de plantas (PINTO et al., 2002).

Uma tentativa neste sentido foi feita no início da década de 1980 com a criação do Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais (PPPM) por iniciativa da Central de Medicamentos (CEME), criada em 1971 e extinta em 1997. A Figura 1 apresenta o fluxograma de funcionamento do PPPM/CEME. O projeto envolveu 24 instituições de pesquisa e foram selecionadas 65 espécies vegetais com base em dados etnofarmacológicos e outras informações científicas, das quais apenas 8 chegaram às etapas finais das fases pré-clínicas e clínicas. Segundo SANT'ANA e ASSAD (2004), não foi possível colocar no mercado um medicamento fitoterápico totalmente brasileiro através deste programa, principalmente, pela descontinuidade do apoio governamental a partir de 1990. Outro fator relevante neste cenário é o baixo investimento da indústria farmacêutica nacional no desenvolvimento de fitoterápicos (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

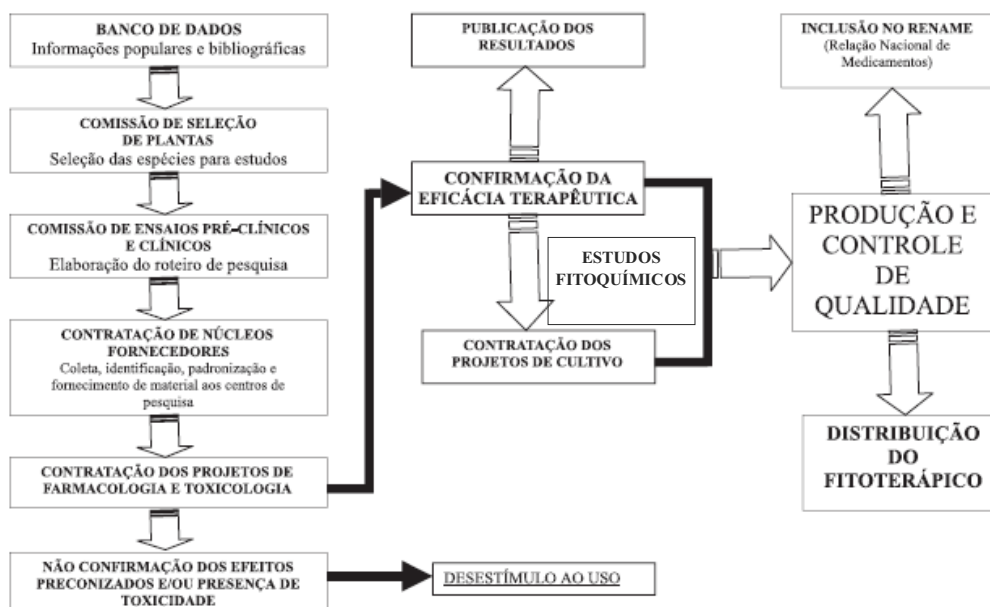


Figura 1: Fluxograma de funcionamento do Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da CEME. Reproduzido, com adaptação, de: SANT'ANA; ASSAD; 2004.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), autarquia ligada ao Ministério da Saúde, responsável pelo registro de medicamentos em nosso país (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004):

“Fitoterápico é um medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança é validada através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais.”

O conceito da ANVISA deixa claro que os fitoterápicos devem atender a mesma trilogia exigida para outros medicamentos: EFICÁCIA, SEGURANÇA e QUALIDADE. De outro lado, coloca algumas de suas características peculiares. Esta tendência de normatização de fitoterápicos pela ANVISA segue a escola alemã, reconhecida como uma das mais avançadas do mundo.

Algumas diferenças importantes entre os medicamentos de origem sintética ou à base de fármacos de origem natural (como os fitofármacos e antibióticos) e os medicamentos fitoterápicos são discutidos na literatura (CALIXTO, 2000; YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, V.; 2001), incluindo:

- a) o uso empírico e tradicional da planta medicinal é uma característica muito importante: informações etnofarmacológicas podem fornecer dados sobre eficácia, segurança, modo de preparo e uso, colheita, etc;
- b) a disponibilidade e a qualidade da matéria-prima vegetal são problemáticas: a variabilidade no metabolismo secundário vegetal pode produzir diferenças na composição química em diferentes lotes de droga vegetal; há falta de padronização na produção e colheita de plantas medicinais; no Brasil há uma cultura de adulteração/falsificação entre fornecedores de droga vegetal;
- c) as substâncias ativas nos medicamentos fitoterápicos estão numa mesma matriz complexa (extrato ou fração padronizada) juntamente com outras não ativas (na maioria das vezes dezenas ou centenas delas, sendo desconhecidas): em muitos casos as plantas apresentam vários compostos em pequena concentração que agem de modo sinérgico (com mesmo mecanismo de ação ou mecanismos diferentes); outras vezes, ocorre a associação de mecanismos por substâncias agindo em diferentes alvos moleculares, responsáveis pelo efeito terapêutico total; pode ocorrer também antagonismo de ação; alguns metabólitos podem apresentar toxicidade não aceitável;
- d) os princípios ativos vegetais freqüentemente são desconhecidos;
- e) há dificuldades com relação à padronização, estabilidade e qualidade do fitoterápico;
- f) estudos clínicos controlados e duplo-cego, bem como toxicológicos, comprovando a eficácia e segurança de fitoterápicos são raros, parcialmente pela dificuldade de padronização de extratos/frações;
- g) a ocorrência de reações adversas parece ser menos freqüente com os fitoterápicos, mas estudos clínicos revelam que elas também ocorrem com estes medicamentos;

h) fitoterápicos geralmente são desenvolvidos com menor custo e tempo; estima-se o custo de desenvolvimento de um novo fármaco sintético entre 300 e 500 milhões de dólares e os fitoterápicos necessitariam de investimento muito menor.

A produção de um fitoterápico (Quadro 1) deve considerar todos os critérios adotados na produção de medicamentos, obedecendo as Boas Práticas de Fabricação e de Controle de Qualidade, além de outros critérios próprios dos fitoterápicos.

Quadro 1: Etapas da produção de fitoterápicos.

1. Cultivo, extrativismo ou manejo sustentável de populações nativas.
2. Coleta ou colheita.
3. Secagem e estabilização do material vegetal.
4. Fragmentação.
5. Armazenamento da droga vegetal.
6. Extração; alternativamente, obtenção de fração padronizada.
7. Etapa farmacotécnica (produção ou manipulação).
8. Controle de qualidade: matérias-primas, processos e produto acabado.

As principais estratégias para seleção de espécies vegetais para desenvolvimento de fitoterápicos são a Bioprospecção, a Etnofarmacologia/Etnobotânica e a Quimiotaxonomia. Há divergências quanto à eficiência destas abordagens. Segundo ELISABETSKY (1999), a comparação de resultados obtidos com bioprospecção ou análise quimiotaxonômica orientadas com informações etnofarmacológicas tem demonstrado que a combinação destas estratégias tem sido mais eficiente do que a utilização de apenas uma delas. Mais recentemente, a indústria farmacêutica tem utilizado a bioprospecção associada a métodos de *screening* biológicos automatizados (*high throughput screening* – HTS) que permitem a avaliação *in vitro* de milhares de substâncias por experimento, com ensaios em escala nanomolar (VIEGAS JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Para ser registrado, produzido e comercializado, o fitoterápico deve atender aos padrões de eficácia e segurança aceitáveis, através da comprovação por estudos pré-clínicos e clínicos, juntamente com dados de levantamentos etnofarmacológicos. A padronização final do fitoterápico e, conseqüentemente, sua

qualidade, depende da padronização e validação de todas as etapas citadas no Quadro 1 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; SONAGLIO *et al.*, 1998).

A padronização e controle de qualidade de fitoterápicos são dependentes da identificação e quantificação de princípios ativos. Para realizar estes processos quando não são conhecidos os responsáveis pela atividade farmacológica/efeito terapêutico, situação bastante freqüente, criou-se o conceito de marcadores químicos. Segundo a ANVISA (BRASIL, 2004):

“Marcador: componente ou classe de compostos químicos presente na matéria-prima vegetal, idealmente o próprio princípio ativo, e preferencialmente que tenha correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos.”

A determinação em dada espécie vegetal dos princípios ativos responsáveis por sua atividade farmacológica ou o estabelecimento de marcadores químicos é de fundamental importância para o desenvolvimento, a padronização e o controle de qualidade de fitoterápicos. O conhecimento dos princípios ativos contribui para o estabelecimento do mecanismo de ação (farmacológico e toxicológico) e da relação estrutura-atividade. Podem também servir de modelos para a síntese ou semi-síntese de fármacos. Estudos farmacológicos com os extratos são desenhados considerando-se a concentração do princípio ativo/marcador.

Com relação à padronização e ao controle de qualidade, a identificação e quantificação dos princípios ativos/marcadores alcançam maior relevância para os fitoterápicos, pois a matéria-prima vegetal está sujeita a importantes variações em sua composição química. Determinada espécie, domesticada ou não, pode apresentar variações no seu metabolismo secundário (intrapopulacionais, interpopulacionais, sazonais, circadianas ou ontogenéticas) relacionadas a fatores genéticos e ambientais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; HARTMANN, 1996; WISDOM; RODRIGUEZ, 1982). Os processos de secagem, estabilização, fragmentação e o armazenamento também podem influenciar significativamente a qualidade da matéria-prima vegetal.

O Quadro 2 mostra as etapas do controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos, compreendendo os testes de autenticidade ou identificação, avaliação

de pureza e as análises químicas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

Quadro 2: Etapas do controle de qualidade de fitoterápicos.

- | |
|---|
| <ol style="list-style-type: none">1. TESTES DE AUTENTICIDADE - Identificação<ol style="list-style-type: none">a) Análise da Morfologia Externa/Macroscópica (droga vegetal)b) Análise anatômica/Microscópica (droga vegetal)c) Caracterização organoléptica (droga vegetal e derivados)2. ENSAIOS GERAIS - Avaliação da pureza<ol style="list-style-type: none">a) Contaminantes biológicos (droga vegetal)b) Matéria estranha (droga vegetal)c) Resíduo por incineração (droga vegetal)d) Metais Pesados (droga vegetal)e) Teor de umidade (droga vegetal)f) Agrotóxicos (droga vegetal e extrato)g) Testes microbiológicos (droga vegetal, extrato e fitoterápico)3. ANÁLISES QUÍMICAS (droga vegetal, extrato e fitoterápico)<ol style="list-style-type: none">a) Identificação de marcadoresb) Análise quantitativa de marcadoresc) Perfil cromatográfico ("Fingerprint") |
|---|

Além da identificação e da análise quantitativa de marcadores, instituições respeitadas na área de plantas medicinais e fitoterápicos como Organização Mundial de Saúde (OMS), European Medicines Agency, German Commission E, British Herbal Medicine Association, Indian Drug Manufacturer's Association, Chinese State Food and Drug Administration, Food and Drug Administration (FDA) e a própria ANVISA, recomendam adicionalmente o uso da técnica *Fingerprint* Cromatográfico no controle de qualidade químico de fitoterápicos (FAN et al., 2006). Esta abordagem está mais de acordo com uma visão holística dos fitoterápicos, considerando que seu efeito terapêutico global é resultado da ação farmacológica de diferentes substâncias.

Fingerprint Cromatográfico é uma metodologia inicialmente empregada no estabelecimento do perfil de impurezas de insumos farmacêuticos ("substâncias puras"), fornecendo informações sobre sua origem e método de preparação (LAZAROWICH; PEKOS, 1998). Introduzida no início da década de 1990 pela OMS na análise de fitoterápicos, consiste num perfil cromatográfico representando as

características químicas do fitoterápico (e/ou droga vegetal), com potencial para determinar sua autenticidade/identidade, estabilidade e reprodutibilidade lote-a-lote na produção (FAN et al., 2006; GONG et al., 2004; MENG et al., 2005). A partir da análise cromatográfica, geralmente por CLAE ou CG, de indivíduos da mesma espécie e de diferentes populações é construído o *Fingerprint* referência ou padrão, um cromatograma simulado onde as médias dos tempos de retenção (informação qualitativa) e das áreas (informação quantitativa) dos picos observados para os diferentes indivíduos são consideradas. Assim, compara-se o perfil cromatográfico de uma amostra com o *Fingerprint* referência, considerando-se maior número de componentes na análise do fitoterápico e não apenas os marcadores.

Uma estratégia moderna para o controle de qualidade químico de fitoterápicos envolveria inicialmente a determinação dos princípios ativos ou marcadores e um estudo de variabilidade do metabolismo secundário da espécie vegetal. Em seguida, devem ser selecionados indivíduos representativos da espécie, ou seja, que apresentem composição (quali e quantitativa) semelhante e capaz de produzir resposta terapêutica, mantendo a segurança. A partir das análises destes indivíduos representativos da espécie é construído o *Fingerprint* referência. Na análise química de uma amostra do fitoterápico, os princípios ativos/marcadores devem ser identificados e quantificados e, além disso, o seu perfil cromatográfico deve ser semelhante ao *Fingerprint* referência.

3.2. CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS DE *Casearia sylvestris* Swartz

Casearia sylvestris foi originalmente descrita por Swartz em 1797 na *Flora Indiae Occidentalis*. Eichler (1871) acrescentou-a na obra *Flora Brasiliensis* de Carl Friedrich Philipp von Martius, onde estava classificada na família *Bixaceae*. Mais tarde foi incluída na família *Flacourtiaceae* (ABSY; SCAVONE, 1973; SLEUMER, 1980).

As análises filogenéticas têm fornecido informações importantes sobre a classificação para ordens e famílias de Angiospermas. Em muitos casos os novos conhecimentos da filogenia revelaram conflito com as classificações utilizadas, as quais eram baseadas em semelhanças e diferenças na morfologia, ao invés de análise cladística de grande número de dados sobre seqüência de DNA ou outros tipos de informação sistemática. O Grupo de Filogenia de Angiospermas (*Angiosperm Phylogeny Group* – APG) publicou uma atualização da classificação para as ordens e famílias de Angiospermas em 2003 – APG II. Gêneros antes classificados na família *Flacourtiaceae* foram re-classificados nas famílias *Achariaceae* e *Salicaceae*. Trabalhos utilizando análises filogenéticas baseadas na seqüência dos genes *rbcL*, *atpB* e 18S rDNA conduziram à inclusão do gênero *Casearia* na família *Salicaceae*. Desta forma, atualmente *C. sylvestris* (seção *Crateria* Bentham) está classificada na tribo *Samydeae*, família *Salicaceae* e ordem *Malpighiales* (CHASE et al., 2002; SOLTIS et al., 2000; THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2003).

A família *Salicaceae* possui distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 50 gêneros e 1.000 espécies. Do ponto de vista etnobotânico, merece destaque o uso medicinal dos gêneros *Casearia* e *Salix*, que juntamente com o gênero *Populus*, apresentam também utilização como árvores ornamentais. A maioria dos gêneros de *Salicaceae* que ocorrem no Brasil são formados por poucas espécies e possuem distribuição restrita, à exceção de *Casearia* e *Xylosma* e, em menor escala, *Banara*, *Ryania*, *Prockia* e *Laetia* (SOUZA; LORENZI, 2005).

O gênero *Casearia* Jacquin (tribo *Samydeae*) possui cerca de 180 espécies com distribuição pantropical. Nas regiões tropicais e subtropicais das Américas encontra-se a maior diversidade do gênero, com cerca de 75 espécies agrupadas em 6 seções: *Guidonia*, *Endoglossum*, *Casearia*, *Gossypiospermun*, *Crateria* e *Piparea* (SLEUMER, 1980; TORRES; YAMAMOTO, 1986). Segundo Record e Hess

(1942 apud Basile et al., 1990), no Brasil são descritas cerca de 70 espécies do gênero.

C. sylvestris é uma espécie vegetal com ampla distribuição no Brasil e muito conhecida pela população, possuindo por isso uma série de nomes comuns em nosso país: guaçatonga, guaçatunga, vaçatonga, chá-de-bugre, erva-de-bugre, bugre-branco, erva-de-lagarto, pau-de-lagarto, língua-de-lagarto, cafezinho-do-mato, café-bravo, café-do-diabo, cambroé, paratudo, erva-de-pontada, caroba, gaibim, chá-de-frade, apiá-acanoçu, língua-de-tiú, fruta-de-saíra, petumba, catinguá-verde, pióia, marmelada vermelha, marmelinho-do-campo, saritã (ABSY; SCAVONE, 1973; CAMINHOÁ, 1877; CORREA, 1975; HOEHNE, 1939; LORENZI; MATOS, 2002; SCAVONE et al., 1979; SILVA, 1926).

As sinônimas botânicas encontradas para a espécie na literatura foram as seguintes: *C. affinis* Gardner, *C. attenuata* Rusby, *C. cambessedesii*, *C. capitata* (Ruiz et Pavon) Spreng., *C. caudata* Uitt., *C. chlorophoroidea* Rusby, *C. ekmanii* Sleumer, *C. formosa* Urban, *C. herbert-smithii* Rusby, *C. lindeniana* Urban, *C. lingua* Cambessèdes, *C. oblongifolia*, *C. onacaensis* Rusby, *C. ovoidea* Sleumer, *C. parviflora* Wild., *C. punctata* Spreng., *C. samyda* (Gaert.) D.C., *C. schulziana* Schimidt, *C. subsessiliflora* Lund., *Anavinga samyda* Gaertn., *Chaetocrater capitatum* Ruiz et Pavon, *Crateria capitata* (Ruiz et Pavon) Person, *Guidonia sylvestris* (Swartz) Maza, *Samyda parviflora* L., *Samyda sylvestris* (Swartz) Poiret (CORREA, 1975; LORENZI, 1992; SCAVONE et al., 1979; SLEUMER, 1980; TORRES; YAMAMOTO, 1986).

3.2.1. MORFOLOGIA EXTERNA

Torres e Yamamoto (1986) desenvolveram estudos taxonômicos através da análise morfológica clássica, baseada principalmente nas obras de Eichler (1871) e Sleumer (1980) com espécies de *Casearia*. A descrição morfológica de *C. sylvestris* elaborada pelos autores é apresentada no Quadro 3. A Figura 2 mostra imagens da planta.

Quadro 3: Descrição morfológica de *C. sylvestris*.

Subarbusto a árvore com 1,5-10,0(-15,0) m de altura. Ramos com extremidade glabra a pubescente, lenticelas esparsas a numerosas. Folhas geralmente maduras, às vezes jovens na floração; oblongas, elípticas ou ovado-oblongas; base atenuada, simétrica a assimétrica; cerca de (4,0-)5,0-12,0(-14,0)x(1,0-)2,0-3,5(-4,0) cm; membranáceas a papiráceas; totalmente glabras, exceto, às vezes, a nervura central em uma ou ambas as faces; pontuações transparentes, pequenas, numerosas, distribuídas por toda a lâmina; margem levemente glandular-serrulada a serrada; venação nunca subtriplínervia, imersa, inconspícua a conspicua na face superior, inconspícua a proeminente na face inferior; pecíolo glabro a pubescente, cerca de 0,5-0,6 cm de comprimento; estípulas caducas. Fascículo séssil, cerca de 24-40 flores por inflorescência; bractéolas pequenas, escamiformes, na base dos pedicelos; pedicelo com cerca de 2,0-6,0 mm de comprimento, articulado quase na metade de seu comprimento, glabro a pubescente. Botão floral globóide; sépalas 5, levemente unidas na base, internamente glabras, externamente glabras a pubescentes, oblongas, com cerca de 4,0x2,0 mm. Estames (8-9-)10(-11-14); filetes glabros a seríceos, alternadamente cerca de 0,8 e 1,0 mm de comprimento; conectivo com glândula apical glabra. Lobos do disco seríceos a tomentosos, com cerca de 0,5-1,0 mm de comprimento. Ovário ovóide, glabro a seríceo na porção superior, estilete com (raramente 2-) 3 ramos na extremidade, estigmas (raramente 2-) 3, capitados. Cápsula ovóide, com cerca de 5,0 mm de diâmetro, vermelha, cálice persistente; sementes 1-7, glabras, testa foveolada, arilo amarelo, pegajoso.



Figura 2: *Casearia sylvestris* Swartz. (a): indivíduo adulto; (b): aspecto geral do ramo; (c): detalhe de botões florais e flor; (d): frutos.

C. sylvestris é encontrada em diferentes ambientes e apresenta grande variação morfológica: quanto ao tamanho, forma, textura e consistência das folhas, à pilosidade dos ramos e das inflorescências, ao número de flores por inflorescências, ao comprimento do pedicelo, além do porte – arbóreo ou arbustivo (MARQUETE, 2001; TORRES; YAMAMOTO, 1986). Sleumer (1980) considera duas variedades para a espécie: var. *sylvestris* e var. *lingua*, sendo conectadas por formas intermediárias. Estudos taxonômicos constataram a dificuldade em definir limites entre as variedades (MARQUETE, 2001; TORRES; YAMAMOTO, 1986). De outro lado, o uso do marcador genético RAPD mostrou que as variedades botânicas *sylvestris* e *lingua* mostraram-se geneticamente distintas (SILVA, 2003). A chave

para identificação das variedades elaborada por Klein & Sleumer (1984) é apresentada no Quadro 4.

A diversidade morfológica observada entre indivíduos de *C. sylvestris* foi enfatizada por um pesquisador, Dr. E. Hassler, citado por Correa (1975), na seguinte frase: "... as variações no aroma, o grau de estreiteza e de dimensão das folhas, etc, são tão numerosas que seria quase preciso atribuir cada pé a uma forma especial". Silva (2003) relata diferenças observadas, durante atividades de coleta, entre as duas variedades botânicas: no bioma Cerrado os indivíduos apresentavam-se como arbusto ou arboreta, com folhas mais coriáceas, de coloração verde clara e de menor largura e comprimento; ao contrário, os indivíduos de Mata Atlântica apresentavam-se como árvores de variáveis alturas, sempre acima de 2 m, com folhas mais largas e compridas, de coloração verde escura. Tais diferenças nas estratégias vegetativas da espécie nos dois biomas podem estar relacionadas a processos adaptativos, como já havia sido observado por Correa (1975).

Vegetativamente *C. sylvestris* é, às vezes, muito semelhante a *C. obliqua* ou a *C. decandra*, o que pode dificultar sua identificação por leigos. O estudo taxonômico do gênero *Casearia* desenvolvido por Torres e Yamamoto (1986) destaca os principais caracteres que auxiliam em sua diferenciação destas 2 outras espécies.

Quadro 4: Chave para identificação das variedades de *C. sylvestris* segundo KLEIN e SLEUMER (1984).

CHAVE DAS VARIEDADES DE <i>C. sylvestris</i>	
1 – Folhas geralmente oblongas, reticulação das veias e veinhas um pouco obscuras; flores glabras ou laxa a densamente cinzento-pubérulas. Ocorre em vegetação florestal ou arbustiva.	<i>var. sylvestris</i>
2 – Folhas mais ou menos ovadas a oblongo-ovadas, reticulação das veias e veinhas mais marcadas em ambas as faces, que muitas vezes são discolores; flores geralmente mais ou menos densamente pubérulas. Ocorre em savanas arbustivas.	<i>var. lingua</i>

3.2.2. ANATOMIA DA FOLHA

As características histológicas da folha de *C. sylvestris* apresentadas a seguir, incluindo a fotomicrografia e esquemas da Figura 3, foram obtidas a partir dos estudos anatômicos desenvolvidos por Absy e Scavone (1973) e por Alquini e Takemori (2000).

A. Lâmina foliar:

Face adaxial: em vista frontal, glabra, apresentando células poliédricas com campos de pontoação primária.

Face abaxial: em vista frontal, glabra, apresentando células poliédricas com campos de pontoação primária; estômatos paracíticos irregularmente distribuídos, caracterizando a folha como hipoestomática.

Limbo: um estrato epidérmico se faz presente em ambas as faces, com cutícula pouco espessa.

Mesófilo: em secção transversal, ocorrem dois estratos de parênquima clorofiliano paliádico, sendo a primeira camada formada de células cilíndricas e regularmente dispostas em paliçada e a segunda camada formada de células relativamente mais curtas, sem a disposição característica em paliçada; diversas camadas de parênquima clorofiliano lacunoso com células irregulares na forma e no tamanho, caracterizando-o como heterogêneo e assimétrico; notam-se pequenos feixes vasculares, drusas e glândulas do tipo esquizógena.

Região das bordas da folha: constituída por uma epiderme provida de cutícula espessa, revestindo um colênquima e um parênquima comum; neste parênquima notam-se feixe vascular, glândulas de óleo essencial e drusas.

B. Nervura central:

Em secção transversal, ambas as faces são convexas, porém a face adaxial é mais abrupta. Ambas as epidermes são acompanhadas de colênquima internamente. Apenas um feixe vascular ocorre, sendo circundado por esclerênquima; o câmbio se faz presente. Poucos tricomas tectores unicelulares estão presentes na face adaxial. Foram observadas glândulas mergulhadas no parênquima, drusas, raros cristais prismáticos e grãos de amido com tamanho reduzido.

C. Pecíolo:

Em secção transversal, a face adaxial apresenta uma convexidade central e duas expansões laterais. A face abaxial é convexa quase circular. Camadas de colênquima situam-se próximas à epiderme abaxial. Um único feixe vascular faz-se presente, cujo floema é acompanhado por esclerênquima. No parênquima encontram-se freqüentes glândulas, além de drusas, raros cristais prismáticos e grãos de amido com tamanho reduzido na camada correspondente à endoderme. A epiderme apresenta estômatos; na face adaxial ocorrem tricomas tectores uni ou pluricelulares unisseriados em pequeno número.

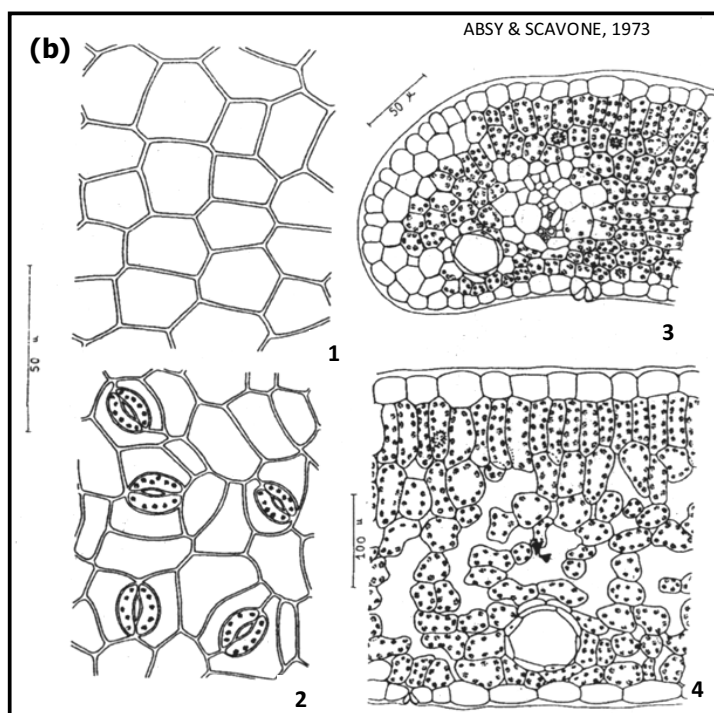
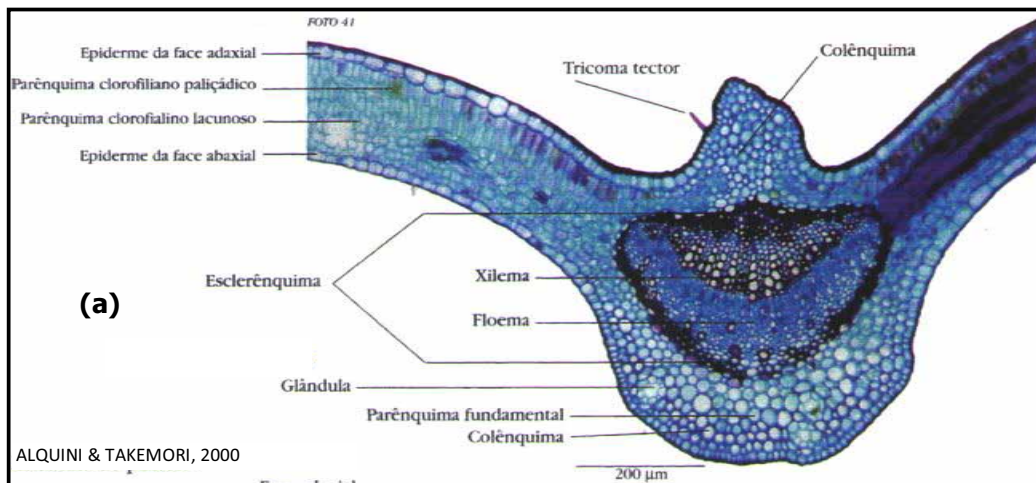


Figura 3: Anatomia da folha *Casearia sylvestris* Swartz. (a) fotomicrografia de corte transversal. (b) esquemas: b.1 – epiderme adaxial, vista frontal; b.2 – epiderme abaxial, vista frontal, mostrando estômatos paracíticos; b.3 – aspecto anatômico da folha na região da borda; b.4 - aspecto anatômico da folha na região entre a borda e a nervura mediana.

3.2.3. INFORMAÇÕES ECOLÓGICAS

Lorenzi (1992) afirma que *C. sylvestris* é uma espécie vegetal perenifólia, heliófita ou esciófita, seletiva higrófila e pioneira. Possui ampla distribuição pela América Tropical, sendo dispersa desde o México até a Argentina, ocorrendo em matas ou florestas primárias e secundárias, úmidas ou secas, principalmente em altitude baixa e ocasionalmente em altitude elevada (acima de 2300 m), raramente em florestas decíduas (SLEUMER, 1980). Segundo Lorenzi (1992) no território brasileiro é encontrada em quase todas as formações florestais, sendo característica e preferencial dos sub-bosques dos pinhais, menos freqüente na floresta pluvial e rara na estacional semi-decídua, ocorrendo também com grande freqüência nas formações secundárias, como capoeiras e capoeirões. No estado de São Paulo, ocorre em campo, capoeira, cerrado, cerradão e matas (mata secundária, mata semi-decídua, mata chuvosa com solos argilosos, mata de galeria) e é comum em regiões elevadas (TORRES; YAMAMOTO, 1986). Marquete (2001) relata sua ocorrência em 22 estados brasileiros, além do Distrito Federal.

Produz anualmente grande quantidade de sementes, disseminadas por pássaros (LORENZI, 1992). Há certa divergência entre autores sobre a sua fenologia. Para Lorenzi (1992), floresce nos meses de junho a agosto e seus frutos amadurecem a partir de setembro, prolongando-se até meados de novembro. Klein & Sleumer (1984) relatam que a planta floresce desde julho até novembro, com predomínio em setembro e outubro. Segundo Hoehne et al. (1941) a floração ocorre entre julho e outubro e a frutificação em dezembro. Dados fenológicos de um estudo taxonômico de *C. sylvestris* no Estado de São Paulo indicam floração de março a dezembro e frutificação de agosto a novembro (TORRES; YAMAMOTO, 1986). As diferenças fenológicas apresentadas pelos autores podem ser um reflexo da capacidade adaptativa da espécie, conforme discutido com relação às diferenças morfológicas encontradas entre indivíduos da espécie (item 2.2.1).

Rosa & Ferreira (2001) concluíram que a maior porcentagem de germinação das sementes de *C. sylvestris* (47%) foi obtida à temperatura constante de 25 °C. Observaram ainda um número de 1-6 sementes por fruto. Lorenzi (1992) apresenta métodos de coleta dos frutos, preparação das sementes, germinação e obtenção de mudas.

Estudo sobre as áreas prioritárias de conservação de vegetação do Cerrado no estado de São Paulo apontou *C. sylvestris* como a espécie com maior distribuição, presente em 90 % das áreas (DURIGAN et al., 2003). Em outro trabalho sobre a composição florística e estrutura da comunidade arbórea em fragmento de Floresta Ombrófila Estacional Decidual (Santa Maria-RS), dentre as 79 espécies estudadas, *C. sylvestris* foi uma das que apresentou maior valor de importância, além de destacar-se em outros parâmetros fitossociológicos como densidade e frequência (LONGHI et al., 1999). Ainda, GIONGO e WAECHTER (2007) investigaram a composição florística de espécies arbóreas em uma floresta mista (Savana Arbóreo Aberta, Savana Parque e Savana Gramíneo-Lenhosa) na Serra do Sudeste no Rio Grande do Sul e observaram que dentre 43 espécies *C. sylvestris* estava entre as 5 mais frequentes na área de estudo.

Extratos de folhas de *C. sylvestris* apresentaram efeito fitotóxico na germinação de sementes e no crescimento das plantas e os autores do trabalho sugerem como efeito primário da alelopatia a genotoxicidade (SOUSA et al., 2007a). A visitação por insetos também foi observada, sendo que num estudo no qual foram coletados insetos pelo período de 2 anos da copa de 10 espécies arbóreas em mata ciliar (Caibaté-RS), *C. sylvestris* foi a planta que abrigou maior número de espécies e maior número de insetos (THUM; COSTA, 1997).

3.3. INFORMAÇÕES ETNOBOTÂNICAS/ETNOFARMACOLÓGICAS SOBRE *C. sylvestris*

C. sylvestris tem uma história rica nos sistemas de medicina tradicional no Brasil. Atualmente, ainda é uma planta medicinal incluída no arsenal da “fitoterapia popular”. Seu uso envolve uma série de diferentes indicações, como revela-nos um de seus nomes populares – paratudo.

Na medicina indígena da região amazônica utilizavam-se suas folhas, cascas e raízes como antitérmico, de uso externo (banho) ou interno (decoção) (JUNGES; SCHENKEL; SIMÕES, 1985). Há mais de 80 anos, farmacêuticos gaúchos empregavam *C. sylvestris* no preparo de elixires “depurativos” e antirreumáticos, reconhecidos como eficazes no tratamento de moléstias da pele de origem sifilítica (CORREA, 1975). Nesta época, a planta foi incluída na *Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil* (HERVA DE BUGRE), constando como parte utilizada suas folhas. O emprego oficial citado é do extrato hidroalcoólico (EtOH/H₂O, 1:2, v/v) obtido por percolação (1:1, m/v) (SILVA, 1926).

A Tabela 1 resume as informações etnofarmacológicas encontradas na literatura. As indicações como antiofídico, antitérmico, cicatrizante e no tratamento de úlceras e gastrites, são as mais comuns, com citações em 8, 6, 5 e 5 referências, respectivamente. As folhas são mais utilizadas, seguidas por cascas do caule e raízes. O relato mais antigo encontrado na literatura é sobre o uso como antiofídico (CAMINHOÁ, 1877). As citações do uso popular de *C. sylvestris* são encontradas em obras clássicas como *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das espécies cultivadas* (CORREA, 1975), *Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais, O Jardim Botânico de São Paulo* (HOEHNE, 1939; HOEHNE, 1941) e *Notas de Fitoterapia* (COIMBRA, 1958); em compêndios recentes sobre plantas medicinais brasileiras como *Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas* (LORENZI; MATOS, 2002) e *Plantas que curam* (PANIZZA, 1998); e, finalmente, em estudos de levantamentos etnobotânicos ou etnofarmacológicos (DICKEL; RATES; RITTER, 2007; RODRIGUES; CARVALHO, 2001; RODRIGUES et al., 2002).

A utilização de *C. sylvestris* como antiofídico tem como base uma explicação popular, a observação de que “os lagartos picados por cobras curam-se comendo as folhas desta planta” (CORREA, 1975). Seu uso como “antileprótico” pode estar relacionado ao óleo de chaulmugra (óleo fixo), obtido das sementes das plantas

Hydnocarpus kurzii (King) Warburg e *H. wightiana* Blume, originárias da Índia e pertencentes à antiga família *Flacourtiaceae* (POSSOLO; FERREIRA, 1949; PUPO, 1926). Num levantamento sobre plantas utilizadas popularmente contra o câncer, constatou-se este uso etnomédico de *C. sylvestris* (folhas e caule) na Colômbia (GRAHAM et al., 2000).

Hoehne (1939) relatou que espécies de *Casearia*, incluindo *C. sylvestris*, chamadas de café do diabo, ocorriam em pastagens sem serem consumidas pelo gado, o que poderia ter alguma relação com efeitos tóxicos apresentados por estas plantas. Três autores citam o uso de *C. sylvestris* como abortivo (Tabela 1), o que é relevante sob o aspecto toxicológico. Ainda, agricultores da região centro-oeste do estado do Rio Grande do Sul faziam o uso empírico do “chá de bugre” (*C. sylvestris*) como abortivo e para retirar a placenta (pós-parto) de animais (JUNGES; SCHENKEL; SIMÕES, 1985; SILVA et al., 1988).

Num trabalho de levantamento etnobotânico realizado no município de Luminárias-MG há o relato sobre a atividade medicinal ser restrita aos indivíduos que nascem no Cerrado, não servindo como remédio as árvores da Mata Atlântica (RODRIGUES et al., 2002).

Além da medicina popular, o uso etnobotânico de *C. sylvestris* envolve a sua utilização em arborização de ruas e de sua madeira na construção civil, trabalhos de torno, tacos, tábuas para assoalho, marcenaria, carpintaria, lenha e carvão (CORREA, 1975, LORENZI, 1992). Lorenzi (1992) ainda descreve a madeira como moderadamente pesada (densidade = 0,84 g/cm³), dura, de tecido compacto, fácil de rachar e de baixa resistência aos organismos xilófagos.

Tabela 1: Informações etnofarmacológicas sobre *C. sylvestris* no Brasil.

Usos	Partes usadas ¹	Formas de uso	Referências
antiofídico	nd ²	nd	CAMINHOÁ, 1877
cicatrizante	f	nd	PUPO, 1926
anestésico tópico	f		
antisséptico tópico	nd		
antitérmico	nd	nd	HOEHNE, 1939
cicatrizante	f		
estomáquico	nd		
moléstias de pele	nd		
anestésico	f,r	nd	HOEHNE, 1941
depurativo			
antileprótico			
antipruriginoso			
antisséptico	nd	nd	POSSOLO; FERREIRA, 1949
antitérmico			
cicatrizante			
entorses			
estomáquico			
antitérmico			
antiulceroso	f	nd	COIMBRA, 1958
depurativo			
moléstias de pele			
antidiarréico	f	suco, decocto	
antiinflamatório tópico	c	nd	
antiofídico tópico/sistêmico	f	suco, decocto	
antirreumático	nd	nd	CORREA, 1975
antitérmico	f	suco, decocto	
antitérmico	c	nd	
depurativo	nd	nd	
“moléstias herpéticas”	f	suco, decocto	
afecções oro-faringeanas	f	tintura	
anestésico local	nd	nd	SCAVONE et al., 1979
cicatrizante	nd	nd	
hemostático	nd	nd	
depurativo			
hidropisias	f,r	nd	BALBACH, 1981
moléstias de pele			
sífilis			
abortivo	nd	nd	SINNOTT-SILVA et al., 1984 OLIVEIRA et al., 1985 SILVA et al., 1988
antitérmico	f,c	banho, decocto	JUNGES et al., 1985 RIZZINI et al., 1988 PEREIRA et al., 1992
antiofídico	nd	nd	RUPPELT; GONÇALVES; PEREIRA, 1990 RUPPELT et al., 1990
antiulceroso			
gastrite	f	infuso	PANIZZA, 1998
halitose			
afecções de pele			
antidiarréico			
antiofídico	f,c	decocto, infuso	RODRIGUES; CARVALHO, 2001
antirreumático			
antitérmico			
depurativo			
analgésico	nd	nd	
antiinflamatório	f,c	nd	
antiofídico	nd	nd	
antirreumático	f,c	nd	
antiulceroso	f	infuso	
cicatrizante	f	nd	
depurativo	f,c	nd	LORENZI; MATOS, 2002
gastrite	f	infuso	
halitose	f	infuso	
hemostático	nd	nd	
herpes	f	nd	
queimaduras	f	nd	
tônico	f,c	nd	
emagrecimento	nd	nd	DICKEL et al., 2007

¹c: cascas; f: folhas; r: raízes. ²nd: não descrito

Matérias divulgadas pela imprensa têm destacado as propriedades medicinais de *C. sylvestris* (GUAÇATONGA, 2004; ZACHÉ, 2000). Encontra-se também divulgação através da internet, havendo oferta de produtos à base da planta (RAINTREE NUTRITION INC., 2007). É possível encontrar à venda em farmácias, ervanarias, feiras e através de raizeiros produtos à base de *C. sylvestris* (Figura 4).



Figura 4: Produtos à base de *C. sylvestris*: (a) ofertado na *internet* – frasco com 100 cápsulas contendo 600 mg de pó de folhas e ramos secos e moídos; custo de US\$ 18,95 (RAINTREE NUTRITION INC., 2007); (b) adquirido no interior do estado de Minas Gerais - 2000; (c) adquirido no interior do estado do Rio Grande do Sul - 2003.

3.4. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NO GÊNERO *Casearia*

Na literatura científica são encontrados vários estudos fitoquímicos com espécies de *Casearia*, os quais demonstram o predomínio de diterpenos do tipo clerodânico no gênero. Das 19 espécies de *Casearia* investigadas sob o aspecto fitoquímico (base de dados SciFinder[®] -CAPlus[®] e Medline[®], 1907-dez.2007), 13 apresentaram mais de 120 diterpenos clerodânicos isolados de diferentes órgãos das plantas: folha, fruto, caule, raiz e semente.

Em sua maioria, estes diterpenos apresentam características estruturais marcantes e são encontrados somente em algumas outras famílias de vegetais, podendo talvez constituírem-se em marcadores taxonômicos para *Casearia*. Inicialmente, as casearinas A-F foram descritas por ITOKAWA et al. (1987) na forma de uma comunicação e as primeiras descrições detalhadas de elucidação estrutural foram feitas por GUITTET et al. (1988) para a pitumbina (Figura 5) e por ITOKAWA et al. (1988) para as casearinas.

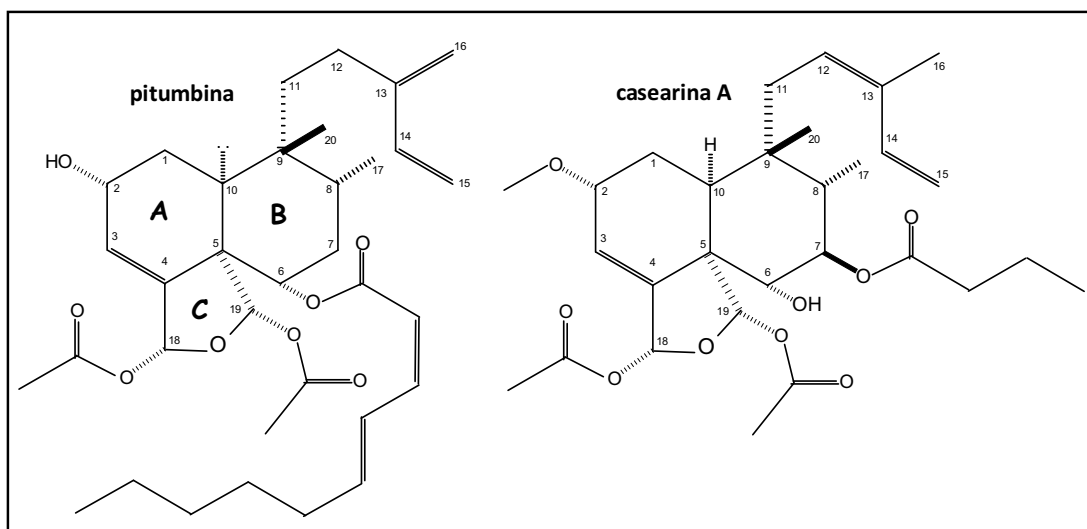


Figura 5: Estruturas químicas da pitumbina e da casearina A.

A estrutura básica destes diterpenos é formada pelos anéis A e B do sistema decalínico com 2 metilas em C-8 (Me-17) e C-9 (Me-20), uma cadeia lateral com 6 carbonos (C-11 a C-16) em C-9 com um dieno conjugado, um terceiro anel C diidrofurânico/diacetálico, além de substituintes oxigenados (ésteres, éteres, hidroxilas ou cetonas) que podem estar presentes nos carbonos 2, 6, 7, 18 e 19. As estruturas químicas destes metabólitos secundários isolados de espécies de *Casearia* são apresentados nas Figuras 6 e 7 (estruturas básicas com configuração relativa) e Tabela 2 (nomes, grupos substituintes e referências).

Estes diterpenos são típicos *cis*-clerodanos (junção *cis* entre os anéis A e B e relação *trans* entre H-10 e Me-20), com configuração *trans* entre Me-17 e Me-20. A estereoquímica observada nos carbonos 2, 6, 7, 18 e 19 (substituintes oxigenados) apresenta variação. As configurações absolutas foram definidas para apenas 10 diterpenos, relacionados nas informações adicionais da Tabela 2.

O dieno presente na cadeia lateral em C-9 apresenta uma característica constante, a ligação dupla terminal em C-14, enquanto a outra ligação dupla conjugada à primeira pode diferir quanto à posição e à estereoquímica: 12*E* (ex. Figura 6a), 12*Z* (ex. Figura 6c) ou, ainda, em 13(16) formando outra ligação dupla terminal (ex. Figura 6b). Em alguns diterpenos ocorre uma hidroxilação em C-12 (caseamembrol B e casearlucinas H-K). Num caso mais específico, foram isolados de *C. corymbosa* 3 diterpenos com ausência do grupo olefínico terminal e com a presença de um aldeído em C-14 (corimbotinas G-I).

Outra característica comum a estes diterpenos é a ligação dupla em C-3 (anel A), que não aparece apenas em 16 diterpenos isolados de *C. guianensis* (casearinol A e B; casearinona A e B), *C. corymbosa* (diterpenos 13 a 15), *C. gray* (casearinona A, diterpenos 16, 17 e 23-25) e *C. grewiifolia* (diterpenos 16 a 20).

Nas posições 2, 18 e 19 sempre há a presença de substituintes oxigenados. Em C-2 ocorrem principalmente ésteres, mas também hidroxilas, metoxilas e cetonas. Especialmente nas posições 18 e 19 existe grande predominância de grupos acetato, observando-se em menor número grupo butanoato, metoxila, etoxila e carbonila. Com relação aos substituintes das posições 6 e 7, nota-se a mesma diversidade que em C-2, sendo que em muitos casos, especialmente na posição 7, há a ausência deles. No caso das casearinas, a prevalência de grupos acetato em C-6 e butanoato em C-7 é mais evidente.

O anel C diacetálico, altamente oxigenado, constitui-se num arranjo de funcionalidade observado em poucas substâncias na natureza e pode ser visto como um dialdeído protegido. Alguns pesquisadores observaram a abertura do anel diacetálico com formação do dialdeído e relacionaram a geração deste artefato com o uso de CDCl_3 em experimentos de RMN, devido à presença de traços de HCl e H_2O (BEUTLER et al., 2000a; TININIS, 2006; WILLIANS et al., 2007). TININIS (2006) comparou a estabilidade da caseargrewiina F (chamada pelo autor de casearina V) isolada de *C. sylvestris* em diferentes solventes deuterados (DMSO-d_6 , acetona- d_6 , CD_3OD , piridina- d_5 e CDCl_3), confirmando a hipótese da sua degradação apenas em CDCl_3 . Segundo estes autores, é possível observar nos espectros de RMN de ^1H o desaparecimento gradual dos sinais dos hidrogênios acetálicos e o surgimento dos sinais de hidrogênios aldeídicos, quando a amostra é mantida por alguns dias em CDCl_3 . No entanto, foram encontradas na literatura substâncias consideradas naturais - caseamembrinas F, J, K, diterpeno 22 (MOSADDIK; WATERMAN, 2006; SHEN et al., 2005a; SHEN et al., 2004a; Tabela 2 e Figura 8) e laetiaprocerina D (JULLIAN et al., 2005), mas que devem tratar-se na realidade de artefatos, já que os pesquisadores utilizaram CDCl_3 nos experimentos de RMN.

Outros 4 diterpenos clerodânicos isolados de espécies de *Casearia* não possuem o anel diacetálico (C) típico e são menos oxigenados. Dois deles, isolados de *C. corymbosa*, apresentaram características dos diterpenos acima discutidos: ligação dupla em C-3, dieno conjugado na cadeia lateral em C-13(C-16) e C-14, junção *cis* entre anéis A e B e relação *trans* entre Me-17 e Me-20 (Figuras 9c e 9d). Já os diterpenos isolados de *C. sylvestris*, 15-hidróxi-3-cleroden-2-ona e (-)-ácido hardwickiico (SANTOS et al., 2007) possuem estereoquímica distinta dos diterpenos típicos de *Casearia*, com relação *cis* entre as metilas C-17 e C-20. Além disso, enquanto 15-hidróxi-3-cleroden-2-ona é um típico *cis*-clerodano e possui a cadeia lateral saturada, (-)-ácido hardwickiico possui configuração típica de um *ent-trans*-clerodano e um anel furânico em C-12 na cadeia lateral. A presença destes outros 2 diterpenos em *C. sylvestris* revela sua habilidade em biossintetizar tanto *cis* como *trans*-clerodanos, o que já foi relatado para outras espécies vegetais como *Adelanthus lindenbergianus* *Adelantaceae* (BLÄS; ZAPP; BECKER, 2004) e *Grangea maderaspatana* *Asteraceae* (SINGH; JAIN; JAKUPOVIC, 1988).

Diversos diterpenos típicos de *Casearia* apresentaram atividade citotóxica em células tumorais: casearborinas A-E (*C. arborea*); caseargrewiinas A-L, esculentina B e diterpenos 1 e 2 (*C. grewiifolia*); casearlucinas A-K, diterpenos 1, 2 e 3 (*C. lucida*); caseamembrinas A-H e L-O, caseamembrol A e B, casearlucina A e diterpeno 2 (*C. membranaceae*); caseanigrescenas A-D (*C. nigrescens*); casearinas A-U, casearvestrinas A-C e caseargrewiina F (*C. sylvestris*). Alguns pesquisadores analisaram sua relação estrutura-atividade citotóxica, chegando às seguintes considerações (MORITA et al., 1991; SHEN et al., 2005b; SHEN et al., 2004a; TININIS, 2006): a) a presença de OAc em C-18 é importante para a atividade, pois a troca por OCH₃ produz redução da mesma; b) de igual forma, a presença de uma hidroxila em C-6 é responsável por maior atividade do que a dos respectivos derivados acetilados em C-6; c) uma hidroxila em C-7 promove redução da atividade; d) diferentes substituintes em C-2 não induzem alterações significativas na atividade; e) a degradação a dialdeído reduz a atividade.

Adicionalmente, as caseargrewiinas A-D e os diterpenos 1 e 2 (*C. grewiifolia*) mostraram ação antimalárica (*Plasmodium falciparum*) e antimicobacteriana (*Mycobacterium tuberculosis*), inferior a dos controles positivos utilizados (KANOKMEDHAKUL et al., 2005). As casearvestrinas e o diterpeno 7 (*C. sylvestris*) apresentaram atividades antifúngica (*Aspergillus niger*) e tripanossomicida (*T. cruzi*), respectivamente (ESPÍNDOLA et al., 2004; OBERLIES et al., 2002). Casearinol A e B e casearinona A e B (*C. guianensis*) mostraram ação imunomodulatória (HUNTER et al., 1997).

Algumas atividades farmacológicas exibidas por espécies de *Casearia* foram objeto de depósitos de patente. Os diterpenos esculentina A e B isolados de *C. esculenta* apresentaram ações citotóxica em células tumorais e antiinflamatória e a respectiva patente foi depositada na Europa por uma empresa farmacêutica (AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GmbH, 1999). *C. sylvestris*, uma das espécies mais investigadas, está relacionada em 3 outras patentes. Na primeira, a ação citotóxica das casearinas foi patenteadas no Japão (KIRIN BREWERY, 1989). A ação antiulcerogênica apresentada por uma fração rica em casearinas gerou uma segunda patente, depositada pela FAPESP, UNESP e USP, cujos inventores pertencem ao nosso grupo de pesquisa e ao Instituto de Ciências Biológicas da USP (FAPESP, UNESP, USP, 2003). Mais recentemente, pesquisadores da Faculdade

de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP) depositaram uma patente de fitoterápicos à base de extratos de *C. sylvestris* para o tratamento da herpes (UNICAMP, 2005).

Diterpenos clerodânicos semelhantes aos encontrados em *Casearia* foram isolados de outras espécies de *Salicaceae*, também classificadas anteriormente na antiga família *Flacourtiaceae*, incluindo *Zuelania guidonia* (KHAN et al., 1990b; KHAN; GRAY; WATERMAN, 1990), *Laetia procera* (GIBBONS et al., 1996b; JULLIAN et al., 2005) e *L. corymbulosa* (BEUTLER et al., 2000b). A ampla ocorrência destes típicos diterpenos em espécies de *Salicaceae* sugere alguma relação quimiotaxonômica. De outro lado, também foram isolados de espécies vegetais de outras famílias como de *Monodora brevipes Annonaceae* (ETSE et al., 1989), *Bucida bucera Combretaceae* (HAYASHI et al., 2002) e *Licania intrapetiolares Chrysobalanaceae* (OBERLIES et al., 2001).

Do ponto de vista farmacológico, a gama de variações em torno de um esqueleto básico encontrada nos diterpenos de *Casearia* fornece modelos muito interessantes para estudos de estabelecimento de relação estrutura-atividade para as ações biológicas destas substâncias, além de outras a serem avaliadas.

DITERPENO	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	Fig.	Espécie	Ref.
casearina T	OCH ₃ (α)	OAc	OAc	OAc (β)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	---	6c	C. sylvestris	10
casearina U	n-C ₃ H ₇ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	OAc	OH (α)	---	---	6c	C. sylvestris	11
casearina X	n-C ₃ H ₇ CO ₂ (α)	OAc	OAc	H	n-C ₃ H ₇ CO ₂	---	6c	C. sylvestris	12
casearina Y	OCH ₃ (α)	OAc	n-C ₃ H ₇ CO ₂	H	n-C ₃ H ₇ CO ₂	---	6c	C. sylvestris	12
casearinol A	2M2Buten	OAc	OAc	OH	---	---	7a	<i>C. guianensis</i>	14
casearinol B	2MB	OAc	OAc	OH	---	---	7a	<i>C. guianensis</i>	14
casearinona A	OAc	OAc	OAc	= O	---	---	7a	<i>C. guianensis</i>	14
casearinona B	OAc	OAc	OAc	= O	---	---	7b	<i>C. guianensis</i>	28
casearlucina A	2MB (α)	OAc	OAc	OH	H	---	6a	<i>C. lucida</i>	15
casearlucina B	OAc (α)	OAc	OAc (β)	OCH ₃ (β)	H	H	6b	<i>C. lucida</i>	3
casearlucina C	2MB (α)	OAc	OAc	OAc	H	---	6a	<i>C. lucida</i>	15
casearlucina D	2MB (β)	OAc	OAc (β)	OAc (β)	H	H	6b	<i>C. lucida</i>	15
casearlucina E	2MB (α)	OAc	OAc (β)	OCH ₃ (β)	H	H	6b	<i>C. lucida</i>	15
casearlucina F	2MB (α)	OAc	OAc	H	H	---	6a	<i>C. lucida</i>	15
casearlucina G	2MB (β)	OAc	OAc	H	H	---	6a	<i>C. lucida</i>	15
casearlucina H	2MB (β)	OAc	OAc (β)	OH (β)	H	OH(α)	6b	<i>C. lucida</i>	15
casearlucina I	2MB (β)	OAc	OAc (β)	OH (β)	H	OH(β)	6b	<i>C. lucida</i>	15
casearlucina J	2MB (α)	OAc	OAc (β)	OH (β)	H	OH(α)	6b	<i>C. lucida</i>	15
casearlucina K	2MB (α)	OAc	OAc (β)	OH (β)	H	OH(β)	6b	<i>C. lucida</i>	15
casearvestrina A	2MP (β)	OAc	OAc	OH (α)	H	---	6c	C. sylvestris	16
casearvestrina B	2MB (β)	OAc	OAc	OH (α)	H	---	6c	C. sylvestris	16
casearvestrina C	n-C ₅ H ₁₁ CO ₂ (β)	OAc	OAc	OH (α)	H	---	7b	C. sylvestris	16
corimbotina A	OAc (β)	OAc	OAc	OCH ₃	H	---	6a	<i>C. corymbosa</i>	17
corimbotina B	2MP (β)	OAc	OAc	OCH ₃	H	---	6a	<i>C. corymbosa</i>	17
corimbotina C	2M2Propen (β)	OAc	OAc	OCH ₃	H	---	6a	<i>C. corymbosa</i>	17
corimbotina D	OAc (β)	OAc	OAc	OH	H	---	6a	<i>C. corymbosa</i>	17
corimbotina E	2MP (β)	OAc	OAc	OH	H	---	6a	<i>C. corymbosa</i>	17
corimbotina F	2M2Propen (β)	OAc	OAc	OH	H	---	6a	<i>C. corymbosa</i>	17
corimbotina G	OAc	OAc	OAc	OH	---	---	7d	<i>C. corymbosa</i>	17
corimbotina H	2MP	OAc	OAc	OH	---	---	7d	<i>C. corymbosa</i>	17
corimbotina I	2M2Propen	OAc	OAc	OH	---	---	7d	<i>C. corymbosa</i>	17
esculentina A	= O	OAc	OAc (β)	H	H	H	6b	<i>C. esculenta</i>	18
esculentina B	3MB (α)	OAc	OAc	OH	OH	---	6a	<i>C. esculenta</i>	18
pitumbina	OH (β)	OAc	OAc (β)	ODen (β)	H	H	6b	<i>C. pitumba</i>	19
diterpeno 1	2MB (β)	OAc	OAc (β)	OCH ₃ (β)	H	H	6b	<i>C. tremula</i>	21
diterpeno 2	2MB (β)	OAc	OAc (β)	OH (β)	H	H	6b	<i>C. grewifolia</i>	6
diterpeno 3	2MB (β)	OAc	OAc (β)	H	H	H	6b	<i>C. lucida</i>	15
diterpeno 4	n-C ₇ H ₁₅ CO ₂ (β)	OAc	OAc (β)	OH (β)	H	H	6b	<i>C. tremula</i>	21
diterpeno 5	n-C ₁₀ H ₂₁ CO ₂ (β)	OAc	OAc (β)	OH (β)	H	H	6b	<i>C. tremula</i>	21
diterpeno 6	3OHO (β)	OAc	OAc (β)	OH (β)	H	H	6b	<i>C. tremula</i>	21
diterpeno 7	2MB (β)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	OAc (β)	OH (β)	H	H	6b	C. sylvestris	22,25
diterpeno 8	2MB (β)	OAc	OAc (α)	OH (β)	H	H	6b	<i>C. corymbosa</i>	23
diterpeno 9	2MP (β)	OAc	OAc (α)	OH (β)	H	H	6b	<i>C. corymbosa</i>	23
diterpeno 10	2MB (β)	OAc	OAc (α)	OCH ₃ (β)	H	H	6b	<i>C. corymbosa</i>	23
diterpeno 11	2MP (β)	OAc	OAc (α)	OCH ₃ (β)	H	H	6b	<i>C. corymbosa</i>	23
diterpeno 12	n-C ₅ H ₁₁ CO ₂ (α)	OAc	OAc (β)	H	H	H	6b	<i>C. tremula</i>	21
diterpeno 13	OH (α)	OAc	OAc (β)	H	---	---	7c	<i>C. corymbosa</i>	23
diterpeno 14	OAc (α)	OAc	OAc (β)	H	---	---	7c	<i>C. corymbosa</i>	23
diterpeno 15	2MB (α)	OAc	OAc (β)	H	---	---	7c	<i>C. corymbosa</i>	23
diterpeno 16	OAc (β)	OAc	OAc (α)	= O	---	---	7c	<i>C. grewifolia</i>	24
diterpeno 17	OAc (β)	OAc	OAc (α)	H	---	---	7c	<i>C. grayi</i>	28
diterpeno 18	2MB (β)	OAc	OAc (α)	= O	---	---	7c	<i>C. grewifolia</i>	24
diterpeno 19	2MP (β)	OAc	OAc (α)	H	---	---	7c	<i>C. grewifolia</i>	24

DITERPENOS	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	Fig.	Espécie	Ref.
diterpeno 20	2MB (β)	OAc	OAc (α)	H	---	---	7c	<i>C. grevifolia</i>	24
diterpeno 21	2MB (α)	OAc	OCH ₃ (β)	OH (β)	---	H	6b	<i>C. multinervosa</i>	27
diterpeno 22			-----artefato-----				8	<i>C. multinervosa</i>	27
diterpeno 23	OH (β)	OAc	OAc (α)	H	---	---	7c	<i>C. grayi</i>	28
diterpeno 24	OH (β)	OAc	OAc (α)	= O	---	---	7c	<i>C. grayi</i>	28
diterpeno 25	OH	OAc	OAc	= O	---	---	7a	<i>C. grayi</i>	28
diterpeno 26	OH	OAc	OAc	H	---	---	7a	<i>C. grayi</i>	28

Abreviaturas, referências e informações adicionais da Tabela 2:

a) Abreviaturas e fórmulas: **OAc:** acetato; **n-C₃H₇CO₂:** butanoato; **n-C₅H₁₁CO₂:** hexanoato; **n-C₇H₁₅CO₂:** octanoato; **n-C₉H₁₉CO₂:** decanoato; **n-C₁₀H₂₁CO₂:** undecanoato; **ODen:** 2,4-(Z,E)-decadienoato; **OEt:** etoxila; **2MB:** 2-metilbutanoato; **2M2Buten:** 2-Me-2-butenoato; **3MB:** 3-metilbutanoato; **2MP:** 2-metilpropanoato; **2M2Propen:** 2-Me-2-propenoato; **4OH3MBz:** 4-hidroxi-3-metoxi-benzoato; **3OHO:** 3-hidroxi-octanoato.

b) Referências: **1.** SHEN et al., 2004a; **2.** SHEN et al., 2005a; **3.** SHEN et al., 2004b; **4.** SHEN et al., 2005b; **5.** BEUTLER et al., 2000a; **6.** KANOKMEDHAKUL et al., 2005; **7.** KANOKMEDHAKUL et al., 2007; **8.** ITOKAWA et al., 1990; **9.** MORITA et al., 1991; **10.** CARVALHO et al., 1998; **11.** SANTOS, 2001; **12.** TININIS, 2006; **13.** SANTOS et al., 2007; **14.** HUNTER et al., 1997; **15.** PRAKASH et al., 2002; **16.** OBERLIES et al., 2002; **17.** CHEN & WIEMER, 1991; **18.** VIJAYAKUMAR et al., 2002; **19.** GUITTET et al., 1988; **20.** WILLIAMS et al., 2007; **21.** GIBBONS et al., 1996a; **22.** ESPÍNDOLA et al., 2004; **23.** KHAN et al., 1990a; **24.** MOSADDIK et al., 2007a; **25.** CARVALHO et al., 2007; **26.** SHEN et al., 2005c; **27.** MOSADDIK; WATERMAN, 2006; **28.** MOSADDIK et al., 2006a.

c) Legenda dos diterpenos codificados com números:

- rel-18S,19R-diacetóxi-18,19-epóxi-2S-(2-metilbutanoiloxi)-6R-metoxi-5R,8S,9S,10R-cleroda-3,13(16),14-trieno
- rel-18S,19R-diacetóxi-18,19-epóxi-2S-(2-metilbutanoiloxi)-6R-hidróxi-5R,8S,9S,10R-cleroda-3,13(16),14-trieno
- rel-18S,19R-diacetóxi-18,19-epóxi-2S-(2-metilbutanoiloxi)-5R,8S,9S,10R-cleroda-3,13(16),14-trieno
- rel-18S,19R-diacetóxi-18,19-epóxi-6R-hidróxi-2S-octanoiloxi-5R,8S,9S,10R-cleroda-3,13(16),14-trieno
- rel-18S,19R-diacetóxi-18,19-epóxi-6R-hidróxi-2S-undecanoiloxi-5R,8S,9S,10R-cleroda-3,13(16),14-trieno
- rel-18S,19R-diacetóxi-18,19-epóxi-6R-hidróxi-2S-(3-hidroxi-octanoiloxi)-5R,8S,9S,10R-cleroda-3,13(16),14-trieno
- rel-19R-acetóxi-18S-butanoiloxi-18,19-epóxi-6R-hidróxi-2S-(2-metilbutanoilóxi)-5R,8S,9S,10R-cleroda-3,13(16),14-trieno
- ent*-6 β -hidroxiisozuelanina-2 β -(2-metil)butanoato
- ent*-6 β -hidroxiisozuelanina-2 β -(2-metil)propanoato
- ent*-6 β -metoxiisozuelanina-2 β -(2-metil)butanoato
- ent*-6 β -metoxiisozuelanina-2 β -(2-metil)propanoato
- rel-18S,19R-diacetóxi-18,19-epóxi-2R-hexanoilóxi-5R,8S,9S,10R-cleroda-3,13(16),14-trieno
- 13*:** *ent*-2 β -hidróxi-3,4-di-hidro-4 α -isozuelanina
- 14*:** *ent*-2 β -acetoxi-3,4-di-hidro-4 α -isozuelanina
- 15:** *ent*-2 β -(2-metilbutanoiloxi)-3,4-di-hidro-4 α -isozuelanina
- rel-2R,18S,19R-triacetóxi-18,19-epóxi-4S,5S,8S,9S,10R-clerodan-13(16),14-dien-6-ona
- 17*:** rel-2R,18S,19R-triacetóxi-18,19-epóxi-4S,5R,8S,9S,10R-clerodan-13(16),14-dieno
- rel-18S,19R-diacetóxi-18,19-epóxi-2R-(2-metilbutanoilóxi)-4S,5S,8S,9S,10R-clerodan-13(16),14-dien-6-ona
- rel-18S,19R-diacetóxi-18,19-epóxi-2R-(isobutanoilóxi)-4S,5R,8S,9S,10R-clerodan-13(16),14-dieno

20: rel-18*S*,19*R*-diacetóxi-18,19-epóxi-2*R*-(2-metilbutanoilóxi)-4*S*,5*R*,8*S*,9*S*,10*R*-clerodan-13(16),14-dieno

21: rel-18*R*-acetóxi-19*S*-metóxi-18,19-epóxi-6*S*-hidróxi-2*S*-(2-metilbutanoilóxi)-5*S*,8*R*,9*R*,10*S*-clerodan-3,13(16),14-trieno

22: rel-(2*R*,5*R*,6*R*,8*S*,9*S*,10*R*)-6-metóxi-2-(2-metilbutanoilóxi)-cleroda-3,13(16),14-trieno-4,5-dial

23*: rel-2*R*-hidróxi-18*S*,19*R* -diacetóxi-18,19-epóxi-4*S*,5*R*,8*S*,9*S*,10*R*-clerodan-13(16),14-dieno

24: rel-2*R*-hidróxi-18*S*,19*R* -diacetóxi-18,19-epóxi-4*S*,5*S*,8*S*,9*S*,10*R*-clerodan-13(16),14-dien-6-ona

25: rel-2*R*-hidróxi-18*S*,19*R* -diacetóxi-18,19-epóxi-4*S*,5*S*,8*S*,9*S*,10*R*-clerodan-12*E*,14-dien-6-ona

26: rel-2*R*-hidróxi-18*S*,19*R* -diacetóxi-18,19-epóxi-4*S*,5*R*,8*S*,9*S*,10*R*-clerodan-12*E*,14-dieno

*segundo MOSSADIK et al (2006a) as estruturas dos diterpenos 13 e 14 foram determinadas de maneira equivocada e suas verdadeiras estruturas equivaleriam as dos diterpenos 23 e 17, respectivamente.

d) Diterpenos com a configuração absoluta determinada:

casearborina E: (+)-18*R*,19*S*-diacetoxi-18,19-epoxi-2*R*-acetiloxi-6*S*-*p*-hidroxibenzoiloxi-5*S*,8*R*,9*R*,10*S*-cleroda-3,12(*E*),14-trieno

caseargrewiina D: (-)-18*R*,19*S*-diacetoxi-18,19-epoxi-2*R*-hidroxi-5*S*,8*R*,9*R*,10*S*-cleroda-3,12(*Z*),14-trieno

casearinas A-F: todas dextrógiras; configurações absolutas ver Tabela 2 e Figuras 6

casearlucina H: (+)-18*S*,19*R*-diacetoxi-18,19-epoxi-6*R*,12*R*-dihidroxi-2*S*-(2-metil-butanoiloxi)-5*R*,8*S*,9*S*,10*R*,12*R*-cleroda-3,13(16),14-trieno

casearlucina I: (+)-18*S*,19*R*-diacetoxi-18,19-epoxi-6*R*,12*S*-dihidroxi-2*S*-(2-metil-butanoiloxi)-5*R*,8*S*,9*S*,10*R*,12*R*-cleroda-3,13(16),14-trieno

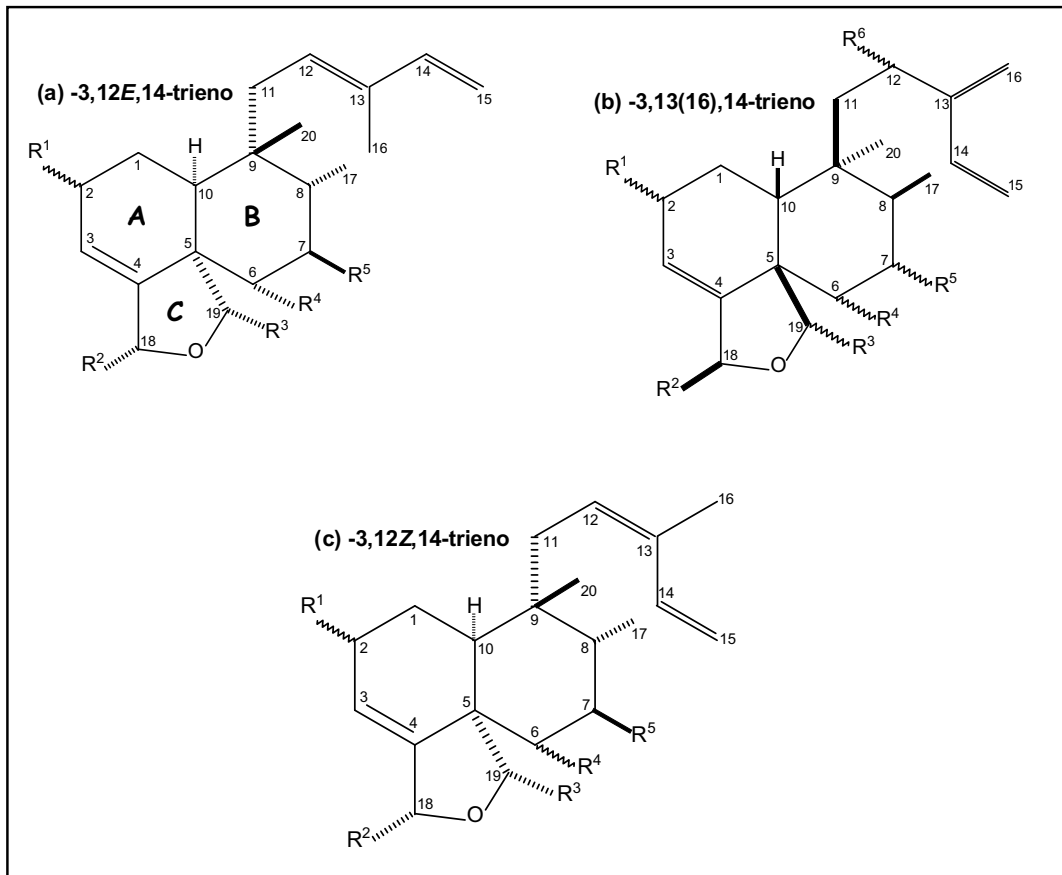


Figura 6 (a-c): Esqueleto básico dos diterpenos *cis*-clerodânicos com anel diacetálico (anel C) presentes em espécies de *Casearia*. Grupos substituintes: Tabela 2. As configurações apresentadas são relativas, exceto para os diterpenos relacionados nas informações adicionais da Tabela 2.

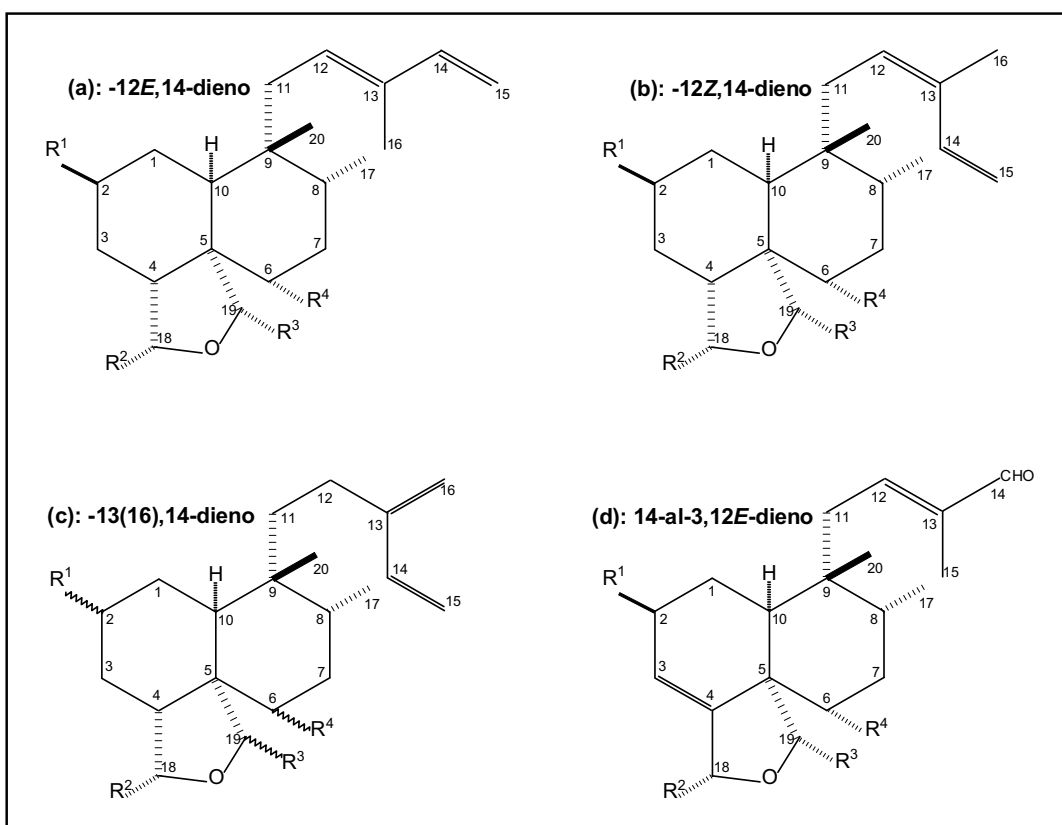


Figura 7 (a-d): Esqueleto básico dos diterpenos *cis*-clerodânicos com anel diacetálico (anel C) presentes em espécies de *Casearia*. Grupos substituintes: Tabela 2. As configurações apresentadas são relativas.

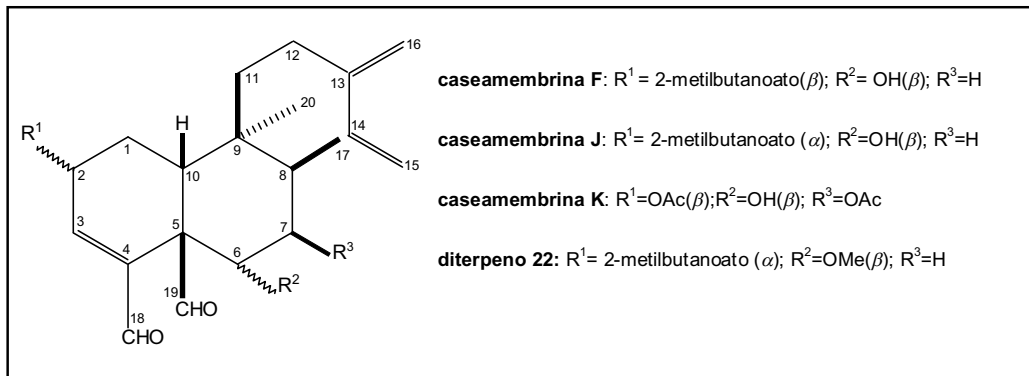


Figura 8: Artefatos originados a partir da degradação ou abertura do anel diacetálico (C) de diterpenos clerodânicos isolados de *Casearia*, possivelmente devido ao uso de CDCl_3 como solvente nos experimentos de RMN. Os autores consideraram tais substâncias como metabólitos secundários inéditos!

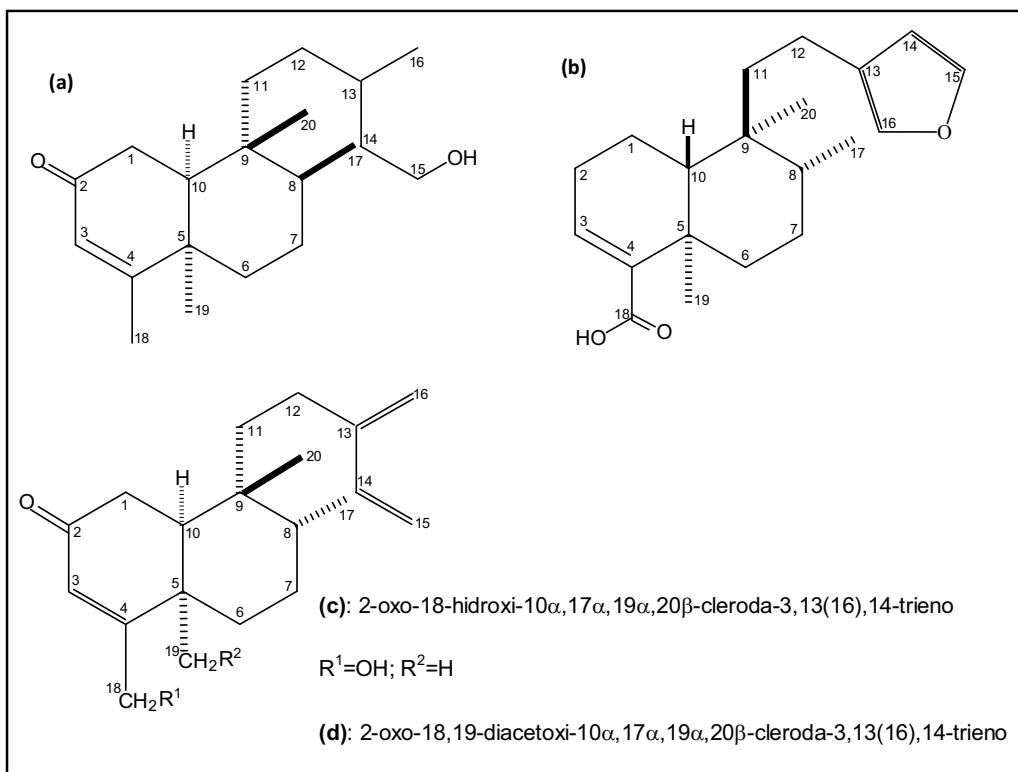


Figura 9: Diterpenos clerodânicos sem o anel diacetálico: **(a)** 15-hidroxi-3-cleroden-2-ona, **(b)** (-)-ácido hardwickiico - isolados de *C. sylvestris* (SANTOS et al., 2007) e **(c)**, **(d)** – isolados de *C. corymbosa* (KHAN et al., 1990a).

Informações sobre outros metabólitos secundários identificados e/ou isolados de espécies de *Casearia* são apresentados na Tabela 3. Além disso, a Tabela 4 inclui os componentes identificados por CG-EM e/ou índice de retenção no óleo essencial das folhas das espécies *C. grandiflora* e *C. sylvestris*.

Em *C. grandiflora* os principais componentes identificados foram, na ordem, β -cariofileno, γ -muuroleno, biciclogermacreno e β -elemeno. Para *C. sylvestris* são apresentados dados de 4 autores na Tabela 4. Em todos os casos predominam sesquiterpenos e monoterpenos. Há diferenças qualitativas e quantitativas na composição dos óleos essenciais, o que pode ser explicado pela variabilidade genética e ambiental a que está sujeita a biossíntese de metabólitos secundários. Considerando-se as 4 análises, os componentes majoritários encontrados no óleo essencial de *C. sylvestris* foram (α - ou β -)cariofileno, biciclogermacreno e germacreno D. Os teores encontrados para o óleo essencial das folhas obtidos em aparelho tipo Clevenger também variaram de 0,2 a 2,5% (m/m) (ESTEVES et al., 2005; SCHNEIDER et al., 2006; SILVA; BAUER, 1970; SOUSA et al., 2007b).

Em trabalho desenvolvido por TININIS et al. (2006) foi possível observar que os indivíduos analisados apresentavam composição diferenciada para as amostras de folhas coletadas de manhã e à tarde. No período da manhã, os constituintes principais (teor relativo > que 1%) foram longifoleno (1,8%), β -selineno (4,2%), germacreno-D (79,2%) e germacreno-B (14,8%). À tarde, os constituintes principais foram identificados como: longifoleno (3,2%), β -gurgeneneno (1,1%), γ -muuroleno (3,0%), γ -gurgeneneno (2,2%), β -selineno (5,2%), germacreno-D (66,2%), biciclogermacreno (3,6%), δ -cadineno (1,7%), germacreno-B (13,7%). Com relação à variação da composição do óleo em função do período de amostragem, os autores concluem que há inicialmente a biossíntese de sesquiterpenos monocíclicos (germacreno B e D), e que estes, em etapas subsequentes, sofreriam rearranjos na cadeia carbônica originando os demais sesquiterpenos. Isto demonstraria que a dinâmica metabólica é influenciada pelo fotoperíodo, inferindo-se a essa variação reações fotoquímicas para os rearranjos dos sesquiterpenos analisados.

Tabela 3: Metabólitos secundários, exceto diterpenos clerodânicos, identificados e/ou isolados de extratos de espécies de *Casearia*.

Espécie	Metabólitos Secundários	Classe	Ação Biológica	Ref
<i>C. arborea</i>	cucurbitacina B	triterpeno	citotoxicidade	1
<i>C. clarkei</i>	4'-desmetildesohipodofilotoxina; 4'-desmetildesohipicropodofilotoxina; 2' β -hidroxi-4'-desmetilpodofilotoxina	lignanas (tipo -podofilotoxina)	----	2
	amentoflavona	biflavona	----	2
	catequina; epicatequina	catequinas	----	2
<i>C. corymbosa</i>	lupenona; friedelan-3 β -ol	triterpenos	----	2
	<i>ent</i> -(-)-kaur-16-en-19-al; acetato de <i>ent</i> -(-)-kaur-16-en-19-ol; ácido <i>ent</i> -(-)-kaur-16-en-19-óico; <i>ent</i> -(-)-kaur-16-en-3 β -ol	diterpenos (<i>ent</i> -kaurenos)	----	3
	(-)-óxico-epimanoil; (-)-óxico-3 α -hidroxi-13-epimanoil	diterpenos	----	3
	4,5-óxico-cariofileno	sesquiterpeno	----	3
<i>C. costulata</i>	β -sitosterol	esteróide	----	3
	idesina	glicosídeo fenólico	----	4
<i>C. esculenta</i>	leucopelargonidina	leucoantocianidina	----	5
<i>C. graveolens</i>	bergapteno; escopoletina; micromelina; casegravol	cumarinas	----	6
	β -sitosterol	esteróide	----	6
	ácido 16-hidroxi-halima-5(10),13 <i>E</i> -dien-15-óico	diterpeno halimânico	----	7
<i>C. grayi</i>	(+)-catequina; 3-O- β -glucopiranosil-7-O- α -ramnopiranosídeo-quercetina; 3-O- β -glucopiranosil-7-O- α -ramnopiranosídeo-canferol; 3,7-di-O- α -raminosídeo-quercetina; 3,7-di-O- α -raminosídeo-canferol; 3-O- β -glucopiranosídeo-quercetina; 3-O- β -glucopiranosídeo-canferol; canferol	flavonas glicosiladas	----	7
	apigenina	flavona	----	8
	quercetina; canferol	flavonóis	----	8
	----	taninos condensados	----	8
<i>C. membranacea</i>	casealactona	butenolídeo	citotoxicidade	9
	caseamemina	cromano	----	9
	casearinona	éter benzoguinolínico	----	9
	casearimeno A; casearimeno B	diterpenos dolabelânicos	----	9
	friedelina; esqualeno	triterpenos	----	9
	siringaresinol	lignana	----	9
	<i>N</i> - <i>trans</i> -feruloiltiramina; <i>N</i> - <i>cis</i> -feruloiltiramina	amidas	citotoxicidade	9
	----	antraquinona	----	9
	ácido vanílico; siringaldeído	compostos fenólicos	----	9
	β -sitosterol; β -sitosterol-3-O- β -glicosídeo; β -sitostenona; estigmast-5-eno-3 β ,7 α -diol; estigmast-5-eno-3 β ,7 β -diol; estigmastano-3 β ,5 α ,6 β -triol	esteróides	----	9
	10 ϵ -acetoxihumula-3,7-dieno; α -humuleno; 4,5-óxico de cariofileno	sesquiterpenos	----	10
<i>C. multinervosa</i>	3 ϵ -(hexadec-11-enil)-4 ϵ -hidróxi-5-metileno-2,3-diidrofurano-2-ona	furanona	----	10
	arbutina; 4-O- <i>E</i> -cafeoilarbutina; 4-O- <i>E</i> -cumaroilarbutina; 4-O- <i>E</i> -feruloilarbutina	glicosídeos fenólicos	----	11
<i>C. sylvestris</i>	lupeol; α e β -amirina	triterpenos	----	12
	hesperidina	flavanona	----	12
	isoquercetina; rutina	flavonóis	----	12
	ácidos caféico, clorogênico e vanílico	compostos fenólicos	----	12
	lapachol	naftoquinona	----	12
<i>C. thwaitesii</i>	quercetina, 4'-O-metiléter-canferol e isoramnetina	flavonóis	----	13
	β -amirina	triterpeno	----	14
<i>C. tomentosa</i>	hiperosídeo	flavonol	----	15

1. BEUTLER et al., 2000a; 2. SHAARI; WATERMAN, 1994; 3. KHAN et al., 1990a; 4. MOSADDIK et al., 2007b; 5. KRISHNAN; RANGASWAMI, 1965; 6. TALAPATRA et al., 1982; 7. MOSADDIK et al., 2006a; 8. WENIGER et al., 1978; 9. CHANG et al., 2003; 10. MOSADDIK; WATERMAN, 2006; 11. MOSADDIK et al., 2006b; 12. RASLAN et al., 2002; 13. JUNGES; SCHENKEL; SIMÕES, 1985; 14. GUNASEKERA et al., 1977; 15. SUKUMAR et al., 1982.

Tabela 4: Composição do óleo essencial de folhas das espécies *C. grandiflora* e *C. sylvestris*.

Metabólitos	Teor (%) encontrado nas espécies				
	<i>C. grandiflora</i> ¹	<i>C. sylvestris</i> ²	<i>C. sylvestris</i> ³	<i>C. sylvestris</i> ⁴	<i>C. sylvestris</i> ^{5,6}
β -acoradieno	----	----	----	20,8	----
álcool benzílico	----	0,1	0,1	----	----
alloaromadendreno	0,7	0,3	0,3	----	----
aromadendreno	0,6	0,3	0,3	----	----
biciclogermacreno	14,7	24,2	24,2	40,9	3,6
α -bisaboleno	----	0,7	0,7	----	----
β -bisaboleno	----	----	0,2	----	----
<i>E</i> - γ -bisaboleno	0,4	----	----	----	----
β -bourboneno	0,8	0,3	0,3	----	----
bulnesol	----	----	4,2	----	----
calameneno	----	----	----	1,5	----
α -cadinol	0,5	----	----	----	----
<i>t</i> -cadinol	----	----	0,5	----	----
γ -canideno	0,4	0,3	0,3	----	----
δ -canideno	1,8	0,6	0,6	----	(1,7)
cariofileno	----	----	----	13,8	----
α -cariofileno	----	27,5	----	----	----
β -cariofileno	24,6	----	27,5	----	----
α -copaeno	1,0	0,6	0,6	----	----
α -cubebeno	1,1	----	----	----	----
cubebol	----	0,4	0,4	----	----
elemeno	----	1,1	----	----	----
β -elemeno	14,2	1,3	1,3	----	----
γ -elemeno	----	0,2	1,1	----	----
δ -elemeno	2,5	----	----	----	----
elemol	----	----	0,8	----	----
espatulenol	----	----	0,9	12,6	----
γ -eudesmol	----	----	0,6	----	----
eugenol	----	0,2	0,2	----	----
<i>Z,E</i> -famesol	----	----	0,3	----	----
germacreno A	1,2	----	----	----	----
germacreno B	5,4	----	0,9	3,9	14,8 (13,7)
germacreno D	----	7,8	7,8	1,9	79,2 (66,2)
globulol	----	----	1,2	2,2	----
guaiol	----	----	4,7	----	----
α -gurjuneno	----	0,1	0,1	----	----
β -gurjuneno	0,6	0,4	0,4	----	(1,1)
γ -gurjuneno	----	----	----	----	(2,2)
α -humuleno	2,3	3,9	3,9	3,7	----
ledol	----	----	0,8	----	----
linalol	----	0,8	0,8	----	----
longifileno	----	----	----	----	1,8 (3,2)
muuroleno	----	0,2	----	----	----
γ -muuroleno	22,8	----	0,2	----	(3,0)
<i>t</i> -muurolol	----	----	0,1	----	----
óxido de cariofileno	----	----	0,6	----	----
α -pineno	----	2,0	2,0	----	----
pulegona	----	0,5	0,5	----	----
α -selineno	1,1	----	----	----	----
β -selineno	----	----	----	----	4,2 (5,2)
tujopseno	----	----	----	5,2	----
viridiflorol	----	----	1,9	----	----

¹MORAES & MACHADO, 1997; ²SCHNEIDER et al., 2006; ³SOUSA et al., 2007a; ⁴ESTEVES et al., 2005; ⁵TININIS et al., 2006.

⁶valores em itálico referentes a análises de folhas coletadas no período da manhã e valores em parênteses referentes a análises de folhas coletadas no período da tarde; ambas coletas do mesmo indivíduo; ver discussão acima.

3.4.1. ESTUDOS FITOQUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS SOBRE *C. sylvestris*

A grande diversidade de usos populares de *C. sylvestris* no Brasil despertou desde há muitos anos o interesse de grupos de pesquisadores, especialmente botânicos, etnobotânicos, farmacologistas e fitoquímicos. O número de artigos e resumos publicados em congresso, bem como as 3 patentes depositadas relacionadas a atividades da planta, confirmam esta constatação.

Os estudos fitoquímicos iniciais empregaram na identificação de metabólitos ou classes de metabólitos testes fitoquímicos clássicos (coloração, precipitação, etc), comparação com padrões em CCDC e espectrometria de absorção no UV. Os resultados indicaram a presença de saponinas, flavonóides e alcalóides em extratos de folhas (JUNGES; SCHENKEL; SIMÕES, 1985; POSSOLO; FERREIRA, 1949; SCAVONE et al., 1979). Mais recentemente, Raslan et al. (2002) utilizando CLAE-UV e padrões cromatográficos identificaram no extrato aquoso das folhas triterpenos, flavonóides, compostos fenólicos e uma naftoquinona. Mais informações sobre os metabólitos secundários isolados de *C. sylvestris*, exceto diterpenos, são apresentadas na Tabela 3.

Os dados da literatura têm demonstrado o predomínio em *C. sylvestris* de diterpenos clerodânicos (Tabela 2; Figuras 6, 7 e 9), especialmente os típicos do gênero *Casearia*, como as chamadas casearinas e casearvestrinas. Foram isolados 30 diterpenos clerodânicos desta espécie, sendo que a maioria exibiu atividade citotóxica em células tumorais, mas também ações tripanossomicida e antifúngica (CARVALHO et al., 1998; ESPÍNDOLA et al., 2004; ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; OBERLIES et al., 2002; SANTOS et al., 2007; TININIS, 2006). O fracionamento biomonitorado do extrato etanólico de folhas conduziu ao isolamento das casearinas A-F, que apresentaram atividade citotóxica em linhagens de células V-79 (fibroblastos de pulmão de hamster chinês clonado) e sarcoma 180 (camundongo), sendo a casearina C mais ativa (ITOKAWA et al., 1990). Novamente, MORITA et al. (1991) demonstraram a citotoxicidade das casearinas (A-R) em células V-79, chegando a algumas considerações sobre sua REA, conforme discutido no item 2.4. As casearinas G, S e T, isoladas por CARVALHO et al. (1998), mostraram ação citotóxica seletiva em cepas mutantes de *Sacharomyces cerevisiae* Rad 52Y e RS321. As casearvestrinas A-C também apresentaram atividade

citotóxica em células KB (carcinoma epidermóide oral humano), LX-1 (pulmão), HCT116 (cólon) e A2780 (ovário) (OBERLIES et al., 2002).

Todas as casearinas (A-Y) foram isoladas de folhas, as casearvestrinas (A-C) de folhas e ramos e o diterpeno 7 foi isolado das cascas das raízes e do caule. Os diterpenos clerodânicos mais simples (-)-ácido hardwiickico e 15-hidróxi-3-cleroden-2-ona também foram isolados das folhas. Trabalho desenvolvido por CARVALHO et al. (2007) sugeriu a presença de diterpenos clerodânicos típicos de *Casearia* em todos os órgãos da planta, através de análises por CLAE-DAD, CCDC e RMN de ¹H de extratos etanólicos e hexânicos. Os dados de absorção no UV dos picos dos cromatogramas dos diferentes órgãos sugerem a maior concentração de casearinas (12Z,14-dieno) em folhas e a ocorrência principalmente de diterpenos apresentando o sistema 13(16),14-dieno na cadeia lateral nos demais órgãos da planta. Outras informações sobre diterpenos em *C. sylvestris* são discutidas no Item 2.4.

Há diversos artigos publicados na literatura tratando da avaliação farmacológica de extratos de *C. sylvestris*. A maior parte das pesquisas concentrou-se nas atividades antiofídica, antiulcerogênica, antiinflamatória, analgésica e cicatrizante, todas estas relacionadas ao uso medicinal popular.

Em trabalhos de triagem de extratos bioativos de plantas do Cerrado, *C. sylvestris* var. *lingua* foi uma das que exibiu atividades biológicas mais significativas. Os extratos hexânicos de folhas, madeira e casca das raízes e caules inibiram o crescimento do *Plasmodium falciparum*, agente etiológico da malária; no entanto, foi observada significativa atividade citotóxica em células de mamíferos para o extrato de madeira do caule (MESQUITA et al., 2007). Extratos hexânicos e etanólicos de diferentes partes da planta (folhas, caules, raízes e frutos) apresentaram atividades leishmanicida (*Leishmania donovani*) e tripanossomicida (*Trypanosma cruzi*) (MESQUITA et al., 2005). Outros extratos exerceram ação larvicida em *Aedes aegypti* (RODRIGUES et al., 2006) e, ainda, o extrato etanólico das partes aéreas exibiu ação antifúngica, quando testado em *Candida albicans*, *C. papsitosis* e *C. krusei* (OLIVEIRA et al., 2007).

3.4.1.1. ATIVIDADES ANTIINFLAMATÓRIA E ANALGÉSICA

Há diversas evidências farmacológicas sobre o efeito antiinflamatório de extratos de folhas de *C. sylvestris*. Os extratos aquosos (chás) de folhas e de cascas (?) produziram em camundongos significativo efeito analgésico, avaliado pelo número de contorções, e antiinflamatório, avaliado em modelos de difusão do azul de Evans para a cavidade peritoneal e de edema de pata (PEREIRA et al., 1992; RUPPELT et al., 1990). O extrato hidroalcoólico de folhas também mostrou atividade antiinflamatória em modelo utilizando o método de difusão de azul de Evans em ratos (SILVA et al., 2004). SASASSIOTO et al. (2004) concluíram que o decocto de *C. sylvestris* promoveu atraso na cronologia do processo de reparação óssea em defeitos ósseos preenchidos com matriz óssea desvitalizada em ratos. Os autores relacionaram este efeito com a atividade antiinflamatória de metabólitos secundários que promovendo a inibição da síntese de prostaglandinas, produzem os efeitos analgésico e antiinflamatório, causando diminuição do número de macrófagos, fibroblastos e fibras colágenas, com ação inibitória sobre a osteogênese. Numa outra triagem com plantas do Cerrado, os extratos hexânicos de madeira do caule e casca da raiz de *C. sylvestris* var. *lingua* inibiram a produção de NO (mediador inflamatório) em macrófagos ativados por lipopolissacarídeo e γ -interferon; no entanto, estes extratos foram citotóxicos aos macrófagos (NAPOLITANO et al., 2005). Uma patente foi depositada por pesquisadores da UNICAMP, incluindo extratos de *C. sylvestris* com ação cicatrizante e antiinflamatória, com utilização no tratamento da herpes (UNICAMP, 2005).

O mecanismo de ação antiinflamatória deve estar relacionado à inibição da fosfolipase A₂, conforme observado para o extrato aquoso de folhas por Borges et al. (2000). Os diterpenos clerodânicos podem ser responsáveis, pelo menos parcialmente, pela ação antiinflamatória, como já verificado para as esculentinas A e B, isoladas de *C. esculenta*. Além do extrato aquoso, extratos hexânicos e hidroalcoólicos também foram ativos.

A ação antinociceptiva do extrato hidroalcoólico 75% foi avaliada em 3 modelos diferentes em camundongos. A análise dos resultados dos 3 modelos permitiu sugerir que o seu efeito antinociceptivo é mediado tanto por inibição da produção de mediadores da inflamação, quanto pela ativação de mecanismo envolvendo receptor opióide (MATTOS et al., 2007).

Outro artigo também descreve efeitos de *C. sylvestris* no Sistema Nervoso Central (SNC). O extrato aquoso de folhas apresentou um efeito neuroquímico geral ou efeitos modulatórios no SNC, pois afetou nos experimentos realizados *in vivo* importantes enzimas (NTPDase, 5'-nucleotidase, Na^+/K^+ -ATPase e acetilcolinesterase) envolvidas em processos purinérgicos, colinérgicos, dentre outros (SILVA et al., 2006).

3.4.1.2. ATIVIDADE ANTIOFÍDICA

A investigação da atividade antiofídica de *C. sylvestris* foi inicialmente realizada por RUPPELT, GONÇALVES e PEREIRA (1990) que verificaram a ação de extratos aquosos (chás) de folhas e cascas (?) bloqueando a atividade na permeabilidade capilar e diminuindo a letalidade, produzidas pelo veneno bruto de *Bothrops jararacussu* (jararaca). As picadas de cobras produzem várias manifestações tóxicas, como dor, edema, mionecrose local e sistêmica, alterações na coagulação do sangue, paralisia muscular e falência renal. Os venenos de cobras são misturas complexas de proteínas, incluindo fosfolipases A_2 (PLA₂s), miotoxinas, metaloproteases hemorrágicas e outras enzimas proteolíticas, componentes coagulantes, neurotoxinas, citotoxinas e cardiotoxinas, dentre outras (MEIER; STOCKER, 1995). A inibição das atividades enzimáticas e farmacológicas de venenos animais ou de suas toxinas purificadas constitui-se em método para a avaliação da atividade antiofídica *in vitro* ou *in vivo*.

As PLA₂s são abundantes em venenos de cobras. Atuam na hidrólise de fosfolipídeos e produzem uma série de atividades tóxicas, tais como neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, formação de edema, efeito anticoagulante, inibição da agregação plaquetária e, finalmente, letalidade. O extrato aquoso de folhas de *C. sylvestris* inibiu as atividades hemolítica, anticoagulante, miotóxica, a indução de edema de pata, além de diminuir a letalidade, produzidas por PLA₂s isoladas ou pelo próprio veneno bruto de cobras (gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*) em ensaios farmacológicos realizados *in vitro* e *in vivo* (BORGES et al., 2000; CAVALCANTE et al., 2007; OSHIMA-FRANCO et al., 2005; RASLAN et al., 2002). Adicionalmente, o extrato hidroalcoólico de folhas também inibiu a ação miotóxica de uma PLA₂; foi também notado que altas doses dos

extratos aquoso e hidroalcoólico causaram bloqueio neuromuscular (OSHIMA-FRANCO et al., 2005).

As enzimas proteolíticas de venenos de espécies de *Bothrops* degradam diversos tipos de substratos, como caseína, hemoglobina, colágeno, elastina, fibrinogênio, fibronectina, dentre outros. Hemorragias provocadas por picadas de cobras ocorrem devido a hemorragina, uma metaloprotease dependente de zinco, capaz de romper a membrana de capilares, causando alterações nos vasos sanguíneos. O extrato aquoso de folhas de *C.sylvestris* inibiu as atividades hemorrágica, proteolítica (fibrigenolítica e caseinolítica) e coagulante de venenos de *Bothrops* e/ou de 3 metaloproteases isoladas de *B. asper* e *B. neuwiedi*. Os autores certificaram-se de que as proteínas do veneno não degradaram, excluindo este mecanismo de ação; outras possibilidades seriam a quelação de metais, a ligação com sítio ativo e, ainda, mecanismos imunológicos. Proteases e seus inibidores estão em delicado equilíbrio nas células de mamíferos. Quando este equilíbrio é afetado podem ocorrer distúrbios como neoplasias e outras doenças, o que amplia a importância do estudo de inibidores de proteases (BORGES et al., 2001).

Atribuiu-se a ação antiofídica a flavonóides e outros compostos fenólicos que foram identificados no extrato aquoso de folhas e em suas frações. Esta hipótese foi reforçada já que algumas destas frações também apresentaram atividade inibitória de PLA₂ (OSHIMA-FRANCO et al., 2005; RASLAN et al., 2002). No entanto, até o momento os metabólitos secundários responsáveis pela atividade não foram identificados.

3.4.1.3. ATIVIDADE CICATRIZANTE

Em ensaios farmacológicos para a avaliação de propriedades cicatrizantes das folhas de *C. sylvestris*, observou-se que o processo cicatricial evoluiu mais rapidamente nos animais tratados com o extrato etanólico (95%) ou com a pomada (PEG) do extrato hidroalcoólico (GOMES et al., 2005; SCAVONE et al., 1979). Camargo et al. (1996) avaliaram a ação do extrato hidroalcoólico (2:1, v/v) de folhas em lesão subcutânea em camundongos, observando que os animais tratados com o extrato apresentaram redução significativa da fase aguda do processo inflamatório seguida de intensificação e prolongamento de eventos típicos da fase regenerativa (proliferação de fibroblastos, fibrócitos e vasos capilares neoformados).

3.4.1.4. ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA

A atividade antiúlcera de uma substância pode ser determinada em animais de experimentação (ratos machos ou fêmeas) em três modelos agudos: indução de lesões gástricas por medicamentos (DJAHANGUIRI, 1969), por estresse (SENAY; LEVINE, 1967) ou por etanol (ROBERT et al., 1979). Estes são os modelos mais utilizados porque representam os agentes etiológicos mais comuns envolvidos na patologia da úlcera gástrica humana. No entanto, é importante verificar a atividade da substância em um modelo crônico, como o das lesões gástricas induzidas por ácido acético (TAKAGI; OKABE; SAZIKI, 1970). Em todos esses modelos, além de se contar o número de úlceras e medir o seu tamanho, avalia-se também, de forma semi-quantitativa, as lesões da mucosa gástrica que precedem a ulceração. Essas lesões, por não permitirem mensuração direta facilmente, são avaliadas subjetivamente e pontuadas segundo o grau aparente de intensidade e comprometimento da mucosa. A somatória da pontuação atribuída aos diferentes tipos de lesão fornece um índice (índice de lesão) que reflete a gravidade da injúria à mucosa gástrica (SOUCCAR, 2002).

Em concentrações elevadas (75% ou mais), o álcool induz uma proporção significativa de úlceras independentes da secreção gástrica. O ácido acetilsalicílico ou a indometacina (antiinflamatórios não esteroideais) induzem lesões gástricas através da inibição da biossíntese de prostaglandinas (PGE_2). Já o modelo de úlcera por estresse envolve mecanismos nervosos centrais, principalmente hipotalâmicos (GLAVIN; SZABO, 1992). Como os agentes indutores de úlcera exercem ação lesiva por diferentes mecanismos, é conveniente estudar a ação antiúlcera da substância teste em todos estes modelos. O protocolo experimental também deve considerar o uso de um controle positivo. Esses modelos fornecem maior informação quando são simultaneamente determinados alguns parâmetros complementares à avaliação do processo ulcerativo. São particularmente importantes a medida da concentração de muco, dos grupos sulfidrílicos não protéicos, da secreção de prostaglandinas da mucosa gástrica e da atividade das enzimas citoplasmáticas liberadas no processo de lesão celular, como lactato desidrogenase e fosfatase alcalina (SOUCCAR, 2002).

Modelos experimentais de medida da secreção ácida gástrica também devem ser utilizados. Os modelos *in vivo* não fornecem informações conclusivas quanto aos

complexos mecanismos celulares envolvidos, por isso a complementação da avaliação da atividade na secreção ácida gástrica com testes *in vitro* permite um estudo mais específico destes mecanismos (SOUCCAR, 2002).

A ação antiulcerogênica dos extratos etanólico e hidroalcoólico 75% das folhas de *C. sylvestris* foi avaliada através dos ensaios de lesão gástrica aguda produzida por estresse e por álcool, e de lesão gástrica crônica provocada por ácido acético. Estes resultados, juntamente com os das medidas de parâmetros de secreção gástrica, demonstraram que o extrato protegeu a mucosa do estômago sem modificar o pH gástrico (BASILE et al., 1990; FAPESP; UNESP; USP, 2003; SERTIÈ; CARVALHO; PANIZZA, 2000).

No trabalho de colaboração entre pesquisadores do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) do Instituto de Química de Araraquara-UNESP com o Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP, o extrato etanólico das folhas e uma fração padronizada reduziram em até 100% o número de lesões quando administrados por via oral, 57,5 e 3,5 mg/kg de peso corporal (ratos), respectivamente, o que representou resultado surpreendente (FAPESP; UNESP; USP, 2003). A análise em CLAE-DAD demonstrou a existência na fração ativa padronizada de 5 picos majoritários, todos com espectros no UV característicos das casearinas ($\lambda_{\text{máx}} = 235 \text{ nm}$). O espectro de RMN ^1H da fração também apresentou os sinais característicos das casearinas (SANTOS, 2001). Portanto, estes resultados indicaram que as casearinas poderiam ser os princípios ativos com ação citoprotetora. Mais recentemente, foi verificada a redução no número de lesões gástricas agudas produzidas por etanol e AAS em ratos com a administração de infusão das folhas de *C. sylvestris* (HEINEN et al., 2006). Isto sugere que casearinas poderiam ser extraídas com água quente, mesmo que em pequena quantidade, e/ou que existem outros componentes mais polares com ação antiulcerogênica no extrato aquoso.

Os dados da literatura indicam que a utilização do extrato etanólico ou hidroalcoólico 75% de folhas de *C. sylvestris* como fitoterápico antiulcerogênico pode apresentar algumas vantagens do ponto de vista farmacológico, como:

a) Elevada margem de segurança do extrato hidroalcoólico administrado via oral: $DL_{50} (>1.840,0 \text{ mg/Kg})$ pelo menos 32 vezes maior que a $DE_{50} (57,5 \text{ mg/kg de peso corporal})$ (BASILE et al, 1990);

- b) Os extratos etanólicos e hidroalcoólicos não modificam o pH do suco gástrico, diferentemente do observado com drogas bloqueadoras dos receptores H₂, por exemplo a cimetidina, e com drogas bloqueadoras dos receptores M₃, por exemplo a piranzepina; este é um fator importante para a digestão e absorção de proteínas e na prevenção de infecções oportunistas;
- c) Os extratos etanólicos e hidroalcoólicos agiram em modelos de indução por estresse ou etanol em úlceras leves, moderadas e graves, semelhantemente às drogas bloqueadoras dos receptores H₂, enquanto que as drogas citoprotetoras, por exemplo o misoprostol, somente agem em úlceras de maior gravidade (BASILE et al., 1990; FAPESP; UNESP; USP, 2003; SERTIÈ et al., 2000);
- d) Em úlceras crônicas, induzidas por ácido acético, o extrato hidroalcoólico, à semelhança das drogas citoprotetoras já existentes, apresentou velocidade de cicatrização maior que a observada com drogas bloqueadoras dos receptores H₂ (BASILE et al., 1990).
- e) São necessárias apenas pequenas doses da fração padronizada para atingir a redução em 100% da área de lesão sem causar efeitos colaterais aparentes (FAPESP; UNESP; USP, 2003).
- f) Os extratos etanólico e hidroalcoólico e a fração padronizada não produziram contração na musculatura uterina, sendo destituídas de atividade abortiva, ao contrário do misoprostol (ver item 2.5.6).

3.4.1.5. ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS

O óleo essencial das folhas de *C. sylvestris* apresentou atividades antimicrobiana (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermitis*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Salmonella* e *Micrococcus*), antiinflamatória e antiulcerogênica (ESTEVES et al., 2005; SCHNEIDER et al., 2006). A sua administração em células HTC induziu dano no DNA (efeito mutagênico) e, de outro lado, quando associado a um agente mutagênico reduziu o número de células com aberrações (SCHNEIDER et al., 2007).

Os componentes do óleo essencial podem estar presentes em extratos, incluindo os preparados com solventes orgânicos e mesmo em extratos aquosos. Portanto, estas substâncias podem ser parcialmente responsáveis por atividades exibidas pelos extratos. Informações sobre a composição química do óleo essencial das folhas de *C. sylvestris* são encontradas no item 2.4 e Tabela 4.

3.4.1.6. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

Ensaio toxicológicos demonstraram a baixa toxicidade dos extratos de folhas de *C. sylvestris*. Em avaliações da toxicidade aguda, o extrato hidroalcoólico 75% administrado via oral apresentou $DL_{50} > 1.840,0$ mg/Kg de peso corporal em ratos (BASILE et al., 1990), o extrato aquoso e o óleo essencial de folhas apresentaram $DL_{50} = 1.792,0$ mg/Kg (SILVA et al., 1988) e $DL_{50} = 1.100,0$ mg/Kg (ESTEVES et al., 2005) de peso corporal em camundongos, via intraperitoneal e oral, respectivamente. Para a atividade antiulcerogênica observada com o extrato hidroalcoólico 75%, a DL_{50} foi 32 vezes maior do que a DE_{50} (via oral), obtendo-se um bom *índice terapêutico*.

Animais submetidos ao teste de toxicidade subcrônica (30 dias, via oral) não apresentaram alterações no consumo de água ou alimento, não ganharam peso, além de não terem sido observados efeitos adversos (diarréia, piloereção, atividade estereotípica, convulsões ou sonolência), nem alterações macroscópicas no fígado, rins ou baço (BASILE et al., 1990).

O extrato hidroalcoólico 75% também não apresentou ação genotóxica ou potencializadora do dano produzido no DNA por agentes alquilantes (ciclofosfamida

e metilmetanossulfonato) em células HTC e V79 (MAISTRO; CARVALHO; MANTOVANI, 2004).

O uso popular de *C. sylvestris* como abortivo no sul do Brasil estimulou sua investigação toxicológica. Dados de um estudo da ação de *C. sylvestris* sobre propriedades do útero de rata (tônus basal, frequência, amplitude e força de contração) sugerem que os extratos aquoso e etanólico de folhas são capazes de modificar a atividade uterina estimulando ou inibindo estas propriedades de forma diferente. As modificações mais significativas foram notadas para o extrato aquoso. Além disso, este potencializou a ação da ocitocina, enquanto o extrato etanólico inibiu parcialmente sua ação (SILVA et al., 1988). Oliveira et al. (1985) administraram extrato aquoso de folhas por período prolongado em ratas virgens e os resultados das análises citológicas de vagina também sugerem sua ação hormonal. De outro lado, estudos toxicológicos com extrato etanólico não evidenciaram ação abortiva nem induziram má formação óssea na prole de fêmeas tratadas durante a fase de gestação (FAPESP; UNESP; USP, 2003).

Estes resultados fitoquímicos e farmacológicos obtidos até o momento sugerem relações entre atividades biológicas e os diterpenos clerodânicos presentes em *C. sylvestris*. Trabalhos usando fracionamento biomonitorado mostraram serem estes os responsáveis pelas atividades citotóxica (casearinas e casearvestrinas), tripanossomicida (diterpeno 7) e, possivelmente, antiulcerogênica (fração padronizada de casearinas). Outro fato interessante é a distribuição em diversos órgãos de *C. sylvestris*, tanto das atividades biológicas quanto destes diterpenos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ESPECIFICAÇÕES DOS MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Balança analítica: Mettler® Toledo modelo AG245 (máx. 210 g; d = 0,1 mg).

Balança semi-analítica: Gehaka®, modelo BG2000 (máx. 2.020 g; mín. 0,50 g; d = 0,01 g).

Colunas cromatográficas de bancada:

- coluna de vidro com 19 cm d.i., com saída para sistema de sucção ("vácuo");
- coluna de vidro com 7,5 cm d.i. com saída para sistema de sucção ("vácuo")
- coluna de vidro com 5 cm d.i. com saída para sistema de sucção ("vácuo").
- coluna de vidro com 4 cm d.i., com entrada para ar comprimido;
- coluna de vidro com 3 cm d.i., com entrada para ar comprimido;
- coluna de vidro com 2,3 cm d.i.;
- coluna de vidro com 2 cm d.i.;
- coluna de vidro com 1 cm d.i.;

Colunas cromatográficas CLAE:

- Phenomenex® fenil-hexil, 250 x 4,6 mm, 5 µm
- Phenomenex® Luna C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm
- Phenomenex® Luna C-18, 250 x 21,2 mm, 10 µm
- Shimadzu® C-18, 250 x 50,0 mm, 12 µm

Coluna cromatográfica CG: DB-5, 5%-difenil-95%-dimetilpolisiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)

Cromatografia em camada delgada comparativa: sílica gel 60PF-254 (Merck®) suspendida em água destilada na proporção 1:2 (m/v) foi aplicada em placas de vidro de 10 ou 20 x 20 cm, obtendo-se 0,25 mm (CCDC) de espessura. Espalhador "Quickfit". Após preparo, as placas foram mantidas em repouso por 4h e ativadas por 1h em estufa a 110 °C.

Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas: Shimadzu® modelo QP2010.

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 1 (Varian[®], modo analítico): bomba ProStar[®] 240, detector de arranjo de diodos ProStar[®] 330, injetor automático ProStar[®] 410, programa gerenciador do cromatógrafo e de dados Star Chromatography Workstation[®].

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 2 (Varian[®], modo analítico): bomba ProStar[®] 230, detector UV/Vis ProStar[®] 310, programa gerenciador do cromatógrafo e de dados Star Integrator[®].

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 3 (Varian[®], modo preparativo): bomba Dynamax[®] SD-1, detector UV/Vis ProStar[®] 320, programa gerenciador do cromatógrafo e de dados Star Integrator[®].

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 4 (Shimadzu[®], modos analítico e preparativo): bomba LC-8 A, com sistema de controle SCL-10Avp, detector UV/Vis (2 comprimentos de onda simultâneos) SPD-M10Avp, programa gerenciador do cromatógrafo e de dados Class-VP versão 6.1.

Estufa de secagem de material de laboratório: Marconi[®] modelo MA 033/3.

Estufa de secagem de material vegetal sem circulação de ar.

Espectrofotômetro no IV: Perkin-Elmer[®] FTIR 1600

Espectrofotômetro no UV-Vis: Cary[®] 13E

Espectrômetro de massas: UltrOTOFG Bruker[®] (Daltonics, Billerica, MA)

Espectrômetros de ressonância magnética nuclear:

- a) Espectrômetro Bruker[®] AC-200F 4,7 T operando a 200 MHz para ¹H e a 50 MHz para ¹³C;
- b) Espectrômetro Varian[®] INOVA 11,4 T operando a 500 MHz para ¹H e a 125 MHz para ¹³C.

Extrator¹ - características: capacidade para 300 L; sistema de pressurização para circulação do solvente; tanque extrator com cesto para o material vegetal e tanque

¹ Equipamento pertencente à empresa Núcleo de Pesquisas Aplicadas – NPA (Jaboticabal-SP).

reservatório de solvente em aço inox, interligados; sistema de aquecimento com de linha de vapor.

Fases estacionárias para cromatografia em coluna:

- a) **sílica:** 0,060-0,200 mm; diâmetro do poro: 6nm; marca: Acros Organics[®] Bélgica (reembalado por Ultra Chem[®] Ind. e Com. de Prod. Químicos Ltda); 0,035-0,070mm; diâmetro do poro: 6nm; marca: Acros Organics[®] Bélgica (reembalado por Ultra Chem[®] Ind. e Com. de Prod. Químicos Ltda);
- b) **carvão ativado em pó:** LABSYNTH[®] Produtos para Laboratórios Ltda;
- c) **sílica C-18:** 0,040-0,060mm; marca: LiChroprep[®] RP-18 (Merck[®])

Moinho de facas: Marconi[®] modelo MA680.

Polarímetro digital: Jasco[®] 1020; medidas realizadas em 546 e 579 nm (filtro de Na).

Rota evaporador: Büchi[®] modelo R-114 RE, com banho termostatizado (aquecimento) Büchi[®] modelo B-480, banho ultratermostatizado (refrigeração) Marconi[®] modelo MA184 e sistema de “vácuo” Büchi[®] modelo V-500 com condensador secundário.

Solventes:

- a) **CCDC, CC, EFS:** solventes grau P.A., adquiridos no mercado e destilados no Instituto de Química da UNESP;
- b) **Análises por CLAE (incluindo pré-tratamento da amostra):** solventes grau cromatográfico;
- c) **Água:** tratada por osmose reversa e deionizada (laboratório NuBBE 1);
- d) **Análises de RMN:** solventes deuterados (CDCl₃, DMSO-d₆ e piridina-d₅).

Ultrassom: ELMA[®], modelo TRANSSONIC 700, frequência: 35KHz.

4.2. DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MÉTODO DE PURIFICAÇÃO DE CASEARINAS

4.2.1. OBTENÇÃO E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

Foram realizadas 3 coletas em 2 áreas distintas:

- a) Parque Estadual "Carlos Botelho" em São Miguel Arcanjo-SP: 13/03 e 09/07/2004, período da tarde. Indivíduos: AGS04 (S 24°03'28", O 47°58'53"), AGS05 (S 24°03'28", O 47°58'53"), AGS06 (S 24°03'26", O 47°58'51"), AGS07 (S 24°03'26", O 47°58'51"), AGS13 (S 24°03'26", O 47°58'51") e AGS19 (S 24°03'26", O 47°58'51");
- b) Sítio do Gagg em Presidente Venceslau-SP: 22/07/2004, período da tarde. Indivíduos: AJCV1 E AJCV2.

Exsicatas dos espécimens foram depositadas no herbário "Maria Eneida P. Kaufmann" do Instituto Botânico do Estado de São Paulo. Características morfológicas como porte arbóreo, tamanho e coloração das folhas sugerem que estes indivíduos pertencem a var. *sylvestris*.

Trabalho desenvolvido por BANDEIRA (2004) demonstrou que o uso de técnicas de estabilização previamente à secagem não interferiram no teor de casearinas nos extratos obtidos de folhas. Da mesma maneira, a secagem realizada à sombra ou em estufa à 40° também não produziu diferenças no teor destas substâncias. Desta forma, a secagem do material vegetal foi realizada de forma mista: à temperatura ambiente e em estufa à 40 °C, em média por 7 dias. A fragmentação do material foi realizada em moinho de facas.

4.2.2. EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

A droga vegetal (20,5 Kg) foi submetida à extração com EtOH por maceração, à 40°C ou à temperatura ambiente, com ou sem circulação de solvente, segundo as condições da Tabela 5. O extrato EtOH líquido (cerca de 200 L) foi filtrado em algodão, concentrado em evaporador rotativo, seco em capela e armazenado sob refrigeração em frasco bem fechado. Previamente aos fracionamentos, análises e

testes farmacológicos, o extrato foi ainda submetido à secagem em dessecador sob vácuo contendo sílica gel.

Tabela 5: Condições utilizadas no processo de extração e informações sobre o extrato líquido.

Etapa de extração	Condições de extração				Informações do extrato	
	Volume de solvente	Temperatura	Circulação de solvente	Tempo	Aspecto	Concentração ¹
1	100 L	40 °C	Sim	5 h	Escuro	12 mg/mL
2	20 L	Ambiente	Não	15 h	Claro (2+3)	4 mg/mL (2+3)
3	80 L	40 °C	Sim	3 h		

¹ massa de extrato seco por volume de etanol no extrato líquido, calculada através de obtenção de resíduo por evaporação.

Calculou-se a massa obtida de extrato seco com base no ensaio de perda por dessecação do extrato concentrado (estufa à 40°C e dessecador sob vácuo), com 3 alíquotas de cerca de 1,0 g, realizando-se pesagens até obter-se massa constante.

4.2.2.1. ANÁLISES DO EXTRATO EtOH PARA DETECÇÃO DE CASEARINAS

a) CLAE-DAD

O pré-tratamento das amostras (extrato 1 e extrato 2+3, Tabela 5) incluiu uma EFS com sílica de fase reversa (C-18 Merck[®]; 2 x 1 cm x 40-63 µm) usando como eluente MeOH/H₂O (98:02, v/v, 5,0 mL), seguida de filtração em membrana (0,22 µm, PVDF Millipore[®]), secagem e ressolubilização em MeOH. As análises foram desenvolvidas no CLAE 1 utilizando coluna de fase reversa (fenil-hexil Phenomenex[®], 250 x 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de 48-100% MeOH/H₂O (v/v) em 80 min, mais MeOH por 5 min, com fluxo de 0,8 mL/min, V_{inj} = 10 µL e faixa de detecção entre 190-400 nm ($\lambda_{\text{cromatogramas}} = 235 \text{ nm}$) (TININIS, 2006). Concentrações: 1^a ext. = 4,6 mg/mL, 2^a ext. = 1,3 mg/mL e 3^a ext. = 4,9 mg/mL (MeOH).

A identificação de casearinas no extrato EtOH baseou-se na comparação dos t_r e sobreposição dos espectros de absorção no UV com os observados para a fração 3^a ext. (Figura 10).

² fração de casearinas obtida em nosso laboratório que apresentou atividade antiulcerogênica (FAPESP; UNESP; USP, 2003; SANTOS, 2001).

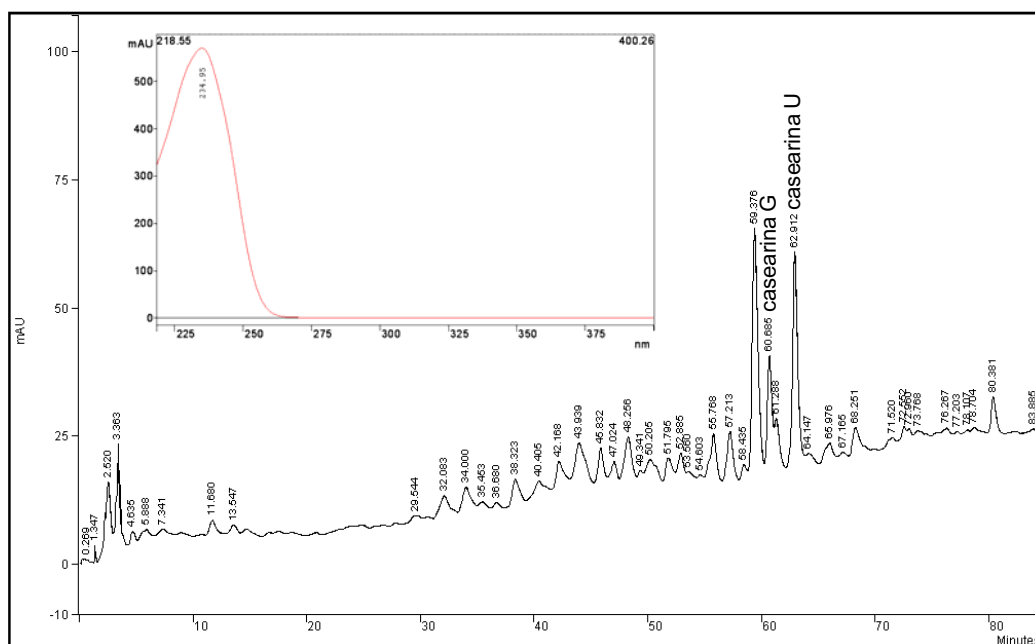


Figura 10: Cromatograma da fração 32CSB e espectro no UV da casearina U. Condições de análise descritas acima (item 1.2.1(a)).

b) RMN de ^1H

Os experimentos de RMN de ^1H foram realizados num espectrômetro Bruker[®] AC200-F (4,7 T), usando CDCl_3 como solvente e CHCl_3 como padrão interno; concentração do extrato EtOH: 50 mg/mL. Para a detecção de casearinas foi considerada a presença dos sinais de ^1H típicos destas substâncias em CDCl_3 (CARVALHO et al., 1998; ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; SANTOS, 2001): δ 2,16-2,46 *dd* (H-10); 5,08-5,38 *d* (H-12); 6,50-6,70 *dd* (H-14); 5,10-5,17 *d* (H-15_a); 5,11-5,24 *d* (H-15_b); 6,34 *s* ou 6,85 *d* ou 5,55-6,74 *t* (H-18); 6,41-6,68 *s* (H-19); 3,37-3,88 *s* (OMe); 1,84-2,10 *s* (OAc).

4.2.3. FRACIONAMENTO DO EXTRATO EtOH (etapas extrativas 1+2+3) ATRAVÉS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

4.2.3.1. EFS-teste

15,1 g de extrato seco foram misturados com a fase estacionária (1:1, m/m) e aplicados em coluna de vidro contendo sílica gel (60-200 μm) e carvão ativo em pó na proporção 1:1 (m:m) (20 x 5 cm, 150,0 g). A eluição (V_{eluate} : 900,0 mL) foi realizada sob vácuo como segue: 1. Hex/AcOEt 7:3 (frações: EFS-teste1.1 e 1.2); 2. 3:7 (frações: EFS-teste2.1, 2.2, 2.3 e 2.4); 3. AcOEt (frações: EFS-teste3.1, 3.2 e 3.3); 4. MeOH (frações: EFS-teste4.1 e 4.2); 5. Tolueno (fração: EFS-teste5).

4.2.3.2. EFS EM MAIOR ESCALA

A EFS em maior escala (EFS) foi realizada em 2 etapas: EFS(A) e EFS(B). Foram aplicados 212,6 e 250,0 g de extrato seco (total = 462,2 g), respectivamente. O extrato foi misturado com a fase estacionária (1:1, m/m) e aplicado em coluna de vidro contendo sílica gel (60-200 μm) e carvão ativo em pó na proporção 1:1 (m/m) (20 x 19 cm, 2.600,0 g). A eluição (V_{eluate} = 12.000,0 mL) foi realizada sob vácuo como segue*: 1. Hex/AcOEt 95:05 (fração EFS1); 2. AcOEt (fração EFS2); 3. MeOH (fração EFS3).

*em EFS(A) as frações foram coletadas como 1.0 e 1.1 (Hex/AcOEt 95:05, 6.000,0 mL cada), 2.0 e 2.1 (AcOEt, 6.000,0 mL cada) e 3 (MeOH, 12.000,0 mL), para fins de análise e confirmação da eficiência na obtenção da fração de casearinas.

4.2.3.3. ANÁLISES DAS FRAÇÕES EFS-teste e EFS

a) CCDC

A CCDC das frações EFS-teste (5,0-10,0 mg/mL, AcOEt) foi desenvolvida em placas de vidro cobertas com sílica gel G60 Merck® (20 x 20 cm x 0,25 mm), utilizando como FM HEX/AcOEt/i-PrOH (2:1:0,15, v/v/v, 200,0 mL) e anisaldeído sulfúrico como revelador. Distância total de eluição (D): 18 cm.

A CCDC das frações EFS (3,0-4,0 mg/mL, AcOEt) foi desenvolvida em placas de vidro cobertas com sílica gel G60 Merck® (20 x 20 cm x 0,25 mm), utilizando

como FM HEX/AcOEt/i-PrOH (70:28:02, v/v/v, 200,0 mL) e anisaldeído sulfúrico como revelador. D: 9 cm. Padrão: fração 32CSB (2,9 mg/mL, AcOEt).

b) CLAE-UV

O pré-tratamento das amostras foi idêntico ao descrito no item 4.2.2.1(a).

As frações EFS-teste (1,0 mg/mL, MeOH) foram analisadas em CLAE-DAD segundo as mesmas condições utilizadas para o extrato EtOH (item 4.2.2.1(a)).

As análises das frações EFS(B) (EFS(B)1: 2,0 mg/mL; EFS(B) 2: 3,0 mg/mL; EFS(B)3: 4,0 mg/mL; MeOH) foram desenvolvidas no CLAE 2 utilizando coluna de fase reversa (C-18 Phenomenex® Luna, 250 x 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de 5-100% MeOH/H₂O (v/v) em 40 min, mais MeOH por 5 min, com fluxo de 1,0 mL/min, $V_{inj} = 20 \mu\text{L}$ e detecção a 254 nm.

c) RMN de ¹H

Os experimentos de RMN de ¹H foram realizados num espectrômetro Bruker® AC200-F (4,7 T), usando CDCl₃ como solvente e CHCl₃ como padrão interno (EFS-teste1.1, 1.2, 2.1, 3.1 e 4.1; EFS(A)1.0, 1.1, 2.0 e 2.1) ou DMSO-d₆ e DMSO, respectivamente (EFS(A)3). Frações EFS-teste – 17 mg/mL e EFS - 30 mg/mL. A detecção de casearinas foi realizada de forma idêntica ao descrito no item 4.2.2.1(b).

4.2.4. FRACIONAMENTO POR CC DE FASE NORMAL DA FRAÇÃO EFS2

4.2.4.1. FRACIONAMENTO DE EFS2 POR CC EM PEQUENA ESCALA -FACT1

1,03 g de EFS(B)2 foram misturados com a fase estacionária (1:3, m/m) e aplicados em coluna de vidro contendo sílica gel (16 x 3 cm; 35-70 µm/poro: 6 nm). A eluição ($V_{eluyente} = 400,0 \text{ mL}$) foi realizada sob pressão como segue: 1. Hex/AcOEt 78:22 (frações V_m e 1-8FACT1); 2. 75:25 (frações 9-16FACT1); 3. 70:30 (frações 17-24FACT1); 4. 60:40 (frações 25-32FACT1); 5. AcOEt (frações 33-37FACT1); 6. AcOEt /MeOH 1:1 (fração 38FACT1).

*volume de coleta das frações: $V_m = 100,0 \text{ mL}$; 1-36FACT1 = 50,0 mL; 37 e 38FACT1 = 200,0 mL

4.2.4.2. FRACIONAMENTO DE EFS2 POR CC EM PEQUENA ESCALA - FACT2

1,50 g de EFS(B)2 foram solubilizados no eluente inicial (5,0 mL) e aplicados em coluna de vidro contendo sílica gel (25 x 4 cm; 35-70 μ m/poro: 6 nm). A eluição ($V_{\text{eluente}} = 700,0$ mL; exceto eluente 1 = 300,0 mL) foi realizada sob pressão como segue: 1. Hex/AcOEt 90:10 (fração V_m); 2. Hex/AcOEt/i-PrOH 78:20,5:1,5 (frações 1-12FACT2); 3. 75:23,3:1,7 (frações 13-27FACT2); 4. 70:28:2 (frações 28-39FACT2); 5. 60:37,3:2,7 (frações 40-52FACT2); 6. AcOEt/i-PrOH 93:7 (frações 53-62FACT2); 7. AcOEt /MeOH 1:1 (frações 63-67FACT2).

*volume de coleta das frações: V_m e 67FACT2 = 300,0 mL; 1-2 e 59-66FACT2 = 100,0 mL; 3-58FACT2 = 50,0 mL.

4.2.4.3. FRACIONAMENTO DE EFS2 POR CC EM MAIOR ESCALA - FA

16,0 g de EFS(A)2 foram solubilizados no eluente inicial e aplicados em coluna de vidro contendo sílica gel (20 x 7,5 cm; 35-70 μ m/poro: 6 nm; 470,0 g). A eluição ($V_{\text{eluente}} = 1.800,0$ mL) foi realizada sob vácuo como segue: 1. Hex/AcOEt/i-PrOH 85:14:01 (V_m , frações 1-3FA); 2. 78:20,5:1,5 (frações 4-12FA); 3. 76:22,4:1,6 (frações 13-20FA); 4. 73:25,2:1,8 (frações 21-28FA); 5. 68:29,9:2,1 (frações 29-37FA); 6. 60:37,2:2,7 (frações 38-45FA); 7. AcOEt /MeOH 1:1 (fração 46FA).

*volume de coleta das frações: 1-2FA = 800,0 mL; 3FA = 600,0 mL; V_m e 4-45FA = 200,0 mL; 46FA = 1800, 0 mL.

4.2.4.4. ANÁLISES DAS FRAÇÕES FACT1, FACT2 E FA

a) CCDC

As frações FACT1 e FACT2 foram submetidas a análises por CCDC para avaliação da separação e comparação dos perfis cromatográficos e, em seguida, reunidas. As condições de análise final das frações reunidas são descritas a seguir.

As análises por CCDC das frações FACT1 (AcOEt) foram desenvolvidas em placas de vidro cobertas com sílica gel G60 Merck® (10 ou 20 x 20 cm x 0,25 mm), utilizando como FM HEX/AcOEt/i-PrOH (70:28:02, v/v/v, 200,0 mL) e anisaldeído sulfúrico como revelador. D: 17 cm.

As análises por CCDC das frações FACT2 (AcOEt ou MeOH) foram desenvolvidas em placas de vidro cobertas com sílica gel G60 Merck® (20 x 20 cm x 0,25 mm), utilizando como FM HEX/AcOEt/i-PrOH (70:28:02, v/v/v, 200,0 mL) – frações 1-49FACT2 – ou HEX/AcOEt/i-PrOH (45:50:05, v/v/v, 200,0 mL) – frações 18-58FACT2 - e anisaldeído sulfúrico como revelador. D: 17 cm.

No caso das frações FA, apenas as alíquotas separadas para CCDC (cerca de 4 mg) foram reunidas após a análise das cromatoplasas. O desenvolvimento da CCDC (amostras: 4,0 mg/mL, AcOEt) foi realizado em placas de vidro cobertas com sílica gel G60 Merck® (10 x 20 cm x 0,25 mm), utilizando como FM HEX/AcOEt/i-PrOH (60:36:04, v/v/v, 200,0 mL) e anisaldeído sulfúrico como revelador. D: 17 cm.

b) CLAE

O pré-tratamento das amostras FACT2 e FA foi idêntico ao descrito no item 4.2.2.1(a).

As análises das frações FACT2 (1,0 mg/mL, MeOH) foram realizadas no CLAE 2 utilizando coluna de fase reversa (C-18 Phenomenex® luna, 250 x 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de 5-100% MeOH/H₂O (v/v) em 40 min, mais MeOH por 5 min, com fluxo de 1,0 mL/min, $V_{inj} = 10 \mu\text{L}$ e detecção a 235 nm.

As análises das frações FA (1,0-1,5 mg/mL, MeOH/H₂O 98:02, v/v) foram desenvolvidas no CLAE 1 utilizando coluna de fase reversa (C-18 Phenomenex® luna, 250 x 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de 65-100% MeOH/H₂O (v/v) em 60 min, mais MeOH por 5 min, com fluxo de 1,0 mL/min, $V_{inj} = 10 \mu\text{L}$ e faixa de detecção entre 210-400 nm ($\lambda_{\text{cromatogramas}} = 235 \text{ nm}$).

4.2.5. ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS A PARTIR DE FRAÇÕES OBTIDAS POR CC (FACT2 e FA) COM O EMPREGO DE CLAEprep DE FASE REVERSA

Algumas frações FACT2 e FA com composição simples (CCDC e CLAE-UV) foram submetidas à separação por CLAEprep. As informações obtidas de gradientes exploratórios (sob as mesmas condições usadas para frações FACT2, descritas no item 4.2.4.4(b)) e de subseqüentes análises em condições isocráticas em CLAE-UV serviram de base para o estabelecimento da condição mais satisfatória para o escalonamento para CLAEprep. As frações selecionadas e as condições de separação em CLAEprep são apresentadas na Tabela 6. As sub-frações

15FACT2(G) e 20-22FA3 obtidas do fracionamento de 15FACT2 e 20-22FA, respectivamente, foram repurificadas em CLAEprep e as condições também são apresentadas na Tabela 6. As frações obtidas e suas respectivas condições de análise (CLAE-UV) encontram-se na Tabela 7.

As condições analíticas foram escalonadas considerando-se mesmo comprimento de coluna, tipo de FE, comprimento de onda de detecção e FM com pequena diminuição na força de eluição no modo *normal* e pequeno aumento no modo *reciclante*. O fluxo foi calculado com base na relação:

$$F_p = (F_{an} \times d_p^2) / d_{an}^2$$

Onde:

F_p – fluxo no modo preparativo; F_{an} - fluxo no modo analítico;

d_p – d.i. coluna preparativa; d_{an} - d.i. coluna analítica

Tabela 6: Condições de separação em CLAEprep (modo isocrático) de frações FACT2 e FA.

Fração concentração (m _{total}) ¹	Coluna ²	Fase Móvel	Fluxo (mL/min)	λ (nm)	V _{inj} (n° injeções)	Cromat. líquido
15FACT2 52,4 mg/mL (314,4 mg) pré-tratamento ³ a+b	A	75% MeOH (45 min)	15,0	254	1 mL (6)	CLAE 3
15FACT2(G) 35,0 mg/mL (70,0 mg) pré-tratamento b	A	75% MeOH (50 min)	15,0	254	1 mL (2)	CLAE 3
8FA 54,3 mg/mL (543,0 mg) pré-tratamento a+b	A	73% MeOH (50 min)	15,0	254	1 mL (10)	CLAE 3
9FA 60,3 mg/mL (723,6 mg) pré-tratamento a+b	A	73% MeOH (50 min)	15,0	254	1 mL (12)	CLAE 3
10FA 18,9 mg/mL (719,4 mg) pré-tratamento a+b	B	72% MeOH (70 min)	80,0	235	~19 mL (2)	CLAE 4
11FA 15,2 mg/mL (578,5 mg) pré-tratamento a+b	B	72% MeOH (70 min)	80,0	235	~19 mL (2)	CLAE 4
15FA 29,9 mg/mL (598,0 mg) pré-tratamento a+b	B	75% MeOH (110 min), <i>modo reciclante</i>	80,0	235 254	10 mL (2)	CLAE 4
16FA 12,7 mg/mL (763,7 mg) pré-tratamento a+b	B	67% MeOH (95 min)	80,0	235 254	15 mL (4)	CLAE 4
17FA 8,1 mg/mL (606,7 mg) pré-tratamento a+b	B	75% MeOH (90 min), <i>modo reciclante</i>	80,0	235 245	~19 mL (4)	CLAE 4
18+19FA 36,2 mg/mL (688,1 mg) pré-tratamento a+b	B	75% MeOH (120 min), <i>modo reciclante</i>	80,0	235 245	~19 mL (1)	CLAE 4
20-22FA 32,0 mg/mL (480,0 mg) pré-tratamento a+b	B	69% MeOH (70 min)	80,0	235 254	5 mL (3)	CLAE 4
20-22FA3 31,1 mg/mL (124,4 mg) pré-tratamento b	B	75% MeOH (50 min), <i>modo reciclante</i>	80,0	235 254	4 mL (1)	CLAE 4
31.1FA^{3c} 3,1 mg/mL (188,0 mg) pré-tratamento c+b	A	68% MeOH (40 min)	14,0	245	~8,5 mL (7)	CLAE 3
31.2FA 3,3 mg/mL (234,0 mg) pré-tratamento c+b	A	71% MeOH (40 min)	14,0	245	~8,5 mL (8)	CLAE 3
31.3+31.4FA 10,3 mg/mL (195,4 mg) pré-tratamento C+B	B	70% MeOH (70 min)	80,0	235 245	~19 mL (1)	CLAE 4

¹ amostras solubilizadas em proporção de MeOH/H₂O similar à FM.

² **Colunas cromatográficas:** **A:** Phenomenex® Luna C-18 (250 x 21,2 mm, 10 μm); **B:** Shimadzu® C-18 (250 x 50,0 mm, 12 μm).

³ **Pré-tratamento da amostra:**

a. EFS: coluna de vidro preenchida com sílica C-18 (2 x 2 cm, 40-63μm); eluição sob pressão com MeOH/H₂O (98:02, v/v, 25,0 mL);

b. Filtração em membrana (PVDF) com poro de 0,22 μm;

c. (31FA): com o objetivo de eliminar interferentes apolares, a fração 31FA (680,0 mg) foi submetida a uma etapa de pré-tratamento por EFS utilizando eluentes com menor força de eluição: coluna de vidro C-18 (2 x 4 cm, 40-60 μm); eluentes: MeOH/H₂O 7:3 - frações obtidas: 31.1FA e 31.2FA e MeOH/H₂O 8:2 - frações 31.3 e 31.4FA (V_{eluyente} = 50,0 mL; V_{coleta de frações} = 25,0 mL).

Tabela 7: Condições de análise em CLAE-UV de frações obtidas da separação por CLAEprep.

Frações (concentração) ¹	Fase Móvel	Fluxo (mL/min)	λ (nm)	V _{inj} (μ L)	Cromat. líquido ²
15FACT2(B), (BC), (C), (D), (F), (G) (1,0 mg/mL)	77% MeOH (45min)	0,7	235	15	CLAE 1
15FACT2(G)repur (1,09mg/mL)	75% MeOH (50 min)	0,7	235	10	CLAE 1
8FA1 e 2; 9FA1 e 2 (1,0 mg/mL)	75% MeOH (70 min)	0,7	235	10	CLAE 1
10FA1, 2, 3 e 4; 11FA1, 3 e 4 (1,0 mg/mL)	75% MeOH (70 min)	0,7	235	40	CLAE 4
15FA1 e 2; 16FA1 e 2, R1FAprep1 e 2³ (1,0 mg/mL)	71% MeOH (60 min)	0,7	235	10	CLAE 4
17FA1 e 2; 18+19FA1 e 2; 31.1FAzero⁴, 1, 2, 3 e 4; 31.2FA1, 1', 2 e 3; 31.3+31.4FA1, 2, 3 e 4 (1,0 mg/mL)	72% MeOH (70 min) + 100% MeOH (10 min)	0,7	235	20	CLAE 1
20-22FA1, 20-22FA2, 20-22FA3 (1,0 mg/mL)	65-100% MeOH (60 min) + 100% MeOH (5 min)	1,0	235	10	CLAE 1
31.1FAzero⁴ (1,0 mg/mL)	60% MeOH (17 min)	0,7	235	20	CLAE 1

¹todas as amostras foram filtradas (PVDF, 0,22 μ m) e solubilizadas em MeOH.

²coluna: Phenomenex[®] Luna C-18 (250 x 4,6 mm x 5 μ m).

³R1FAprep1 e R1FAprep2 foram obtidas a partir de 20-22FA3 por CLAEprep.

⁴31.1FAzero foi analisada em 2 condições (72 e 60% MeOH).

Algumas sub-frações foram submetidas a co-injeções (CLAE-UV) e as condições cromatográficas encontram-se descritas nos cromatogramas dos Anexos 22 a 24.

4.3. TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS UTILIZADAS NA DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS PURIFICADAS E DO DERIVADO OBTIDO

Os espectros de RMN unidimensionais e os mapas de contorno bidimensionais foram obtidos a 500 MHz para ¹H e a 125 MHz para ¹³C em um espectrômetro Varian[®] INOVA 500 (11,7 T), operando com gradiente de pulso; utilizou-se piridina-d₅ como solvente e piridina como referência interna. Os espectros no IV foram obtidos em disco de KBr num espectrofotômetro Perkin Elmer[®] FTIR 1600. Os espectros no UV foram obtidos (MeOH) num espectrofotômetro Cary[®] 13E ou a partir das análises cromatográficas utilizando-se o CLAE 1, equipado com detetor de arranjo de diodos, em proporção de MeOH/H₂O conforme fase móvel utilizada (concentrações das amostras e V_{inj} indicadas nas respectivas condições de

análise em CLAE). Os espectros de massa de alta resolução (amostras: 1,0 mg/mL, MeOH) foram obtidos no modo positivo num espectrômetro UltrOTOFO_Q (Bruker[®] Daltonics, Billerica, MA). As medidas de rotação óptica específica (amostras: 1,0 mg/mL, MeOH) foram obtidas em polarímetro Jasco[®] 1020.

4.4. HIDRÓLISE BÁSICA DA CASEARGREWIINA F

195,2 mg de caseargrewiina F (16FA1 e R1FAprep1) foram mantidos sob agitação em balão contendo 15% (m/V) de KOH em EtOH 95% (50,0 mL) durante 4h, conforme método descrito por Beutler et al. (2000a) para a hidrólise da casearborina D. A solução reacional foi adicionada de H₂O (100,0 mL) e, em seguida, foi realizada uma partição líquido-líquido com Hex/AcOEt (8:2, v/v, 1.000,0 mL divididos em 5 etapas). Para retirar resíduos de KOH da fase orgânica, foi realizada nova partição desta com H₂O (1.000,0 mL divididos em 2 etapas). A fase orgânica foi concentrada e seca, fornecendo o produto da reação.

4.4.1. ANÁLISE DA CASEARGREWIINA Fhb POR CLAE-DAD

As análises da caseargrewiina F e da caseargrewiina Fhb (1,0 mg/mL, MeOH) foram realizadas no CLAE 1 utilizando coluna de fase reversa (C-18 Phenomenex[®] luna, 250 x 4,6 mm, 5 µm), 70 ou 60% MeOH/H₂O (v/v) em 40 min, mais MeOH por 10 min, com fluxo de 1,0 mL/min, $V_{inj} = 20 \mu\text{L}$ e faixa de detecção entre 210-400 nm ($\lambda_{\text{cromatogramas}} = 235 \text{ nm}$).

4.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA

Os testes de atividade citoprotetora (antiulcerogênica) e de toxicidade aguda via oral foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, por técnicos ou alunos de pós-graduação, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Jaime Aboin Sertiè, auxiliado pelo Dr. Ricardo Gomide Woisky.

Para avaliação de atividade citoprotetora a metodologia empregada foi a seguinte: 30 minutos antes da administração oral de 1,0 mL de etanol absoluto aos

animais (ratos, grupos de 7) foram administrados, por via oral, a amostra teste (extrato, frações EFS e substâncias purificadas ou derivados), cimetidina ou misoprostol. Controle (ágar 1%+tween 80 8%). Uma hora após, os estômagos foram retirados, abertos ao longo da maior curvatura e avaliados quanto ao número e a severidade das lesões (ROBERT *et al.*, 1979).

Para determinação da toxicidade aguda via oral foi administrada com auxílio de seringa e cânula dose única da casearina U - 35,0, 65,0 ou 172,0 mg/kg de peso corporal - aos animais (ratos, grupos de 7) previamente pesados. Os animais foram observados por 14 dias, avaliando-se o número de óbitos durante as próximas 72 h e após diariamente. O padrão de comportamento dos animais incluindo depressão, excitação, convulsão, estereotipia, piloereção, diarreia, alterações na pelagem, no globo ocular e nas mucosas, frequência respiratória, sono e salivação foi observado diariamente, assim como os pesos corporais.

4.6. QUANTIFICAÇÃO DE DITERPENOS CLERODÂNICOS TÍPICOS DE *Casearia* NO EXTRATO EtOH COM O USO DE CLAE

4.6.1. QUANTIFICAÇÃO DA CASEARINA U NO EXTRATO EtOH

O pré-tratamento do extrato EtOH seco foi realizado nas mesmas condições descritas no item 4.2.2.1(a). Foram aplicados 41,0 mg de extrato EtOH e como na EFS do pré-tratamento $V_{\text{eluyente}} = 5,0$ mL, a concentração de extrato EtOH considerando-se a massa antes do pré-tratamento foi de 8,2 mg/mL (MeOH/H₂O 98:02, v/v). A solução padrão de casearina U (0,50 mg/mL, MeOH) foi filtrada em membrana (0,22 μm , PVDF Millipore[®]). As análises foram desenvolvidas no CLAE 4 utilizando coluna de fase reversa (C-18 Phenomenex[®] Luna, 250 x 4,6 mm, 5 μm), gradiente linear de 48-100% MeOH/H₂O (v/v) em 80 min, mais MeOH por 5 min, com fluxo de 0,8 mL/min e detecção a 235 nm. Extrato EtOH: $V_{\text{inj}} = 20$ μL ; 2 injeções. Casearina U (fração 15FACT2(G)): $V_{\text{inj}} = 10, 20, 30, 40$ e 50 μL .

4.6.2. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CASEARGREWIINA F E DE DITERPENOS TOTAIS DO TIPO DAS CASEARINAS ($\lambda_{\text{máx}} = 231\text{-}235 \text{ nm}$) EM RELAÇÃO À CASEARGREWIINA F NO EXTRATO EtOH

9,90 mg do extrato EtOH seco foram submetidas a um pré-tratamento conforme descrito no item 4.2.2.1(a) e ressolubilizados em 4,0 mL de MeOH resultando numa concentração de 2,475 mg/mL, considerando-se a massa antes do pré-tratamento. As soluções padrões de caseargrewiina F foram preparadas nas concentrações de 0,007938, 0,015875, 0,0635, 0,2540 e 0,5080 mg/mL (MeOH). As análises foram desenvolvidas no CLAE 1 utilizando coluna de fase reversa (C-18 Phenomenex® Gemini, 250 x 4,6 mm, 5 μm), gradiente com ACN/MeOH/H₂O (44:22:34 a 47:53:00 v/v/v) em 42 min, mais ACN/MeOH (53:47, v/v) por 5 min, com fluxo de 0,8 mL/min, $V_{\text{inj}} = 20 \mu\text{L}$ e faixa de detecção entre 210-400 nm ($\lambda_{\text{cromatogramas}} = 235 \text{ nm}$)³.

Adicionalmente, a caseargrewiina F e as casearinas B, O⁴ e U foram analisadas em CLAE-DAD com a finalidade de identificar estas substâncias no extrato EtOH. As análises foram desenvolvidas no CLAE 1 utilizando coluna de fase reversa (fenil-hexil Phenomenex®, 250 x 4,6 mm, 5 μm), gradiente linear de 48-100% MeOH/H₂O (v/v) em 80 min, mais MeOH por 5 min, com fluxo de 0,8 mL/min, $V_{\text{inj}} = 40 \mu\text{L}$ e faixa de detecção entre 210-400 nm ($\lambda_{\text{cromatogramas}} = 235 \text{ nm}$) (TININIS, 2006). As concentrações utilizadas foram: extrato EtOH – 3,0 mg/mL; padrões de diterpenos – 0,5 mg/mL.

4.7. IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS PRESENTES NA FRAÇÃO EFS1 POR CG-EM

As análises foram desenvolvidas no CG Shimadzu® modelo QP2010 utilizando coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). A programação de temperatura foi de 60 a 240 °C a 3 °C/min, a razão de *split* 1:20, a temperatura do injetor de 240 °C e do detector de 250 °C. Como gás de arraste usou-se He a uma pressão de 81,5 kPa e velocidade linear de 1,33 mL/min. O detector utilizado nas análises foi o

³ Método de análise em CLAE desenvolvido pelo aluno de iniciação científica Giovanni César C. Bomfim em 2007.

⁴ A casearina O foi purificada nos laboratórios do NuBBE em 2004 pela aluna de iniciação científica Carla Cristina Perez, orientada pelo Prof. Dr Alberto José Cavalheiro

espectrômetro de massas, com modo de ionização por impacto eletrônico, com energia de ionização de 70 eV.

4. 8. DADOS FÍSICOS COMPLEMENTARES DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE *C. sylvestris* E DO DERIVADO OBTIDO

casearina U

Pó branco; $[\alpha]_D^{20} +54.3^\circ$ (c 1,00, MeOH); IV (disco de KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3.490, 2.967, 2.936, 2.887, 1.752, 1.461, 1.374, 1.225 e 1.173 cm^{-1} ; UV (c 0,019, MeOH) λ_{max} 235 nm (ϵ $16,7 \times 10^3 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); RMN de ^1H e ^{13}C (Tabela 14); HRTOF-ESIMS m/z 555.2931 (M+Na⁺; calc. para C₃₀H₄₄O₈Na, 555,2928), 571,2659 (M+K⁺; calc. para C₃₀H₄₄O₈K, 571.2668).

casearina B

Pó branco; $[\alpha]_D^{20} +42.6^\circ$ (c 1,00, MeOH); IV (disco de KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 2.975, 2.940, 2.886, 2.826, 1.751, 1.457, 1.374, 1.227, 1.176, 1.076 e 1.023 cm^{-1} ; UV (c 0,024, MeOH) λ_{max} 234 nm (ϵ $18,1 \times 10^3 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); RMN de ^1H e ^{13}C (Tabelas 15 e 16); HRTOF-ESIMS m/z 599,2853 (M+Na⁺; calc. para C₃₁H₄₄O₁₀Na, 599,2826), 615,2580 (M+K⁺; calc. para C₃₁H₄₄O₁₀K, 615,2566).

casearina D

Pó branco; $[\alpha]_D^{20} +41.6^\circ$ (c 1,00, MeOH); IV (disco de KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3.345, 2.966, 2.928, 1.742, 1.632, 1.458, 1.379, 1.227, 1.182, 1.007; UV (MeOH) λ_{max} 235 nm; RMN de ^1H e ^{13}C (Tabelas 15 e 16); HRTOF-ESIMS m/z 571,2875 (M+Na⁺; calc. para C₃₀H₄₄O₉Na, 571,2878).

casearina H

Pó branco; $[\alpha]_D^{20} +68,2^\circ$ (c 1,00, MeOH); IV (disco de KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3.437, 2.968, 2.934, 2.885, 1.740, 1.632, 1.456, 1.377, 1.231, 1.184, 1.016; UV (MeOH) λ_{max} 235 nm; RMN de ^1H e ^{13}C (Tabelas 15 e 16); HRTOF-ESIMS m/z 527,2612 (M+Na⁺; calc. para C₂₈H₄₀O₈Na, 527,2615).

caseargrewiina F

Pó branco; $[\alpha]_D^{20} +55.1^\circ$ (c 1,00, MeOH); IV (disco de KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3.460, 2.967, 2.930, 2.878, 1.738, 1.376, 1.230 e 1.175 cm^{-1} ; UV (c 0,018, MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ 235 nm (ϵ 15,9 x $10^3 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); RMN de ^1H e ^{13}C (Tabelas 15 e 16); HRTOF-ESIMS m/z 527,2619 (M+Na⁺; calc. para C₂₈H₄₀O₈Na, 527,2615), 543,2362 (M+K⁺; calc. para C₂₈H₄₀O₈K, 543,2355).

9-hidróxi-4-megastimen-3-ona

Óleo levemente amarelo; $[\alpha]_D^{20} +39,0^\circ$ (c 1,00, MeOH); IV (disco de KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3.443, 2.966, 2.932, 2.880, 1.722, 1.647, 1.458, 1.381, 1.254, 1.184 e 1.090 cm^{-1} ; UV (MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ 245 nm; RMN de ^1H e ^{13}C (Tabela 17); HRTOF-ESIMS m/z 233,1515 (M+Na⁺; calc. para C₁₃H₂₂O₂Na, 233,1517).

caseargrewiina Fhb

Pó branco; IV (disco de KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3.443, 3.373, 2.966, 2.924, 2.858, 1.742, 1.456, 1.414, 1.381, 1.229 e 1.003 cm^{-1} ; UV (MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ 235 nm; RMN de ^1H e ^{13}C (Tabela 18); HRTOF-ESIMS m/z 355,1878 (M+Na⁺; calc. para C₂₀H₂₈O₄Na, 355,1880).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MÉTODO DE PURIFICAÇÃO DE CASEARINAS

O método para a purificação de casearinas a partir do extrato EtOH de folhas de *C. sylvestris* foi planejado de modo a obter-se bom rendimento (eficiência e seletividade adequadas), reprodutibilidade, baixo custo, pequeno número de etapas, além de considerar o uso de solventes menos tóxicos. Inicialmente as condições de fracionamento foram otimizadas com pequena quantidade de material, para subsequente escalamento. De modo geral, a metodologia consistiu em 3 etapas utilizando EFS, CC e CLAEprep (Figura 11), sendo as frações obtidas monitoradas por CCDC, CLAE-UV e/ou RMN de ^1H .

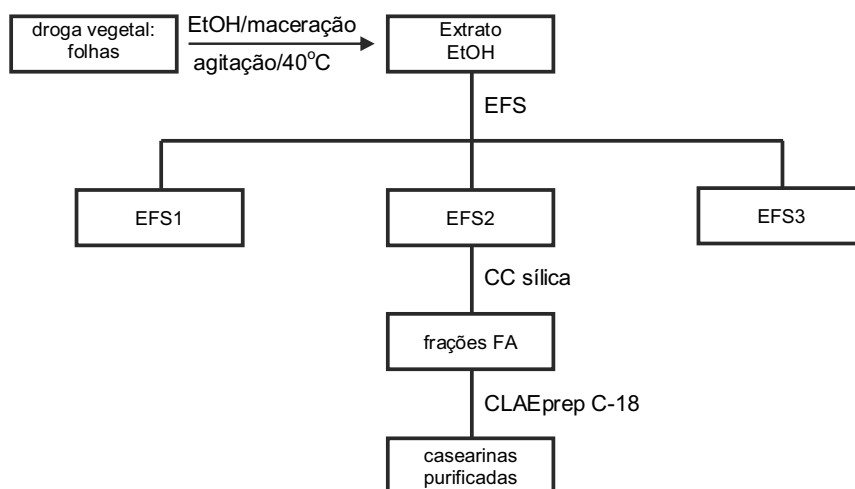


Figura 11: Purificação de casearinas a partir do extrato EtOH de folhas de *C. sylvestris*.

5.1.1. EXTRAÇÃO

A escolha do método de extração e do solvente extrator – maceração dinâmica à quente com EtOH – baseou-se em resultados que evidenciaram a eficiência deste sistema na extração das casearinas (ITOKAWA et al., 1990 ; MORITA et al., 1991 ; SANTOS, 2001). BANDEIRA (2004), utilizando CLAE-DAD e ferramentas quimiométricas, comparou métodos de extração (maceração, sonicação e extração líquida pressurizada) em diferentes condições (solvente, pH, temperatura e tempo) buscando melhor eficiência e seletividade na extração de casearinas, concluindo que o melhor solvente extrator seria CHCl_2 saturado com NH_4OH . Quanto aos métodos de extração a principal diferença observada foi o maior tempo necessário para a maceração.

O EtOH é um solvente com toxicidade mais aceitável, produz menor impacto ambiental, possui ampla disponibilidade e menor custo, quando comparado a hidrocarbonetos, ésteres, éteres, clorados, dentre outros. Apesar da possibilidade de utilização de CHCl_2 ou mistura de solventes com polaridade semelhante, a escolha de EtOH foi considerada mais adequada para extração em escala piloto, bem como possivelmente industrial, estando de acordo com princípios da Química Verde e tendências atuais de produção de fitoterápicos.

O extrato bruto concentrado foi armazenado em frasco de vidro fechado em geladeira. A massa obtida de extrato seco, 1.540,0 g, foi calculada com base no ensaio de perda por dessecação do extrato concentrado. O rendimento do extrato seco em relação à droga vegetal foi de 7,5%, semelhante a alguns resultados anteriores utilizando EtOH: 6,5% - sonicação (SANTOS, 2001) e 7,0% - maceração à quente (MORITA et al., 1991). Itokawa et al. (1990) obtiveram rendimento bem superior utilizando também maceração à quente com EtOH, 20,4%.

O extrato (1ª e 2ª etapas de extração) apresentou perfil cromatográfico em CLAE-DAD semelhante ao da fração 32CSB⁵. Foi possível inclusive sugerir a presença das casearinas G e U⁶ no extrato EtOH, a partir da comparação dos t_R e da sobreposição dos espectros no UV com os observados para a fração 32CSB (Figuras 12 e 13). Mesmo considerando-se todos comprimentos de onda (190-400

⁵32CSB: fração concentrada em casearinas e com atividade antiulcerogênica (item 4.2.2.1(a)).

⁶ A descrição da identificação das casearinas G e U em 32CSB encontra-se em SANTOS (2001).

nm), observou-se claramente o predomínio de picos com $\lambda_{\text{máx}} = 235$ nm, notados entre 40 e 75 min (t_R) nos 3 cromatogramas da Figura 12.

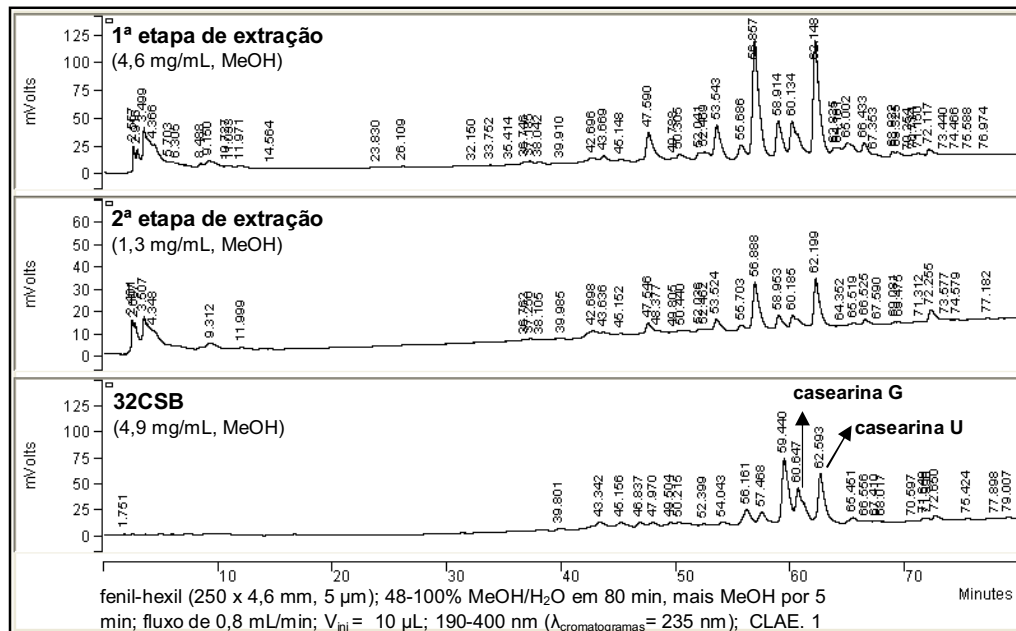


Figura 12: Cromatogramas do extrato EtOH (1ª e 2ª etapas de extração) e da fração 32CSB.

No espectro de RMN de ^1H do extrato EtOH (Figura 14) foram observados sinais com valores de δ na mesma região de absorção dos sinais já descritos para as casearinas (ver item 4.2.2.1(b), Materiais e Métodos).

Em resumo, as análises demonstraram a seletividade do método de extração utilizado com relação às casearinas.

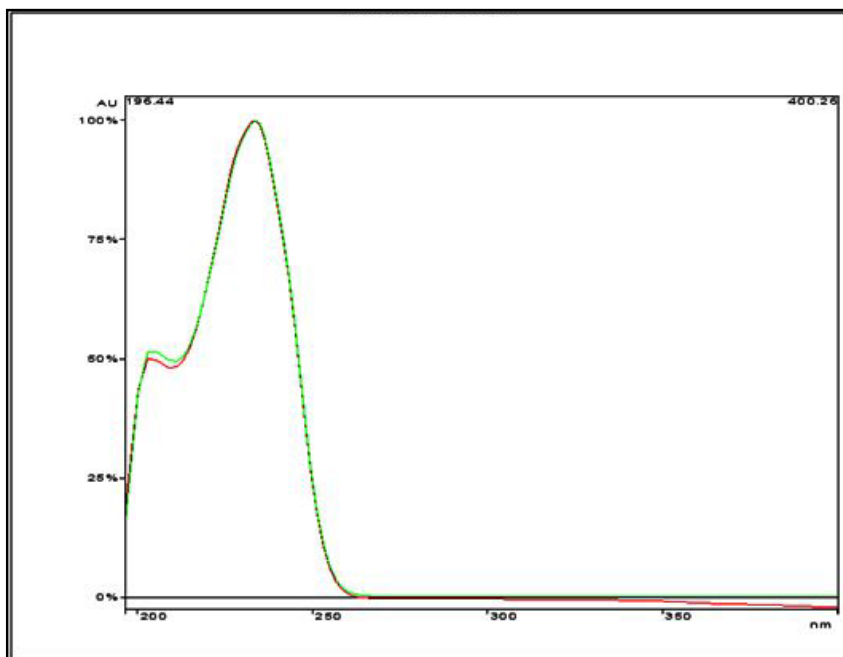


Figura 13: Espectros no UV sobrepostos da casearina U obtidos a partir dos cromatogramas (Figura 12) da fração 32CSB ($t_R = 62,6$ min, espectro em vermelho) e do extrato EtOH ($t_R = 62,2$ min, espectro em verde).

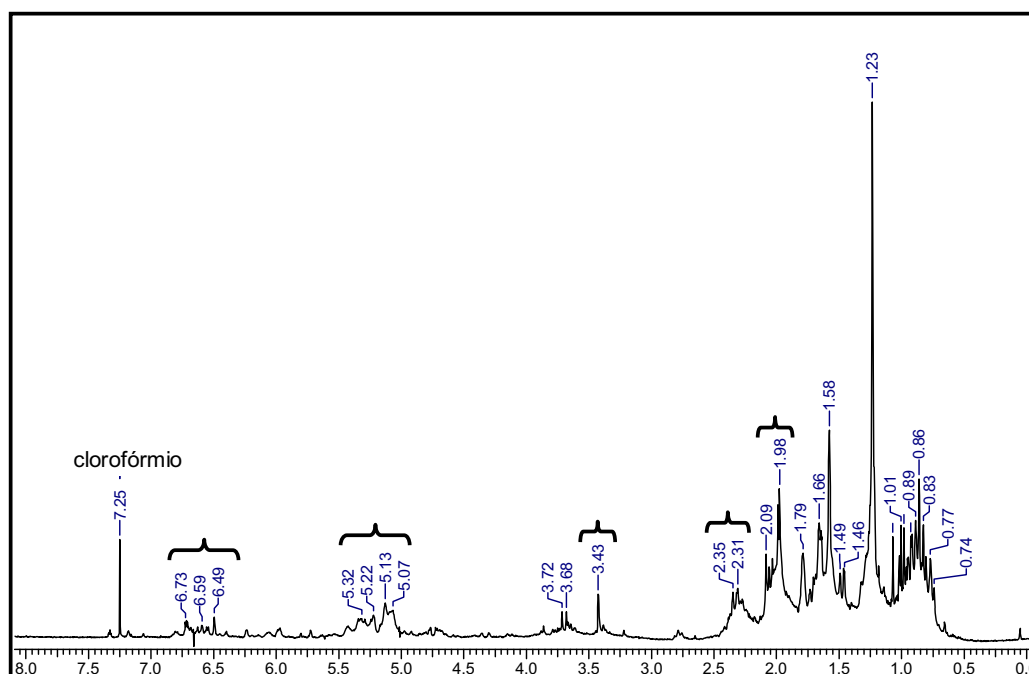


Figura 14: Espectro de RMN de ^1H do extrato EtOH obtido à 200 MHz em CDCl_3 (50 mg/mL). As chaves indicam as regiões dos sinais característicos de casearinas (Item 4.2.2.1(b)).

5.1.2. FRACIONAMENTO DO EXTRATO EtOH ATRAVÉS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Métodos empregados no fracionamento de extratos de *C. sylvestris* (CARVALHO et al., 1998; ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; SANTOS, 2001) apresentaram algumas desvantagens como: a) muitas etapas, dificultando a reprodutibilidade e aumentando o custo do processo; b) uso de CH₂Cl₂; c) obtenção de frações com pigmentos (clorofilas e carotenóides).

TININIS (2006) utilizou um sistema de EFS com fase estacionária (FE) composta por sílica e carvão ativo 1:1 (m/m), que possibilitou o fracionamento da fase hexânica da partição líquido-líquido do extrato EtOH sem o uso de solventes clorados e obtendo apenas 4 frações. Dentre estas, uma fração de casearinas livre de pigmentos interferentes. Este método serviu como referência para o desenvolvimento do processo de fracionamento do extrato EtOH diretamente por EFS, sem etapa prévia de partição líquido-líquido.

5.1.2.1. EFSteste

Uma EFS teste (EFS-teste) foi realizada para a confirmação da eficiência e seletividade do sistema proposto com relação às casearinas. A definição das condições cromatográficas baseou-se no trabalho de TININIS (2006) e considerou a série eluotrópica para a sílica (SNYDER; KIRKLAND, 1979). O volume de eluente foi calculado a partir de $3 \times V_m$. No final da eluição foram utilizados como eluentes MeOH e tolueno, pois o primeiro possui alta força de eluição em sílica e o segundo em carvão ativo (SNYDER; KIRKLAND, 1979), possibilitando avaliar a retenção de casearinas nas 2 FE.

A Tabela 8 resume os dados das análises realizadas com as frações da EFS-teste. A análise por CCDC (cromatoplaça no Anexo 1, Figura B) mostrou que as frações EFS-teste1.2 e 2.1 apresentaram perfil semelhante; o mesmo ocorreu com as frações EFS-teste2.2, 2.3, 2.4, 3.1, 3.2 e 3.3. As frações eluídas com MeOH (EFS-teste4.1 e 4.2) permaneceram retidas na origem. A fração eluída com tolueno (EFS-teste5) apresentou algumas manchas com R_f semelhante ao de outras amostras. Entretanto, a coloração apresentada por estas manchas de EFS-teste5 (revelação com anisaldeído) foi característica (alaranjado) e distinta das demais frações (roxo), demonstrando a presença de substâncias diferentes nesta fração.

Tabela 8: Resultados das análises das frações da EFS-teste.

FRAÇÃO	ELUENTE	MASSA (g)	CCDC ¹	CLAE-DAD ²	RMN ¹ H ³
1.1	H/A 7:3	2,940	A	PRESENÇA	PRESENÇA
1.2	H/A 7:3	0,711	B	PRESENÇA	PRESENÇA
2.1	H/A 3:7	0,927	C	PRESENÇA	PRESENÇA
2.2	H/A 3:7	0,351	D	NA ⁴	NA
2.3	H/A 3:7	0,160	D	NA	NA
2.4	H/A 3:7	0,036	D	NA	NA
3.1	AcOEt	0,060	D	POUCO INTENSOS	AUSÊNCIA
3.2	AcOEt	0,045	D	NA	NA
3.3	AcOEt	0,038	D	NA	NA
4.1	MeOH	2,074	E	NA	AUSÊNCIA
4.2	MeOH	0,209	E	NA	NA
5	tolueno	2,500	F	POUCO INTENSOS	NA

¹amostras com perfil semelhante foram divididas em grupos: A-F.

²presença ou ausência de picos com t_R e espectros no UV semelhantes aos observados para a fração 32CSB. Picos pouco intensos são indicados.

³presença ou ausência de sinais de casearinas no espectro de RMN de ¹H.

⁴análise não realizada.

A análise por RMN de ¹H (ver Item 4.2.2.1(b)), indicou que as frações eluídas com Hex/AcOEt 7:3 (EFS-teste1.1 e 1.2) e a primeira fração eluída com Hex/AcOEt 3:7 (EFS-teste2.1) contêm casearinas. A fração EFS-teste3.1 apresentou em seu espectro de RMN de ¹H apenas indícios da presença de sinais de casearinas e a fração EFS-teste4.1, não apresentou estes sinais. Os espectros encontram-se nos Anexos 2 a 4. A análise por CLAE-DAD indicou que as frações EFS-teste1.1, 1.2 e 2.1 são ricas em casearinas, por comparação com a fração 32CSB, conforme discussão realizada para o extrato EtOH. Já as outras 2 frações analisadas, EFS-

teste3.1 e EFS-teste5, apresentaram picos pouco intensos na região das casearinas. Os cromatogramas encontram-se no Anexo 1, Figura B.

Estes dados mostram que as frações da EFS-teste que concentraram as casearinas foram as eluídas com Hex/AcOEt 7:3 e 3:7. As frações eluídas com AcOEt apresentaram pouca massa (0,9% do extrato seco), perfil em CCDC semelhante às frações eluídas com Hex/AcOEt 3:7 e, segundo análises por CLAE-DAD e RMN de ¹H, indícios da presença de casearinas. Ainda, concluiu-se que as frações eluídas com MeOH e tolueno não contém casearinas; portanto, a FE mista não deve ter retido estas substâncias de forma “irreversível”. Com base nestas informações, propusemos uma otimização do sistema de EFS, conforme descrito a seguir.

5.1.2.2. EFS EM MAIOR ESCALA – EFS(A) E EFS(B)

Algumas modificações na composição da fase móvel (FM) foram efetuadas para o desenvolvimento da EFS em maior escala, segundo a discussão acima e como justificado a seguir:

- Nas frações EFS-teste correspondentes ao primeiro e segundo eluentes (Hex/AcOEt 7:3 e 3:7) detectou-se a presença de casearinas e também de componentes menos polares. Por isso, optou-se por iniciar o novo desenvolvimento da EFS utilizando-se Hex/AcOEt 95:05 para a obtenção na primeira fração apenas dos componentes menos polares do que as casearinas;
- As frações obtidas dos eluentes Hex/AcOEt 3:7 e AcOEt apresentaram mesmo perfil cromatográfico em CCDC. Desta forma, verificou-se desnecessário o uso de Hex/AcOEt 3:7 seguido de AcOEt, optando-se pelo uso de AcOEt como segundo eluente. Então, propusemos a FM da EFS em maior escala composta de 3 eluentes: Hex/AcOEt 95:05, AcOEt e MeOH, sendo a fração concentrada em casearinas obtida com o segundo eluente.

O novo sistema com FM otimizada foi escalado, mantendo-se a mesma composição e altura da fase estacionária da EFS-teste, através da relação:

$$m_1 / m_2 = r_1^2 / r_2^2$$

Onde: m_1 : massa inicial do extrato (EFS-teste)

m_2 : massa calculada do extrato (maior escala)

r_1 : raio da coluna menor

r_2 : raio da coluna maior

Desta forma, a massa de extrato (m_2) utilizada para uma coluna de 9,5cm de raio interno (r_2) seria de aproximadamente 220g. O volume dos eluentes foi calculado com base no volume morto medido ($3 \times V_m$ para cada eluente). A EFS foi realizada em 2 etapas (A e B), com a aplicação de um total de 462,6g de extrato.

EFS(A) e (B) mostraram rendimentos similares (Tabela 9), calculados considerando-se a relação porcentual da massa das frações em relação à massa de extrato EtOH aplicada. As frações EFS(A)2 e EFS(B)2 apresentaram rendimentos de 25,0 e 28,4%, respectivamente. Os rendimentos totais (soma das massas de todas frações) foram considerados baixos: 49,7% para EFS(A) e 55,9% para EFS(B). De qualquer forma, o total de massa obtida de EFS2 (124,1 g) foi considerado suficiente para a obtenção de casearinas purificadas para a caracterização estrutural, ensaios pré-clínicos e modificações moleculares.

Tabela 9: Balanço de massas das frações EFS(A) e (B).

ELUENTE	FRAÇÃO	MASSA (g)	% do EXTRATO
HEX/AcOEt 95:05	EFS(A)1	28,5	13,4
	EFS(B)1	35,2	14,1
AcOEt	EFS(A)2	53,1	25,0
	EFS(B)2	71,0	28,4
MeOH	EFS(A)3	24,0	11,3
	EFS(B)3	33,4	13,4

Em EFS(A) os 2 primeiros eluentes foram coletados em 2 frações cada e não foram observadas diferenças significativa entre os perfis cromatográficos em CCDC (Figura 15) ou espectros de RMN de ^1H de EFS(A)1.0 e 1.1, nem EFS(A)2.0 e 2.1, que foram reunidas.

As respectivas frações EFS(A) e (B) apresentaram mesmo perfil cromatográfico em CCDC (Figura 15), comprovando a reprodutibilidade do sistema de separação. As frações EFS(A)2 e EFS(B)2 também mostraram perfil semelhante a EFS-teste2.1. A comparação dos valores de R_f das manchas das frações EFS2

com os da fração 32CSB mostrou que as casearinas foram concentradas nas mesmas. Manchas com maior valor de R_f foram observadas praticamente apenas nas frações EFS1, mostrando que as substâncias menos polares foram concentradas nestas frações. Finalmente, as frações EFS3 não foram analisadas por apresentarem alta polaridade e necessitarem de outro sistema cromatográfico em CCDC, o que sugere a ausência de casearinas nas mesmas.

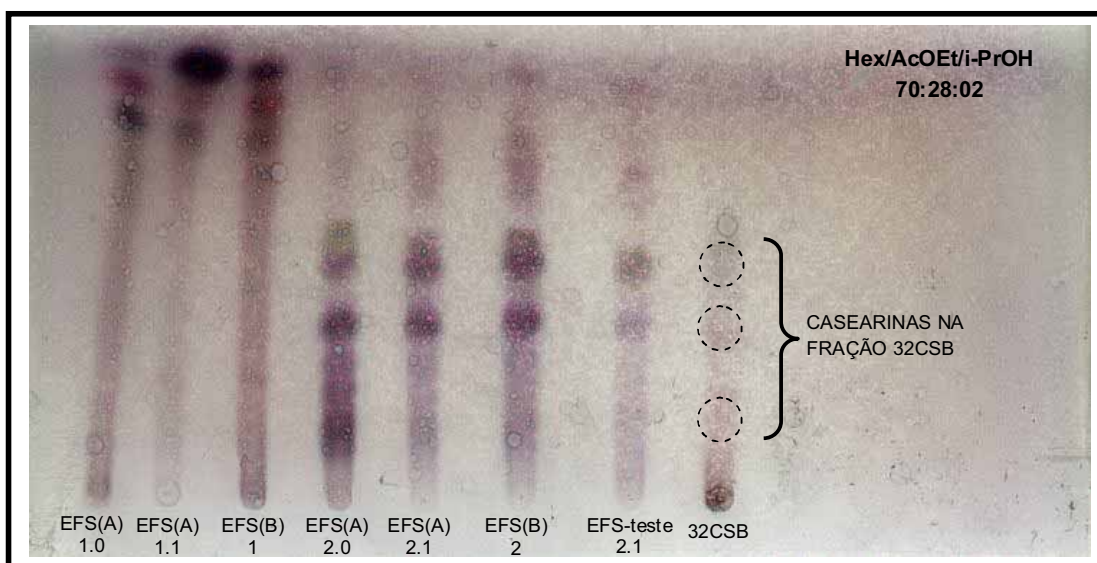


Figura 15: Cromatoplaça das frações EFS(A)1.0, 1.1, 2.0 e 2.1, EFS(B)1 e 2, EFS-teste2.1 e 32CSB.

A fração EFS(A)1.0 não apresentou em seu espectro de RMN de ^1H (Anexo 5, Figura A) os sinais característicos das casearinas (ver Item 4.2.2.1(b)); os principais sinais observados localizam-se em região de frequência mais baixa, indicando a presença de compostos com cadeias alifáticas saturadas. A análise dos espectros de RMN de ^1H confirmou a concentração das casearinas na fração EFS(A)2 (Figura 16). EFS(A)3 também não apresentou em seu espectro (Anexo 5, Figura B) os sinais das casearinas; na região de absorção entre 3,0 e 4,0 ppm observaram-se sinais que podem ser atribuídos a hidrogênios de açúcares.

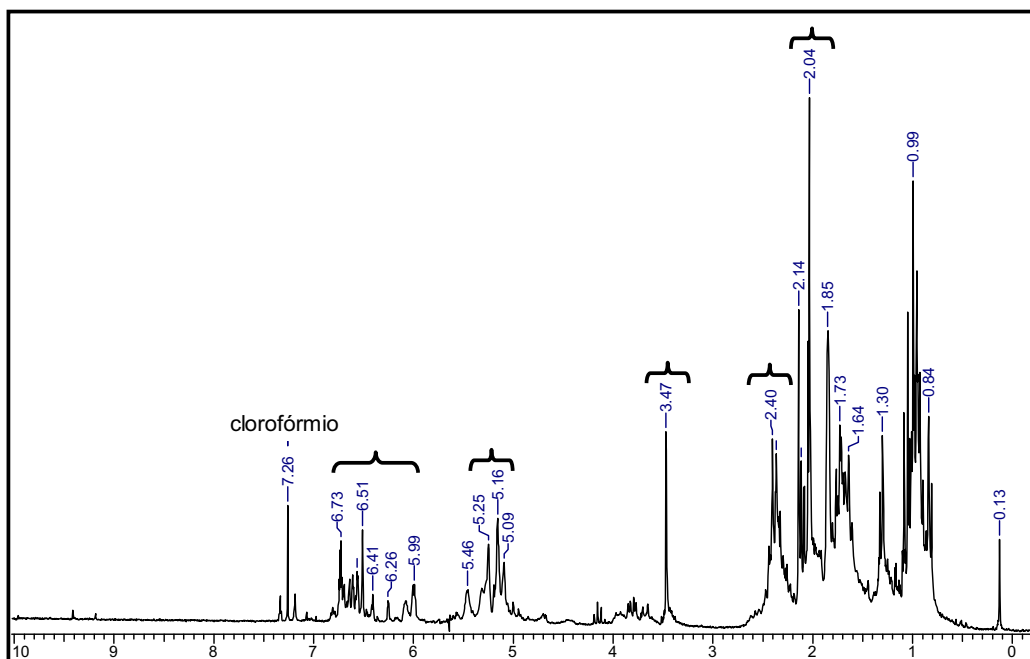


Figura 16: Espectro de RMN de ^1H da fração EFS(A)2.0 obtido a 200 MHz em CDCl_3 (cerca de 30 mg/mL). As chaves indicam as regiões dos sinais característicos de casearinas (Item 4.2.2.1(b)).

O cromatograma da fração EFS(B)1 (Figura 17) apresentou baixa complexidade, com um pico principal na mesma região dos picos apresentados pela fração EFS(B)2, porém com absorvância bem menor do que nesta. É importante notar que as absorvâncias nos cromatogramas estão na escala de Volts para EFS(B)2 e mVolts para EFS(B)1 e EFS(B)3, os V_{inj} foram idênticos e as concentrações próximas. A fração EFS(B)3 mostrou maior complexidade, mas também baixa absorvância dos picos, indicando, como em EFS(B)1, a presença de substâncias com baixa absorção em 254 nm ou mesmo que não absorvam no UV. O cromatograma de EFS(B)2 mostrou quatro picos principais e outros de menor intensidade.

De maneira geral, o sistema de EFS proposto possibilitou a obtenção de uma fração (EFS2) concentrada em casearinas diretamente a partir do extrato EtOH, livre de pigmentos e apenas com resíduos de interferentes apolares. Cabe destacar que as demais frações (EFS1 e EFS3) não apresentaram quantidades detectáveis de

casearinas e que o carvão ativo e a sílica parecem não reter de forma irreversível as casearinas ou degradá-las.

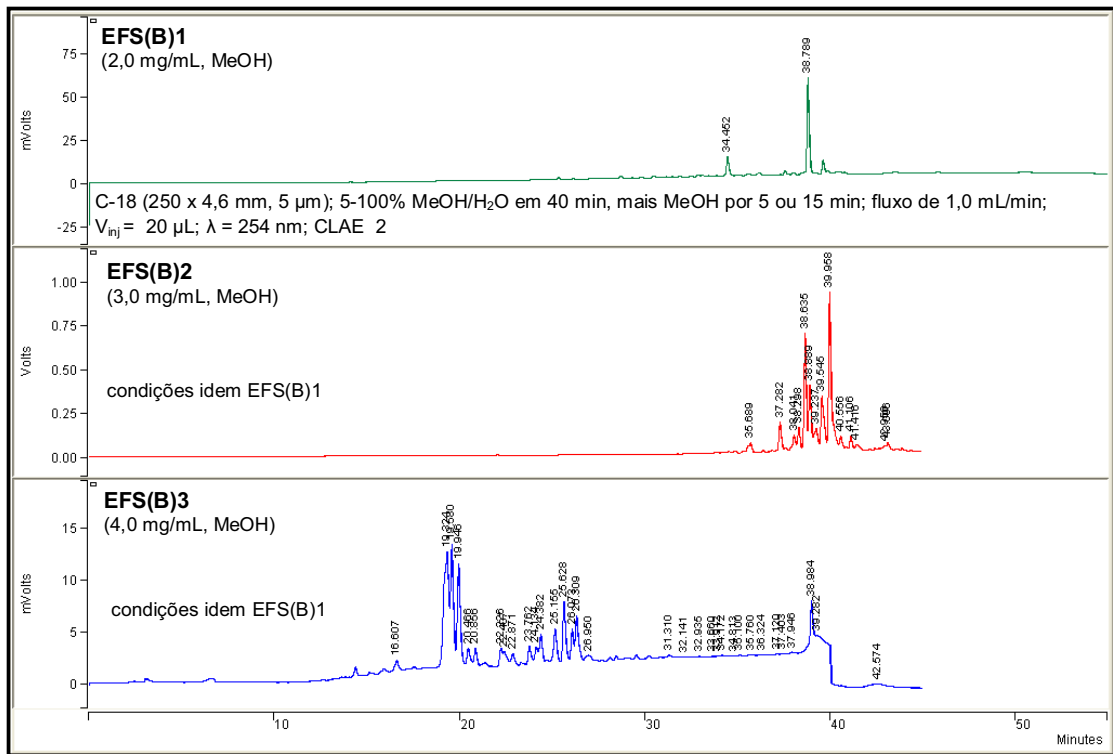


Figura 17: Cromatogramas das frações EFS(B)1, EFS(B)2 e EFS(B)3 (2,0, 3,0 e 4,0 mg/mL, respectivamente, MeOH).

5.1.3. FRACIONAMENTO POR CC DE FASE NORMAL DA FRAÇÃO EFS2

5.1.3.1. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES – COLUNAS FACT1 E FACT2

Como na EFS, inicialmente o fracionamento de EFS(B)2 por CC/sílica foi realizado com pequena quantidade de amostra (1,0 g), para a otimização das condições cromatográficas e posterior escalamento. O sistema cromatográfico testado (FACT1) foi planejado com base em análises de CCDC da fração EFS(B)2 e segundo metodologia adaptada de STILL *et al.* (1978). Foram determinadas 2 condições de FM em CCDC (placa de vidro 5 x 20 cm; sílica; revelação: anisaldeído): **a)** Hex/AcOEt 60:40 - condição de separação ideal, com todas as manchas da amostra num intervalo de R_f entre 0,2 e 0,8 e com resolução adequada ($\Delta R_f > 0,1$); **b)** Hex/AcOEt 78:22 - condição em que todas as manchas da amostra possuíam $R_f < 0,5$. A seqüência de eluentes de Hex/AcOEt 78:22 (b) a 60:40 (a) foi estabelecida com aumento gradativo da força de eluição.

As condições de uma segunda coluna teste (FACT2) foram otimizadas a partir da análise da separação obtida em FACT1. As otimizações incluíram: a) aumento da eficiência (maior altura de sílica); b) aplicação da amostra solubilizada na própria FM; c) uso de “pré-eluente” de baixa polaridade para eliminação de interferentes apolares (componentes residuais de EFS(B)1 em EFS(B)2); d) modificação da seletividade com manutenção da força de eluição através da inclusão de i-PrOH na FM.

As frações FACT1 e FACT2 foram analisadas por CCDC e reunidas segundo semelhança do perfil cromatográfico. FACT1 e FACT2 tiveram mesmo rendimento, cerca de 98% (Tabela 10).

A comparação das cromatoplas das frações FACT1 e FACT2 (Figuras 18 e 19) revelou que em ambos os casos o perfil de separação foi semelhante, observando-se que algumas frações apresentaram 1 ou 2 manchas na cromatoplasca. A análise das frações 8, 15, 18 e 21FACT2 por CLAE-UV (Figura 20) também mostrou perfil cromatográfico simples, adequado para separação em CLAEprep.

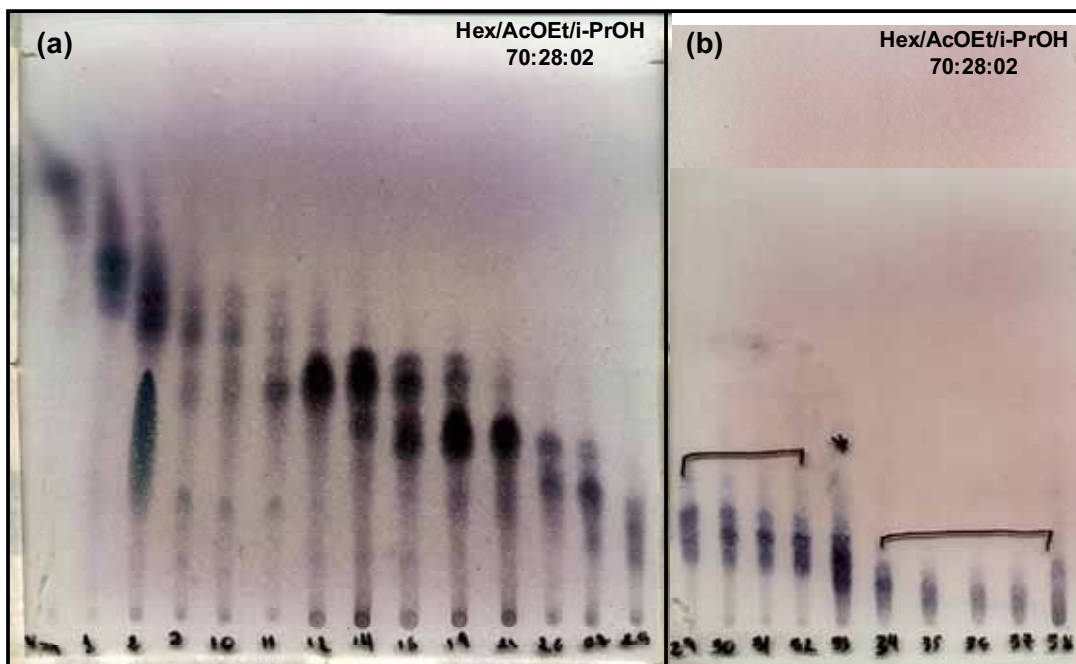


Figura 18: Cromatoplas das frações FACT1 reunidas. **(a):** na seqüência - V_m , 1, 2, 7, 10, 11, 12, 14, 18, 19, 21, 26, 27 e 29. **(b):** na seqüência - 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 e 38.

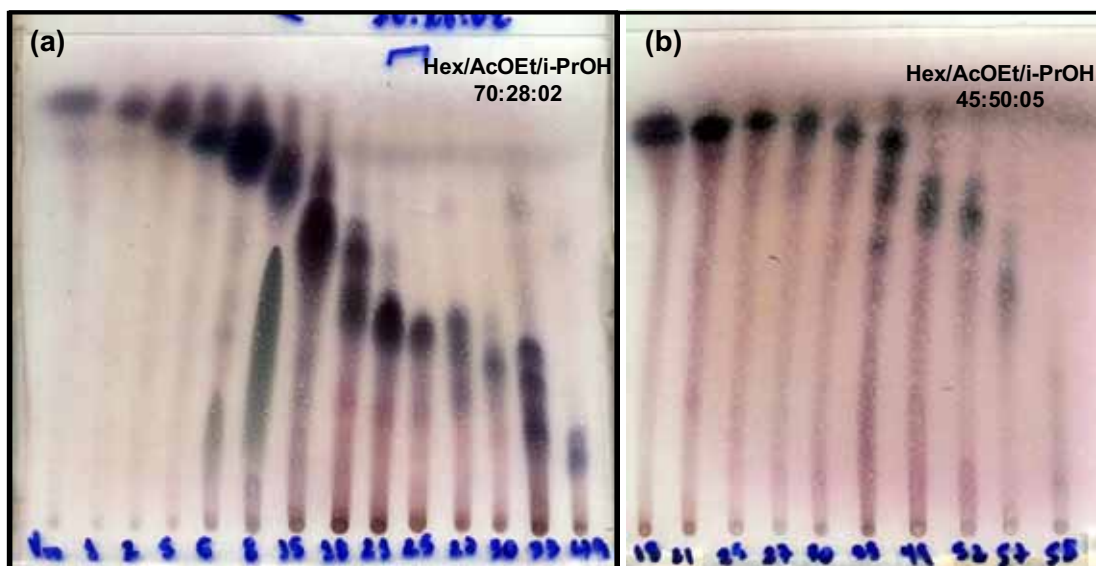


Figura 19: Cromatoplas das frações FACT2. **(a):** na seqüência - V_m , 1, 2, 5, 6, 8, 15, 18, 21, 25, 27, 30, 33, 49 (foram reunidas posteriormente as frações 21 e 25, além de 49 e 52). **(b):** na seqüência - 18, 21, 25, 27, 30, 33, 49, 52, 57 e 58.

Tabela 10: Balanço de massas das frações reunidas FACT1 e FACT2.

FACT1 (extrato 1,03 g)			FACT2 (extrato 1,50 g)		
FRAÇÕES	MASSA (mg)	% de EFS(B)2	FRAÇÕES	MASSA (mg)	% de EFS(B)2
V _m	43,1	4,2	V _m	20,9	1,4
1	28,7	2,8	1	8,8	0,6
2	160,0	15,5	2	17,7	1,2
7	24,2	2,3	5	14,6	1,0
10	9,6	0,9	6	68,9	4,6
11	13,0	1,3	8	184,0	12,3
12	90,8	8,8	15	334,1	22,3
14	130,6	12,7	18	144,9	9,7
18	40,1	3,9	21	258,4	17,2
19	92,5	9,0	27	34,1	2,3
21	122,3	11,9	30	38,7	2,6
26	20,8	2,0	33	189,7	12,6
27	36,6	3,6	49	77,9	5,2
29	53,9	5,2	57	10,8	0,7
33	68,4	6,6	58	60,0	4,0
34	21,0	2,0			
37	8,5	0,8			
38	41,8	4,1			
TOTAL	1,005 g	97,7	TOTAL	1,463 g	97,6

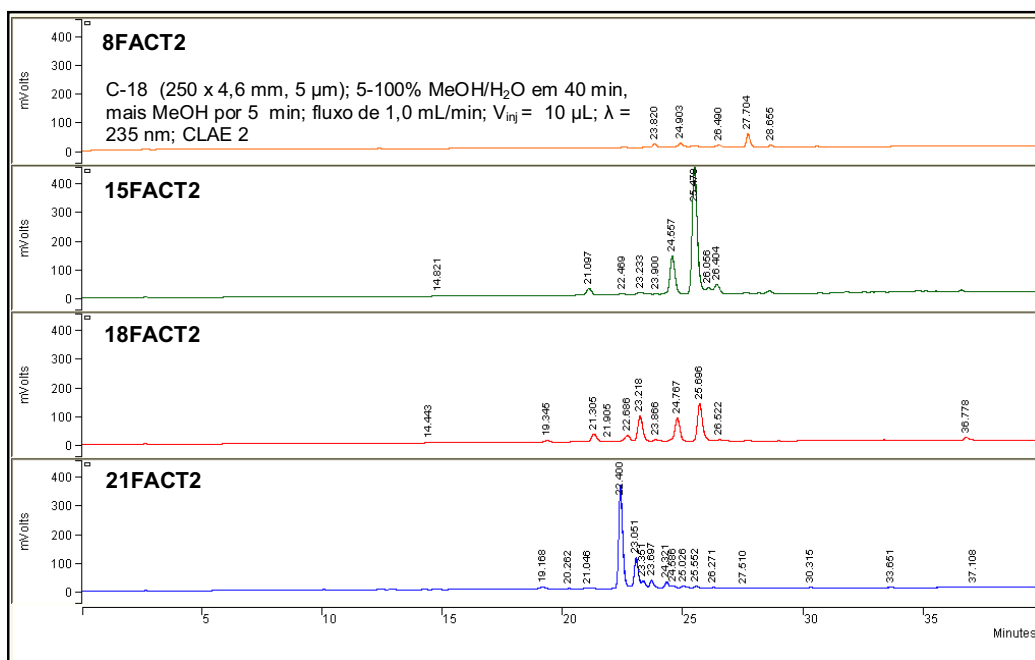


Figura 20: Cromatogramas em CLAE-UV (gradiente exploratório) das frações 8, 15, 18 e 21FACT2 (1,0 mg/mL, MeOH).

A comparação dos dados das colunas FACT1 e FACT2 permitiu propor algumas modificações no sistema cromatográfico a fim de otimizá-lo para a obtenção de frações em menor número, mais simplificadas e passíveis de separação via CLAEprep num fracionamento em maior escala. A seguir são discutidas tais modificações:

a) Interferentes de baixa polaridade

A fração EFS2 ainda continha resíduos das substâncias de baixa polaridade presentes na fração EFS1 (cromatoplaça, Figura 15). Em FACT1, tais componentes eluíram nas frações chamadas de V_m e 1. Em FACT2, utilizou-se um “pré-eluente” com menor ϵ a fim de concentrar estes componentes na fração V_m , sem eluir as casearinas, mas observou-se a presença dos compostos de baixa polaridade em maior número de frações do que em FACT1. Isto deveu-se também ao aumento da altura da fase estacionária de 15 cm (FACT1) para 26 cm (FACT2), o que deve ter aumentado o t_R dos componentes da amostra. Para solucionar este problema foi proposto o uso de um "pré-eluente" com maior força de eluição (Hex/AcOEt/*i*-PrOH 85:14:01 ao invés de Hex/AcOEt 90:10) com $V = 3 \times V_m$.

b) Aumento da resolução

Com o objetivo de melhorar a resolução da separação, foi proposto um aumento mais gradual da força de eluição no início do desenvolvimento. Por outro lado, no final do desenvolvimento percebeu-se ser desnecessário o uso do eluente AcOEt (FACT1) ou AcOEt/*i*-PrOH 97:03 (FACT2), já que as frações obtidas possuem perfil semelhante às do próximo eluente (AcOEt/MeOH 1:1).

c) Altura da fase estacionária

Com o aumento da altura da sílica em FACT2 não percebeu-se aumento na eficiência da separação. Por isso, foi proposto utilizar na coluna em maior escala uma altura intermediária entre as usadas em FACT1 e FACT2: 20cm.

5.1.3.2. COLUNA FA – MAIOR ESCALA

O rendimento de 97% (Tabela 11) obtido na coluna FA foi semelhante aos de FACT1 e FACT2. A resolução foi otimizada em relação aos 2 outros sistemas cromatográficos, como pode ser observado pelas análises por CLAE-DAD e CCDc.

As frações apresentaram composição mais simples, a maioria com 1 ou 2 manchas na cromatoplaça (Figura 21). Pôde-se concluir também que os componentes de baixa polaridade residuais de EFS1 concentraram-se apenas na fração 1FA. Os espectros no UV (CLAE-DAD) das frações FA apresentaram perfil semelhante ao das casearinas (ITOKAWA et al., 1990; SANTOS, 2001). A análise dos cromatogramas (Figuras 22 e 23) permitiu concluir que muitas destas frações constituem-se de misturas de 1 a 3 casearinas ou de casearinas semi-purificadas.

O sistema cromatográfico empregado permitiu a obtenção de amostras de composição simples, mas não teve eficiência suficiente para fornecer substâncias purificadas. Alternativamente poderia-se utilizar outras FE, como C-18, C-8 (fase reversa) ou alumina (fase normal). Porém, em trabalhos anteriores em nosso grupo de pesquisa percebeu-se o mesmo tipo de resultado para fase reversa (C-18) (TININIS, 2006; SANTOS, 2001). De modo geral, as diferenças estruturais entre as casearinas não permitem seu isolamento utilizando apenas técnicas cromatográficas de baixa ou média eficiência. Faz-se necessária a utilização da CLAEprep, técnica utilizada com êxito no isolamento destas substâncias (ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; OBERLIES et al., 2002; SANTOS et al., 2007).

Tabela 11: Balanço de massas da coluna FA.

FRAÇÕES	MASSA (mg)	% de EFS(A)2	FRAÇÕES	MASSA (mg)	% de EFS(A)2
1	535,3	3,3	24	247,6	1,5
2	797,9	5,0	25	171,9	1,1
3	824,2	5,2	26	156,8	1,0
4	373,2	2,3	27	106,6	0,7
5	846,6	5,3	28	94,9	0,6
6	507,1	3,2	29	111,3	0,7
7	237,0	1,5	30	158,5	1,0
8	570,3	3,6	31	217,2	1,4
9	757,7	4,7	32	171,4	1,1
10	1142,0	7,1	33	118,9	0,7
11	718,9	4,5	34	121,2	0,8
12	474,2	3,0	35	153,5	1,0
13	448,3	2,8	36	122,0	0,8
14	375,1	2,3	37	99,6	0,6
15	663,3	4,1	38	113,1	0,7
16	829,1	5,2	39	87,5	0,5
17	747,7	4,7	40	92,2	0,6
18	522,5	3,3	41	104,3	0,7
19	337,6	2,1	42	12,2	0,1
20	237,1	1,5	43	82,0	0,5
21	190,6	1,2	44	70,1	0,4
22	161,5	1,0	45	15,7	0,1
23	195,6	1,2	46	403,0	2,5
TOTAL = 15.524,3 mg (97,0%)					

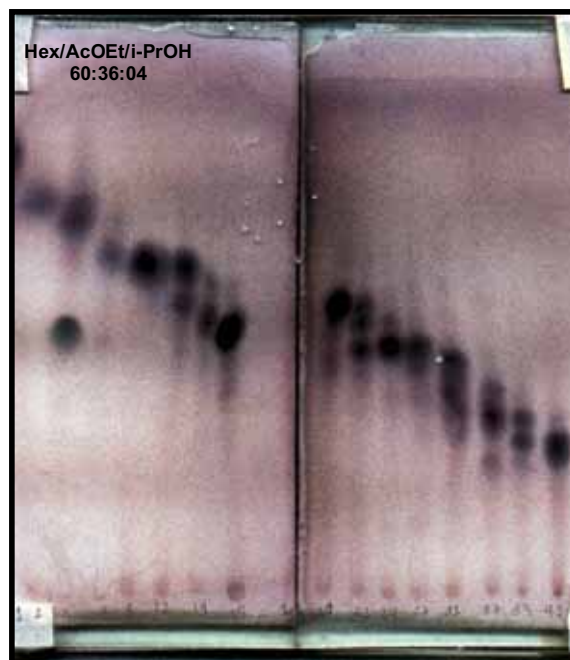


Figura 21: Cromatoplaça das frações FA, na seqüência - 1, 2, 3(3-6), 7, 8(8-11), 12(12+13), 14, 15(15-19), 20(20+21), 22(22+23), 24(24-26), 27(27-30), 31(31-36), 37(37+38), 39(39+40) e 41(41-45)FA.

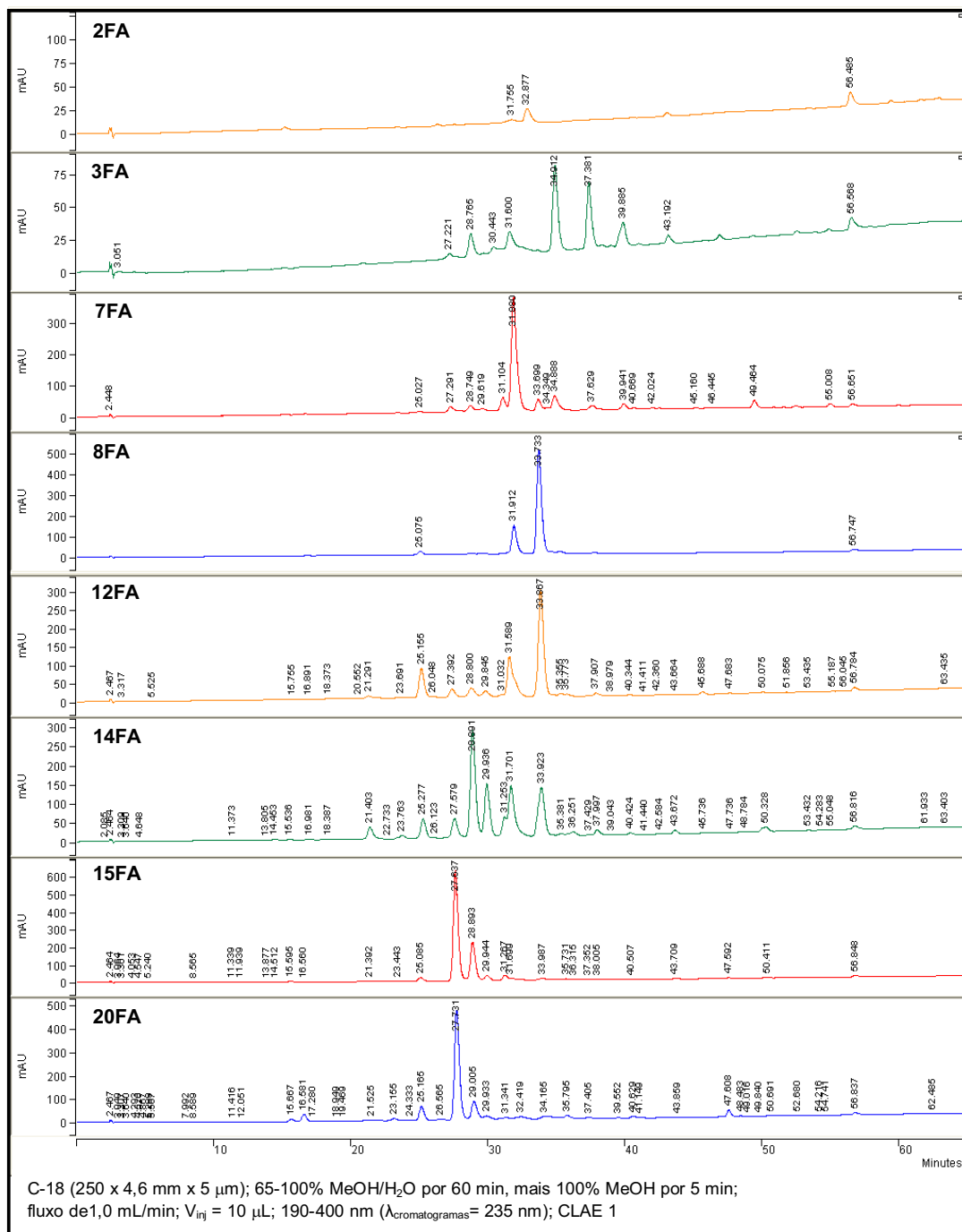


Figura 22: Cromatogramas (CLAE-DAD) das frações 2, 3(3-6), 7, 8(8-11), 12(12+13), 14, 15(15-19) e 20(20+21)FA (1,0-1,5 mg/mL, MeOH).

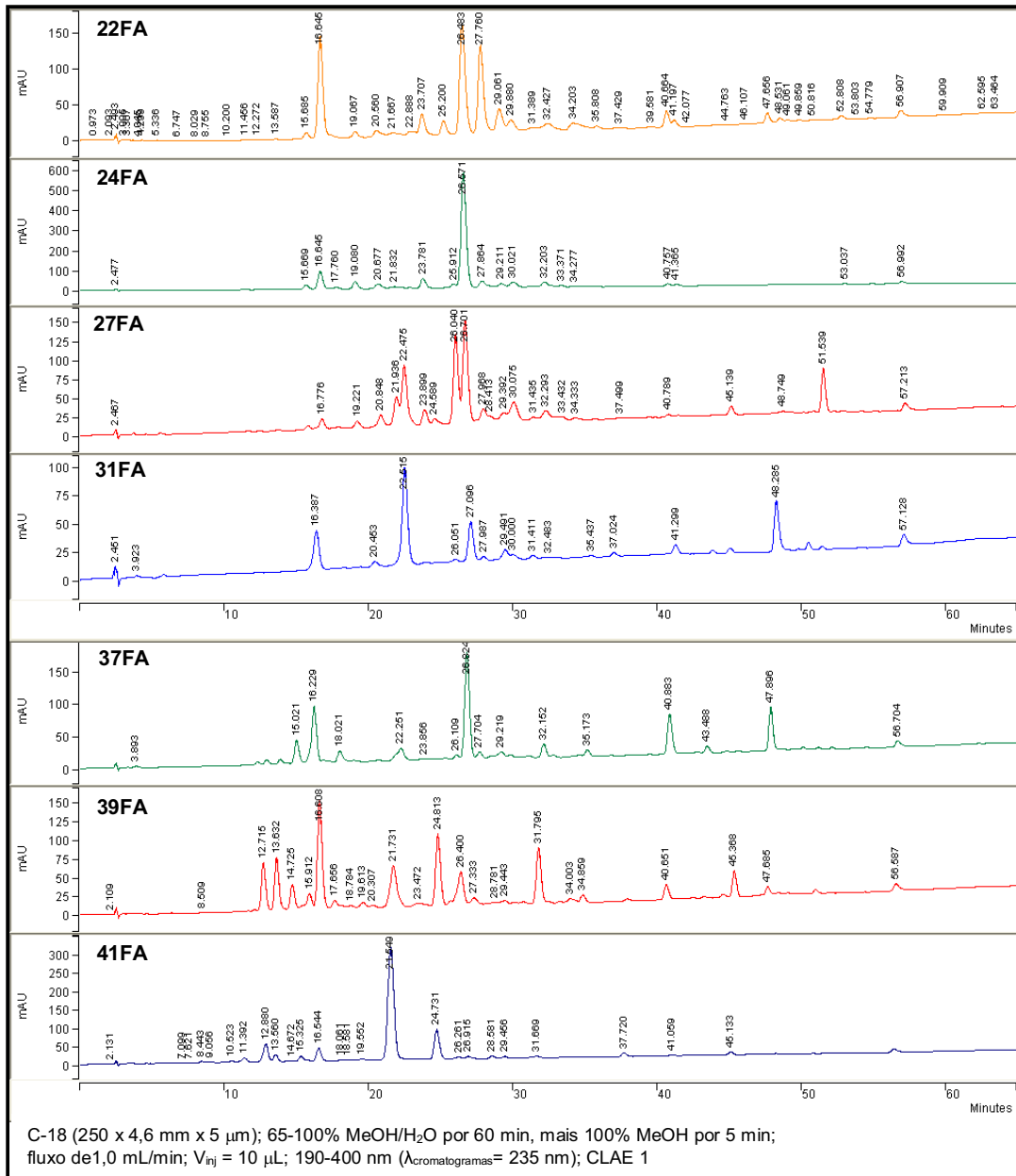


Figura 23: Cromatogramas (CLAE-DAD) das frações 22(22+23), 24(24-26), 27(27-30), 31(31-36), 37(37+38), 39(39+40) e 41(41-46)FA (1,0-1,5 mg/mL, MeOH).

5.1.4. ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS A PARTIR DE FRAÇÕES OBTIDAS POR CC (FACT2 E FA) COM O EMPREGO DE CLAEprep DE FASE REVERSA

Frações FA com composição simples (CCDC e CLAE-DAD) foram submetidas à separação por CLAEprep. As informações obtidas (CLAE-UV) de gradientes exploratórios (condições descritas no Item 4.2.4.4(b)) e de subseqüentes análises em condições isocráticas serviram de base para o estabelecimento da condição mais satisfatória para o escalamento para CLAEprep. Informações sobre a purificação em CLAEprep das substâncias são mostradas na Tabela 12.

A Figura 24 apresenta os cromatogramas analíticos e preparativo da fração 15FACT2 que ilustra o processo de purificação de substâncias. Demais cromatogramas das frações submetidas à purificação, incluindo as sub-frações obtidas, são apresentados nos Anexos 6 a 21, conforme indicado na Tabela 12.

Tabela 12: Informações sobre as substâncias purificadas por CLAEprep.

FRAÇÃO APLICADA		SUBSTÂNCIA PURIFICADA				CROMATOGRAMAS
CÓDIGO	MASSA (mg)	CÓDIGO	MASSA (mg)	RENDIMENTO (%) ¹	PUREZA no UV ²	
15FACT2	314,3	15FACT2(G)	77,6	24,7	80,0	Anexo 6
15FACT2(G) ³	70,0	15FACT2(G)repur⁴	54,0	77,1	98,0	Anexo 7
8FA	543,0	8FA2	169,8	31,3	96,7	Anexo 8, Figura A
9FA	723,6	9FA2	396,7	54,8	97,0	Anexo 8, Figura B
10FA	719,4	10FA4	269,5	37,5	96,4	Anexos 9 e 10
11FA	578,5	11FA4	233,5	40,3	98,6	Anexos 9 e 11
15FA	598,0	15FA1	91,7	15,4	95,2	Anexo 12
		15FA2	158,9	26,6	95,5	
16FA	763,7	16FA1	204,0	26,7	79,4	Anexo 13
17FA	606,7	17FA1	204,2	33,7	95,6	Anexo 14
		17FA2	46,8	7,7	83,1	
18+19FA	688,1	18+19FA1	292,9	42,6	98,6	Anexo 15
		18+19FA2	44,9	6,5	97,1	
20-22FA	480,0	20-22FA3	124,5	25,9	78,2	Anexo 16
20-22FA3 ³	124,5	R1FAprep⁴	53,7	43,1	96,1	Anexo 17
31.1FA	188,0	31.1FAzero	11,3	6,0	85,6	Anexo 18
31.2FA	234,0	31.2FA2	83,5	35,7	87,5	Anexo 19
		31.2FA3	12,7	5,4	75,8	
31.3+31.4FA	195,4	31.3+31.4FA3	19,2	9,8	80,9	Anexos 20 e 21

¹rendimento porcentual da massa de substância purificada em relação ao total da fração aplicada.

²pureza no UV (235 nm) calculada a partir das áreas dos picos dos cromatogramas.

³sub-frações submetidas a re-purificação em CLAEprep.

⁴substâncias re-purificadas por CLAEprep.

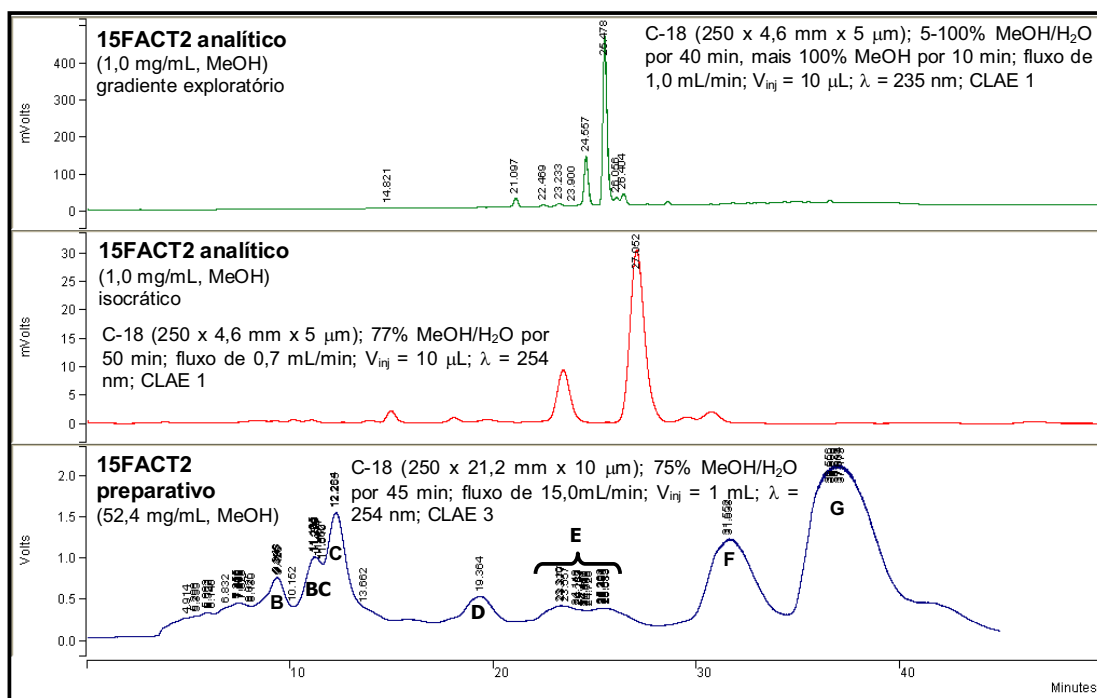


Figura 24: Cromatogramas analíticos (gradiente exploratório e modo isocrático) e preparativo da fração 15FACT2. Cromatogramas das sub-frações no Anexo 6.

Dentre as frações purificadas por CLAEprep, 11 forneceram substâncias com pureza acima de 95%. As sub-frações 15FACT2(G) e 20-22FA3 obtidas do fracionamento de 15FACT2 e 20-22FA, respectivamente, foram re-purificadas em CLAEprep (Tabela 12) fornecendo 15FACT2(G)repur e R1FAprep1, respectivamente.

A principal diferença entre os dois sistemas preparativos utilizados foi a capacidade de carga da coluna (50,0 mm d.i.) acoplada ao CLAE 4 que proporcionou uma redução drástica no tempo de separação quando comparado ao CLAE 3 equipado com coluna de menor diâmetro interno (21,6 mm). Em ambos os casos, utilizou-se como FM MeOH/H₂O (67-75% MeOH), como FE C-18 e detecção em λ = 235 ou 245 nm. Tanto o modo reciclante quanto o não reciclante no CLAE 4 possibilitaram o isolamento de casearinas com alto grau de pureza. Cabe ressaltar que o modo reciclante não proporcionou economia de solvente significativa, mesmo porque, apesar de o volume total de FM ser menor, é preciso utilizar maior força de eluição e, conseqüentemente, maior proporção de MeOH. Como exemplo, na separação de 16FA no modo não reciclante em única injeção o gasto de MeOH

estimado foi de 5.360 mL, enquanto no caso da separação com o uso do modo reciclante também em única injeção da fração 17FA (composição qualitativa igual 16FA) foi de 5.520 mL, em ambos os casos com fluxo de 80,0 mL/min.

O rendimento obtido nas purificações foi um pouco abaixo do esperado. No caso da fração 15FA, as áreas dos picos do cromatograma referentes às substâncias purificadas 15FA1 e 15FA2 corresponderam a 34,1 e 54,2%, respectivamente, da área total. Os rendimentos de 15FA1 e 15FA2 em relação à massa da fração 15FA aplicada em CLAEprep foram de 15,4 e 26,6%, respectivamente. Situações semelhantes foram observadas nas outras separações por CLAEprep. Um dos motivos desta perda de massa pode ter sido o rigor utilizado na coleta das substâncias (descarte do início e final dos picos), na tentativa de obter-se alto grau de pureza. A retenção parcial no início da coluna C-18 ou mesmo a precipitação de casearinas devido à insolubilidade parcial na FM poderiam produzir a redução no rendimento das substâncias purificadas. O rendimento total da purificação de 15FACT2 foi calculado em 99,5% e suas sub-frações “limpeza” e “entre picos” tiveram rendimentos de 17,7 e 12,3%, respectivamente, sugerindo a confirmação destas hipóteses. Como solução sugere-se utilizar FM com menor polaridade em outro tipo de FE (incluindo fase normal) e mesmo otimizar a resolução das separações para coleta completa do pico de interesse.

As substâncias purificadas de frações subseqüentes e que apresentaram mesmo t_R sob as mesmas condições em CLAEan foram submetidas a co-injeções. As co-injeções da sub-fração 15FACT2(G) com 8FA2 e 9FA2 (Figura 25) e de 9FA2 com 10FA4 e 11FA4 resultaram em cromatogramas com único pico simétrico; além disso, os espectros no UV de 8FA2, 9FA2 e 15FACT2(G) mostraram-se praticamente sobrepostos quando normalizados (Figura 26). Resultados semelhantes foram obtidos para 2 conjuntos de sub-frações: **a)** 15FA1, 16FA1, 17FA1, 18+19FA1 e R1FAprep1; **b)** 15FA2, 17FA2 e 18+19FA2. Os cromatogramas destas análises encontram-se nos Anexos 22 a 24.

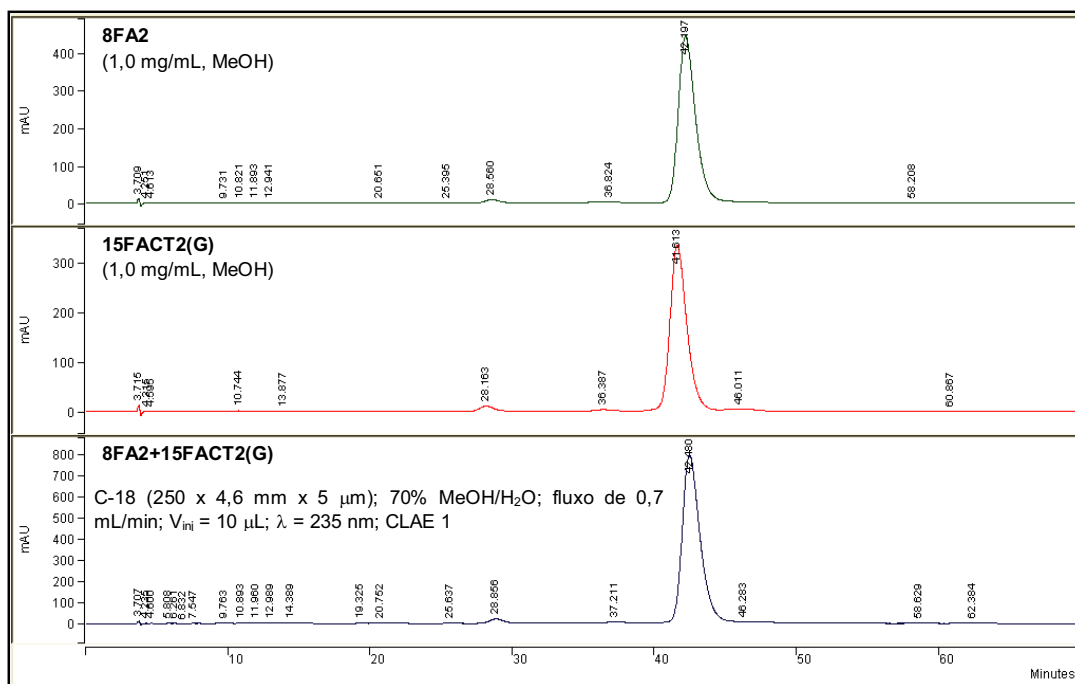


Figura 25: Cromatogramas (CLAE-UV) das sub-frações 8FA2 e 15FACT2(G) e da co-injeção (1:1, v/v) de 8FA2+15FACT2(G).

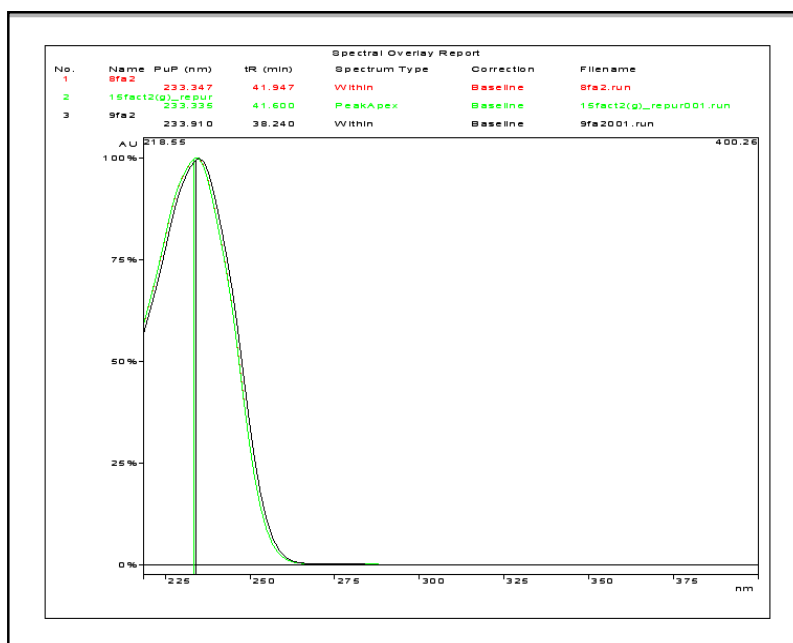


Figura 26: Espectros de absorção no UV (CLAE-DAD) das sub-frações 8FA2 (vermelho), 9FA2 (preto) e 15FACT2(G) (verde).

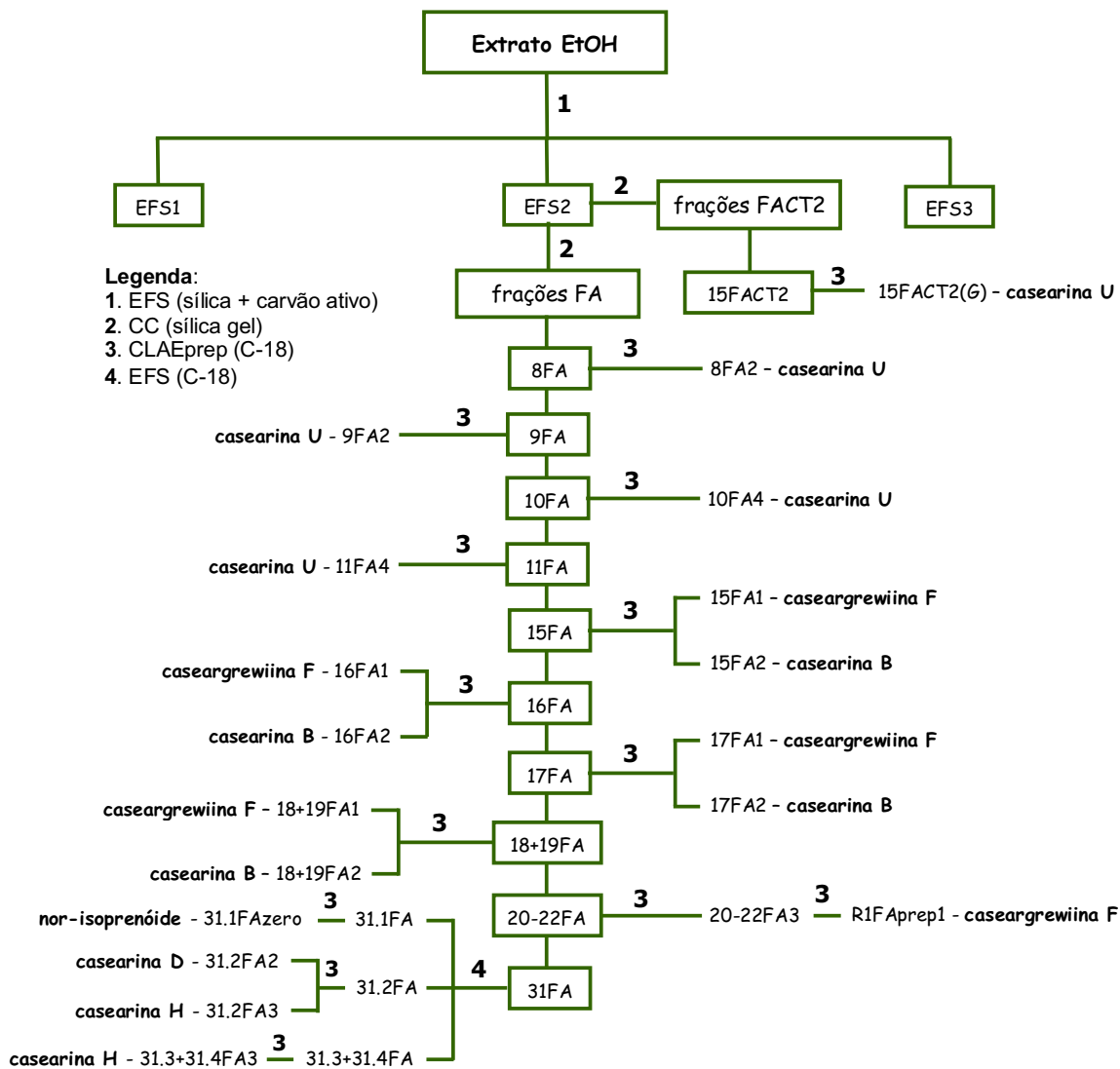


Figura 27: Fluxograma do processo de isolamento de substâncias a partir do extrato EtOH das folhas de *C. sylvestris*.

5.2. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS PURIFICADAS

As estruturas químicas dos 5 diterpenos (Figura 28 e Tabela 13) e de 1 nor-isoprenóide (Figura 29) purificados foram determinadas através dos dados espectrométricos obtidos, incluindo Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear uni e bidimensional, Espectrometria de Massas de Alta Resolução, Espectrofotometria de Absorção no Infravermelho e no Ultravioleta.

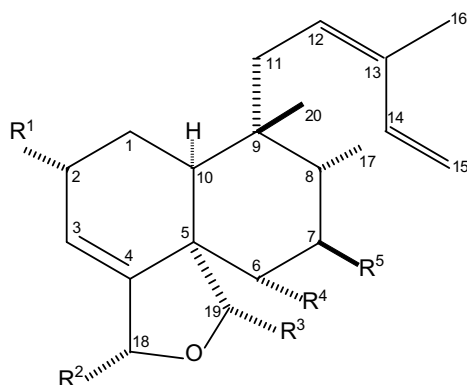


Figura 28: Estrutura química geral dos diterpenos purificados. Nomes e substituintes na Tabela 13.

Tabela 13: Substituintes e massas obtidas dos diterpenos purificados.

SUBSTÂNCIA	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	SUB-FRAÇÕES CLAEprep ¹	MASSA TOTAL OBTIDA (mg)
casearina B	OMe	OAc	OAc	OAc	OBu	15FA2, 17FA2 e 18+19FA2	250,6
casearina D	OH	OBu	OAc	OH	OBu	31.2FA2	83,5
casearina H	OH	OAc	OAc	H	OBu	31.2FA3, 31.3+31.4FA3	31,9
casearina U	OBu	OBu	OAc	OH	H	15FACT2(G)repur, 8FA2, 9FA2, 10FA4, 11FA4	1.123,5
caseargrewiina F	OBu	OAc	OAc	OH	H	15FA1, 16FA1, 17FA1, 18+19FA1 e R1FAprep1	846,5

¹sub-frações submetidas a co-injeções para identificação

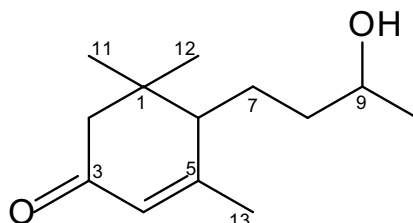


Figura 29: Estrutura química da 9-hidróxi-4-megastimen-3-ona (11,3 mg).

5.2.1. CASEARINA U

Os dados de RMN de ^{13}C da casearina U foram muito semelhantes aos já obtidos para esta substância em trabalhos de mestrado (SANTOS, 2001) e de doutorado (TININIS, 2006) desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa. No entanto, a estrutura desta substância ainda é inédita na literatura e os dados espectrométricos descritos para a casearina U nestes trabalhos são incompletos, não havendo registro de espectros no IV e de massas de alta resolução. Além disso, há diferenças nas atribuições de alguns sinais nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C . Portanto, a elucidação estrutural da casearina U é apresentada a seguir.

A casearina U foi obtida como um pó branco. Seu espectro de massas de alta resolução (HRTOF-ESIMS) no modo positivo (Anexo 25, Figura A) apresentou picos relativos aos íons $[\text{M}+\text{Na}]^+$ e $[\text{M}+\text{K}]^+$ com valores de m/z de 555,2931 e 571,2659, respectivamente, que são consistentes com os valores de 555,2928 e 571,2668, respectivamente, calculados com base na fórmula empírica $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_8$ para o íon molecular. O espectro de RMN de ^{13}C da casearina U apresentou 30 sinais similares àqueles já relatados para outras casearinas (CARVALHO et al., 1998; ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; SANTOS et al., 2007). A banda larga observada no espectro no IV (Anexo 26) em 3.490 cm^{-1} , juntamente com os sinais nos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H em $\delta 72,9$ (*d*, C-6) e $\delta 4,18$ (*dd*, $J = 11,0$ e $5,0$ Hz; H-6), respectivamente, indicaram a presença de um grupo hidroximetínico na molécula. De maneira semelhante, a banda no IV em 1.752 cm^{-1} e os sinais nos espectros de RMN de ^{13}C em $\delta 170,0$ (*s*), $173,3$ (*s*) e $173,4$ (*s*) sugerem a presença de 1 grupo acetato e 2 grupos butanoato (Tabela 14). Todos espectros de RMN obtidos são apresentados nos Anexos 27 a 47.

A banda de absorção em 235 nm no espectro no UV (Anexo 25, Figura B) é característica do dieno conjugado da cadeia lateral das casearinas (CARVALHO et al., 1998; ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; SANTOS et al., 2007), cuja presença foi confirmada pelos sinais observados na região olefínica do espectro de RMN de ^1H mostrando os acoplamentos *cis/trans* dos hidrogênios da ligação dupla terminal monosubstituída [$\delta 5,13$ (*d*, $J = 11,0$ Hz; H-15_a), $5,26$ (*d*, $J = 17,0$ Hz; H-15_b)] com o hidrogênio vicinal [$\delta 6,81$ (*dd*, $J = 17,0$ e $11,0$ Hz; H-14)], além de outro sinal em $\delta 5,64$ (*dl*, $J = 9,0$ Hz; H-12) que pôde ser atribuído ao hidrogênio da ligação dupla trissubstituída do dieno conjugado. A estrutura parcial formada pela cadeia

lateral ligada em C-9 foi confirmada pelas correlações observadas no mapa de contornos HMBC entre H-11 e C-12, H-12 e C-13/C-16, H-14 e C-16, H-15 e C-13, e H-16 e C-13, bem como as correlações do mapa de contornos COSY apresentadas na Tabela 14. A configuração Z da ligação dupla em C-12 foi determinada com base no efeito nuclear Overhauser (NOESY2D) observado entre H-16 [δ 1,84 (s)] e H-12 [δ 5,64 (dl; $J = 9,0$ Hz)].

A estrutura decalínica (anéis A e B, C-1 a C-10) também foi confirmada a partir de correlações observadas nos mapas de contorno HMBC (Figura 30) e COSY, além da comparação com dados de RMN de ^{13}C da literatura. Outro sinal de hidrogênio olefínico em δ 6,34 (dl, $J = 4,5$ Hz; H-3) foi atribuído à ligação dupla em C-3 (δ 121,6 d), também característica das casearinas (CARVALHO et al., 1998; ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; SANTOS et al., 2007). Na região de menor frequência de absorção dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135°, 6 sinais foram atribuídos a metilas, sendo: 2 do anel decalínico, nas posições 8 [δ 16,1 (q; C-17)] e 9 [δ 25,5 (q; C-20)]; 1 da cadeia lateral [δ 20,7 (q; C-16)]; 2 dos grupos butanoato [δ 13,8 (q e 14,0 q)]; e 1 do grupo acetato [δ 22,0 (q)].

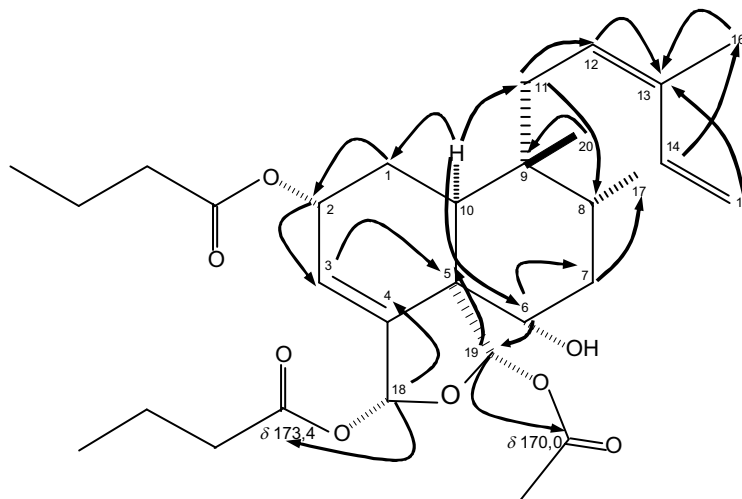


Figura 30: Principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC para a casearina U.

Os sinais de carbonos metínicos oxigenados em δ 97,3 (*d*; C-18) e 99,2 (*d*; C-19), além de 2 hidrogênios em δ 7,16 (*s*; H-19) e 7,45 (*t*, $J = 1,5$ Hz; H-18) indicaram a existência do sistema diacetálico no anel C. As correlações observadas no mapa de contornos HMBC (Figura 30) entre H-18 e a carbonila de um grupo butanoato [δ 173,4 (*s*)], e entre H-19 e a carbonila do grupo acetato [δ 170,0 (*s*)] definiram a posição destes substituintes. O segundo grupo butanoato foi atribuído ao carbono com sinal em δ 67,4 (*d*; C-2). As correlações observadas no mapa de contornos HMBC entre os grupos metílicos, metilênicos e carbonílicos dos grupos ésteres substituintes permitiram a inequívoca atribuição de seus sinais dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , conforme dados da Tabela 14.

A estereoquímica relativa dos 8 centros estereogênicos foi determinada a partir dos dados de RMN de ^{13}C , dos valores de J (RMN de ^1H) e das correlações observadas no experimento de NOESY2D. A configuração *cis* na junção dos anéis A e B pôde ser deduzida a partir do valor de δ 25,5 observado para a metila em C-20, conforme descrito na literatura (KHAN et al., 1990b; MANABE; NISHINO, 1986; VIJAYAKUMAR et al., 2002). Os deslocamentos químicos de C-5 e C-10 (δ 54,8 e 37,7, respectivamente) foram semelhantes aos descritos para as casearinas e compostos análogos (ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; SHEN et al., 2004a; SHEN et al., 2004b). Além disso, os valores de $J = 3,5$ e 13,5 Hz para δ 2,76 (*dd*) sugerem que H-10 possui orientação α -axial. Finalmente, o efeito nuclear Overhauser (NOESY2D) entre H-10 e H-12, e H-11 e H-19 indicou a mesma orientação α para a cadeia lateral em C-9.

Em geral, diterpenos *cis*-clerodânicos sem substituintes nas posições C-7, C-8, C-10, C-11 e C-12 apresentam valores para Me-17 e Me-20 com relação *trans* em torno de δ 15,0 e 26,0, respectivamente (ETSE et al., 1989; KANOKMEDHAKUL et al., 2005; NOGUEIRA et al., 2001), enquanto para a configuração *cis* os valores observados são de cerca de δ 16,0 e 18,0, respectivamente (BILLET et al., 1976; BLÄS; ZAPP; BECKER, 2004; GEIS et al., 1999; SANTOS et al., 2007). As casearinas já isoladas apresentaram valores de cerca de δ 11,0 e 26,0 para C-17 e C-20 e a absorção em menor frequência observada para C-17 pode ser explicada pelo efeito γ de blindagem produzido pelo substituinte oxigenado presente em C-7 sobre a metila C-17. No caso da casearina U, que não possui substituinte em C-7, as absorções em δ 16,1 e 25,5 (Me-17 e Me-20, respectivamente) indicam relação

trans entre estas metilas, como observado para as casearvestrinas (OBERLIES et al., 2000).

O valor de δ 67,4 para o carbono oximetínico C-2 e a constante de acoplamento observada para o hidrogênio alílico H-2 [δ 5,73 (*t*, $J = 4,5$ Hz)] são consistentes com a orientação β -pseudoequatorial de H-2 (ESPÍNDOLA et al., 2004; KANOKMEDHAKUL et al., 2005). Adicionalmente, o efeito nuclear Overhauser observado (NOESY2D) entre H-2 e H-1 $_{\beta}$ [δ 2,14 (*m*)], e H-6 e H-1 $_{\beta}$ sugere que estes hidrogênios possuem mesma orientação β . O acoplamento homoalílico (5J) entre H-18 [δ 7,45 (*t*, $J = 1.5$ Hz)] e H-2 necessita de certa sobreposição dos orbitais π da ligação dupla com os orbitais 1s dos átomos de H, o que indica orientação β para H-18 (GUITTET et al., 1988). Finalmente, o efeito nuclear Overhauser entre H-18 e H-19 confirmou a orientação α para os grupos butanoato em C-18 e acetato em C-19.

A casearina U é dextrorrotatória, com $[\alpha]_D^{20} = +54,3^\circ$ (MeOH, *c* 1,0).

Tabela 14: Dados espectrométricos de RMN obtidos para a **casearina U** a 500 MHz para ^1H e a 125 MHz para ^{13}C , em piridina- d_5 .

C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ J (Hz)	HMBC	COSY	NOESY2D
1	27,6 <i>t</i>	2,08 <i>m</i> 2,14 <i>m</i>	67,4 ----	2,76 2,76	---- 4,18; 5,73
2	67,4 <i>d</i>	5,73 <i>t</i> (4,5)	27,6; 37,7; 97,3; 121,6	----	2,14; 6,34
3	121,6 <i>d</i>	6,34 <i>dl</i> (4,5)	27,6; 54,8	----	5,73; 7,45
4	147,8 <i>s</i>	----	----	----	----
5	54,8 <i>s</i>	----	----	----	----
6	72,9 <i>d</i>	4,18 <i>dd</i> (11,0; 5,0)	38,1; 99,2	1,88-1,94	2,14
7	38,1 <i>t</i>	1,88-1,94 <i>m</i>	16,1; 54,8; 72,9	4,18	----
8	37,0 <i>d</i>	nd ¹	----	----	----
9	38,6 <i>s</i>	----	----	----	----
10	37,7 <i>d</i>	2,76 <i>dd</i> (13,5; 3,5) 1,93 <i>m</i>	27,6; 30,0; 37,0; 67,4 ----	2,08; 2,14 2,49	5,64 ----
11	30,0 <i>t</i>	2,49 <i>dd</i> (16,0; 9,0)	25,5; 37,0; 37,7; 72,9; 128,4; 134,0	1,93	6,81; 7,16
12	128,4 <i>d</i>	5,64 <i>dl</i> (9,0)	20,7; 30,0; 134,0	2,49	1,84; 2,76
13	134,0 <i>s</i>	----	----	----	----
14	134,4 <i>d</i>	6,81 <i>dd</i> (17,0; 11,0)	20,7; 128,4; 134,0	5,13; 5,26	2,49; 5,13
15	114,6 <i>t</i>	5,13 <i>d</i> (11,0) 5,26 <i>d</i> (17,0)	134,0 134,0	5,26; 6,81 5,13; 6,81	5,26; 6,81 1,84 ; 5,13
16	20,7 <i>q</i>	1,84 <i>sl</i>	128,4; 134,0	----	5,26; 5,64
17	16,1 <i>q</i>	0,88 <i>d</i> (7,5)	----	----	----
18	97,3 <i>d</i>	7,45 <i>t</i> (1,5)	54,8; 99,2; 121,6; 147,8; 173,4	----	6,34
19	99,2 <i>d</i>	7,16 <i>s</i>	54,8; 72,9; 97,3; 147,8; 170,0	----	2,49
20	25,5 <i>q</i>	0,87 <i>s</i>	30,0; 38,6	----	----
OAc	22,0 <i>q</i>	2,04 <i>s</i>	170,0	----	----
OAc	170,0 <i>s</i>	----	----	----	----
OBu	13,8 <i>q</i>	0,84 <i>t</i> (7,5)	18,9; 36,7	1,60	----
OBu	14,0 <i>q</i>	0,89 <i>t</i> (7,4)	19,2; 36,7	1,60	----
OBu	18,9 <i>t</i>	1,60 <i>m</i>	13,8; 36,7; 173,4	0,84; 2,32	----
OBu	19,2 <i>t</i>	1,60 <i>m</i>	14,0; 36,7; 173,3	0,89; 2,19	----
OBu	36,7 <i>t</i>	2,19 <i>m</i>	14,0; 19,2; 173,3	1,60	----
OBu	36,7 <i>t</i>	2,32 <i>m</i>	13,8; 18,9; 173,4	1,60	----
OBu	173,3 <i>s</i>	----	----	----	----
OBu	173,4 <i>s</i>	----	----	----	----

¹valor não determinado

5.2.2. CASEARINA B, CASEARINA D, CASEARINA H E CASEARGREWIINA F

Outras 4 substâncias purificadas foram identificadas como os diterpenos clerodânicos já isolados de *C. sylvestris*, as casearinas B, D (ITOKAWA et al., 1990) e H (MORITA et al., 1991), e de *C. grewiifolia* (KANOKMEDHAKUL et al., 2005), a caseargrewiina F. Os dados de RMN de ^{13}C obtidos em piridina- d_5 para os 4 diterpenos foram praticamente idênticos aos descritos na literatura (CDCl_3). Além disso, dados de experimentos de RMN uni (^1H , NOESY1D, DEPT90 e 135°) e bidimensionais (HMQC, COSY, HMBC e NOESY2D) confirmaram as estruturas químicas propostas.

A identificação estrutural foi realizada de maneira muito semelhante ao discutido para a casearina U, confirmando as sub-estruturas referentes ao anel decalínico (A e B, C-1 a C-10), à cadeia lateral em C-9 e ao anel diacetálico (C). A determinação da configuração relativa destas substâncias também foi realizada considerando-se os mesmos aspectos discutidos para a casearina U.

Os dados físicos complementares das substâncias purificadas encontram-se no Item 4.8, os espectros (EM, IV, UV e RMN) nos Anexos 48 a 148 e os dados de RMN de ^1H e ^{13}C nas Tabelas 15 e 16.

5.2.2.1. (+)-CASEARINA B

O espectro de massas de alta resolução (HRTOF-ESIMS) da casearina B (pó branco) obtido no modo positivo apresentou picos relativos aos íons $[\text{M}+\text{Na}]^+$ e $[\text{M}+\text{K}]^+$ com valores de m/z de 599,2853 (calculado 599,2826) e 615,2580 (calculado 615,2566), respectivamente, concordantes com a fórmula empírica $\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{O}_{10}$ para o íon molecular. A banda de absorção no IV em 1.227 cm^{-1} e os sinais observados nos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H em δ 57,1 (q) e 3,36 (s) indicaram a presença de 1 grupo metoxila na molécula. Da mesma maneira, a banda de absorção no IV em 1.751 cm^{-1} e os sinais nos espectros de RMN de ^{13}C em δ 169,6 (s), 170,5 (s), 170,8 (s) e 173,1 (s) evidenciaram a presença de 3 grupos acetato e 1 butanoato, respectivamente. As correlações observadas no mapa de contornos HMBC (Figura 31) entre os hidrogênios do grupo metoxila [δ 3,36 (s)] e δ 73,0 (d; C-2), δ 5,64 (d, $J = 10,5\text{ Hz}$; H-6) e a carbonila de um grupo acetato [δ 170,5 (s)], δ 5,59 (t, $J = 10,5\text{ Hz}$; H-7) e a carbonila do grupo butanoato [δ 173,1 (s)] e, finalmente, entre δ 7,14 (s;

H-19) e a carbonila de outro grupo acetato [δ 169,6 (s)], permitiram definir a posição dos grupos substituintes oxigenados na molécula. O terceiro grupo acetato foi atribuído ao carbono acetálico C-18 [δ 95,9 (d)].

A configuração absoluta da casearina B foi determinada a partir da comparação do valor obtido de $[\alpha]_D^{20} = +42,6^\circ$ (MeOH; *c* 1,00), com o dado da literatura – $[\alpha]_D = +35,1^\circ$ (EtOH; *c* 1,24) (ITOKAWA et al., 1990).

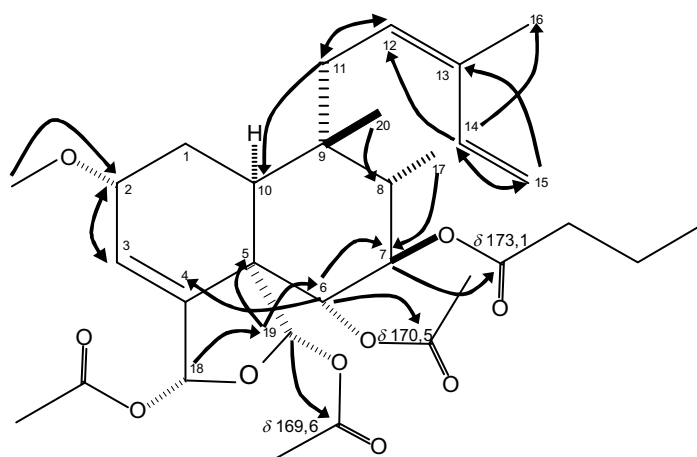


Figura 31: Principais correlações observadas nos mapas de contornos HMBC (setas simples) e COSY (setas duplas) para a casearina B.

5.2.2.2. (+)-CASEARINA D

O espectro de massas de alta resolução (HRTOF-ESIMS) da casearina D (pó branco) no modo positivo apresentou pico relativo ao íon $[M+Na]^+$ com valor de *m/z* de 571,2875 (calculado 571,2878), congruente com a fórmula empírica de $C_{30}H_{44}O_9$ para o íon molecular. A banda de absorção em 1.752 cm^{-1} e os sinais nos espectros de RMN de ^{13}C em δ 169,7 (s), 173,5 (s) e 173,7 (s) evidenciaram a presença de 1 grupo acetato e 2 butanoatos, respectivamente. A posição destes grupos na molécula foi determinada com base em correlações observadas no mapa de contornos HMBC entre δ 7,43 (*t*; *J* = 1,5 Hz; H-18) e a carbonila do grupo butanoato com absorção em δ 173,5 (s), δ 7,24 (s; H-19) e a carbonila do grupo acetato [δ 169,7(s)] e, finalmente, entre δ 5,65 (*t*; *J* = 11,0 Hz; H-7) e a carbonila do outro grupo butanoato [δ 173,1 (s)], conforme representado na Figura 32. Os sinais em δ 63,7 (d;

C-2) e 74,8 (*d*; C-6) foram atribuídos a carbonos ligados a grupos hidroxila, cuja presença foi confirmada pela banda larga de absorção no IV em 3.435 cm⁻¹.

A configuração absoluta da casearina D foi determinada a partir da comparação do valor obtido de $[\alpha]_D^{20} = +41,6^\circ$ (MeOH; *c* 1,00), com o dado da literatura – $[\alpha]_D = +38,5^\circ$ (EtOH; *c* 0,42) (ITOKAWA et al., 1990).

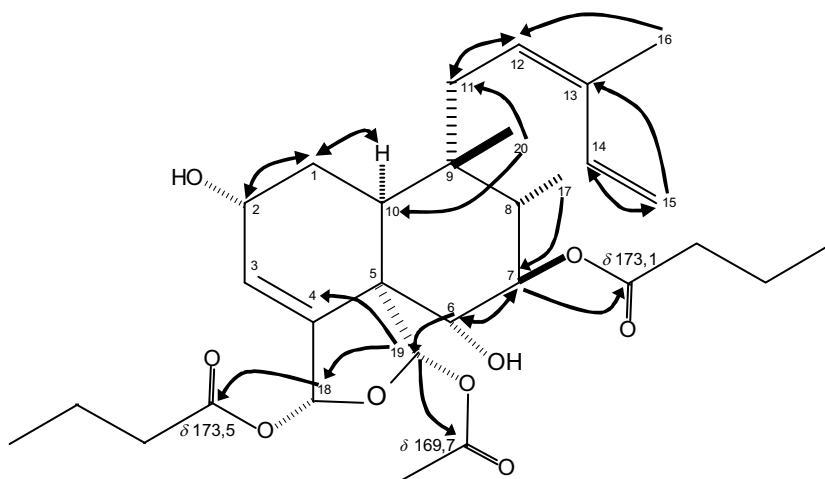


Figura 32: Principais correlações observadas nos mapas de contornos HMBC (setas simples) e COSY (setas duplas) para a casearina D.

5.2.2.3. (+)-CASEARINA H

A casearina H foi obtida como um pó branco. Seu espectro de massas de alta resolução (HRTOF-ESIMS) no modo positivo apresentou pico relativo ao íon $[M+Na]^+$ com valor de *m/z* de 527,2612 (calculado 527,2615), congruente com a fórmula empírica C₂₈H₄₀O₈ para o íon molecular. A banda de absorção no IV em 1.740 cm⁻¹ e os sinais nos espectros de RMN de ¹³C em δ 169,8 (s), 170,8 (s) e 173,2 (s) evidenciaram a presença de 2 grupos acetato e 1 butanoato, respectivamente. A posição destes grupos na molécula foi determinada com base em correlações observadas no mapa de contornos HMBC (Figura 33) entre δ 7,06 (*t*, *J* = 2,0 Hz; H-18) e a carbonila do grupo butanoato com absorção em δ 170,8 (s), δ 6,93 (s; H-19) e a carbonila do grupo acetato [δ 169,8 (s)] e, finalmente, entre δ 5,18 (*dd*, *J* = 11,5 e 5,0 Hz; H-7) e a carbonila do outro grupo butanoato [δ 173,2 (s)]. O

sinal em δ 63,7 (*d*; C-2) foi atribuído a 1 carbono ligado a grupo hidroxila, cuja presença foi confirmada pela banda larga de absorção no IV em 3.437 cm^{-1} .

A configuração absoluta da casearina H foi determinada a partir da comparação do valor obtido de $[\alpha]_D^{20} = +68,2^\circ$ (MeOH; *c* 1,00), com o dado da literatura – $[\alpha]_D = +32,2^\circ$ (CHCl_3 ; *c* 0,10) (MORITA et al., 1991).

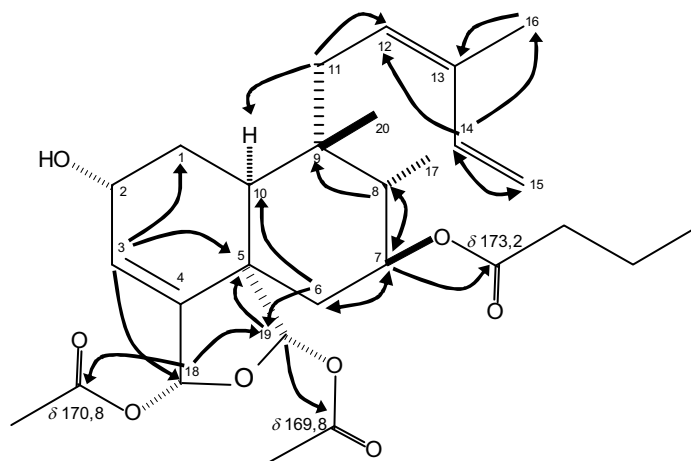


Figura 33: Principais correlações observadas nos mapas de contornos HMBC (setas simples) e COSY (setas duplas) para a casearina H.

5.2.2.4. (+)-CASEARGREWIINA F

O espectro de massas de alta resolução (HRTOF-ESIMS) da caseargrewiina F (pó branco) obtido no modo positivo apresentou picos relativos aos íons $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$ com valores de *m/z* de 527,2619 (calculado 527,2615) e 543,2362 (calculado 543,2355), concordantes com a fórmula empírica $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_8$ para o íon molecular. Os dados de RMN de ^{13}C e de ^1H para a caseargrewiina F mostraram-se muito semelhantes aos da casearina U, exceto pela substituição dos sinais referentes a 1 grupo butanoato pelos de 1 grupo acetato, diferença congruente com a encontrada para as fórmulas moleculares das substâncias. A banda de absorção no IV em 1.738 cm^{-1} e os sinais no espectro de RMN de ^{13}C em δ 169,8 (*s*), 170,5 (*s*) e 173,0 (*s*) confirmaram a presença de 2 grupos acetato e 1 butanoato na molécula, enquanto a banda larga de absorção no IV em 3.460 cm^{-1} e o sinal no espectro de RMN de ^{13}C em δ 72,5 (*d*; C-6) evidenciaram o grupo hidroxila.

As correlações observadas no mapa de contorno HMBC entre δ 5,73 (t, $J = 4,0$ Hz; H-2) e a carbonila do grupo butanoato [δ 173,0 (s)], o sinal em δ 7,43 (t, $J = 1,5$ Hz; H-18) e a carbonila do grupo acetato absorvendo em δ 170,5 (s) e, finalmente, entre δ 7,16 (s; H-19) e a carbonila do outro grupo acetato [δ 169,8(s)], permitiram a atribuição das posições dos grupos ésteres substituintes (Figura 34). O grupo hidroxila pôde então ser atribuído ao carbono carbinólico restante em C-6 [δ 72,5 (d)].

A caseargrewiina F é dextrorrotatória, com $[\alpha]_D^{20} = +55,1^\circ$ (MeOH, c 1,0), valor semelhante ao descrito na literatura - $[\alpha]_D^{28} = +68,3^\circ$ (KANOKMEDHAKUL; KANOKMEDHAKUL; BUAYAIRAKSA, 2007).

TININIS (2006) em seu trabalho de doutorado isolou de *C. sylvestris* a substância que chamou de casearina V, publicada no ano seguinte por outros autores (KANOKMEDHAKUL; KANOKMEDHAKUL; BUAYAIRAKSA, 2007) com o nome de caseargrewiina F, por ter sido isolada de *C. grewiifolia*.

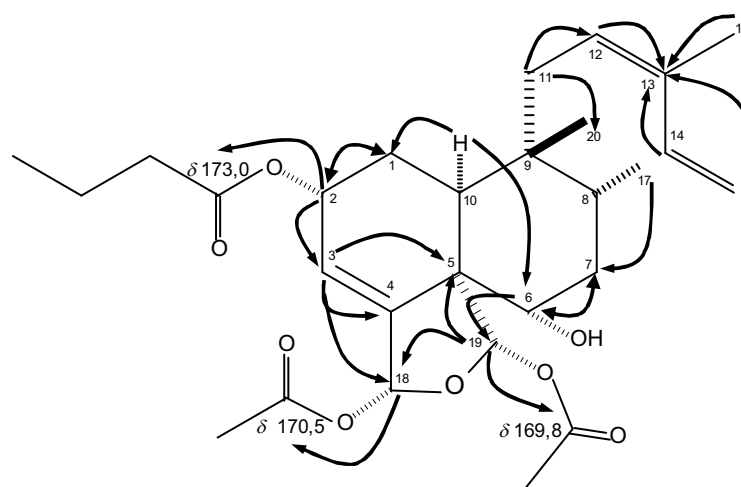


Figura 34: Principais correlações observadas nos mapas de contornos HMBC (setas simples) e COSY (setas duplas) para a caseargrewiina F.

Tabela 15: Dados espectrométricos de RMN de ^{13}C das **casearinas B, D e H**, e da **caseargrewiina F** obtidos a 125 MHz, em piridina-d5.

C	$\delta^{13}\text{C}$			
	casearina B	casearina D	casearina H	caseargrewiina F
1	26,4 <i>t</i>	31,1 <i>t</i>	30,2 <i>t</i>	27,4 <i>t</i>
2	73,0 <i>d</i>	63,7 <i>d</i>	63,7 <i>d</i>	67,0 <i>d</i>
3	126,5 <i>d</i>	127,5 <i>d</i>	127,3 <i>d</i>	121,3 <i>d</i>
4	141,5 <i>s</i>	142,6 <i>s</i>	142,4 <i>s</i>	147,4 <i>s</i>
5	53,7 <i>s</i>	55,0 <i>s</i>	50,5 <i>s</i>	54,5 <i>s</i>
6	74,9 <i>d</i>	74,8 <i>d</i>	35,1 <i>t</i>	72,5 <i>d</i>
7	73,4 <i>d</i>	76,5 <i>d</i>	72,4 <i>d</i>	37,8 <i>t</i>
8	41,5 <i>d</i>	41,8 <i>d</i>	41,5 <i>d</i>	37,4 <i>d</i>
9	40,0 <i>s</i>	40,1 <i>s</i>	40,3 <i>s</i>	38,3 <i>s</i>
10	37,6 <i>d</i>	36,6 <i>d</i>	34,5 <i>d</i>	36,7 <i>d</i>
11	30,9 <i>t</i>	31,0 <i>t</i>	31,1 <i>t</i>	29,7 <i>t</i>
12	127,0 <i>d</i>	127,8 <i>d</i>	127,4 <i>d</i>	128,1 <i>d</i>
13	134,5 <i>s</i>	134,3 <i>s</i>	134,2 <i>s</i>	133,7 <i>s</i>
14	134,2 <i>d</i>	134,0 <i>d</i>	134,4 <i>d</i>	134,1 <i>d</i>
15	115,0 <i>t</i>	114,7 <i>t</i>	114,7 <i>t</i>	114,3 <i>t</i>
16	20,4 <i>q</i>	20,5 <i>q</i>	20,5 <i>q</i>	20,4 <i>q</i>
17	11,4 <i>q</i>	11,8 <i>q</i>	11,2 <i>q</i>	15,8 <i>q</i>
18	95,9 <i>d</i>	97,3 <i>d</i>	95,5 <i>d</i>	97,1 <i>d</i>
19	98,3 <i>d</i>	99,3 <i>d</i>	99,9 <i>d</i>	98,8 <i>d</i>
20	25,8 <i>q</i>	26,1 <i>q</i>	26,2 <i>q</i>	25,2 <i>q</i>
OAc	21,3 <i>q</i>	21,8 <i>q</i>	21,3 <i>q</i>	21,1 <i>q</i>
OAc	170,5 <i>s</i>	169,7 <i>s</i>	169,8 <i>s</i>	169,8 <i>s</i>
OAc	21,3 <i>q</i>	----	21,4 <i>q</i>	21,7 <i>q</i>
OAc	170,8 <i>s</i>	----	170,8 <i>s</i>	170,5 <i>s</i>
OAc	21,6 <i>q</i>	----	----	----
OAc	169,6 <i>s</i>	----	----	----
OBu	14,1 <i>q</i>	13,9 <i>q</i>	14,1 <i>q</i>	13,7 <i>q</i>
OBu	19,0 <i>t</i>	18,9 <i>t</i>	19,2 <i>t</i>	18,9 <i>t</i>
OBu	36,5 <i>t</i>	36,7 <i>t</i>	36,8 <i>t</i>	36,4 <i>t</i>
OBu	173,1 <i>s</i>	173,5 <i>s</i>	173,2 <i>s</i>	173,0 <i>s</i>
OBu	----	14,1 <i>q</i>	----	----
OBu	----	19,1 <i>t</i>	----	----
OBu	----	36,8 <i>t</i>	----	----
OBu	----	173,7 <i>s</i>	----	----
OMe	57,1 <i>q</i>	----	----	----

Tabela 16: Dados espectrométricos de RMN de ^1H das **casearinas B, D e H**, e da **caseargrewiina F** obtidos a 500 MHz, em piridina-d₅.

C	$\delta^1\text{H}$			
	casearina B	casearina D	casearina H	caseargrewiina F
1	2,00-2,18 <i>m</i>	2,20 <i>dd</i> (13,5; 5,0)	2,22 <i>m</i>	2,05-2,10 <i>m</i>
2	3,95 <i>t</i> (4,0)	4,73 <i>sl</i>	4,70 <i>sl</i>	5,73 <i>t</i> (4,0)
3	6,38 <i>dl</i> (4,0)	6,48 <i>d</i> (3,5)	6,38 <i>d</i> (4,0)	6,33 <i>dl</i> (4,0)
4	----	----	----	----
5	----	----	----	----
6	5,64 <i>d</i> (10,5)	4,27 <i>d</i> (11,0)	1,67 <i>m</i> 2,28 <i>dd</i> (14,0; 5,0)	4,17 <i>dd</i> (11,0; 5,0)
7	5,59 <i>t</i> (10,5)	5,65 <i>t</i> (11,0)	5,18 <i>dd</i> (11,5; 5,0)	1,88-1,94 <i>m</i>
8	nd ¹	nd ¹	1,90 <i>m</i>	nd ¹
9	----	----	----	----
10	2,74 <i>dd</i> (13,5; 3,0)	2,99 <i>dd</i> (13,5; 3,5)	2,78 <i>dd</i> (13,5; 3,0)	2,74 <i>dd</i> (13,5; 3,5)
11	1,95 <i>dl</i> (16,0)	2,01 <i>m</i>	1,90 <i>m</i>	1,86-1,92 <i>m</i>
12	2,67 <i>dd</i> (16,0; 9,0)	2,69 <i>dd</i> (16,0; 8,0)	2,60 <i>dd</i> (16,0; 8,5)	2,48 <i>dd</i> (16,0; 9,0)
13	5,50 <i>dl</i> (9,0)	5,52 <i>dl</i> (8,0)	5,52 <i>dl</i> (8,5)	5,63 <i>dl</i> (9,0)
14	6,70 <i>dd</i> (17,0; 11,0)	6,68 <i>dd</i> (17,0; 11,0)	6,75 <i>dd</i> (17,5; 11,0)	6,80 <i>dd</i> (17,0; 11,0)
15	5,13 <i>d</i> (11,0)	5,11 <i>d</i> (11,0)	5,14 <i>d</i> (11,0)	5,12 <i>d</i> (11,0)
16	5,25 <i>d</i> (17,0)	5,22 <i>d</i> (17,0)	5,24 <i>d</i> (17,5)	5,25 <i>d</i> (17,0)
17	1,75 <i>sl</i>	1,73 <i>s</i>	1,72 <i>s</i>	1,83 <i>sl</i>
18	0,98 <i>d</i> (6,5)	1,03 <i>d</i> (6,5)	0,96 <i>d</i> (2,0)	0,88 <i>d</i> (6,0)
19	6,86 <i>t</i> (1,7)	7,43 <i>t</i> (1,5)	7,06 <i>t</i> (2,0)	7,43 <i>t</i> (1,5)
20	7,14 <i>s</i>	7,24 <i>s</i>	6,93 <i>s</i>	7,16 <i>s</i>
OAc	0,96 <i>s</i>	0,97 <i>s</i>	0,98 <i>s</i>	0,87 <i>s</i>
OAc	1,90 <i>s</i>	1,85 <i>s</i>	1,85 <i>s</i>	2,02 <i>s</i>
OAc	2,07 <i>s</i>	----	2,03 <i>s</i>	2,02 <i>s</i>
OAc	2,10 <i>s</i>	----	----	----
OBu	0,91 <i>t</i> (7,5)	0,83 <i>t</i> (7,5)	0,94 <i>t</i> (7,5)	0,88 <i>t</i> (7,0)
OBu	1,66 <i>m</i>	1,58 <i>m</i>	1,70 <i>m</i>	1,62 <i>m</i>
OBu	2,38 <i>m</i>	2,32 <i>m</i>	2,41 <i>t</i> (7,5)	2,18 <i>m</i>
OBu	----	0,91 <i>t</i> (7,5)	----	----
OBu	----	1,70 <i>m</i>	----	----
OBu	----	2,39 <i>m</i>	----	----
OMe	3,36 <i>s</i>	----	----	----

¹valor não determinado

5.2.3. (+)-9-HIDRÓXI-4-MEGASTIMEN-3-ONA

A substância 9-hidróxi-4-megastimen-3-ona foi purificada como um óleo levemente amarelo. Todos os espectros obtidos encontram-se nos Anexos 149 a 164. Seu espectro de massas de alta resolução (HRTOF-ESIMS) no modo positivo apresentou pico relativo ao íon $[M+Na]^+$ com valor de m/z de 233,1515 (calculado 233,1517), concordante com a fórmula empírica $C_{13}H_{22}O_2$ do íon molecular. O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 13 sinais identificados através da análise dos espectros de DEPT 135 e 90° como sendo referentes a 4 carbonos metílicos, 3 metilênicos, 3 metínicos e 3 quaternários (Tabela 17). Tais sinais apresentaram valores praticamente idênticos aos relatados para (+)-(6*R*,9*R*)-9-hidróxi-4-megastimen-3-ona, isolada de *Cestrum parqui* da família *Solanaceae* (D'ABROSCA et al., 2004). A banda de absorção no UV com $\lambda_{m\acute{a}x} = 245$ nm, valor também semelhante ao da literatura (D'ABROSCA et al., 2004), é consistente com a presença de uma cetona α,β -insaturada/ β -substituída em um anel de 6 átomos, o que é confirmado pelos sinais apresentados no espectro de RMN de ^{13}C em δ 198,7 (s), 125,6 (d) e 165,7 (s), atribuídos à carbonila, ao carbonos olefínicos metínico e quaternário, respectivamente. O sinal do hidrogênio olefínico absorvendo em δ 5,97 (s; H-4) apresentou correlação no mapa de contornos HMQC com o sinal em δ 125,6 (d; C-4).

Foram observadas correlações no mapa de contornos HMBC (Tabela 17 e Figura 35) entre os sinais dos hidrogênios δ 2,11 (d; $J = 17,0$ Hz; H-2_a) e 2,49 (d; $J = 17,0$ Hz; H-2_b) e o carbono da carbonila [δ 198,7 (s; C-3)]. Correlações do mesmo tipo entre δ 1,90 (d; $J = 1,2$ Hz; H-13) e os sinais de carbonos em δ 165,8 (s; C-5), 125,6 (d; C-4) e 51,5 (d; C-6), além do valor de $J = 1,2$ Hz observado para H-13 indicando seu acoplamento alílico com H-4, confirmaram a posição da metila C-13 [δ 24,6 (q)]. Os sinais em δ 0,99 (s; H-11) e 0,96 (s; H-12) foram atribuídos a 2 metilas ligadas a um carbono quaternário (C-1), a partir das correlações apresentadas entre H-11/H-12 e C-1 [δ 36,7 (s)], C-2 [δ 48,0 (t)] e C-6 [δ 51,5 (d)]. Ainda, na cadeia lateral formada por C-7 a C-10, a metila absorvendo em δ 1,36 (d; $J = 5,7$ Hz; H-10) apresentou correlação no mapa de contornos HMBC com o sinal do carbono carbinólico em δ 67,4 (d; C-9). A banda de absorção no IV observada em 3.443 cm^{-1} confirmou a presença do grupo hidroxila.

O valor obtido para a rotação óptica específica de 9-hidróxi-4-megastimen-3-ona foi de $[\alpha]_D^{20} = +39,0^\circ$ (MeOH; c 1,00). O valor descrito na literatura (D'ABROSCA et al., 2004) para (6*R*,9*R*)-9-hidróxi-4-megastimen-3-ona foi de $[\alpha]_D = +83,6^\circ$ (CHCl₂; c 0,61).

Tabela 17: Dados espectrométricos de RMN obtidos para a 9-hidróxi-4-megastimen-3-ona a 500 MHz para ¹H e a 125 MHz para ¹³C, em piridina-d₅.

C	$\delta^{13}\text{C}^1$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H} J$ (Hz) ¹	$\delta^1\text{H} J$ (Hz)	HMBC	COSY
1	36,2 s	36,7 s	----	----	----	----
2	47,1 t	48,0 t	2,39 d (16,9) 2,04 d (16,9)	2,11 d (17,0) 2,49 d (17,0)	198,7 198,7	----
3	199,6 s	198,7 s	----	----	----	----
4	125,1 d	125,6 d	5,84 s	5,97 s	----	1,90
5	165,8 s	165,7 s	----	----	----	----
6	51,1 d	51,5 d	nd ²	1,84 t (5,0)	----	----
7	26,2 t	27,0 t	nd	nd	----	----
8	38,6 t	39,9 t	nd	nd	----	----
9	68,0 s	67,4 d	3,78 m	3,96 m	----	1,36
10	24,6 q	24,7 q	1,21 d (6,3)	1,36 d (5,7)	39,9; 67,4	3,96
11	27,2 q	27,4 q	1,07 s	0,99 s	29,0; 36,7; 48,0; 51,5	----
12	28,8 q	29,0 q	1,02 s	0,96 s	27,4; 36,7; 48,0; 51,5	----
13	23,7 q	24,6 q	2,00 d (1,2)	1,90 d (1,2)	51,5; 125,6; 165,7	5,97

¹Dados de RMN da (6*R*,9*R*)-9-hidróxi-4-megastimen-3-ona obtidos em CDCl₃ à 125 e 500 MHz, respectivamente para ¹H e ¹³C (D'Abrosca et al., 2004)

²valor não determinado

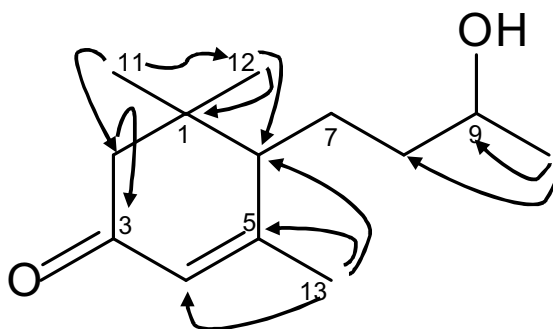


Figura 35: Principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC para 9-hidróxi-4-megastimen-3-ona.

9-hidróxi-4-megastimen-3-ona trata-se de um *nor*-isoprenóide C₁₃ (bissnorsesquiterpeno) volátil derivado biossinteticamente da degradação de

carotenóides e, por isso, chamado também de apocarotenóide. Esta classe de compostos ocorre geralmente na forma glicosilada e, após hidrólise, liberam a aglicona volátil. Também chamado na literatura de blumenol C (GALBRAITH; HORN, 1972) ou 3-oxo-7,8-diidro- α -ionol (SKOUROUMOUNIS; WINTERHALTER, 1994). Já foi isolado e/ou identificado em diversas espécies de interesse alimentar como *Laurus nobilis* (KILIC et al., 2005), *Prunus persica* (frutos) (AUBERT et al., 2003), *Vitis vinifera* (suco, vinho, folhas) (SKOUROUMOUNIS; WINTERHALTER, 1994), suco de manga (SAKHO et al., 1997), *Passiflora edulis* (suco) (WINTERHALTER, 1952), madeira de carvalho utilizada para envelhecer vinho (SEFTON et al., 1990), além de *Nicotiana tabacum* (AASEN et al., 1974).

5.3. HIDRÓLISE BÁSICA DA CASEARGREWIINA F

A fase orgânica da partição líquido-líquido do produto reacional da hidrólise básica da caseargrewiina F forneceu 89,3 mg de um pó branco, chamado de caseargrewiina Fhb. A análise em CLAE-DAD da caseargrewiina Fhb (Figura 36) demonstrou pureza de 99,0% no UV (235 nm) para esta substância.

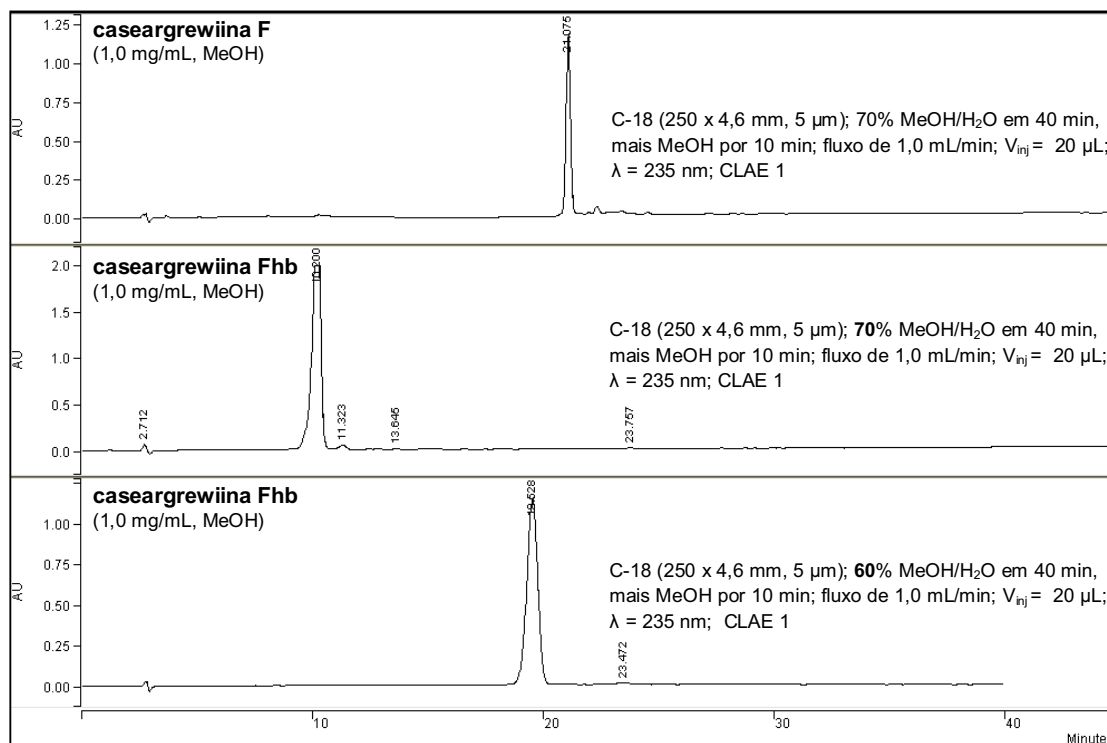


Figura 36: Cromatogramas analíticos da caseargrewiina F e da caseargrewiina Fhb.

Todos os espectros obtidos para a caseargrewiina Fhb encontram-se nos Anexos 165 a 186. Seu espectro de massas de alta resolução (HRTOF-ESIMS) obtido no modo positivo apresentou pico relativo ao íon $[M+Na]^+$ com valor de m/z de 355,1878 (calculado 355,1880), concordante com a fórmula empírica $C_{20}H_{28}O_4$ para o íon molecular. Seu espectro de RMN de ^{13}C apresentou 20 sinais caracterizando a estrutura diterpênica. Na região de menor frequência de absorção dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT90 e 135°, apenas 3 sinais puderam ser atribuídos a metilas, sendo 2 do anel decalínico, nas posições 8 [δ 16,1 (q ; C-17)] e 9 [δ 25,4 (q ; C-20)], e 1 da cadeia lateral [δ 20,5 (q ; C-16)]. A determinação estrutural com base nos

experimentos de RMN uni (^1H , ^{13}C , NOESY1D, DEPT90 e $^{135}^\circ$) e bidimensionais (HMQC, COSY e HMBC) foi realizada de maneira muito semelhante ao discutido para a casearina U e caseargrewiina F com relação às sub-estruturas do anel decalínico (A e B, C-1 a C-10) e da cadeia lateral em C-9. A banda de absorção no UV com $\lambda_{\text{máx}} = 235$ nm confirmou a presença do dieno na cadeia lateral e o efeito nuclear Overhauser (NOESY1D) observado entre H-12 [δ 5,49 (*tt*; $J = 6,5$ Hz)] e H-16 [δ 1,76 (*ss*)] determinou a configuração Z da ligação dupla em C-12.

Nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da caseargrewiina Fhb não foram observados os sinais de hidrogênios e carbonos metílicos dos 2 grupos acetato, nem metílico e metilênicos do grupo butanoato. Além disso, notou-se a ausência dos sinais dos hidrogênios e carbonos acetálicos (posições 18 e 19), absorvendo em cerca de δ 95,0-99,0 e 6,90-7,50, respectivamente. As correlações observadas no mapa de contornos HMBC de δ 5,22 (*d*, $J = 8,5$ Hz ; H-19) e δ 7,27 (*d*, $J = 3,5$ Hz ; H-3) com a carbonila absorvendo em δ 171,7 (*s*; C-18) indicaram a presença de uma lactona no anel C, substituindo o sistema diacetálico. A absorção de H-3 em maior frequência na caseargrewiina Fhb deve-se à desblindagem produzida neste hidrogênio pela conjugação da ligação dupla com a carbonila. A banda de absorção no IV em 1.742 cm^{-1} é coerente com a presença de uma carbonila α,β -insaturada. Finalmente, 2 hidroxilas foram atribuídas aos carbonos absorvendo no espectro de RMN de ^{13}C em δ 63,8 (*d*; C-2) e 72,4 (*d*; C-6).

A estereoquímica relativa dos 7 centros estereogênicos pôde ser determinada de maneira semelhante ao discutido para a casearina U, considerando-se os dados de RMN de ^{13}C , os valores de J (RMN de ^1H) e as correlações observadas no experimento de NOESY1D. Além disso, segundo a proposta mecanística apresentada na Figura 38, a reação de formação da caseargrewiina Fhb foi produzida com retenção da configuração original dos centros estereogênicos.

A caseargrewiina Fhb é uma substância cuja estrutura química é inédita na literatura. Beutler et al. (2000a) produziram um derivado da casearborina D, estereoisômero da caseargrewiina Fhb, que possui configuração *E* na ligação dupla em C-12. Desta forma, os dados de RMN de ^{13}C das 2 substâncias diferem significativamente apenas com relação aos carbonos nas posições 14, 15 e 16, sendo o restante dos dados congruentes com a estrutura molecular proposta para a caseargrewiina Fhb.

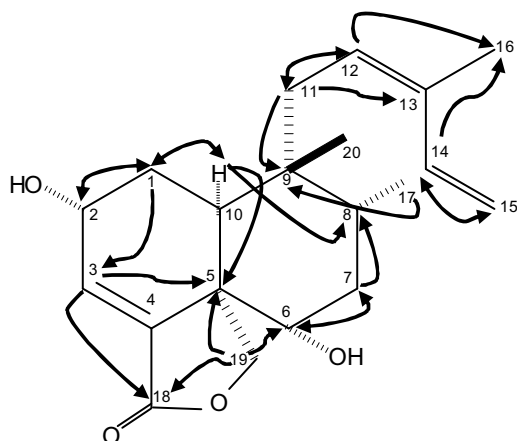


Figura 37: Principais correlações observadas nos mapas de contornos HMBC (setas simples) e COSY (setas duplas) para a caseargrewiina Fhb.

Tabela 18: Dados espectrométricos de RMN obtidos para a caseargrewiina Fhb a 500 MHz para ^1H e a 125 MHz para ^{13}C , em piridina- d_5 .

C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (J Hz)	HMBC	COSY	NOESY1D
1	30,8 <i>t</i>	2,10 <i>m</i>	41,1; 48,8; 63,8	2,38; 4,72	----
2	63,8 <i>d</i>	4,72 <i>sl</i>	----	2,10	2,10
3	135,7 <i>d</i>	7,27 <i>d</i> (3,5)	30,8; 48,8; 171,7	----	----
4	137,1 <i>s</i>	----	----	----	----
5	48,8 <i>s</i>	----	----	----	----
6	72,4 <i>d</i>	4,18 <i>dl</i> (11,0)	----	1,82	2,10
7	37,3 <i>t</i>	1,82 <i>m</i>	16,1; 36,7; 48,8; 72,4	4,18	----
8	36,7 <i>d</i>	nd	----	----	----
9	38,7 <i>s</i>	----	----	----	----
10	41,1 <i>d</i>	2,38 <i>dd</i> (10,0; 7,0)	30,8; 36,7; 38,7; 48,8; 63,8; 72,4	2,10	4,13; 5,49
11	30,9 <i>t</i>	2,20 <i>dd</i> (17,3; 6,5)	38,7; 127,6; 134,6	5,49	----
12	127,6 <i>d</i>	5,49 <i>tl</i> (6,5)	20,5; 134,5	2,20	1,76; 2,38; 4,13
13	134,6 <i>s</i>	----	----	----	----
14	134,5 <i>d</i>	6,90 <i>dd</i> (17,0; 11,0)	20,5; 127,6; 134,6	5,17; 5,28	----
15	114,9 <i>t</i>	5,17 <i>d</i> (11,0) 5,28 <i>d</i> (17,0)	134,5 134,5	6,90 6,90	----
16	20,5 <i>q</i>	1,76 <i>sl</i>	127,6; 134,5	----	----
17	16,1 <i>q</i>	0,87 <i>d</i> (7,0)	38,7	----	----
18	171,7 <i>s</i>	----	----	----	----
19	74,3 <i>t</i>	4,13 <i>d</i> (8,5) 5,22 <i>d</i> (8,5)	41,1; 48,8; 72,4 48,8; 72,4; 137,1; 171,7	5,22 4,13	----
20	25,4 <i>q</i>	0,96 <i>s</i>	30,9; 36,7; 38,7; 41,1	----	----

¹valor não determinado

5.3.1. PROPOSTA MECANÍSTICA DA HIDRÓLISE BÁSICA DA CASEARGREWIINA F

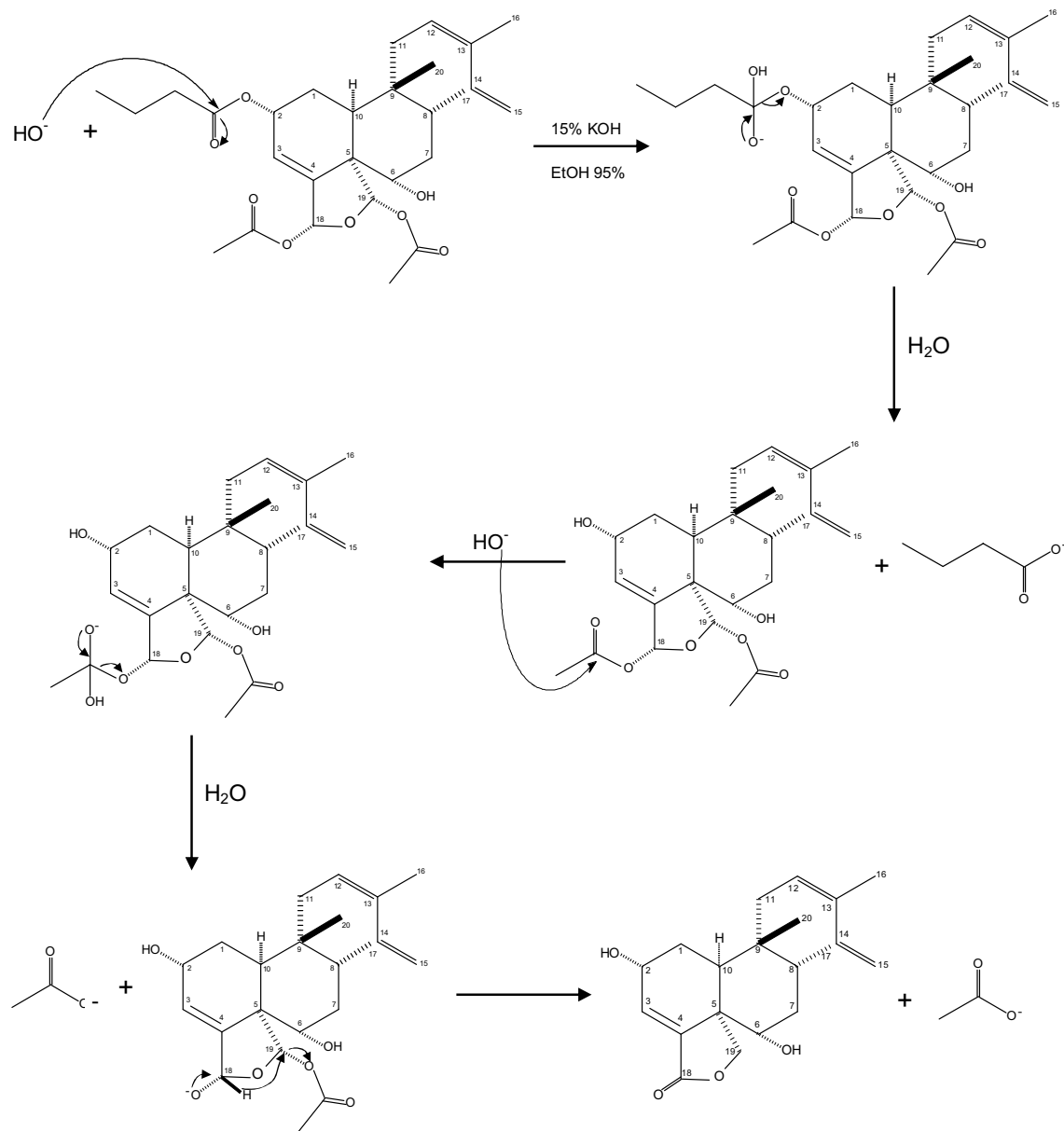


Figura 38: Proposta mecanística da hidrólise básica da caseargrewiina F.

5.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA

A Tabela 19 apresenta os resultados dos ensaios farmacológicos realizados. O extrato EtOH, administrado na dose equivalente à DE₅₀ encontrada por Basile et al. (1990), inibiu completamente a formação de úlceras nos animais. A mesma atividade foi verificada para a fração EFS2 na dose de 15,5 mg/kg. As frações EFS1 e EFS2 não inibiram o desenvolvimento das úlceras. A dose mínima efetiva 100% para a casearina U foi determinada: DE₁₀₀ = 1,68 mg/kg de peso corporal. Com a administração desta mesma dose as casearinas B, D, O¹ e a caseargrewiina F também produziram inibição total da formação de úlceras. Ainda, a caseargrewiina Fhb não apresentou atividade antiulcerogênica, sugerindo a importância do sistema diacetálico ou de um derivado biológico deste sistema para a ação farmacológica.

Tabela 19: Resultados dos ensaios de atividade antiulcerogênica.

ENSAIO	AMOSTRA	DOSE ¹	ÚLCERAS
1	extrato etanólico seco	57,5 mg/kg	zero
2	EFS1	7,5 mg/ kg	idem controle ²
2	EFS2	15,5 mg/ kg	zero
2	EFS3	6,3 mg/ kg	idem controle
3	casearina U	5,75 mg/ kg	zero
4	casearina U	5,75 mg/ kg	zero
4	casearina U	3,83 mg/ kg	zero
4	casearina U	2,56 mg/ kg	zero
4	casearina U	1,70 mg/ kg	91% de inibição
4	casearina U	1,14 mg/ kg	50% de inibição
5	casearina U	2,56 mg/ kg	zero
5	casearina U	2,23 mg/ kg	zero
5	casearina U	1,94 mg/ kg	zero
5	casearina U	1,68 mg/ kg	zero
6	casearina D	1,68 mg/kg	zero
6	casearina B	1,68 mg/kg	zero
6	casearina O ³	1,68 mg/kg	zero
6	caseargrewiina F	1,68 mg/kg	zero
6	caseargrewiina Fhb	1,68 mg/kg	idem controle

¹ dose = mg de amostra por kg de peso corporal dos animais

² todos os animais utilizados como controle negativo apresentaram várias áreas de ulceração no estômago, consideradas em cada ensaio como 100% de ulceração.

³ a casearina O foi purificada nos laboratórios do NuBBE em 2004 pela aluna de iniciação científica Carla Cristina Perez, orientada pelo Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro.

Com a administração da casearina U nas doses de 30,0, 65,0 e 172,0 mg/kg de peso corporal não foram observadas alterações comportamentais ou de peso nos animais submetidos ao teste de toxicidade aguda via oral (dose única). Cabe ressaltar que a dose de 172,0 mg/kg é cerca de 100 vezes maior do que a DE_{100} para a ação antiulcerogênica da casearina U (1,68 mg/kg).

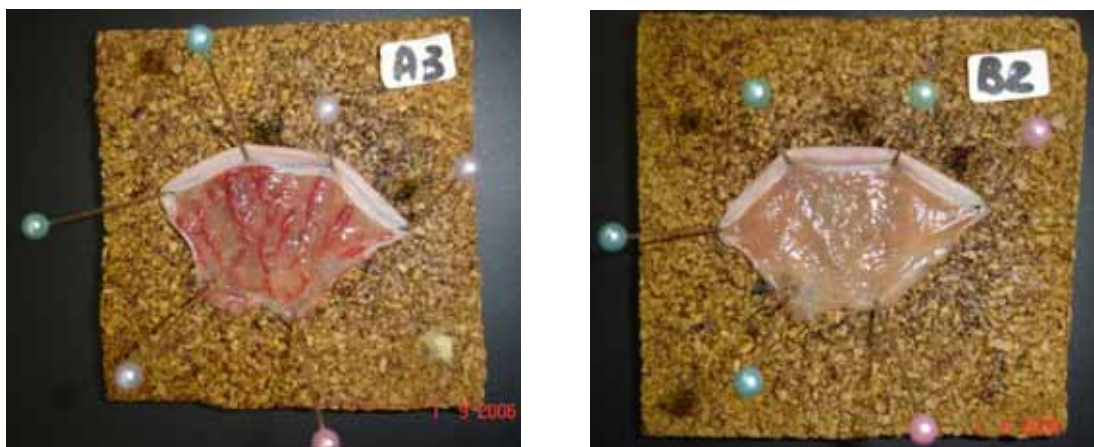


Figura 39: Fotografias dos estômagos dos ratos após ensaio de ação antiulcerogênica: A3 – animal do grupo controle; B2 – animal do grupo tratado com casearina U, 1,68 mg/Kg de peso corporal (ensaio 5, Tabela 19).

5.5. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR CLAE DE DITERPENOS CLERODÂNICOS TÍPICOS DE *Casearia* NO EXTRATO EtOH

5.5.1. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CASEARINA U NO EXTRATO EtOH

A curva de calibração (Figura 40) foi construída com os dados das áreas dos picos dos cromatogramas da casearina U solução padrão (sub-fração 15FACT2(G), 0,5 mg/mL; V_{inj} = 10, 20, 30, 40 e 50 μ L) e respectivas massas de casearina U, calculadas a partir dos V_{inj} e de sua concentração. No cálculo das massas de casearina U foi considerada sua pureza cromatográfica média (77,2%; 5 injeções). A curva de calibração apresentou boa linearidade ($R^2 = 0,9996$) no intervalo de massas analisado.

Tabela 20: Dados obtidos das análises em CLAE-UV da casearina U para construção da curva de calibração.

V_{inj} (μ L)	t_{R} (min)	MASSA 15FACT2(G) (mg)	ÁREA DOS PICOS	PUREZA ¹ casearina U (%)	MASSA ² casearina U (mg)
10	68,9	0,005	8.036.891	73,5	0,0037
20	68,8	0,010	16.361.174	76,4	0,0076
30	68,7	0,015	24.622.974	78,3	0,0118
40	68,5	0,020	32.864.160	78,5	0,0157
50	68,5	0,025	40.586.408	79,3	0,0198

¹pureza cromatográfica em porcentagem calculada a partir da área do pico da casearina U no cromatograma em relação à área total dos picos, para cada análise.

²massa de casearina U calculada considerando-se o valor médio de sua pureza cromatográfica (77,2%).

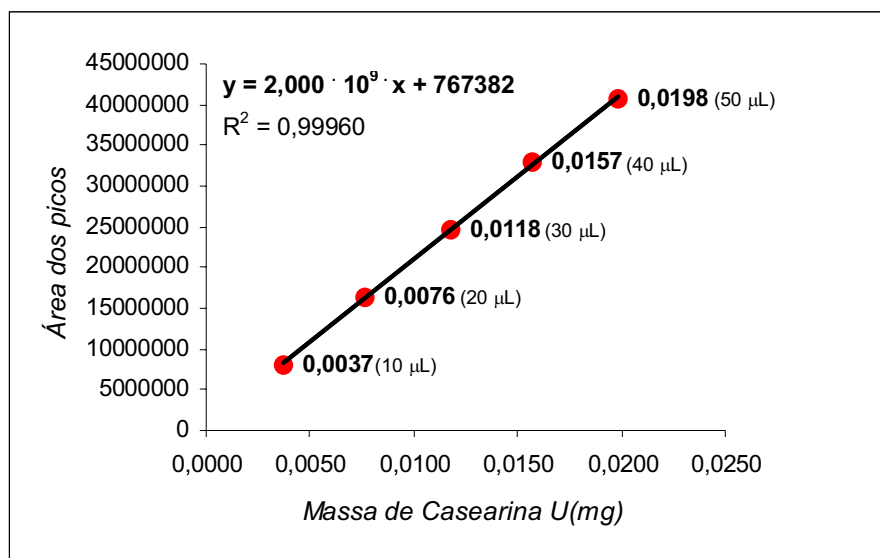


Figura 40: Gráfico das massas de casearina U relativas aos volumes injetados pelas áreas dos picos dos cromatogramas (curva de calibração).

A média dos valores das áreas dos picos com t_R igual ao da casearina U nos 2 cromatogramas do extrato EtOH aplicada na equação do gráfico da Figura 40, forneceu um valor de massa de casearina U igual a 0,0141mg, representando 8,60% da massa do extrato analisado (0,164mg, Tabela 21). O valor da massa de casearina U obtida nas análises do extrato EtOH encontra-se dentro do intervalo de massas da curva de calibração.

Tabela 21: Dados obtidos na quantificação da casearina U no extrato EtOH.

INJEÇÃO	V_{inj} (µL)	MASSA ¹ extrato (mg)	t_R casearina U (min)	ÁREA DO PICO casearina U	MASSA ² casearina U (mg)
1	20	0,164	68,5	28.946.484	0,0141mg
2			68,4	28.916.772	0,0141mg

¹massa calculada a partir do V_{inj} e da concentração do extrato EtOH (8,20 mg/mL), considerando-se sua massa antes do pré-tratamento.

²massa calculada a partir dos valores das áreas dos picos dos cromatogramas com t_R igual ao da casearina U no extrato aplicados na equação obtida do gráfico (Figura 40).

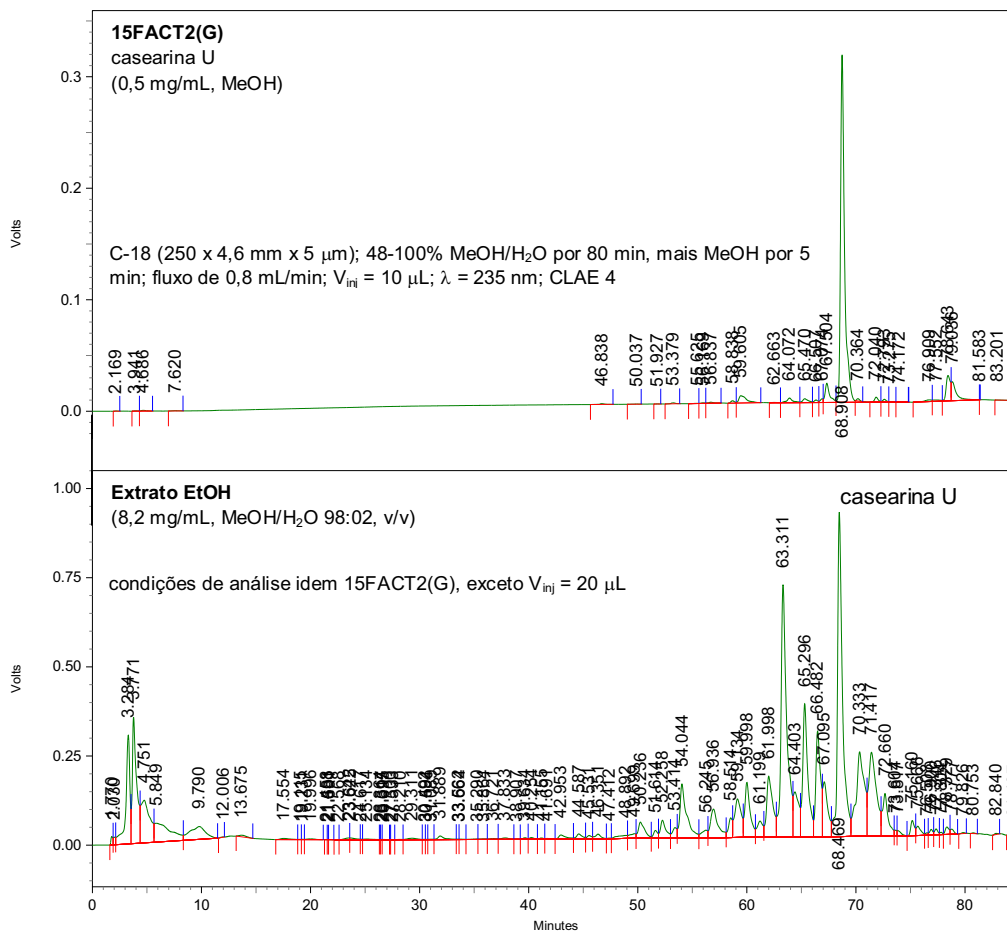


Figura 41: Identificação e quantificação por CLAE-UV da casearina U no extrato EtOH: cromatogramas de 15FACT2(G) e do extrato EtOH.

5.5.2. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CASEARGREWIINA F E DE DITERPENOS TOTAIS DO TIPO DAS CASEARINAS ($\lambda_{\text{máx}} = 231\text{-}235 \text{ nm}$) EM RELAÇÃO À CASEARGREWIINA F NO EXTRATO EtOH

A curva de calibração da caseargrewiina F, construída a partir dos valores das áreas dos picos desta substância nos cromatogramas e de suas concentrações (Tabela 22), é apresentada na Figura 42. As concentrações das soluções padrões de caseargrewiina F foram corrigidas considerando-se sua pureza média cromatográfica (95,0 %; Tabela 22).

Tabela 22: Dados obtidos das análises em CLAE-DAD da caseargrewiina F para construção da curva de calibração.

CONCENTRAÇÃO inicial (mg/mL, MeOH)	t _R ¹ (min)	ÁREA DOS PICOS ¹	PUREZA ^{1,2} (%)	CONCENTRAÇÃO ³ corrigida (mg/mL, MeOH)
0,007938	18,9 (0,0)	2.180.852 (59.606)	----- ⁴	0,00754
0,015875	18,8 (0,0)	4.179.264 (27.359)	----- ⁴	0,01508
0,0635	18,8 (0,0)	17.550.797 (153.435)	93,9 (1,9)	0,06033
0,2540	19,3 (0,2)	69.460.016 (1.133.089)	94,4 (0,7)	0,2413
0,5080	19,5 (0,2)	135.261.387 (409.933)	96,4 (0,5)	0,4826

¹média de 3 análises (desvio padrão)

²pureza cromatográfica calculada a partir da porcentagem relativa da área do pico da caseargrewiina F em relação à área total dos picos, para cada análise.

³concentração de caseargrewiina F calculada considerando-se o valor médio de sua pureza cromatográfica (95,0%).

⁴não foi considerada a pureza cromatográfica destas amostras devido à concentração das impurezas abaixo da sensibilidade do método.

A quantificação de diterpenos totais do tipo das casearinas em relação à caseargrewiina F foi realizada considerando-se os picos dos cromatogramas com banda no espectro no UV semelhante à observada para estas substâncias (Figura 12, Item 1.1), com $\lambda_{\text{máx}} = 231\text{-}235 \text{ nm}$. O interesse no conhecimento do teor desta classe de metabólitos no extrato EtOH deve-se a sugestão de sua utilização como marcadores químicos em *C. sylvestris*, como justificado a seguir:

- as casearinas e outros diterpenos de *Casearia* apresentaram diversas atividades farmacológicas verificadas para extratos, incluindo a atividade antiulcerogênica discutida neste trabalho;

- estes diterpenos são típicos no gênero, servindo como marcadores quimiotaconômicos para o táxon *Casearia*;

- as casearinas e outros diterpenos clerodânicos podem ser analisadas por técnicas recomendadas no controle de qualidade de fitoterápicos e insumos vegetais como CCDC e CLAE-UV, conforme descrito neste e em outros trabalhos.

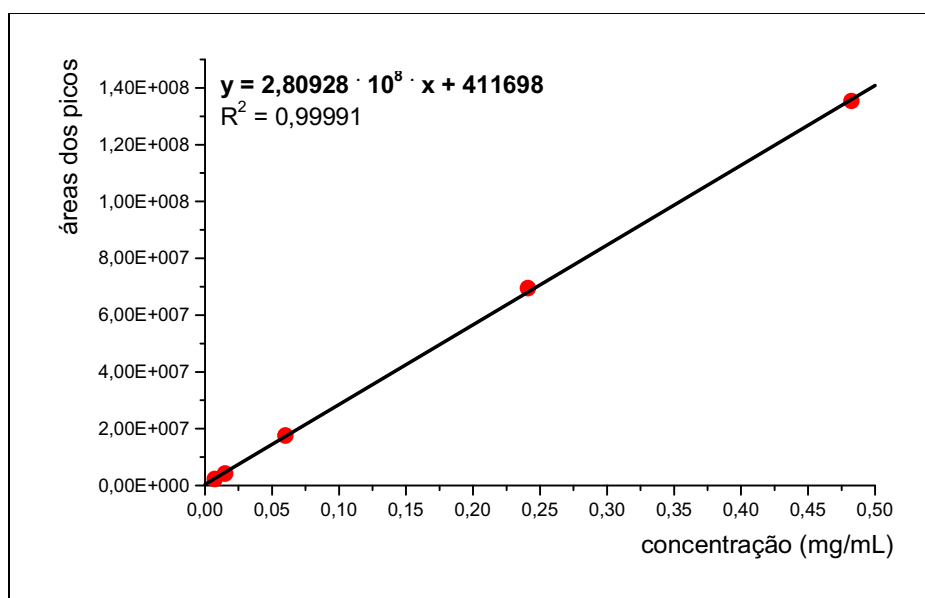


Figura 42: Gráfico das concentrações de caseargrewiina F e das áreas dos picos dos cromatogramas (curva de calibração).

Foram observados nos cromatogramas do extrato EtOH 24 picos considerados de diterpenos do tipo das casearinas. Além destes, notou-se a presença de 1 pico nos cromatogramas com espectro no UV com 2 bandas absorvendo em cerca de 235 e 338 nm e outros 2 com valor de $\lambda_{máx}$ de cerca de 215 nm.

A partir da equação da curva de calibração (Figura 42) e dos dados obtidos da análise do extrato EtOH em triplicata (Tabela 23) pôde-se calcular as concentrações de caseargrewiina F e de diterpenos totais do tipo das casearinas no extrato EtOH, cujos valores encontrados foram de 4,00 % (m/m; massas obtidas a partir da concentração do extrato EtOH e da concentração calculada de

caseargreina F - 0,0981 mg/mL) e 18,08 % (m/m; massas obtidas a partir da concentração do extrato EtOH e da concentração calculada de diterpenos totais - 0,4477 mg/mL), respectivamente.

Tabela 23: Dados obtidos na quantificação de diterpenos totais do tipo das casearinas em relação à caseargreina F no extrato EtOH.

INJEÇÃO	t _R caseargreina F (min)	ÁREA DO PICO caseargreina F	ÁREAS DOS PICOS diterpenos
1	19,9	27.960.132	126.744.177
2	19,8	28.140.908	125.551.291
3	19,6	27.828.056	126.272.701
MÉDIA (desvio padrão)	19,8 (0,2)	27.976.365 (157.056)	126.189.390 (600.791)

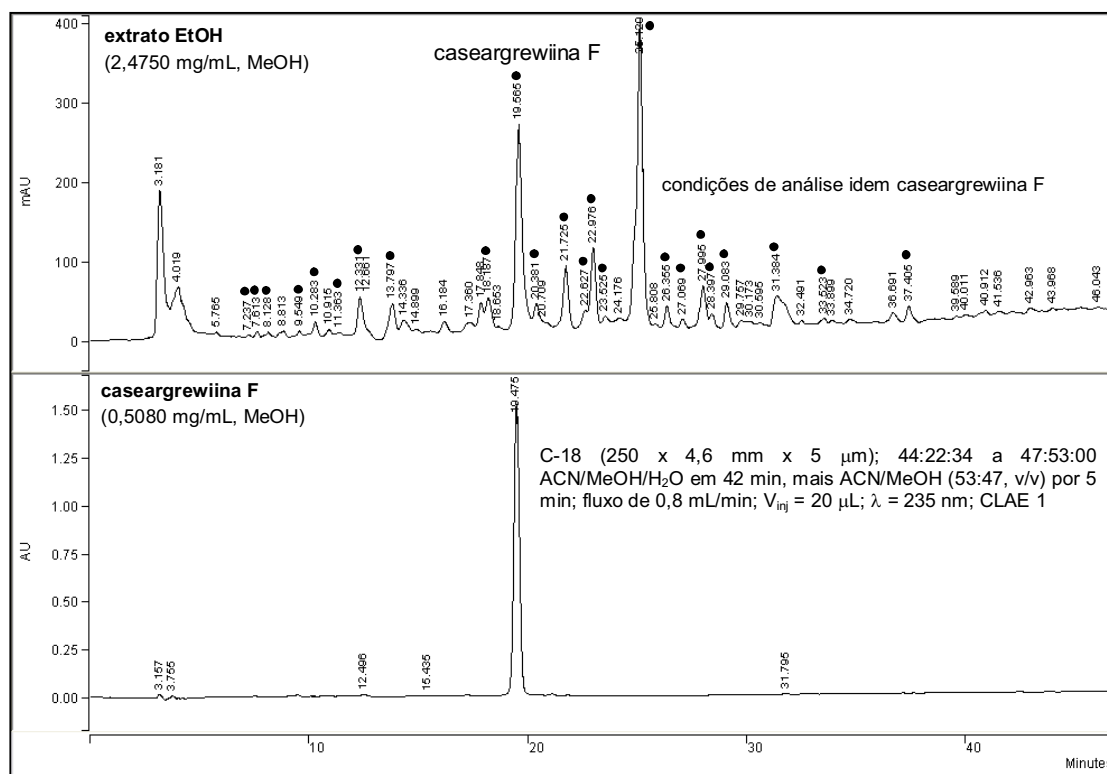


Figura 43: Análise quantitativa em CLAE-DAD de diterpenos totais em relação à caseargreina F no extrato EtOH: cromatogramas do extrato EtOH e da caseargreina F. Os símbolos (•) indicam picos considerados de diterpenos do tipo das casearinas no cromatograma do extrato EtOH.

A casearina B também foi identificada no extrato EtOH. No cromatograma do extrato EtOH apresentado na Figura 44 foi possível identificar os picos relativos a 3 dos diterpenos purificados: caseargreina F e as casearinas B e U. A casearina O (obtida em nosso laboratório de outro extrato de *C. sylvestris*, ver Item 5.2 na Metodologia Experimental) não foi identificada no extrato EtOH.

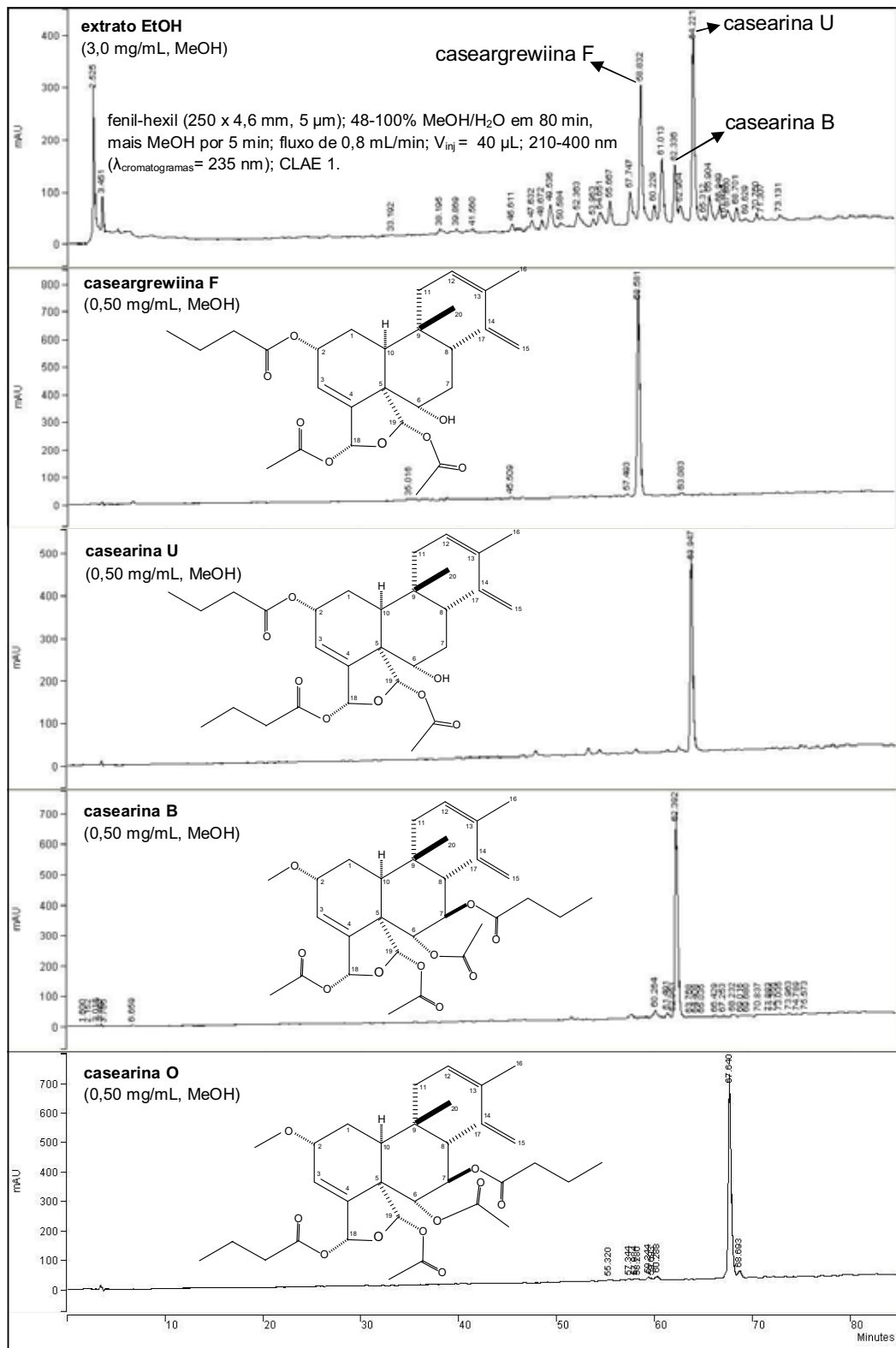


Figura 44: Identificação de diterpenos por CLAE-DAD no extrato EtOH: cromatogramas do extrato EtOH, da caseargrewiina F e das casearinas U, B e O, respectivamente.

5.6. IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS PRESENTES NA FRAÇÃO EFS1 POR CG-EM

As frações EFS(A)1 e EFS(B)1, eluídas com Hex/AcOEt 95:05 (v/v) na EFS e contendo os componentes de menor polaridade do extrato EtOH, foram obtidas como um óleo amarelo com odor pronunciado e semelhante ao do óleo essencial das folhas de *C. sylvestris*. Com o objetivo de investigar a presença de componentes do óleo essencial no extrato das folhas de *C. sylvestris*, a fração EFS(B)1 foi analisada por CG-EM.

A identificação de constituintes químicos voláteis foi realizada através da comparação dos índices de retenção (índice de Kovats) e dos espectros de massas com dados da literatura. Os índices de retenção foram calculados a partir dos t_R dos analitos na fração EFS(B)1 e dos t_R dos hidrocarbonetos (C-9 a C-32) da solução padrão e os valores obtidos foram comparados aos descritos por Adams (1995). Os dados espectrométricos obtidos foram comparados com os disponíveis na biblioteca Wiley 7.0 (espectros de massas nas Figuras 46 a 49).

A análise dos resultados (Tabela 23) indica a predominância de sesquiterpenos no cromatograma de íons totais (TIC) da fração EFS(B)1 (Figura 45). Ao todo foram identificados 15 sesquiterpenos, dos quais 13 já haviam sido identificados no óleo essencial das folhas de *C. sylvestris* (Item 2.4, Introdução). Apenas α -curcumeno e viridifloreno não foram identificados no óleo essencial. Algumas ações farmacológicas exibidas pelo extrato de folhas como antiulcerogênica, antiinflamatória, antimicrobiana e citotóxica, também foram verificadas para óleo essencial de folhas (Item 2.5, Introdução). No entanto, a fração EFS(B)1 não apresentou ação antiulcerogênica. ESTEVES et al. (2005) verificaram esta atividade para o óleo essencial que também apresentou como componentes principais sesquiterpenos, sendo o mais abundante bicilogermacreno (40,9 %). Aparentemente estes resultados são contraditórios. Dentre os sesquiterpenos, diversas lactonas sesquiterpênicas apresentaram ação antiulcerogênica (DIAS et al., 2001; YESILADA et al., 2004). Novos estudos sobre a ação antiulcerogênica do óleo essencial e a quantificação dos sesquiterpenos no extrato EtOH podem fornecer informações importantes para a padronização do extrato EtOH.

Tabela 24: Dados obtidos das análises por CG-EM da fração EFS(B)1.

SUBSTÂNCIA IDENTIFICADA (F.M.)	t _R (min)	ÍNDICE DE KOVATS calculado	ÍNDICE DE KOVATS literatura ¹	SIMILARIDADE EM ² (%)	TEOR RELATIVO (%)
<i>β</i> -elemeno (C ₁₅ H ₂₄)	22,58	1386	1391	97	1,34
<i>α</i> -gurjuneno (C ₁₅ H ₂₄)	23,43	1406	1409	92	0,72
<i>trans</i> -cariofileno (C ₁₅ H ₂₄)	23,78	1414	1418	96	5,98
aromadendreno (C ₁₅ H ₂₄)	24,55	1433	1439	94	0,99
<i>α</i> -humuleno (C ₁₅ H ₂₄)	25,25	1450	1454	94	0,95
germacreno D (C ₁₅ H ₂₄)	26,31	1476	1480	95	3,46
<i>α</i> -curcumeno (C ₁₅ H ₂₂)	26,41	1478	1483	95	8,49
<i>β</i> -selineno (C ₁₅ H ₂₄)	26,63	1483	1485	95	2,33
viridifloreno (C ₁₅ H ₂₄)	26,72	1486	1493	94	1,14
biciclogermacreno (C ₁₅ H ₂₄)	26,91	1490	1494	92	8,59
<i>γ</i> -cadineno (C ₁₅ H ₂₄)	27,62	1508	1513	95	1,99
<i>δ</i> -cadineno (C ₁₅ H ₂₄)	27,84	1514	1524	95	1,15
germacreno B (C ₁₅ H ₂₄)	29,37	1552	1556	96	2,02
espatulenol (C ₁₅ H ₂₄ O)	30,12	1572	1576	95	17,51
óxido de cariofileno (C ₁₅ H ₂₄ O)	30,28	1576	1581	96	2,80

¹valores obtidos de Adams (1995).

²similaridade entre espectros de massas do analito e da base de dados Wiley 7.0.

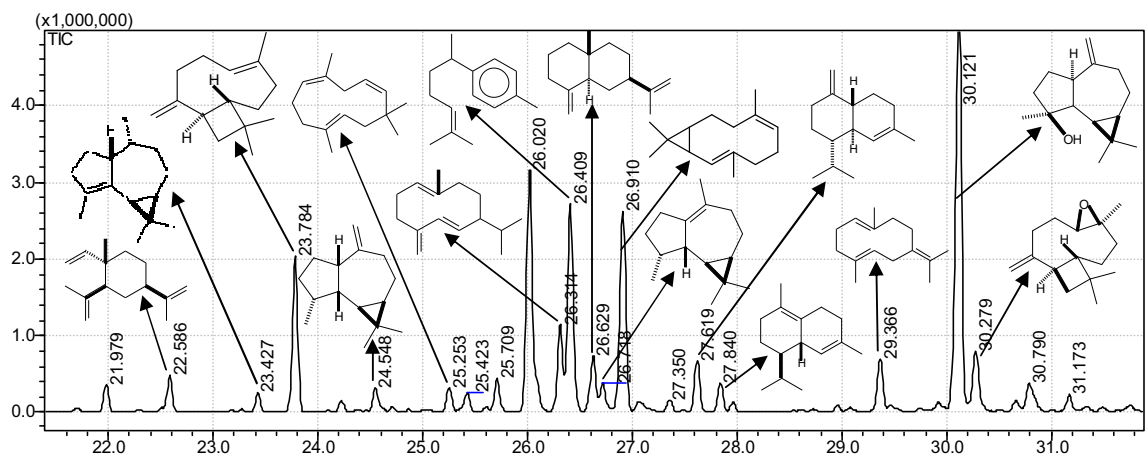
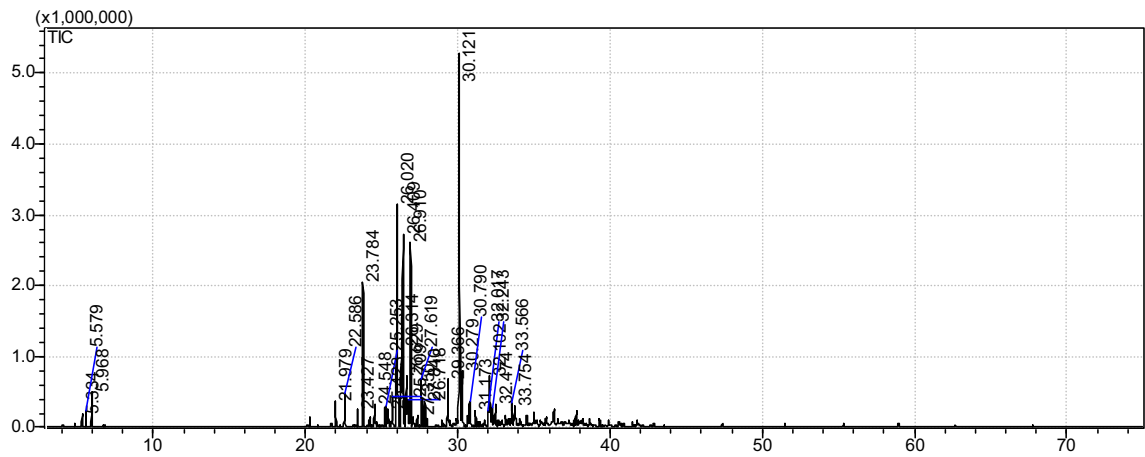


Figura 45: Cromatograma (TIC) de EFS(B)1 obtido em CG-EM (acima) e expansão com estruturas químicas dos sesquiterpenos identificados (abaixo).

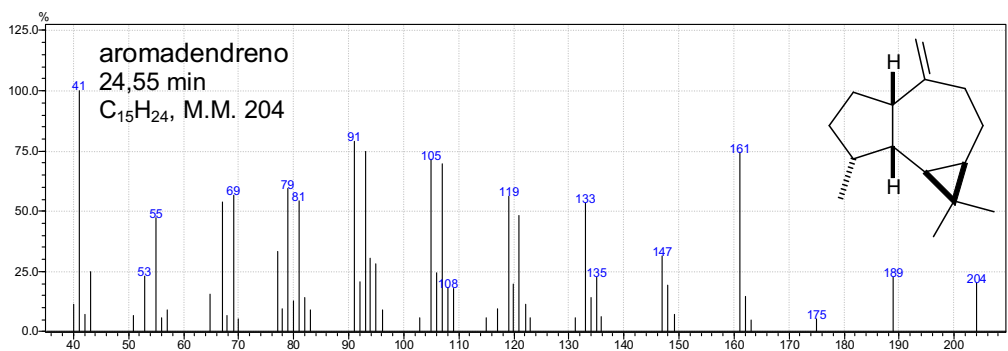
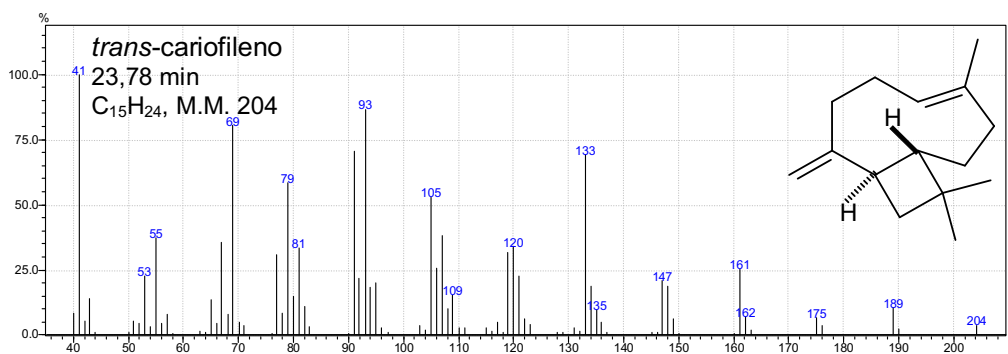
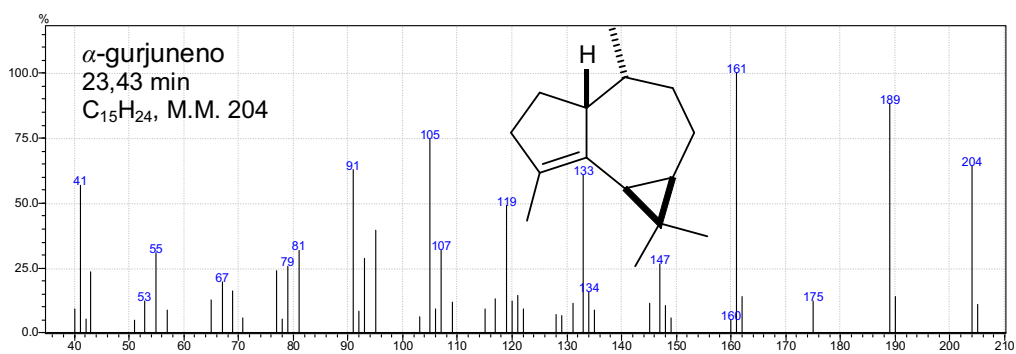
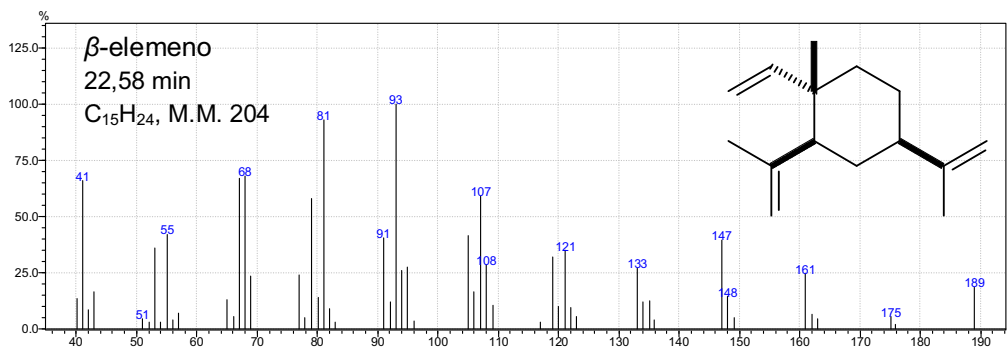


Figura 46: Espectros de massas das substâncias identificadas por CG-EM: *β*-elemeno, *α*-gurjuneno, *trans*-cariofileno e aromadendreno.

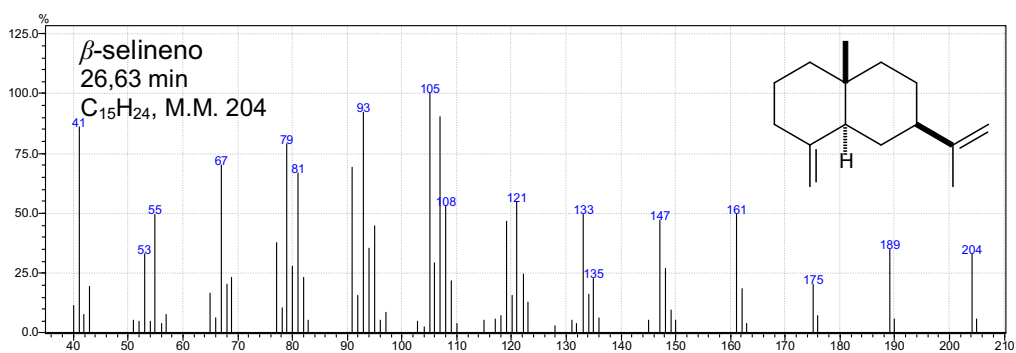
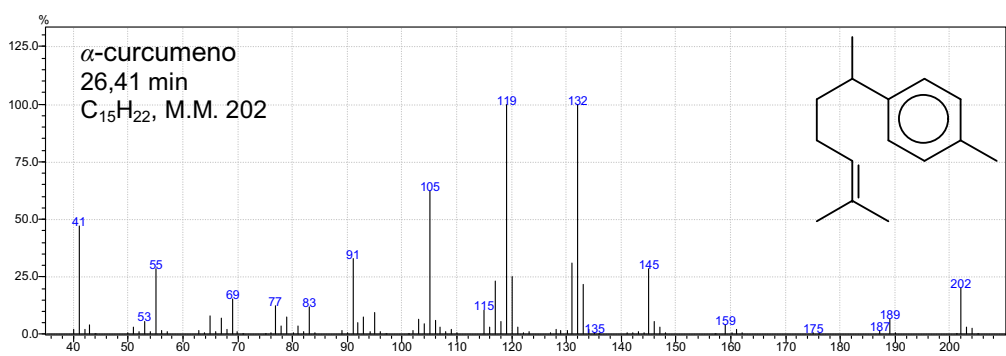
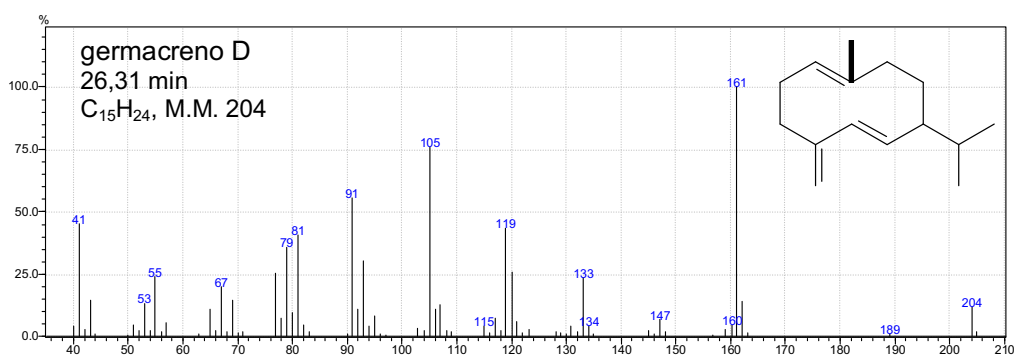
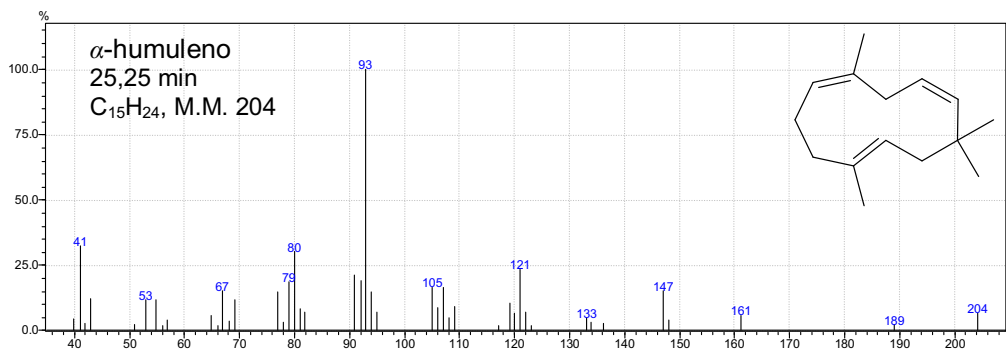


Figura 47: Espectros de massas das substâncias identificadas por CG-EM: *α*-humuleno, germacreno D, *α*-curcumeno e *β*-selineno.

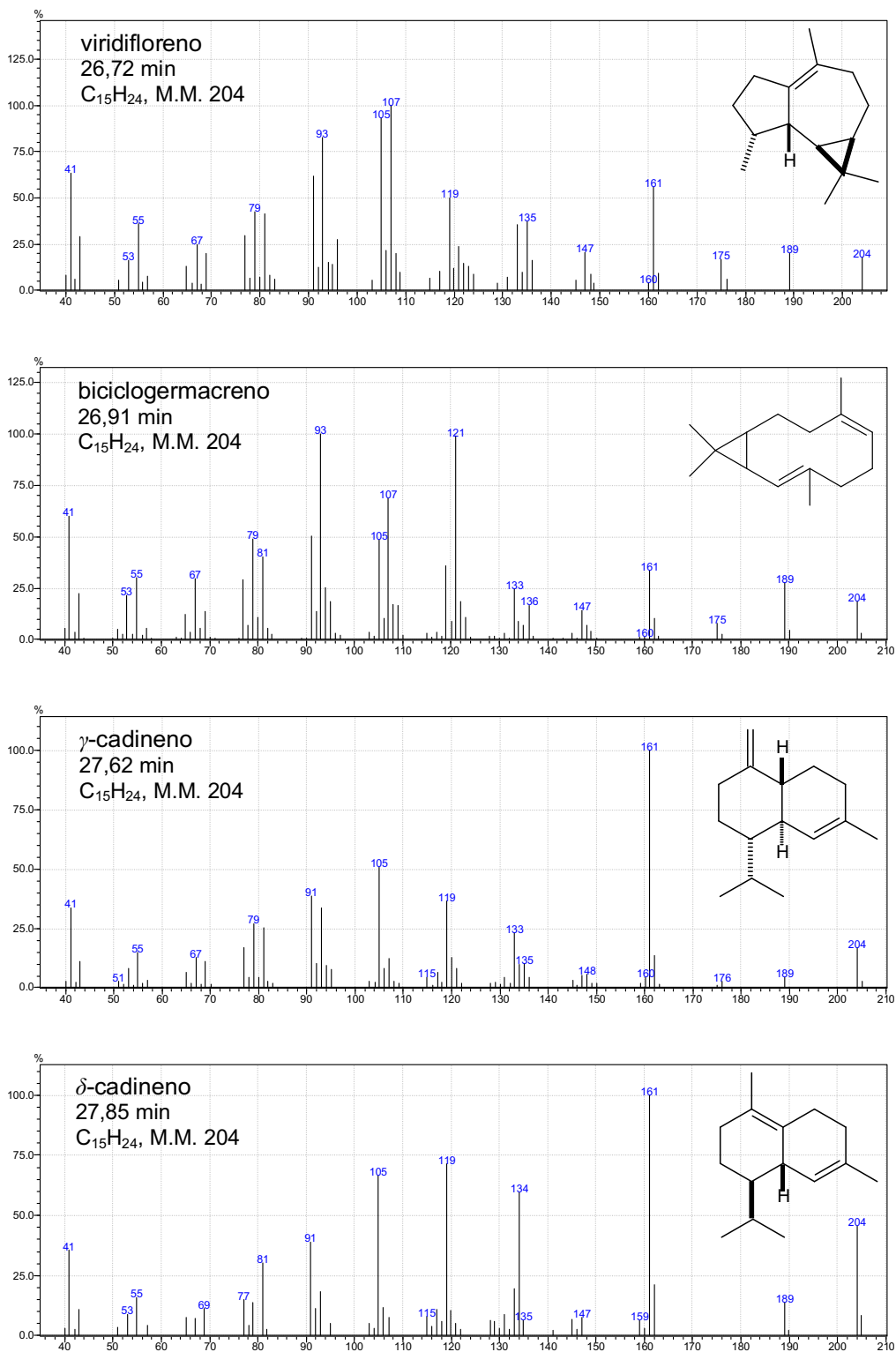


Figura 48: Espectros de massas das substâncias identificadas por CG-EM: viridifloreno, biciclogermacreno, γ -cadineno e δ -cadineno.

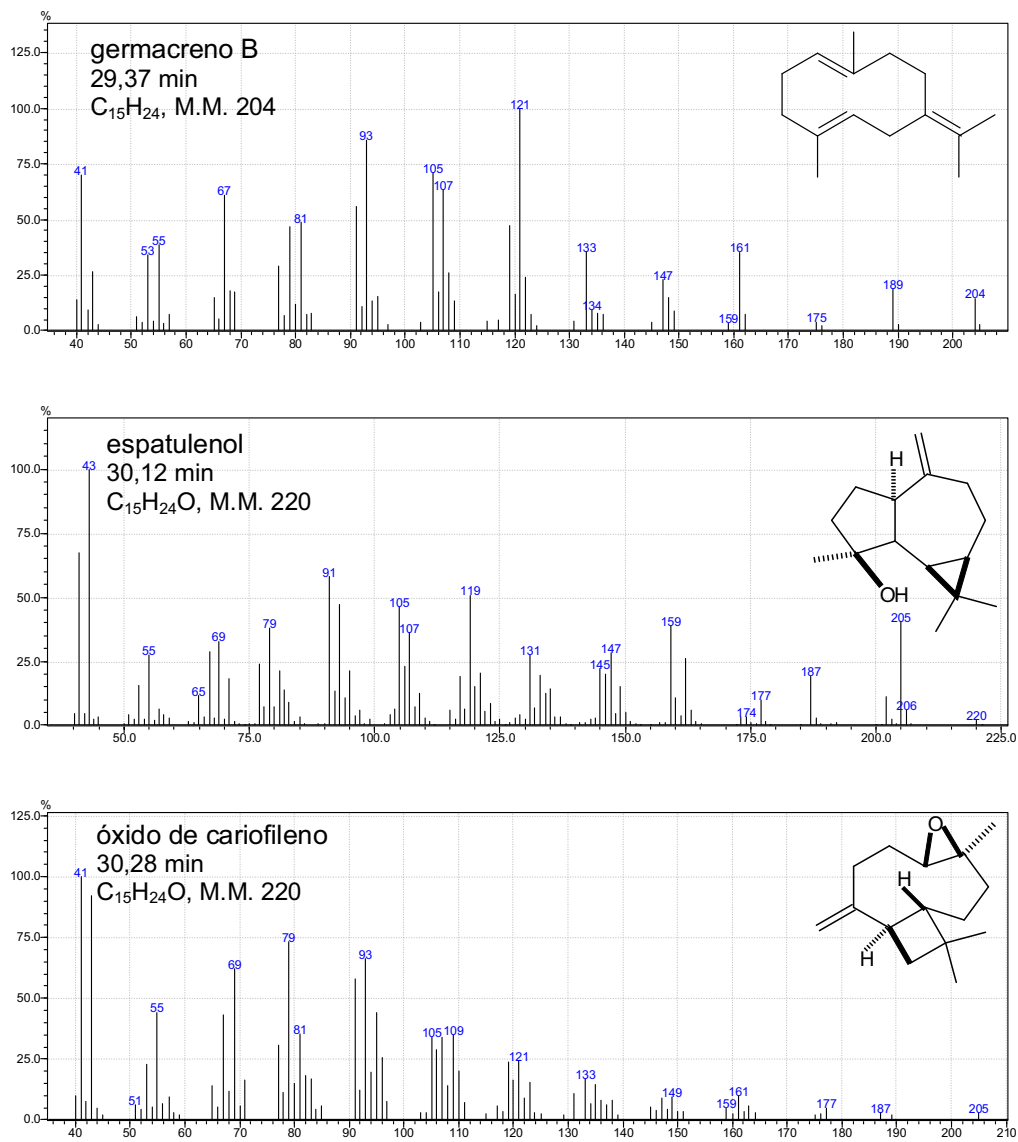


Figura 49: Espectros de massas das substâncias identificadas por CG-EM: germacreno B, espatulenol e óxido de cariofileno.

6. CONCLUSÕES

A estratégia para a identificação dos princípios ativos antiulcerogênicos do extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris* através de fracionamento biomonitorado utilizou métodos cromatográficos para a purificação de substâncias, ensaios farmacológicos com o extrato, frações e substâncias purificadas e técnicas espectrométricas para a determinação estrutural.

Os processos de obtenção do extrato, da fração concentrada em casearinas e de diterpenos purificados foram otimizados de modo a permitir seu escalamento e possível produção industrial. A seleção do método de extração (maceração dinâmica à quente) e do solvente extrator (etanol) consideraram sua simplicidade, menor custo, toxicidade mais aceitável e menor impacto ambiental, estando de acordo com princípios da Química Verde e tendências atuais de produção de fitoterápicos. O rendimento de 7,5 % do extrato seco em relação à droga vegetal foi semelhante a resultados obtidos anteriormente e considerado adequado. As análises por CLAE-DAD e RMN de ^1H demonstraram a seletividade também adequada do método de extração com relação aos diterpenos do tipo das casearinas.

O método de purificação utilizado permitiu obter as substâncias ativas com alto grau de pureza cromatográfica utilizando apenas 3 etapas, na seqüência, EFS, CC e CLAE. A EFS com sílica e carvão ativo possibilitou a aplicação direta do extrato bruto sem etapa prévia de partição líquido-líquido, não usou solventes clorados como em procedimentos anteriores, reteve os pigmentos interferentes (como clorofilas e carotenóides), fornecendo uma fração concentrada em diterpenos do tipo das casearinas, representando cerca de 27% (m/m) do extrato etanólico. A fração concentrada em casearinas foi fracionada por CC de fase normal, fornecendo frações com perfil cromatográfico simples e com picos nos cromatogramas com espectro no UV similar ao das casearinas. De modo geral, as diferenças estruturais entre as casearinas não permitem seu isolamento utilizando apenas técnicas cromatográficas de baixa ou média eficiência. Por isso, as frações semi-purificadas por CC foram então selecionadas para purificação final por CLAE de fase reversa, fornecendo 6 substâncias diferentes. O rendimento obtido nas purificações foi razoável, mas passível de otimização posterior, fornecendo quantidades adequadas

das substâncias para realização dos ensaios farmacológicos. Os resultados das análises espectrométricas permitiram identificar dentre estas substâncias as casearinas B, D, H, U e a caseargrewiina F, diterpenos típicos de *Casearia*, além do norisoprenóide 9-hidróxi-4-megastimen-3-ona, isolado pela primeira vez na espécie.

A primeira fração da EFS (menos polar) foi analisada por CG-EM, sendo identificados 15 sesquiterpenos, dos quais 13 foram identificados previamente no óleo essencial das folhas de *C. sylvestris*. A fração EFS1 não apresentou ação antiulcerogênica na dose testada, ao contrário de resultado obtido anteriormente para o óleo essencial, resultados que são aparentemente contraditórios e demandam novos estudos.

Os dados dos ensaios farmacológicos mostraram que o extrato, a fração concentrada em casearinas e as casearinas B, D, O, U e a casergrewiina F apresentaram atividade antiulcerogênica ou citoprotetora, com 100% de inibição na formação de úlceras com as doses testadas nos animais (v.o.). A DE_{100} obtida para a casearina U foi de 1,68 mg/Kg de peso corporal e os outros diterpenos apresentaram atividade antiulcerogênica idêntica com a administração desta dose. Já a caseargrewiina Fhb, um derivado com um anel lactônico substituindo o anel diacetálico típico dos diterpenos de *Casearia*, não apresentou esta atividade na mesma dose testada. Estes resultados sugerem pouca influência dos diferentes substituintes dos diterpenos nas posições 2, 6 e 7 sobre a atividade antiulcerogênica, bem como a importância do sistema diacetálico ou de um derivado biológico deste sistema para a ação farmacológica. Pesquisadores analisaram a relação estrutura-atividade citotóxica para diterpenos de *Casearia*, incluindo as casearinas, concluindo que a degradação do anel diacetálico a dialdeído também reduziu significativamente a atividade.

A administração da casearina U na dose de 172,0 mg/kg, cerca de 100 vezes maior do que a DE_{100} para a ação antiulcerogênica (1,68 mg/kg), não produziu nenhum tipo de alteração nos animais nos ensaios de toxicidade aguda via oral, indicando, preliminarmente, bom índice terapêutico.

A casearina U e a caseargrewiina F foram quantificadas por CLAE, apresentando teores de 8,6 e 4,0% (m/m), respectivamente, no extrato etanólico. Os diterpenos totais do tipo das casearinas também foram quantificados no extrato

etanólico (CLAE-DAD) em relação à caseargrewiina F, apresentando um teor igual a 18,1% (m/m).

A partir da DE₁₀₀ observada em ratos para a casearina U (1,68 mg/Kg de peso corporal), considerando-se que os outros diterpenos apresentaram mesma atividade nesta dose, e da quantificação de casearinas totais no extrato etanólico (18,1 %, m/m), foi possível estimar a quantidade mínima necessária do extrato etanólico para produzir a ação farmacológica esperada, que seria de 9,3 mg/Kg de peso corporal (ratos).

Os dados etnofarmacológicos sobre *C. sylvestris*, sua ampla ocorrência no Brasil e potencial de domesticação, a atividade antiulcerogênica e a baixa toxicidade apresentadas pelo extrato etanólico, os resultados dos ensaios farmacológicos e de toxicidade realizados com diterpenos purificados, e o teor destes marcadores no extrato etanólico estão de acordo com a proposta deste trabalho em utilizar o extrato etanólico das folhas ou a fração padronizada (concentrada em casearinas) desta espécie vegetal na produção de um fitoterápico. Adicionalmente, os próprios diterpenos podem ser utilizados como fitofármacos, no desenvolvimento de fármacos semi-sintéticos ou como modelos para síntese de novos fármacos.

De modo geral, as próximas etapas no desenvolvimento de um fitoterápico a partir das folhas de *C. sylvestris* devem incluir: a) padronização do extrato através da relação entre sua DE₁₀₀ e a concentração de diterpenos do tipo das casearinas, obtendo-se o teor mínimo de marcadores; b) incorporação do extrato padronizado em uma forma farmacêutica e seu emprego em novos ensaios pré-clínicos farmacológicos e toxicológicos; c) realização de ensaios clínicos de fases I, II e III; d) os métodos analíticos utilizados e os estudos taxonômicos descritos neste trabalho podem servir de base ao desenvolvimento da metodologia de controle de qualidade do futuro fitoterápico, desde a planta até o medicamento; e) estudos sobre a domesticação da espécie para a produção em larga escala. Cabe ainda ressaltar a importância do desenvolvimento de estudos de ecofisiologia com a espécie vegetal, pois os dados de variabilidade metabólica servem de base para o estabelecimento de um *Fingerprint* cromatográfico, que será útil tanto como referência no controle de qualidade quanto na seleção de indivíduos e das condições de cultivo e colheita mais adequados.

REFERÊNCIAS

- AASEN, A. J.; HLUBUCEK, J. R.; ENZELL, C. R. Tobacco chemistry. 24. (9R)-9hydroxy-4-megastimen-3-one, a new tobacco constituent. **Acta Chemica Scandinavica B**, v. 28, n. 3, p. 285-288, 1974.
- ABSY, M. L.; SCAVONE, O. Sobre a morfologia e anatomia da *Casearia sylvestris* Swartz. **Boletim de Zoologia e Biologia Marinha**, n. 30, p. 641-676, 1973.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Illinois: Allured Publishing Corporation, 1995, 469 p.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA . Resolução da RDC n. 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 mar. 2004.
- ALQUINI, Y.; TAKEMORI, N. K. **Organização estrutural de espécies vegetais de interesse farmacológico**. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 2000, p. 24-25.
- AUBERT, C.; AMBID, C.; BAUMES, R.; GÜNATA, Z. Investigation of bound aroma constituents of yellow-fleshed nectarines (*Prunus persica* L. Cv. Springbright): changes in bound aroma profile during maturation. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 51, n. 21, p. 6280-6286, 2003.
- AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GmbH (Germany). S. Bal-Tembe; K. E. K. S. Vijaya; D. V. Bhagwan; J. K. Sanjay. **Isolation of 18 β ,19 β -diacetoxy-18 β ,19 β -epoxy-3,13(16),14-clerodatrien-2-one (esculentin A) and 18 α ,19 α -diacetoxy-18 α ,19 α -epoxy-3,12,14-clerodatrien-2 β -isovaleryloxy-6 β ,7 α -diol (esculentin B) from the Samydaceae family, particularly *Casearia esculenta* and their medicinal use**. EP 0916663A1, 12 Nov. 1998, 19 May 1999.
- BALBACH, A. **As plantas curam**. São Paulo: A Edificação do Lar, 1981. p. 230.
- BANDEIRA, K. F. **Otimização e comparação de metodologias de extração de casearinas em *Casearia sylvestris***. 2004. 113 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.
- BASILE, A. C.; SERTIE, J. A. A.; PANNIZZA, S.; OSHIRO, T. T.; AZZOLINI, C. A. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, p.185-197, 1990.
- BEUTLER, J. A.; McCALL, K. L.; HERBERT, K.; HERALD, D. L.; PETTIT, G. R.; JOHNSON,

T.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Novel cytotoxic diterpenes from *Casearia arborea*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 5, p. 657-661, 2000a.

BEUTLER, J. A.; McCALL, K. L.; HERBERT, K.; JOHNSON, T.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Cytotoxic clerodane diterpenes esters from *Laetia procera*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 233-236, 2000b.

BILLET, D.; DURGEAT, M.; HEITZ, S.; BROUARD, J. P.; AHOND, A. Constituents D' *Evodia floribunda* Baker. II – 1ère Partie. L'acide floridiolique, nouveau diterpene de type clerodane. **Tetrahedron Letters**, v. 32, p. 2773-2776, 1976.

BLÄS, B.; ZAPP, J.; BECKER, H. *ent*-Clerodane diterpenes and other constituents from the livewort *Adelanthus lindenbergianus* (Lehm.) Mitt. **Phytochemistry**, v. 65, p.127-137, 2004.

BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (*Flacourtiaceae*) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 127B, p. 21-30, 2000.

BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; OLIVEIRA, F.; FRANSCHESCHI, A. M.; RUCAVADO, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (*Flacourtiaceae*). **Toxicon**, v.39, p.1863-1869, 2001.

BUSCCHIAZZO, P. M. El concepto de medicamentos esenciales y la accesibilidad. **Boletim da Sociedade Brasileira de Vigilância de Medicamentos**, n. 36, p. 3-4, 2000.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p.179-189, 2000.

CAMARGO, F. G.; PEREIRA, J. A.; BUENO, V. S.; GOMES, E.; ANDO, T. Ação do extrato alcoólico de guaçatonga diluído e tamponado em subcutâneo de camundongo – Parte II – Estudo histológico. **LECTA**, v. 14, n. 1, p. 61-86, 1996.

CAMINHOÁ, J. M. **Elementos de botânica geral e médica**. Rio de Janeiro: Tipographia Nacional, 1877. v. 3, p. 2600.

CARVALHO, E. S.; SANTOS, A. G.; CAVALHEIRO, A. J. Diterpeno $\Delta^{13(16),14}$ – diênico do caule de *Casearia sylvestris* Swartz. In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 8., 2007, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 2007. 1 CD-ROM.

CARVALHO, P. R. F.; FURLAN, M.; YOUNG, M. C. M.; KINGSTON, D. G. I.; BOLZANI, V. da S. Acetylated DNA-damage clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1659-1662, 1998.

CAVALCANTE, W. L. G.; CAMPOS, T. O.; PAI-SILVA, M. D.; PEREIRA, P. S.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A₂ toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 490-497, 2007.

CHANG, K-C; DUH, C-Y; CHEN, I-S; TSAI, I-L. A cytotoxic butenolide, two new dolabellane diterpenoids, a chroman and a benzoquinol derivative from Formosan *Casearia membranacea*. **Planta Medica**, v. 69, n. 7, p. 667-672, 2003.

CHASE, M. W.; ZMARTZTY, S.; LLEDÓ, M. D.; WURDACK, K. J.; SWENSEN, S. M.; FAY, M. F. When in doubt, put it in Flacourtiaceae: a molecular phylogenetic analysis based on plastid *rbcl* DNA sequences. **Kew Bulletin**, n. 57, p. 141-181, 2002.

CHEN, T. B.; WIEMER, D. F. Corymbotins A-I: highly oxidized kolovane derivatives from *Casearia corymbosa*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 6, p. 1612-1618, 1991.

COIMBRA, R. **Notas de fitoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Laboratório Clínico Silva Araújo, 1958. p. 169-170.

CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das espécies cultivadas**. Brasília: Ministério da Agricultura: IBDF, 1975. p. 514-516.

CREME à base de erva combate herpes labial. **Jornal da UNICAMP**, p. 8, 14 a 27 nov. 2005.

D'ABROSCA, B.; DELLAGRECA, M.; FIORENTINO, A.; MONACO, P.; ORIANO, P.; TEMUSSI, F. Structure elucidation and phytotoxicity of C₁₃ *nor*-isoprenoids from *Cestrum parqui*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 497-505, 2004.

DE SMET, P. A. G. M. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. **Drugs**, v. 54, n. 6, p. 801-840, 1997.

DIAS, P. C.; FOGLIO, M. A.; POSSENTI, A.; NOGUEIRA, D. C. F.; CARVALHO, J. E. Antiulcerogenic activity of crude ethanol extract and some fractions obtained from aerial parts of *Artemisia annua* L. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 8, p. 670-675, 2001.

DICKEL, M. L.; RATES, S. M. K.; RITTER, M. R. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 1, p. 60-71, 2007.

DJAHANGUIRI, B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 4, p. 265, 1969.

DURIGAN, G.; SIQUEIRA, M. F.; FRANCO, G. A. D. C.; BRIDGEWATER, S.; RATTER, J. A. The vegetation of priority areas for cerrado conservation in São Paulo State, Brazil. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 60, n. 2, p. 217-241, 2003.

EICHLER, A. G.; MARTIUS, C. F. P. *Bixaceae*. **Flora Brasiliensis**, n. 13, v. 1, p. 421-488, tab. 94,96 f. 2,97.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 1999, p. 87-95.

ESPÍNDOLA, L. S.; VASCONCELOS JUNIOR, J. R.; DE MESQUITA, M. L.; MARQUIE, P.; DE PAULA, J. E.; MAMBU, L.; SANTANA, J. M. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. **Planta Medica**, v. 70, n. 11, p. 1093-1095, 2004.

ESTEVES, I.; SOUZA, I. R.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L. G. V.; SANTOS, L. S.; SERTIÉ, J. A. A.; PERAZZO, F. F.; LIMA, L. M.; SCHNEEDORF, J. M.; BASTOS, J. K.; CARVALHO, J. C. T. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 191-196, 2005.

ETSE, J. T.; GRAY, A. I.; THOMAS, D. W.; WATERMAN, P. G. Terpenoid and alkaloid compounds from the seeds of *Monodora brevipes*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 9, p. 2489-2492, 1989.

FAN, X-H.; CHENG, Y-Y.; YE, Z-L.; LIN, R-C.; QIAN, Z-Z. Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines. **Analitica Chimica Acta**, v. 555, p. 217-224, 2006.

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA NO ESTADO DE SÃO PAULO; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO; UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (Brasil). J. A. A. SERTIÉ; R. G. WOISKY; A. J. CAVALHEIRO; V. S. BOLZANI; A. G. SANTOS; A. G. TININIS. **Processo de obtenção de extratos de *Casearia sylvestris*, processos de obtenção de frações ativas, extratos, frações ativas, uso de extratos e frações ativas, composição, unidade de dosagem, método para prevenir, tratar, combater ou suspender distúrbios gastrointestinais, medicamento e princípio ativo**. PI 0306167-1, 18 dez. 2003.

FERREIRA, S. H. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998. p. 9.

GALBRAITH, M. N.; HORN, D. H. S. Structures of the natural products blumenols A, B and C. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 3, p. 113-114, 1972.

GEIS, W.; BUSCHAUER, B.; BECKER, H. *cis*-Clerodanes from axenic cultures of the liverwort *Scapania nemorea*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 643-649, 1999.

GIBBONS, S.; GRAY, A. I.; WATERMAN, P. G. Clerodane diterpenes from the bark of *Casearia tremula*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 2, p. 565-570, 1996a.

GIBBONS, S.; GRAY, A. I.; WATERMAN, P. G. Clerodane diterpenes from the leaves of *Laetia procera*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 3, p. 635-638, 1996b.

GIONGO, C.; WAECHTER, J. L. Composição florística e espectro de dispersão das espécies arbóreas de uma floresta mista com *Podocarpus*, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 333-335, 2007. Suplemento 2.

GLAVIN, G. B.; SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. **FASEB Journal**, v. 6, p. 825-831, 1992.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOMES, C. L. N.; MACIEL, M. C. G.; GUERRA, R. N. M.; ABREU-SILVA, A. L.; NASCIMENTO, F. R. F. Avaliação do efeito cicatrizante da *Casearia sylvestris* Swartz (guaçatonga) em camundongos. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v. 3, n. 2, p. 48-55, 2005.

GONG, F.; LIANG, Y-Z.; FUNG, Y-S.; CHAU, F-T. Correction of retention time shifts for chromatographic fingerprints of herbal medicines. **Journal of Chromatography A**, v.1029, p. 173-183, 2004.

GRAHAM, J. G.; QUINN, M. L.; FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 347-377, 2000.

GUAÇATONGA faz úlcera cicatrizar mais rápido. **O Estado de S. Paulo**, São Paulo, Ciência e Meio Ambiente, 12, jul, 2004. Disponível em: < <http://www.estadao.com.br/ciencia/aplicada/2004/jul/12/107.htm>>. Acesso em: 03 ago. 2004.

GUITTET, E.; STOVEN, V.; LALLEMAND, J.; RAMIANDRASOA, F.; KUNESCH, G. Pitumbin, a novel kolavene acylal from *Casearia pitumba* Pleumer. **Tetrahedron**, v. 44, n. 10, p. 2893-2901, 1988.

GUNASEKERA, S. P.; SULTANBAWA, M. U. S.; BALASUBRAMANIAM, S. Triterpenes of some species of *Flacourtiaceae*. **Phytochemistry**, v. 16, n. 6, p. 788-789, 1977.

HAYASHI, K-I.; NAKANISHI, Y.; BASTOW, K. F.; CRAHH, G.; NOZAKI, H.; LEE, K-H. Antitumor agents. Part 212 – Bucidasins A-C, three new cytotoxic clerodane diterpenes from *Bucida buceras*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, p. 345-348, 2002.

HARTMAN, T. Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 80, p. 177-188, 1996.

HEINEN, T. E.; COUTO, V. S.; ANDRADE, M. B.; DANTAS, D. C. M. Efeito da *Casearia sylvestris* sobre a ulceração de mucosa gástrica produzida pelo AAS e álcool. In: REUNIÃO DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 26., 2006, Águas de Lindóia. **Anais...** São Paulo, 2006. 1 CD-ROM.

HIRUMA-LIMA, C. A.; TOMA, W.; GRACIOSO, J. S.; ALMEIDA, A. B. A.; BATISTA, L. M.; MAGRI, L.; PAULA, A. C. B.; SOARES, F. R.; NUNES, D. S.; BRITO, A. R. M. S. Natural trans-crotonin: the antiulcerogenic effect of another diterpene isolated from the bark of *Croton cajucara* Benth. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 4, p. 452-456, 2002.

HOEHNE, F. C. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. São Paulo: Graphicars, 1939.

HOEHNE, F. C.; KUHLMANN, M.; HANDRO, O. **O Jardim Botânico de São Paulo**. São Paulo: Departamento de Botânica do Estado de São Paulo, 1941.

HUNTER, M. S.; CORLEY, D. G.; CARRON, C. P.; ROWOLD, E.; KILPATRICK, B. F.; DURLEY, R. C. Four new clerodane diterpenes from the leaves of *Casearia guianensis* wick inhibit the interaction of leukocyte function antigen 1 with intercellular adhesion molecule 1. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 9, p. 894-899, 1997.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; TAKEYA, K.; WATANABE, K.; OBATA, E. New antitumor principles, casearins A-F, from *Casearia sylvestris* Sw. (*Flacourtiaceae*). **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 4, p. 1585-1588, 1988.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; IITAKA, Y.; SCHENKEL, E. P.; MOTIDOME, M. Antitumor principles from *Casearia sylvestris* Sw. (*Flacourtiaceae*), structure elucidation of new clerodane diterpenes by 2-D NMR spectroscopy. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 12, p. 3384-3388, 1990.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; MAEZURU, M.; OBATA, E.; TAKEYA, K.; KONDO, M.; IITAKA, Y. New antitumor agent from paraguayan medicinal plant, *Casearia sylvestris* Sw. (*Samydaceae*). **Journal of Pharmaceuticals Sciences**, v. 76, n. 11, S 216, 1987.

JULLIAN, V.; BONDUELLE, C.; VALENTIN, A.; ACEBEY, L.; DUGOU, ANNE-GAËLLE; PRÉVOST, MARIE-FRANCOISE; SAUVAIN, M. New clerodane diterpenoids from *Laetia*

procera (Poepp.) Eichler (Flacourtiaceae), with antiplasmodial and antileishmanial activities. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 5065-5070, 2005.

JUNGES, M. J.; SCHENKEL, E. P.; SIMÕES, C. M. O. Flavonóides da *Casearia sylvestris* Sw. (erva de bugre). **Caderno de Farmácia**, v. 1, n. 2, p. 95-101, 1985.

KANOKMEDHAKUL, S.; KANOKMEDHAKUL, K.; BUAYAIRAKSA, M. Cytotoxic clerodane diterpenoids from fruits of *Casearia grewiifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 7, p. 1122-1126, 2007.

KANOKMEDHAKUL, S.; KANOKMEDHAKUL, K.; KANARSA, T.; BUAYAIRAKSA, M. New bioactive clerodane diterpenoids from the bark of *Casearia grewiifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 2, p. 183-188, 2005.

KHAN, M. R.; GRAY, A. I.; SADLER, I. H.; WATERMAN, P. G. Clerodane diterpenes from *Casearia corymbosa* stem bark. **Phytochemistry**, v. 29, n. 11, p. 3591-3595, 1990a.

KHAN, M. R.; GRAY, A. I.; REED, D. R.; SADLER, I. H.; WATERMAN, P. G. Diterpenes from *Zuelania guidonia*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 5, p. 1609-1614, 1990b.

KHAN, M. R.; GRAY, A. I.; WATERMAN, P. G. Clerodane diterpenes from *Zuelania guidonia* stem bark. **Phytochemistry**, v. 29, n. 9, p. 2939-2942, 1990.

KILIC, A.; KOLLMANNBERGER, H.; NITZ, S. Glycosidically bound volatiles and flavor precursors in *Laurus nobilis* L. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2231-2235, 2005.

KIRIN BREWERI (Japan). H. Itokawa. **Novo composto diterpênico e suas aplicações**. JP 01.149.779, 05 Dec. 1987, 12 June 1989.

KLEIN, R. M.; SLEUMER, H. O. **Flora ilustrada catarinense: flacourtiáceas**. Itajaí: FLAC, 1984. p. 78-87.

KRISHNAN, V.; RANGASWAMI, S. Occurrence of leucopelargonidin in the roots of *Casearia esculenta*. **Current Science**, v. 34, n. 22, p. 634-635, 1965.

LAZAROWICH, N. J.; PEKOS, P. Use of fingerprinting and marker compounds for identification and standardization of botanical drugs: strategies for applying pharmaceutical HPLC analysis of herbal products. **Drug Information Journal**, v. 32, p. 497-512, 1998.

LONGHI, S. J.; NASCIMENTO, A. R. T.; FLEIG, F. D.; DELLA-FLORA, J. B.; FREITAS, R. A.; CHARÃO, L. W. Composição florística e estrutura da comunidade arbórea de um

fragmento florestal no município de Santa Maria-Brasil. **Ciência Florestal**, v. 9, n. 11, p. 115-133, 1999.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. p. 115.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. p. 220-221.

MAISTRO, E. L.; CARVALHO, J. C.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay. **Toxicology In Vitro**, v. 18, n. 3, p. 337-342, 2004.

MANABE, S.; NISHINO, C. Stereochemistry of *cis*-clerodanes diterpenes. **Tetrahedron**, v. 42, n. 13, p. 3461-3470, 1986.

MARQUES, M. B. Patentes farmacêuticas e acessibilidade aos medicamentos no Brasil. **História, Ciências, Saúde**, v. 7, n. 1, 2000.

MARQUETE, R. Reserva ecológica do IBGE (Brasília-DF): *Flacourtiaceae*. **Rodriguésia**, v. 52, n. 80, p. 5-16, 2001.

MATTOS, E. S.; FREDERICO, M. J. S.; COLLE, T. D.; PIERI, D. V.; PETERS, R. R.; PIOVEZAN, A. P. Evaluation of antinociceptive activity of *Casearia sylvestris* and possible mechanism of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 1-6, 2007.

MEIER, J.; STOCKER, K. F. Biology and distribution of venomous snakes of medical importance and the composition of snake venoms. In: MEIER, J.; WHITE, J. **Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons**. Boca Raton: CRC Press, 1995. p. 367-412.

MENG, J.; LEUNG, K. S-Y.; JIANG, Z.; DONG, X.; ZHAO, Z.; XU, L-J. Establishment of HPLC-DAD-MS fingerprint of fresh *Houttunya cordata*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 12, p. 1604-1609, 2005.

MESQUITA, M. L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; PAULA, J. E.; GRELLIER, P.; ESPÍNDOLA, L. S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 783-787, 2005.

MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; PAULA, J. E.; ESPÍNDOLA, L. S. *In vitro* antiplasmodial activity of brazilian cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 165-170, 2007.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MORAES, S. M.; MACHADO, M. I. L. Essential oil of *Casearia grandiflora* Camb. **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, p. 697-698, 1997.

MORITA, H.; NAKAYAMA, M.; KOJIMA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; SCHENKEL, E. P.; MOTIDOME, M. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 3, p. 693-697, 1991.

MOSADDIK, M. A.; WATERMAN, P. G. A sesquiterpene, clerodane diterpenes and a furanone from the roots of *Casearia multinervosa* (Flacourtiaceae/ Salicaceae). **Natural Products Communications**, v. 1, n. 8, p. 601-607, 2006.

MOSADDIK, M. A.; FORSTER, P. I.; BOOTH, R.; WATERMAN, P. G. New clerodane and halimane diterpenes from the leaves and woody stems of *Casearia grayi* (Flacourtiaceae/ Salicaceae). **Natural Products Communications**, v. 1, n. 6, p. 441-448, 2006a.

MOSADDIK, M. A.; FLOWERS, A.; KARAGIANIS, G.; WATERMAN, P. G. New phenolic glycosides from the stems and leaves of *Casearia multinervosa*. **Natural Product Research, Part A: Structura and Synthesis**, v. 20, n. 6, p. 641-647, 2006b.

MOSADDIK, M. A.; FORSTER, P. I.; BOOTH, R.; WATERMAN, P. G. Clerodane diterpenos from the stems of *Casearia grewiifolia* var. *gelonioides* (Flacourtiaceae/ Salicaceae sensu lato). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 631-633, 2007a.

MOSADDIK, M. A.; FORSTER, P. I.; BOOTH, R.; WATERMAN, P. G. Phenolic glycosides from some Australian species of Flacourtiaceae (Salicaceae sensu lato). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 166-168, 2007b.

NAPOLITANO, D. R.; MINEO, J. R.; SOUZA, M. A.; PAULA, J. E.; ESPÍNDOLA, L. S.; ESPÍNDOLA, F. S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 37-41, 2005.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. G. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 1999, p. 11-24.

NOGUEIRA, R. T.; SHEPERD, G. J.; LAVERDE JÚNIOR, A.; MARSAIOLI, A. J.; IMAMURA, P. M. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 1153-1157, 2001.

OBERLIES, N. H.; BURGESS, J. P.; NAVARRO, H. A.; PINOS, R. E.; SOEJARTO, D. D.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; WANI, M. C.; WALL, M. E. Bioactive constituents of the roots of *Licania intrapetiolares*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 4, p. 497-501, 2001.

OBERLIES, N. H.; BURGESS, J. P.; NAVARRO, H. A.; PINOS, R. E.; FAIRCHILD, C. R.; PETERSON, R. W.; SOEJARTO, D. D.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; WANI, M. C.; WALL, M. E. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 2, p. 95-99, 2002.

OLIVEIRA, P. V. A.; ROSSETI, E. S.; FACHIN, A. P.; FRANÇA, S. C.; PIETRO, R. C. L. R.; PEREIRA, P. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Ação de extrato etanólico de *Casearia sylvestris* contra leveduras do gênero *Candida*. **Jornal Brasileiro de Fitoterapia**, v. 5, n. 3, 2007.

OLIVEIRA, B.; MUCCILLO-BAISCH, A. L.; AMARANTE-SILVA, F.; BATTASTINI, A. M.; TORRES, F.; VARGAS, J.; SINNOTT-SILVA, E.; ALAM, M. F.; RACOSKI, G. L.; BASSO, O. An evaluation of the abortive activity of *Casearia sylvestris* Swartz. **Journal of Medical and Biological Research**, v. 18, n. 5-6, p. 726A, 1985.

OSHIMA-FRANCO, Y.; ALVES, C. M. V.; ANDRÉO FILHO, N.; GERENUTTI, M.; CINTRA, A. C. O.; LEITE, G. B.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; SILVA, M. G. Neutralization of the neuromuscular activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom, by a hydroalcoholic extract of *Casearia sylvestris* Sw. (guaçatonga). **Journal of Venoms Animal Toxins including Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, p. 465-478, 2005.

PANIZZA, S. **Plantas que curam**. 3. ed. São Paulo: IBRASA, 1998.

PEREIRA, B. M. R.; GONÇALVES, L. C.; PEREIRA, N. A. Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina popular III. Atividade antiedematogênica. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 73, n. 4, p. 85-86, 1992.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002. Suplemento 1.

POSSOLO, H.; FERREIRA, C. Saponinas e outros compostos interessantes na Família das Flacourtiaceae. I - *Casearia sylvestris* Swartz, guassatonga do Brasil. **Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia da USP**, v. 7, p. 377-385, 1949.

PRAKASH, C. V. S.; HOCH, J. M.; KINGSTON, D. G. I. Structure and stereochemistry of new cytotoxic clerodane diterpenoids from the bark of *Casearia lucida* from the Madagascar rainforest. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 2, p. 100-107, 2002.

PUPO, J. A. O óleo de Chaulmoogra e as Flacourtiaceas do Brasil. **Anais da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 1, p. 331-340, 1926.

RAINTREE NUTRITION INC. Guacatonga capsules *Casearia sylvestris*. Disponível em: <<http://www.rain-tree.com/guacatonga-capsules.htm>>. Acesso em: 22 nov. 2007.

RASLAN, D. S.; JAMAL, C. M.; DUARTE, D. S.; BORGES, M. H.; DE LIMA, M. E. Anti-PLA2 action test of *Casearia sylvestris* Sw. **Bolletín Chimie et Pharmacie**, v. 141, n. 6, p. 457-460, 2002.

RIZZINI, C. T.; MORS, W. B.; PEREIRA, N. A. Plantas brasileiras tidas como ativas contra peçonha de animais, especialmente venenos de cobras. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 69, n. 4, 1988.

ROBERT, A.; NEZAMINS, J. E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A. J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 77, p. 433-443, 1979.

RODRIGUES, A. M. S.; PAULA, J. E.; DEGALLIER, N.; MOLEZ, J. F.; ESPÍNDOLA, L. S. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Association**, v. 22, n. 2, p. 314-317, 2006.

RODRIGUES, L. A.; CARVALHO, D. A. de; GOMES, L. J.; BOTREL, R. T. Espécies vegetais nativas usadas pela população local em Luminárias-MG. **Boletim Agropecuário da Universidade Federal de Lavras**, n. 52, p. 1-34, 2002.

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

ROSA, S. G. T.; FERREIRA, A. G. Germinação de sementes de plantas medicinais lenhosas. **Acta Botânica Brasílica**, v. 15, n. 2, 2001.

RUPPELT, B. M.; GONÇALVES, L. C.; PEREIRA, N. A. Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas. II-Bloqueio da atividade na permeabilidade capilar e na letalidade do veneno de jararaca (*Bothrops jararaca*), **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 71, n. 3, p. 57-58, 1990.

RUPPELT, B. M.; PEREIRA, E. F. R.; GONÇALVES, L. C.; PEREIRA, N. A. Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas. I – Atividades analgésica e antiinflamatória. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 71, n. 3, p. 54-56, 1990.

SAKHO, M.; CHASSAGNE, D.; CROUZET, J. African mango glycosidically bound volatile compounds. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 883-888, 1997.

SANT'ANA, P. J. P.; ASSAD, A. L. D. Programa de pesquisa em produtos naturais: a experiência da CEME. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 508-512, 2004.

SANTOS, A. G. **Desenvolvimento de metodologia para a análise de variabilidade intra-específica e dinâmica de casearinas em *Casearia sylvestris* Sw (Flacourtiaceae)**. 2001. 120 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

SANTOS, A. G.; PEREZ, C. C.; TININIS, A. G.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J. Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. **Química Nova**, v. 30, n. 30, p. 1100-1103, 2007.

SASSIOTO, M. C. P.; CARDOSO FILHO, N.; FACCO, G. G.; SODRÉ, S. T.; NEVES, N.; PURISCO, S. U.; FARIAS, A. G. Efeito da *Casearia sylvestris* no reparo ósseo com matriz óssea bovina desvitalizada em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 6, p. 637-641, 2004.

SCAVONE, O.; GRECCHI, R.; PANIZZA, S.; SILVA, R. A. P. S. Guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz): aspectos botânicos da planta, ensaios fitoquímicos e propriedade cicatrizante da folha. **Anais de Farmácia e Química de São Paulo**, v. 19, n. 1, p. 73-81, 1979.

SCHNEIDER, N. F.; MOURA, N. F.; COLPO, T.; FLACH, A. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo volátil de *Casearia sylvestris* Swartz. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 87, n. 4, p. 112-114, 2006.

SEFTON, M. A.; FRANCIS, I. L.; WILLIAMS, P. J. Volatile norisoprenoid compounds as constituents of woody woods used in wine and spirit maturation. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 38, n. 11, p. 2045-2049, 1990.

SENAY, S. E.; LEVINE, R. J. Synergism between cold and restraint for rapid production of stress ulcer in rats. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**, v. 124, p. 3384-3388, 1967.

SERTIÉ, J. A. A.; CARVALHO, J. C. T.; PANIZZA, S. Antiulcer activity of the crude extract from the leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n. 2, p. 112-119, 2000.

SHAARI, K.; WATERMAN, P. G. Podophyllotoxin-type lignans as major constituents of the stems and leaves of *Casearia clarkei*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 6, p. 720-724, 1994.

SHEN, Y-C.; WANG, C-H.; CHENG, Y-B.; WANG, L-T.; GUH, J-H.; CHIEN, C-T.; KHALIL, A. T. New cytotoxic clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia membranacea*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 3, p. 316-321, 2004a.

SHEN, Y-C.; WANG, L-T.; WANG, C-H.; KHALIL, A. T.; GUH, J-H. Two new cytotoxic clerodane diterpenoids from *Casearia membranacea*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 1, p. 108-110, 2004b.

SHEN, Y-C.; LEE, C. L.; KHALIL, A. T.; CHENG, Y-B.; CHIEN, C-T.; KUO, Y-H. New clerodane diterpenoids from *Casearia membranacea*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 88, n. 1, p. 68-77, 2005a.

SHEN, Y-C.; CHENG, Y-B.; AHMED, A. F.; CHENG, L. L.; CHEN, S-T.; CHIEN, C-T.; KUO, Y-H.; TZENG, G-L. Cytotoxic clerodane diterpenoids from *Casearia membranacea*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 11, p. 1665-1668, 2005b.

SHEN, Y-C.; CHENG, Y-B.; CHEN, Y-H.; KHALIL, A. T.; KO, C-L. Three new clerodane diterpenes derivatives from *Casearia membranacea*. **Journal of Chinese Chemical Society**, v. 52, n. 6, p. 1263-1268, 2005c.

SILVA, A. C.; BALZ, D.; SOUZA, J. B. D.; MORSCH, V. M.; CORRÊA, M. C.; ZANETTI, G. D.; MANFRON, M. P.; SCHETINGER, M. R. C. Inhibition of NTPDase, 5`-nucleotidase, Na⁺/K⁺-ATPase and acetylcholinesterase activities by subchronic treatment with *Casearia sylvestris*. **Phytomedicine**, v. 13, p. 509-514, 2006.

SILVA, F. B.; ALMEIDA, J. M.; SOUSA, S. M. G. Natural medicaments in endodontics – a comparative study of the anti-inflammatory action. **Brazilian Oral Research**, v. 18, n. 2, p. 174-179, 2004.

SILVA, M. A. S. da. **Variabilidade genética e fitoquímica de *Casearia sylvestris* Sw em populações do cerrado e mata atlântica do estado de São Paulo**. 2003. 110 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

SILVA, F. A.; BAISCH, A. L. M.; OLIVEIRA, B.; BATTASTINI, A. M.; TORRES, F.; RACOSKI, G.; SILVA, E. S.; ALAM, M. F.; APOLINARIO, J. C. G.; LAPA, A. J. Estudos farmacológicos preliminares dos extratos de *Casearia sylvestris* Swartz. **Acta Amazonica**, v. 18, n. 1-2, p. 219-229, 1988.

SILVA, G. A. A. B.; BAUER, L. Análise do óleo essencial de *Casearia sylvestris* Sw – I. **Revista Brasileira de Farmácia**, p. 327-331, 1970.

SILVA, R. A. D. **Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1926. p. 429, 503-504.

SINNOTT-SILVA, E.; ALAM, M. F.; COPPOLA, M. C.; AMARANTE-SILVA, F.; OLIVEIRA, B.; BATTASTINI, A. M.; TORRES, F.; APOLINARIO, J. C.; RACOSKI, G. L. An avaluation of toxicity and effects of extracts from *Casearia sylvestris* Swartz on rat uterine motility. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 17, n. 5-6, p. 530, 1984.

SINGH, P.; JAIN, S.; JAKUPOVIC, J. Clerodane derivatives from *Grangea maderaspatana*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 5, p. 1537-1539, 1988.

SKOUROUMOUNIS, G. K.; WINTERHALTER, P. Glycosidically bound norisoprenoids from *Vitis vinifera* Cv. Riesling leaves. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 42, n. 5, p. 1068-1072, 1994.

SLEUMER, H. O. **Flacourtiaceae**: flora neotropica; monograph number 22. New York: The New York Botanic Garden, 1980. p. 4, 281, 392-393, 400-401.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. **Introduction to modern liquid chromatography**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1979. p. 365-370.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; CHASE, M. W.; MORT, M. E.; ALBACH, D. C.; ZANIS, M.; SAVOLAINEN, V.; HAHN, W. H.; HOOT, S. B.; FAY, M. F.; AXTELL, M.; SWENSEN, S. M.; PRINCE, L. M.; KRESS, W. J.; NIXON, K. C.; FARRIS, J. A. Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, *rbcL*, and *atpB* sequences. **Botanical Journal of the Linnean Society**, n. 133, p. 381-461, 2000.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 1999. p.11-24.

SOUCCAR, C. Métodos utilizados para a validação de plantas medicinais com atividade gastrointestinal - Apostila. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17., 2002, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá, 2002. 1 CD-ROM.

SOUSA, F. G.; DENARDIN, R. B. N.; MOURA, N. F.; DREVS, S. Allelopathy and genotoxic potential of *Casearia sylvestris* Sw. extracts. **Allelopathy Journal**, v. 20, n. 1, p. 195-202, 2007a.

SOUSA, F. G.; SCHNEIDER, F. Z.; MENDES, C. E.; MOURA, N. F.; DENARDIN, R. B. N.; MATUO, R.; MANTOVANI, M. S. Clastogenic and anticlastogenic effect of the essential oil from *Casearia sylvestris* Swart. **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, p. 376-378, 2007b.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. p.333.

STILL, W. C.; KAHN, M.; MITRA, A. J. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolutions. **Journal of Organic Chemistry**, v. 43, p. 2923, 1978.

SUKUMAR, D.; NAMBI, R. A.; SWARNALAKSHMI, T.; SULOCHANA, N.; BHASKAR, E. A.

Chemical and pharmacological studies on the leaves of *Casearia tomentosa*. **Fitoterapia**, v. 53, n. 5-6, p. 163-165, 1982.

TAKAGI, K.; OKABE, S.; SAZIKI, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 19b, p. 418, 1970.

TALAPATRA, S. K.; CANGULY, N. C.; GOSWAMI, S.; TALAPATRA, B. Chemical constituents of *Casearia graveolens*: some novel reactions and the preferred molecular conformation of the major coumarin, micromelin. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 3, p. 401-408, 1982.

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, n. 141, p. 399-436, 2003.

THUM, A. B.; COSTA, E. C. Coreidae (Heteroptera) associados a espécies florestais. **Ciência Florestal**, v. 7, n. 1, p. 27-31, 1997.

TININIS, A. G. **Desenvolvimento, otimização, validação e utilização de métodos de extração e análise de casearinas em *Casearia sylvestris* Sw.** 2006. 182 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

TININIS, A. G.; ASSONUMA, M. M.; TELASCREA, M.; PEREZ, C. C.; SILVA, M. R. S. R. M.; FAVORETO, R.; CAVALHEIRO, A. J. Composição e variabilidade química de óleo essencial de *Casearia sylvestris* SW. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 4, p. 132-136, 2006.

TOGNONI, G.; LAPORTE, J. R. Estudo de utilização de medicamentos e de farmacovigilância. In: LAPORTE, J. R.; TOGNONI, G.; ROZENFELD, S. **Epidemiologia do medicamento**: princípios gerais. São Paulo: HUCITEC; Rio de Janeiro: ABRASCO, 1989, p. 44-46.

TORRES, R. B.; YAMAMOTO, K. Taxonomia das espécies de *Casearia* Jacq. (*Flacourtiaceae*) do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, n. 9, p. 239-258, 1986.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIJAYAKUMAR, E. K. S.; BAL-TEMBE, S.; JOSHI, K. S.; DEORE, V. B. Esculentins A & B, two new diterpenes from *Casearia esculenta*. **Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry**, v. 41B, n. 12, p. 2706-2708, 2002.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

YESILADA, E.; GÜRBÜZ, I.; BEDIR, E.; TATLI, I.; KHAN, I. A. Isolation of anti-ulcerogenic sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* through bioassay-guided fractionation procedures in rats. **Journal of Natural Products**, v. 95, n. 2-3, p. 213-219, 2004.

WENIGER, B.; HAAG-BERRURIER, M.; ROHMER, M.; ANTON, R. Some constituents of *Casearia ilicifolia* Vent. **Planta Medica**, v. 33, n. 2, p. 170-172, 1978.

WILLIAMS, R. B.; NORRIS, A.; MILLER, J. S.; BIRKINSHAW, C.; RATOVOSON, F.; ANDRIANTSIFERANA, R.; RASAMISON, V. E.; KINGSTON, D. G. I. Cytotoxic clerodane diterpenoids and their hydrolysis products from *Casearia nigrescens* from the Rainforest of Madagascar. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 2, p. 206-209, 2007.

WINTERHALTER, P. Bound terpenoids in the juice of the purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 38, n. 2, p. 452-455, 1990.

WISDOM, C.; RODRIGUEZ, E. Quantitative variation of the sesquiterpene lactones and chromenes of *Encelia farinosa*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 10, n. 1, p. 43-48, 1982.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Draft WHO guidelines on safety monitoring and pharmacovigilance of herbal medicines**. Amsterdam, 2003.

ZACHÉ, J. Guaçatonga, proteção para o estômago. **Revista Saúde**, p.38-44, fev. 2000.

ANEXOS

ANEXO 1

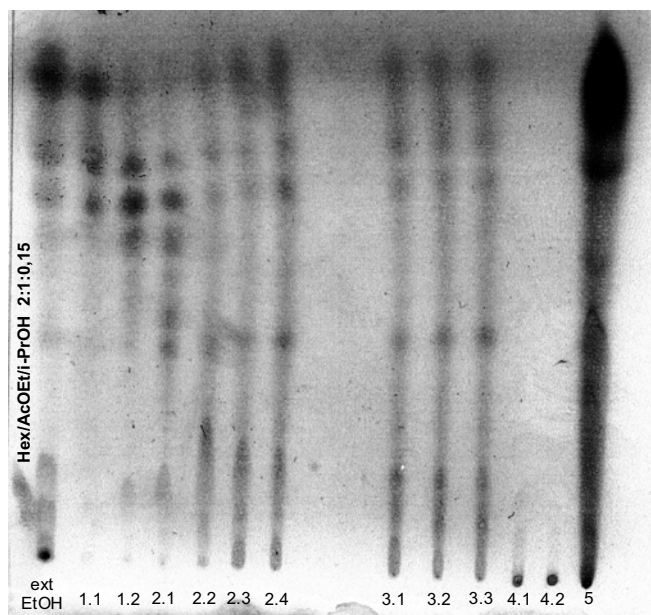


Figura A: Cromatoplaça do extrato EtOH e das frações EFS-teste1.1, 1.2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 3.1, 3.2, 3.3, 4.1, 4.2 e 5.

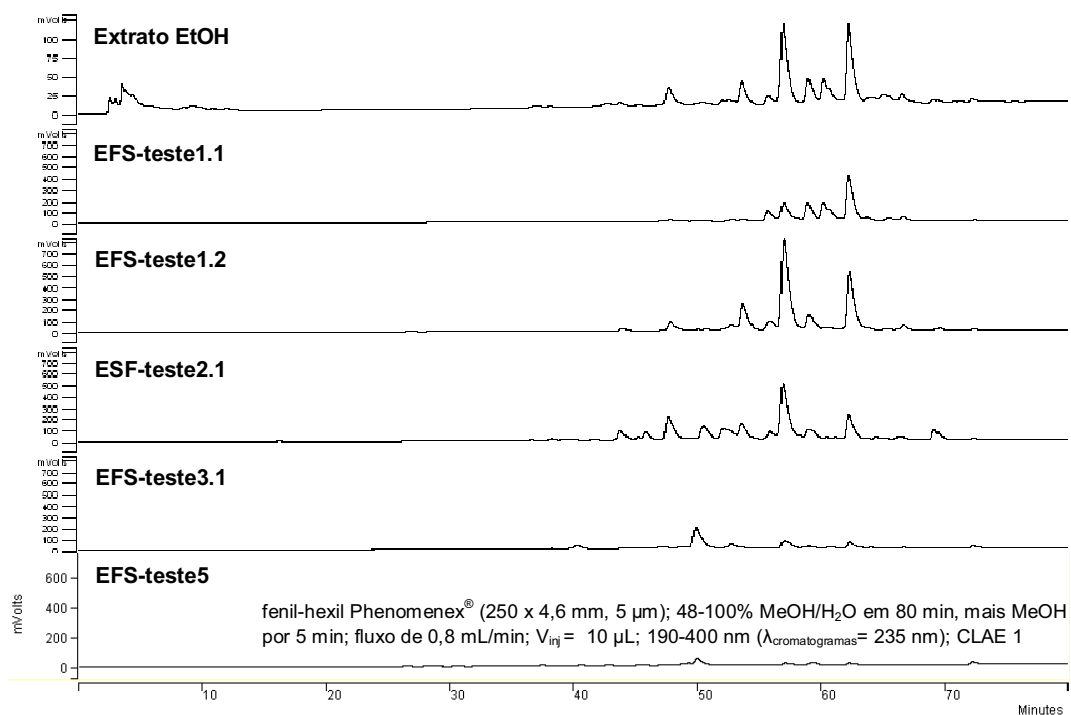


Figura B: Cromatogramas do extrato EtOH e das frações EFS-teste1.1, 1.2, 2.1, 3.1 e 5 (1,0 mg/mL MeOH).

ANEXO 2

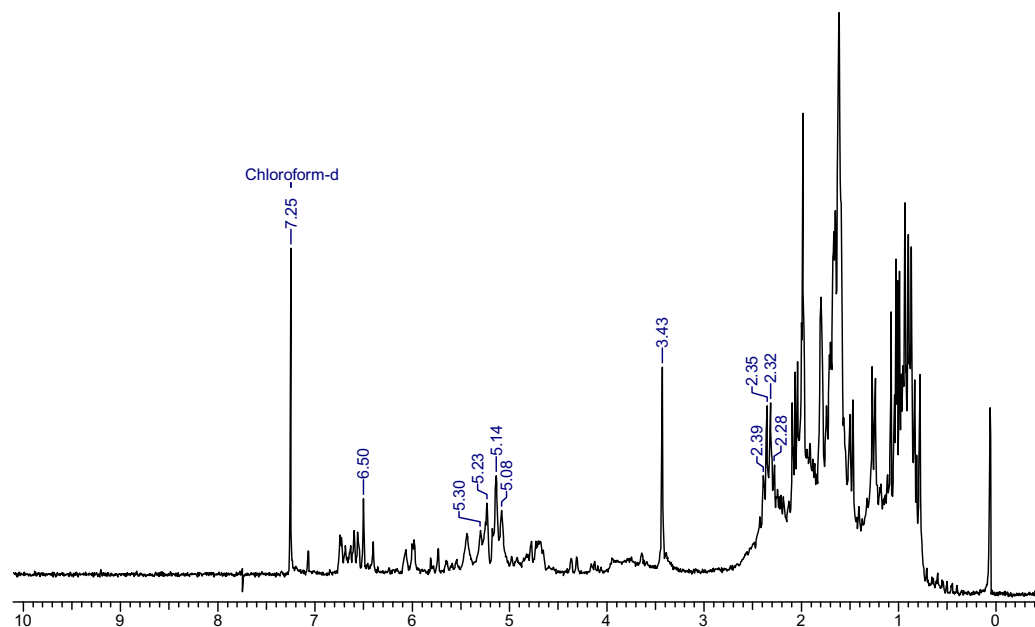


Figura A: Espectro de RMN de ¹H da fração EFS-teste 1.1 obtido a 200 MHz em CDCl₃ (17 mg/mL).

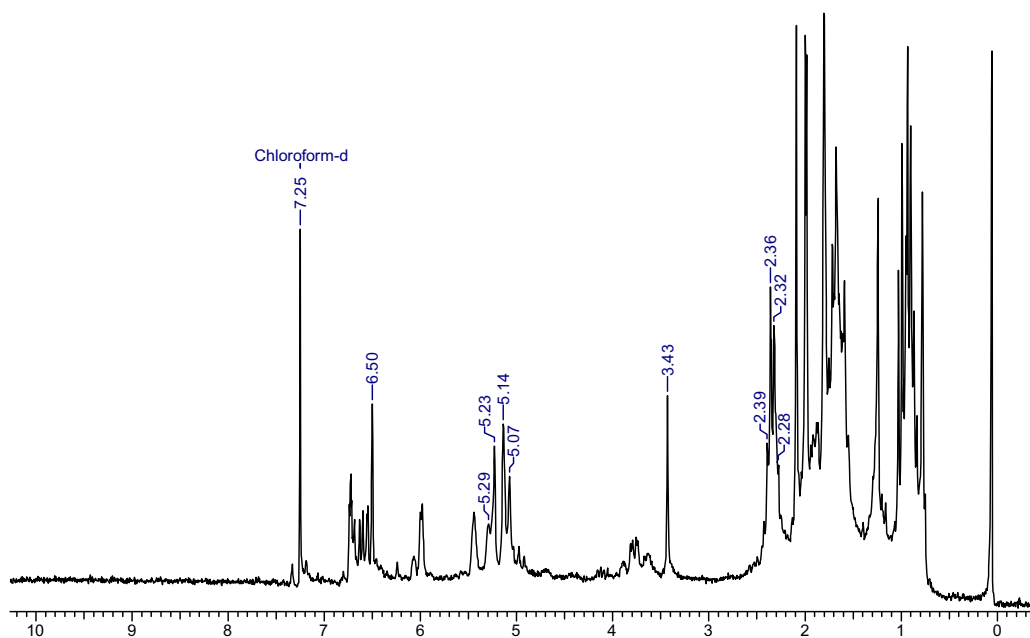


Figura B: Espectro de RMN de ¹H da fração EFS-teste 1.2 obtido a 200 MHz em CDCl₃ (17 mg/mL).

ANEXO 3

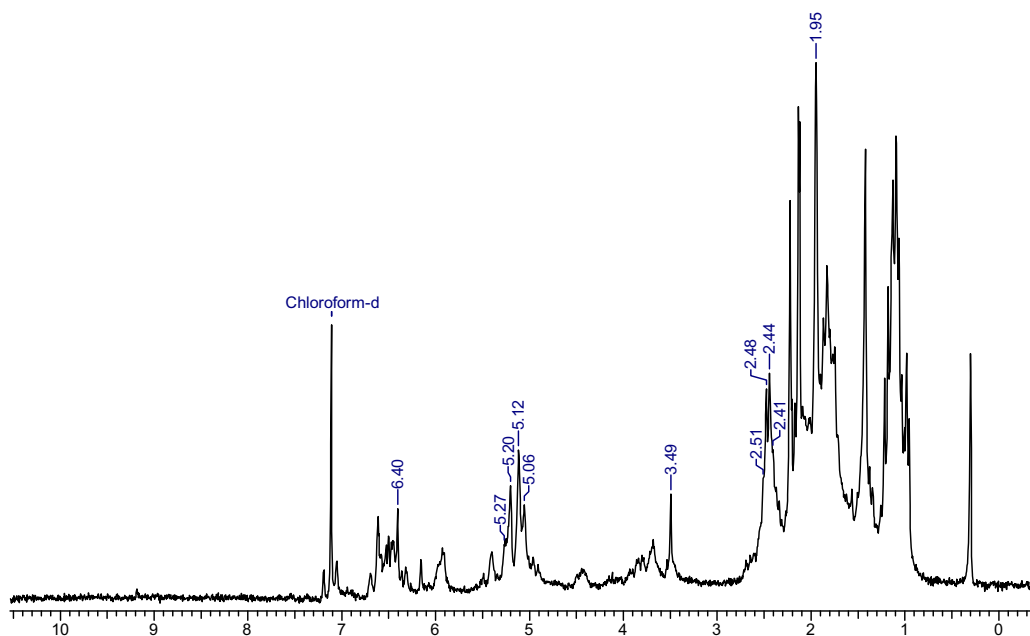


Figura A: Espectro de RMN de ^1H da fração EFS-teste2.1 obtido a 200 MHz em CDCl_3 (17 mg/mL).

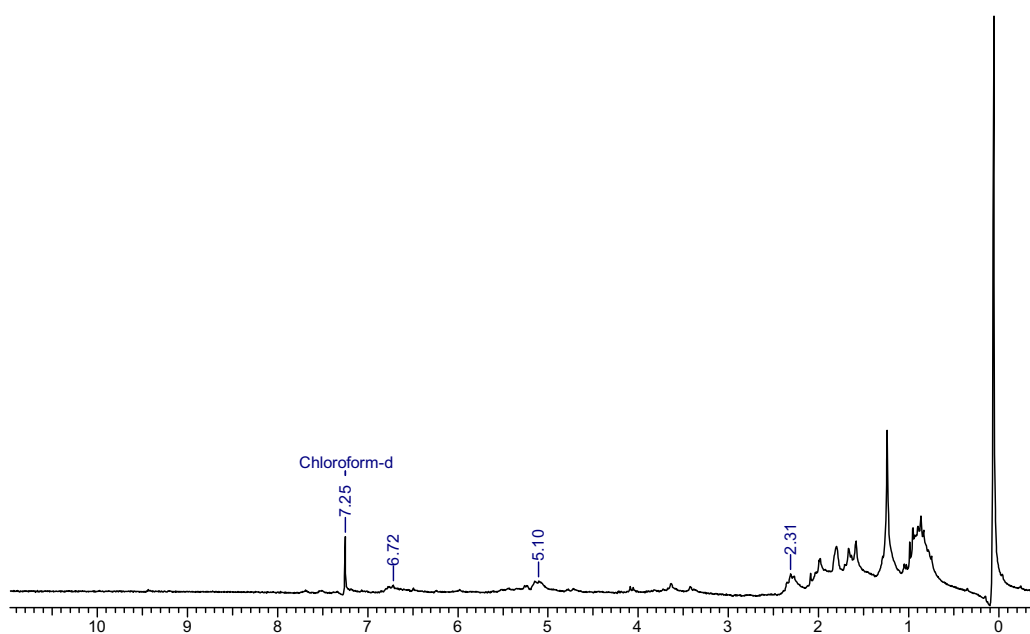


Figura B: Espectro de RMN de ^1H da fração EFS-teste3.1 obtido a 200 MHz em CDCl_3 (17 mg/mL).

ANEXO 4

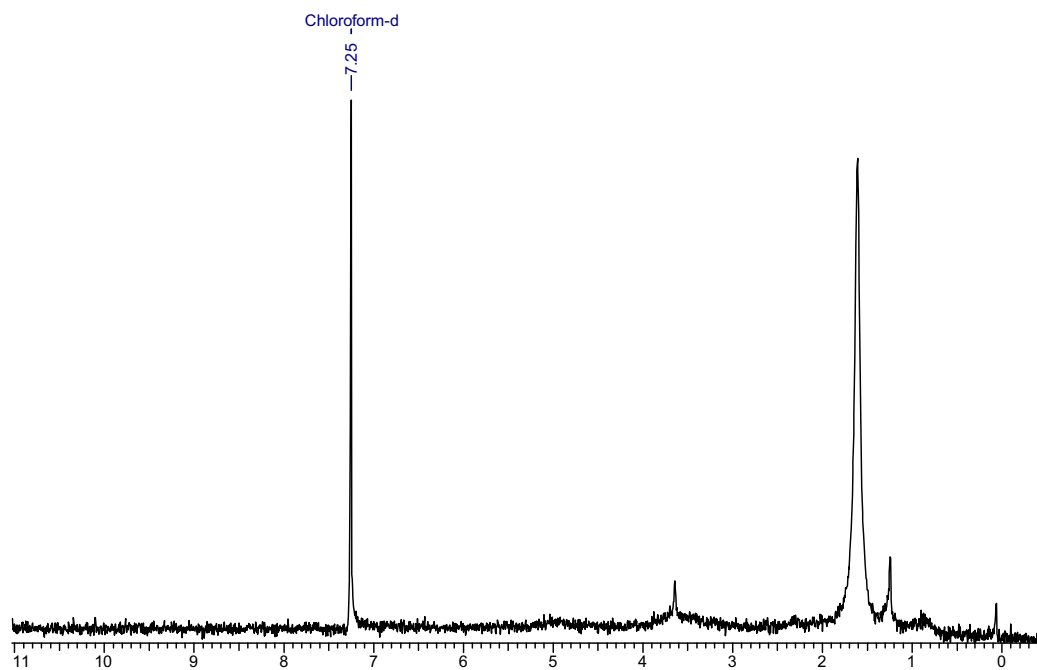


Figura: Espectro de RMN de ¹H da fração EFS-teste4.1 obtido a 200 MHz em CDCl₃ (concentração desconhecida; amostra parcialmente insolúvel em CDCl₃).

ANEXO 5

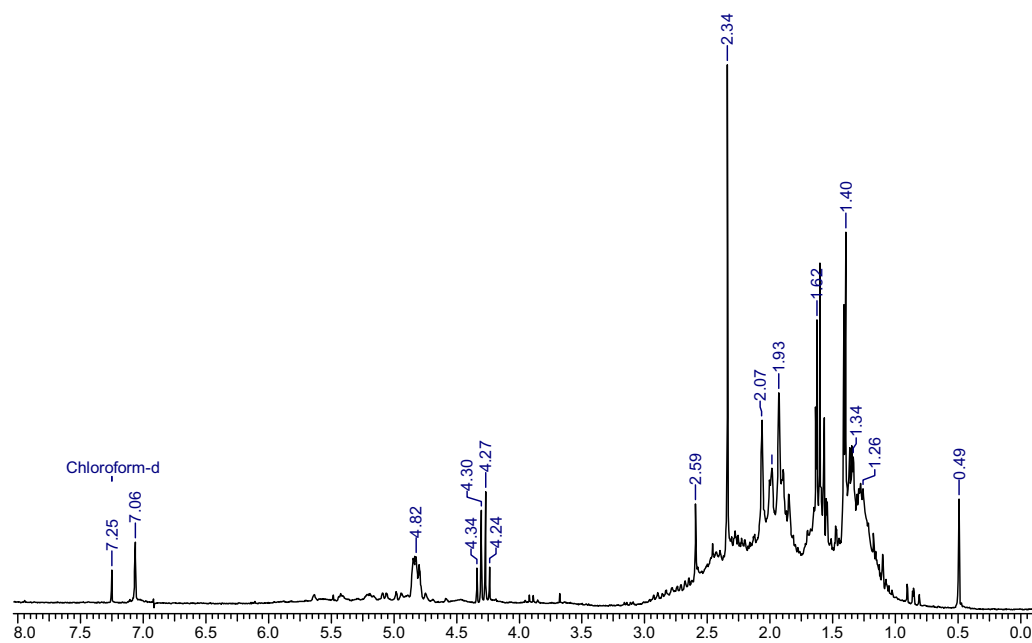


Figura A: Espectro de RMN de ¹H da fração EFS(A)1.0 obtido a 200 MHz em CDCl₃ (cerca de 30 mg/mL).

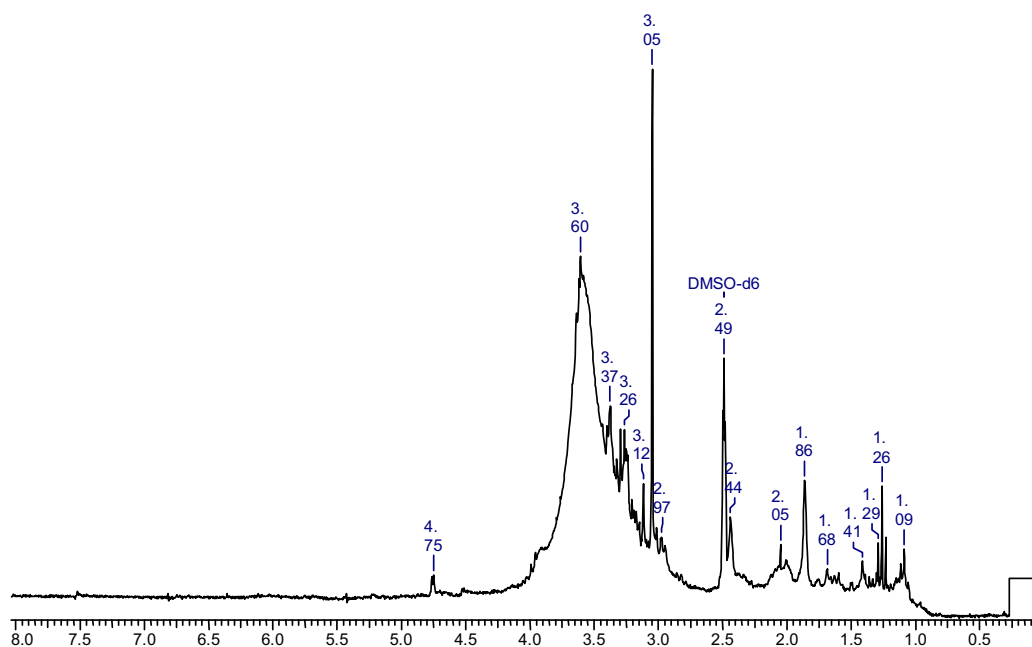


Figura B: Espectro de RMN de ¹H da fração EFS(A)3 obtido a 200 MHz em DMSO-d₆ (cerca de 30 mg/mL).

ANEXO 6

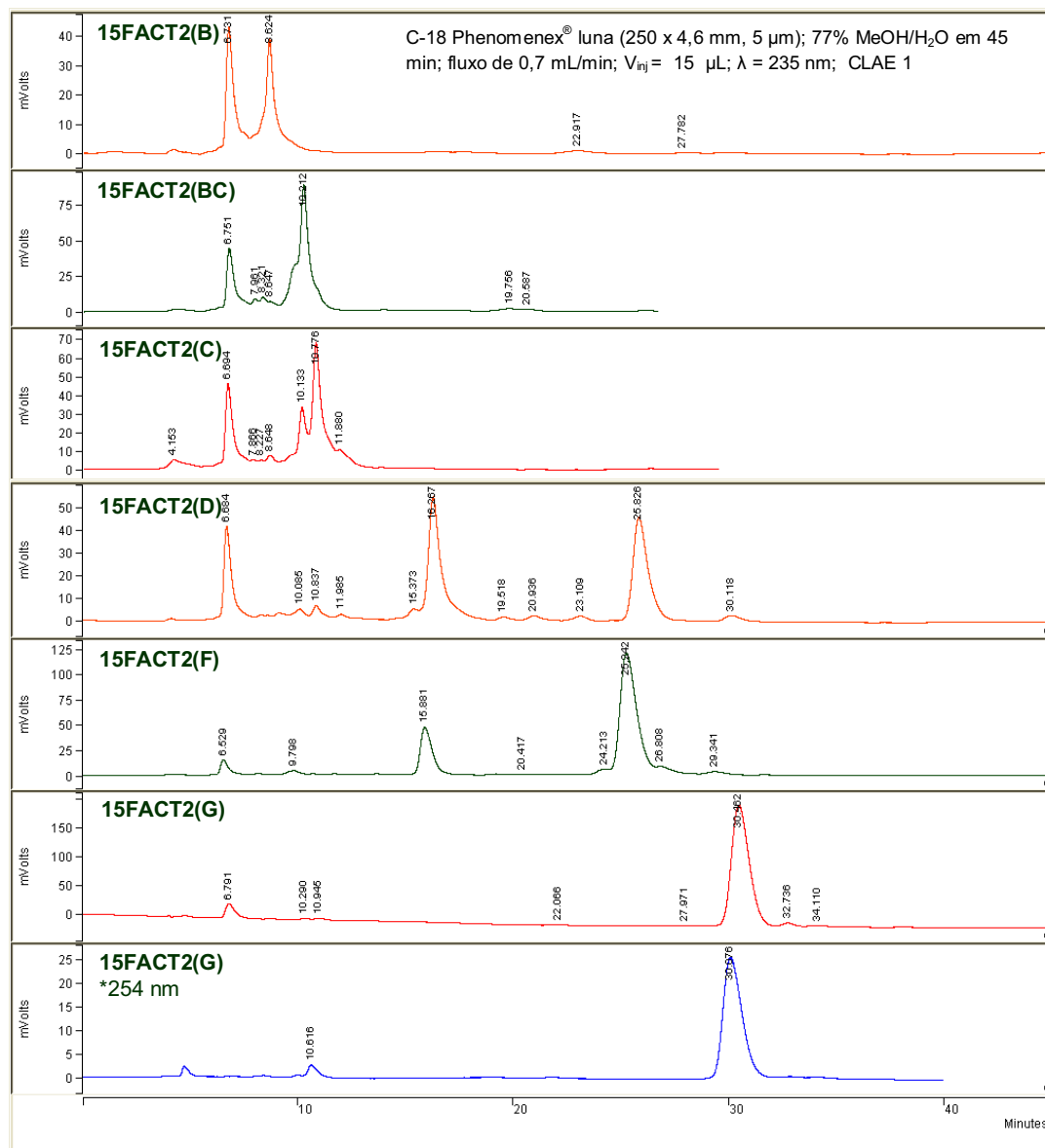


Figura: Cromatogramas analíticos das frações 15FACT2(B), 15FACT2(BC), 15FACT2(C), 15FACT2(D), 15FACT2(F) e 15FACT2(G) (1,0 mg/mL, MeOH); esta última fração também foi analisada em 254 nm.

ANEXO 7

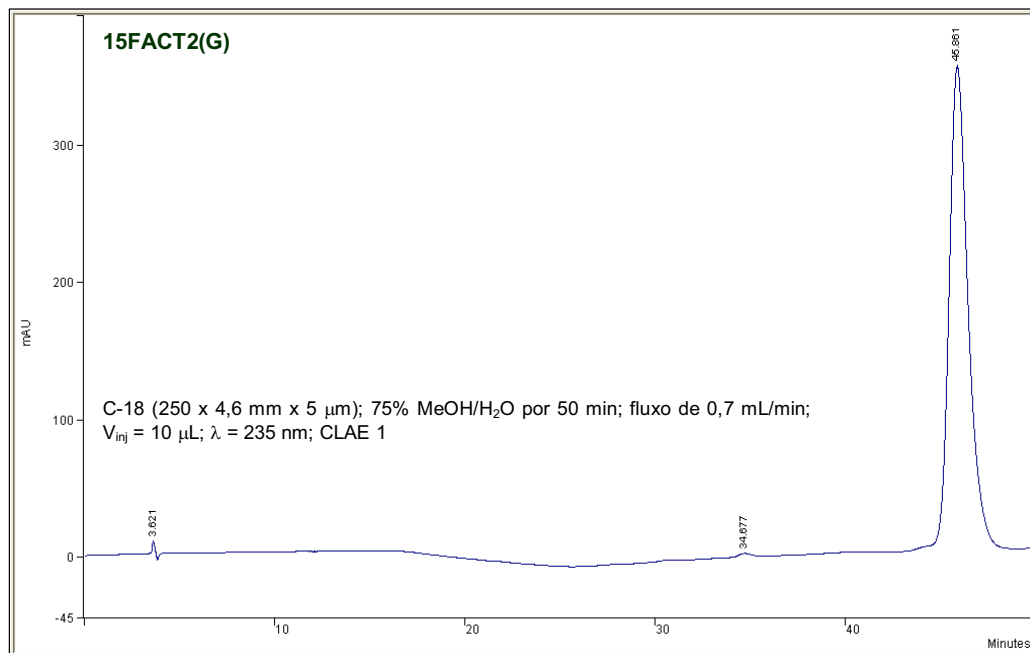


Figura: Cromatograma analítico de 15FACT2(G) repurificada (1,1 mg/mL, MeOH).

ANEXO 8

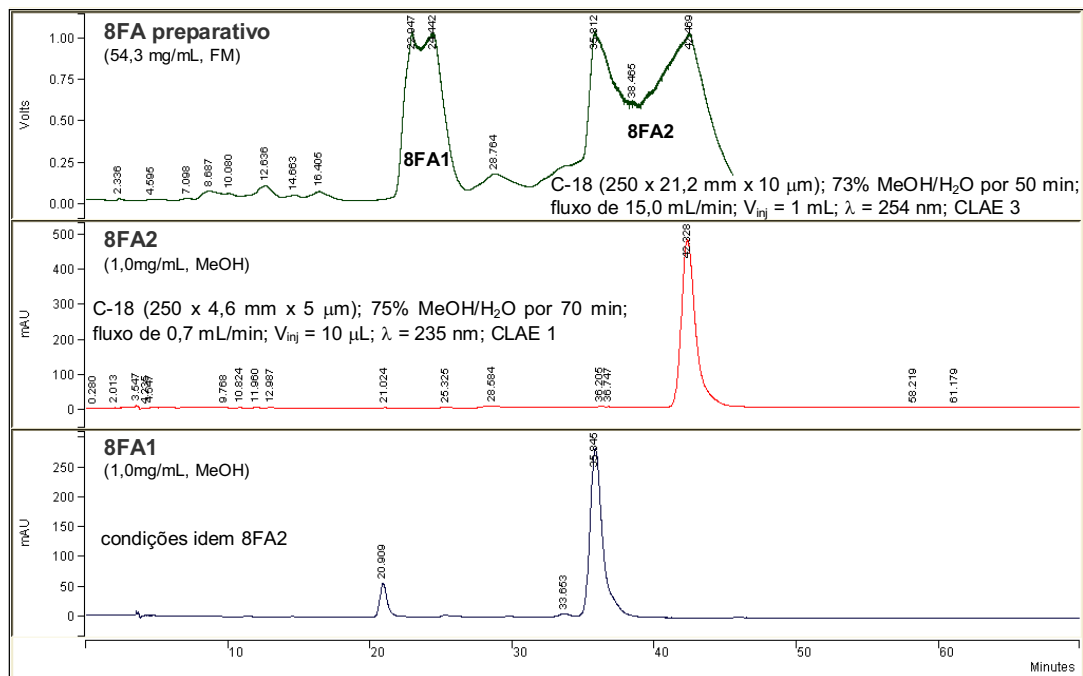


Figura A: Cromatogramas preparativo de 8FA e analíticos das sub-frações 8FA1 e 8FA2.

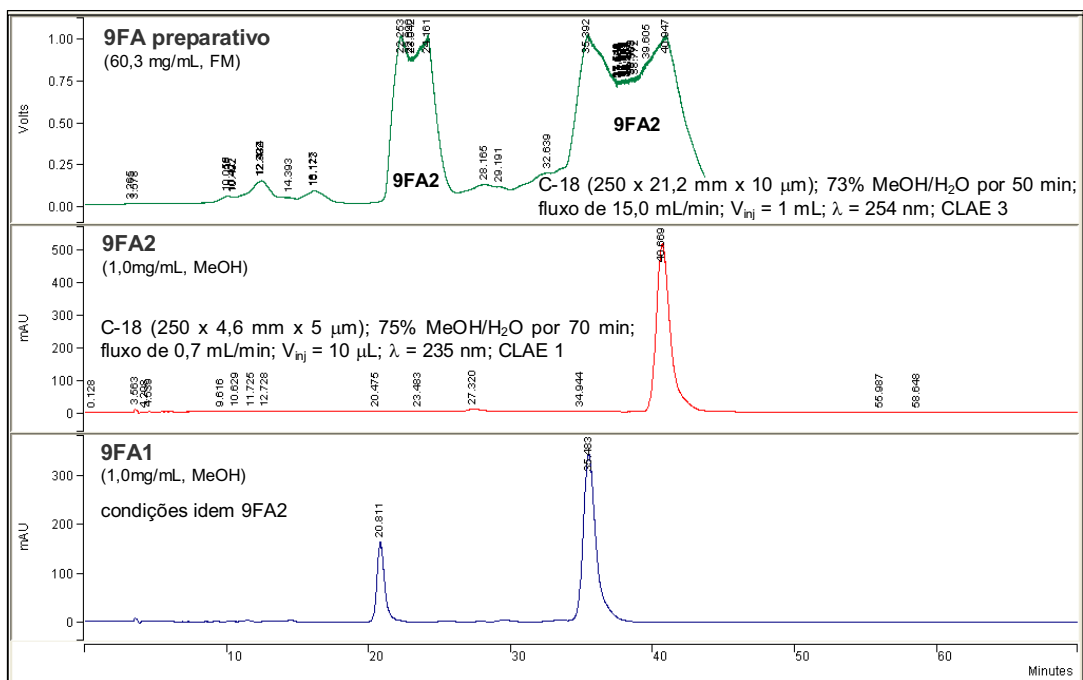


Figura B: Cromatogramas preparativo de 9FA e analíticos das sub-frações 9FA1 e 9FA2.

ANEXO 9

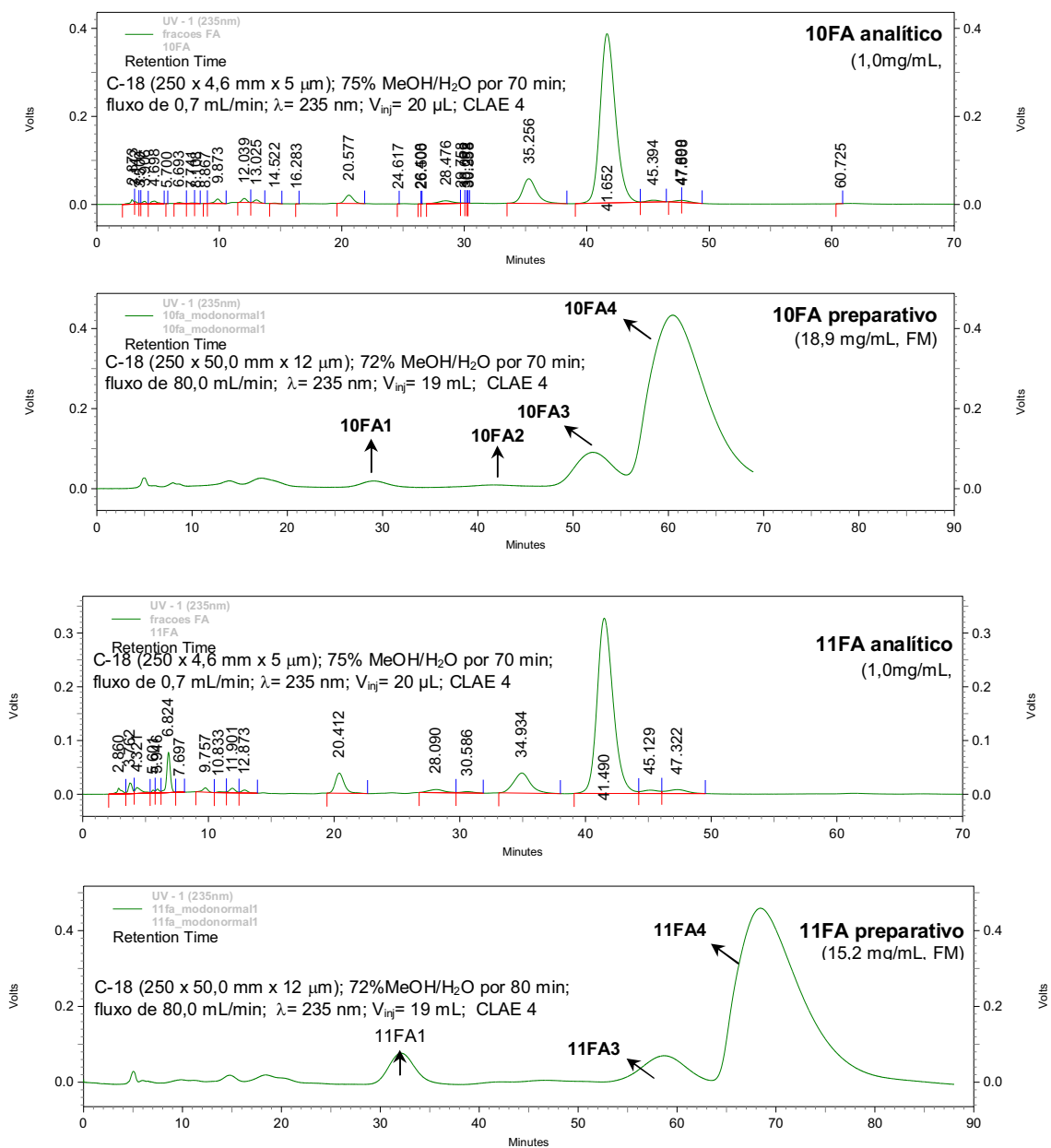


Figura: Cromatogramas analíticos e preparativos de 10FA e 11FA.

ANEXO 10

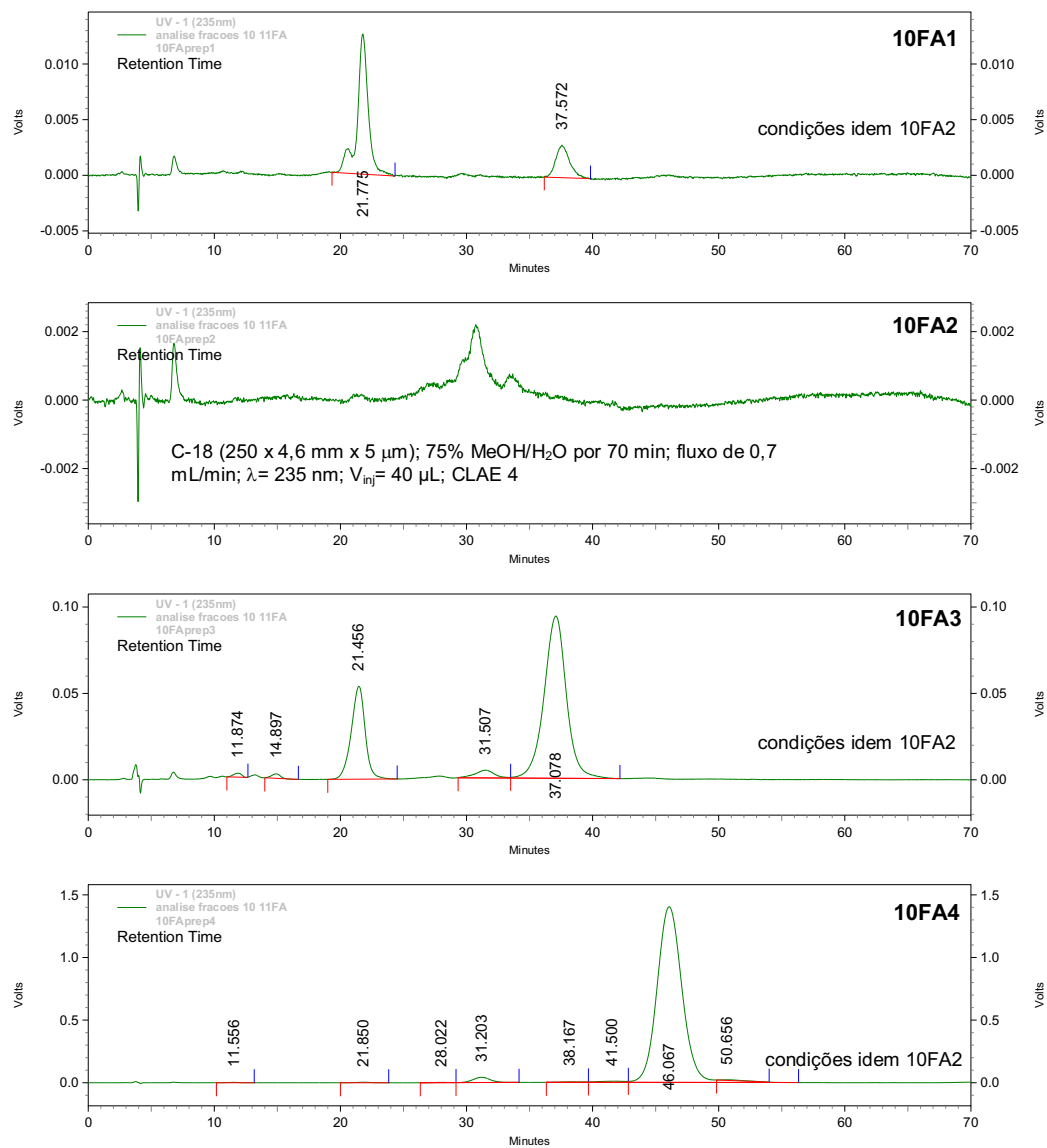


Figura: Cromatogramas analíticos das sub-frações de 10FA1, 10FA2, 10FA3 e 10FA4 (1,0 mg/mL, MeOH).

ANEXO 11

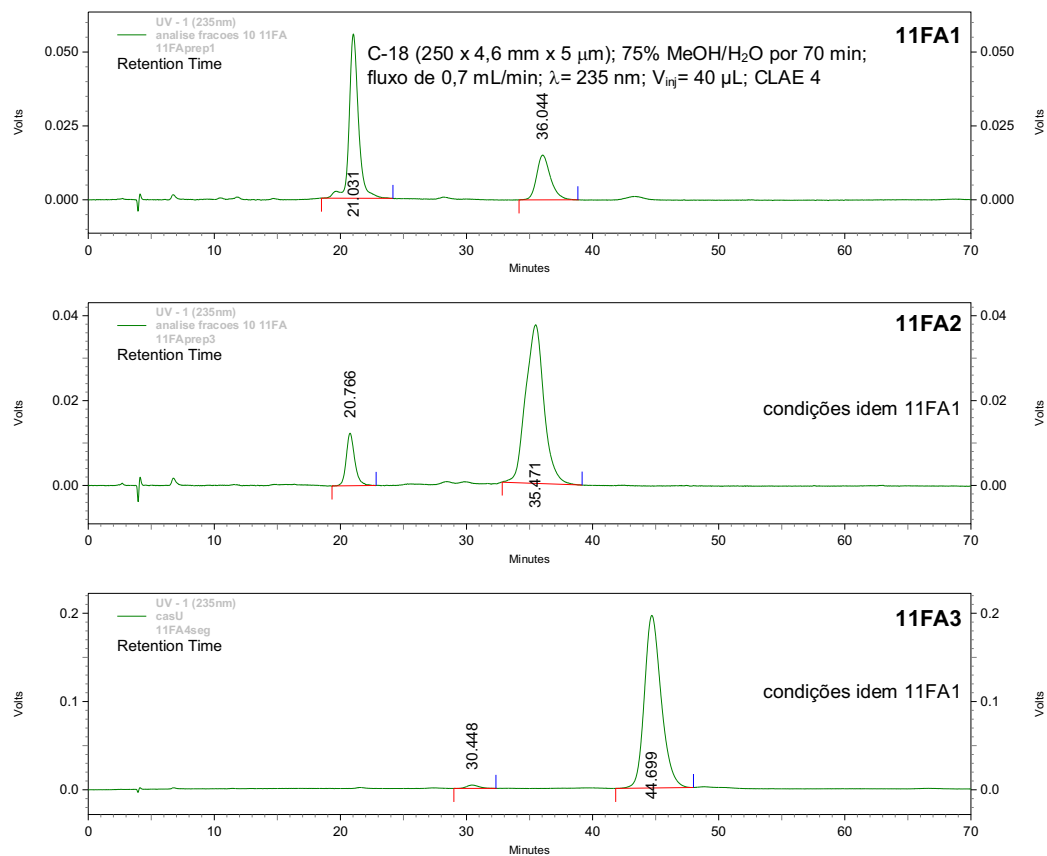


Figura: Cromatogramas analíticos das sub-frações de 11FA1, 11FA3 e 11FA4 (1,0 mg/mL, MeOH).

ANEXO 12

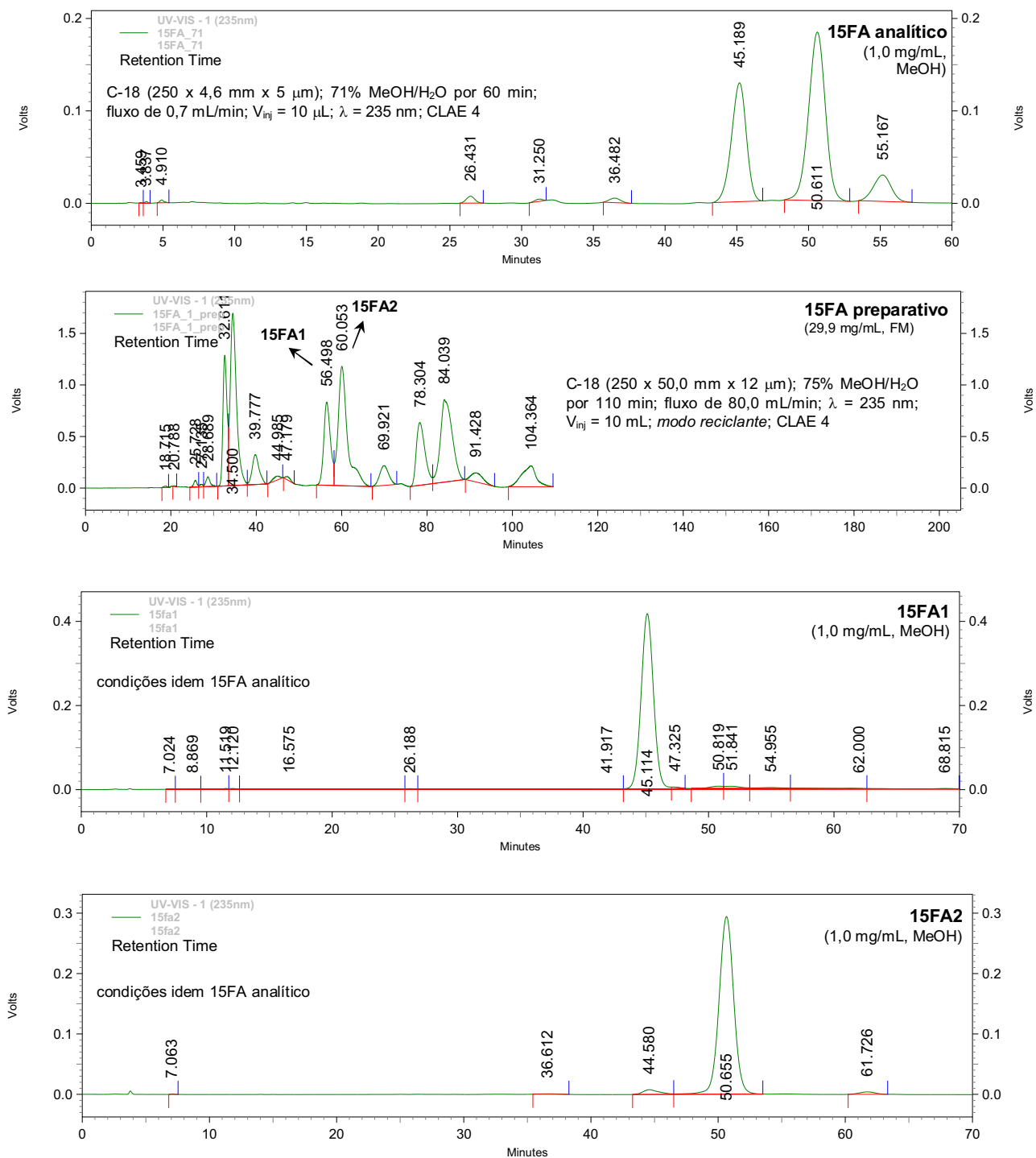


Figura: Cromatogramas analítico e preparativo da fração 15FA e analíticos das sub-frações 15FA1 e 15FA2.

ANEXO 13

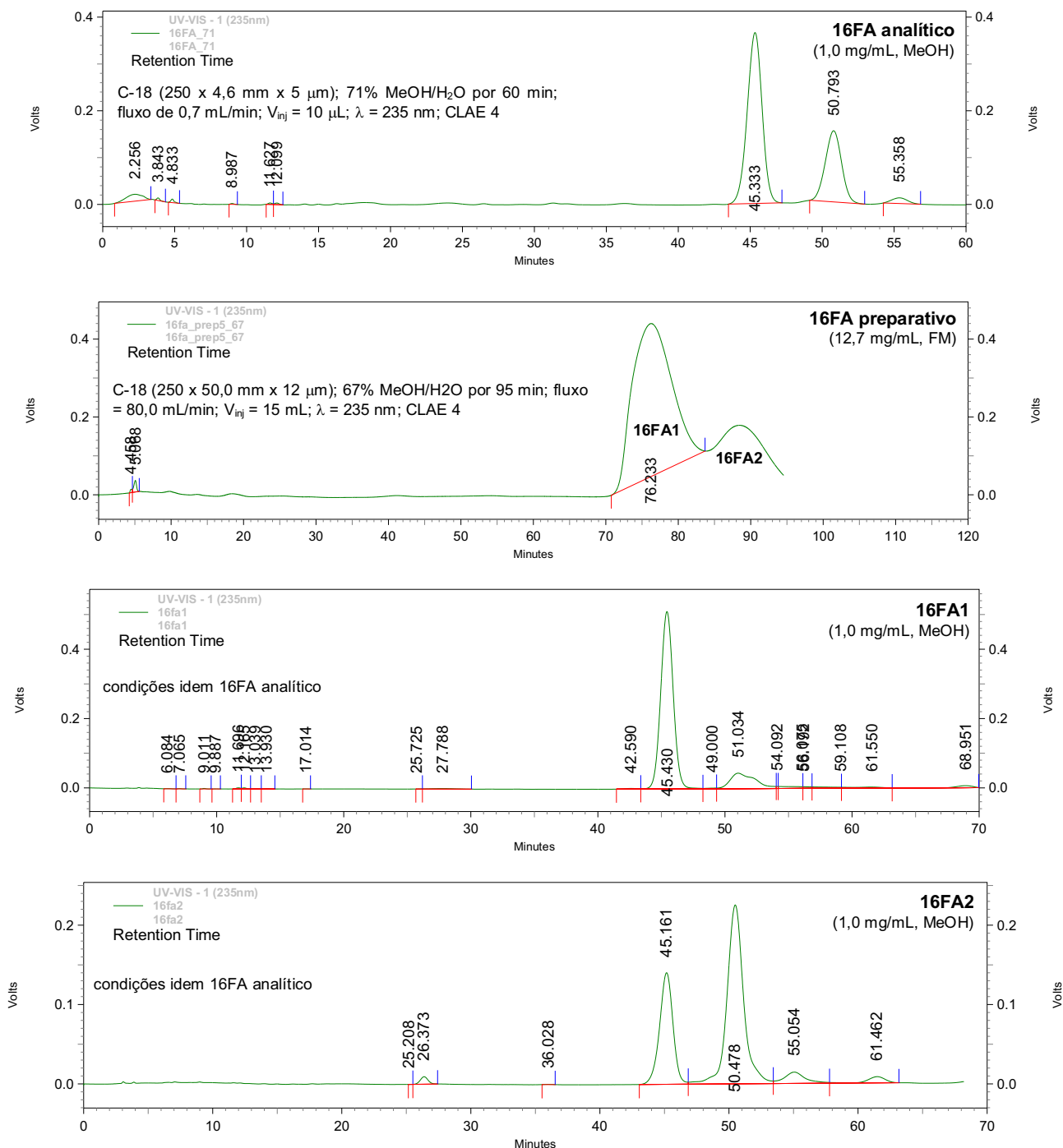


Figura: Cromatogramas analítico e preparativo da fração 16FA e analíticos das sub-frações 16FA1 e 16FA2.

ANEXO 14

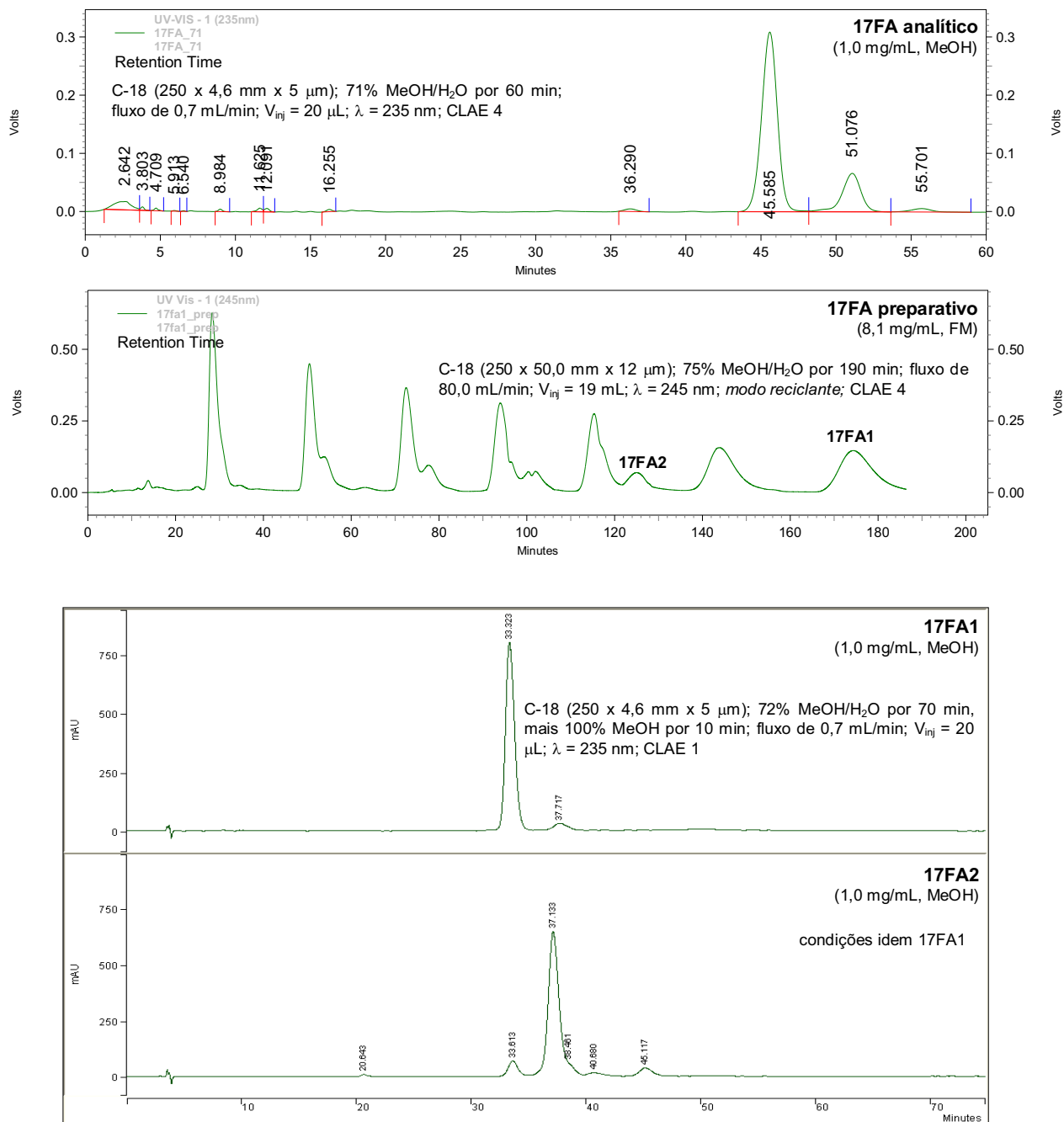


Figura: Cromatogramas analítico e preparativo da fração 17FA e analíticos das sub-frações 17FA1 e 17FA2.

ANEXO 15

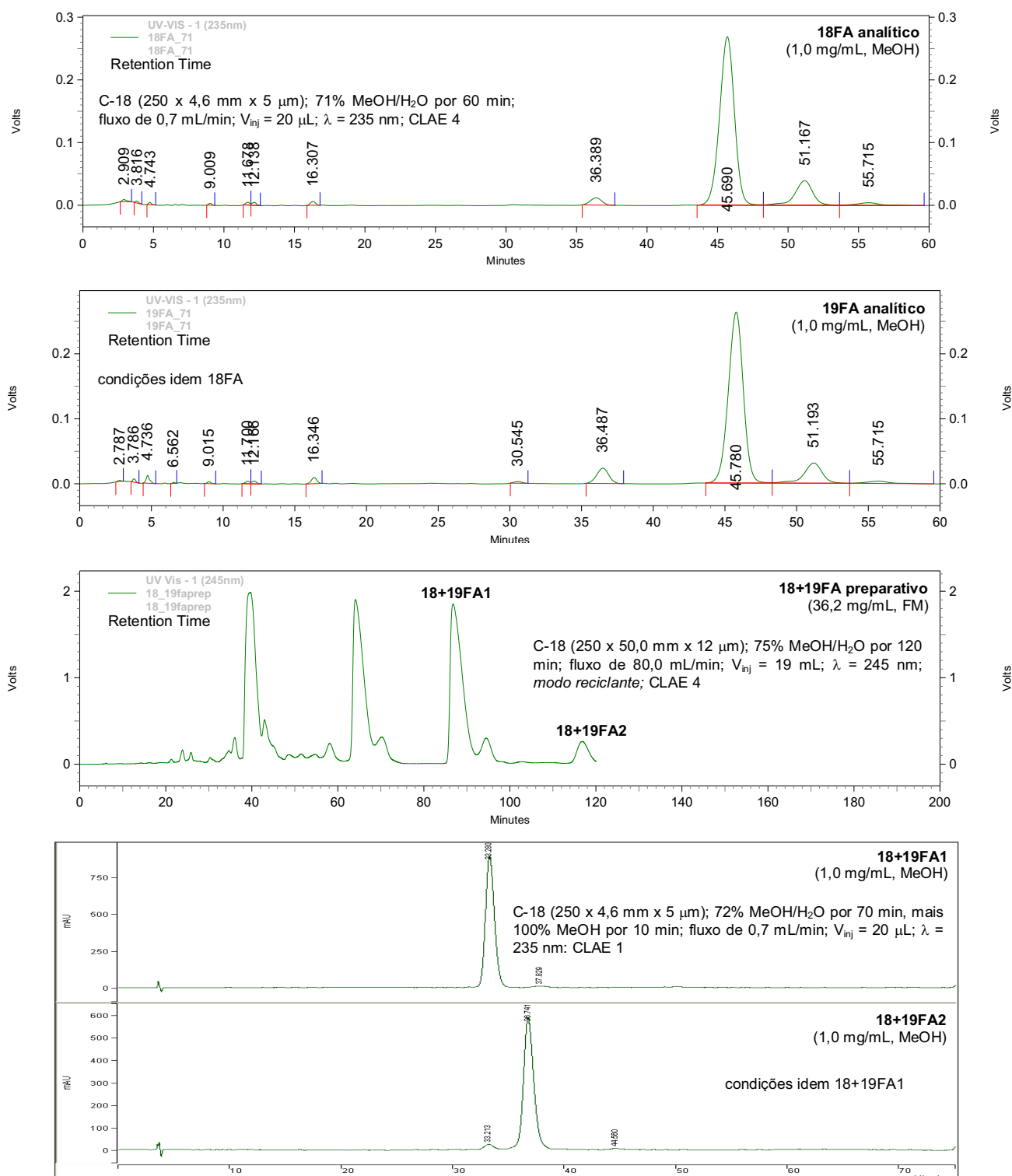


Figura: Cromatogramas analíticos das frações 18FA e 19FA, preparativo de 18+19FA e analíticos das sub-frações 18+19FA1 e 18+19FAFA2.

ANEXO 16

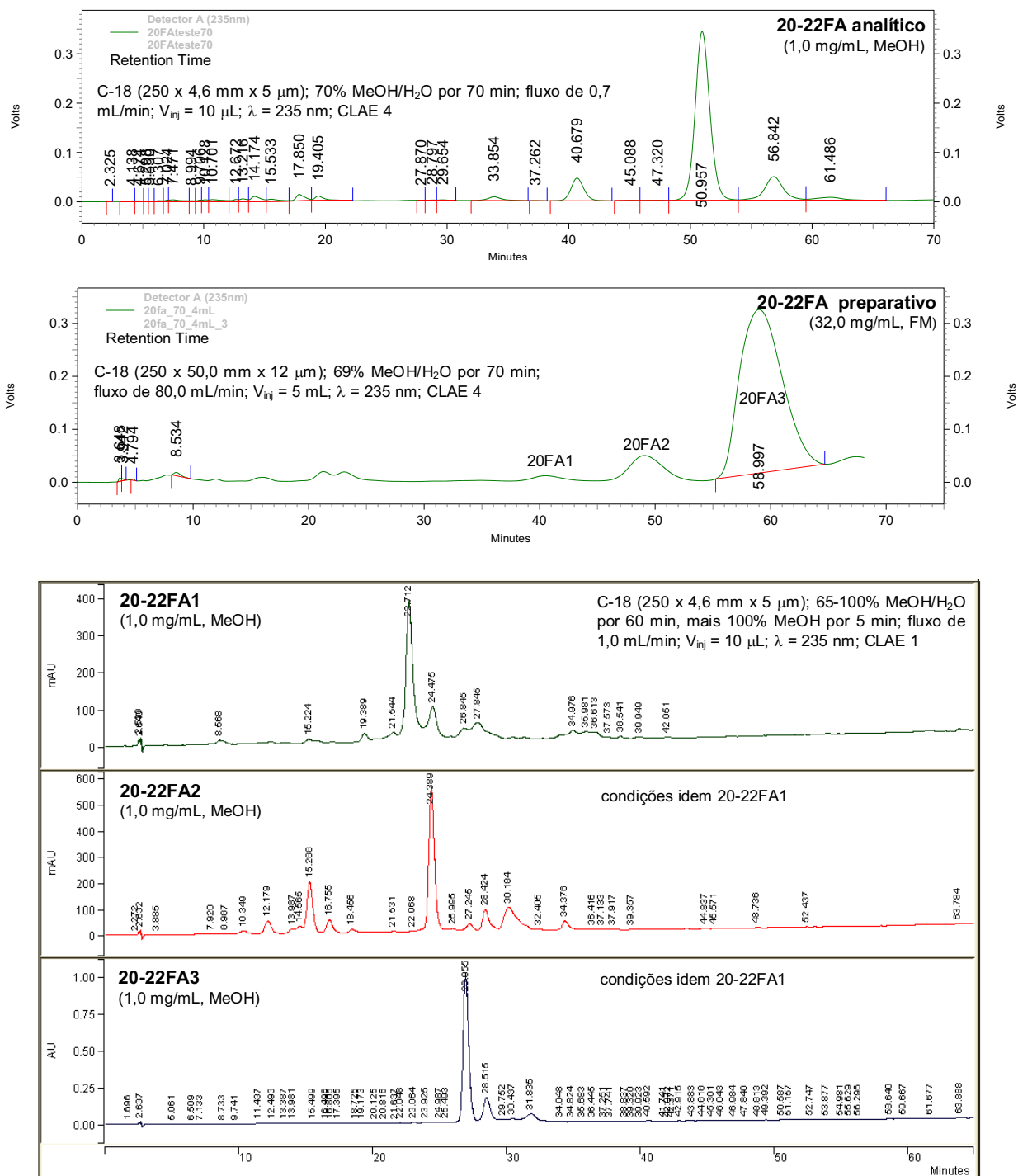


Figura: Cromatogramas analítico e preparativo da fração 20-22FA e analíticos das sub-frações 20-22FA1, 20-22FA2 e 20-22FA3.

ANEXO 17

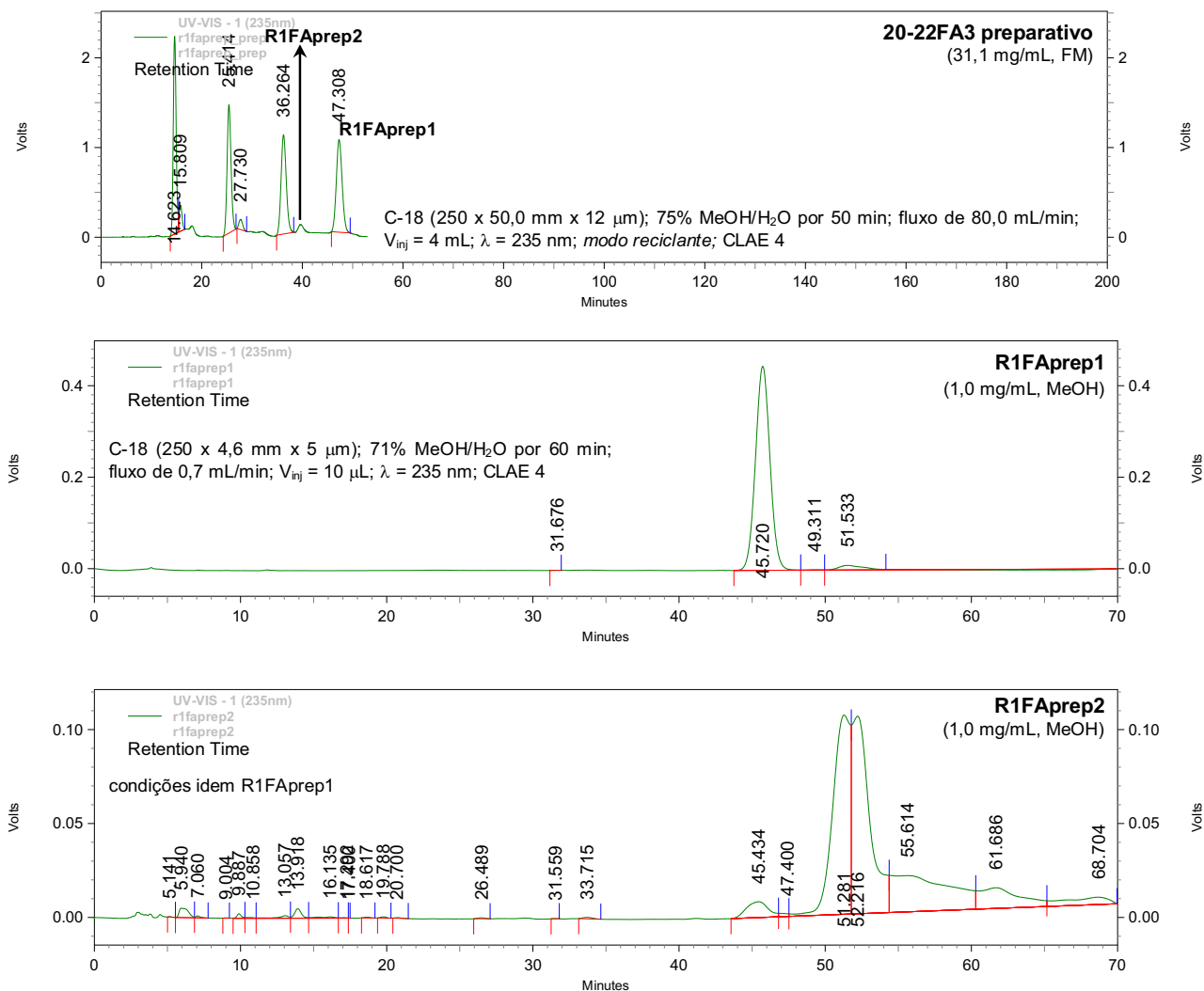


Figura: Cromatogramas preparativo da fração 20-22FA3 e analíticos das sub-frações R1FAprep1 e R1FAprep2.

ANEXO 18

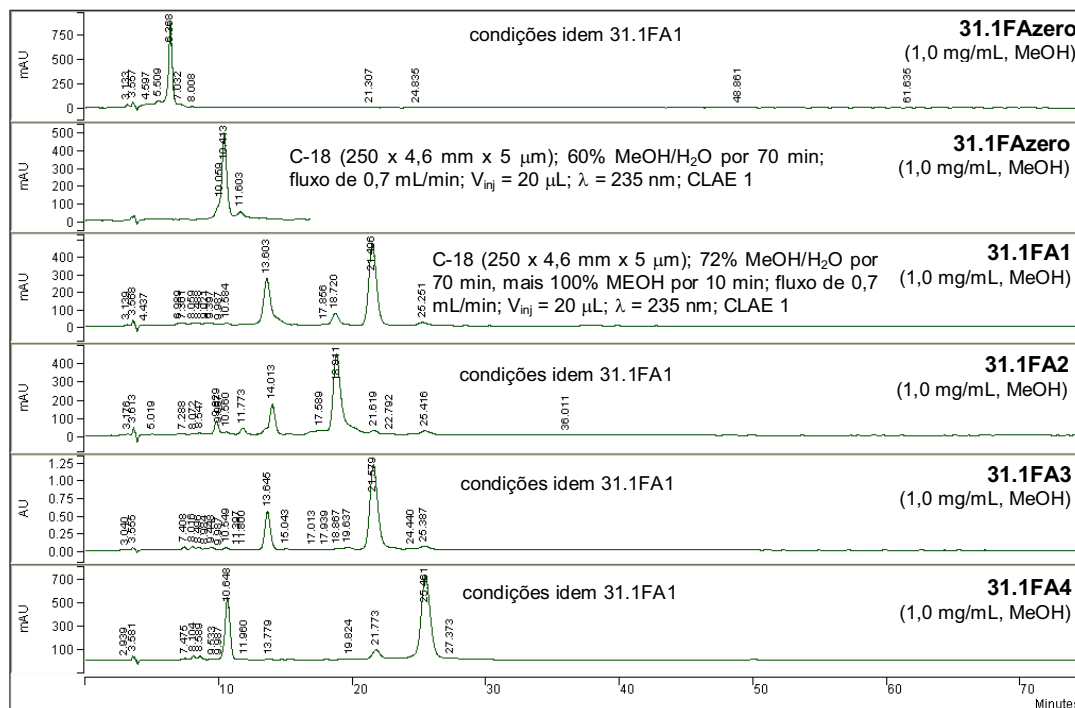
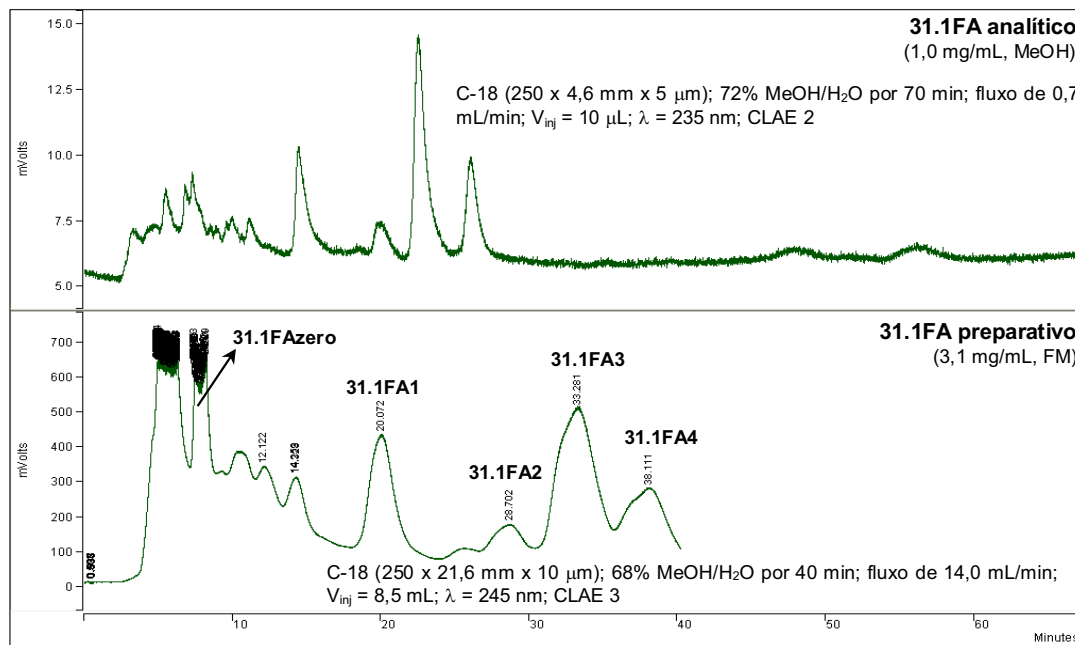


Figura: Cromatogramas analítico e preparativo da fração 31.1FA e analíticos das sub-frações 31.1FAzero (2 condições), 31.1FA1, 31.1FA2, 31.1FA3 e 31.1FA4.

ANEXO 19

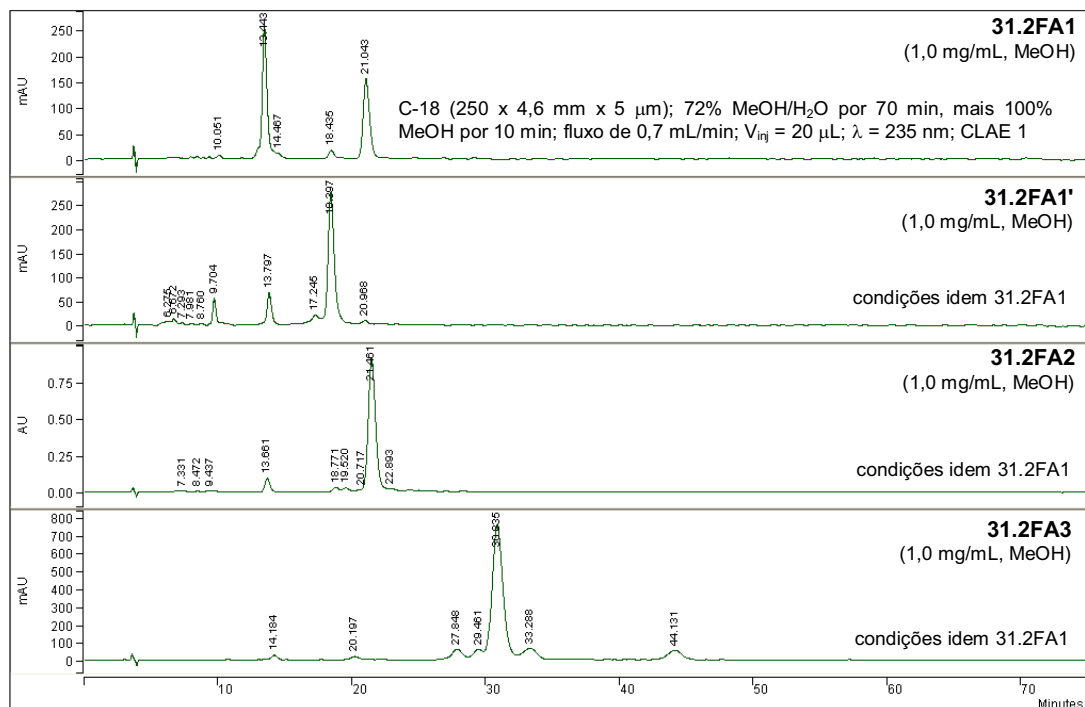
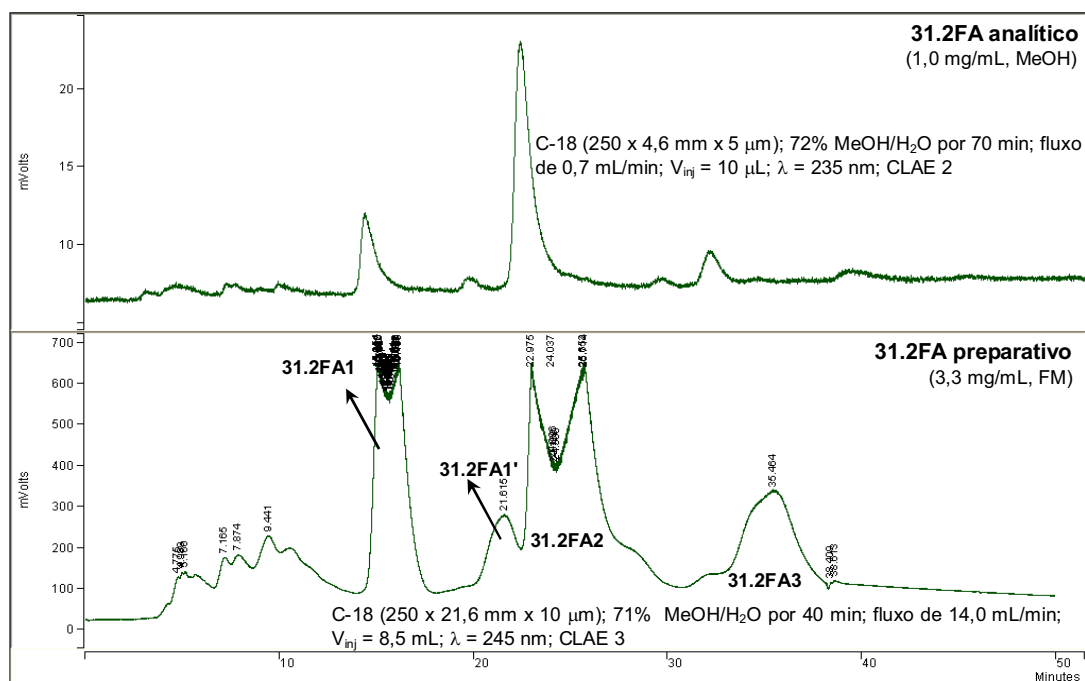


Figura: Cromatogramas analítico e preparativo da fração 31.2FA e analíticos das sub-frações 31.2FA1, 31.2FA1', 31.2FA2 e 31.2FA3.

ANEXO 20

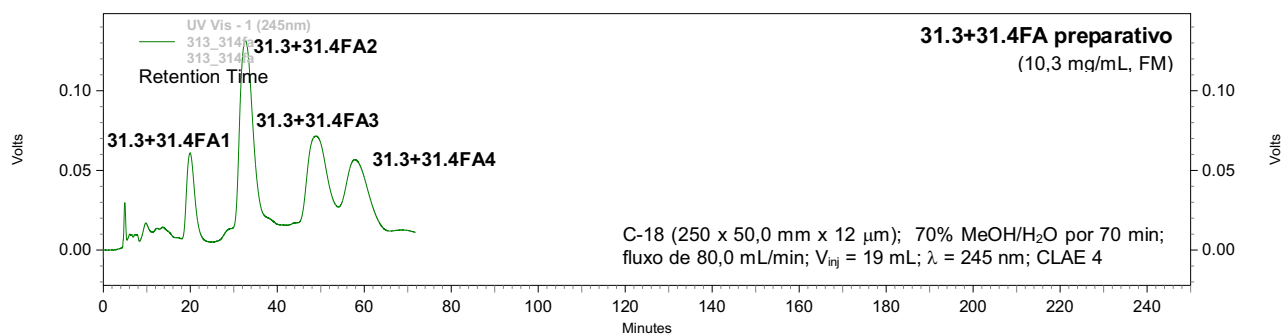
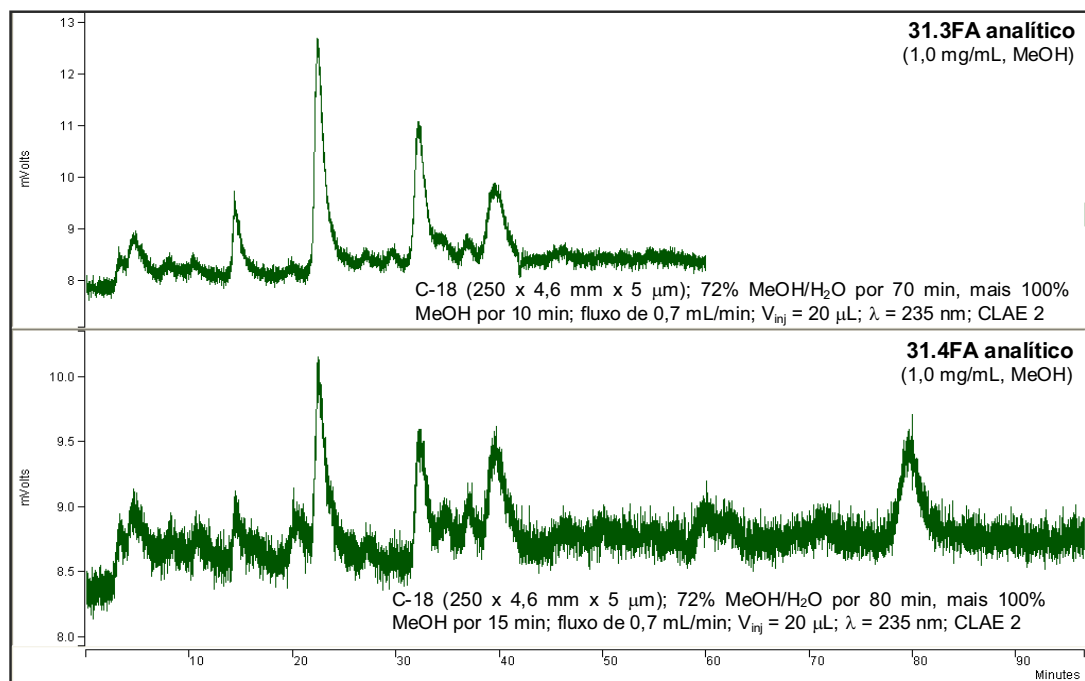


Figura: Cromatogramas analíticos das frações 31.3FA e 31.4FA e preparativo da fração 31.3+31.4FA.

ANEXO 21

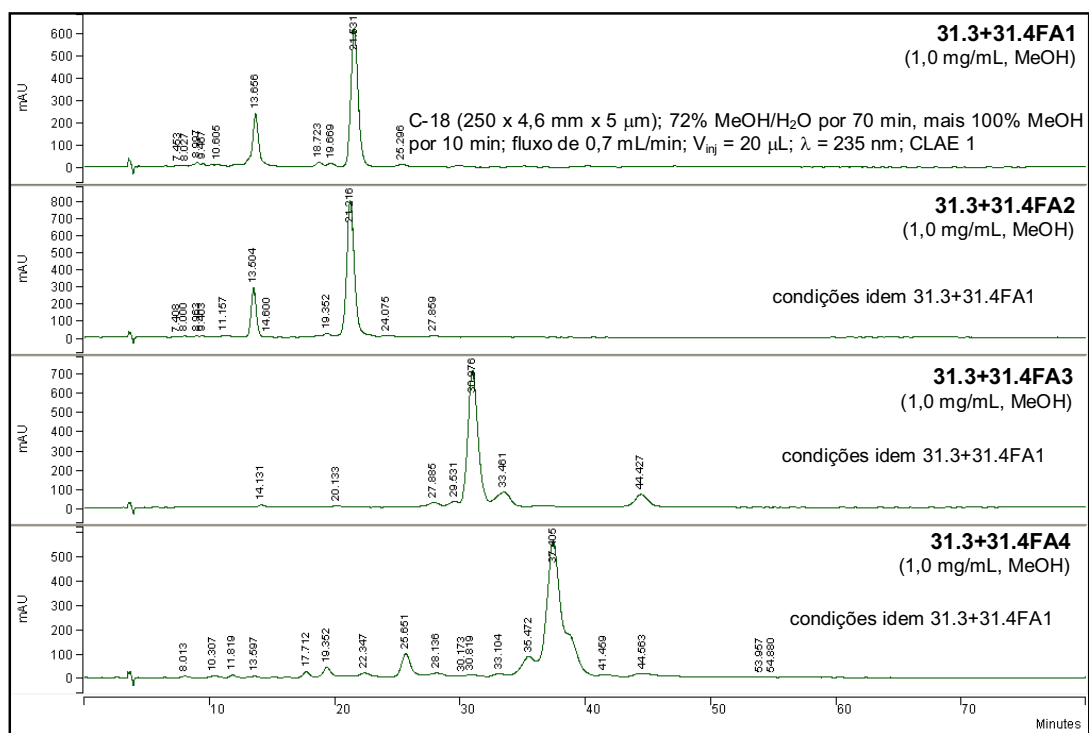


Figura: Cromatogramas analíticos das sub-frações 31.3+31.4FA1, 31.3+31.4FA2, 31.3+31.4FA3 e 31.3+31.4FA4.

ANEXO 22

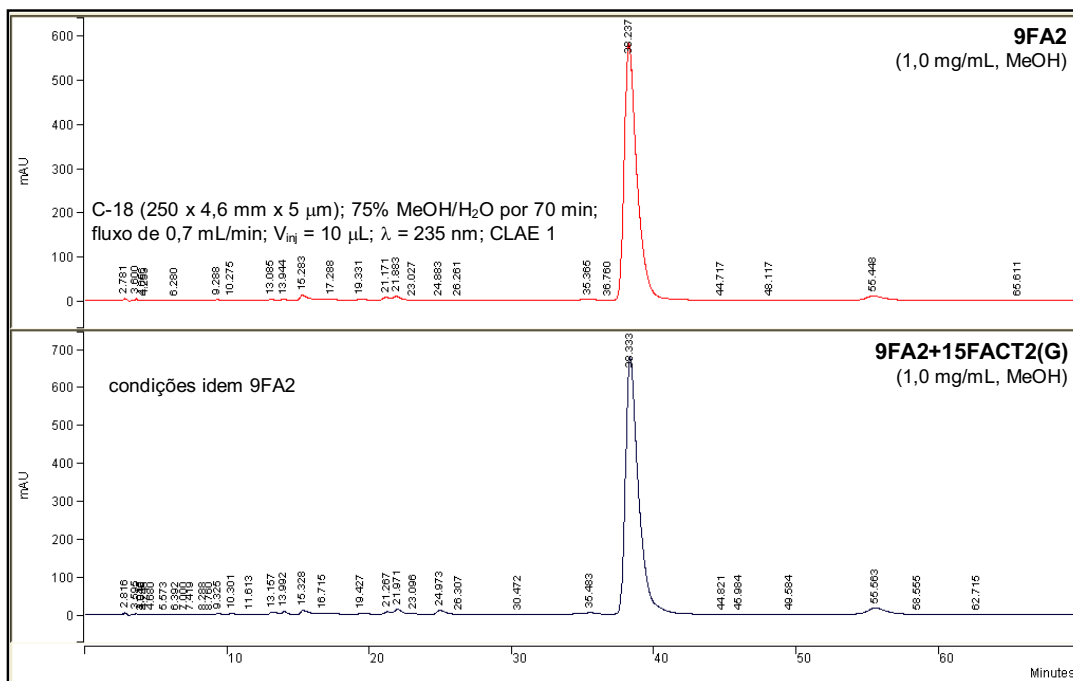


Figura A: Cromatogramas analíticos de 9FA2 e da co-injeção (1:1, v/v) de 9FA2+15FACT2(G).

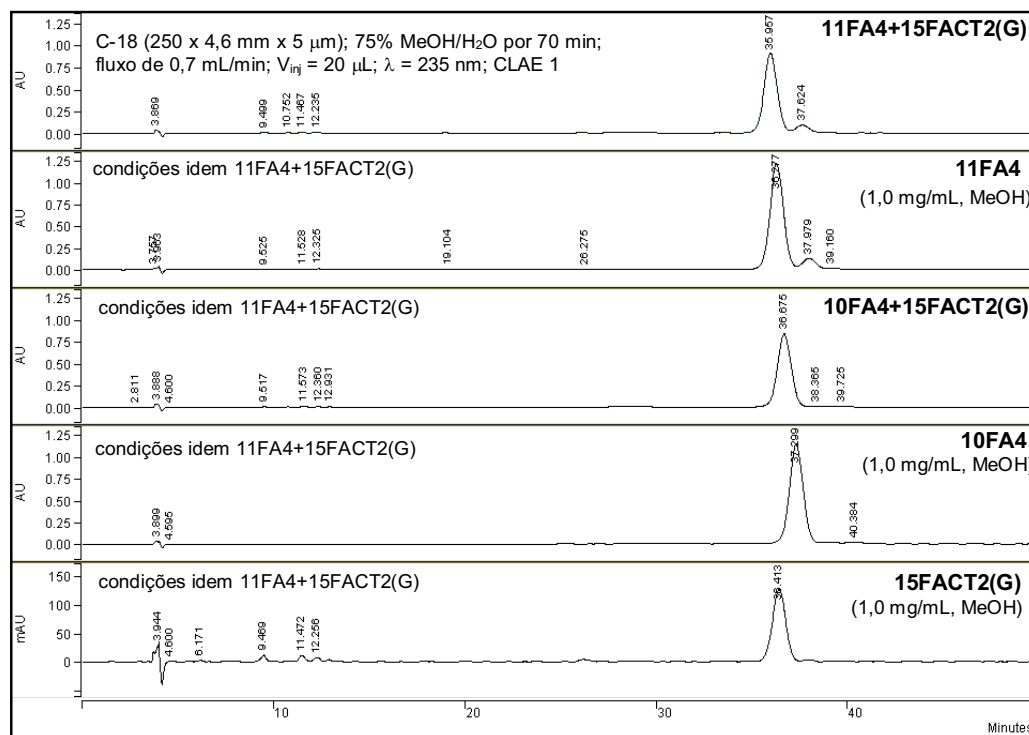


Figura B: Cromatogramas analíticos de 10FA4, 11FA4 e 15FACT2(G) e das co-injeções(1:1, v/v) de 15FACT2(G)+ 10FA4 e 15FACT2(G)+11FA4.

ANEXO 23

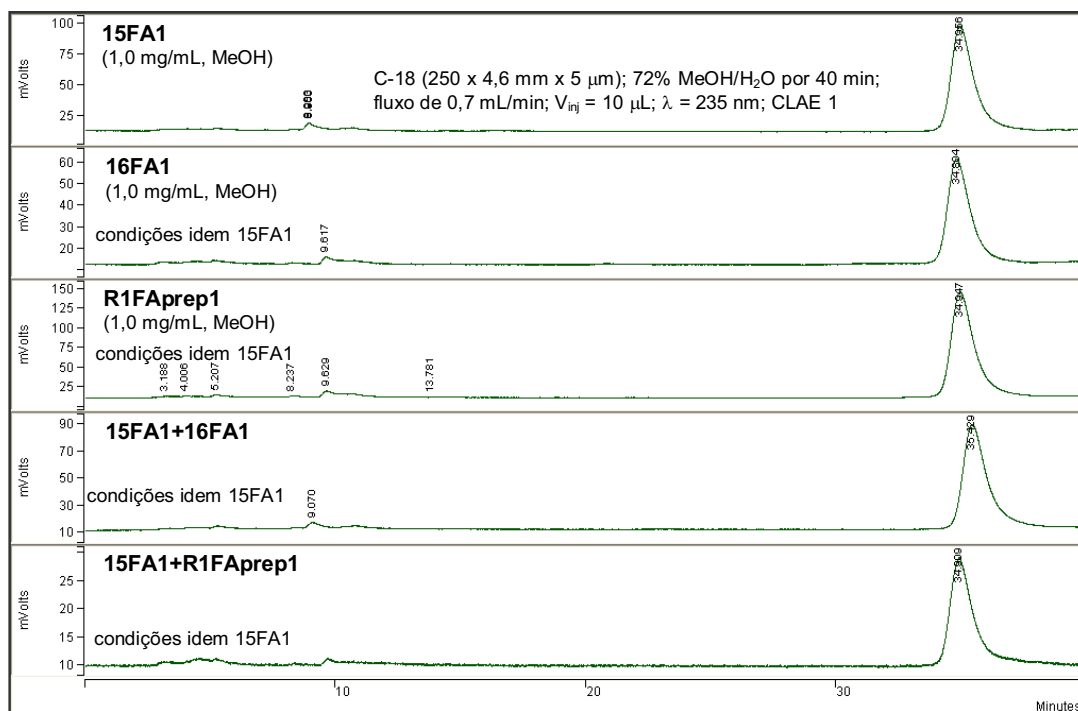


Figura A: Cromatogramas analíticos de 15FA1, 16FA1 e R1FAprep1 e das co-injeções (1:1, v/v) de 15FA1+16FA1 e 15FA1+R1FAprep1.

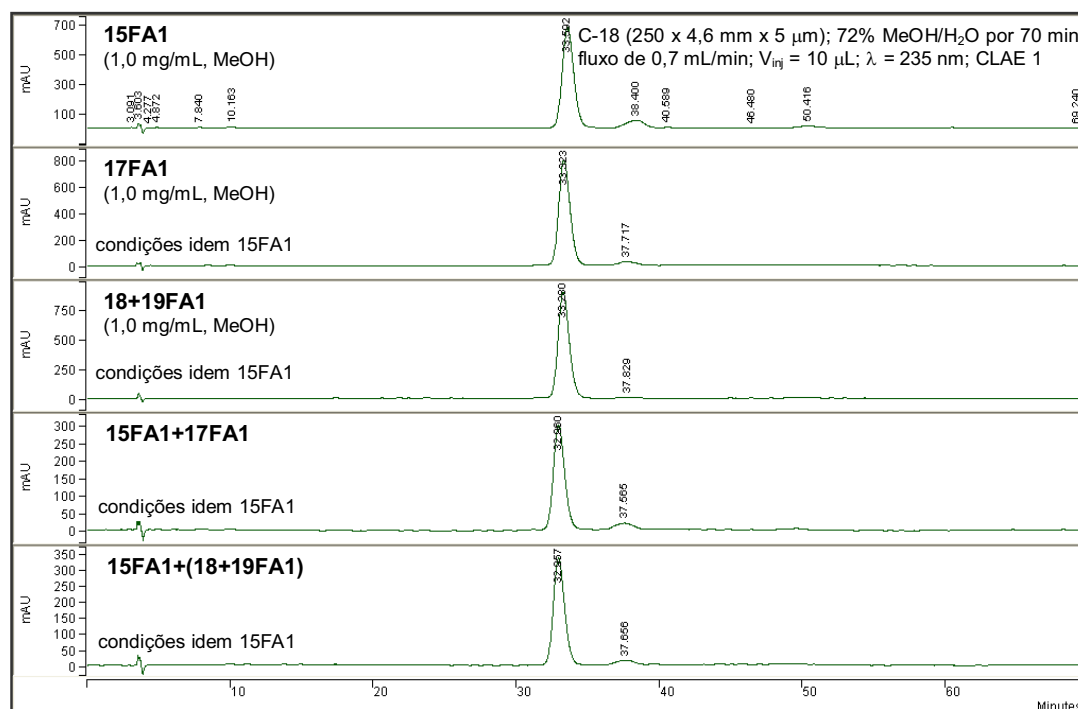


Figura B: Cromatogramas analíticos de 15FA1, 17FA1 e 18+19FA1 e das co-injeções (1:1, v/v) de 15FA1+17FA1 e 15FA1+(18+19FA1).

ANEXO 24

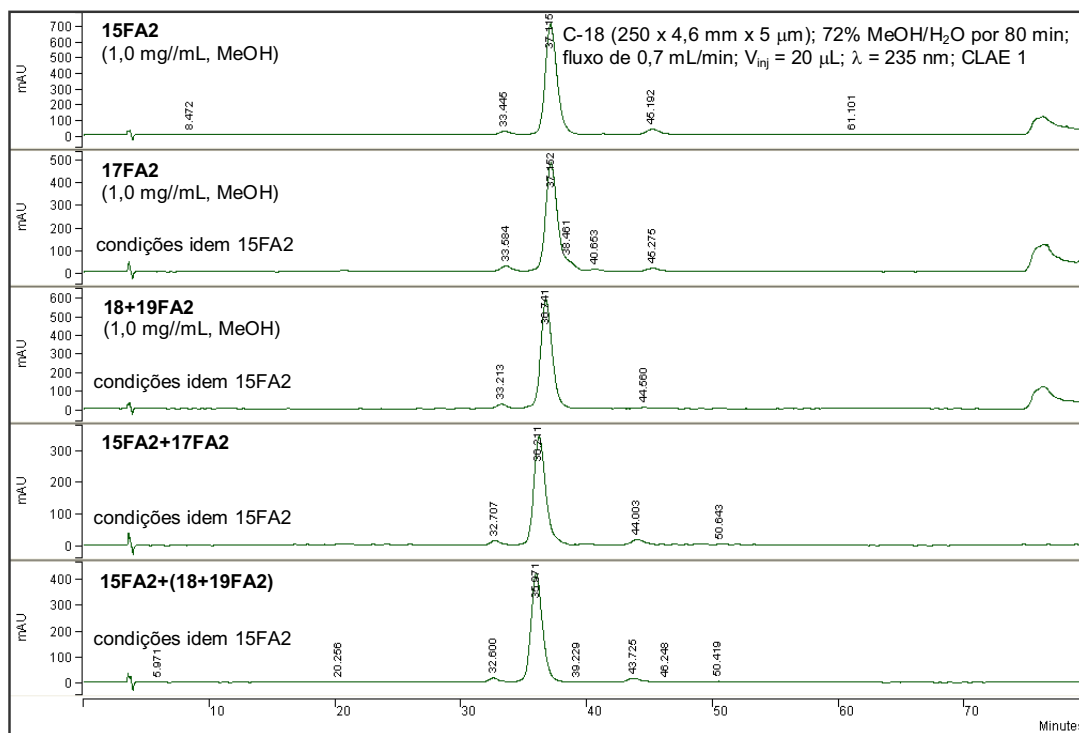


Figura: Cromatogramas analíticos de 15FA2, 17FA2 e 18+19FA2 e das co-injeções (1:1, v/v) de 15FA2+17FA2 e 15FA2+(18+19FA2).

ANEXO 25

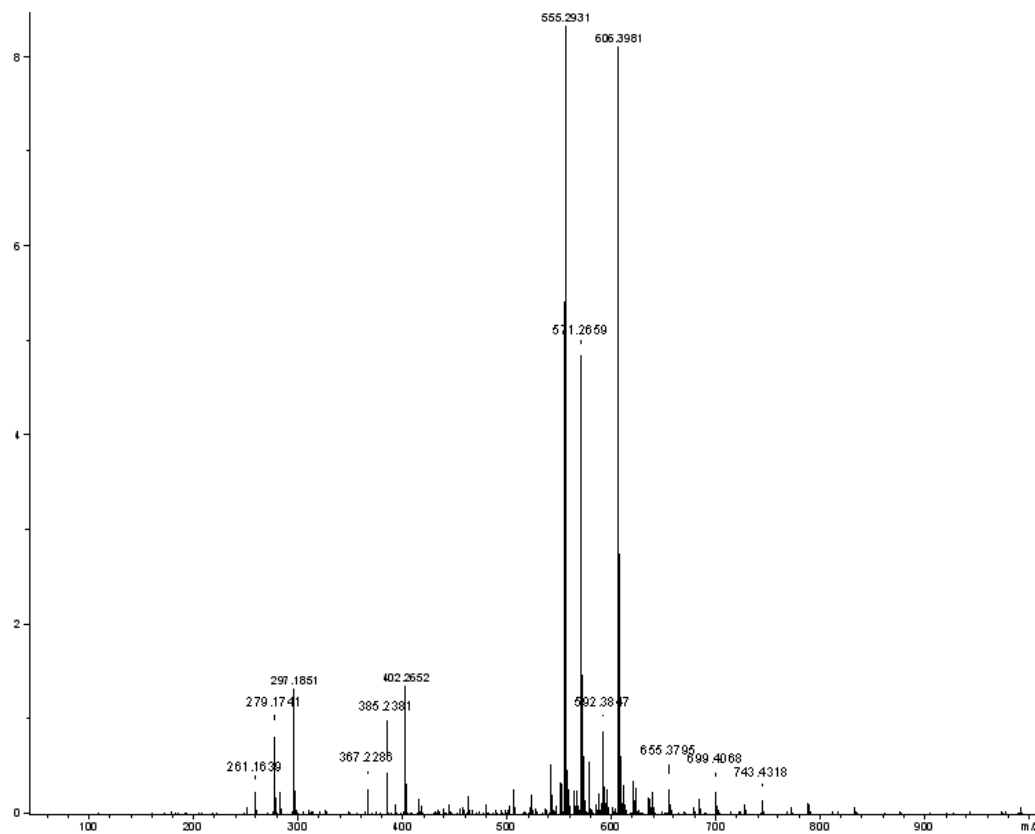


Figura A: Espectro de massas de alta resolução (HRTOF-ESIMS) da casearina U.

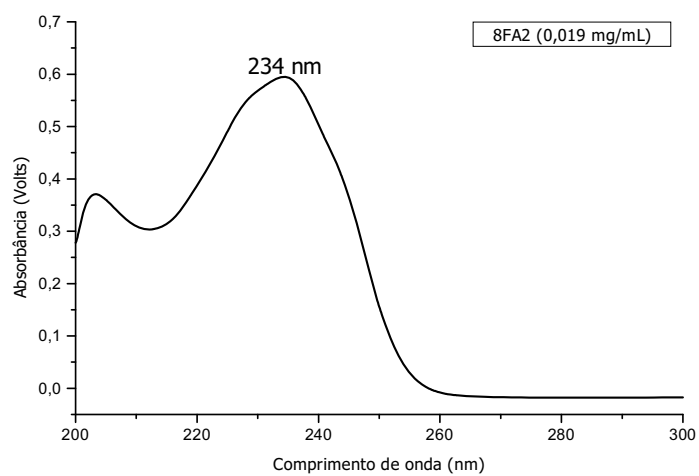


Figura B: Espectro de absorção no UV da casearina U.

ANEXO 26

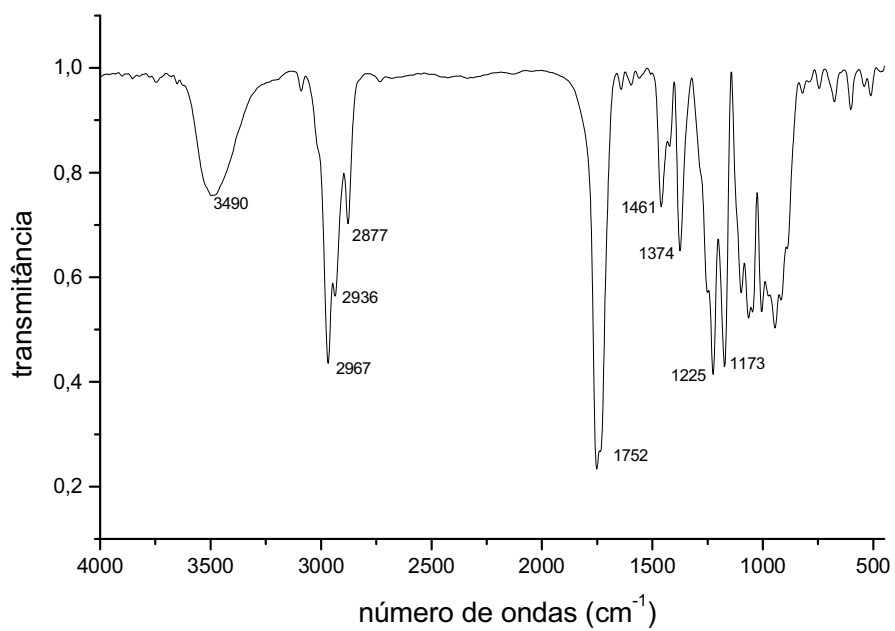


Figura: Espectro de absorção no IV da casearina U.

ANEXO 27

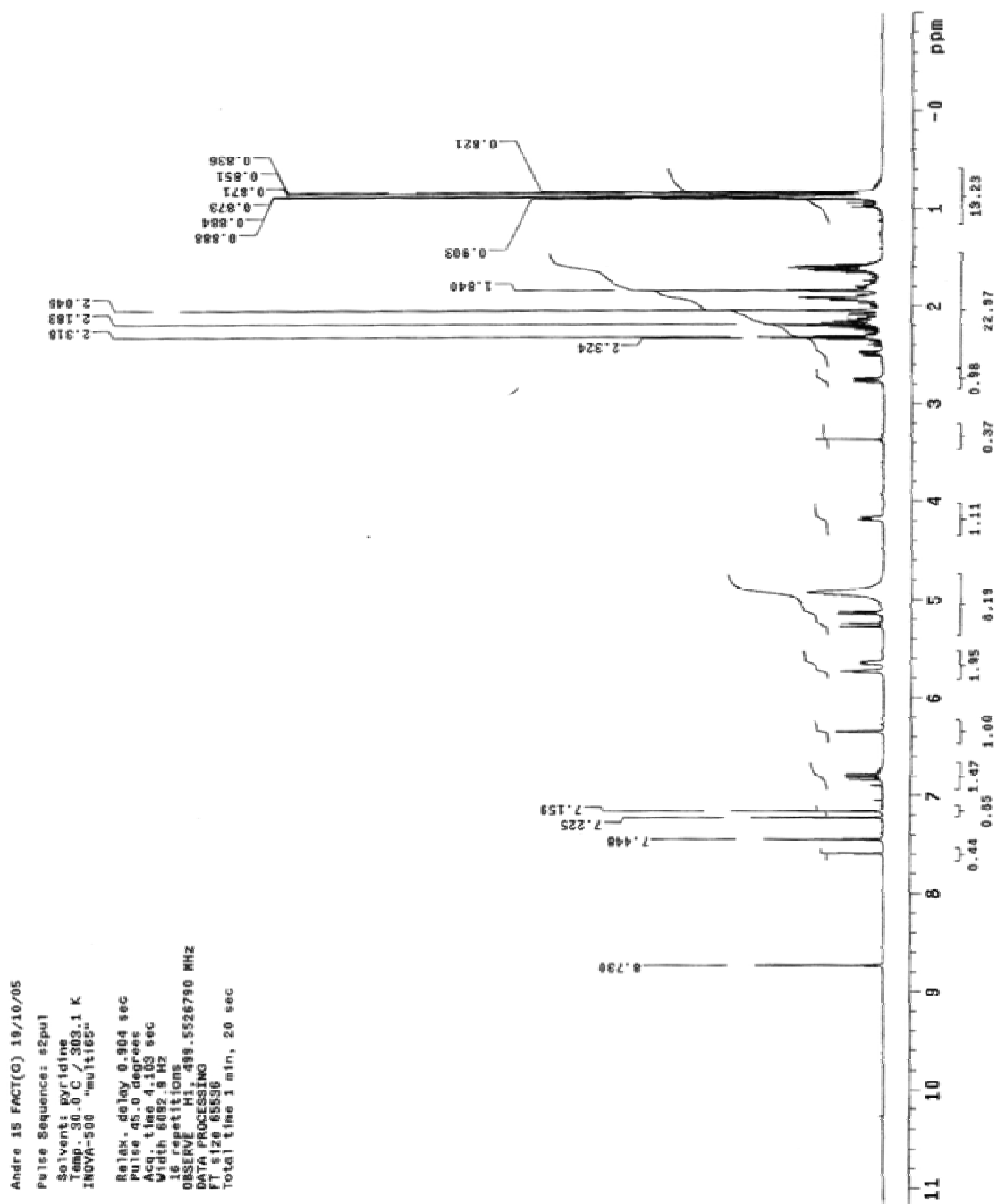


Figura: Espectro de RMN de ^1H da casearina U em piridina- d_5 obtido a 500 MHz.

ANEXO 28

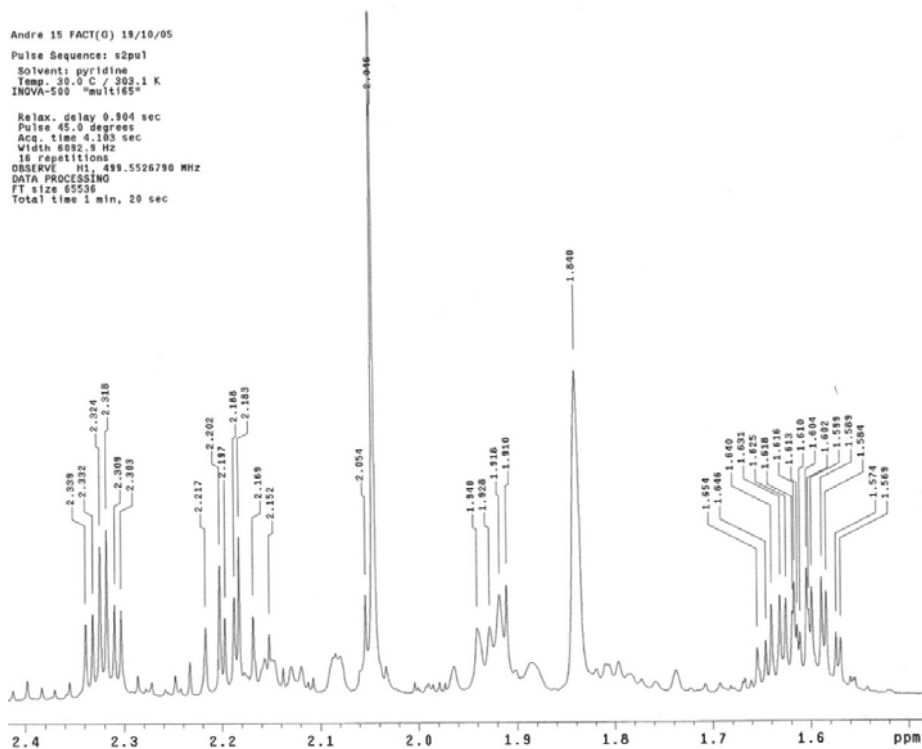
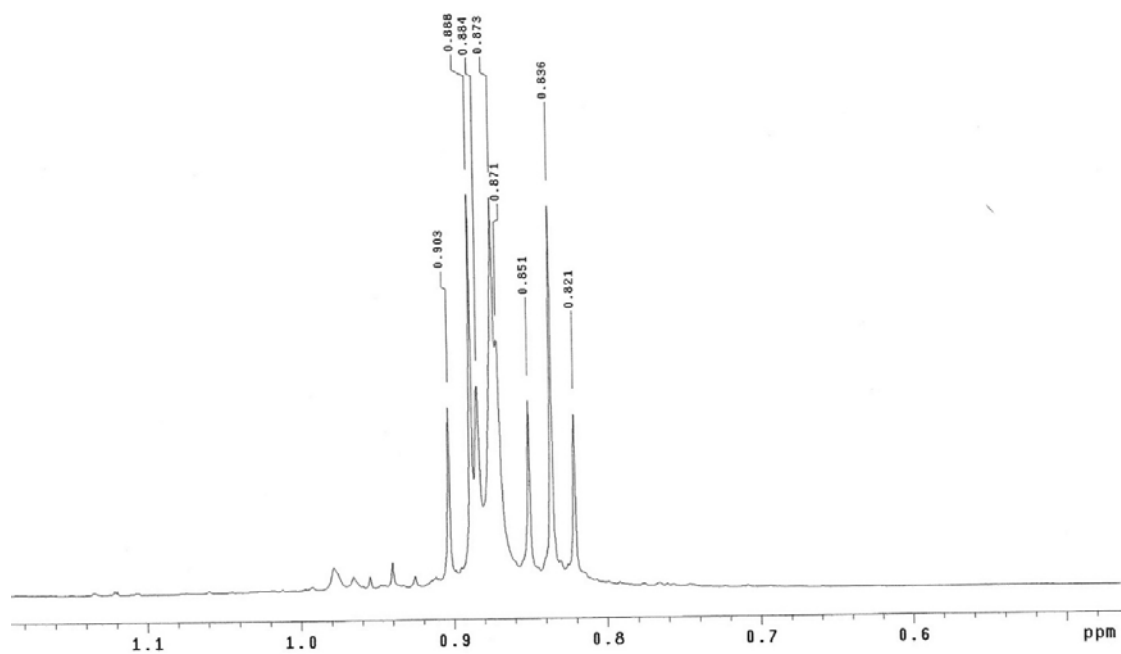


Figura: Expansões do espectro de RMN de ^1H da casearina U em piridina- d_5 obtido a 500 MHz.

ANEXO 29

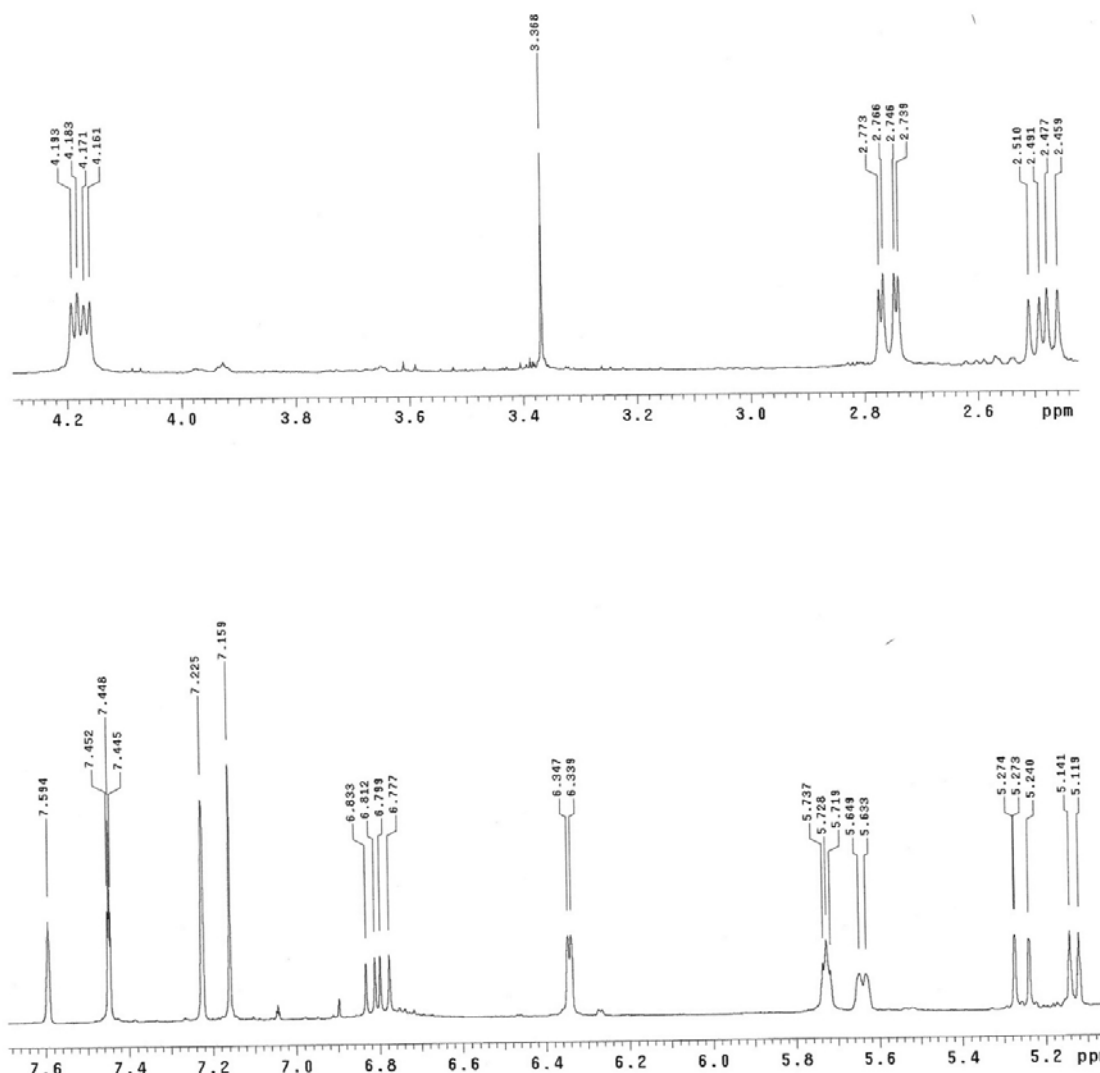


Figura: Expansões do espectro de RMN de ^1H da casearina U em piridina- d_5 obtido a 500 MHz.

ANEXO 30

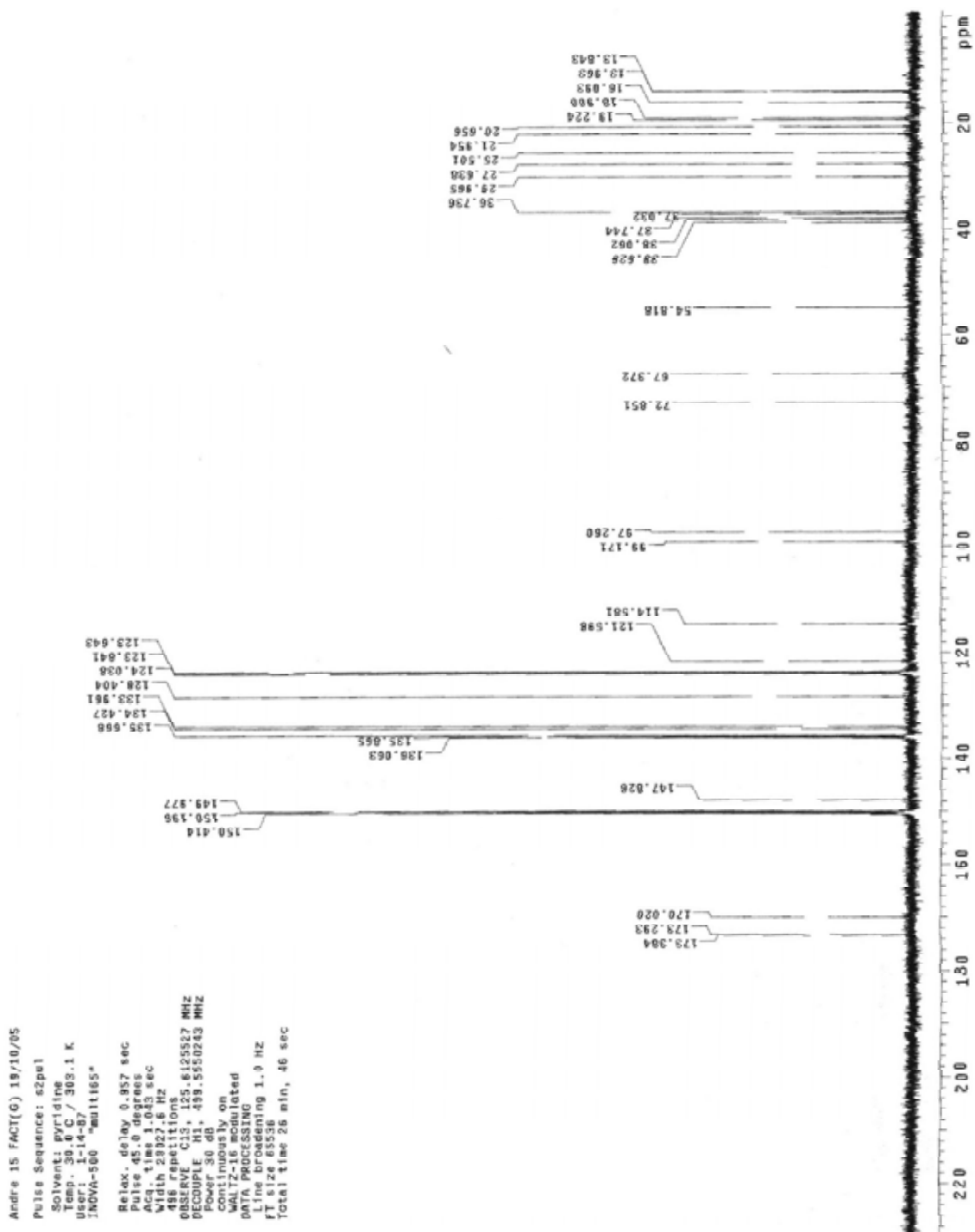


Figura: Espectro de RMN de ^{13}C da casearina U em piridina-d5 obtido a 125 MHz.

ANEXO 31

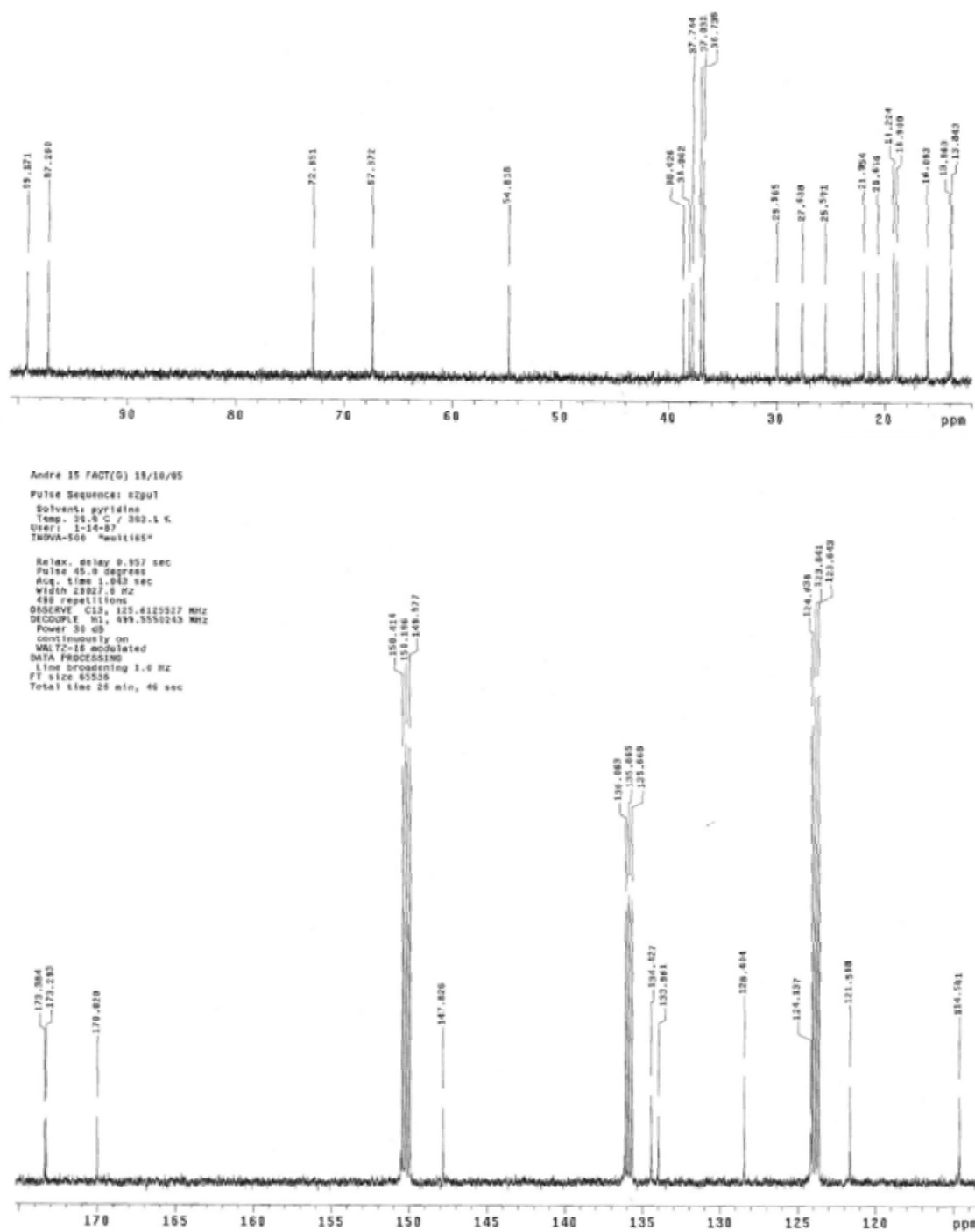


Figura: Expansões do espectro de RMN de ^{13}C da casearina U em piridina- d_5 obtido a 125 MHz.

ANEXO 32

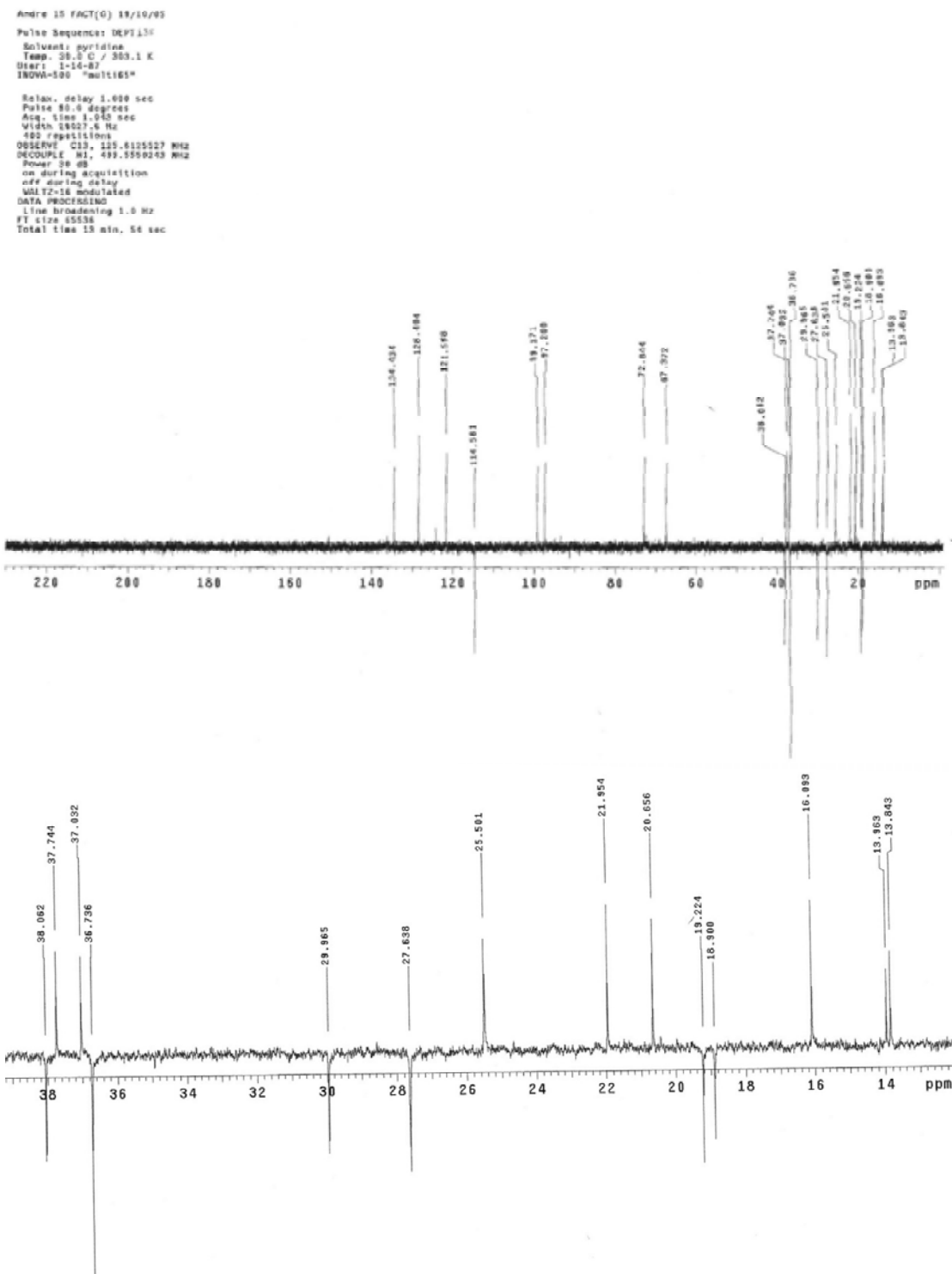


Figura: Espectro de DEPT135^O (incluindo expansão abaixo) da casearina U em piridina-d₅ obtido a 125 MHz.

ANEXO 33

Andre 15 FACT(G) 19/10/05
Pulse Sequence: DEPT90
Solvent: pyridine
Temp. 30.0 C / 303.1 K
User: 1-14-87
INOVA-500 "multi65"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 90.0 degrees
Acq. time 1.043 sec
Width 29027.6 Hz
400 repetitions
OBSERVE C13, 125.6125527 MHz
DECOUPLE H1, 499.5550243 MHz
Power 30 dB
on during acquisition
off during delay
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 65536
Total time 13 min, 54 sec

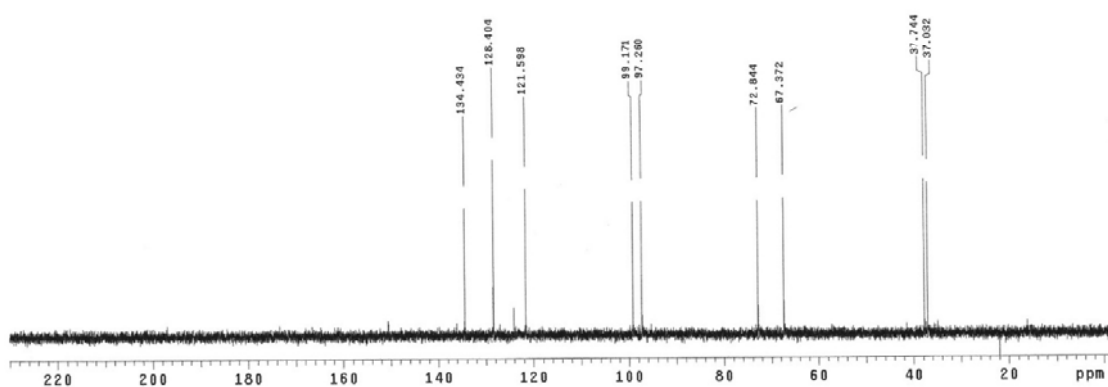


Figura: Espectro de DEPT90^o da casearina U em piridina-d5 obtido a 125 MHz.

ANEXO 34

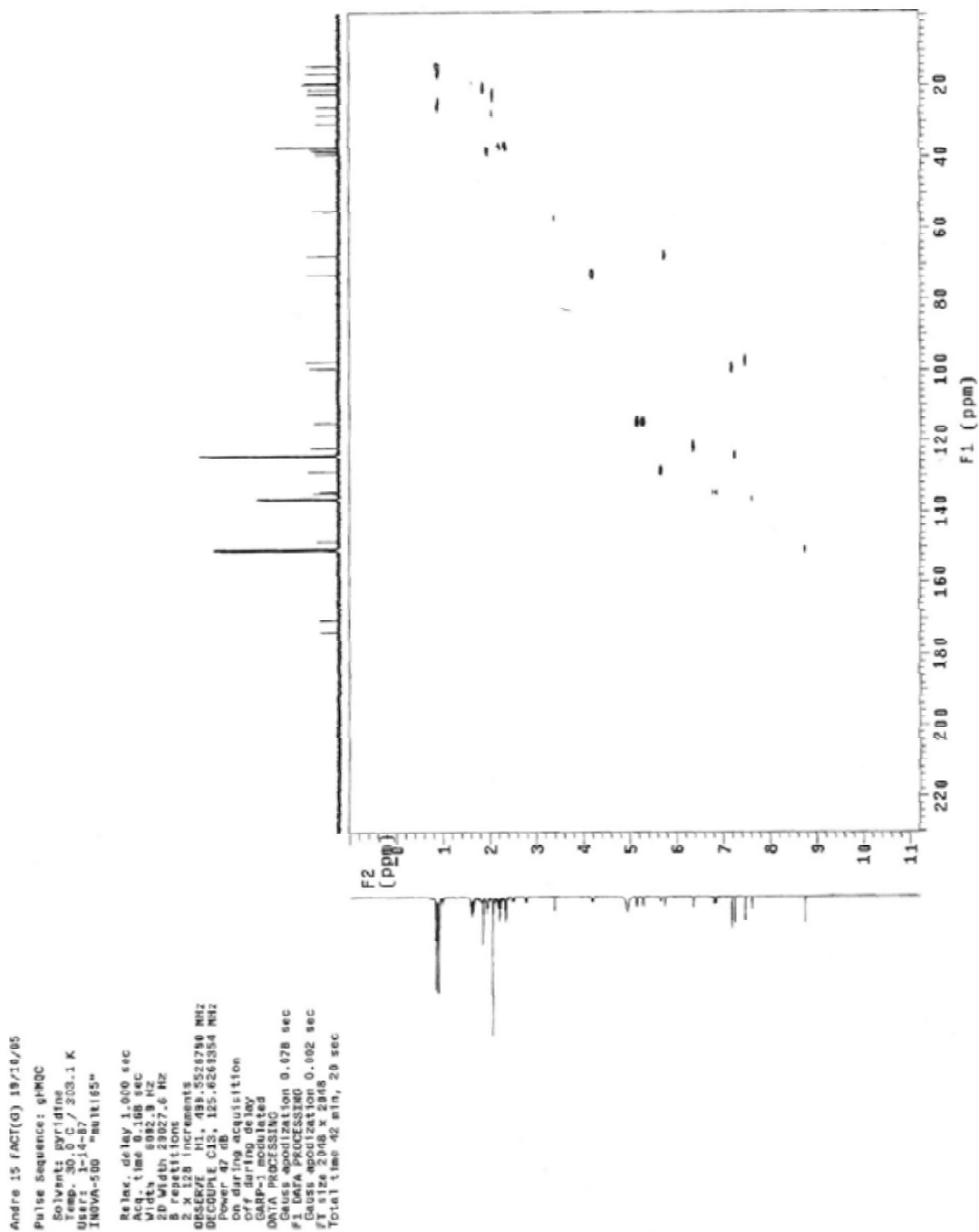


Figura: Mapa de contornos HMBC da casearina U (piridina-d5, 11,7 T).

ANEXO 35

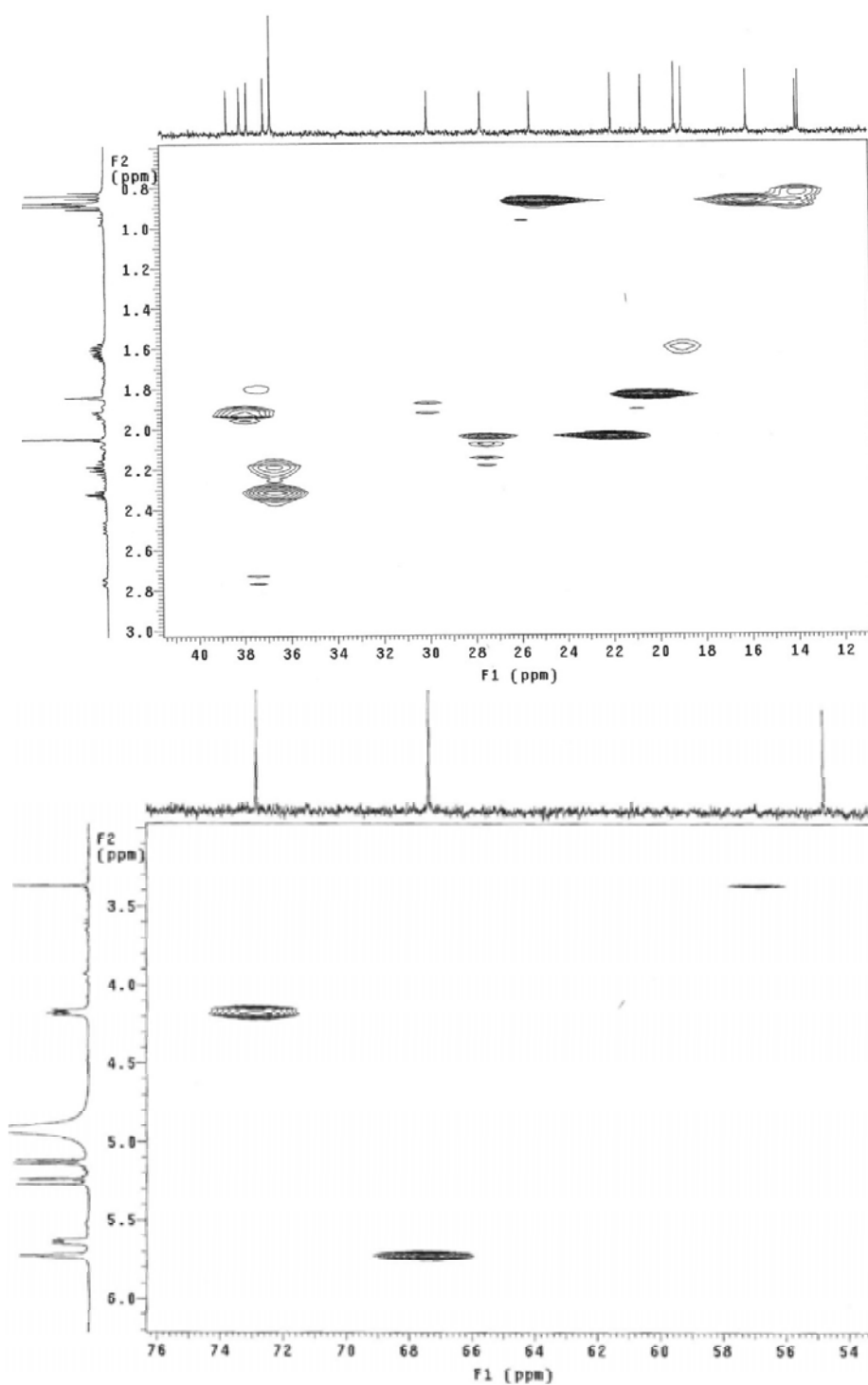


Figura: Expansões do mapa de contornos HMQC da casearina U (piridina- d_5 , 11,7 T).

ANEXO 36

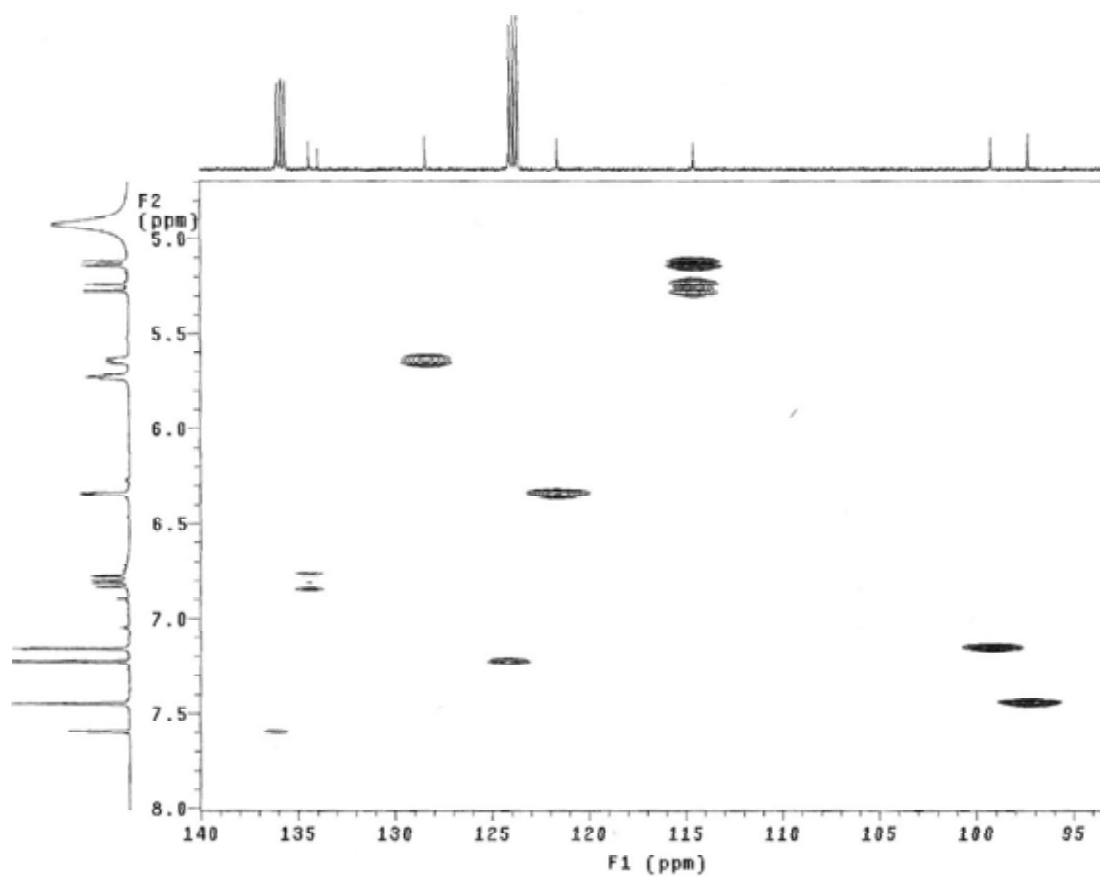


Figura: Expansão do mapa de contornos HMQC da casearina U (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 37

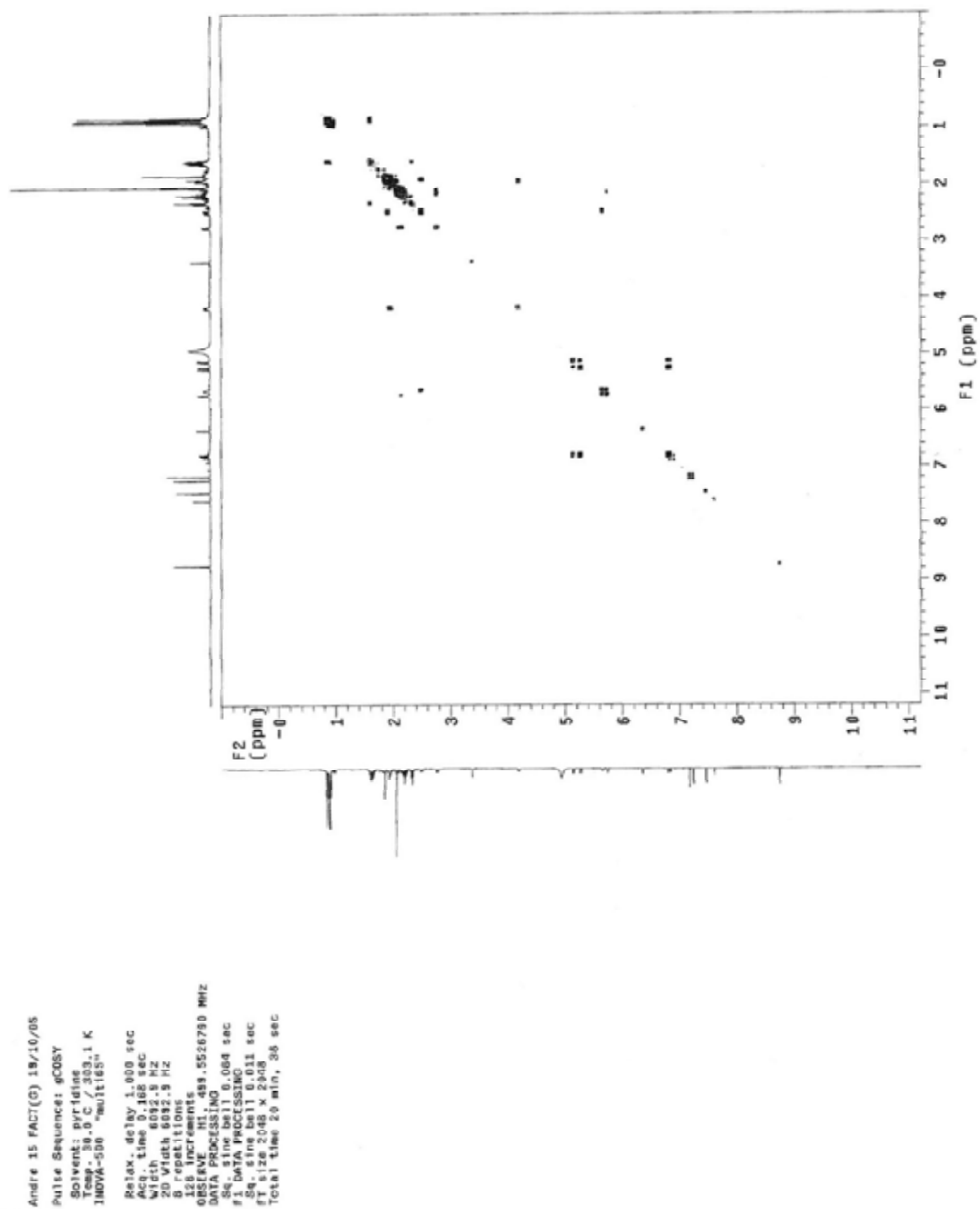


Figura: Mapa de contornos COSY da casearina U (piridina-d5, 11,7 T).

ANEXO 38

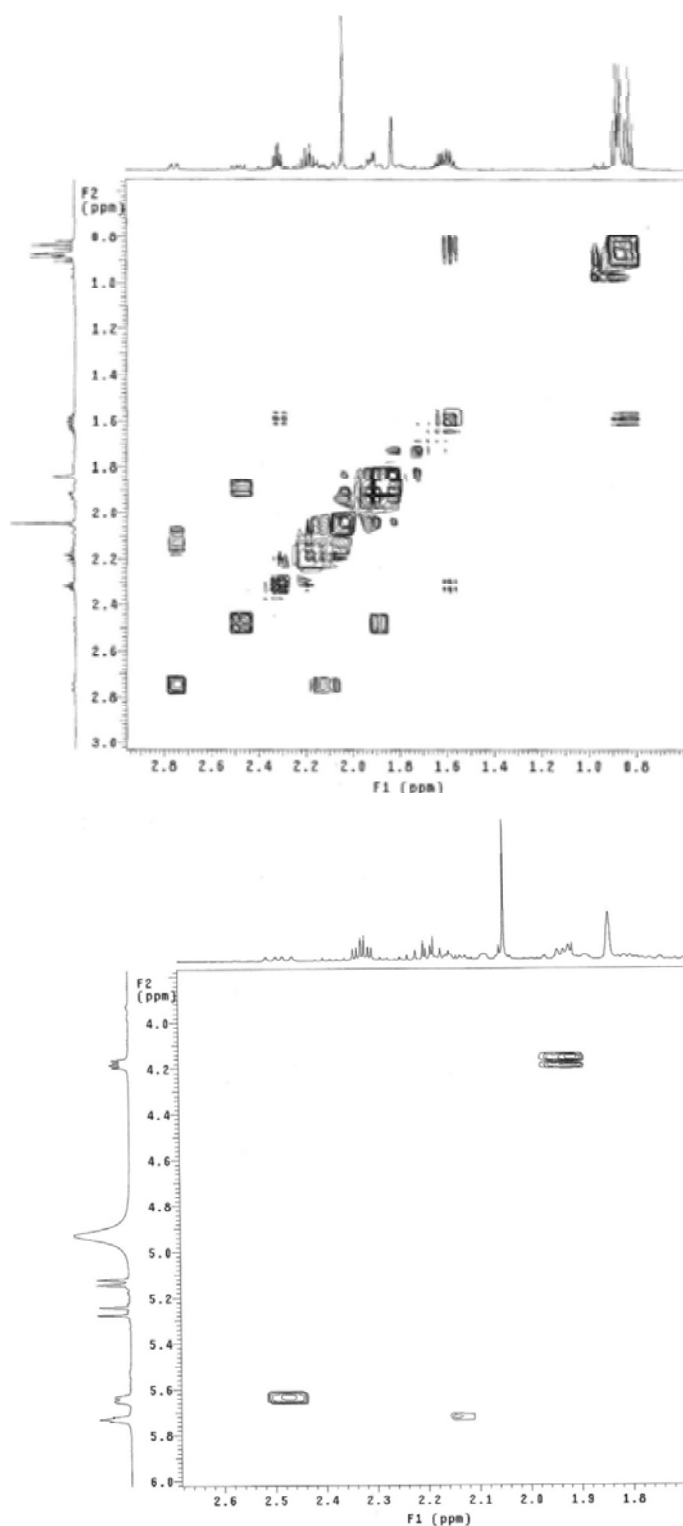


Figura: Expansões do mapa de contornos COSY da casearina U (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 39

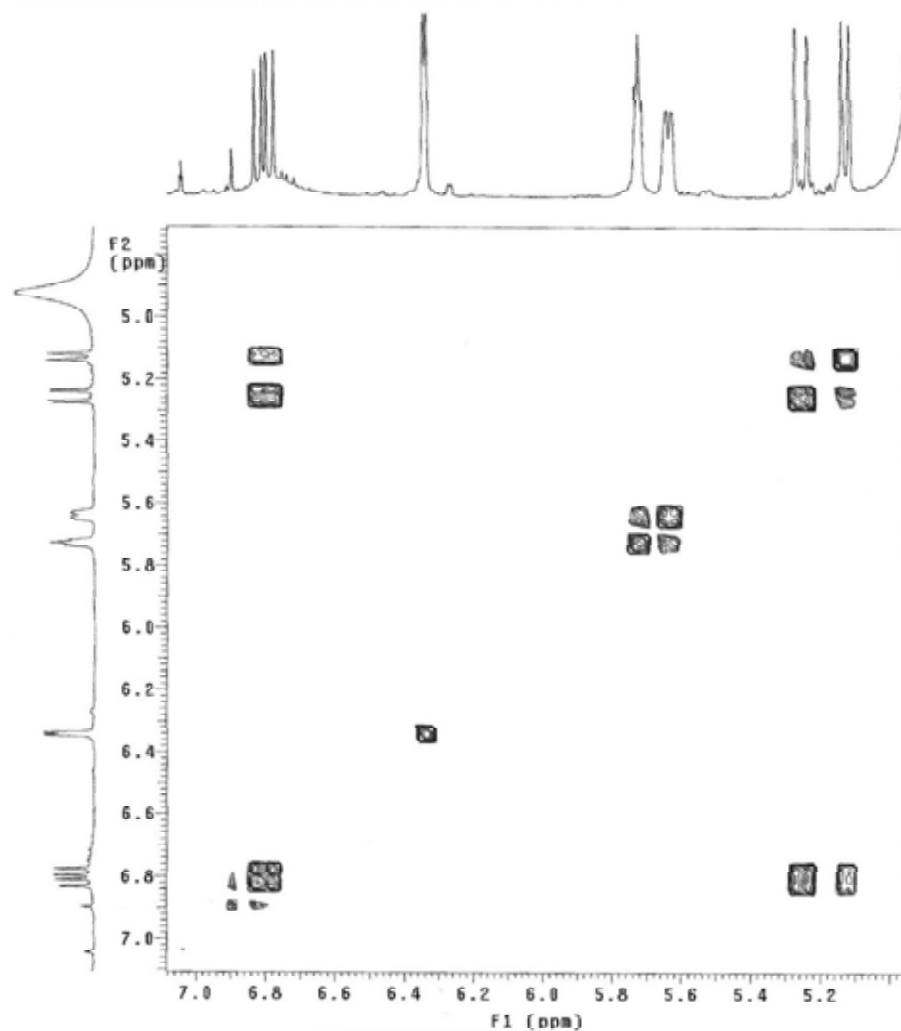


Figura: Expansão do mapa de contornos COSY da casearina U (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 40

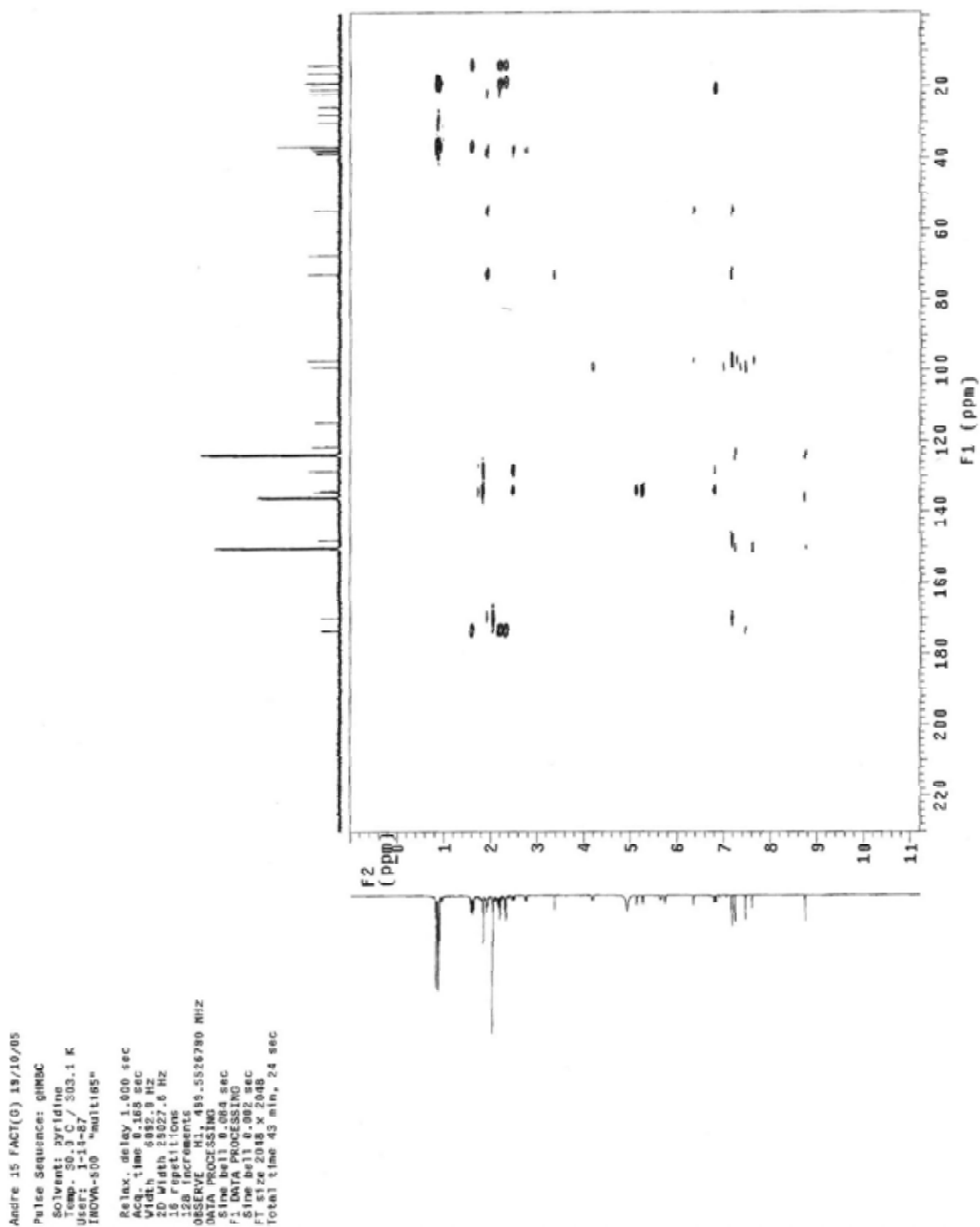


Figura: Mapa de contornos HMBC da casearina U (piridina-d5, 11,7 T).

ANEXO 41

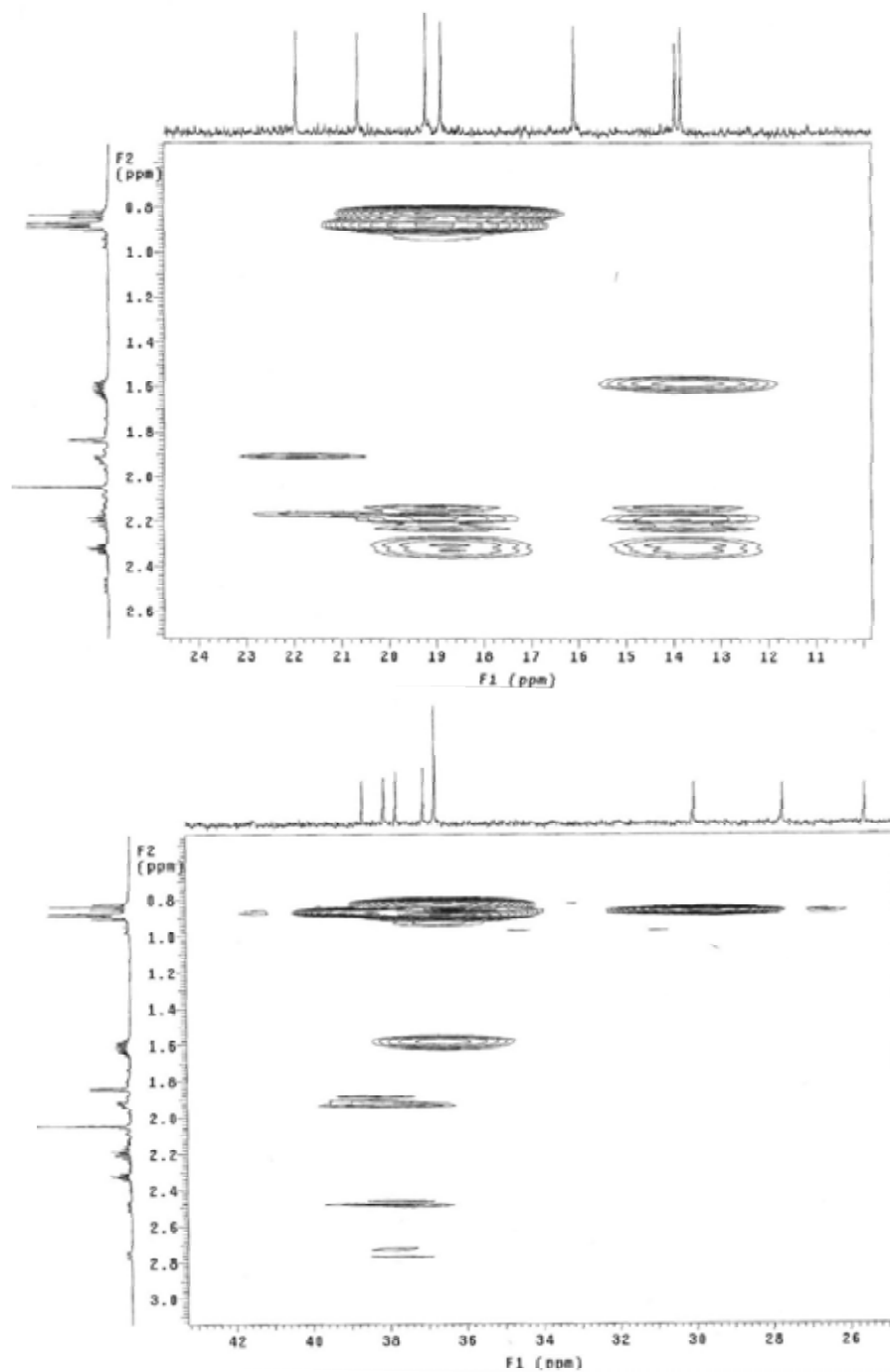


Figura: Expansões do mapa de contornos HMBC da casearina U (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 42

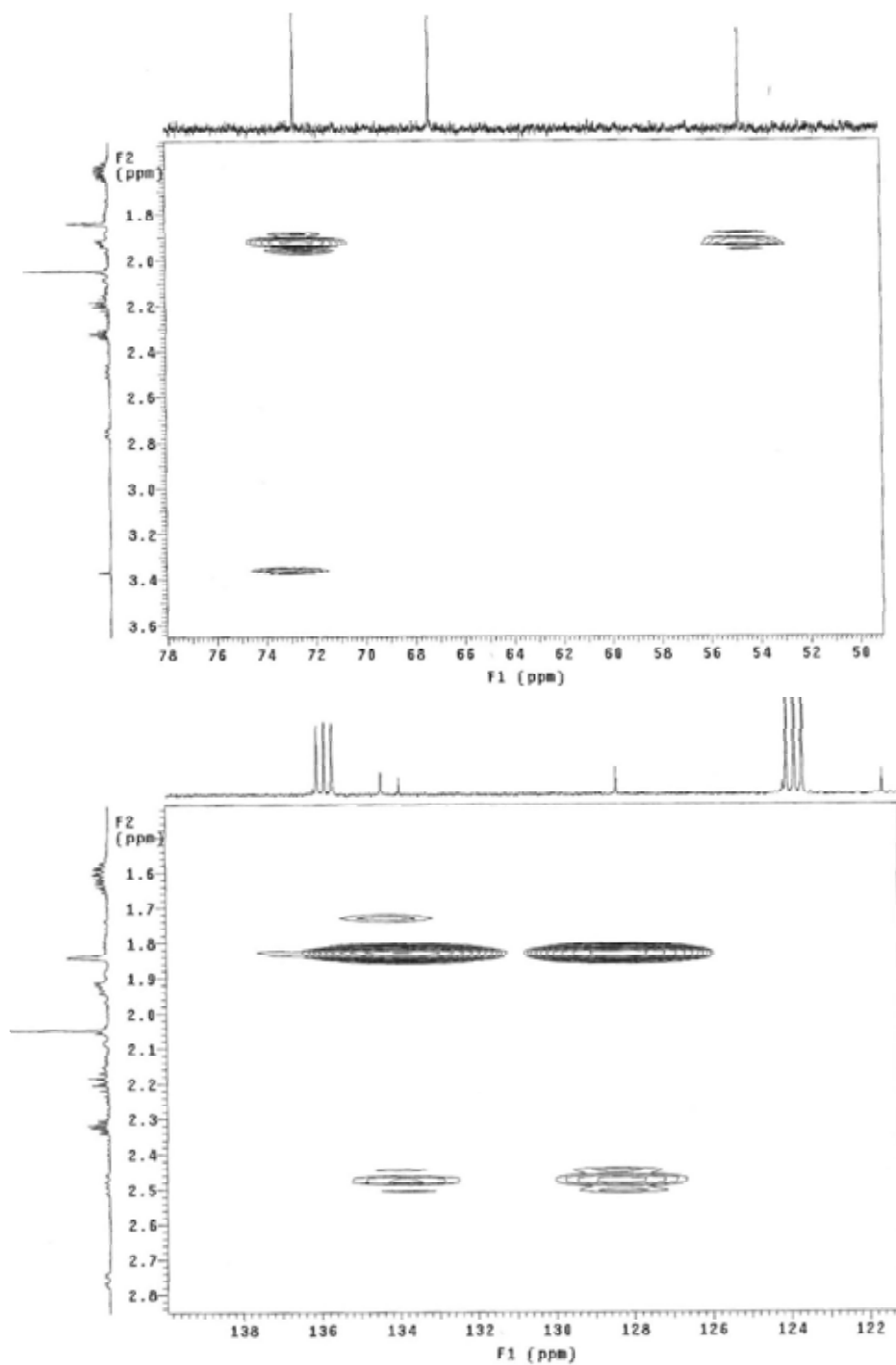


Figura: Expansões do mapa de contornos HMBC da casearina U (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 43

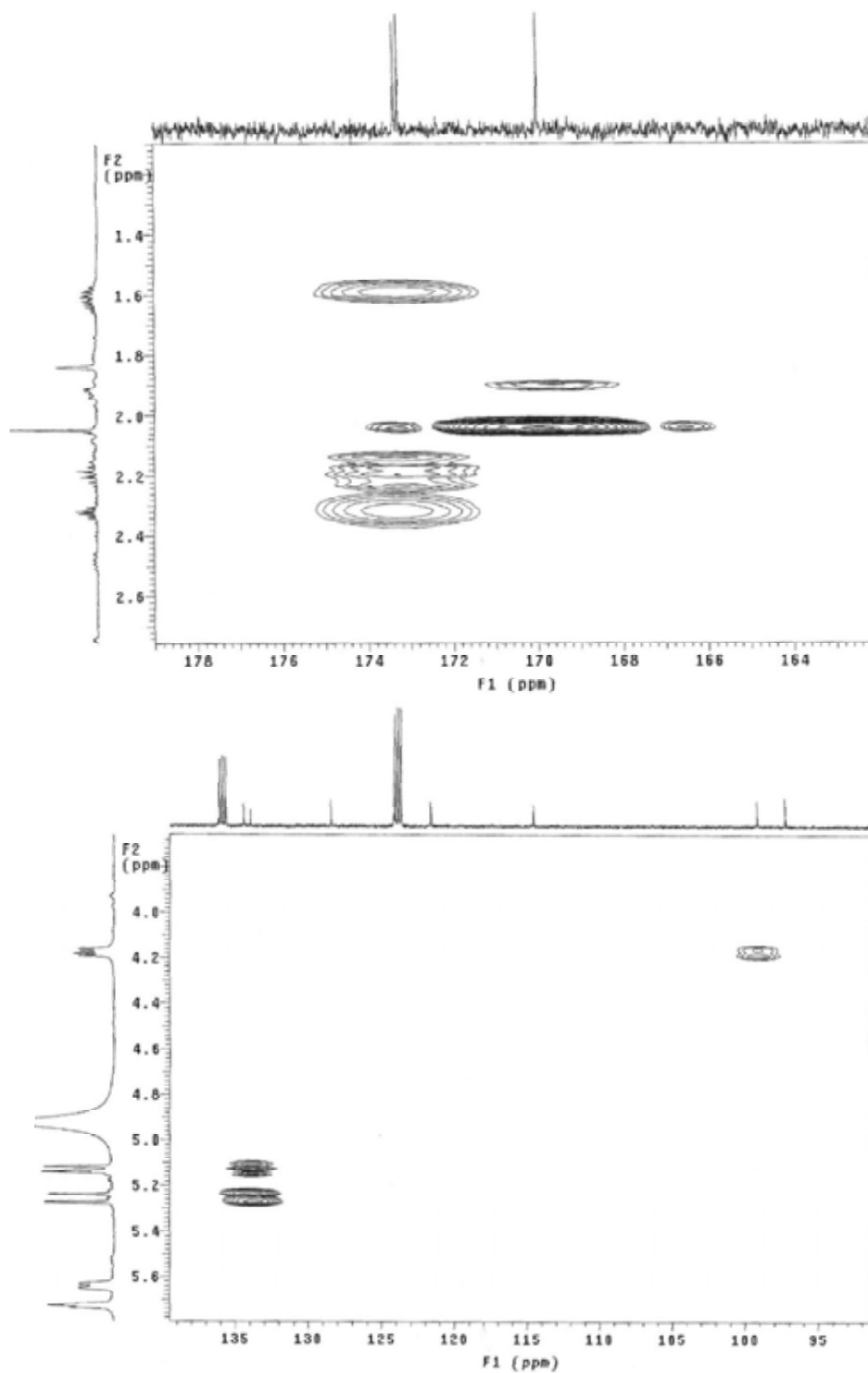


Figura: Expansões do mapa de contornos HMBC da casearina U (piridina- d_5 , 11,7 T).

ANEXO 44

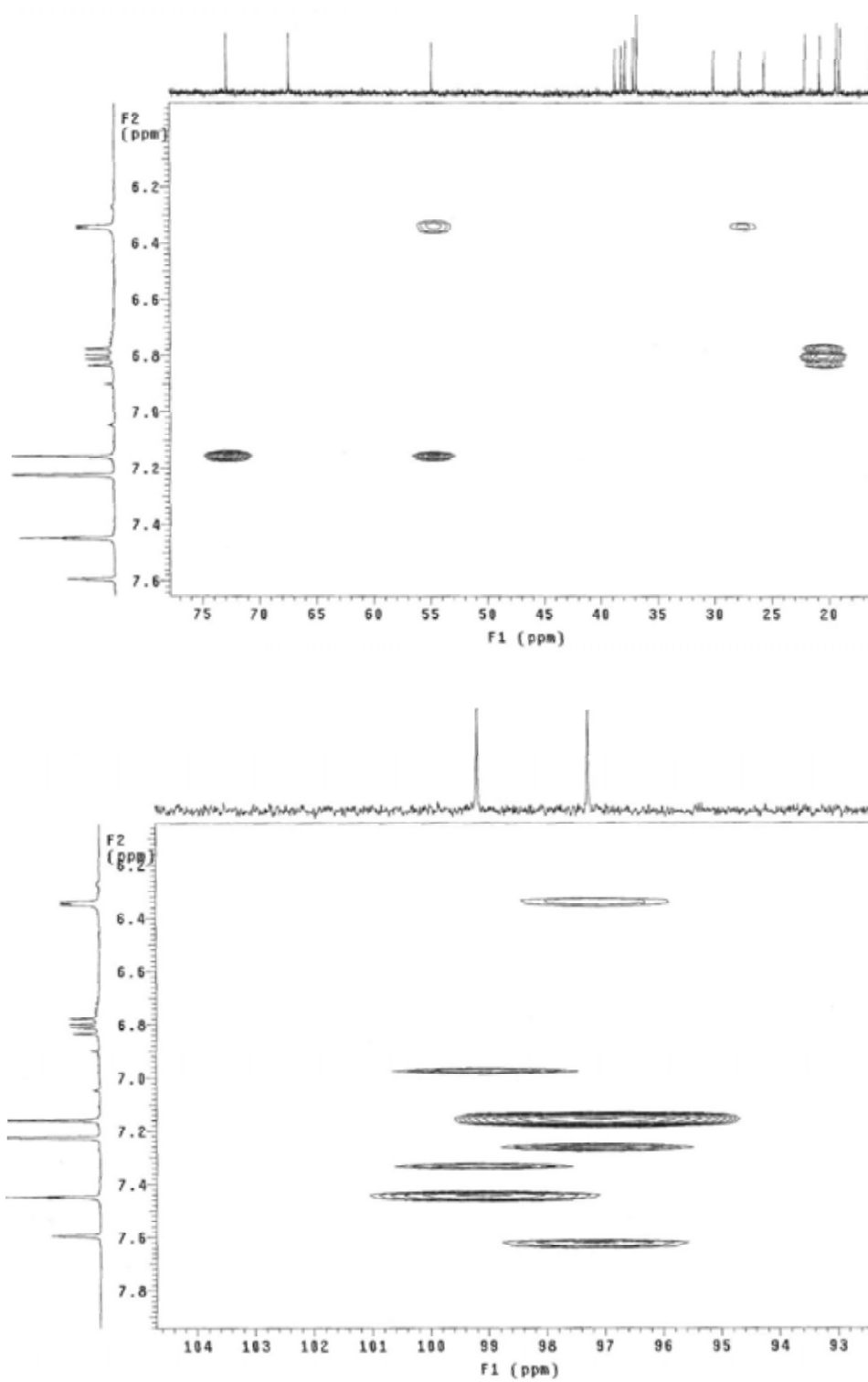


Figura: Expansões do mapa de contornos HMBC da casearina U (piridina- d_5 , 11,7 T).

ANEXO 45

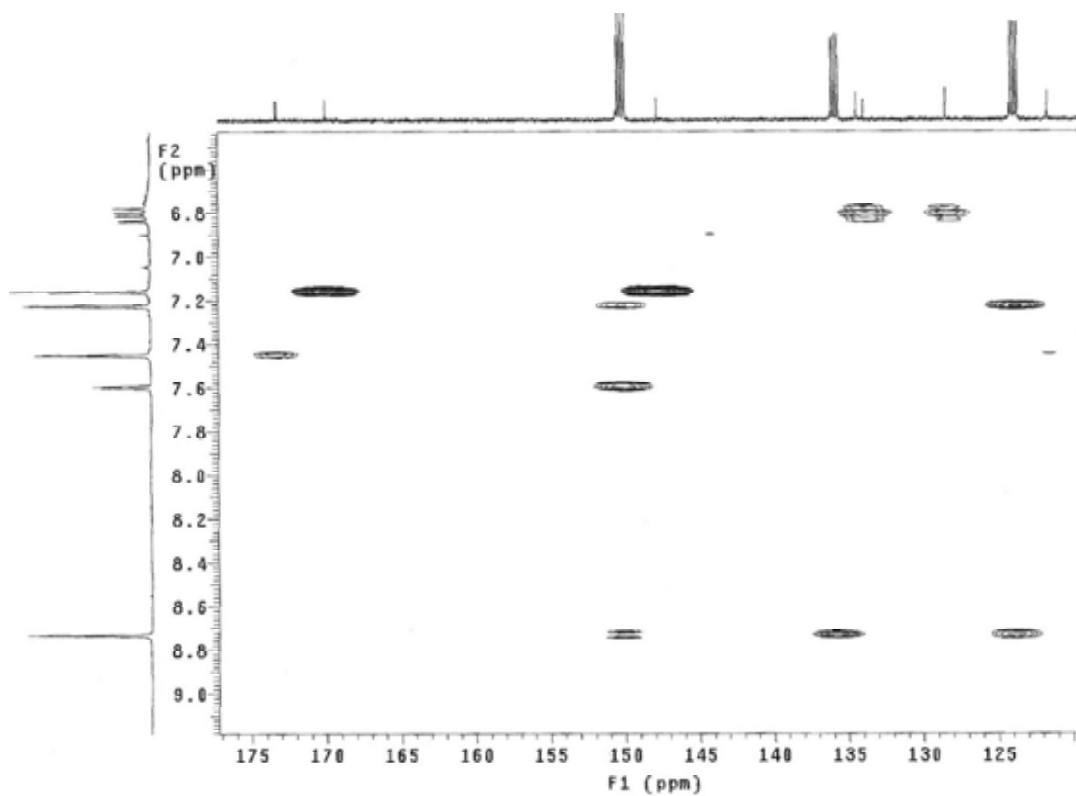


Figura: Expansão do mapa de contornos HMBC da casearina U (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 46

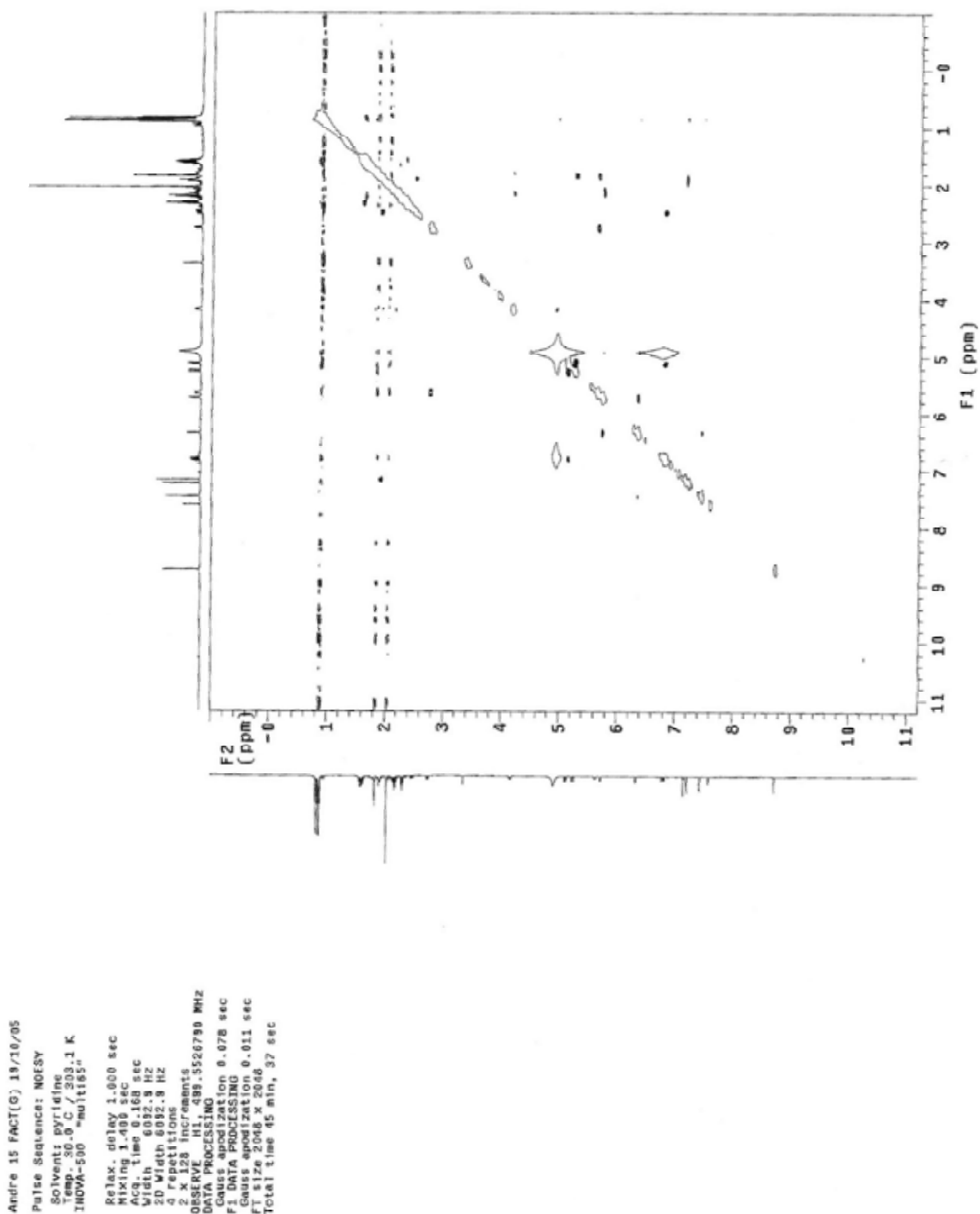


Figura: Mapa de contornos NOESY2D da casearina U (piridina-d5, 11,7 T).

ANEXO 47

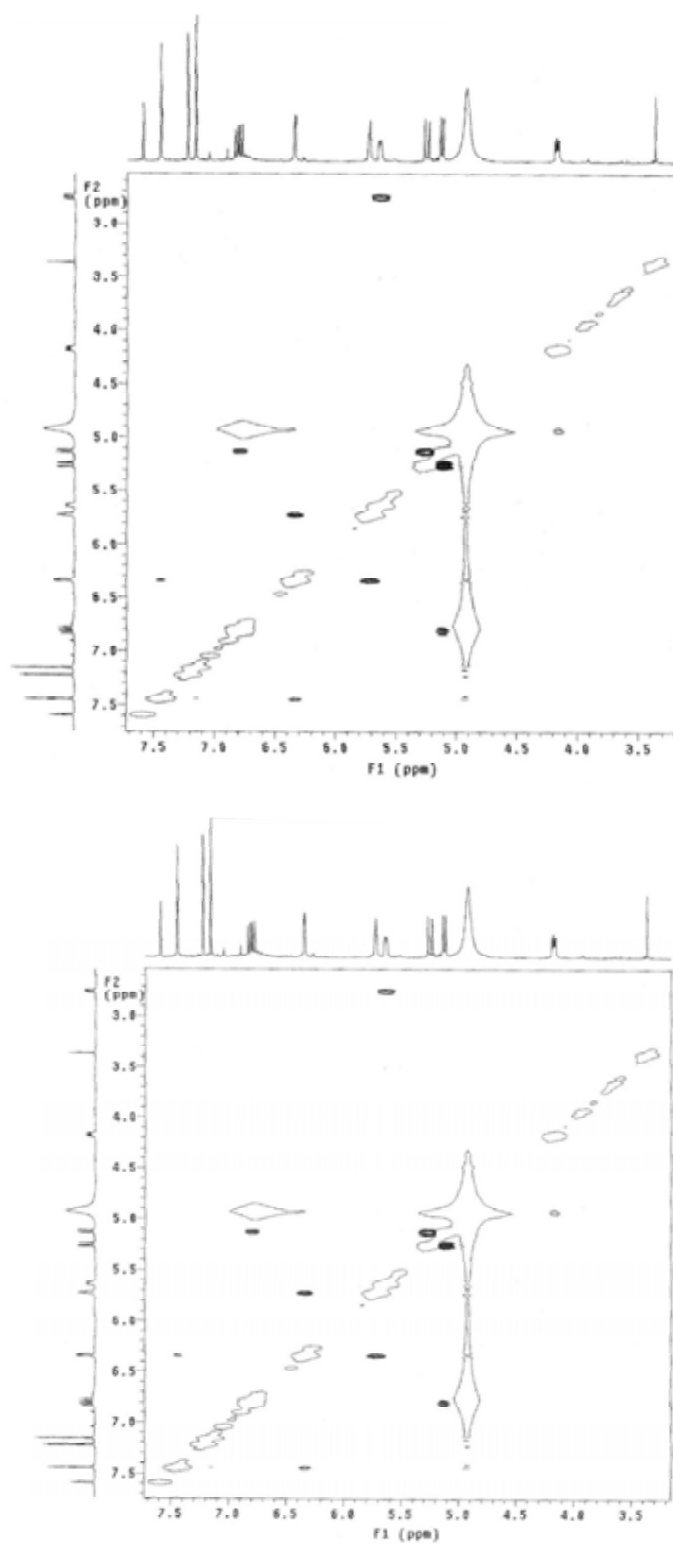


Figura: Expansões do mapa de contornos NOESY2D da casearina U (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 48

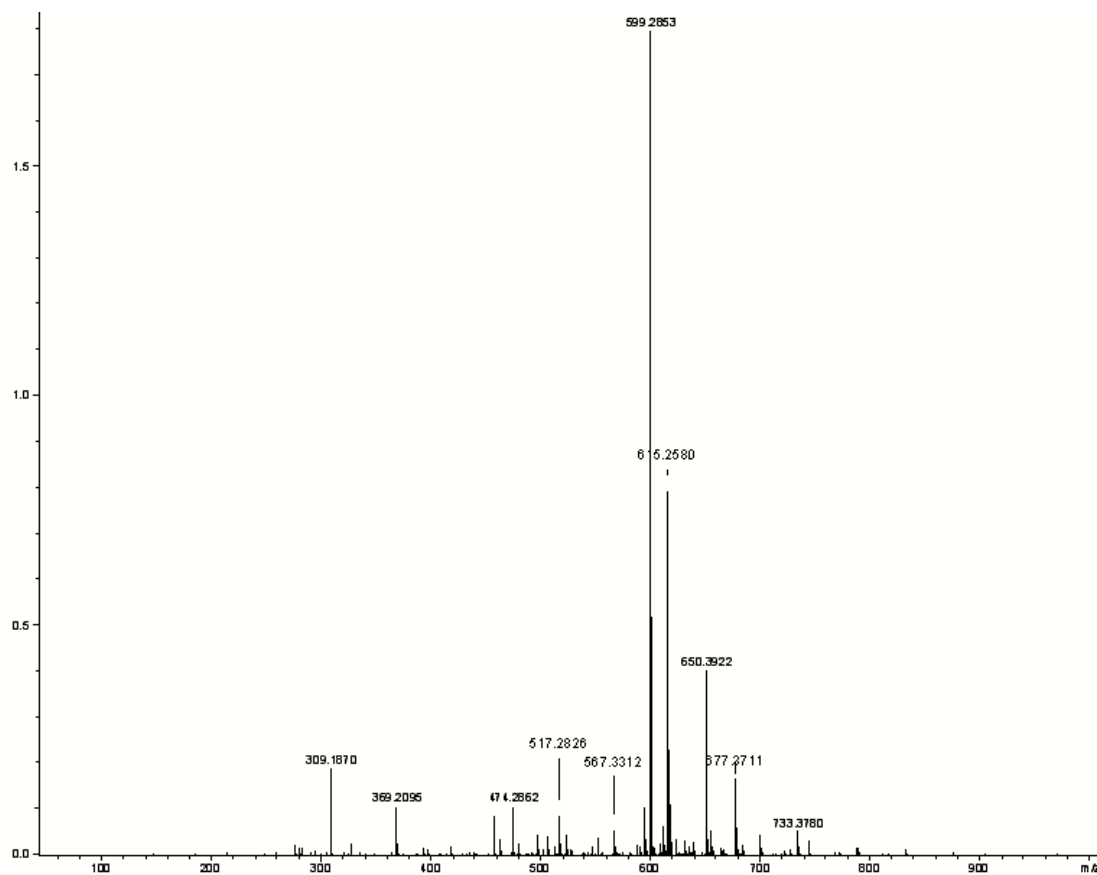


Figura A: Espectro de massas de alta resolução (HRTOF-ESIMS) da casearina B.

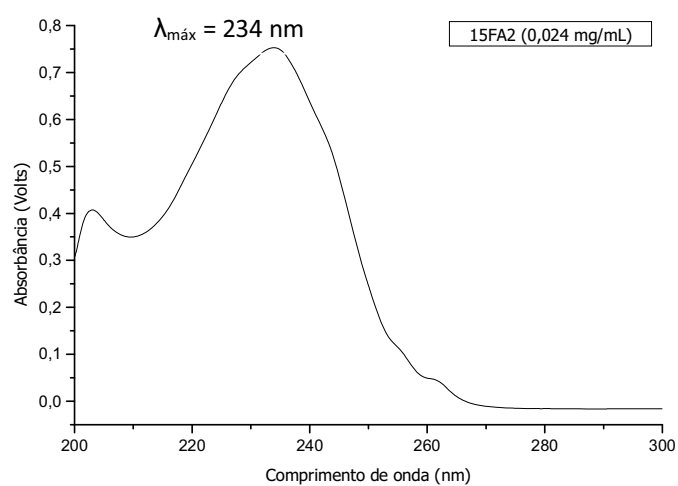


Figura B: Espectro de absorção no UV da casearina B.

ANEXO 49

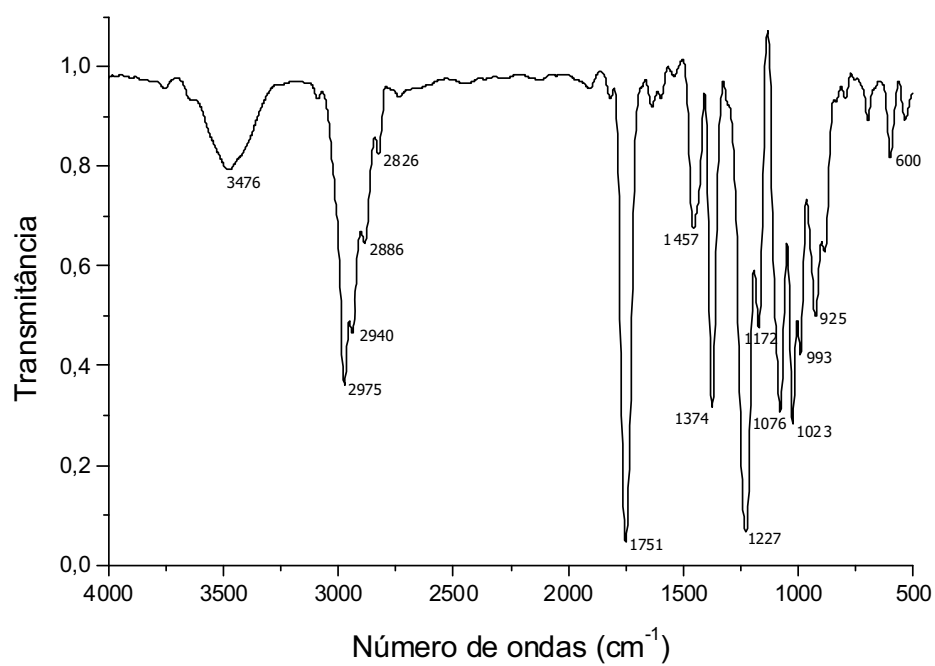


Figura: Espectro de absorção no IV da casearina B.

ANEXO 50

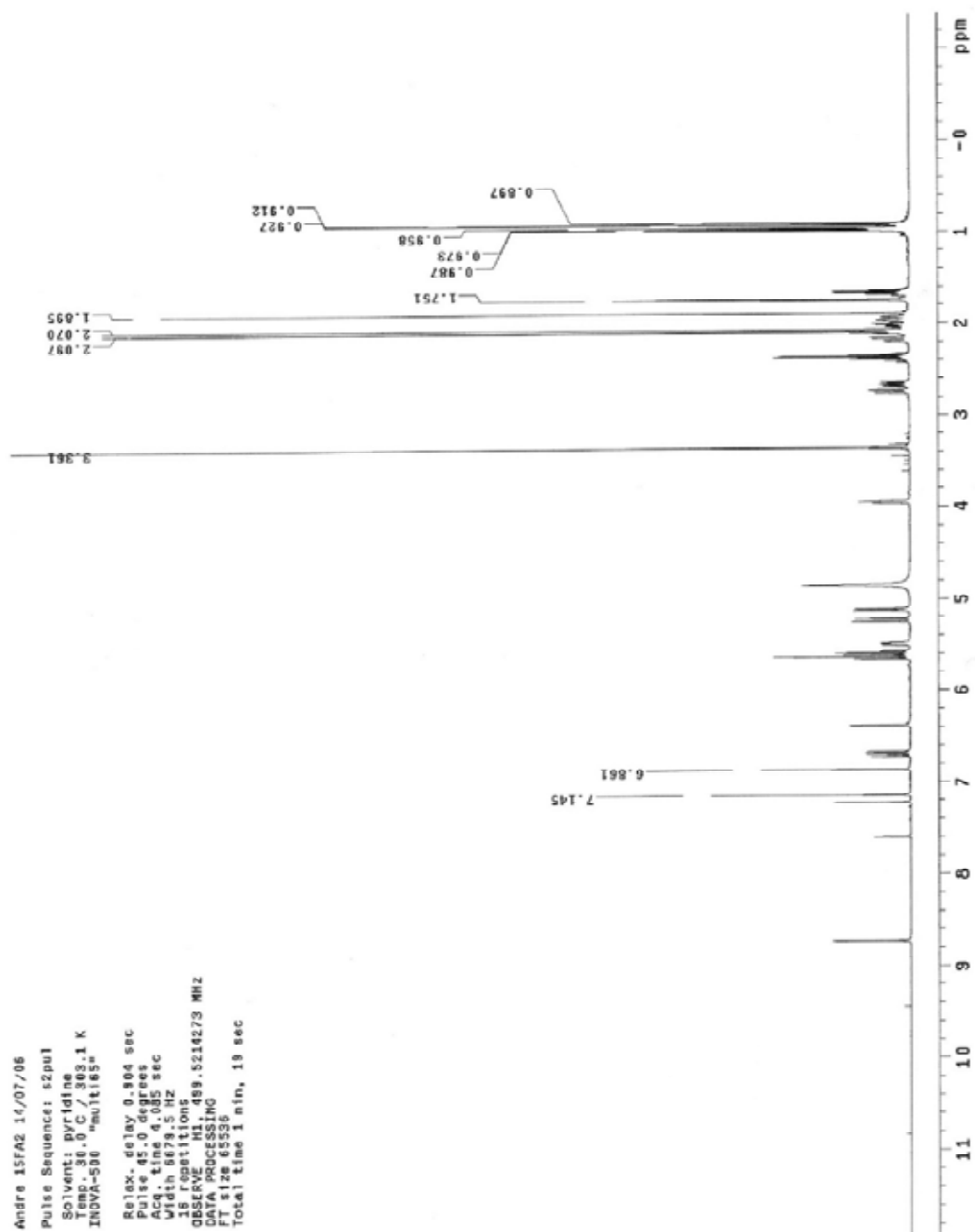


Figura: Espectro de RMN de ^1H da casearina B em piridina- d_5 obtido a 500 MHz.

ANEXO 51

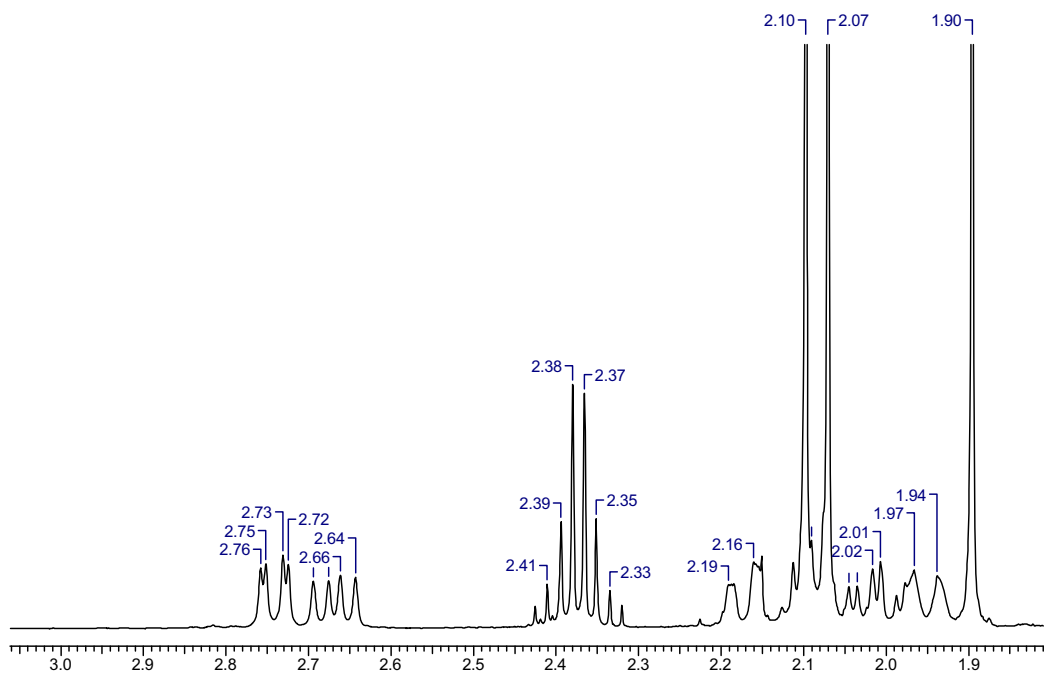
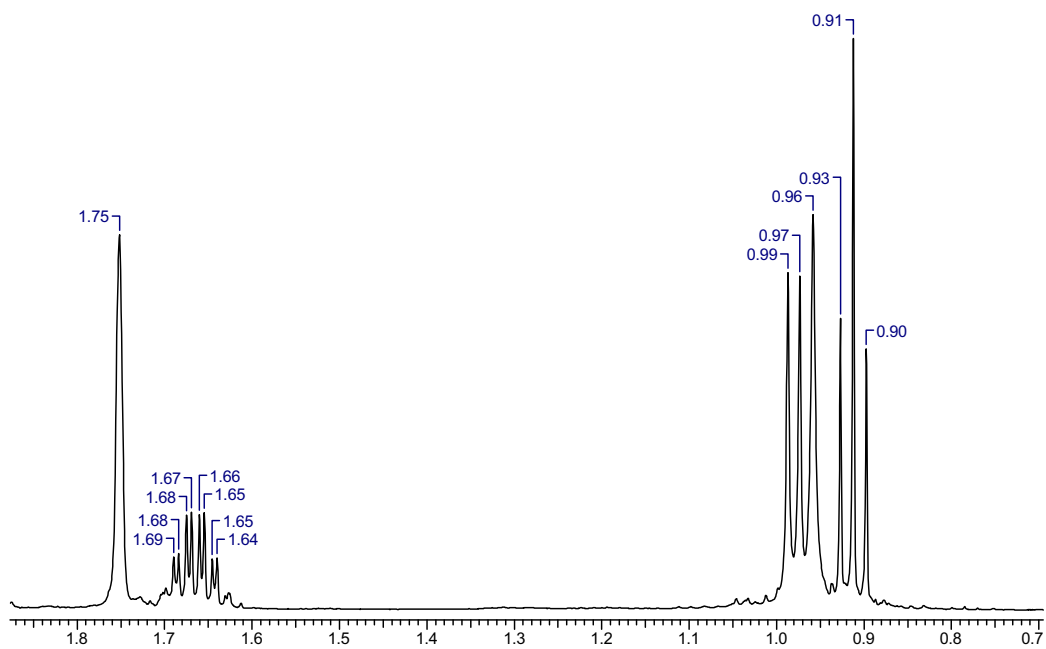


Figura: Expansões do espectro de RMN de ^1H da casearina B em piridina-d₅ obtido a 500 MHz.

ANEXO 52

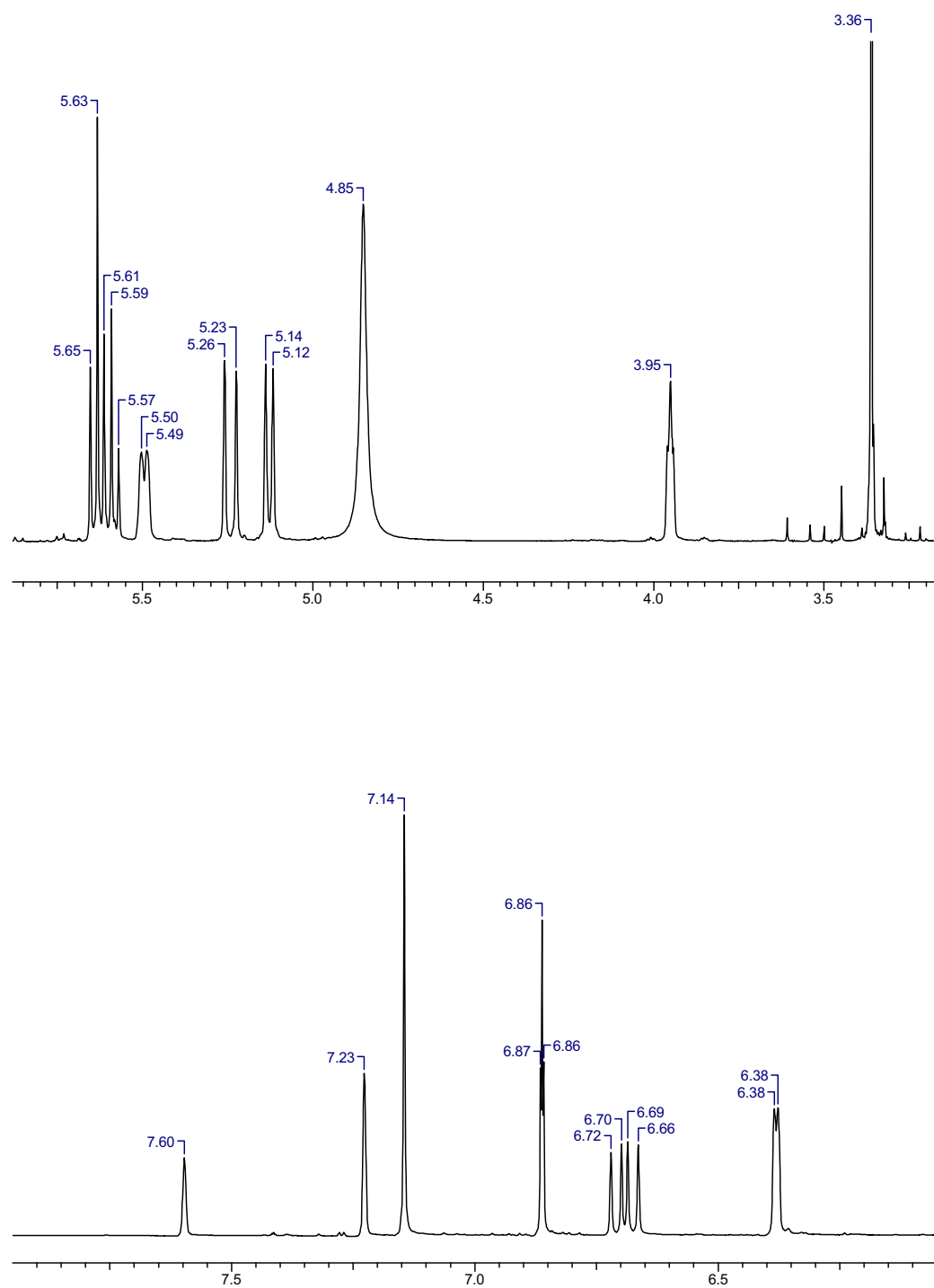


Figura: Expansões do espectro de RMN de ^1H da casearina B em piridina- d_5 obtido a 500 MHz.

ANEXO 53

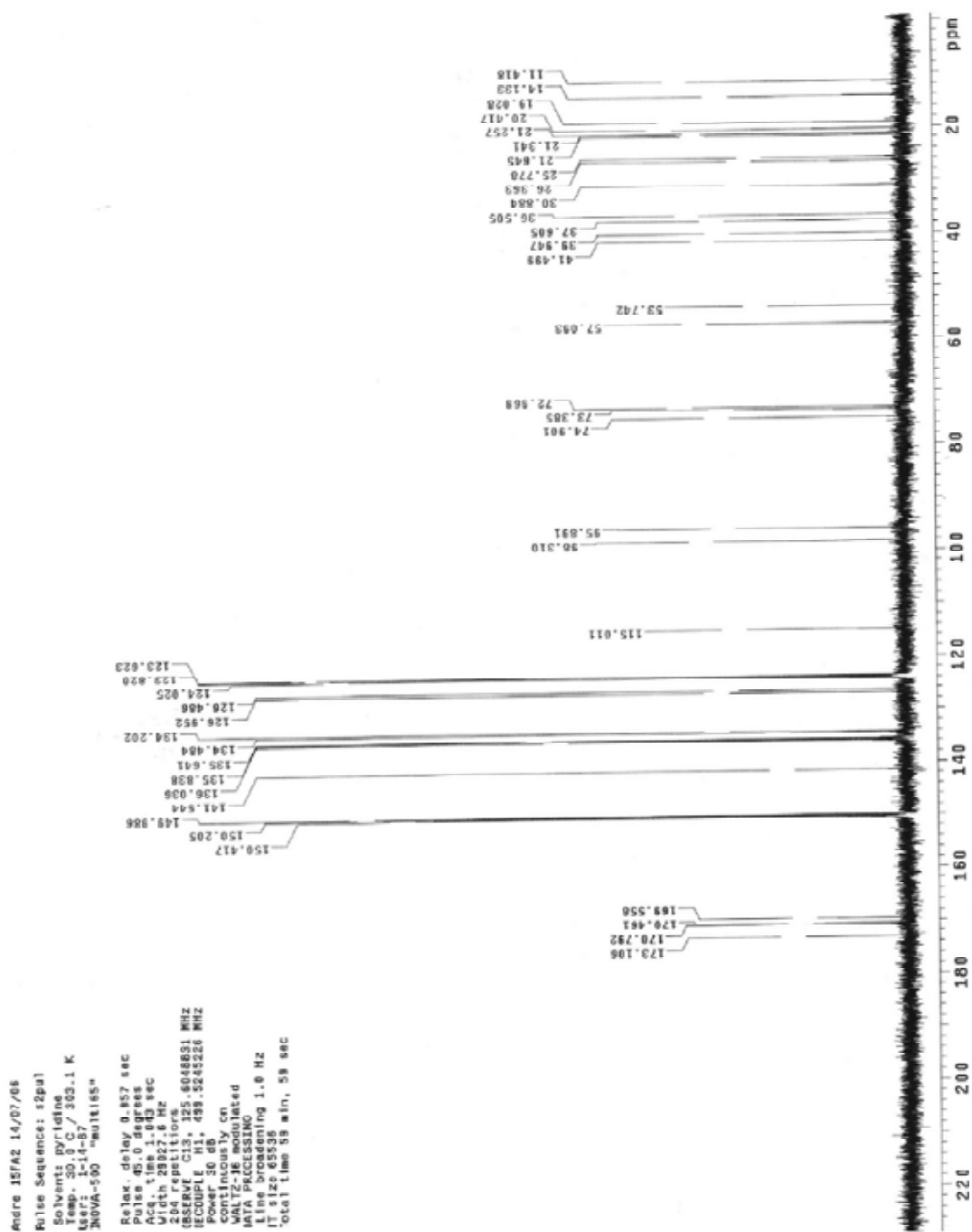


Figura: Espectro de RMN de ^{13}C da casearina B em piridina-d5 obtido a 125 MHz.

ANEXO 54

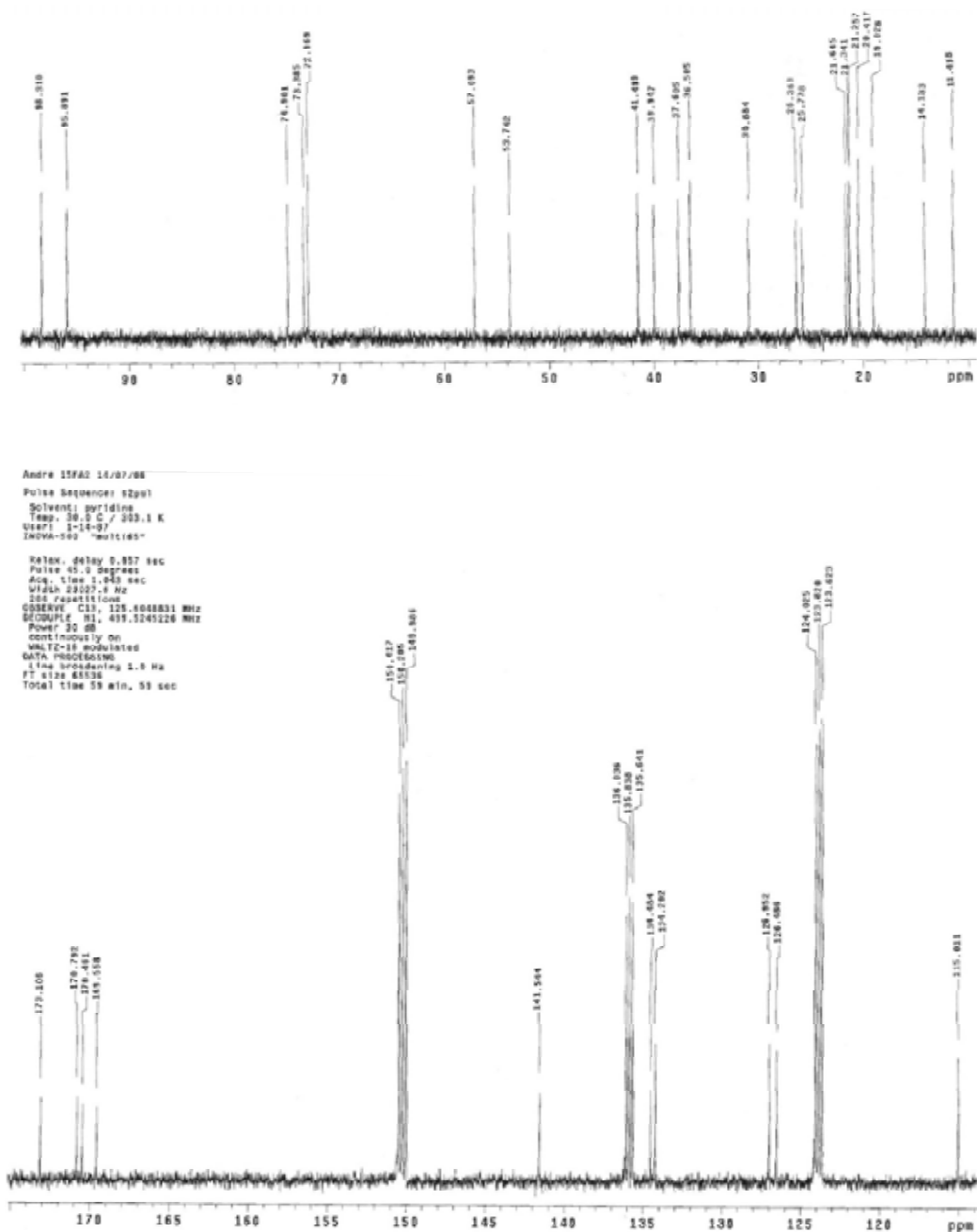
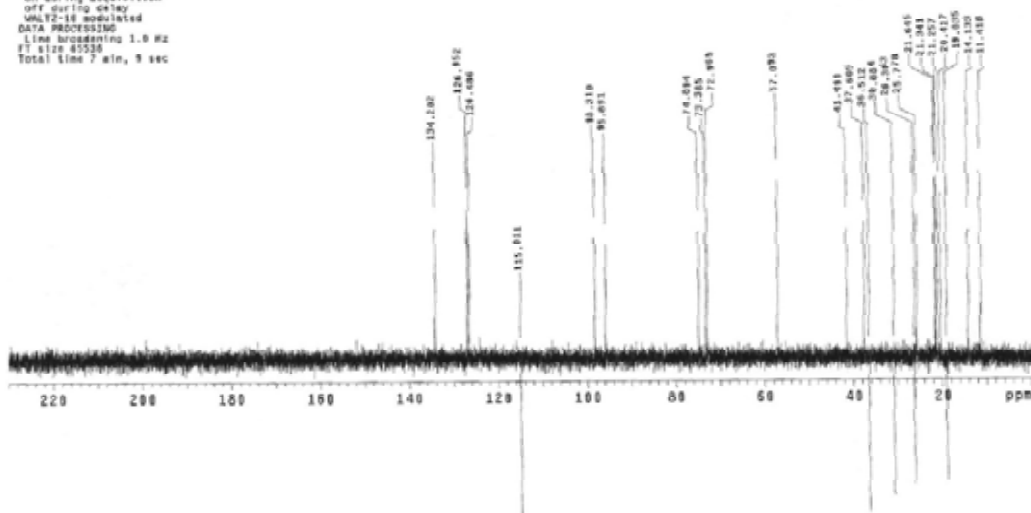


Figura: Expansões do espectro de RMN de ^{13}C da casearin B em piridina-d5 obtido a 125 MHz.

ANEXO 55

Andre ISFA2 14/07/06
 Pulse Sequence: GCPY
 Solvent: pyridine
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 User: 1-14-07
 INOVA-500 "nut1105"

Relax: delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degree
 Acq. time 1.040 sec
 Width 28000.0 Hz
 100 repetitions
 OBSERVE CH: 125.0040031 MHz
 DECOUPLE N1: 499.5245224 MHz
 Power 30 dB
 On during acquisition
 off during delay
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 45536
 Total time 7 min, 0 sec



Andre ISFA2 14/07/06
 Pulse Sequence: DEPT
 Solvent: pyridine
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 User: 1-14-07
 INOVA-500 "nut1105"

Relax: delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degree
 Acq. time 1.040 sec
 Width 28000.0 Hz
 100 repetitions
 OBSERVE CH: 125.0040031 MHz
 DECOUPLE N1: 499.5245224 MHz
 Power 30 dB
 On during acquisition
 off during delay
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 45536
 Total time 7 min, 0 sec

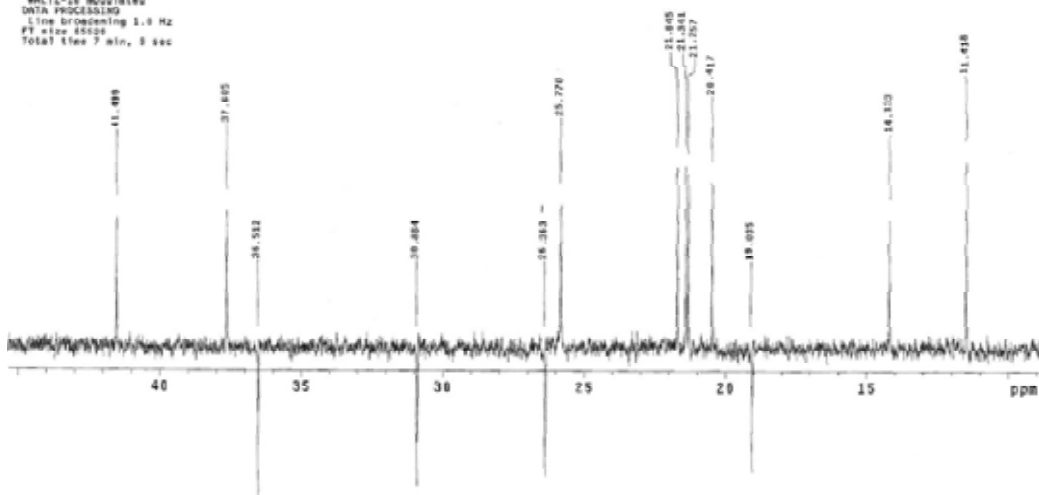


Figura: Espectro de DEPT135^o (incluindo expansão abaixo) da casearina B em piridina-d₅ obtido a 125 MHz.

ANEXO 56

```
Andra 15FAD 14/07/04
Pulse Sequence: DEPT 90
Solvent: pyridine
Temp: 30.0 C / 293.1 K
Year: 1-14-07
INSTR: 500 "multiss"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 90.0 degrees
Acq. time 1.043 sec
Width 24027.8 Hz
100 repetitions
QSCOFF: On, 125.6648831 MHz
DECOUPLE H1: 499.5245225 MHz
Power 30 dB
on during acquisition
off during delay
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
line broadening 1.0 Hz
FT size 45536
Total time 7 min, 8 sec
```

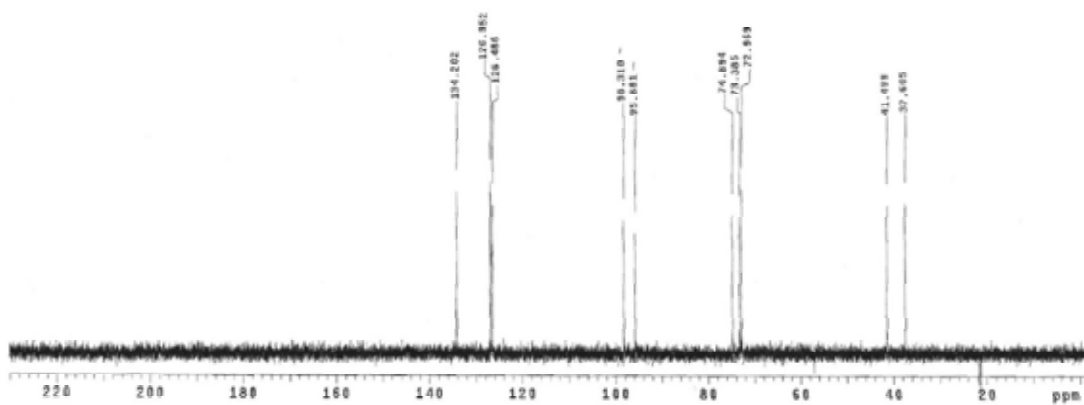


Figura: Espectro de DEPT90^o da casearina B em piridina-d5 obtido a 125 MHz.

ANEXO 57

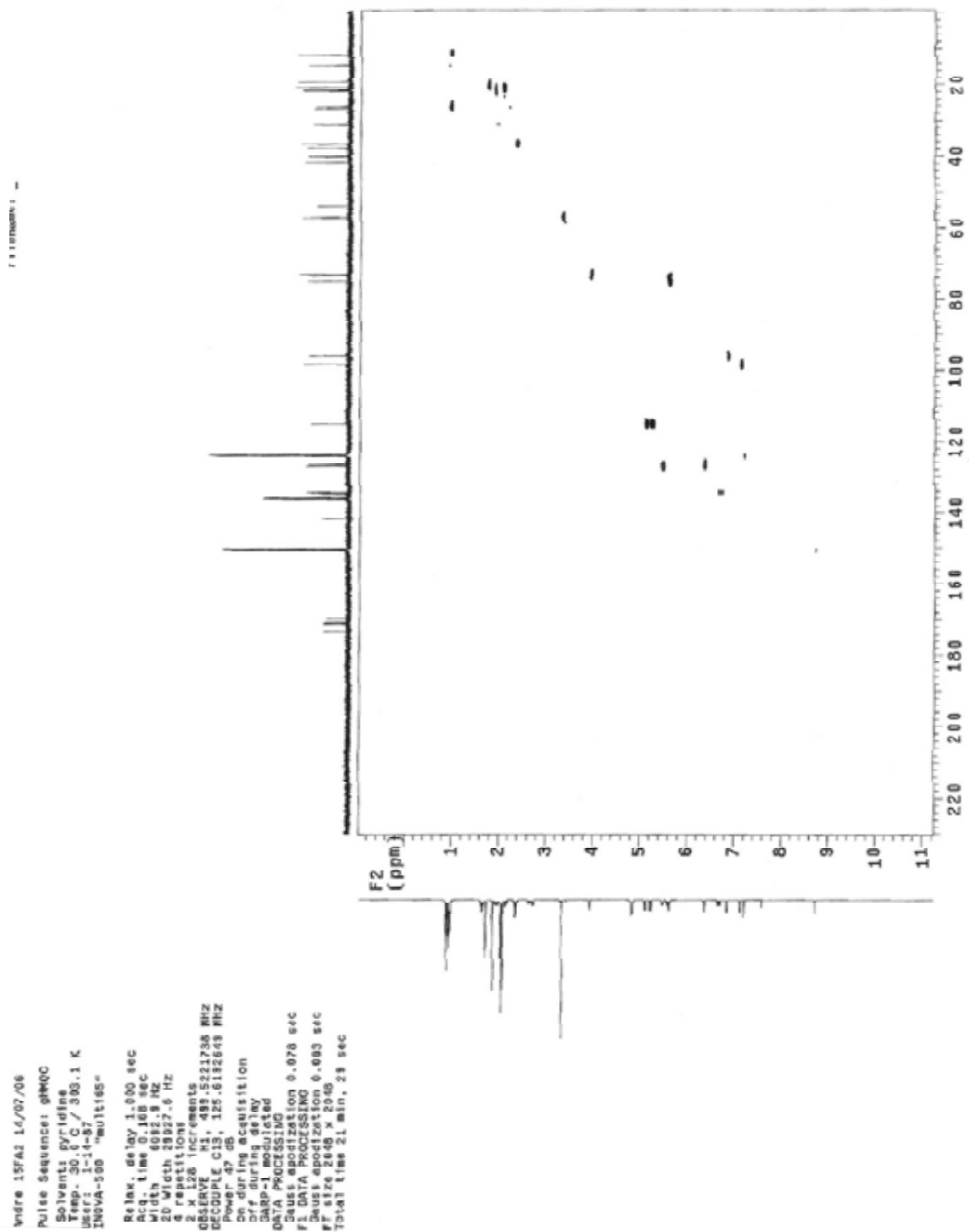


Figura: Mapa de contornos HMQC da casearina B (piridina-d5, 11,7 T).

ANEXO 58

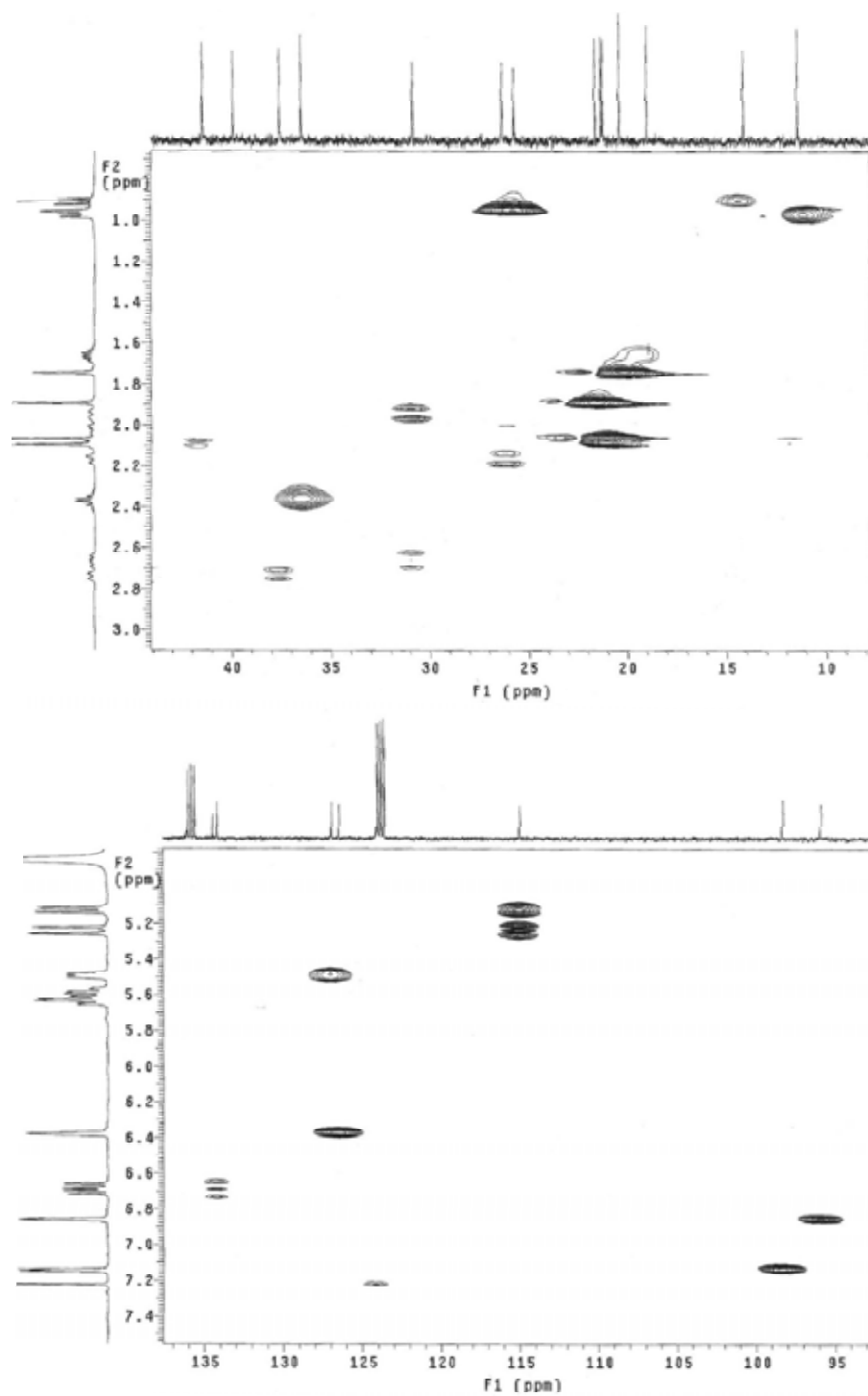


Figura: Expansões do mapa de contornos HMQC da casearina B (piridina- d_5 , 11,7 T).

ANEXO 59

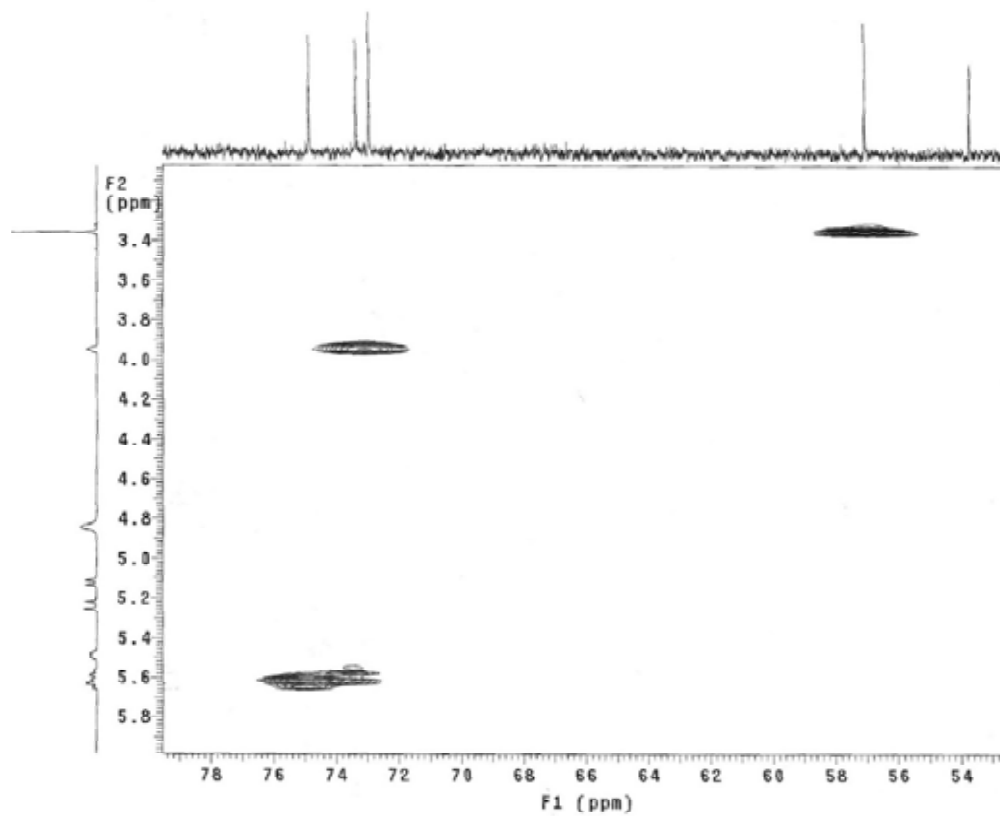


Figura: Expansão do mapa de contornos HMQC da casearina B (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 60

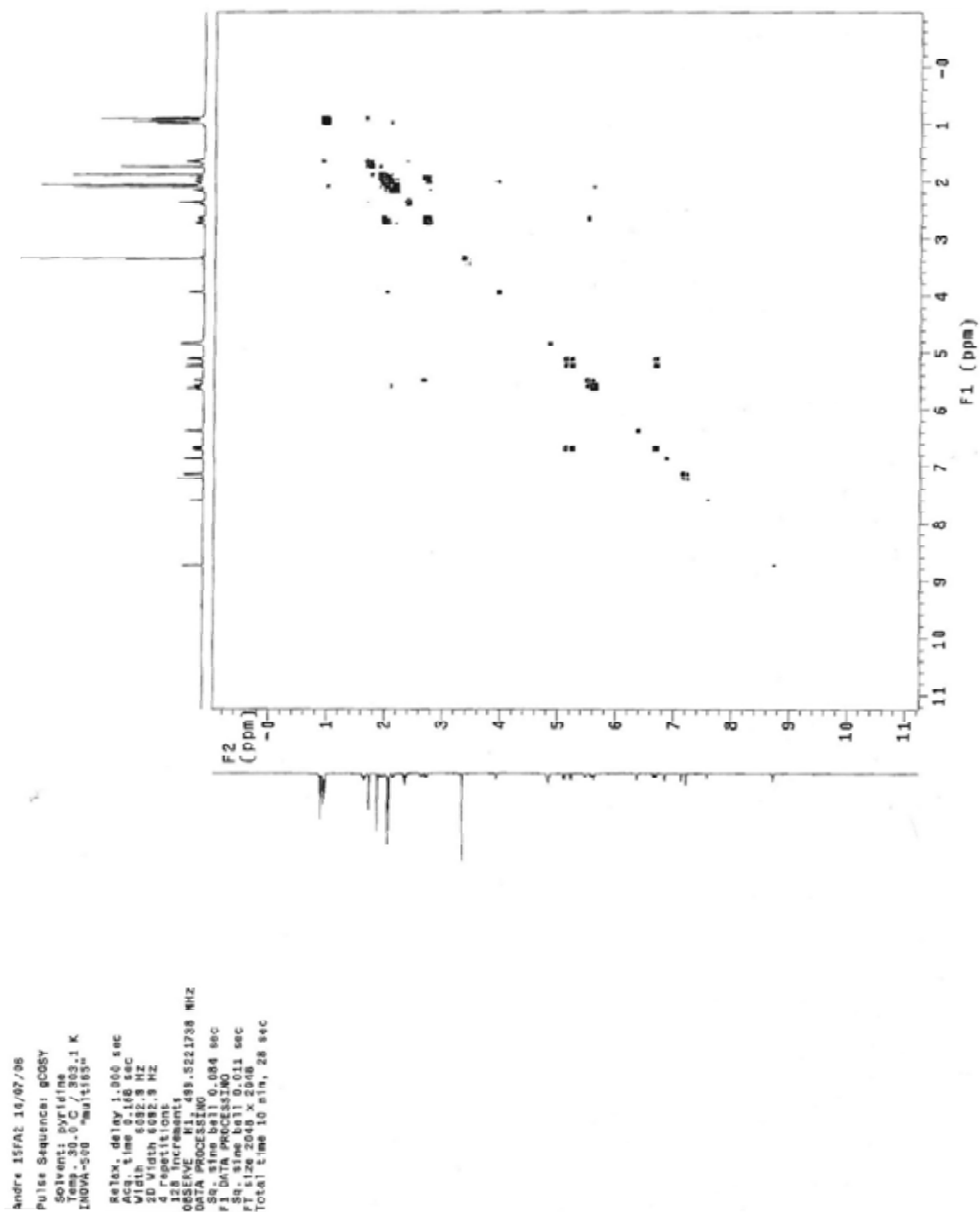


Figura: Mapa de contornos COSY da casearina B (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 61

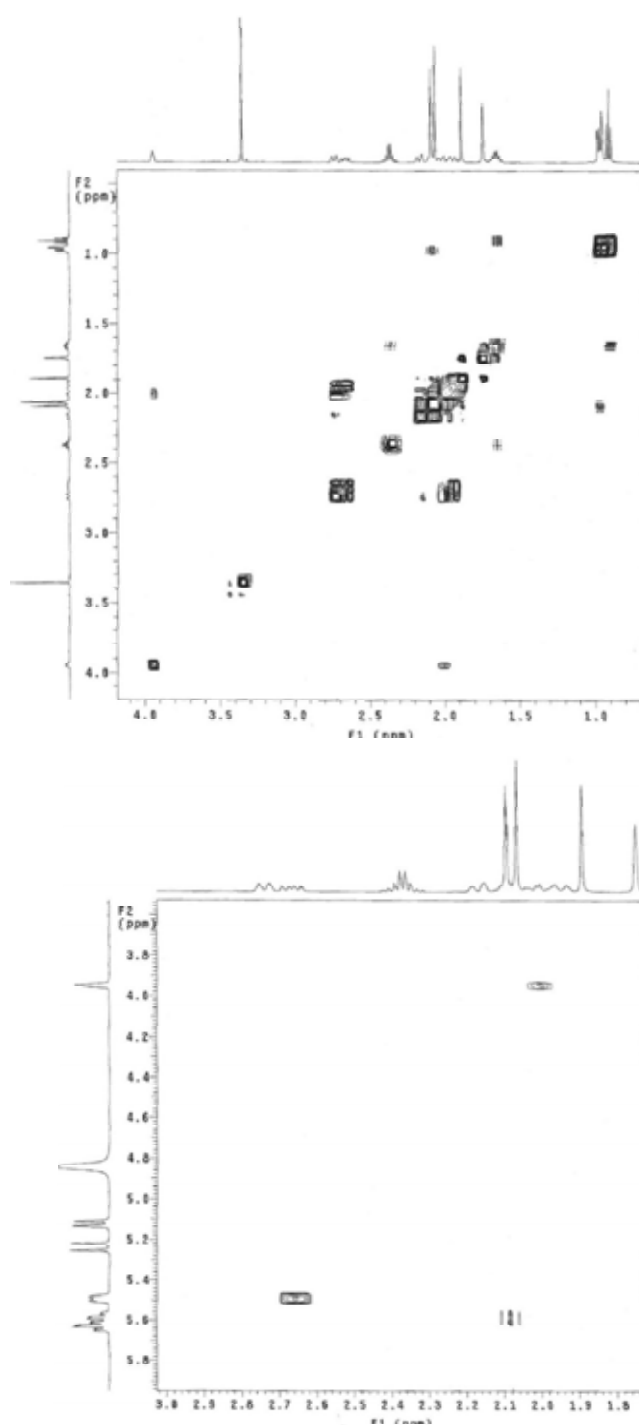


Figura: Expansões do mapa de contornos COSY da casearina B (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 62

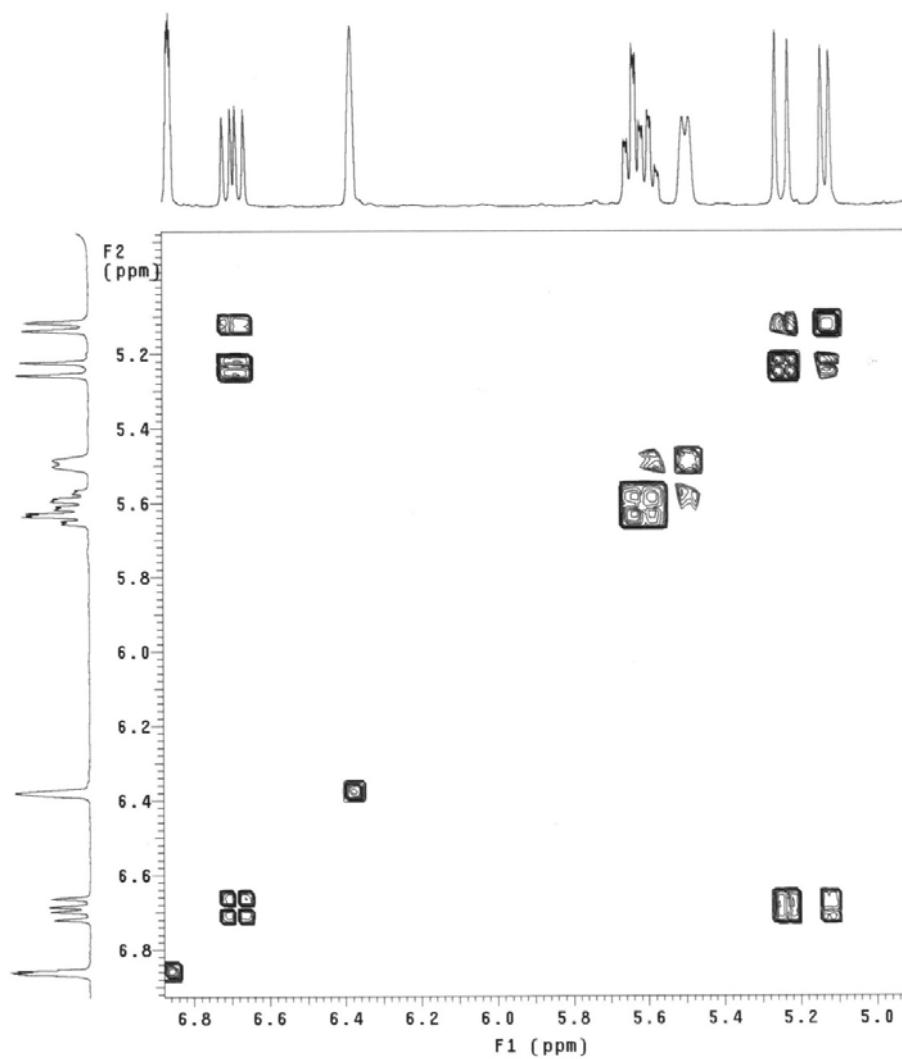


Figura: Expansão do mapa de contornos COSY da casearina B (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 63

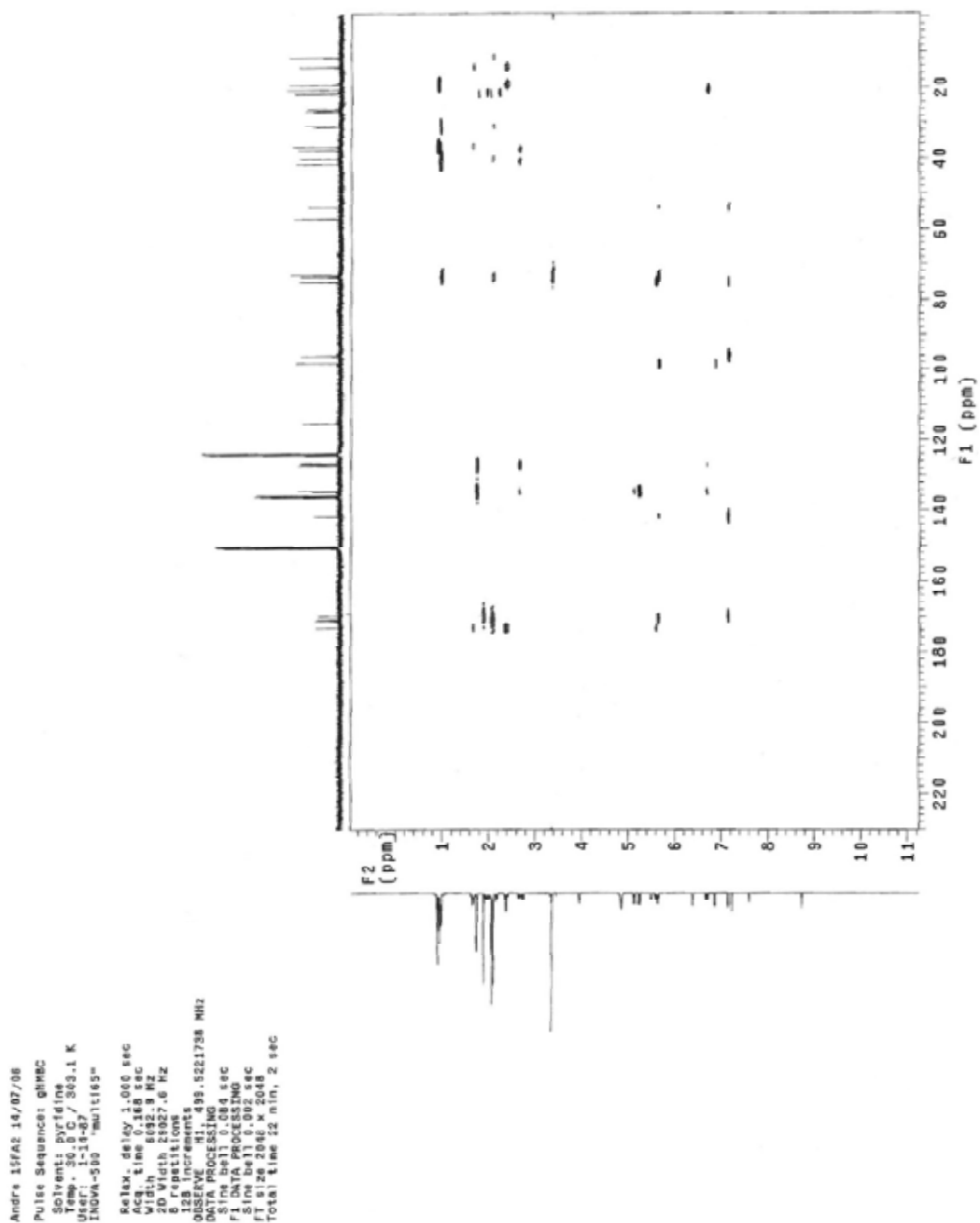


Figura: Mapa de contornos HMBC da casearina B (piridina-d5, 11,7 T).

ANEXO 64

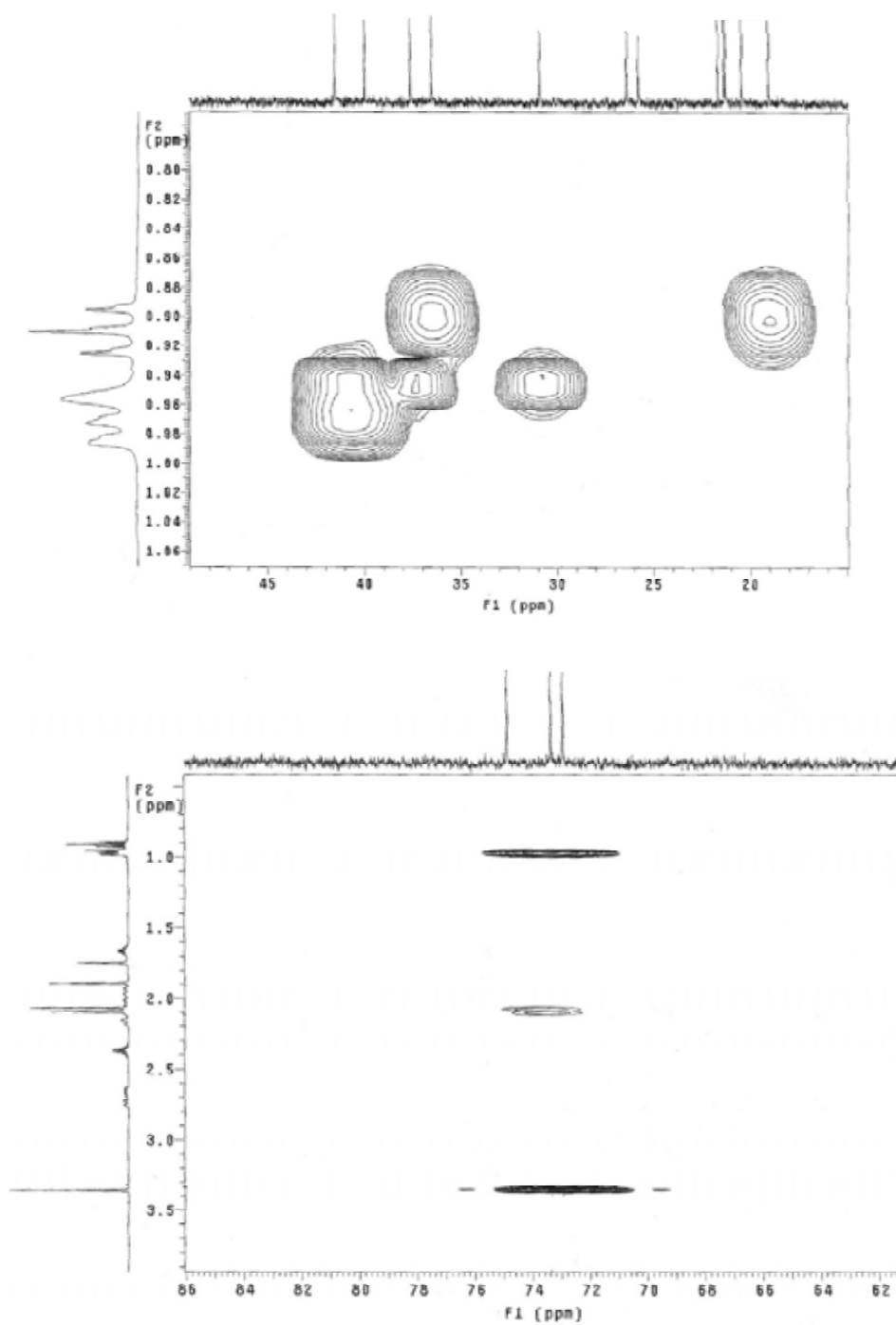


Figura: Expansões do mapa de contornos HMBC da casearina B (piridina- d_5 , 11,7 T).

ANEXO 65

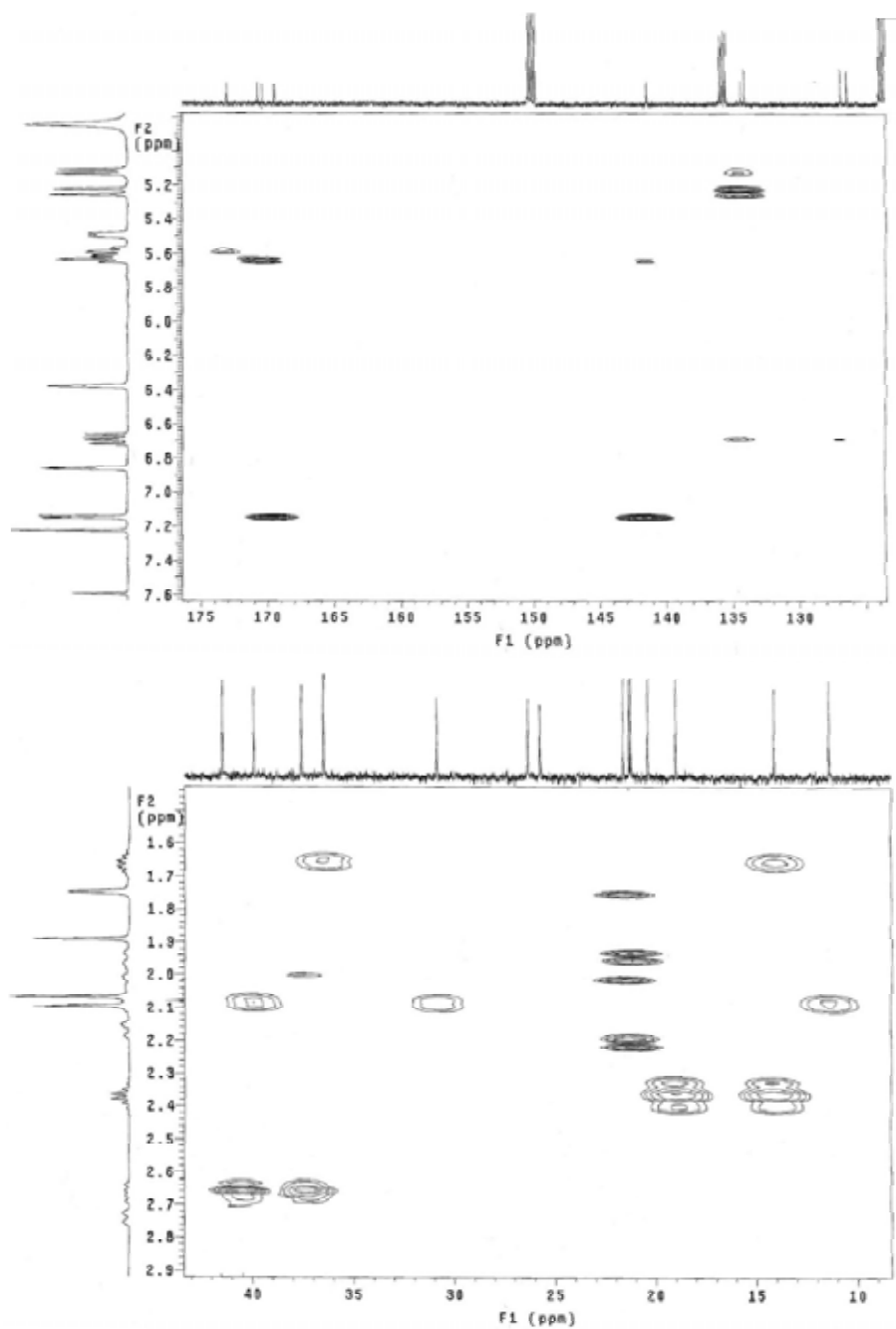


Figura: Expansões do mapa de contornos HMBC da casearina B (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 66

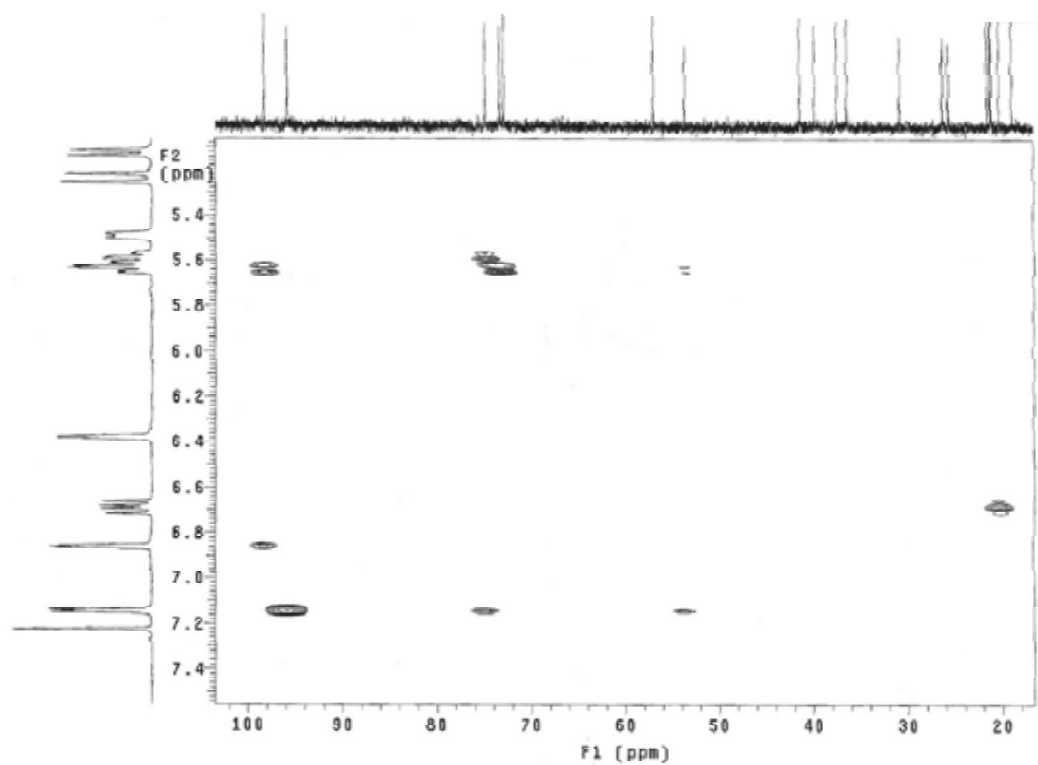
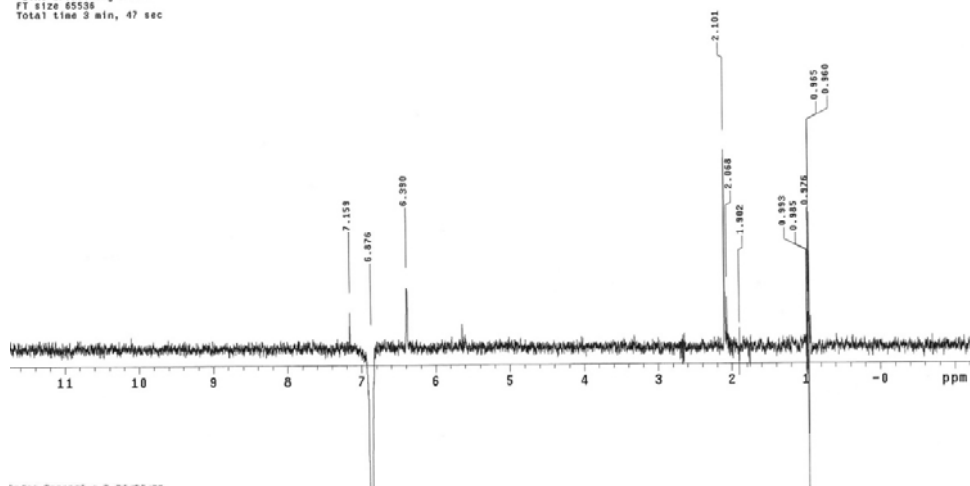


Figura: Expansão do mapa de contornos HMBC da casearina B (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 67

Andre Casarina B 24/20/06
 Pulse Sequence: NOESY1D
 Solvent: pyridine
 Temp: 30.0 C / 293.1 K
 INOVA-500 "multis9"
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Mixing 1.420 sec
 Acq. time 4.987 sec
 Width 6492.5 Hz
 32 repetitions
 OBSERVE F1: 499.5101410 MHz
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 3 min, 47 sec



Andre Casarina B 24/20/06
 Pulse Sequence: NOESY1D
 Solvent: pyridine
 Temp: 30.0 C / 293.1 K
 INOVA-500 "multis9"
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Mixing 1.420 sec
 Acq. time 4.987 sec
 Width 6492.5 Hz
 32 repetitions
 OBSERVE F1: 499.5101410 MHz
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 3 min, 48 sec

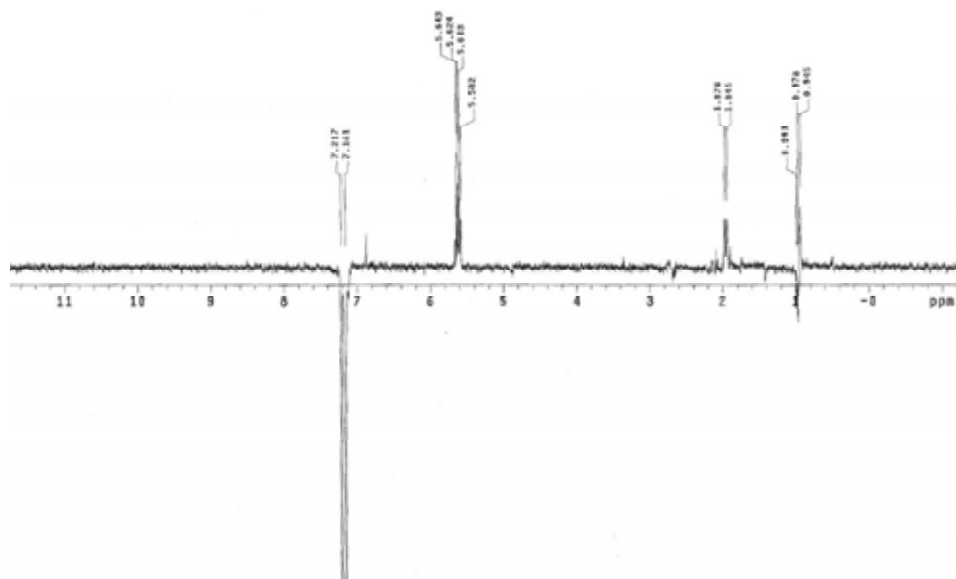
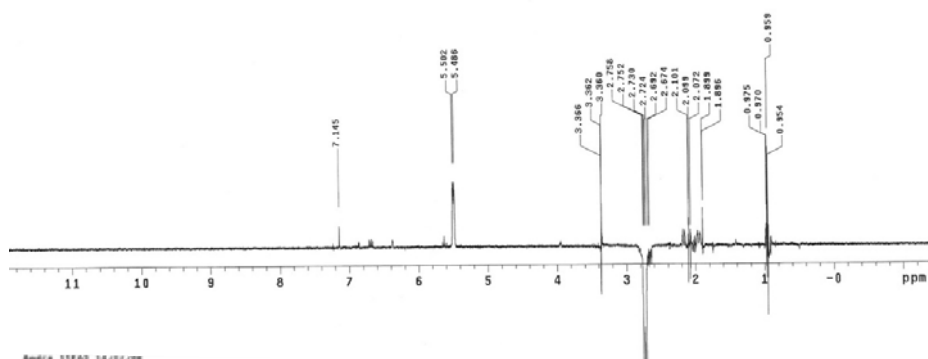


Figura: Espectros de NOESY1D da casearina B (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 68

Andre 15FA2 14/07/09
 Pulse Sequence: NOESY1D
 Solvent: pyridine
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 INOVA-500 "multis"

 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degree
 Mixing 1.000 sec
 Acq. time 4.085 sec
 Width 6678.5 Hz
 25 repetitions
 OBSERVE H1: 499.5214273 MHz
 DATA PROCESSING
 Line broadening 0.2 Hz
 FT size 65536
 Total time 3 min, 31 sec



Andre 15FA2 14/07/09
 Pulse Sequence: NOESY1D
 Solvent: pyridine
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 INOVA-500 "multis"

 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degree
 Mixing 1.000 sec
 Acq. time 4.085 sec
 Width 6678.5 Hz
 25 repetitions
 OBSERVE H1: 499.5114273 MHz
 DATA PROCESSING
 Line broadening 0.2 Hz
 FT size 65536
 Total time 3 min, 30 sec

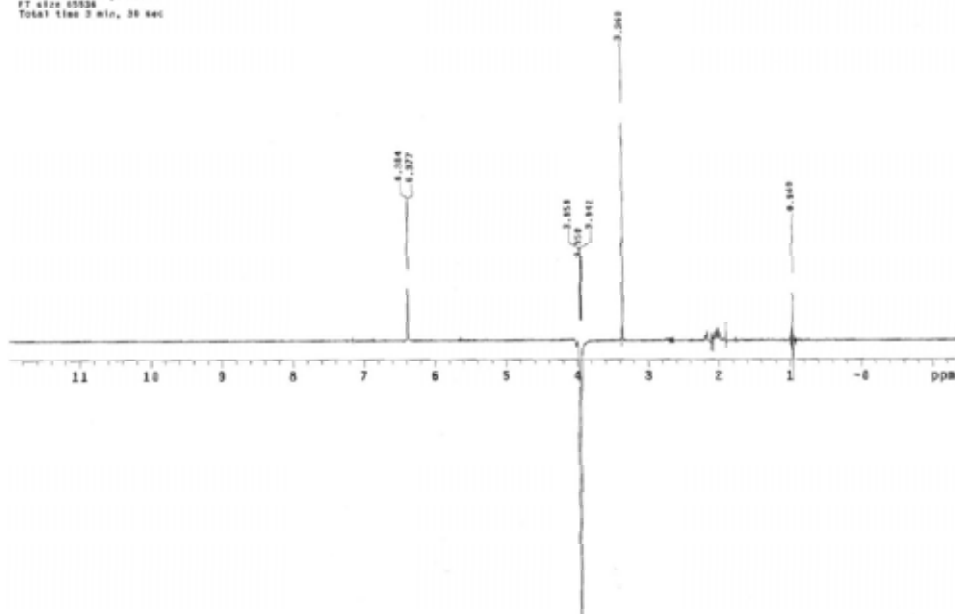


Figura: Espectros de NOESY1D da casearina B (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 69

Andre 15FA2 14/07/06
Pulse Sequence: NOESY1D
Solvent: pyridine
Temp. 30.0 C / 303.1 K
INOVA-500 "multis"*

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 90.0 degrees
Mixing 1.500 sec
Acq. time 4.085 sec
Width 6675.5 Hz
18 repetitions
OBSERVE H1, 499.5214273 MHz
DATA PROCESSING
Line broadening 0.2 Hz
FT size 65536
Total time 3 min, 34 sec

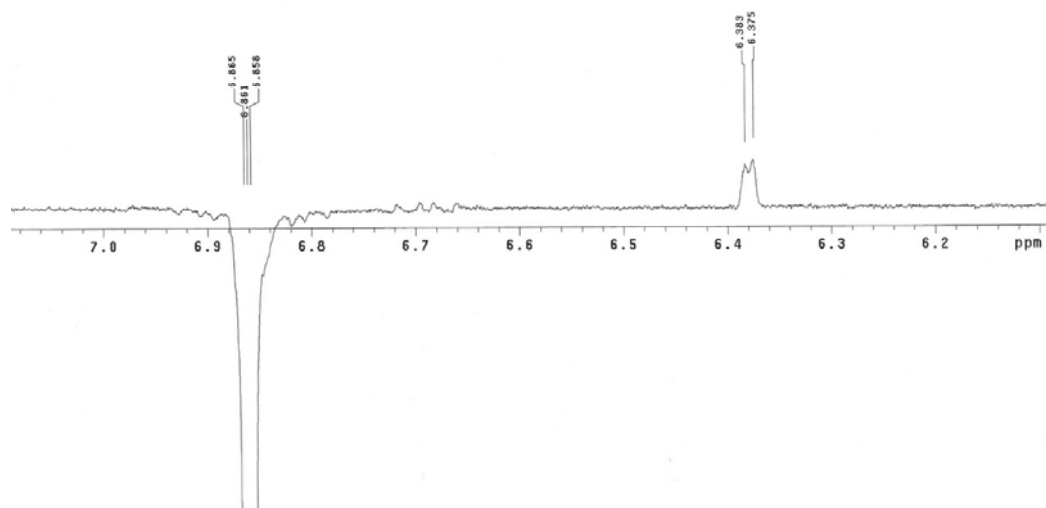


Figura: Expansão de espectro de NOESY1D da casearina B (piridina-d5, 11,7 T).

ANEXO 70

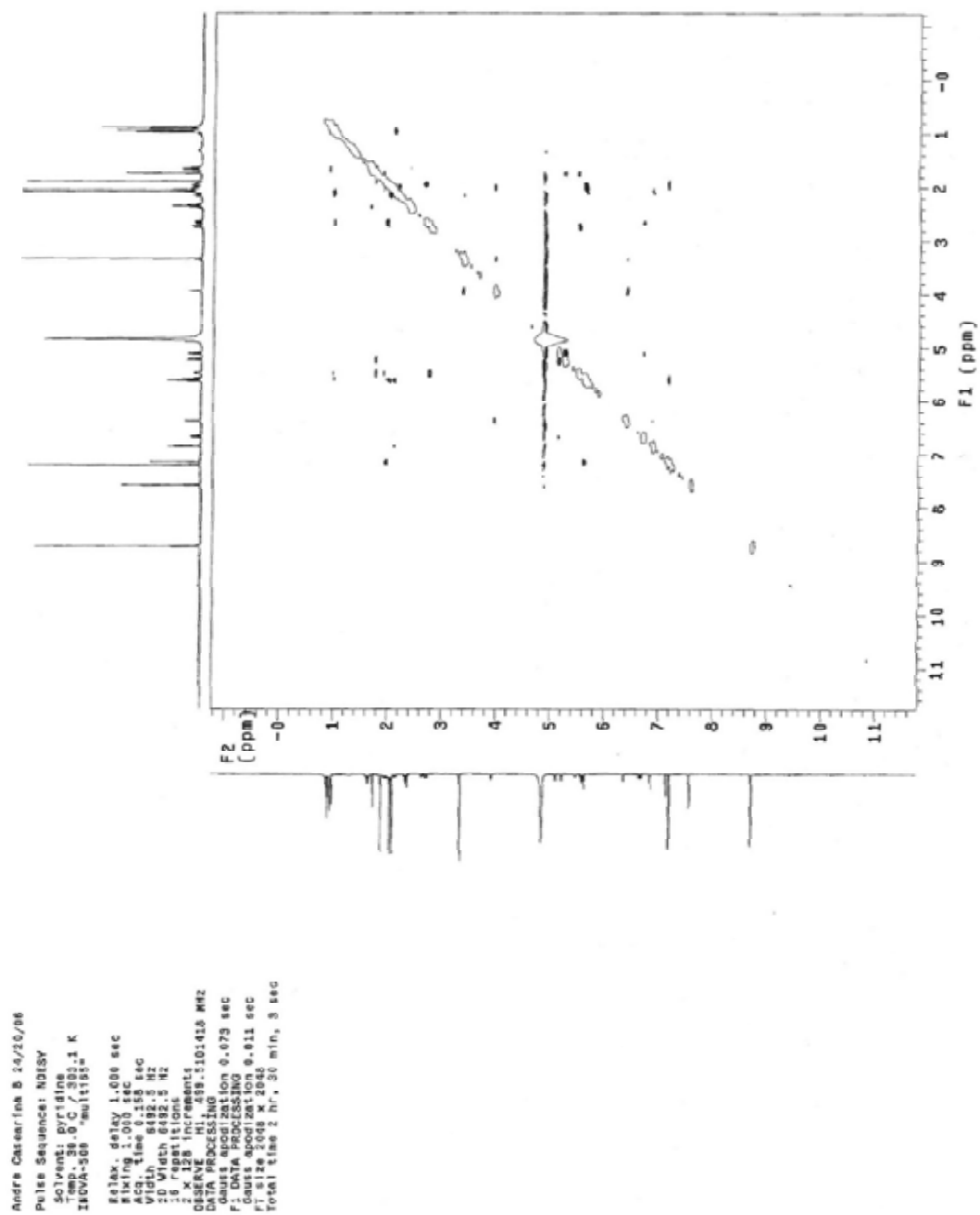


Figura: Mapa de contornos NOESY2D da casearina B (piridina-d5, 11,7 T).

ANEXO 71

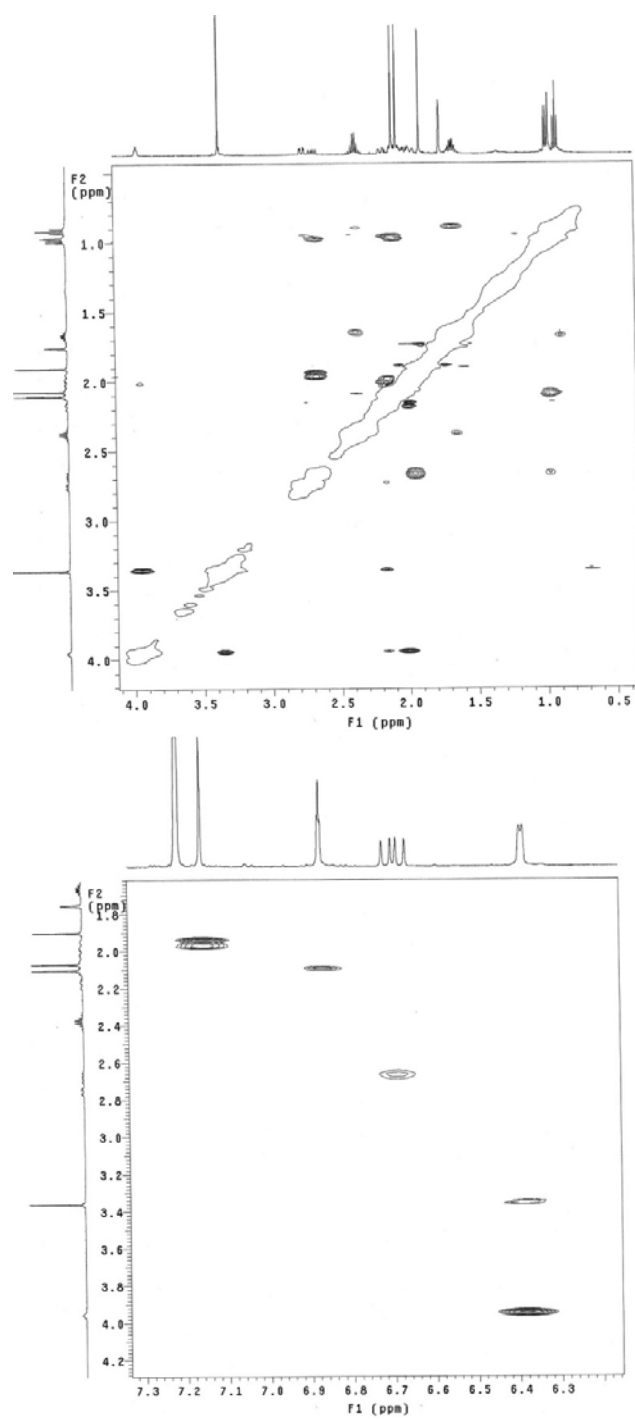


Figura: Expansões do mapa de contornos NOESY2D da casearina B (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 72

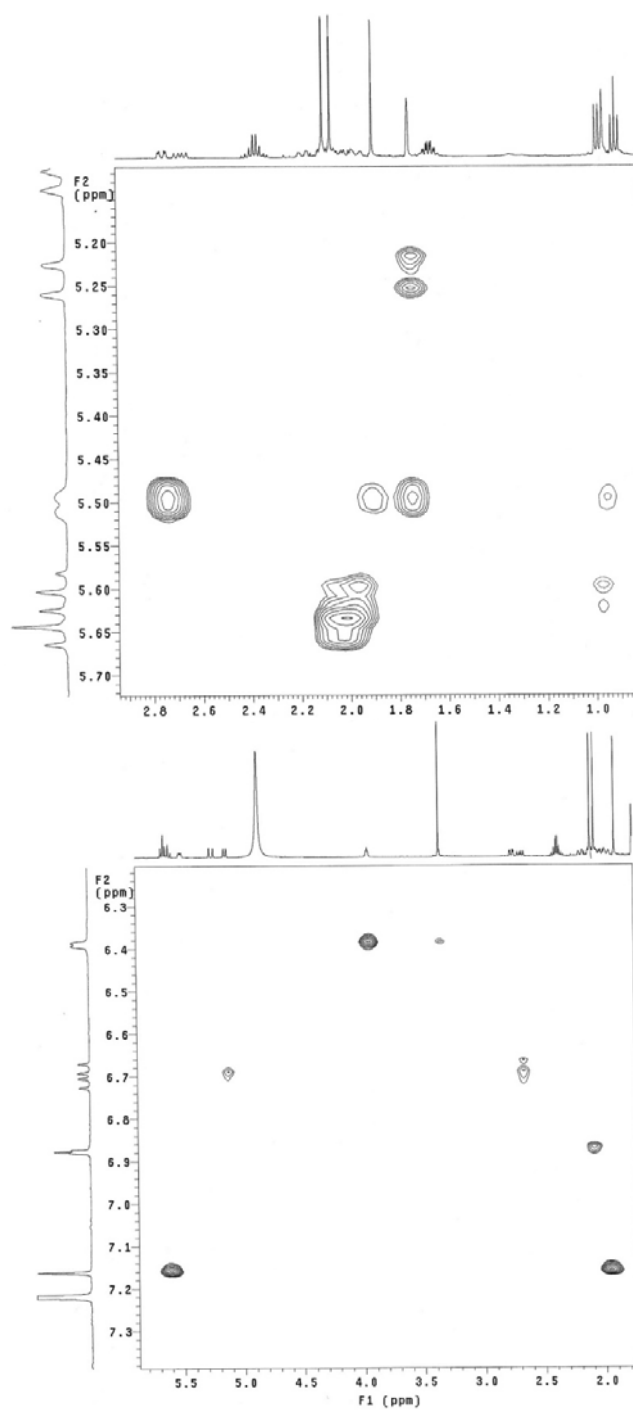


Figura: Expansões do mapa de contornos NOESY2D da casearina B (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 73

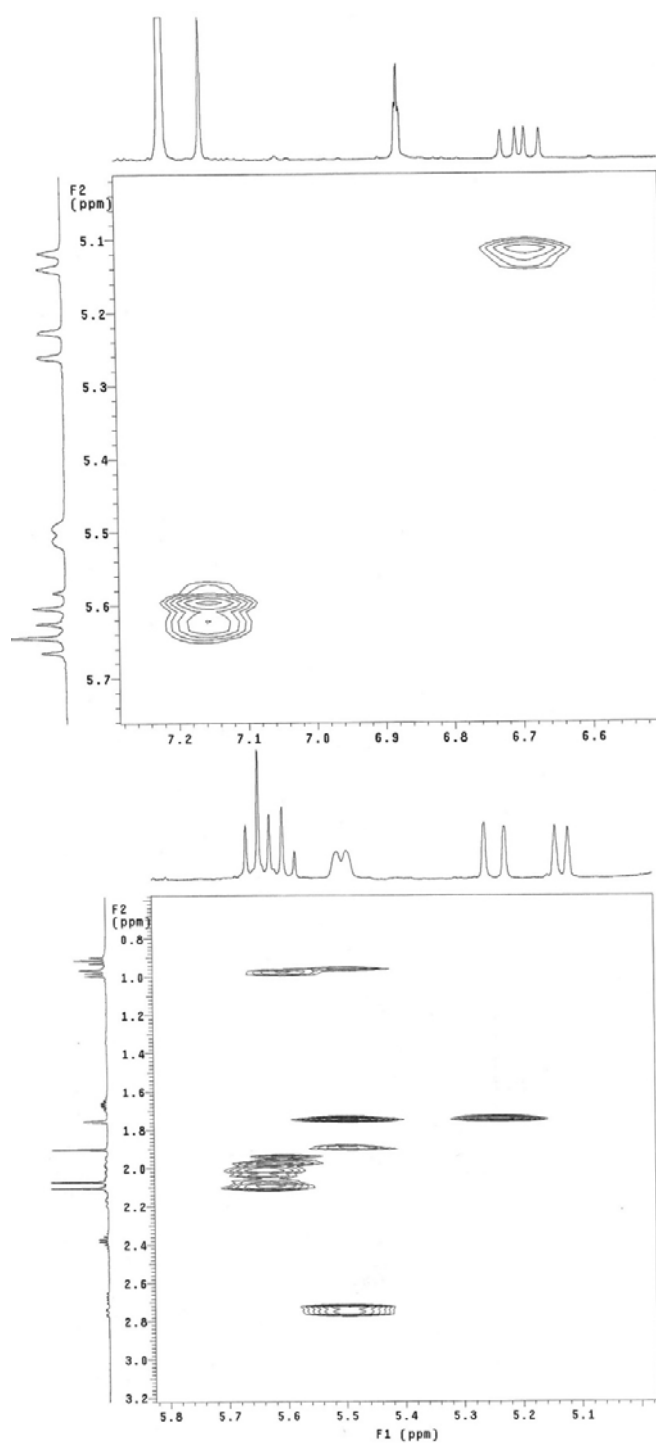


Figura: Expansões do mapa de contornos NOESY2D da casearina B (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 74

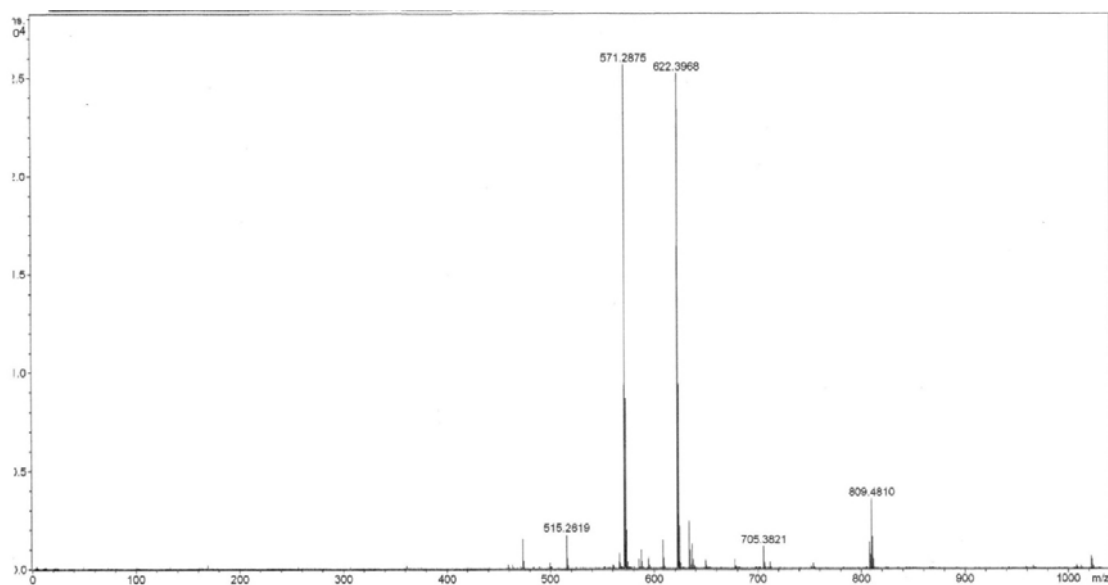


Figura A: Espectro de massas de alta resolução (HRTOF-ESIMS) da casearina D.

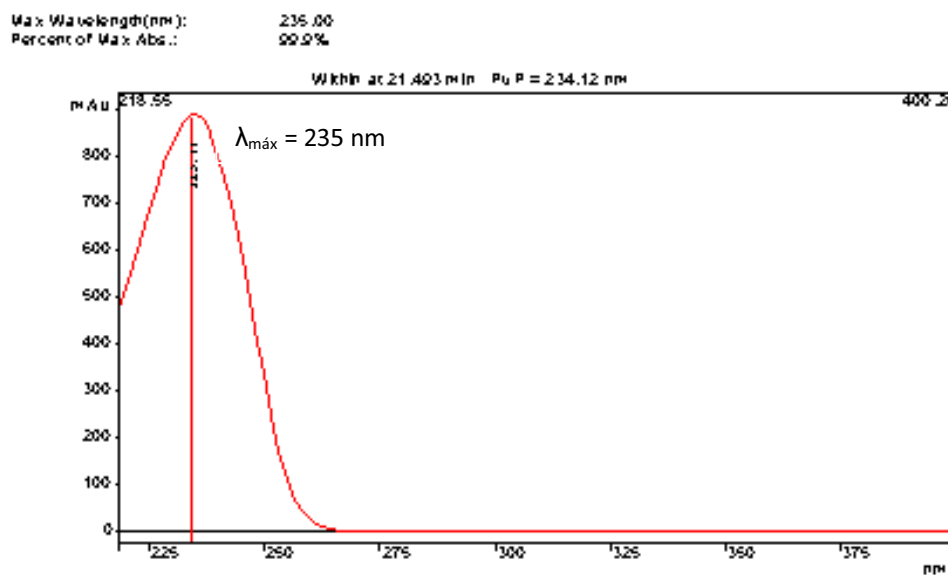


Figura B: Espectro de absorção no UV da casearina D obtido pela análise em CLAE-DAD. Condições de análise na Tabela 7.

ANEXO 75

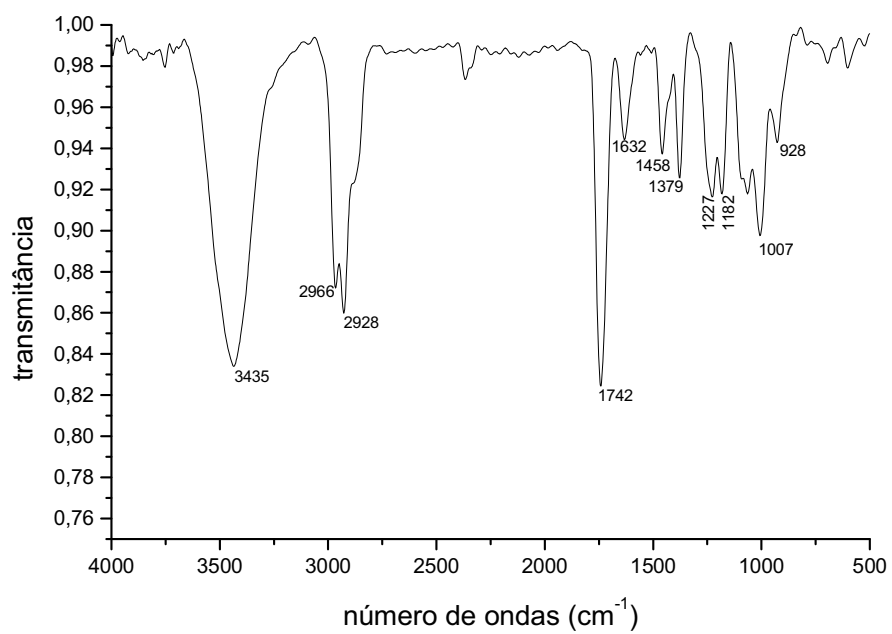


Figura: Espectro de absorção no IV da casearina D.

ANEXO 76

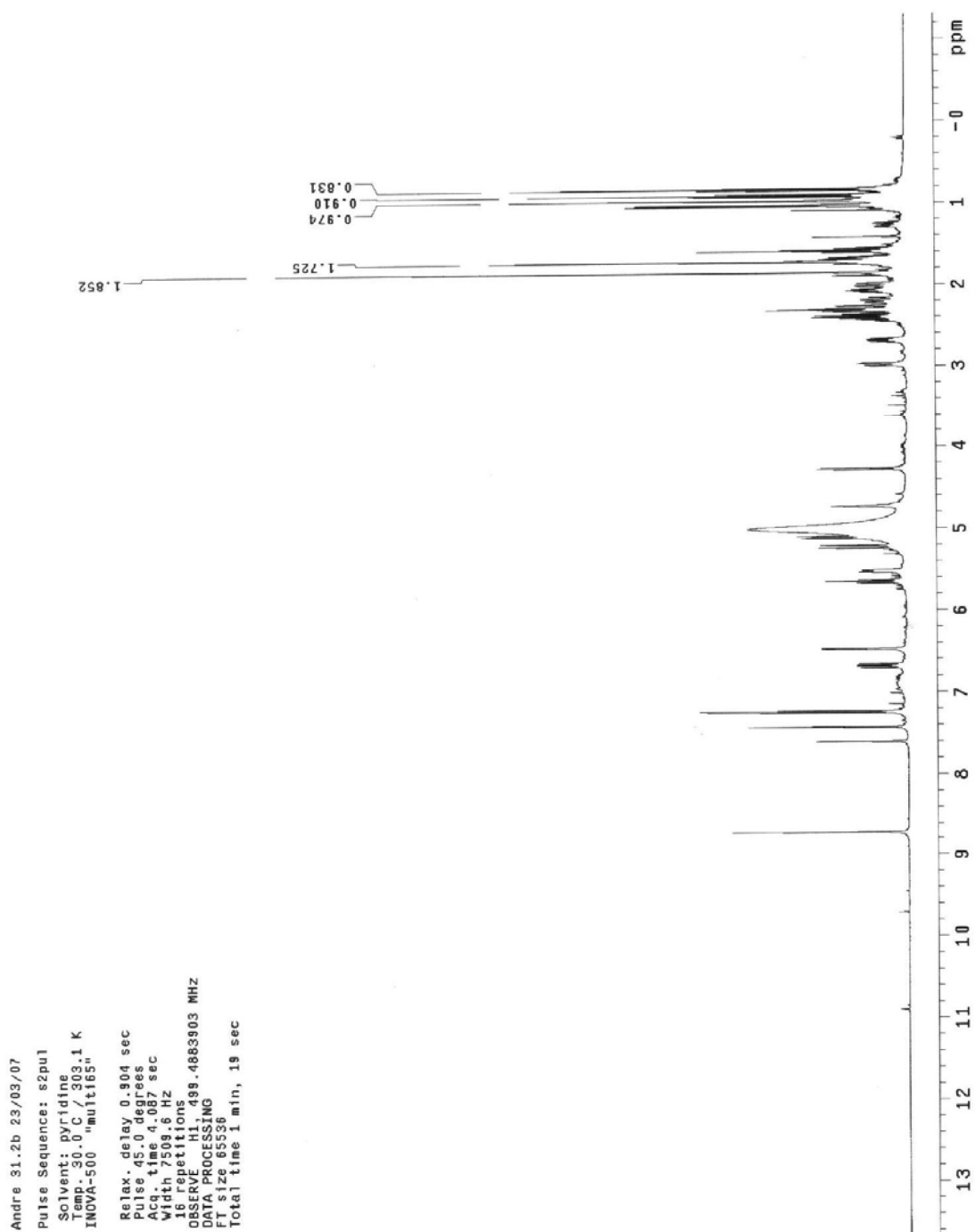


Figura: Espectro de RMN de ^1H da casearina D em piridina-d5 obtido a 500 MHz.

ANEXO 77

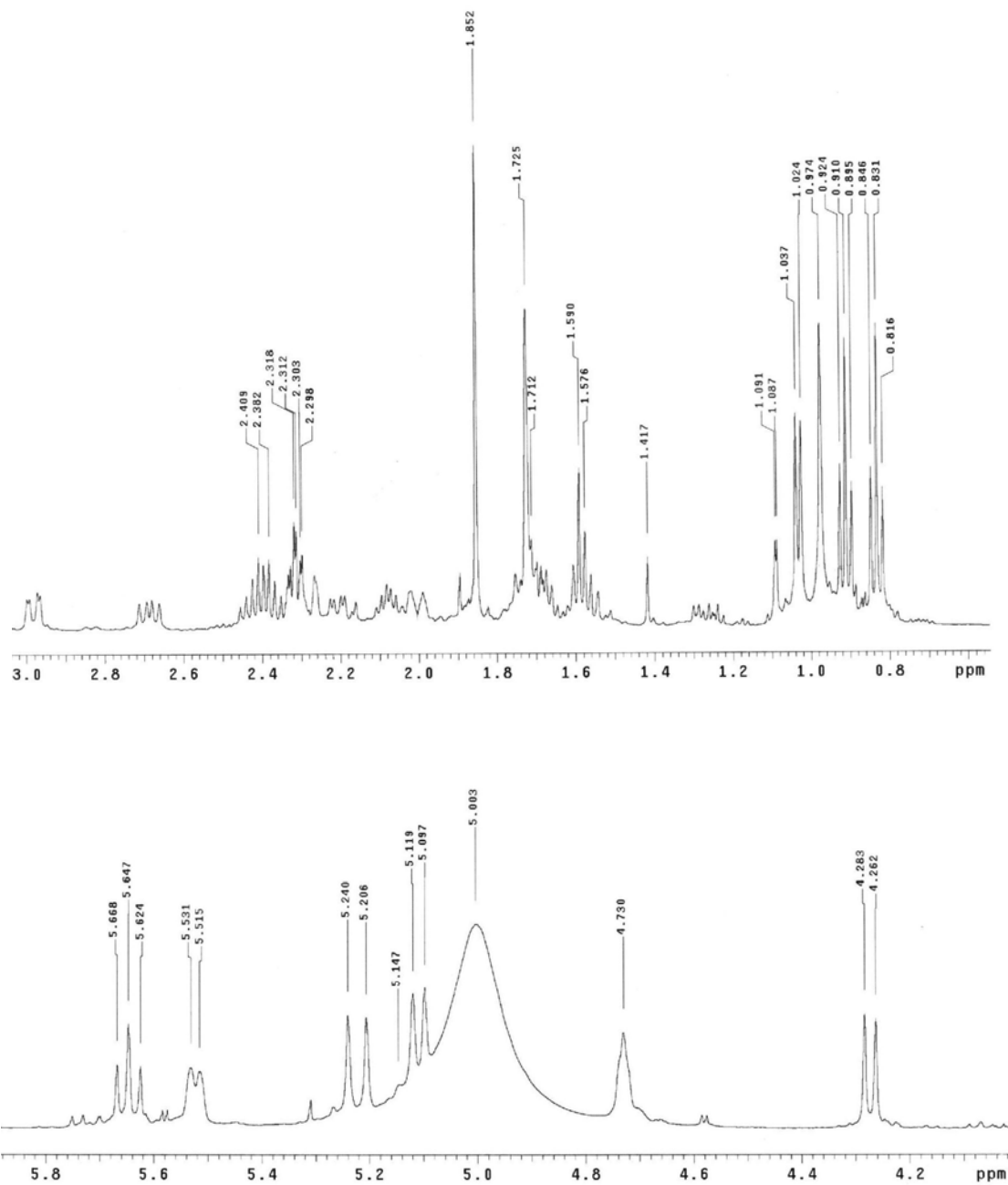


Figura: Expansões do espectro de RMN de ^1H da casearina D em piridina- d_5 obtido a 500 MHz.

ANEXO 78

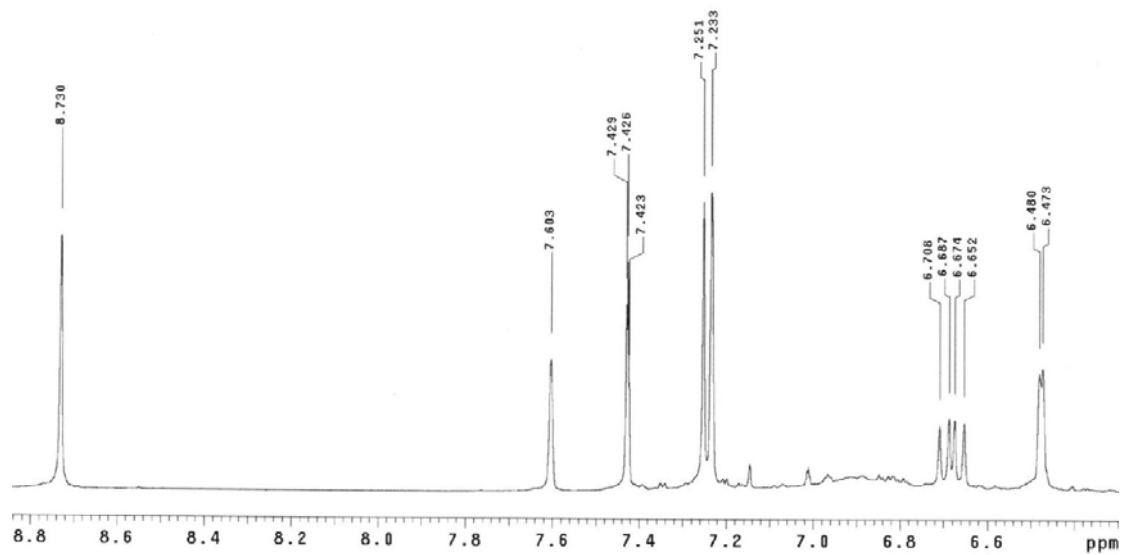


Figura: Expansão do espectro de RMN de ^1H da casearina D em piridina- d_5 obtido a 500 MHz.

ANEXO 79

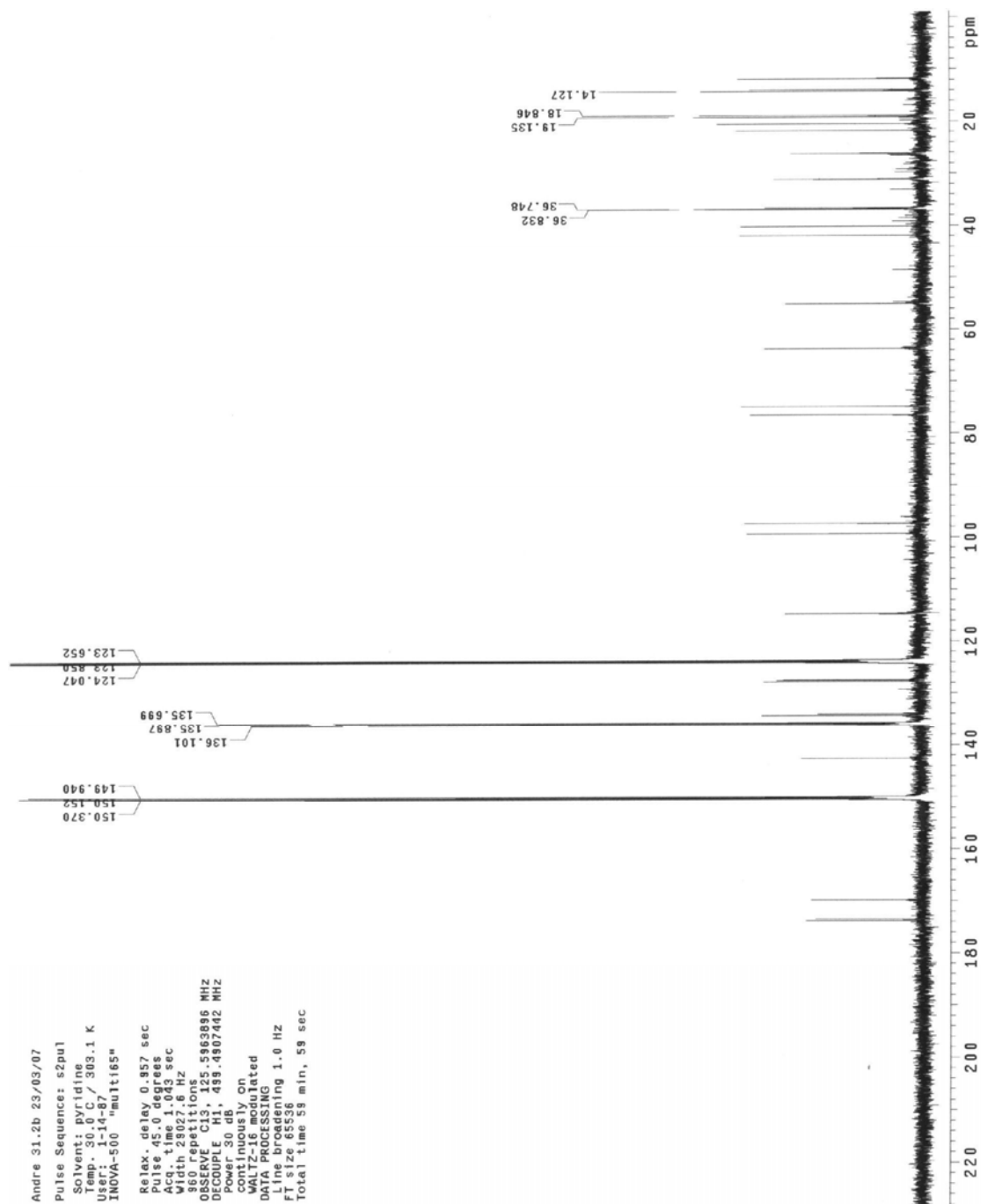


Figura: Espectro de RMN de ^{13}C da casearina D em piridina-d5 obtido a 125 MHz.

ANEXO 80

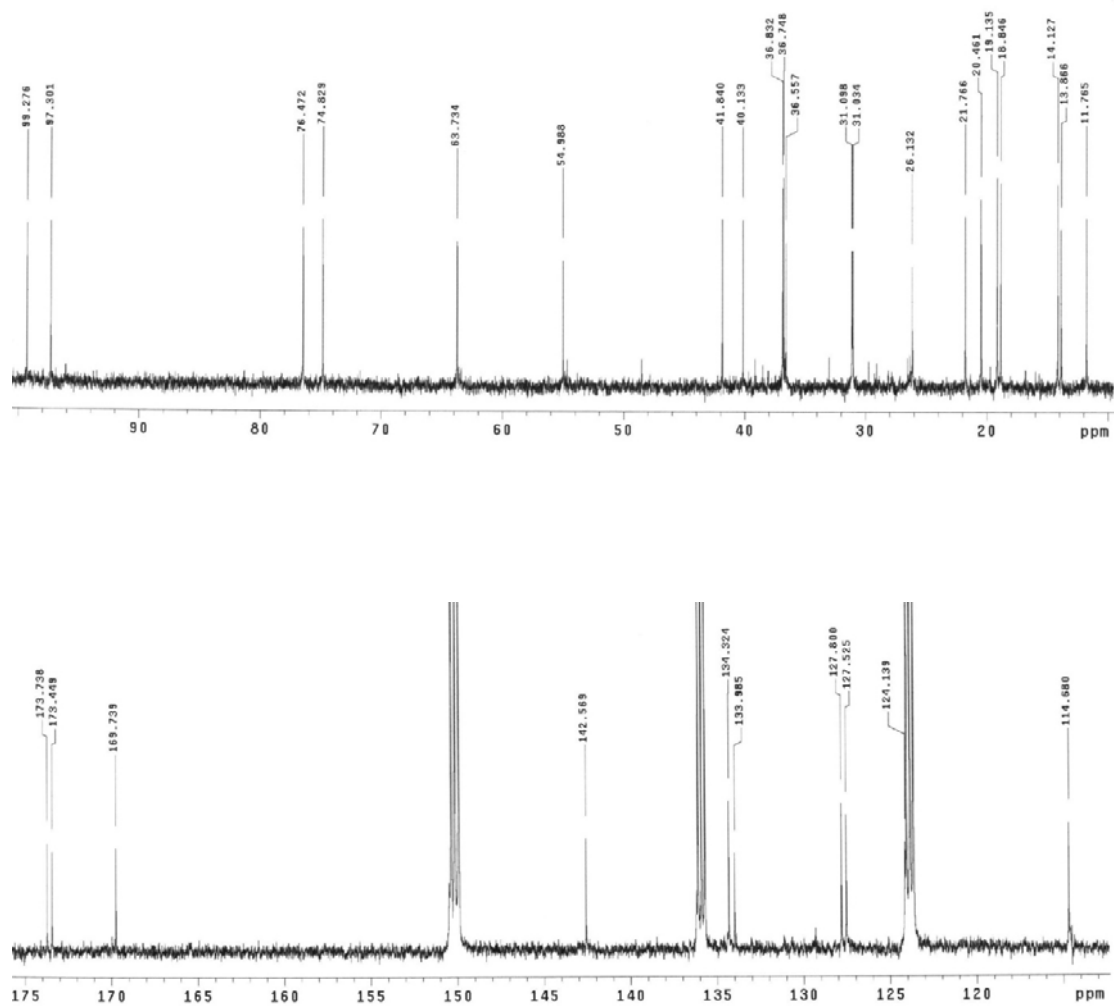


Figura: Expansões do espectro de RMN de ^{13}C da casearina D em piridina- d_5 obtido a 125 MHz.

ANEXO 81

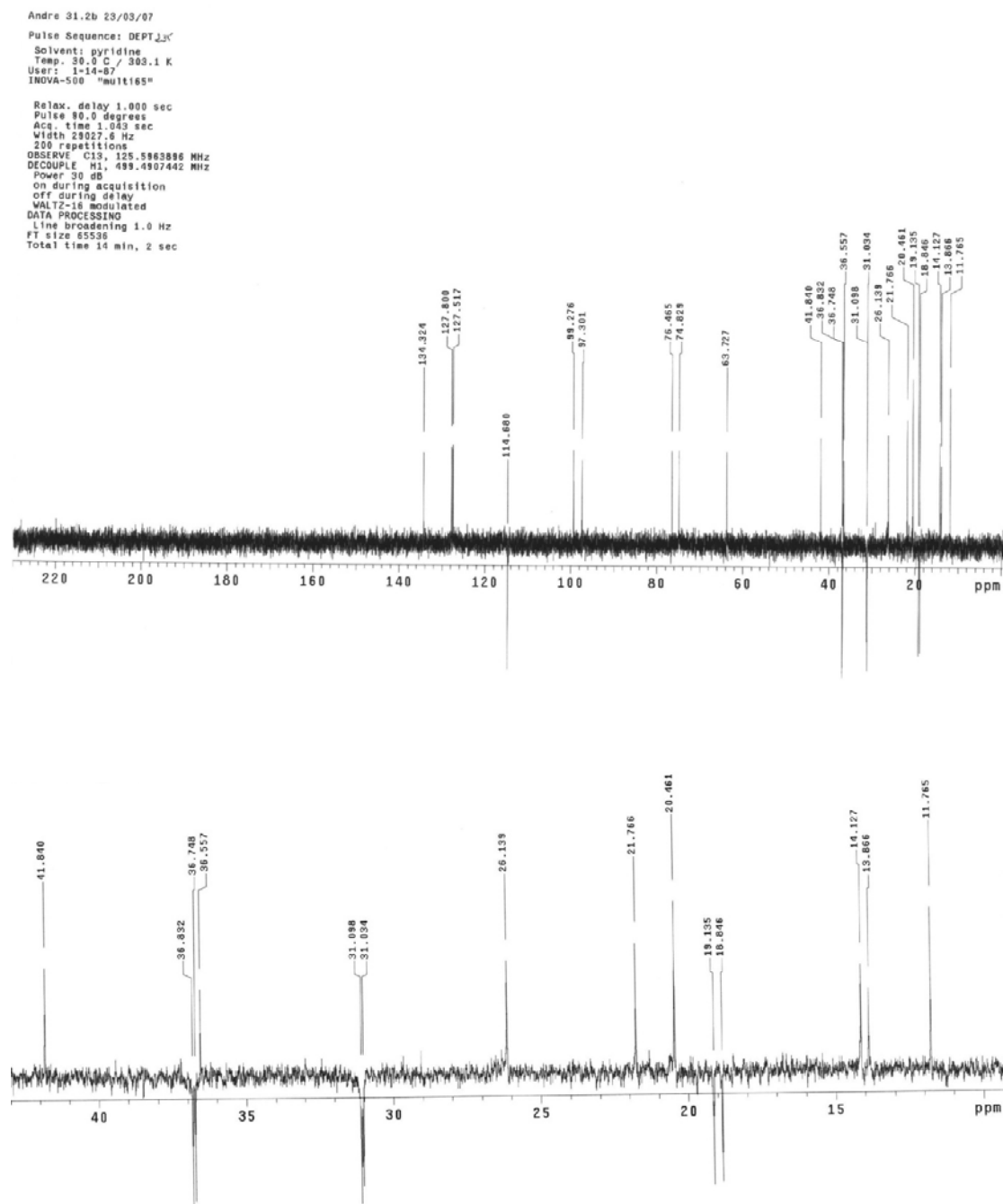


Figura: Espectro de DEPT135^o (incluindo expansão abaixo) da casearina D em piridina-d₅ obtido a 125 MHz.

ANEXO 82

Andre 31.2b 23/03/07
Pulse Sequence: DEPT 90
Solvent: pyridine
Temp. 30.0 C / 303.1 K
User: 1-14-87
INOVA-500 "multies"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 90.0 degrees
Acq. time 1.043 sec
Width 23927.6 Hz
200 repetitions
OBSERVE C13, 125.5963886 MHz
DECOUPLE H1, 499.4967442 MHz
Power 30 dB
on during acquisition
off during delay
WALTZ-16 Modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 85506
Total time 14 min, 2 sec

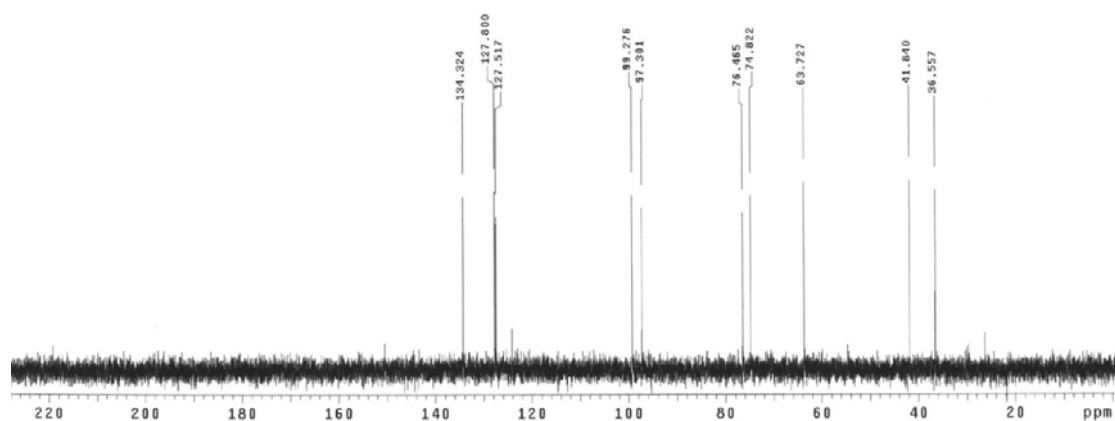


Figura: Espectro de DEPT90^o da casearina D em piridina-d5 obtido a 125 MHz.

ANEXO 83

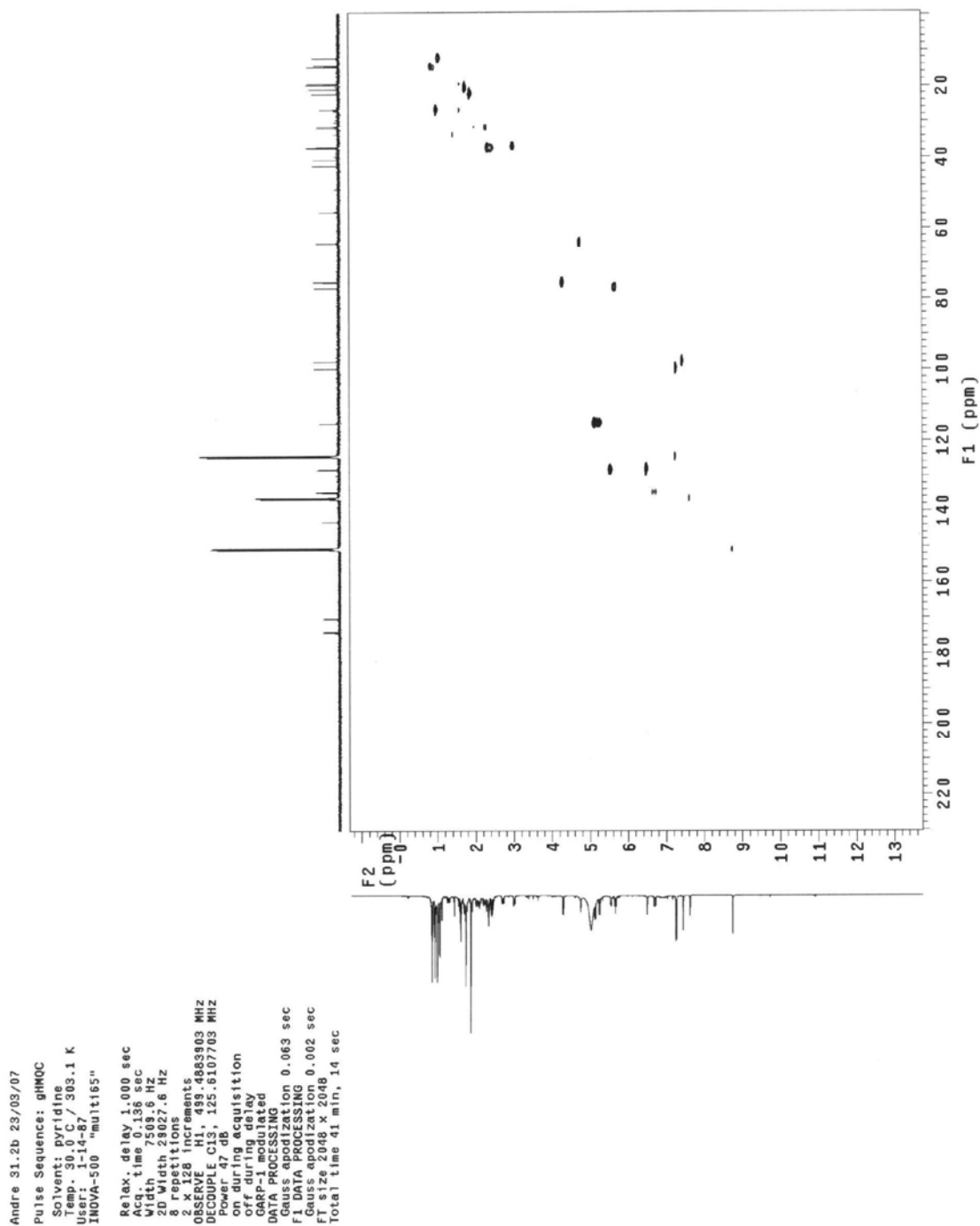


Figura: Mapa de contornos HMOC da casearina D (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 84

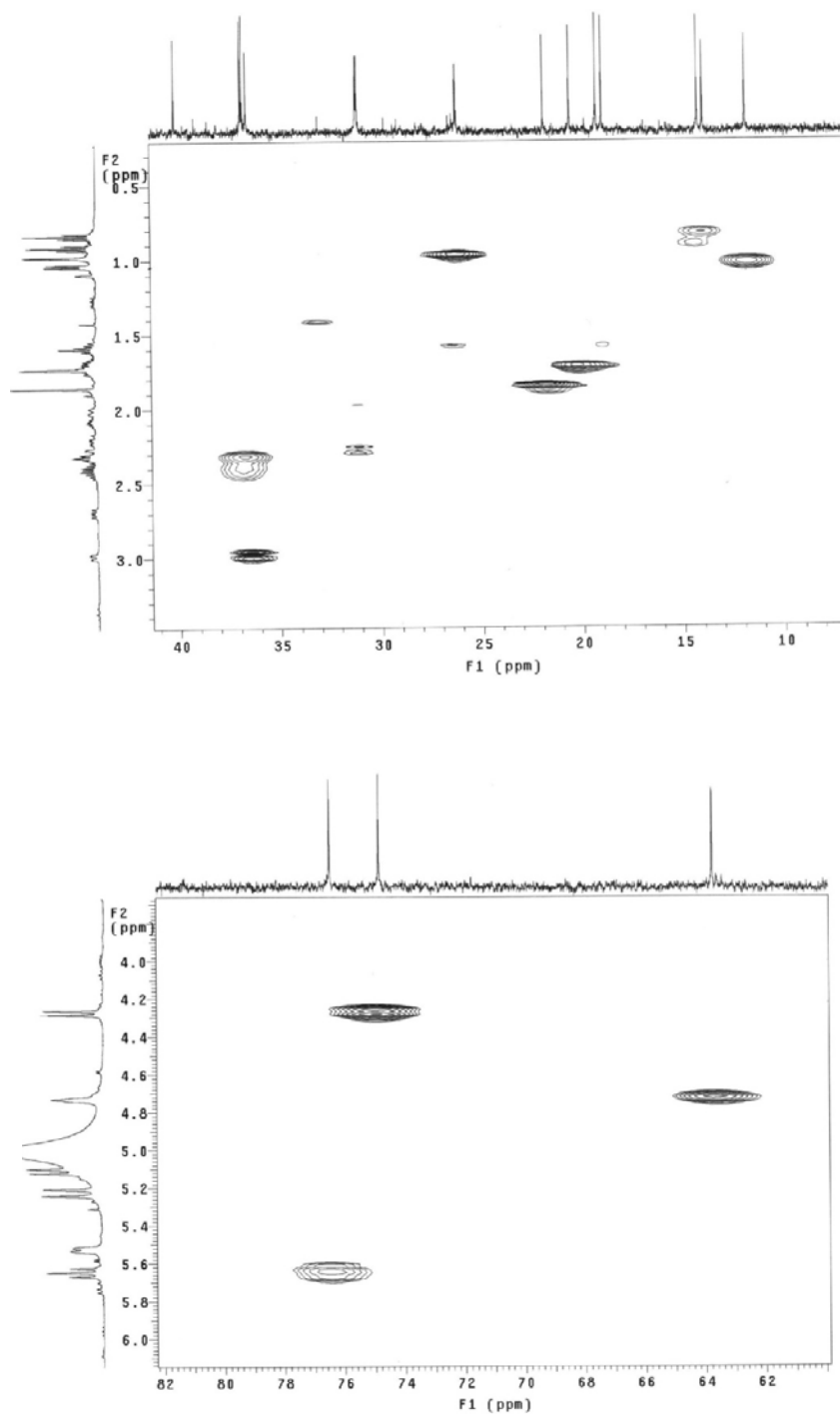


Figura: Expansões do mapa de contornos HMQC da casearina D (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 85

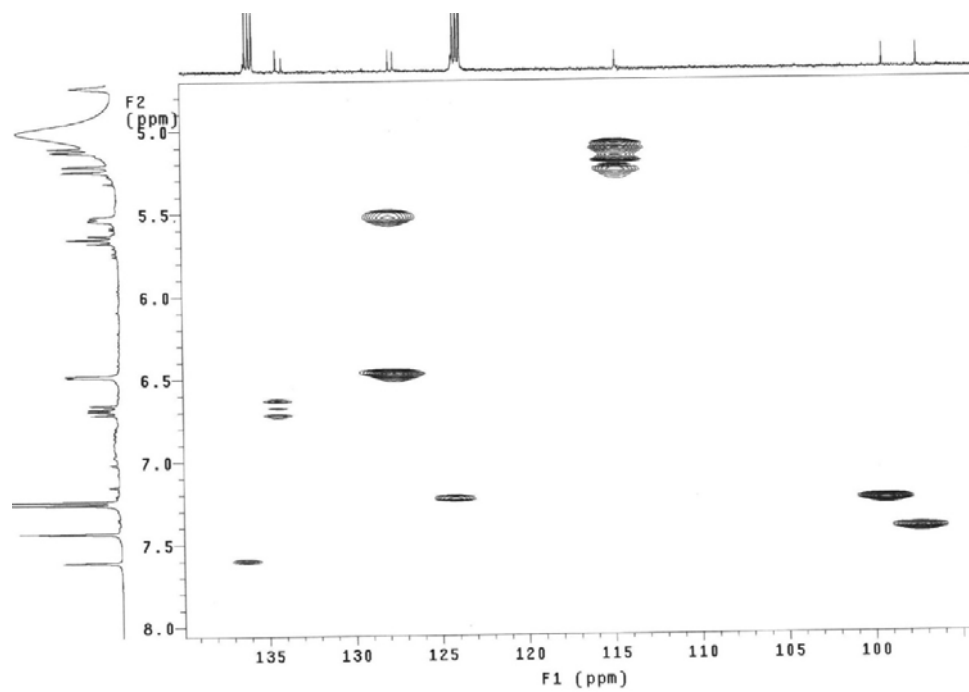


Figura: Expansão do mapa de contornos HMQC da casearina D (piridina- d_5 , 11,7 T).

ANEXO 86

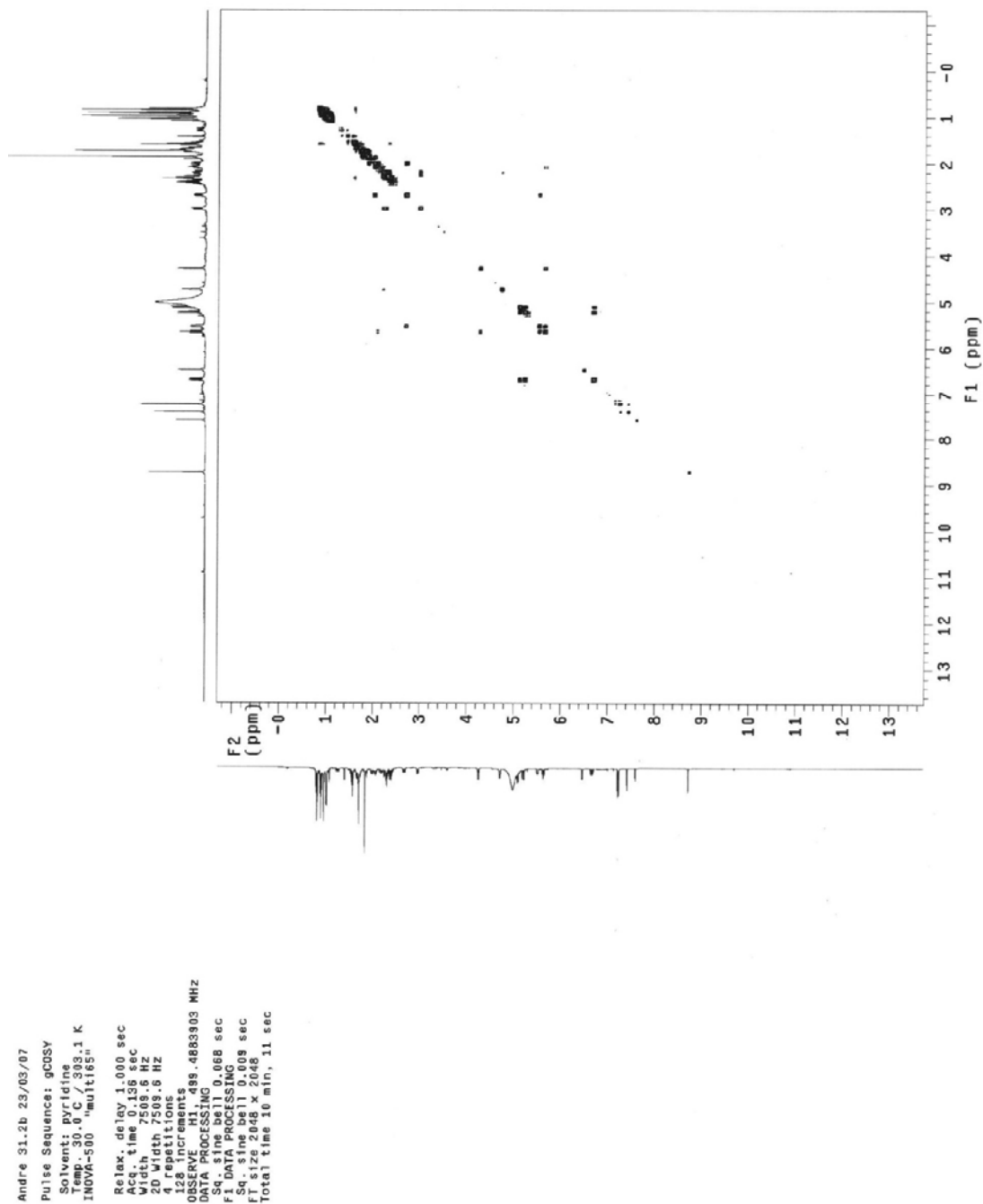


Figura: Mapa de contornos COSY da casearina D (piridina-d5, 11,7 T).

ANEXO 87

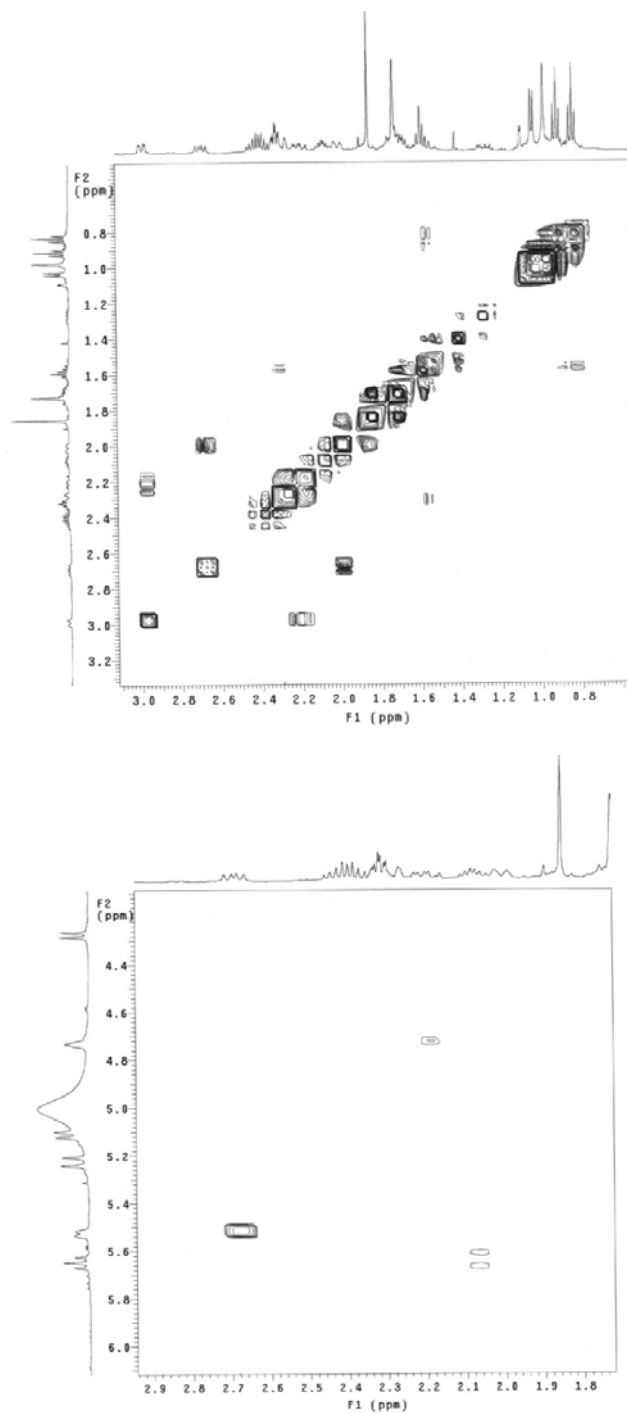


Figura: Expansões do mapa de contornos COSY da casearina D (piridina- d_5 , 11,7 T).

ANEXO 88

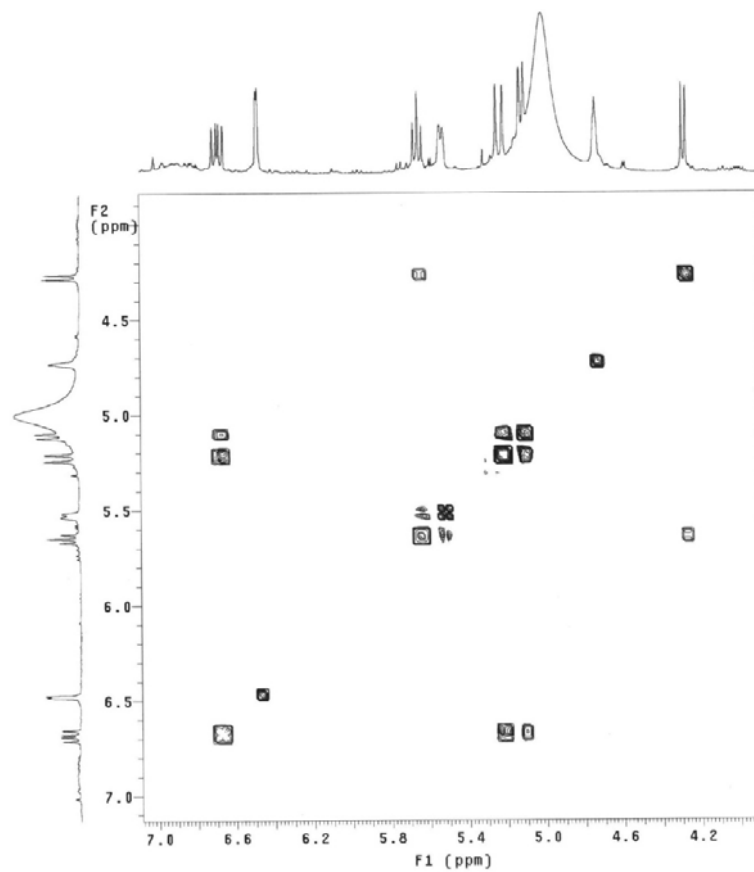


Figura: Expansão do mapa de contornos COSY da casearina D (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 89

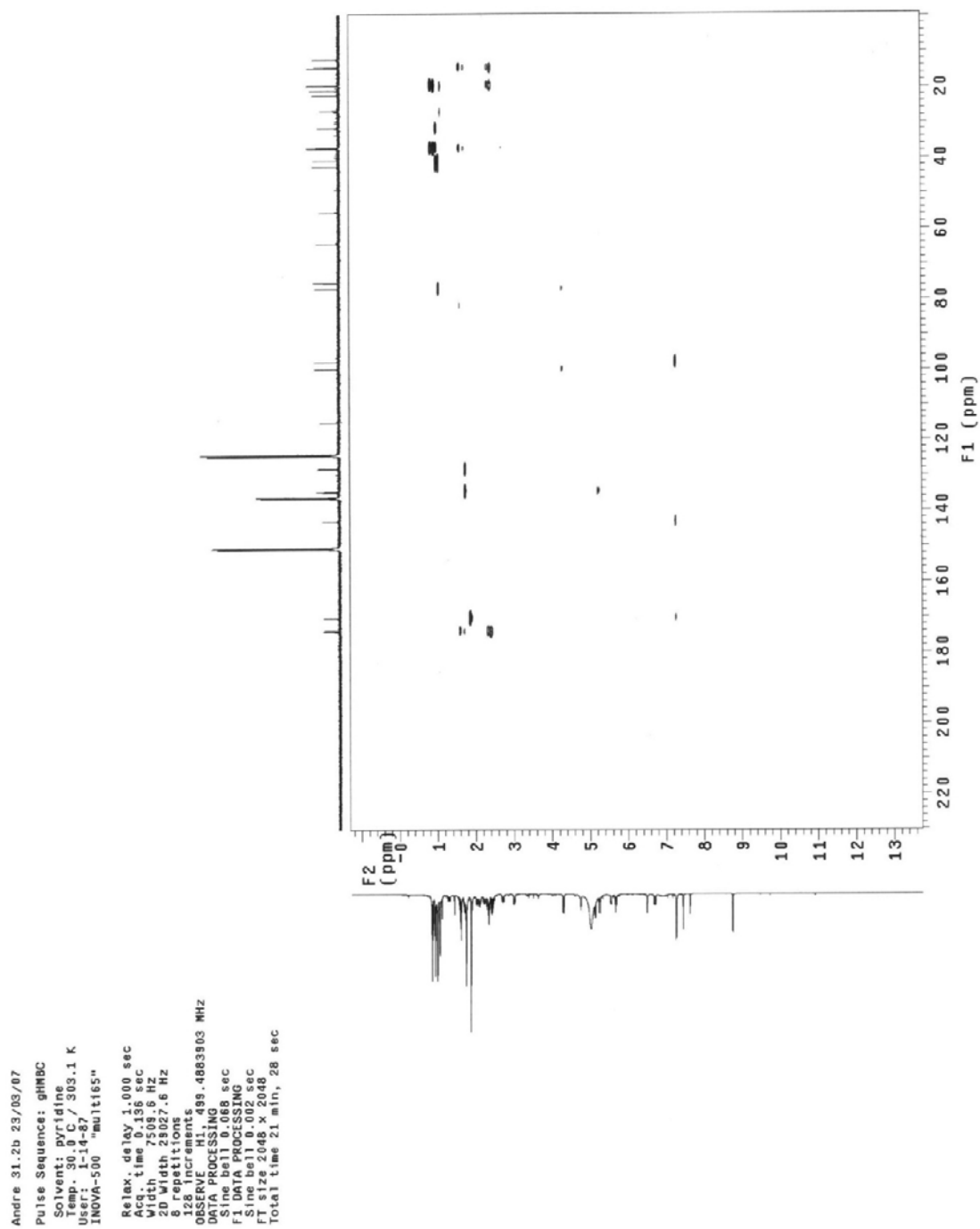


Figura: Mapa de contornos HMBC da casearina D (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 90

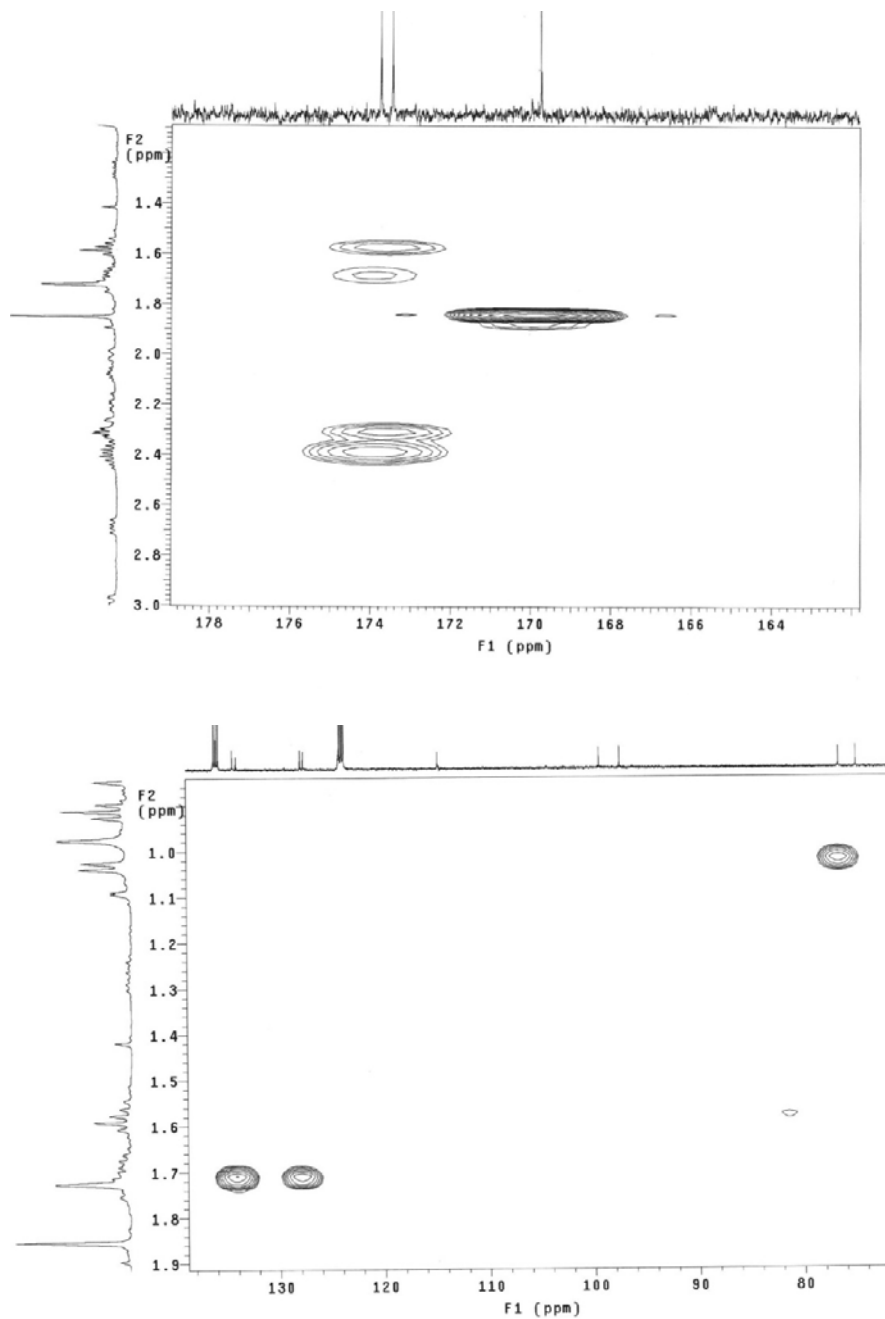


Figura: Expansões do mapa de contornos HMBC da casearina D (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 91

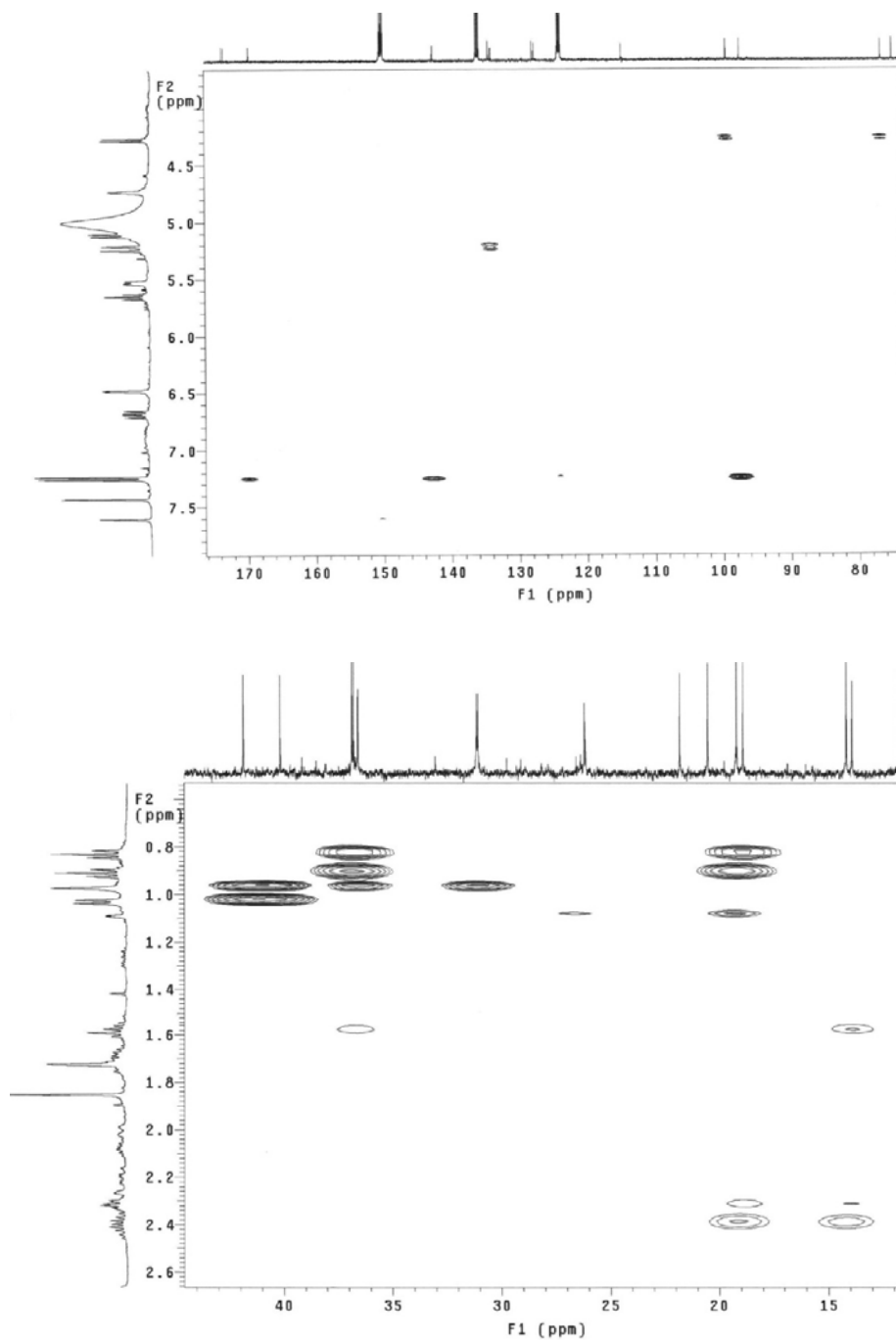
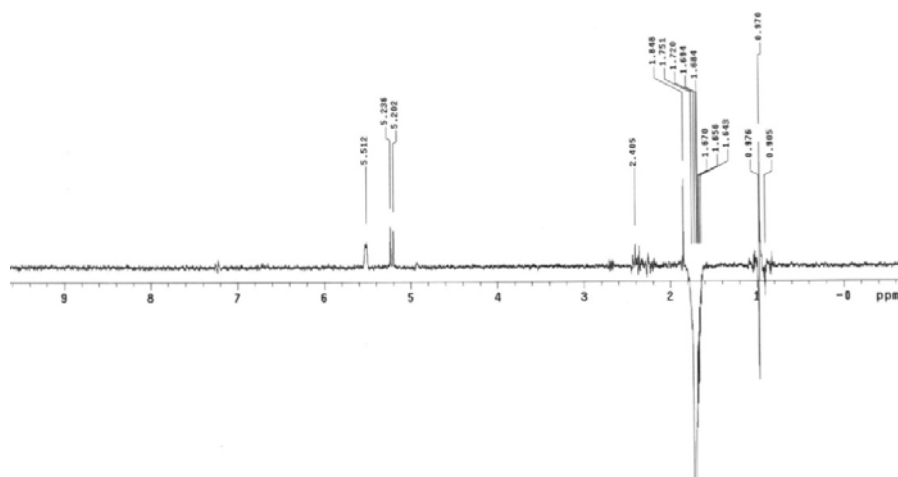


Figura: Expansões do mapa de contornos HMBC da casearina D (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 92

Andre 31.2b 18/04/07
 Pulse Sequence: NOESY1D
 Solvent: pyridine
 Temp. 30.0 C / 303.1 K
 INOVA-500 "multis5"
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Mixing 0.800 sec
 Acq. time 4.094 sec
 Width 5182.7 Hz
 32 repetitions
 OBSERVE H1, 499.480351 MHz
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 3 min, 32 sec



Andre 31.2b 18/04/07
 Pulse Sequence: NOESY1D
 Solvent: pyridine
 Temp. 30.0 C / 303.1 K
 INOVA-500 "multis5"
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Mixing 0.800 sec
 Acq. time 4.094 sec
 Width 5182.7 Hz
 32 repetitions
 OBSERVE H1, 499.480351 MHz
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 3 min, 24 sec

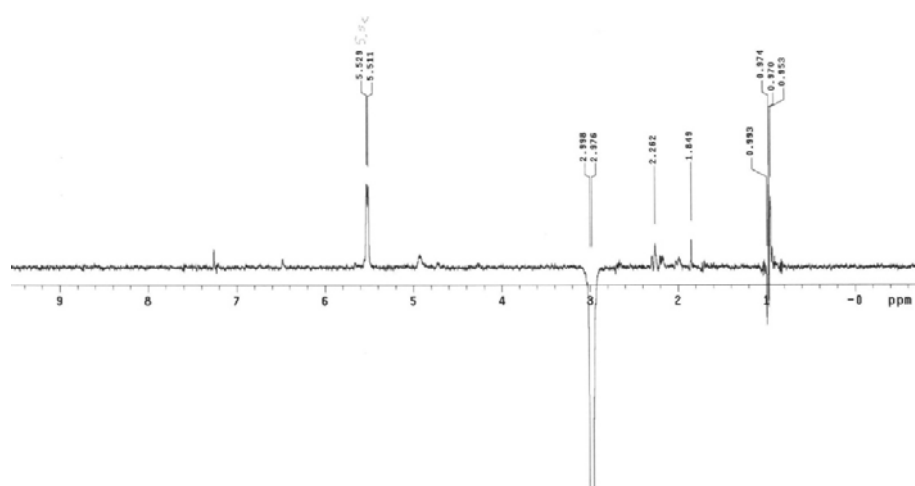


Figura: Espectros de NOESY1D da casearina D (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 93

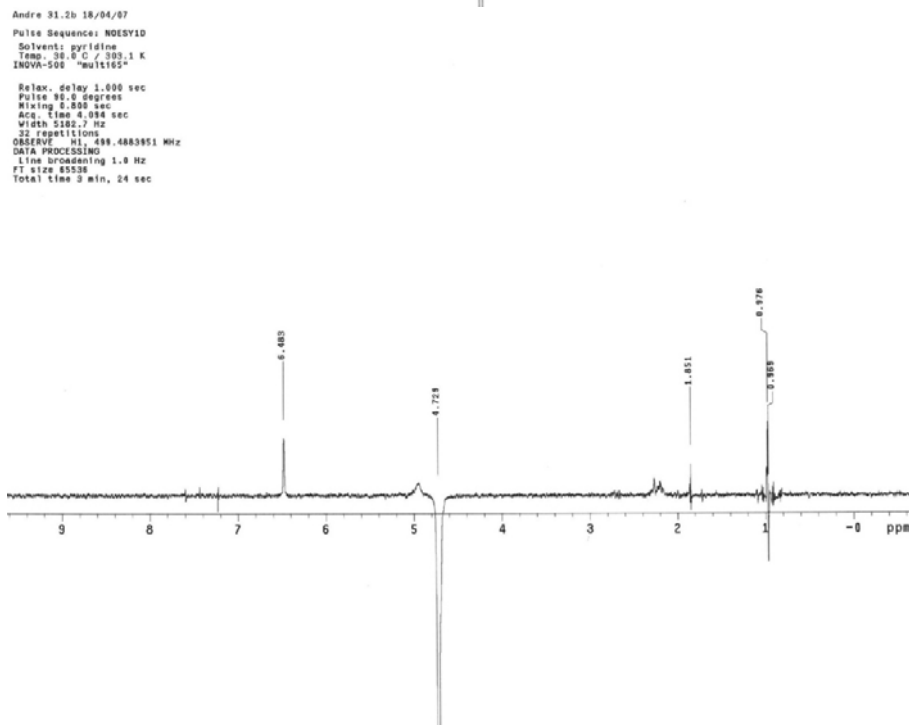
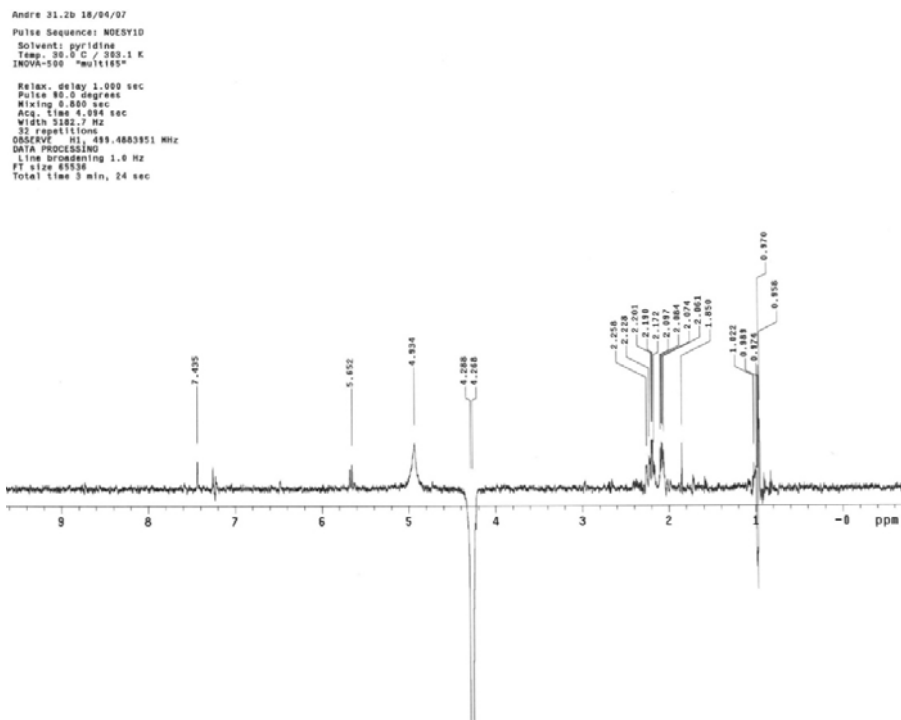


Figura: Espectros de NOESY1D da casearina D (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 94

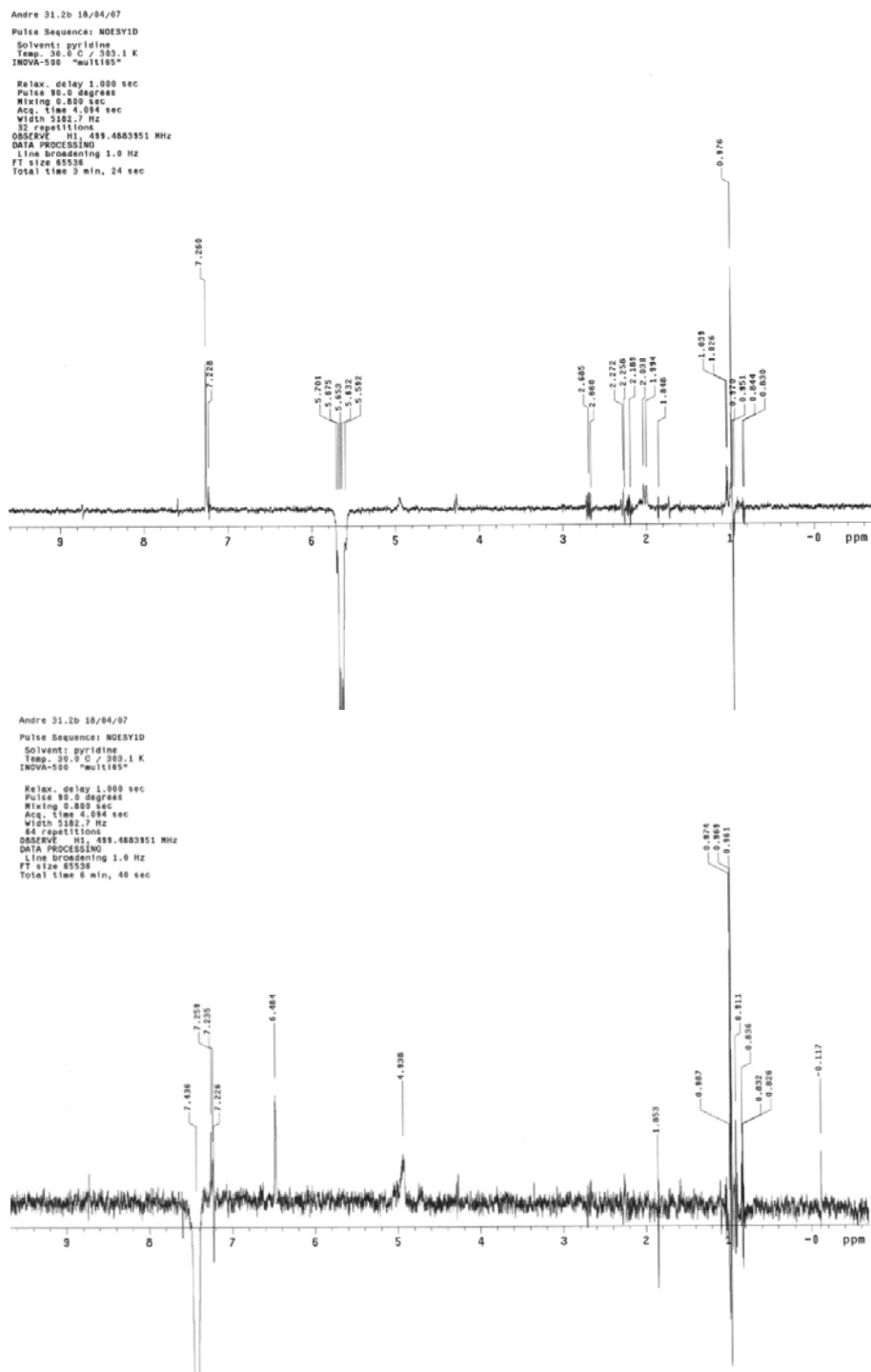


Figura: Espectros de NOESY1D da casearina D (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 95

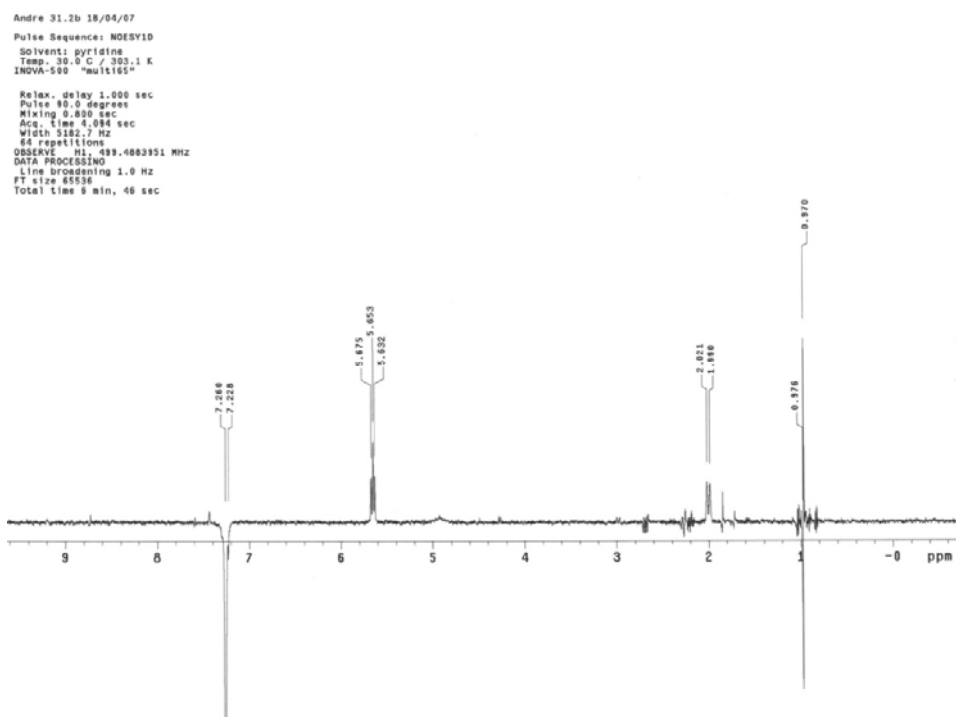


Figura: Espectro de NOESY1D da casearina D (piridina-d5, 11,7 T).

ANEXO 96

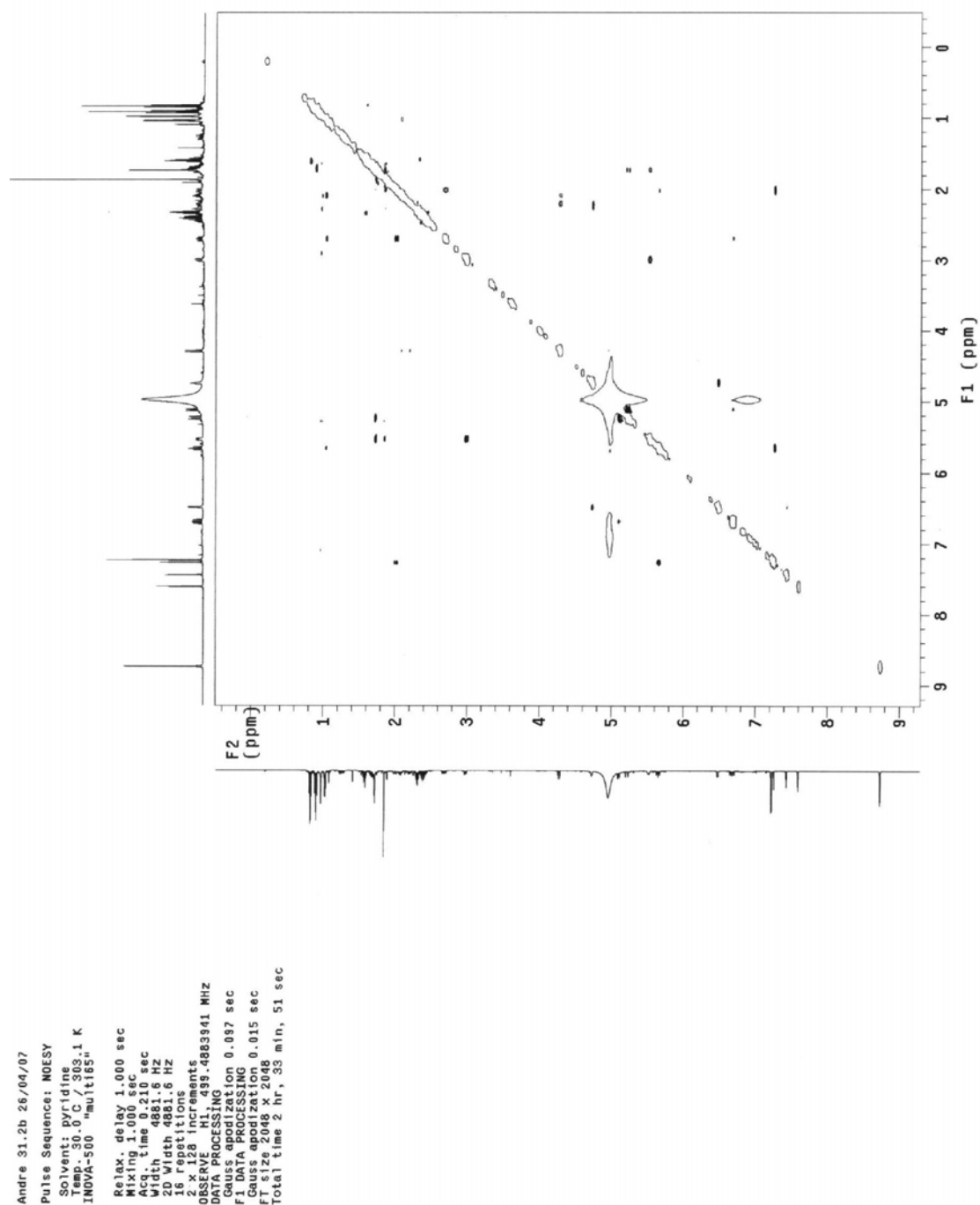


Figura: Mapa de contornos NOESY2D da casearina D (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 97

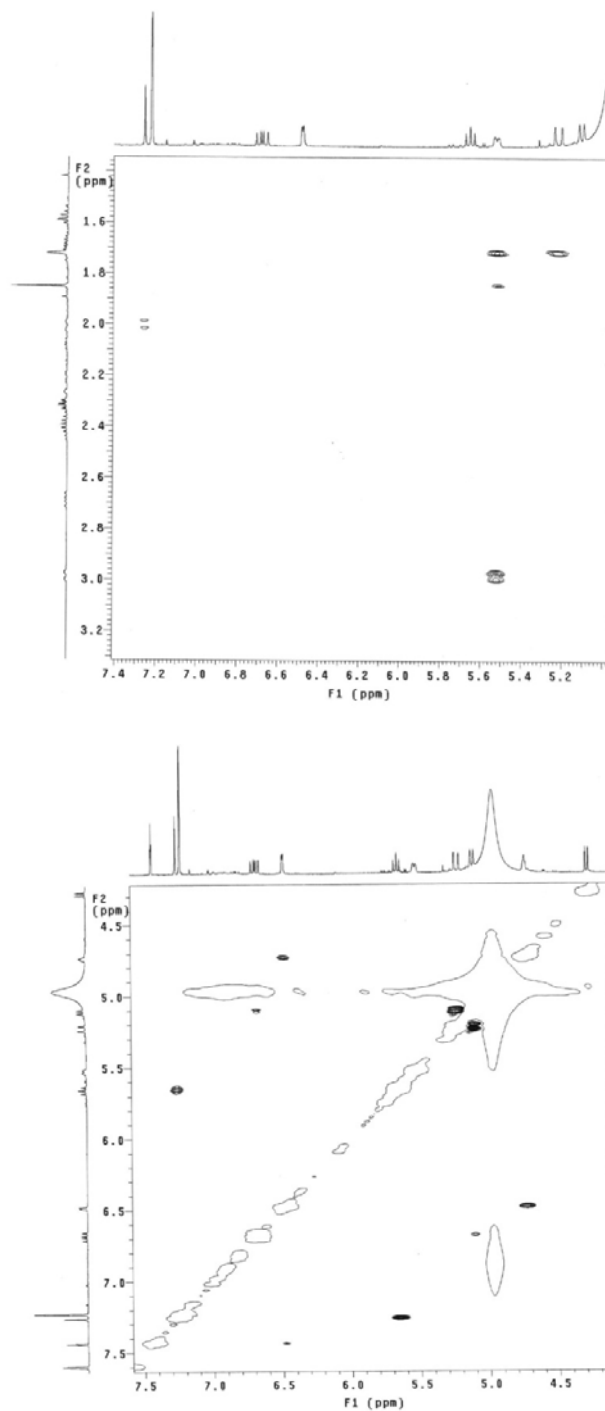


Figura: Expansões do mapa de contornos NOESY2D da casearina D (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 98

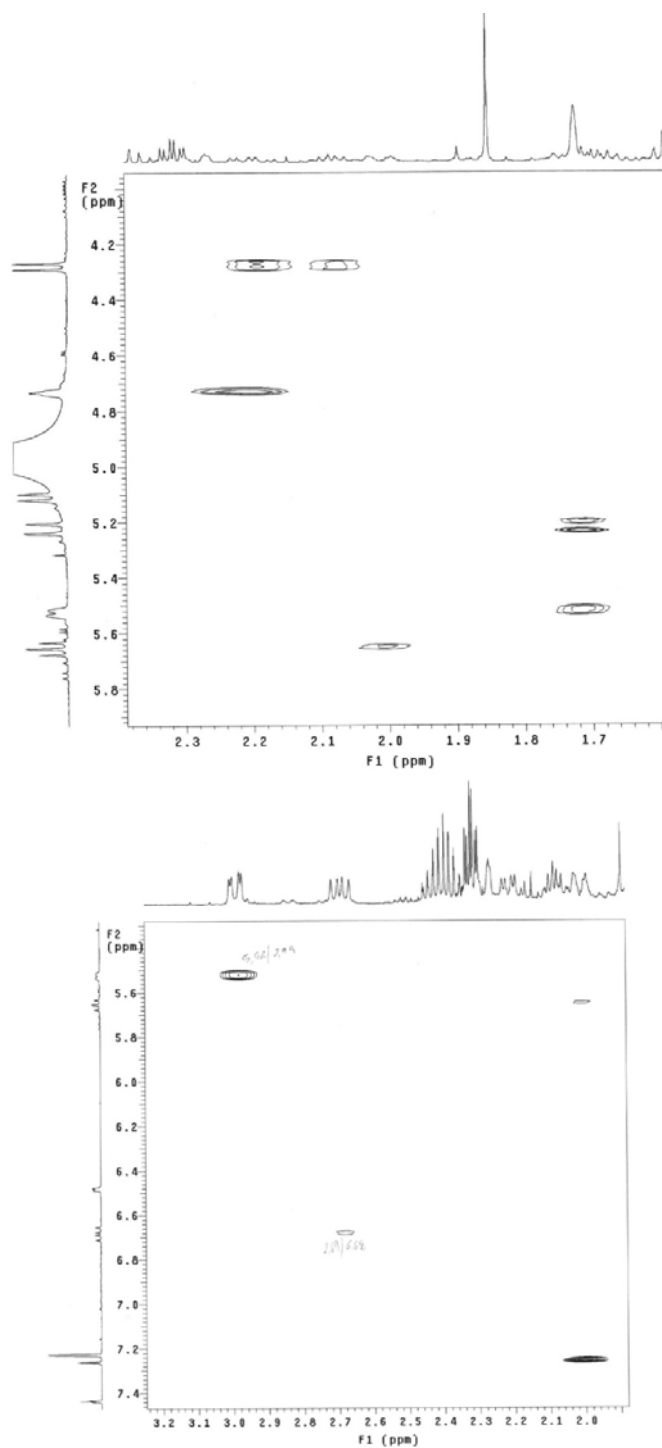


Figura: Expansões do mapa de contornos NOESY2D da casearina D (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 99

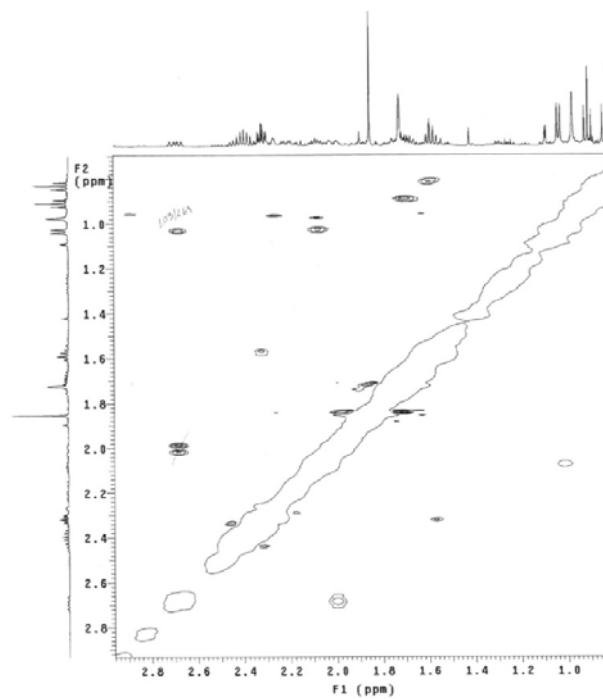


Figura: Expansão do mapa de contornos NOESY2D da casearina D (piridina-d5, 11,7 T).

ANEXO 100

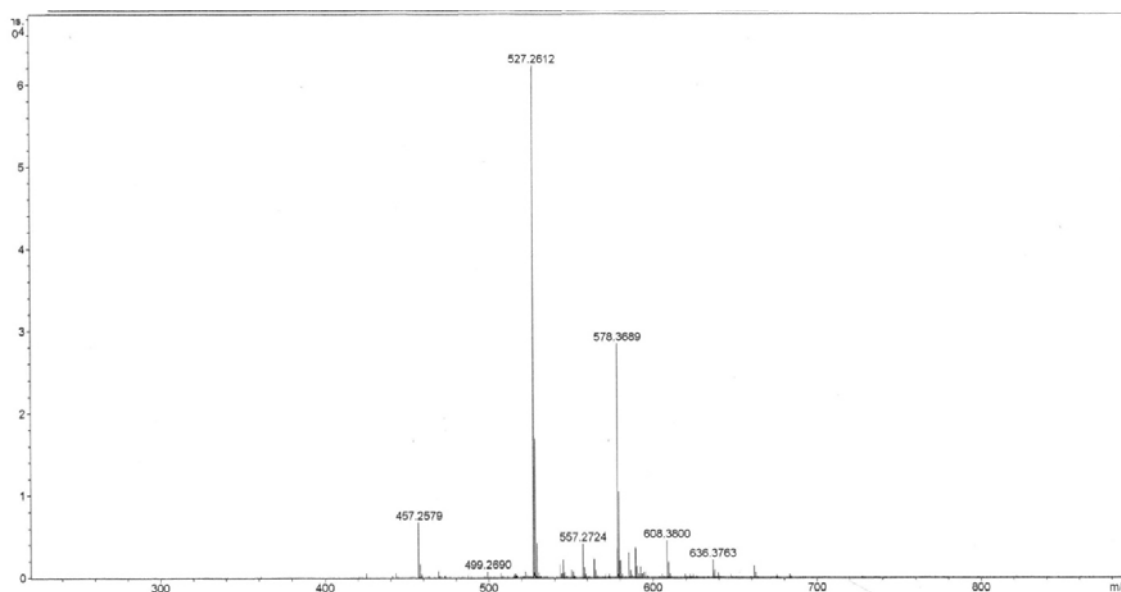


Figura A: Espectro de massas de alta resolução (HRTOF-ESIMS) da casearina H.

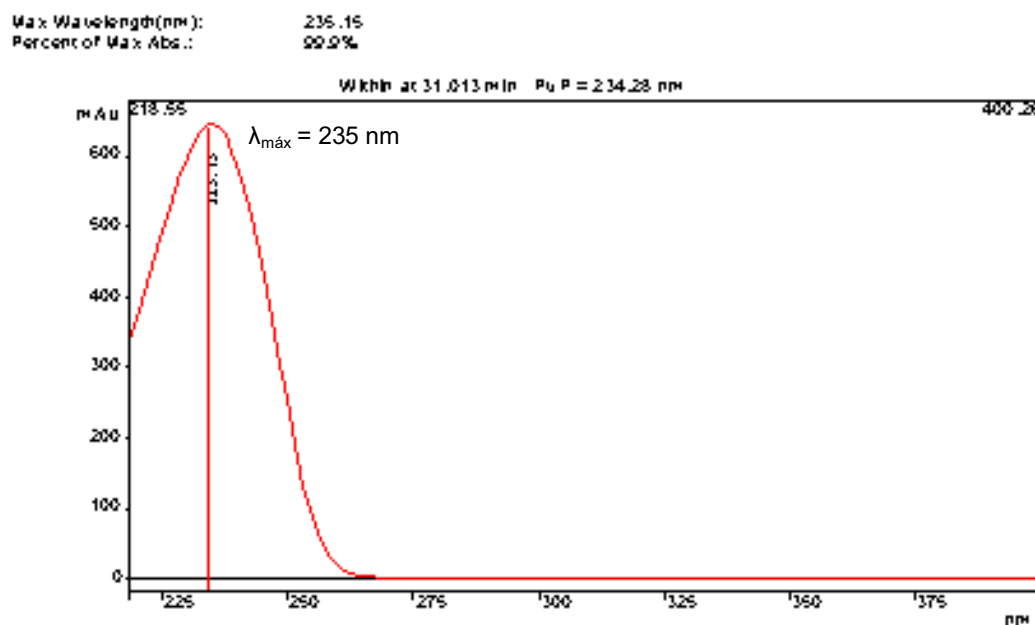


Figura B: Espectro de absorção no UV da casearina H obtido pela análise em CLAE-DAD. Condições de análise na Tabela 7.

ANEXO 101

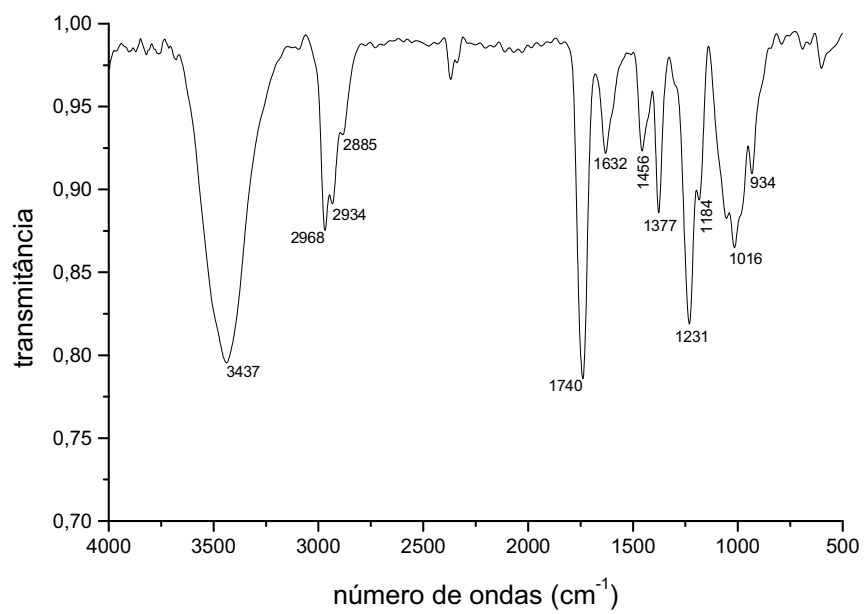


Figura: Espectro de absorção no IV da casearina H.

ANEXO 102

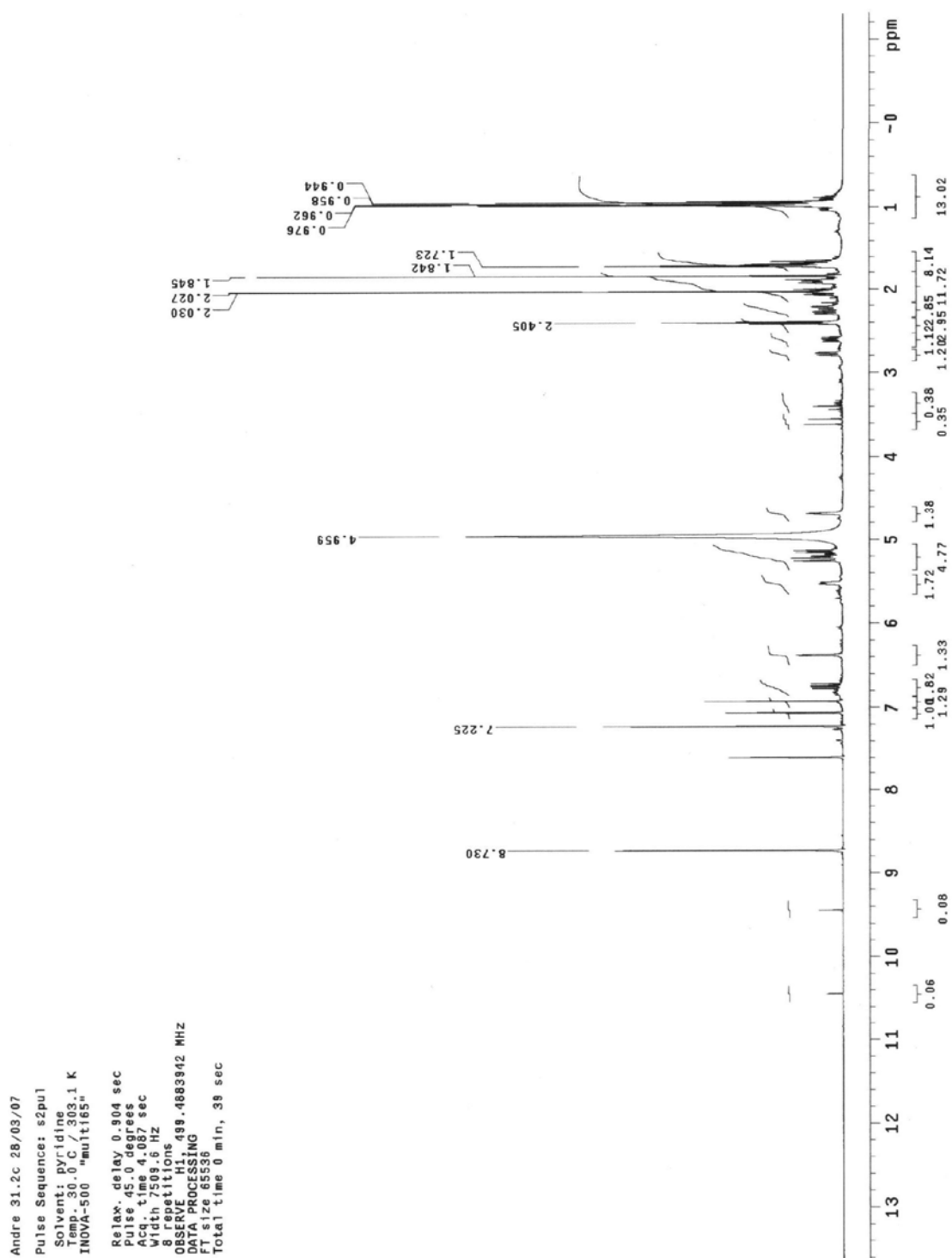


Figura: Espectro de RMN de ^1H da casearina H em piridina-d5 obtido a 500 MHz.

ANEXO 103

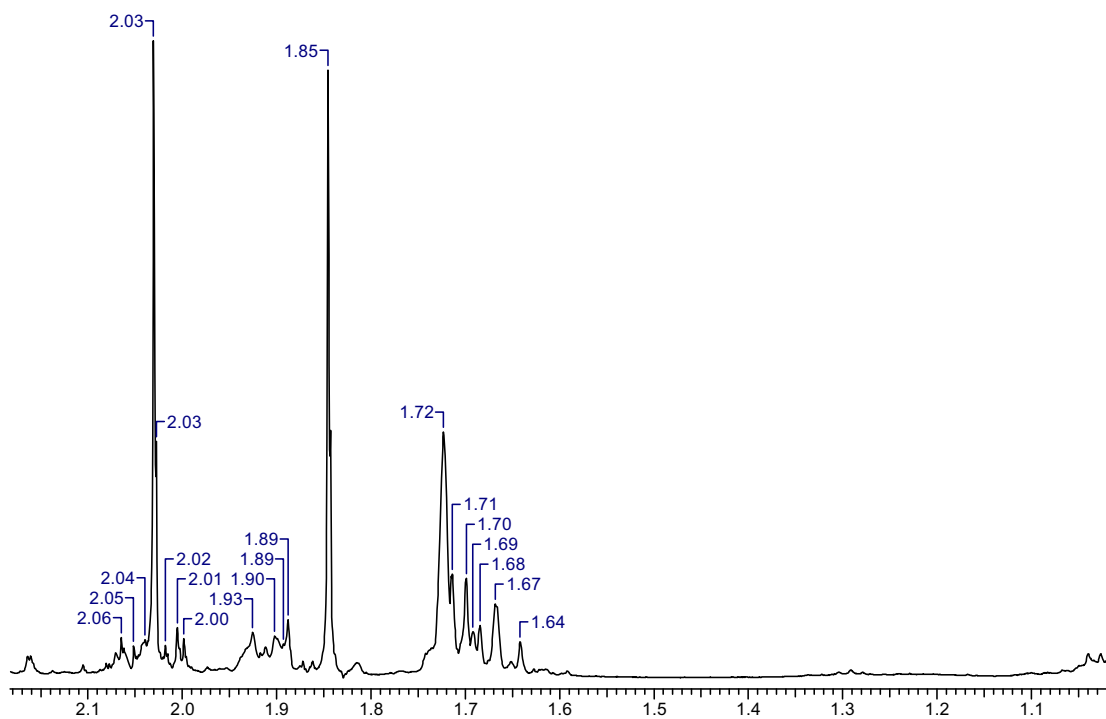
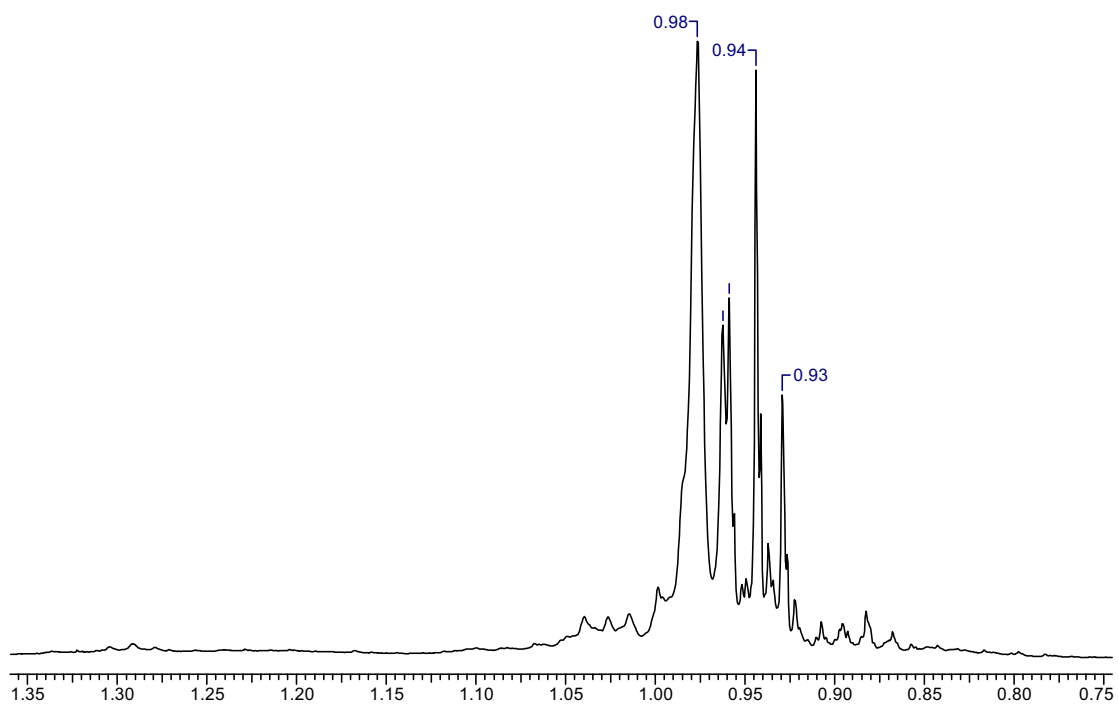


Figura: Expansões do espectro de RMN de ^1H da casearina H em piridina- d_5 obtido a 500 MHz.

ANEXO 104

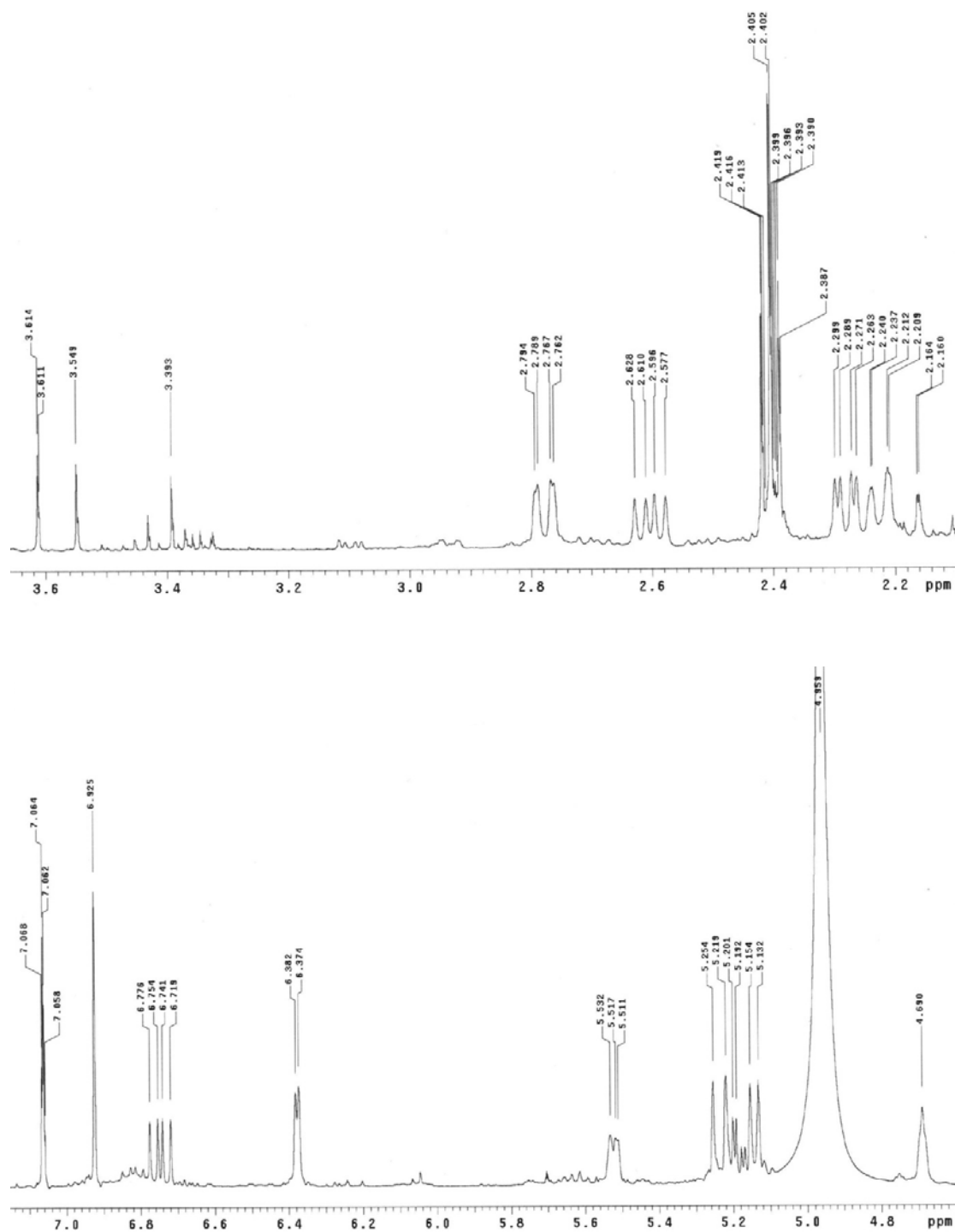


Figura: Expansões do espectro de RMN de ^1H da casearina H em piridina- d_5 obtido a 500 MHz.

ANEXO 105

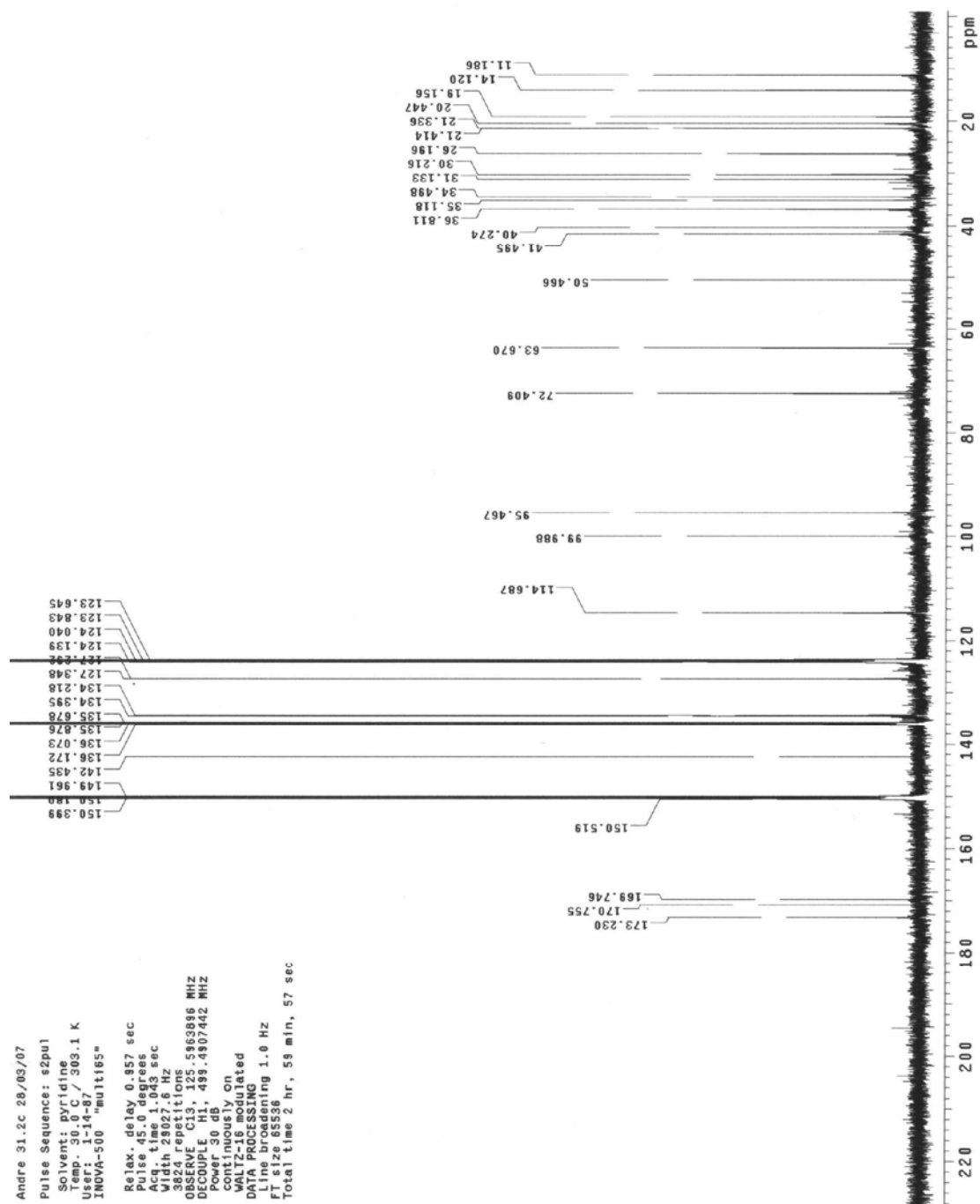


Figura: Espectro de RMN de ^{13}C da casearina H em piridina-d5 obtido a 125 MHz.

ANEXO 106

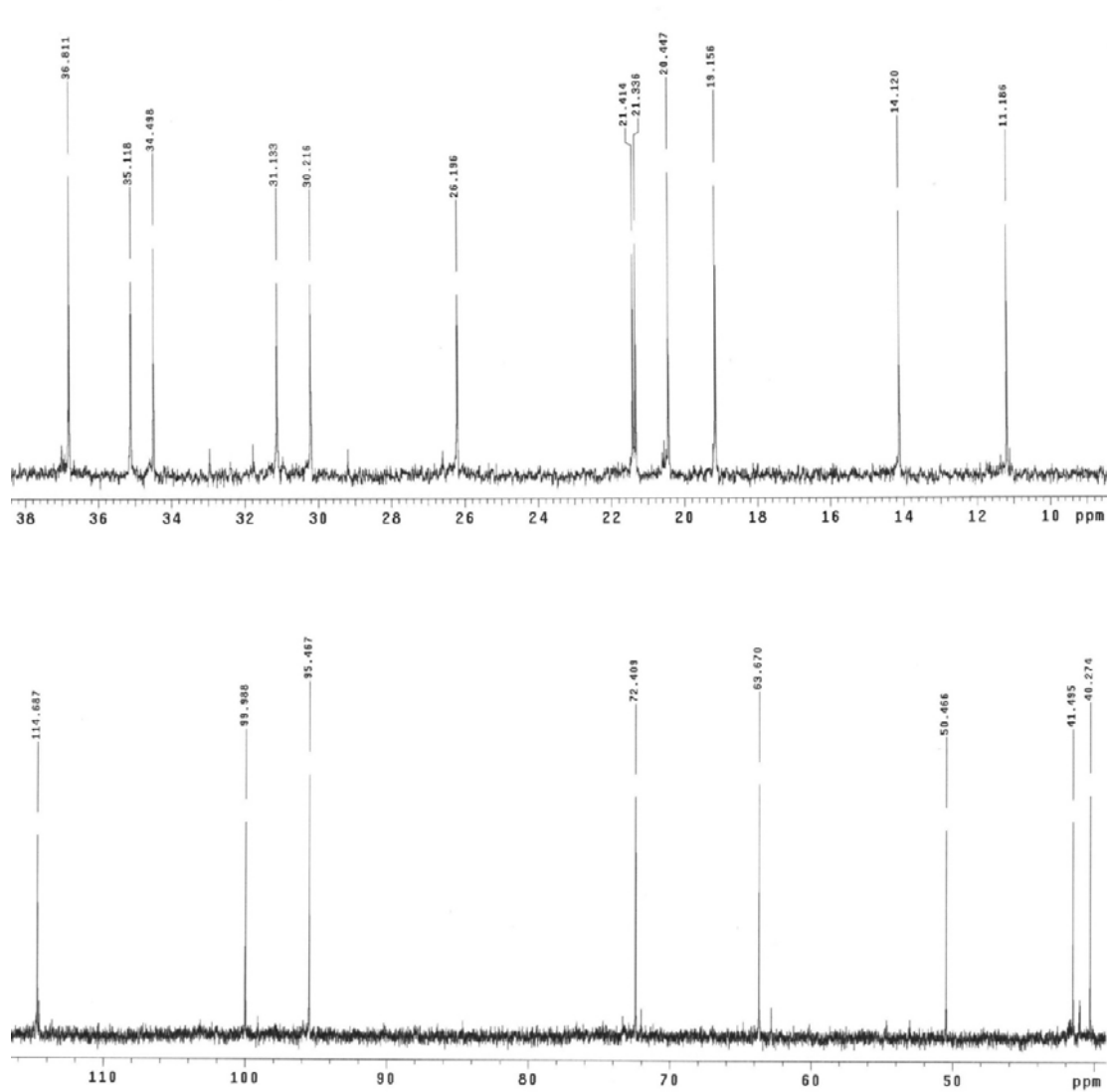


Figura: Expansões do espectro de RMN de ^{13}C da casearina H em piridina- d_5 obtido a 125 MHz.

ANEXO 107

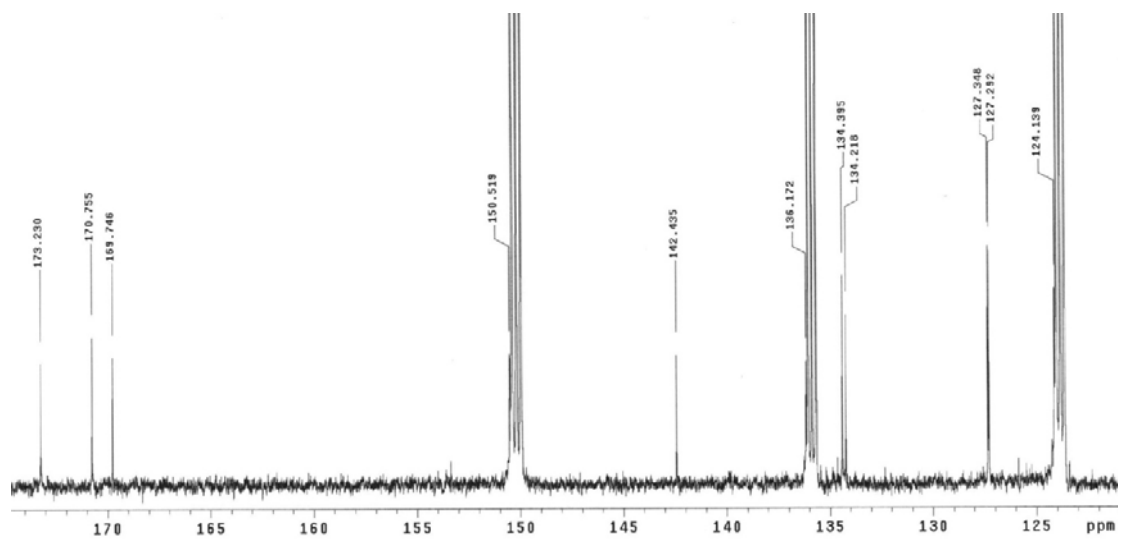


Figura: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C da casearina H em piridina-d5 obtido a 125 MHz.

ANEXO 108

Andre 31.2c 28/03/07
 Pulse Sequence: DEPT135
 Solvent: pyridine
 Temp. 30.0 C / 303.1 K
 User: 1-14-87
 INOVA-500 "multi65"

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Acq. time 1.043 sec
 Width 29027.6 Hz
 400 repetitions
 OBSERVE C13, 125.5163896 MHz
 DECOUPLE H1, 499.4907442 MHz
 Power 30 dB
 on during acquisition
 off during delay
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 27 min, 49 sec

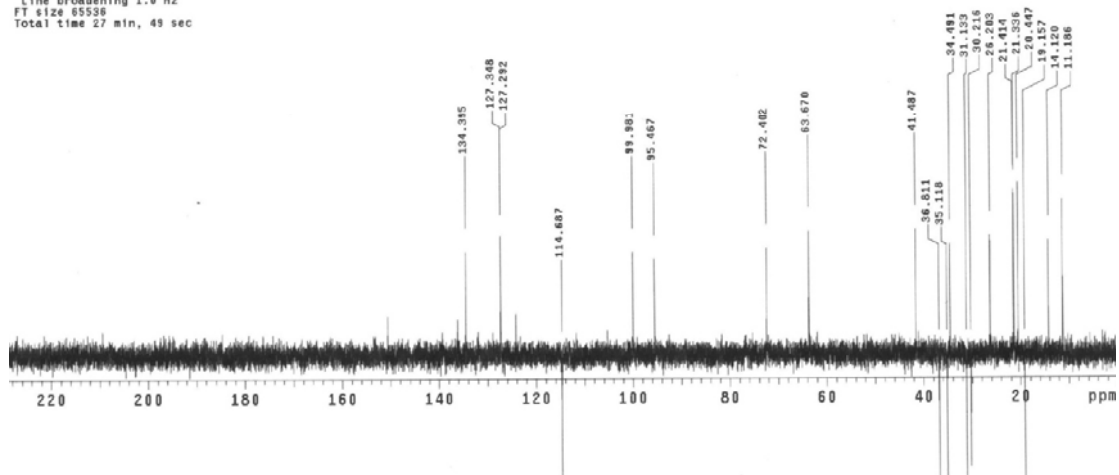


Figura A: Espectro de DEPT135^o da casearina H em piridina-d5 obtido a 125 MHz.

Andre 31.2c 28/03/07
 Pulse Sequence: DEPT90
 Solvent: pyridine
 Temp. 30.0 C / 303.1 K
 User: 1-14-87
 INOVA-500 "multi65"

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Acq. time 1.043 sec
 Width 29027.6 Hz
 400 repetitions
 OBSERVE C13, 125.5163896 MHz
 DECOUPLE H1, 499.4907442 MHz
 Power 30 dB
 on during acquisition
 off during delay
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 27 min, 49 sec

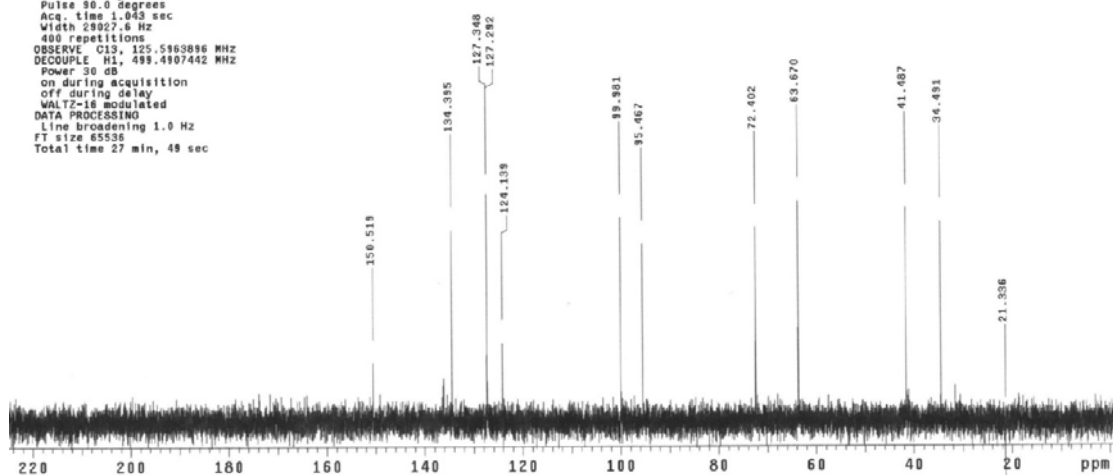


Figura B: Espectro de DEPT90^o da casearina H em piridina-d5 obtido a 125 MHz.

ANEXO 109

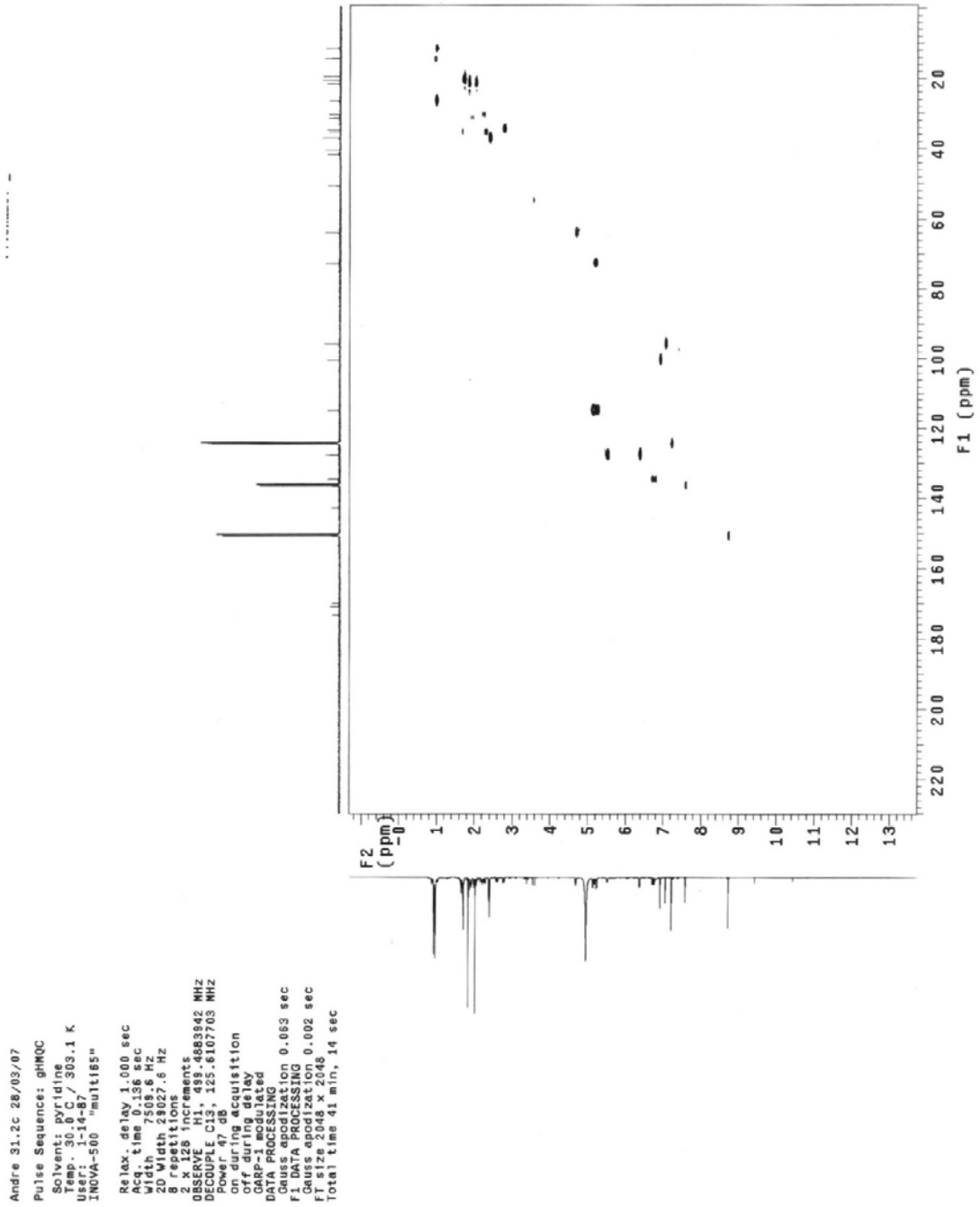


Figura: Mapa de contornos HMQC da casearina H (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 110

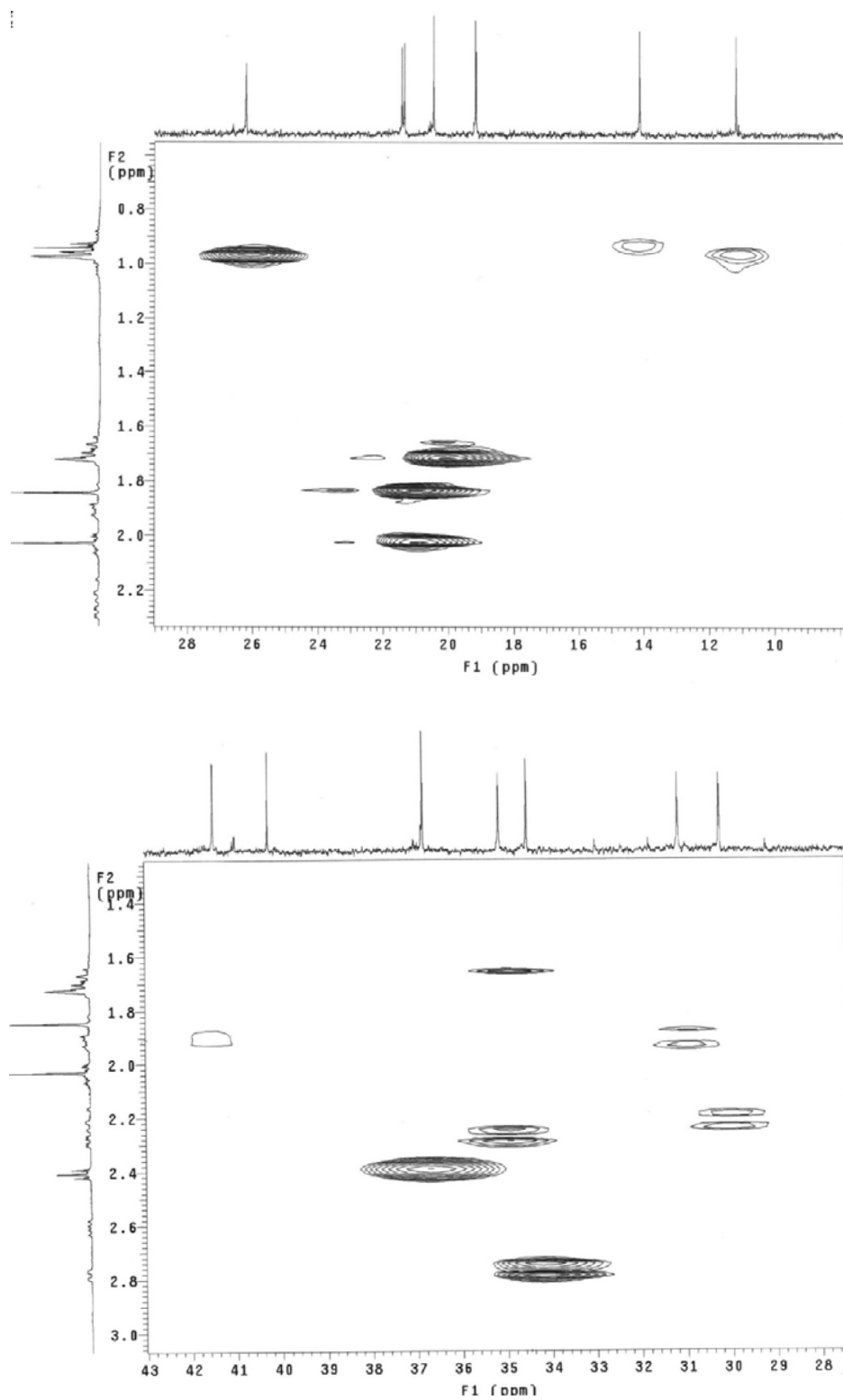


Figura: Expansões do mapa de contornos HMQC da casearina H (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 111

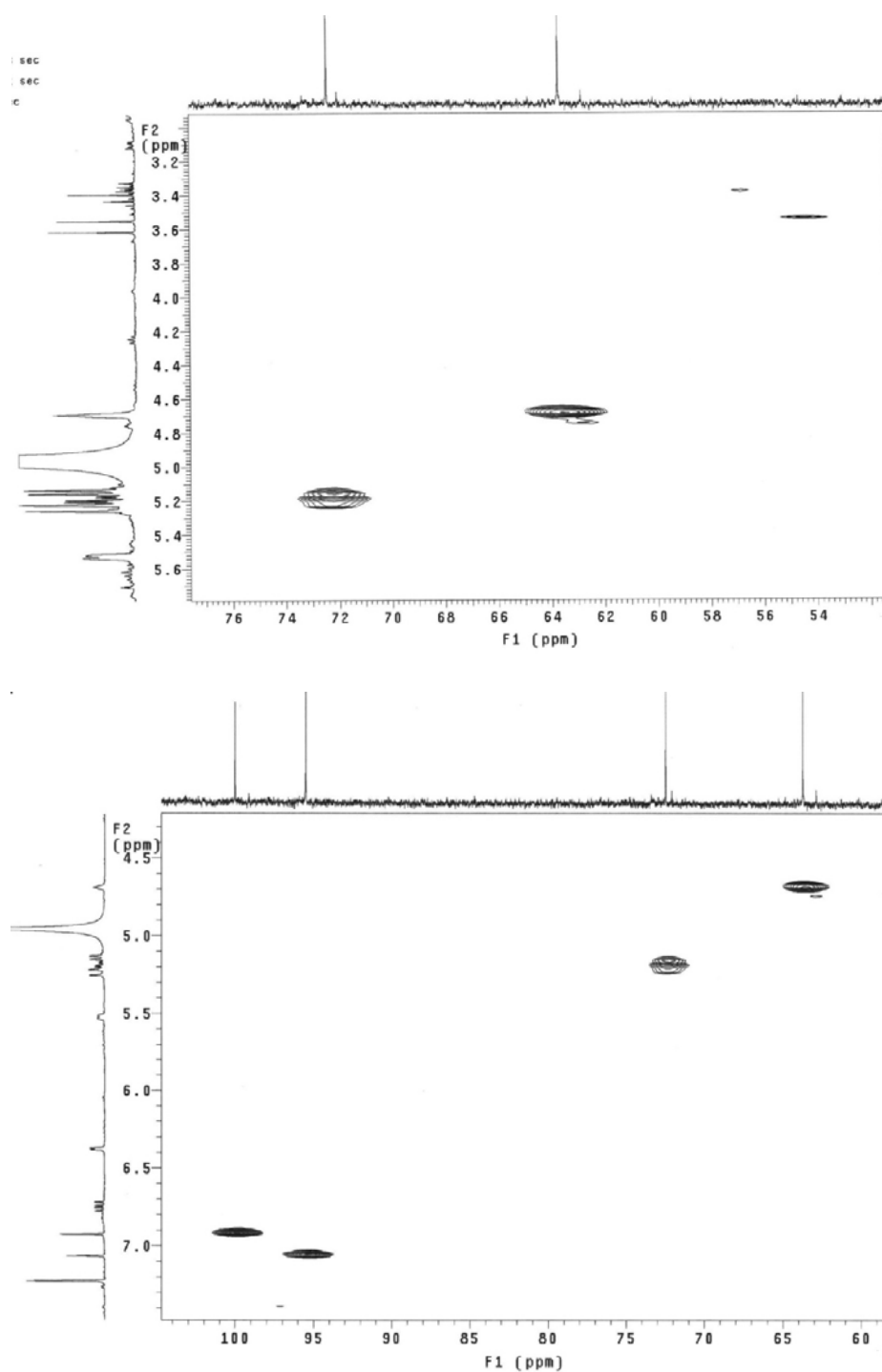


Figura: Expansões do mapa de contornos HMQC da casearina H (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 112

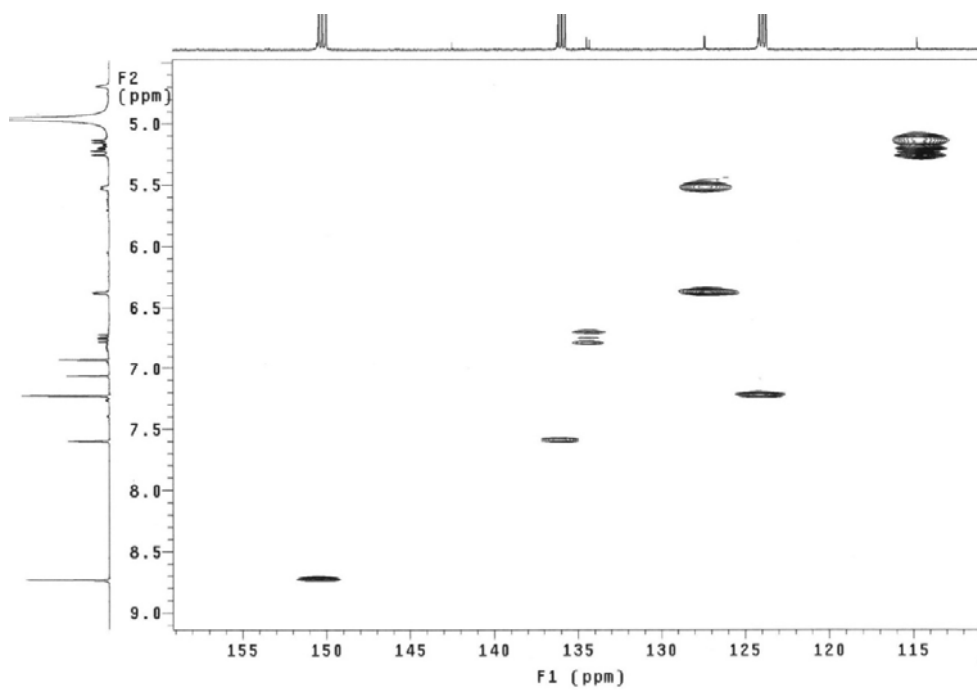


Figura: Expansão do mapa de contornos HMQC da casearina H (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 113

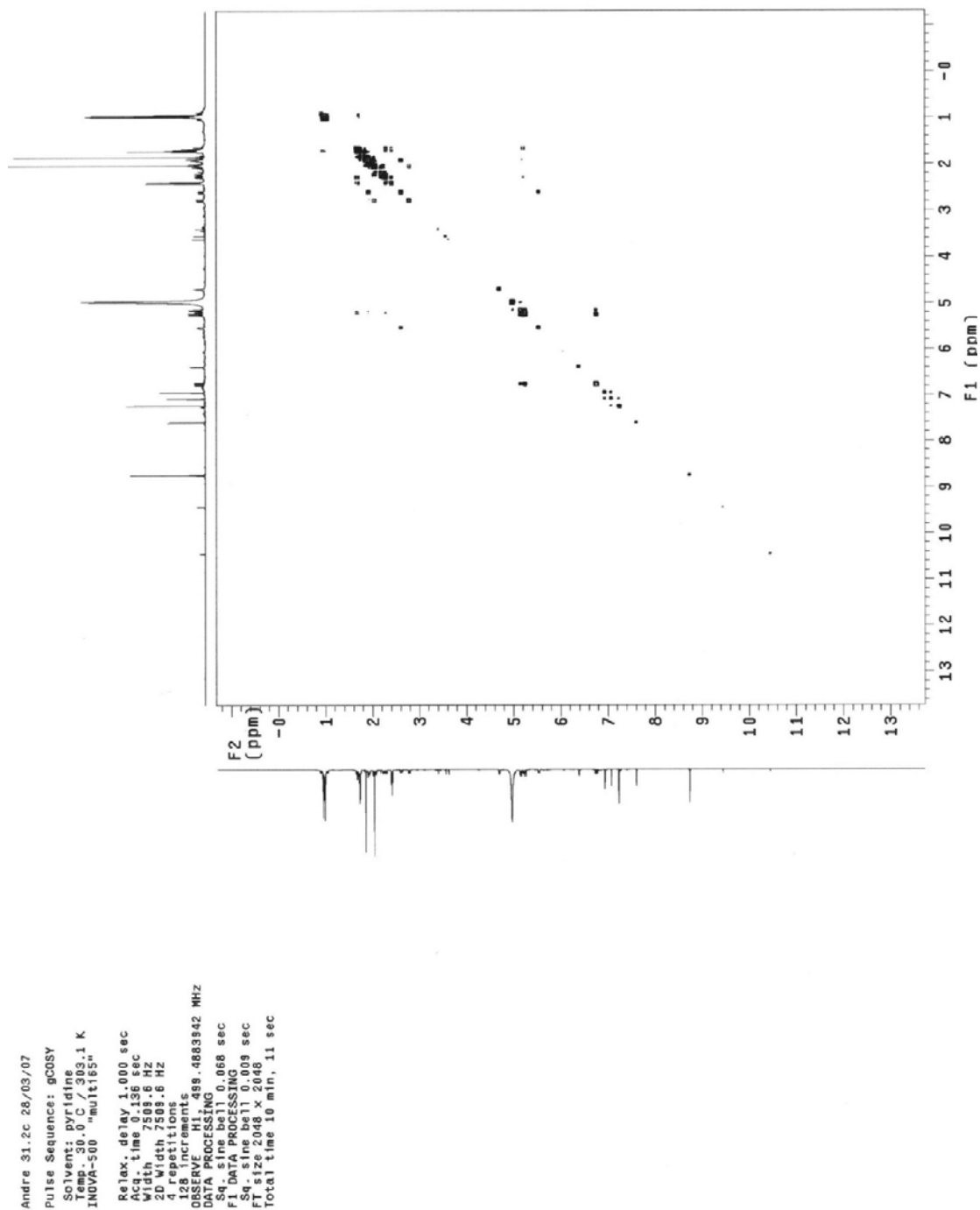


Figura: Mapa de contornos COSY da casearina H (piridina-d5, 11,7 T).

ANEXO 114

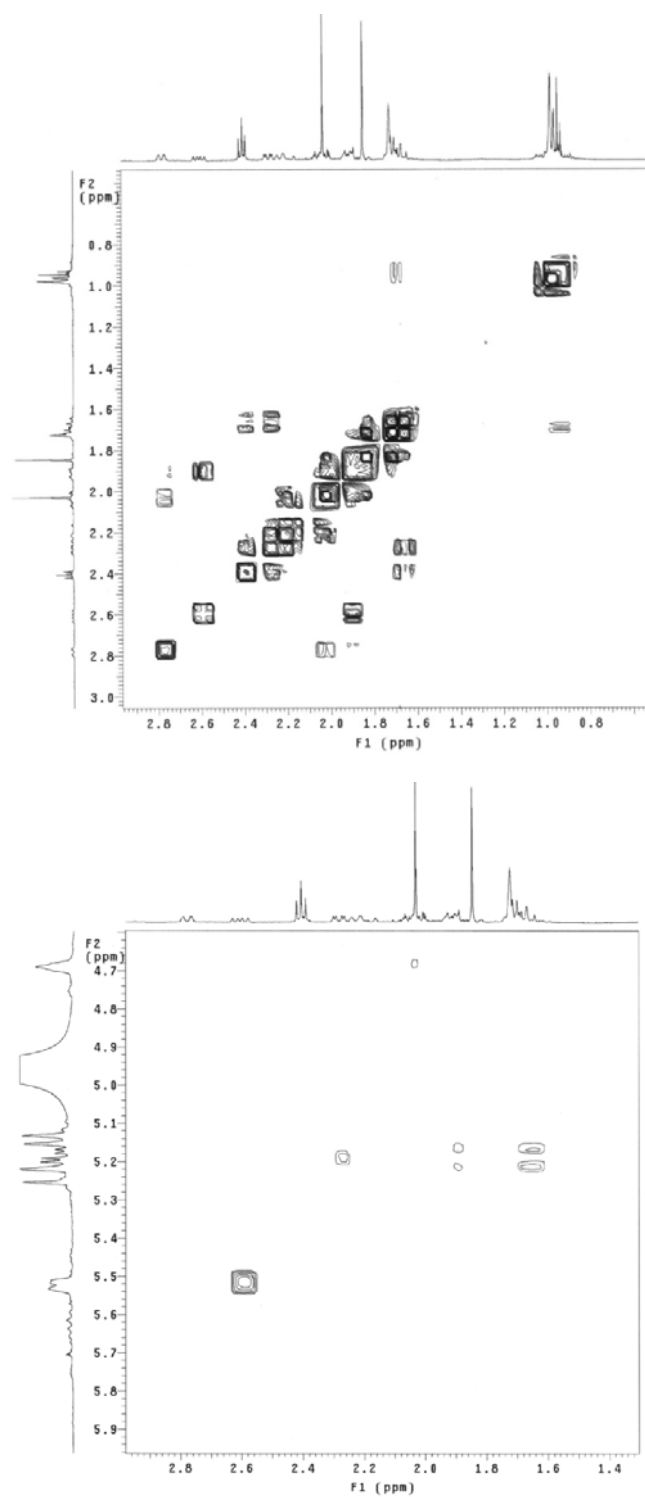


Figura: Expansões do mapa de contornos COSY da casearina H (piridina- d_5 , 11,7 T).

ANEXO 115

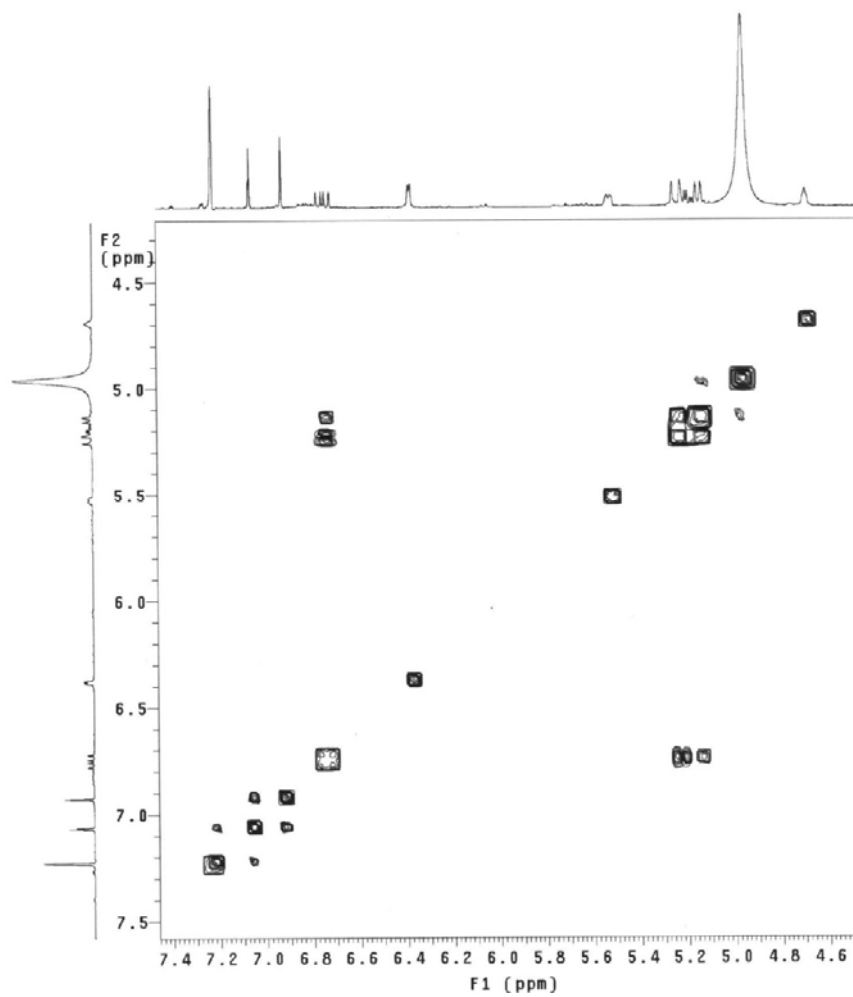


Figura: Expansão do mapa de contornos COSY da casearina H (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 116

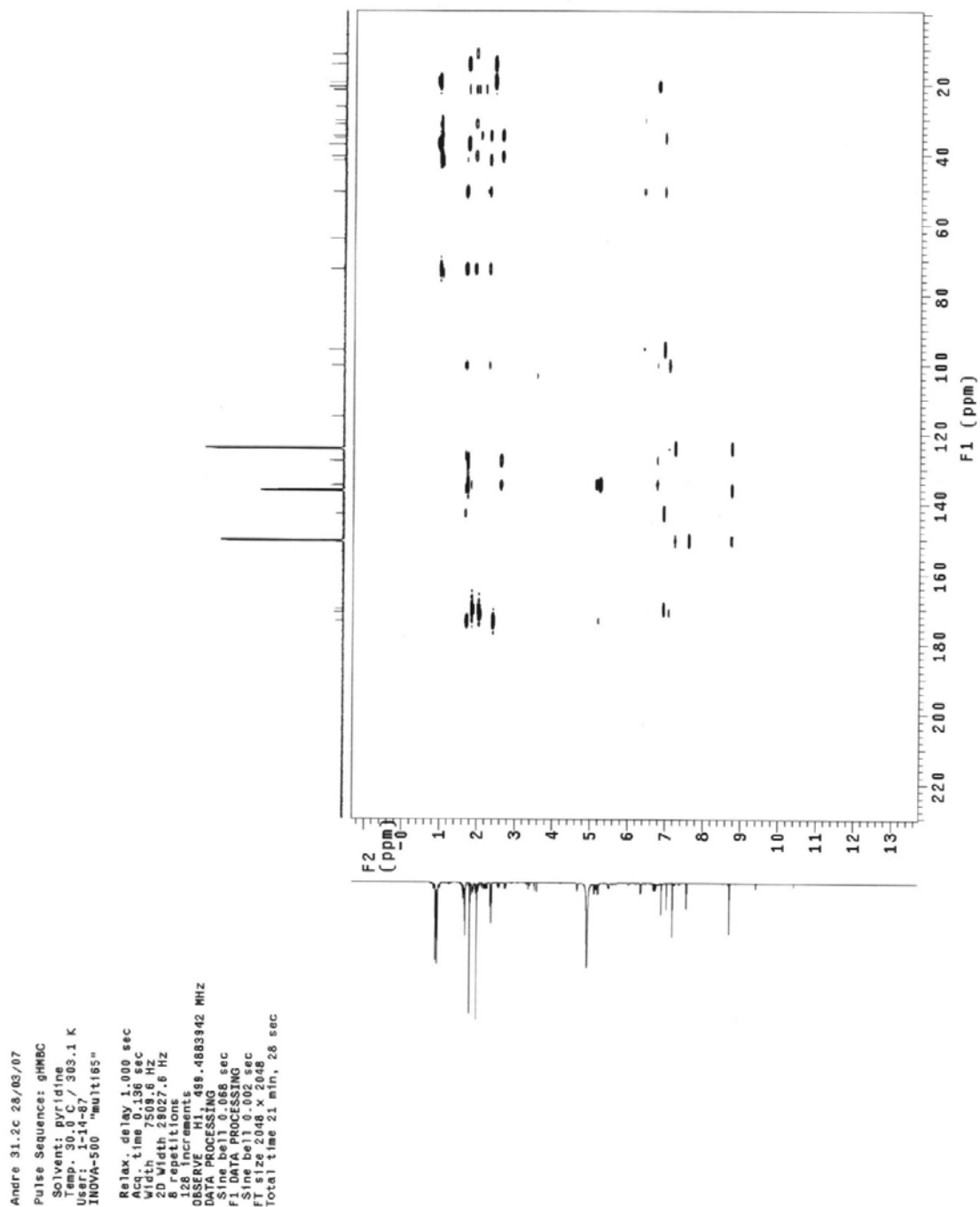


Figura: Mapa de contornos HMBC da casearina H (piridina-d5, 11,7 T).

ANEXO 117

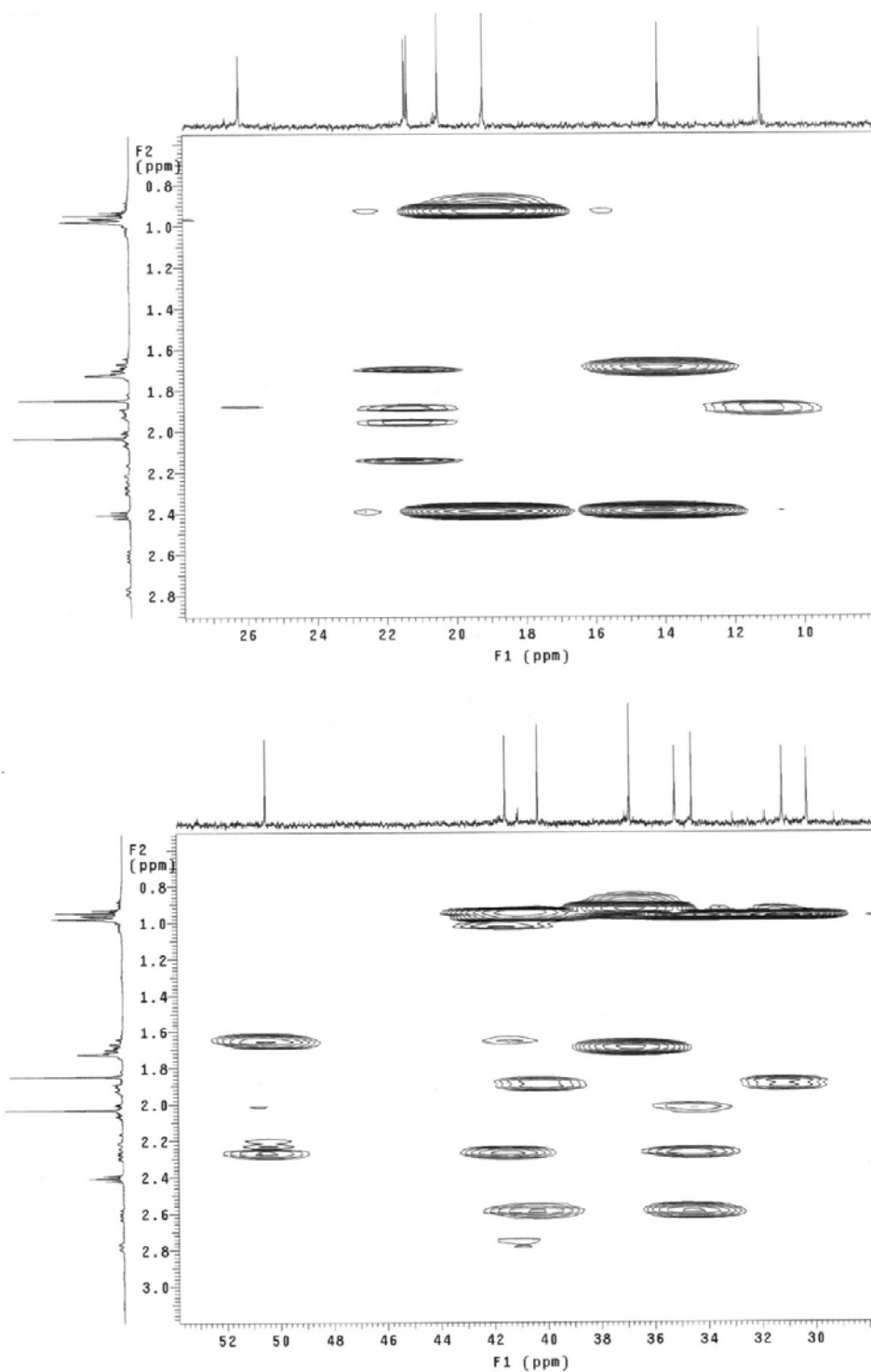


Figura: Expansões do mapa de contornos HMBC da casearina H (piridina- d_5 , 11,7 T).

ANEXO 118

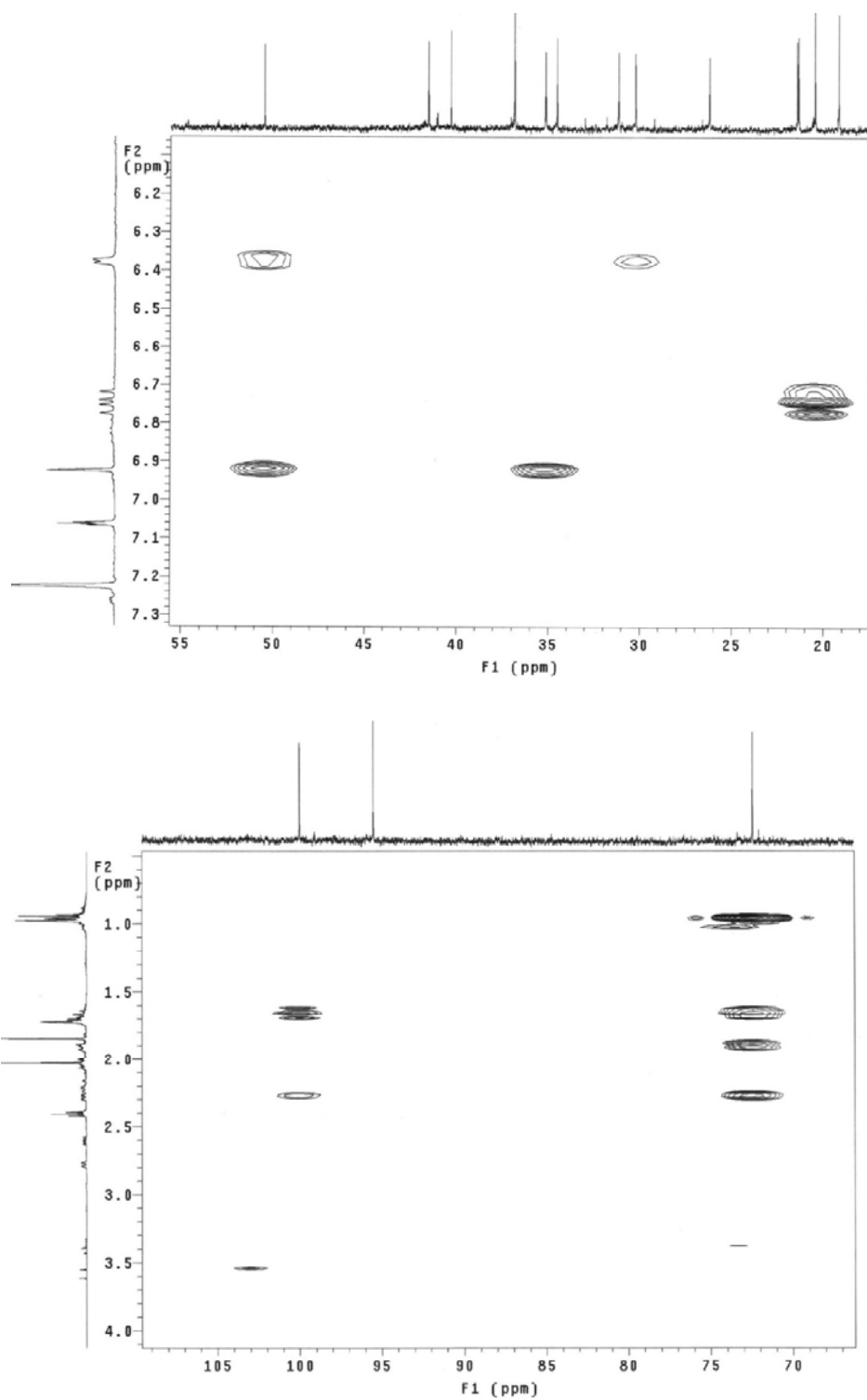


Figura: Expansões do mapa de contornos HMBC da casearina H (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 119

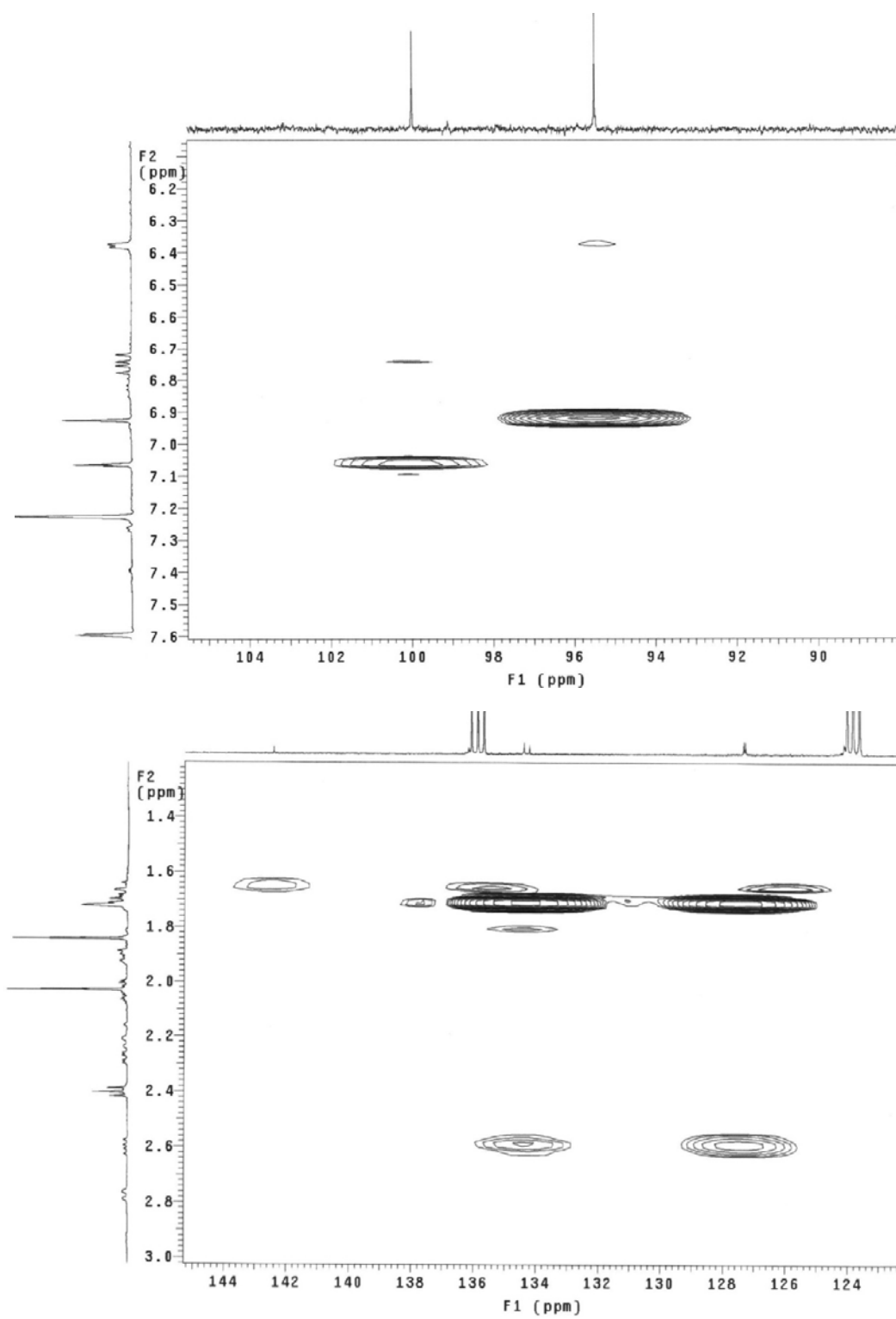


Figura: Expansões do mapa de contornos HMBC da casearina H (piridina- d_5 , 11,7 T).

ANEXO 120

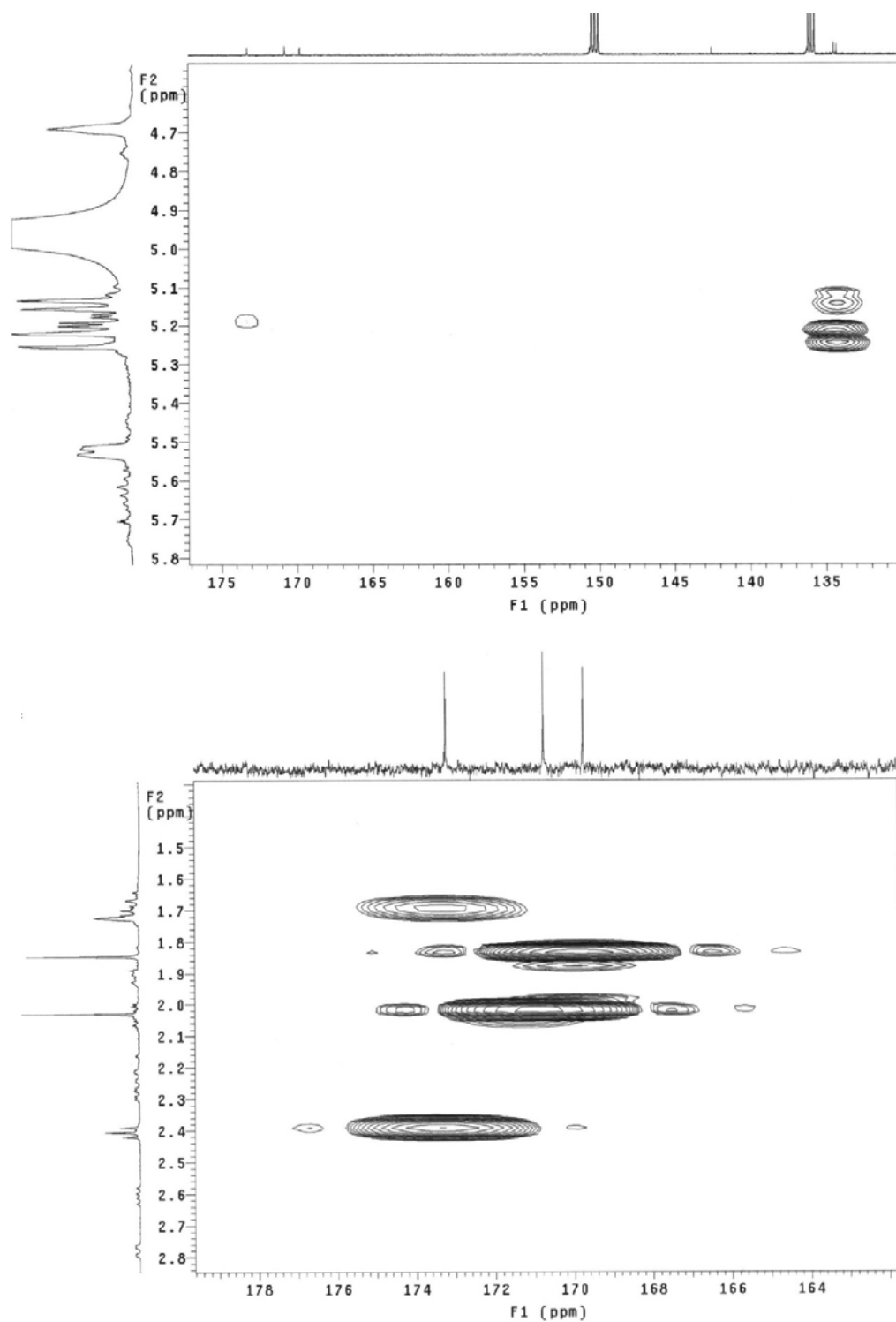


Figura: Expansões do mapa de contornos HMBC da casearina H (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 121

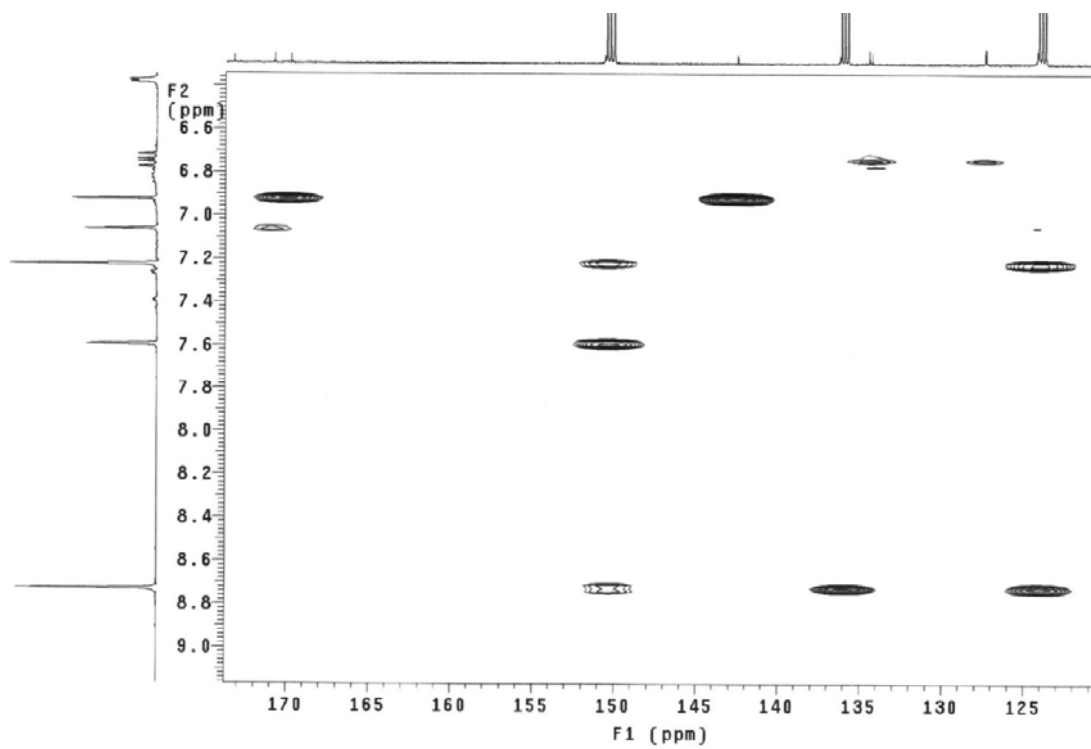


Figura: Expansão do mapa de contornos HMBC da casearina H (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 122

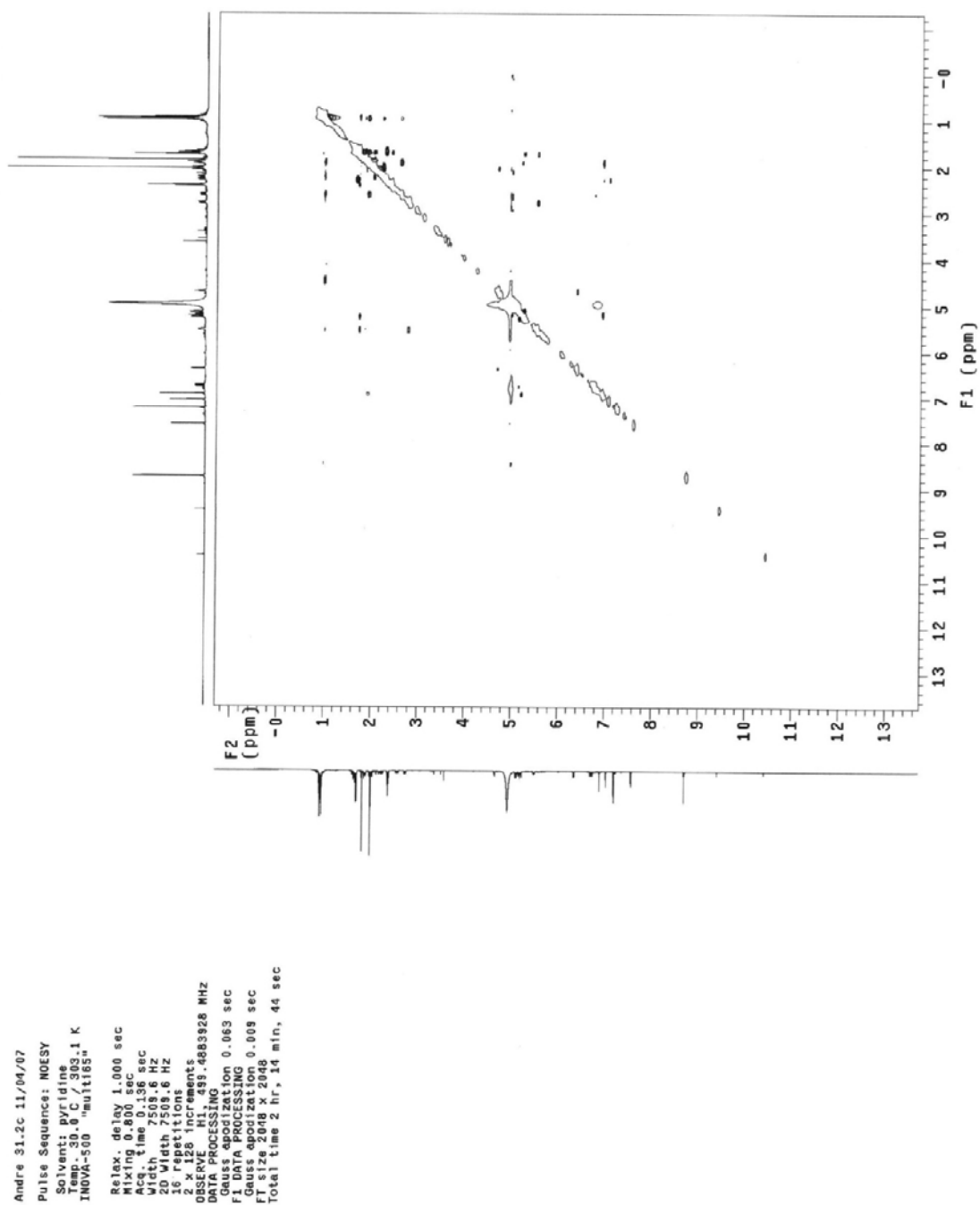


Figura: Mapa de contornos NOESY2D da casearina H (piridina-d5, 11,7 T).

ANEXO 123

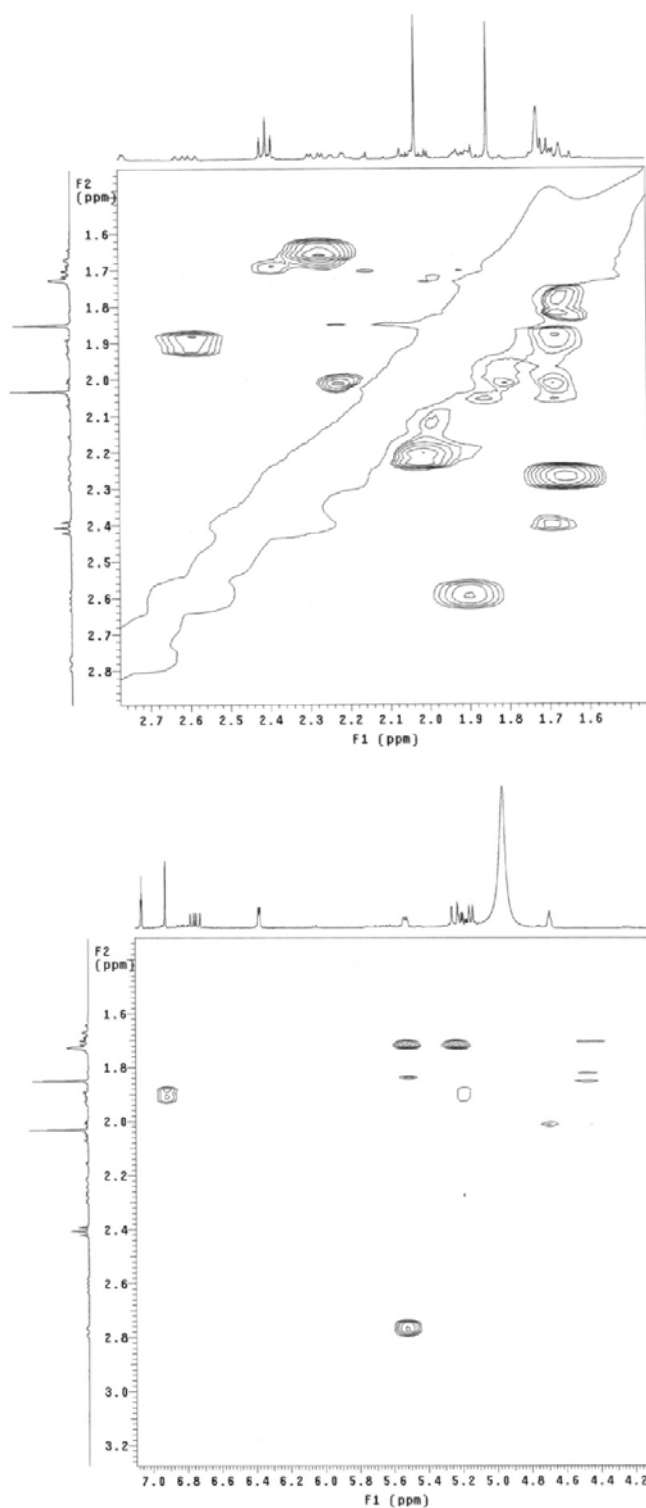


Figura: Expansões do mapa de contornos NOESY2D da casearina H (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 124

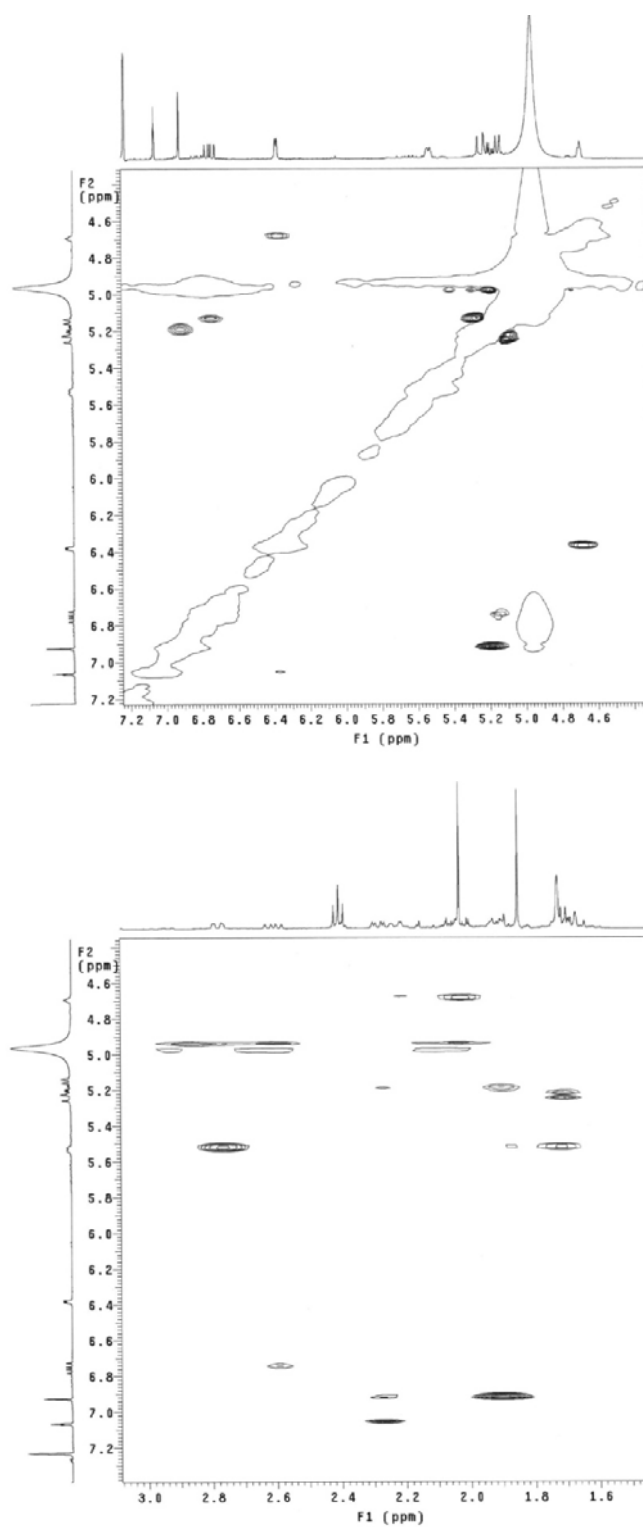
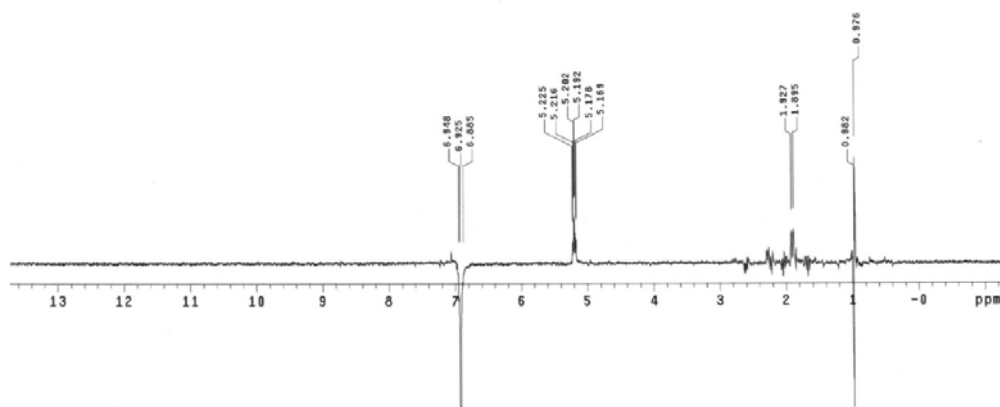


Figura: Expansões do mapa de contornos NOESY2D da casearina H (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 125

Andre 31.2c 10/04/07
 Pulse Sequence: NOESY1D
 Solvent: pyridine
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 INOVA-500 "multis"

 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Mixing 1.000 sec
 Acq. time 6.086 sec
 Width 7509.6 Hz
 32 repetitions
 OBSERVE H1, 499.4863928 MHz
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 3 min, 34 sec



Andre 31.2c 10/04/07
 Pulse Sequence: NOESY1D
 Solvent: pyridine
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 INOVA-500 "multis"

 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Mixing 1.000 sec
 Acq. time 4.086 sec
 Width 7509.6 Hz
 32 repetitions
 OBSERVE H1, 499.4863928 MHz
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 3 min, 33 sec

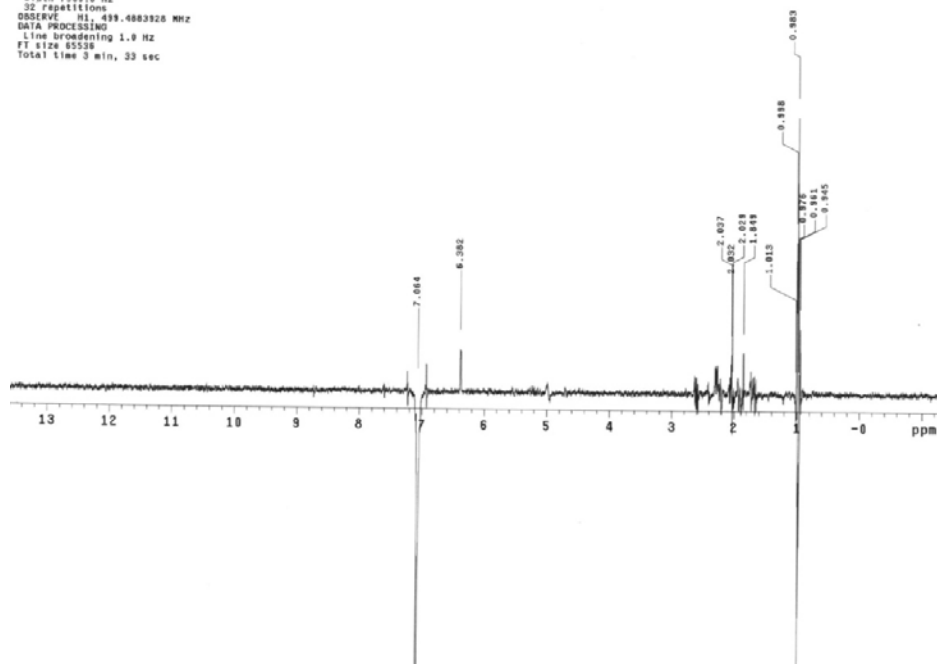


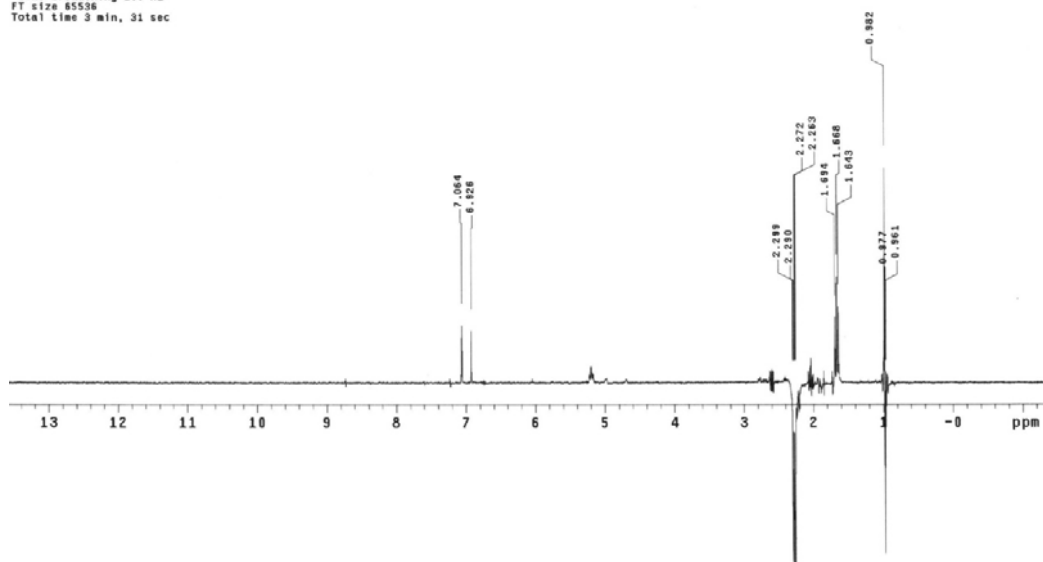
Figura: Espectros de NOESY1D da casearina H (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 126

Andre 31.2c 10/04/07

Pulse Sequence: NOESY1D
 Solvent: pyridine
 Temp. 30.0 C / 303.1 K
 INOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Mixing 1.000 sec
 Acq. time 4.080 sec
 Width 7508.6 Hz
 32 repetitions
 OBSERVE F1: 499.4683928 MHz
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 3 min, 31 sec



Andre 31.2c 10/04/07

Pulse Sequence: NOESY1D
 Solvent: pyridine
 Temp. 30.0 C / 303.1 K
 INOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Mixing 1.000 sec
 Acq. time 4.080 sec
 Width 7508.6 Hz
 32 repetitions
 OBSERVE F1: 499.4683928 MHz
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 3 min, 30 sec

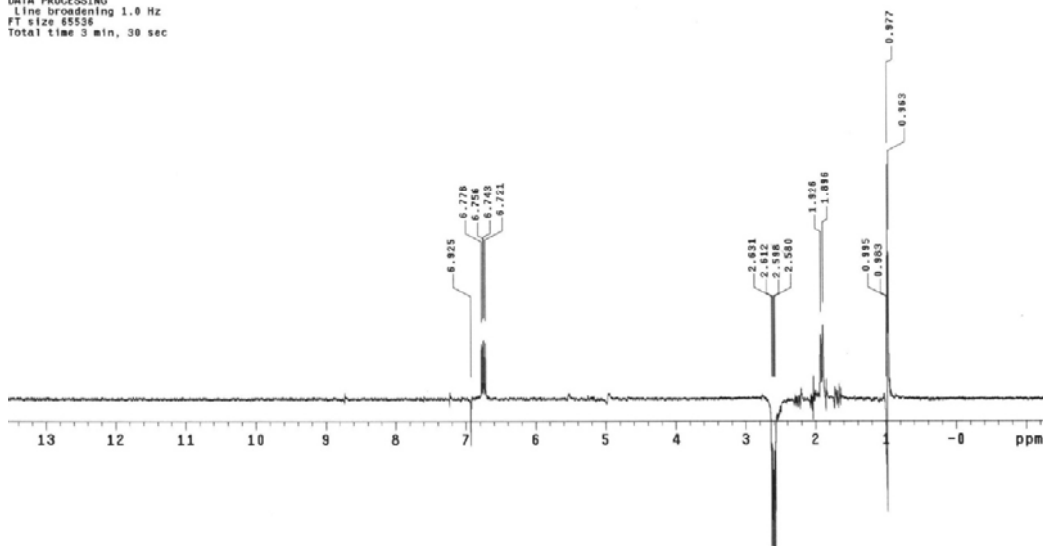
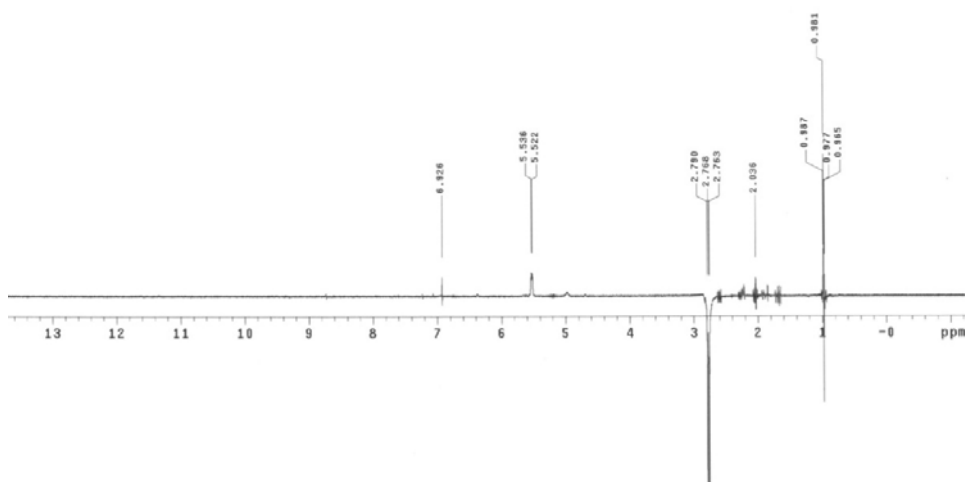


Figura: Espectros de NOESY1D da casearina H (piridina-d5, 11,7 T).

ANEXO 127

Andre 31.2c 10/04/07
Pulse Sequence: NOESY1D
Solvent: pyridine
Temp. 30.0 C / 303.1 K
INOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 90.0 degree
Mixing 1.000 sec
Acq. time 4.000 sec
Width 7508.6 Hz
32 repetitions
OBSERVE -H1, 499.4803920 MHz
DATA PROCESSING
Line broadening 0.2 Hz
FT size 85536
Total time 3 min, 30 sec



Andre 31.2c 10/04/07
Pulse Sequence: NOESY1D
Solvent: pyridine
Temp. 30.0 C / 303.1 K
INOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 90.0 degree
Mixing 1.000 sec
Acq. time 4.000 sec
Width 7508.6 Hz
24 repetitions
OBSERVE -H1, 499.4803920 MHz
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 85536
Total time 3 min, 30 sec

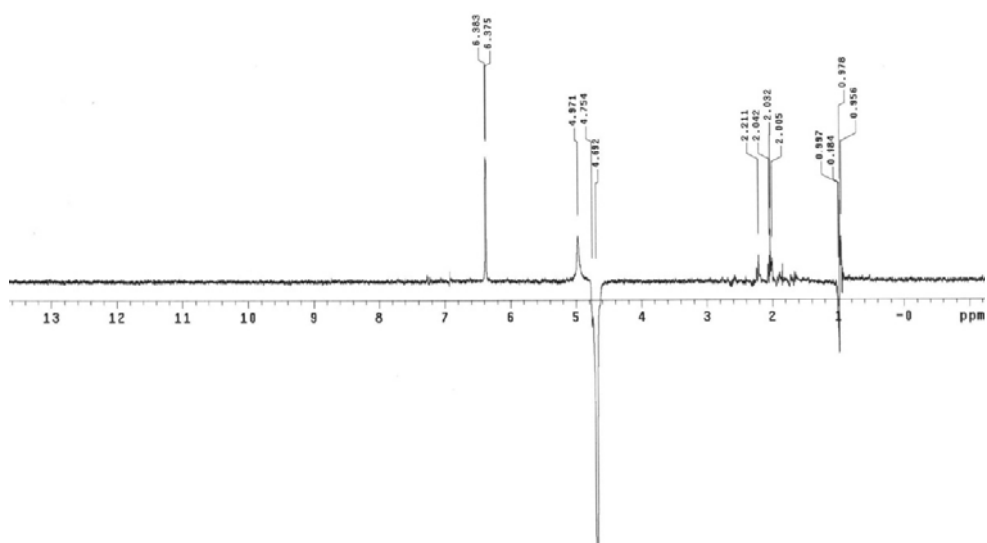


Figura: Espectros de NOESY1D da casearina H (piridina-d5, 11,7 T).

ANEXO 128

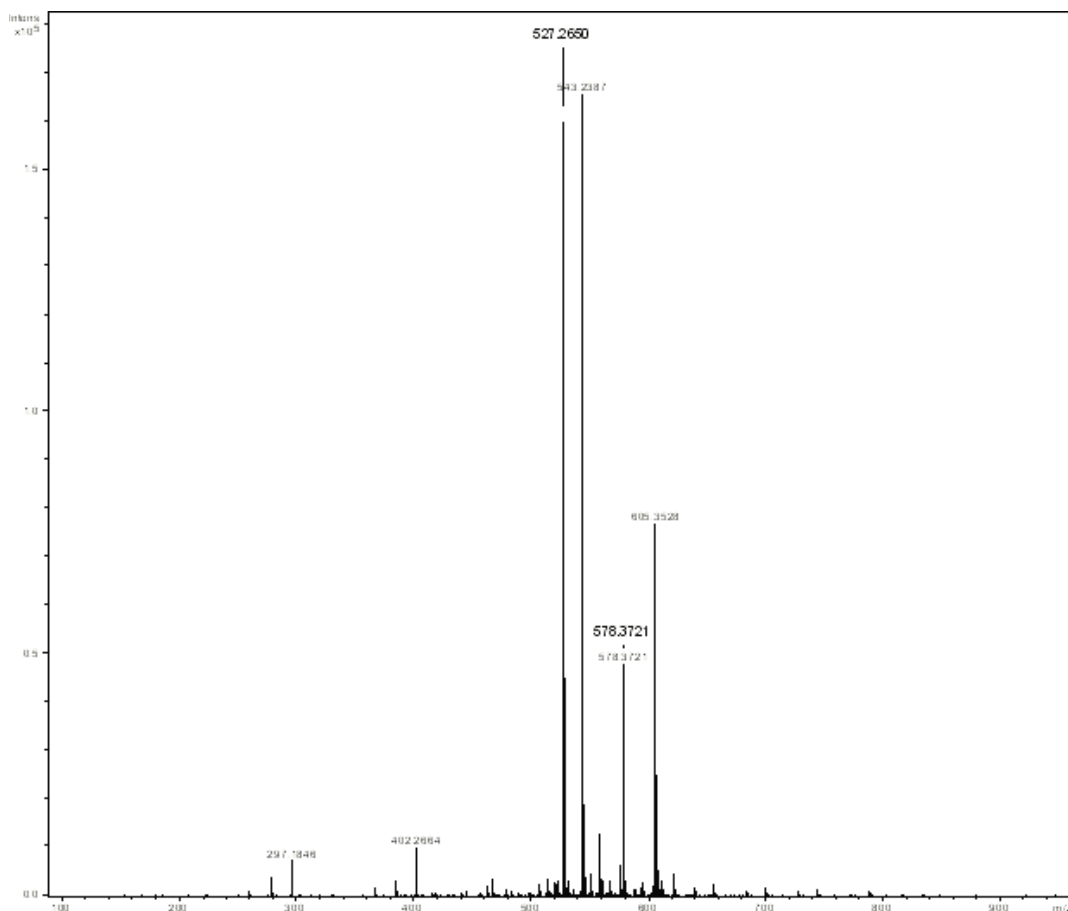


Figura A: Espectro de massas de alta resolução (HRTOF-ESIMS) da caseargreina F.

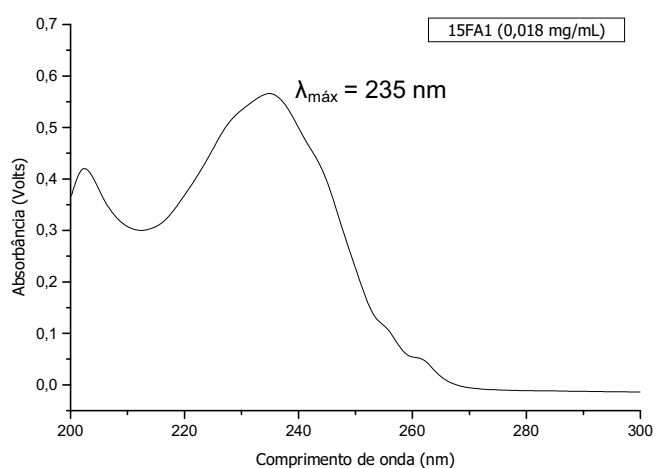


Figura B: Espectro de absorção no UV da caseargreina F.

ANEXO 129

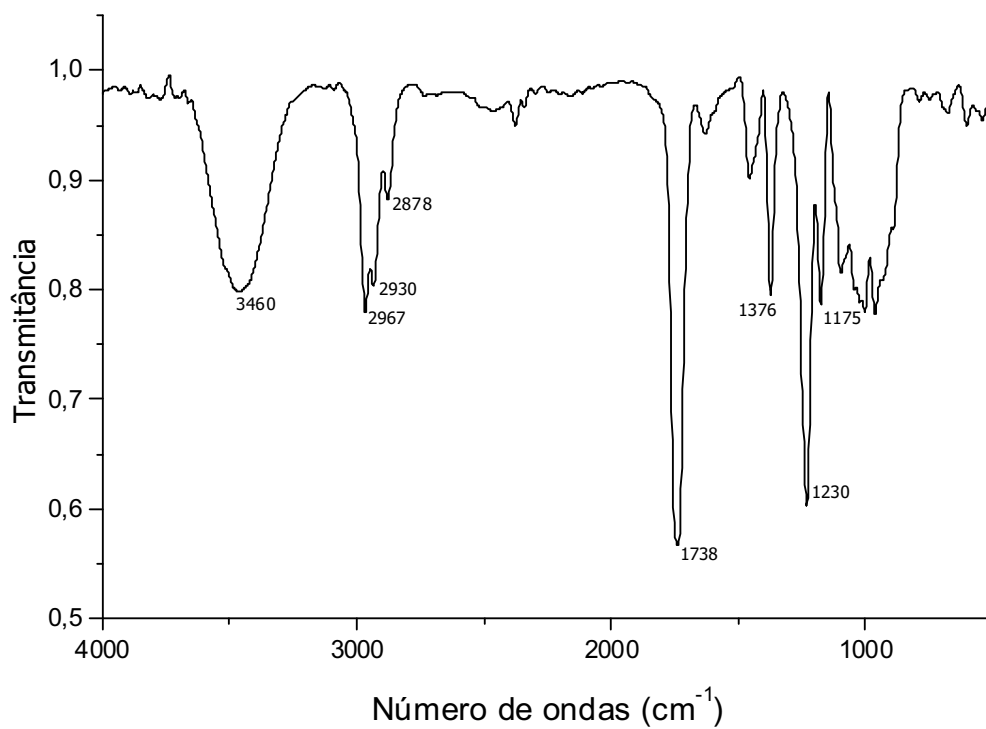


Figura: Espectro de absorção no IV da caseargreina F.

ANEXO 130

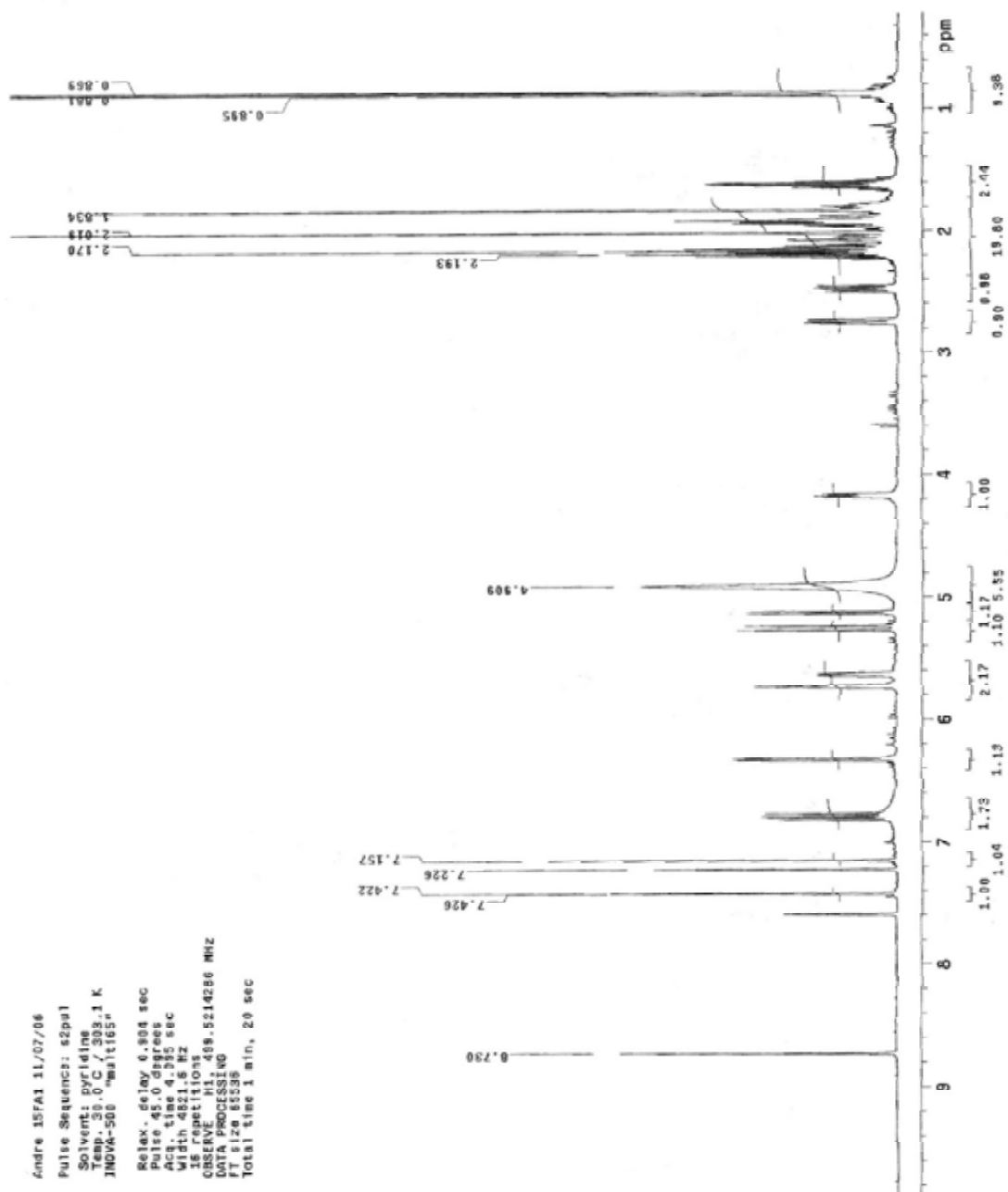


Figura: Espectro de RMN de ^1H da caseargrewna F em piridina-d5 obtido a 500 MHz.

ANEXO 131

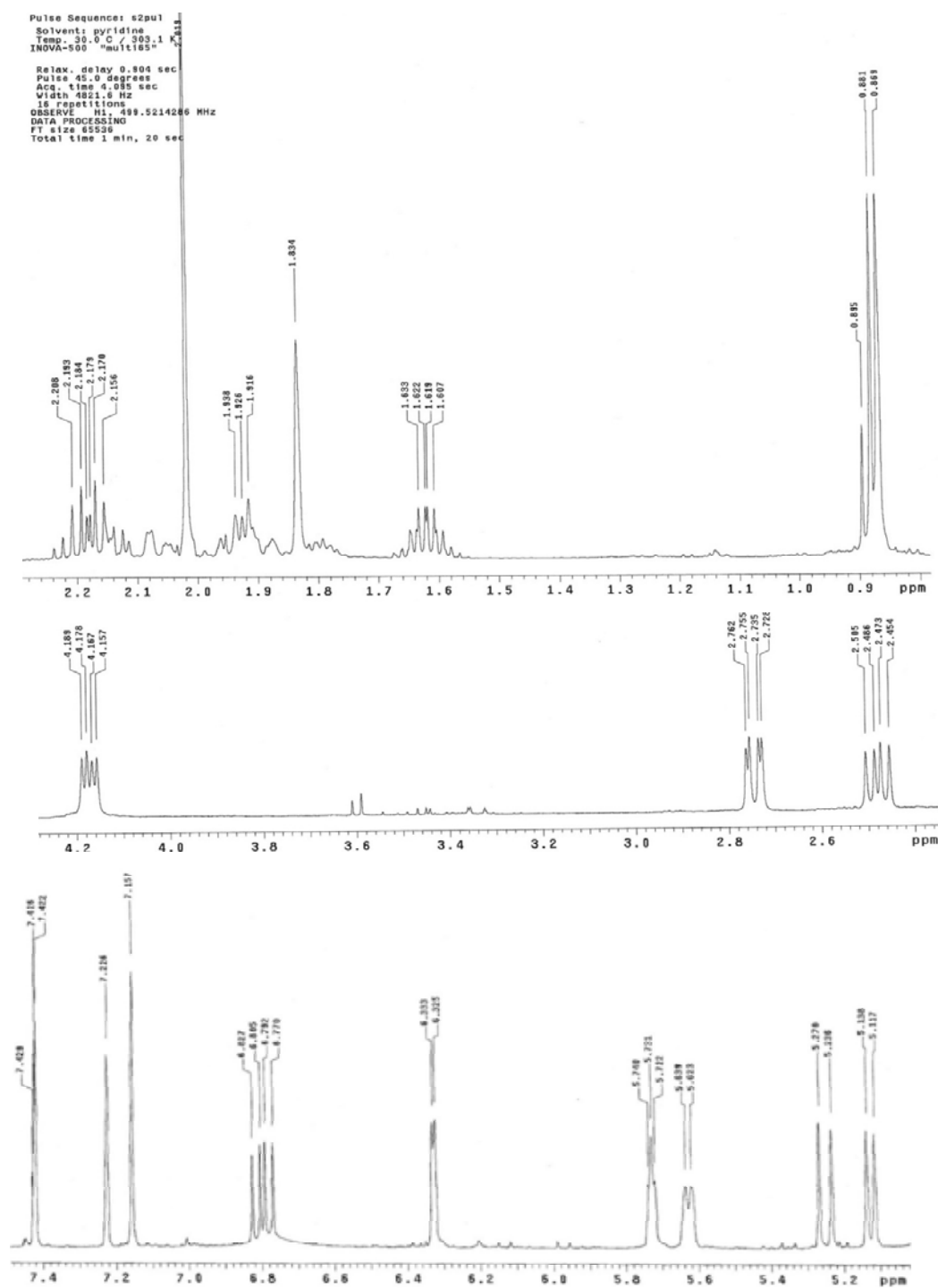


Figura: Expansões do espectro de RMN de ^1H da caseargreina F em piridina- d_5 obtido a 500 MHz.

ANEXO 132

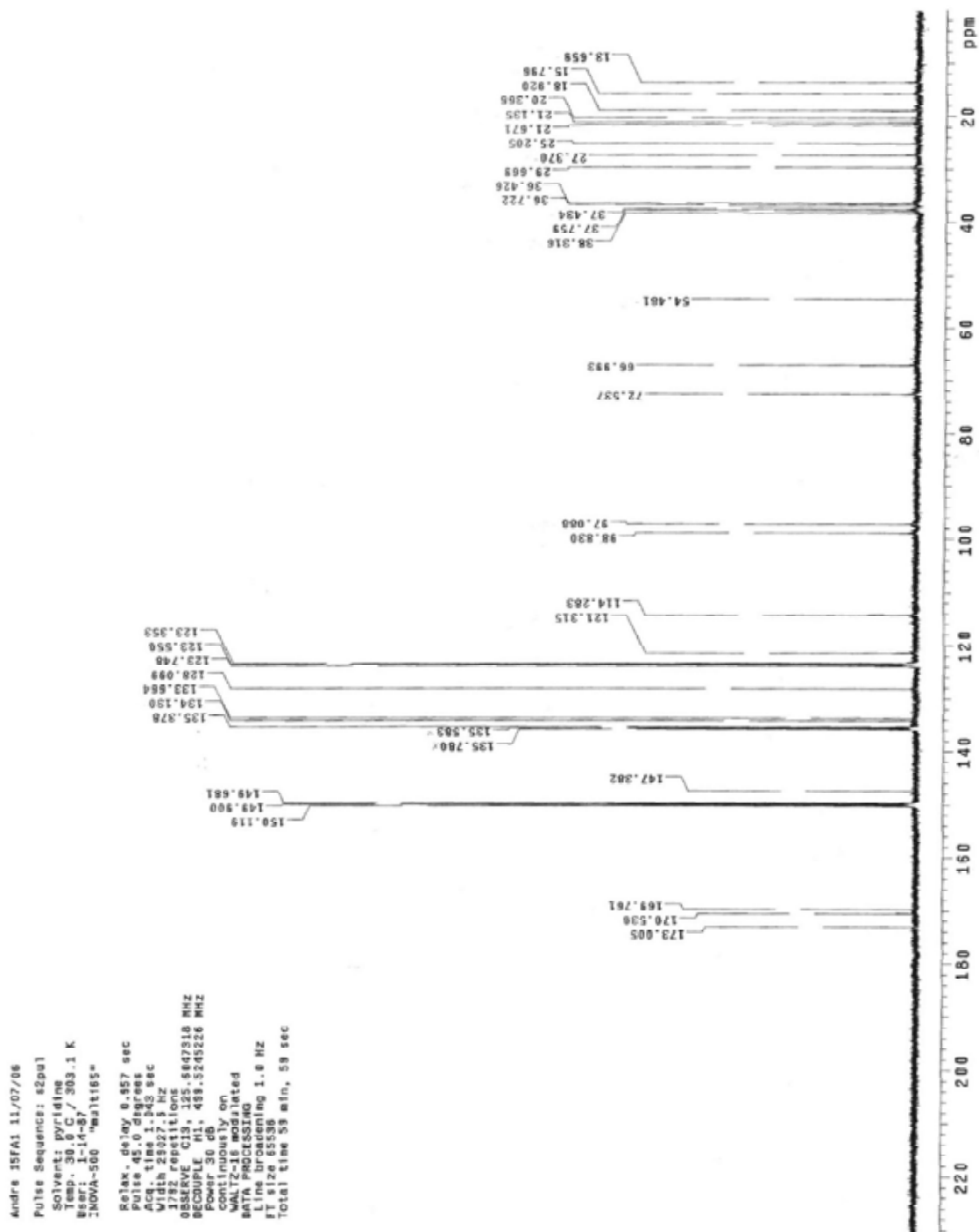
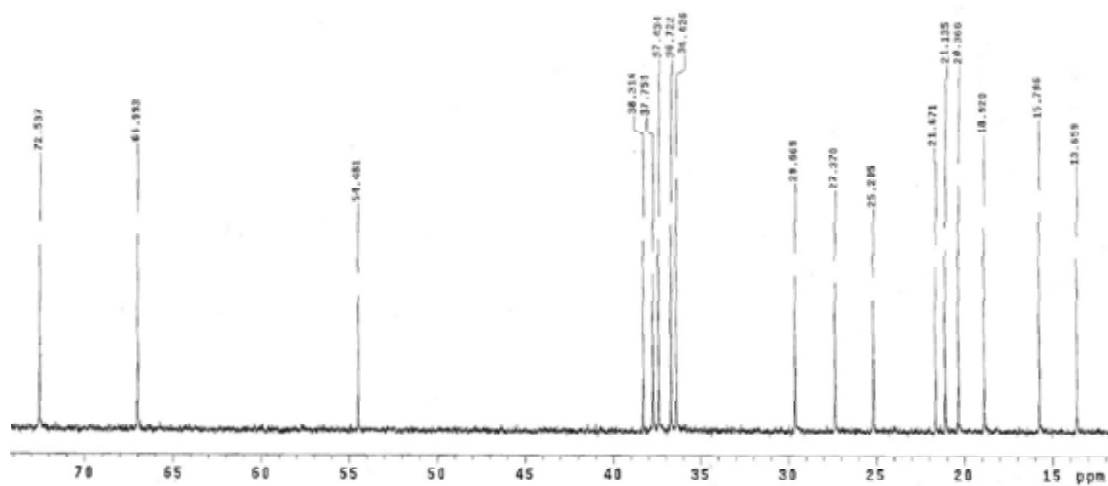


Figura: Espectro de RMN de ^{13}C da caseargwiina F em piridina- d_5 obtido a 125 MHz.

ANEXO 133



Indra 15FAT 11/07/08
 Pulse Sequence: s2pu1
 Solvent: pyridine
 Temp: 29.0 C / 283.1 K
 Acq: 1-14-07
 INOVA-500 "multis65"

Relax. delay 0.857 sec
 Pulse 45.0 degree
 Acq. time 1.043 sec
 Width 23027.6 Hz
 1742 repetitions
 OBSERVE CH, 125.0047318 MHz
 DECOUPLE N1, 499.5245220 MHz
 Power 30 dB
 continuously on
 WALTZ-16 modulated
 Delta Modulation
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 59 min, 59 sec

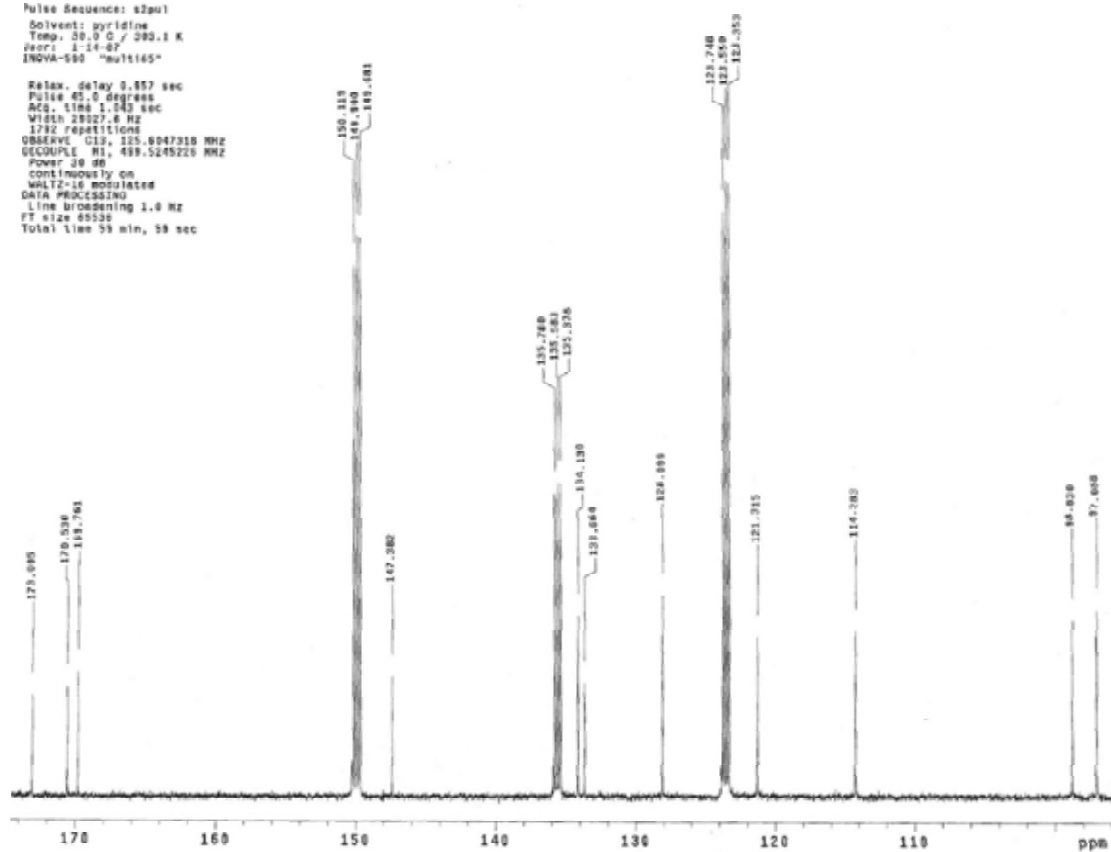


Figura: Expansões do espectro de RMN de ^{13}C da caseargreina F em piridina-d5 obtido a 125 MHz.

ANEXO 134

Andre 15FA1 12/07/06
 Pulse Sequence: DEPT135C
 Solvent: pyridine
 Temp. 30.0 C / 303.1 K
 User: 1-14-07
 INOVA-500 "multis65"

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Acq. time 1.043 sec
 Width 29027.6 Hz
 400 repetitions
 OBSERVE C13, 125.0048831 MHz
 DECOUPLE H1, 499.5245226 MHz
 Power 30 dB
 on during acquisition
 off during delay
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 27 min, 49 sec

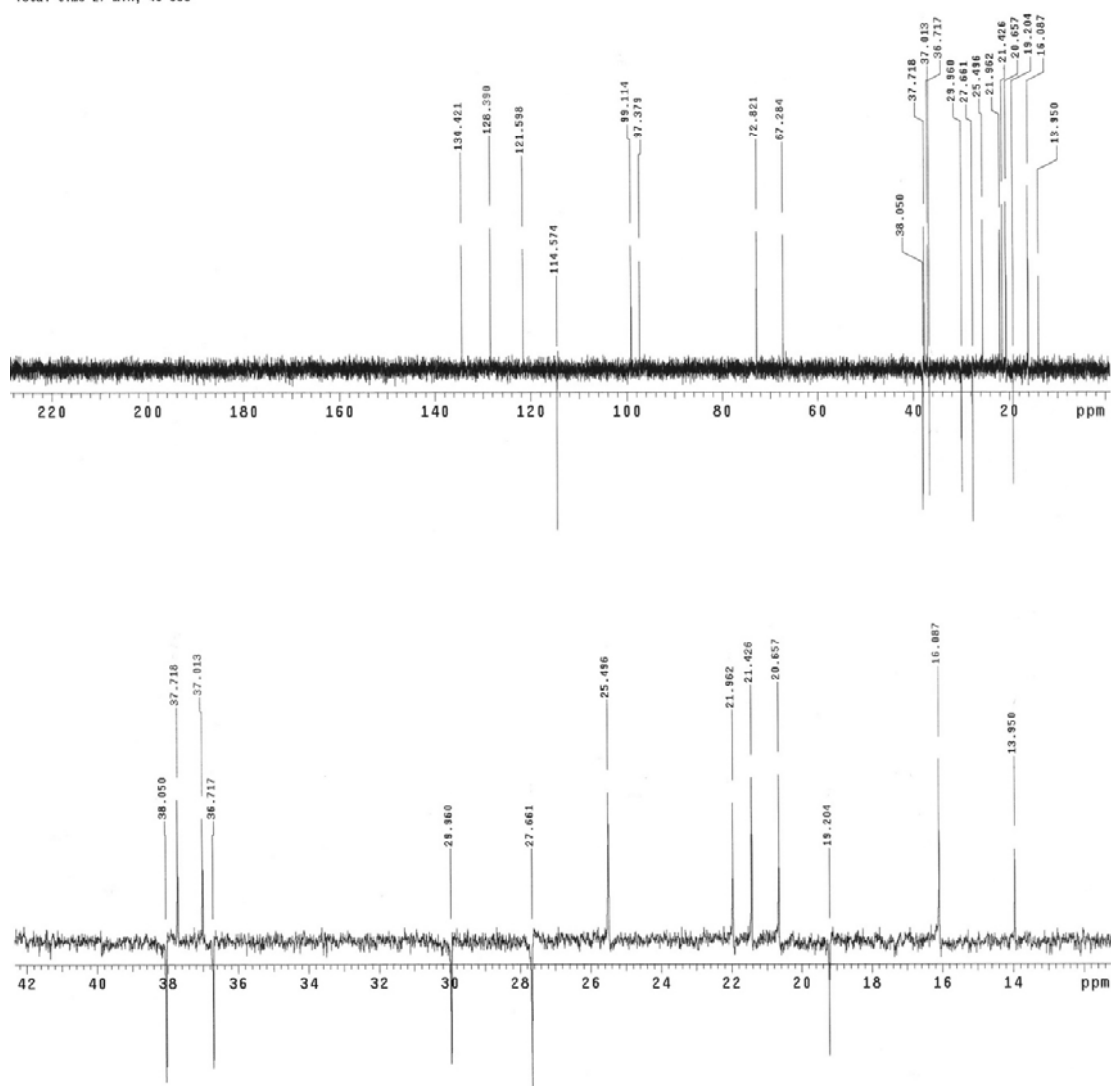


Figura: Espectro de DEPT135⁰ (incluindo expansão abaixo) da caseargreina F em piridina-d₅ obtido a 125 MHz.

ANEXO 135

Andre 15FA1 12/07/06
Pulse Sequence: DEPT 90
Solvent: pyridine
Temp. 30.0 C / 303.1 K
User: 1-14-87
INOVA-500 "multi65"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 90.0 degrees
Acq. time 1.343 sec
Width 25027.6 Hz
400 repetitions
OBSERVE C13, 125.8048831 MHz
DECOUPLE H1, 499.5245228 MHz
Power 30 dB
on during acquisition
off during delay
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 65536
Total time 27 min, 49 sec

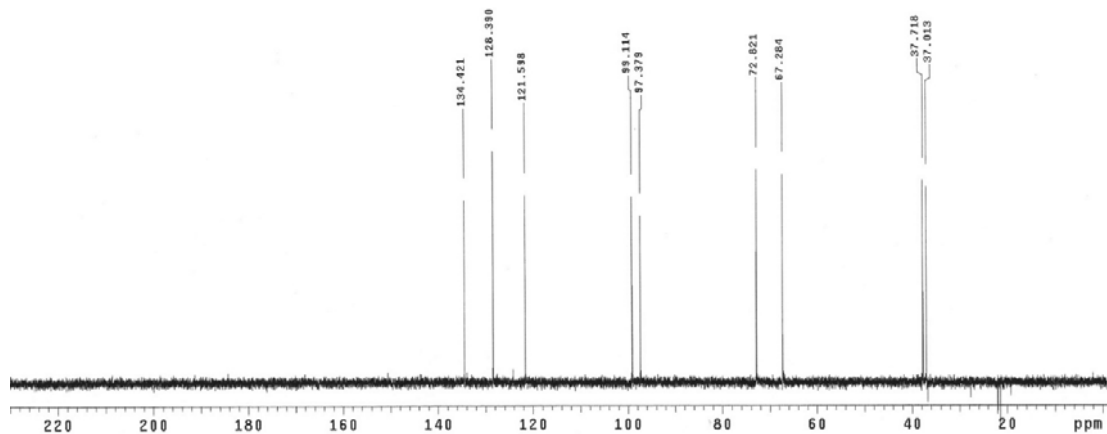


Figura: Espectro de DEPT90^o da caseargreina F em piridina-d5 obtido a 125 MHz.

ANEXO 136

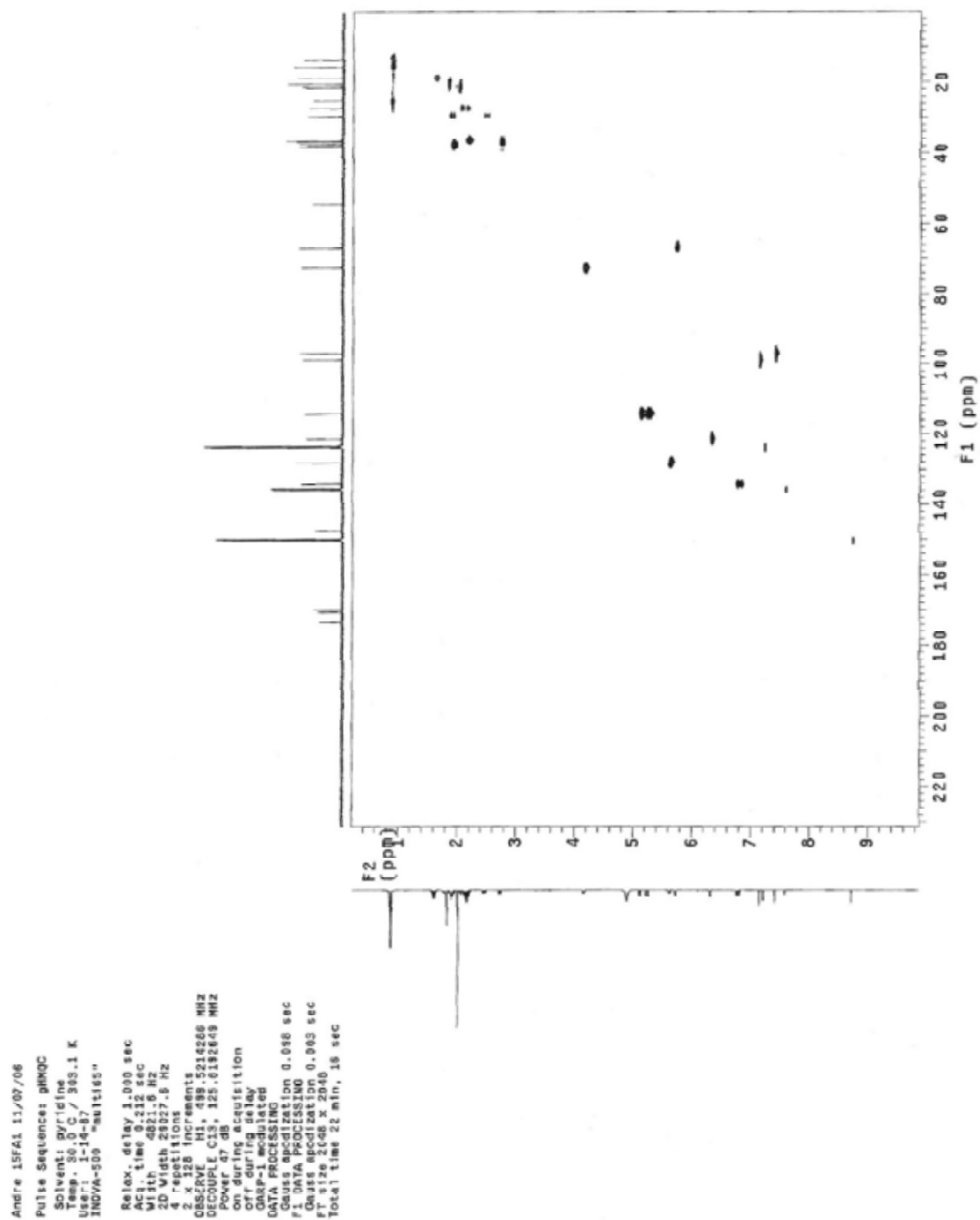


Figura: Mapa de contornos HMQC da caseargrewiina F (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 137

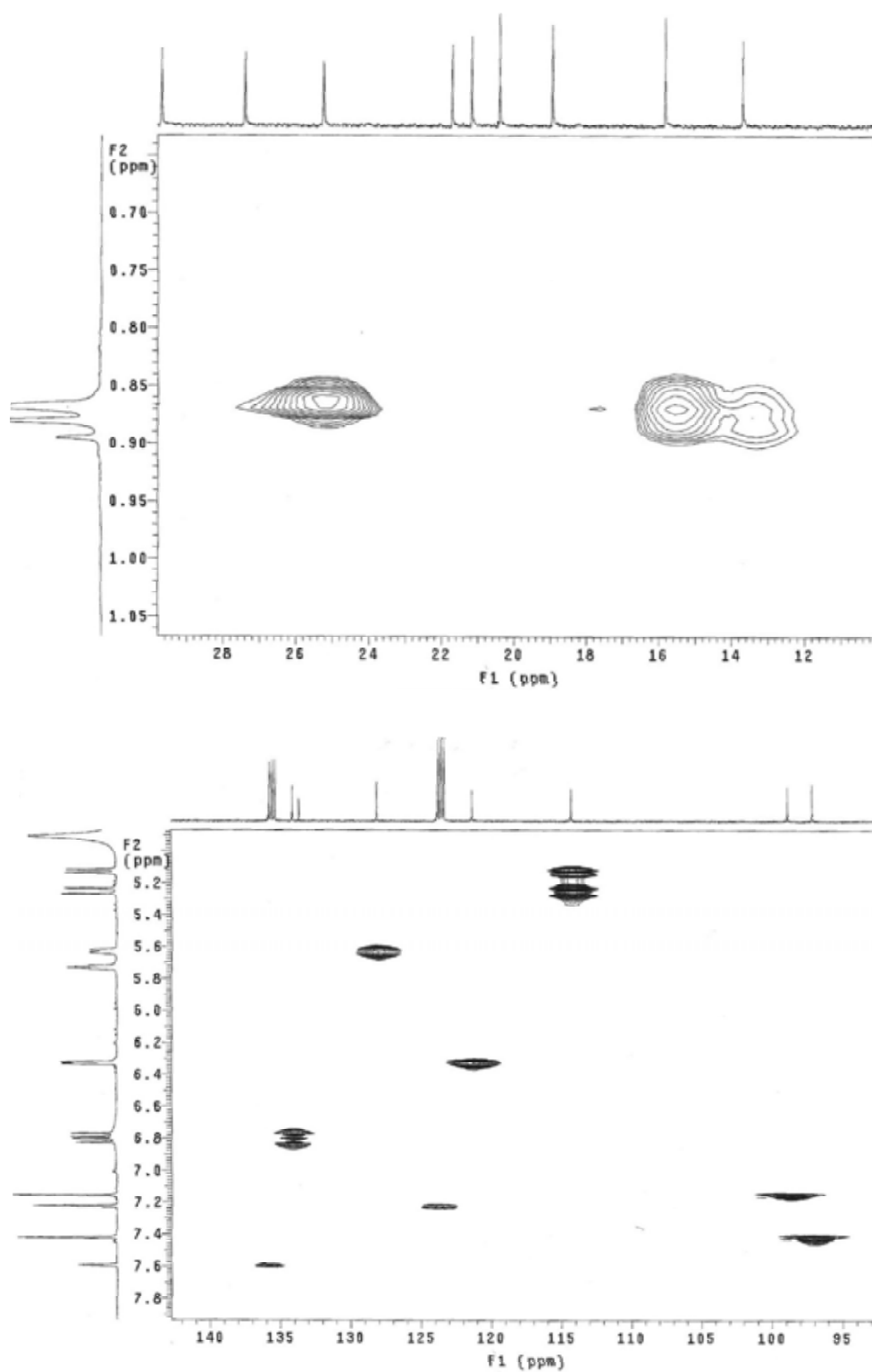


Figura: Expansões do mapa de contornos HMQC da caseargrewiina F (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 138

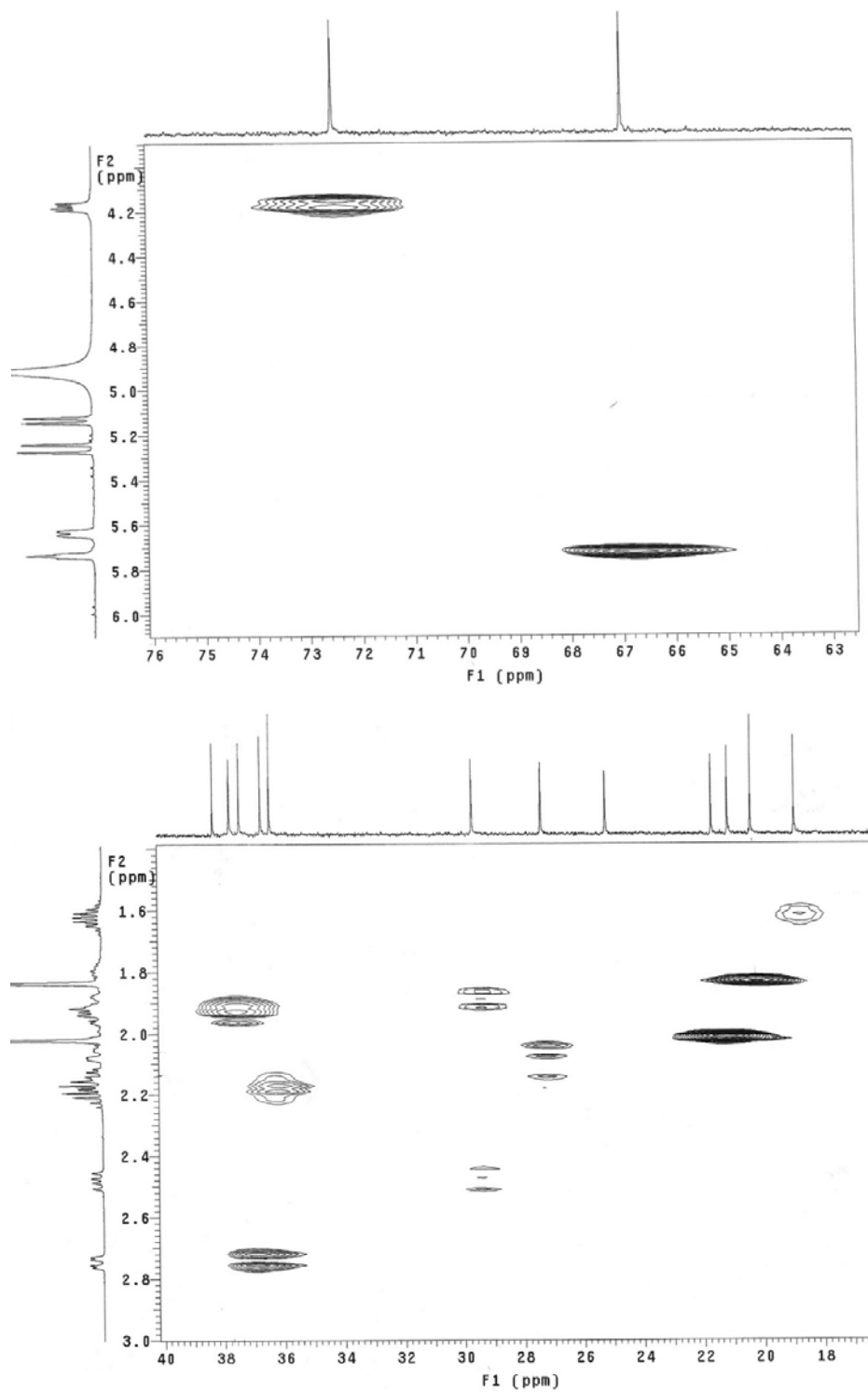


Figura: Expansões do mapa de contornos HMQC da caseargreina F (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 139

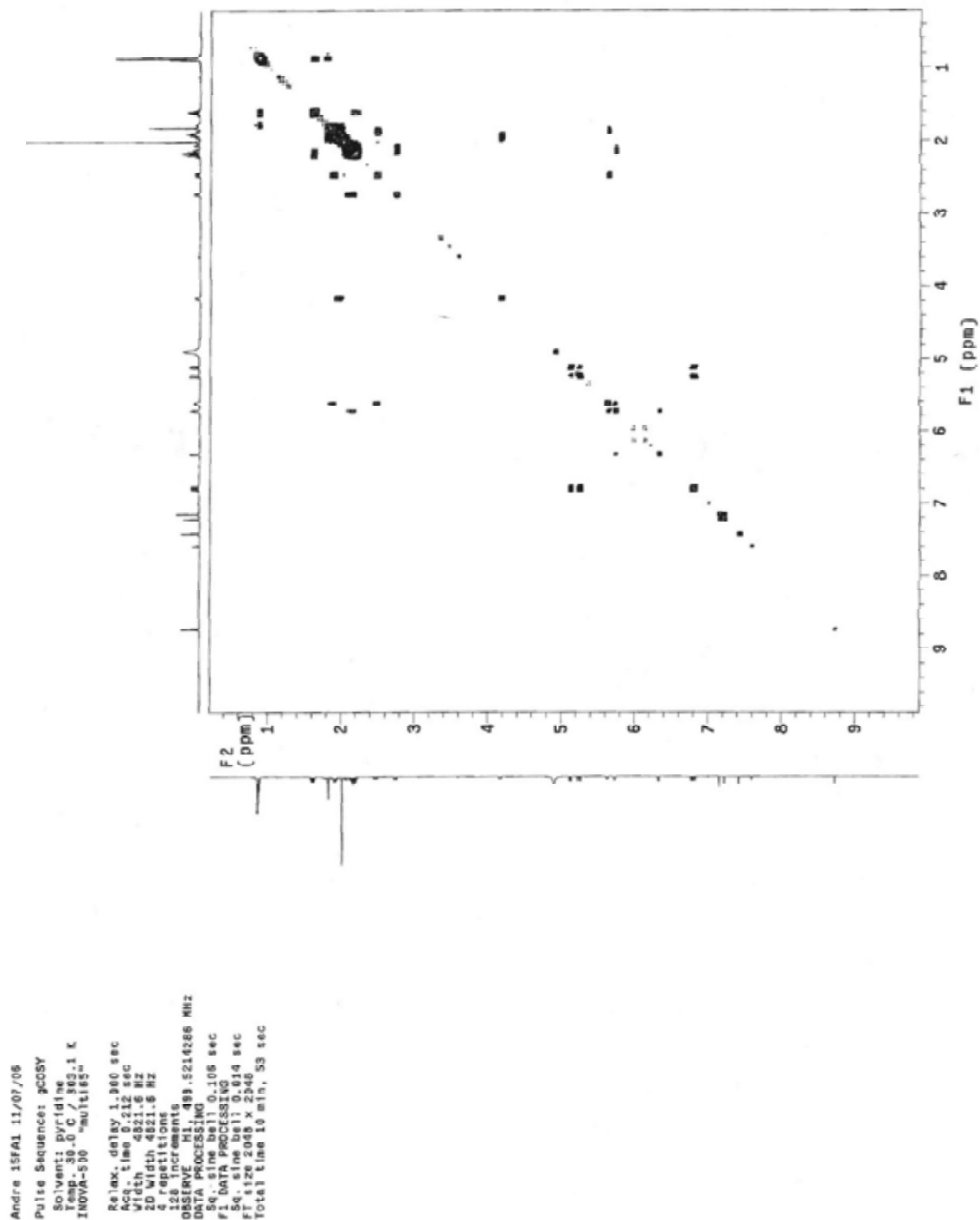


Figura: Mapa de contornos COSY da caseargreina F (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 140

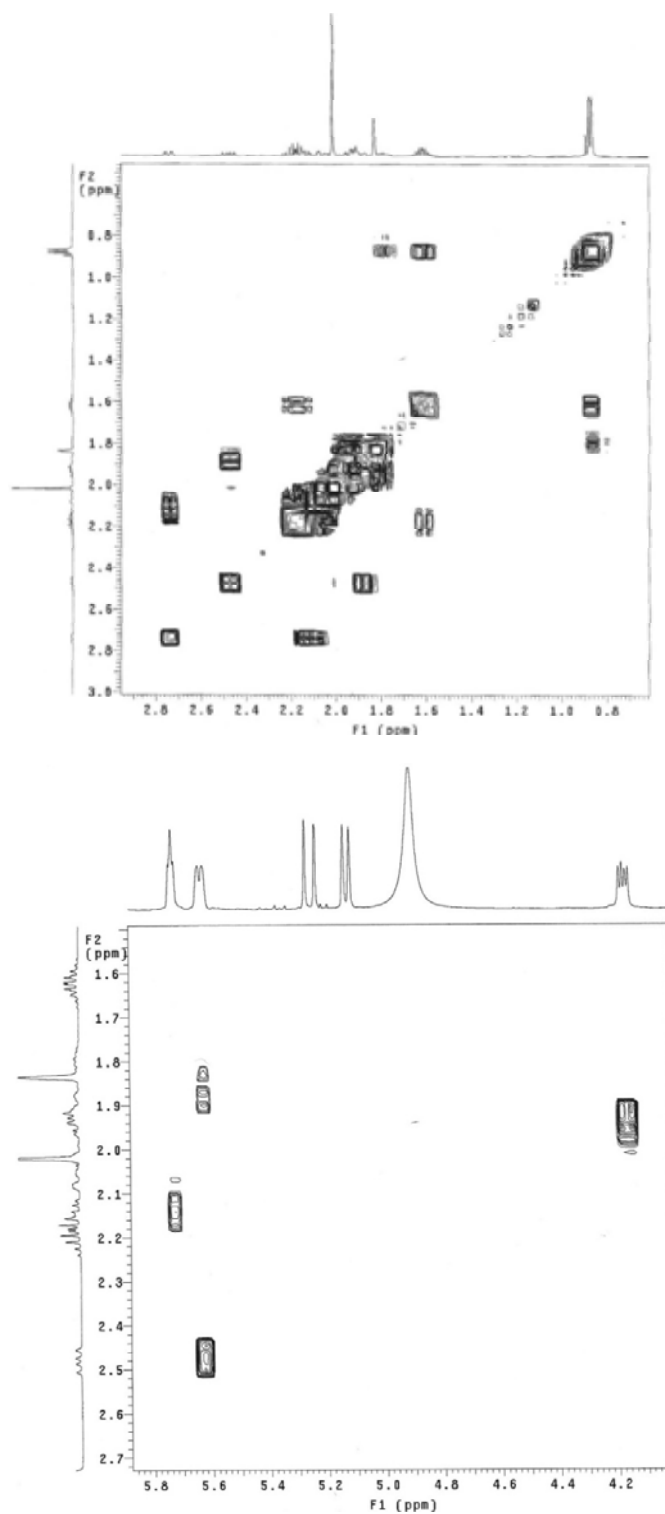


Figura: Expansões do mapa de contornos COSY da caseargreina F (piridina- d_5 , 11,7 T).

ANEXO 141

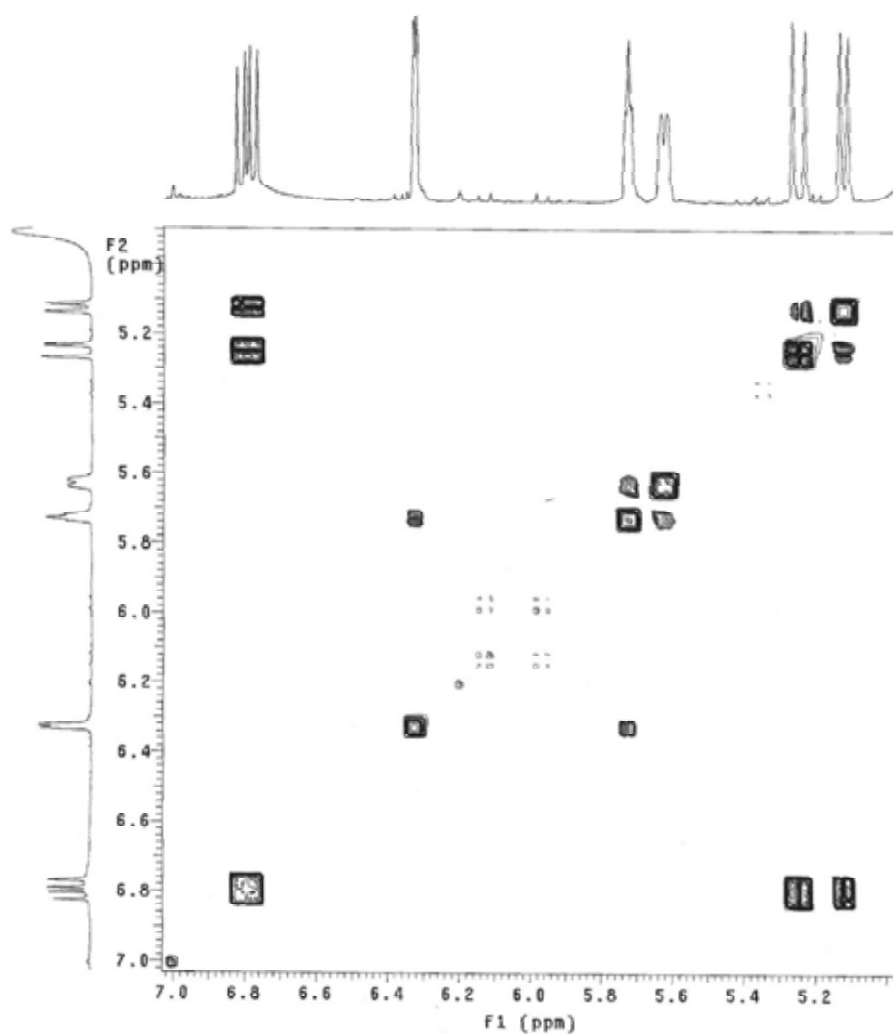


Figura: Expansão do mapa de contornos COSY da caseargreina F (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 142

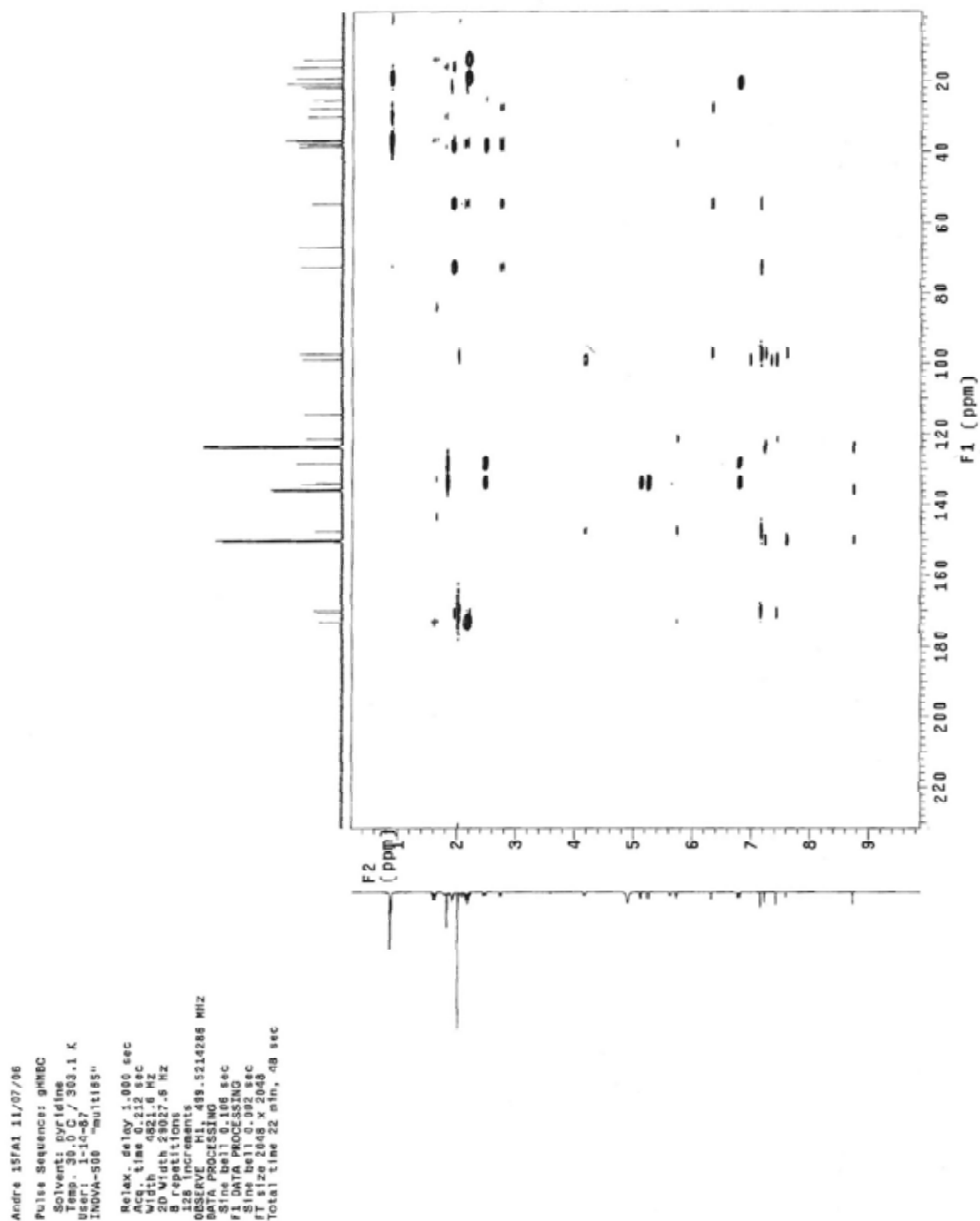


Figura: Mapa de contornos HMBC da caseargrewiina F (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 143

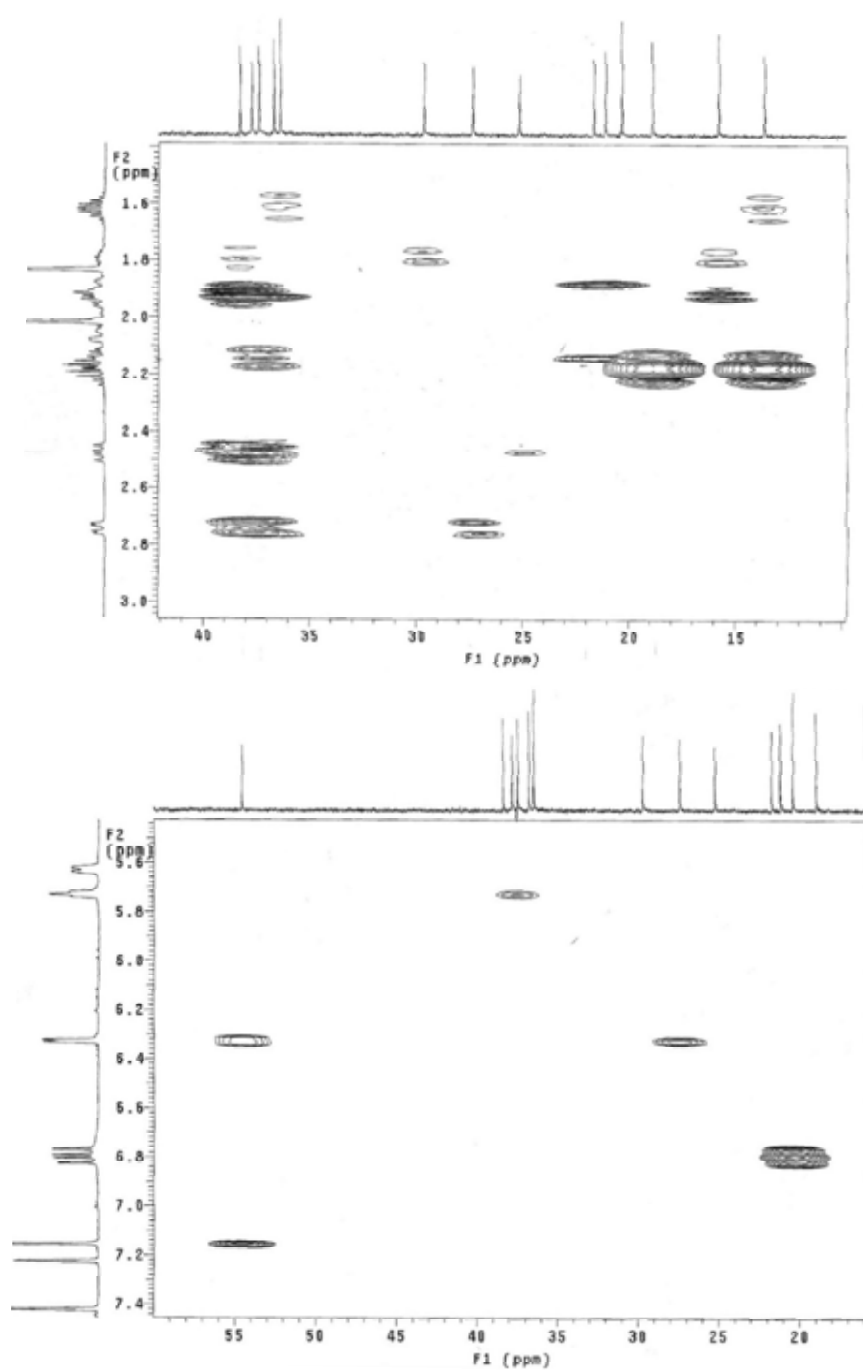


Figura: Expansões do mapa de contornos HMBC da caseargreina F (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 144

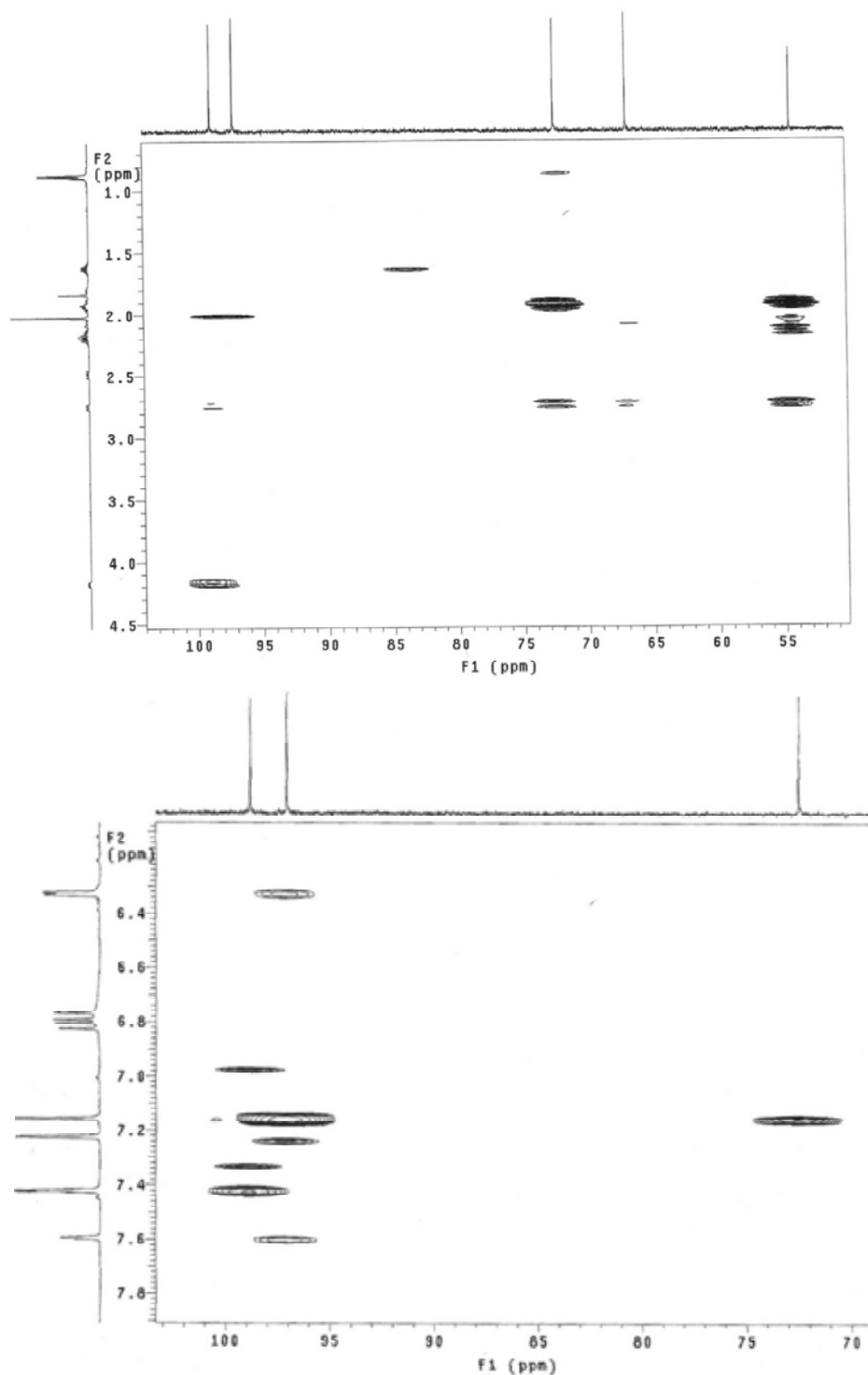


Figura: Expansões do mapa de contornos HMBC da caseargreina F (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 145

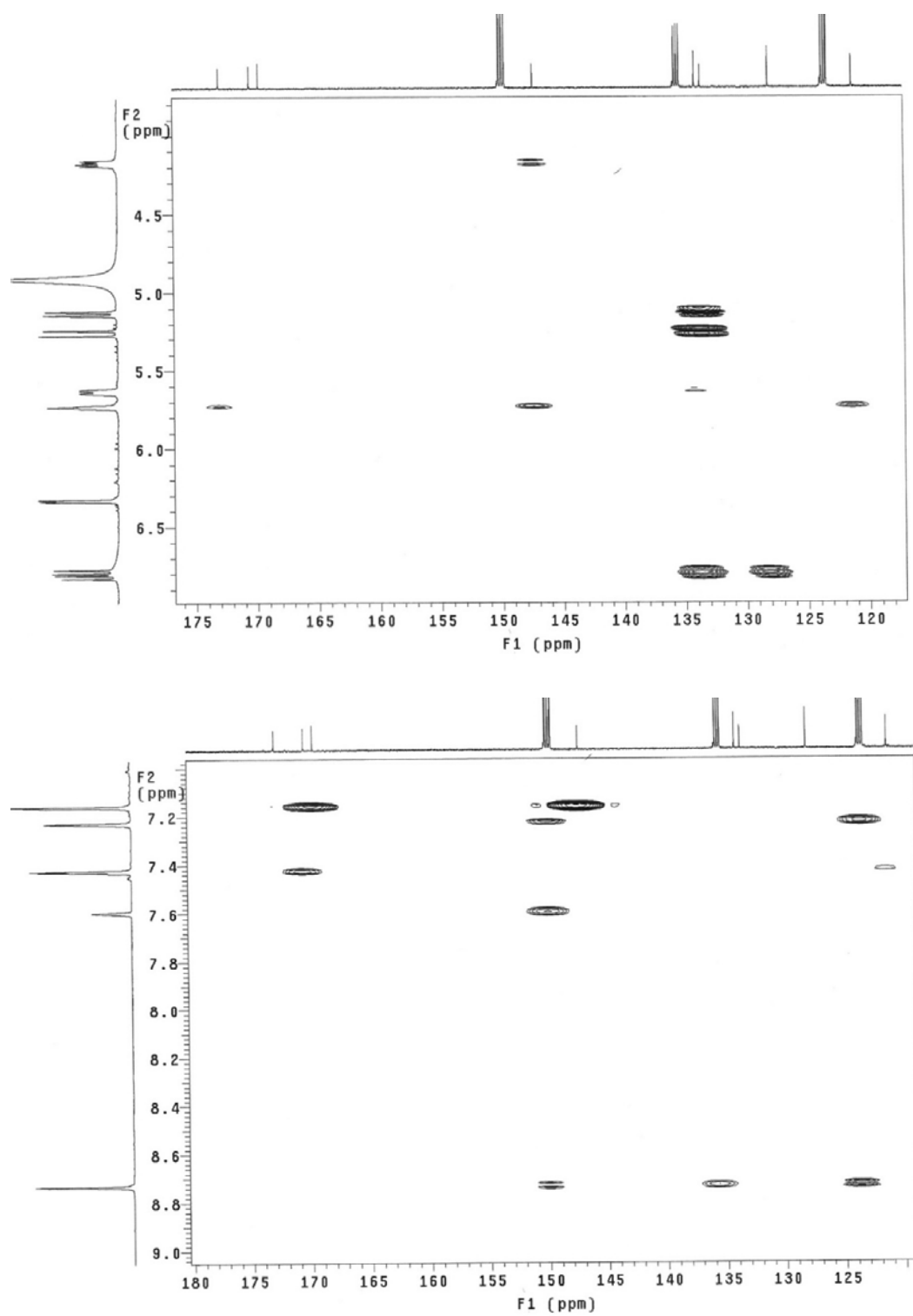


Figura: Expansões do mapa de contornos HMBC da caseargrewiina F (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 146

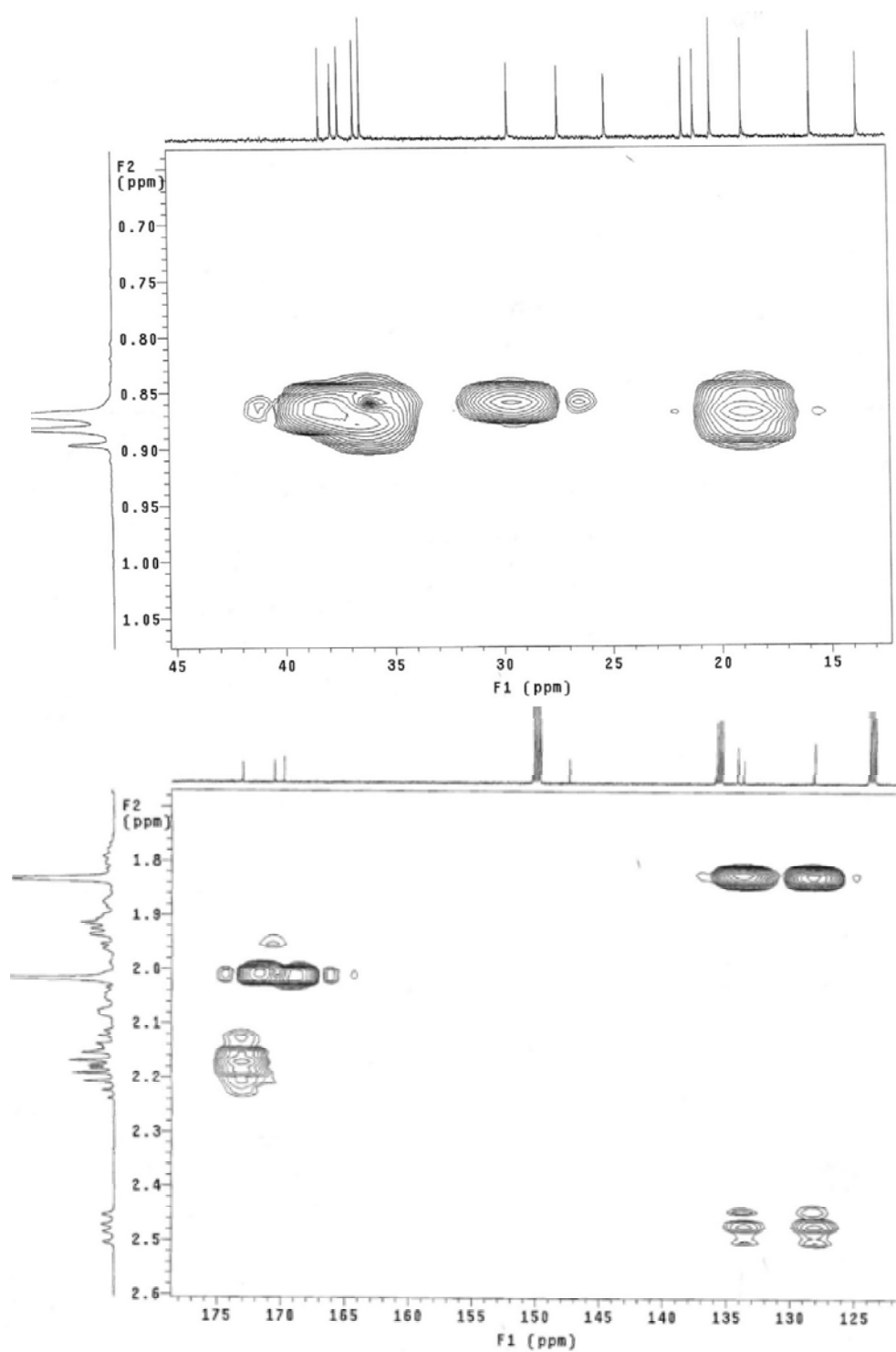


Figura: Expansões do mapa de contornos HMBC da caseargreina F (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 147

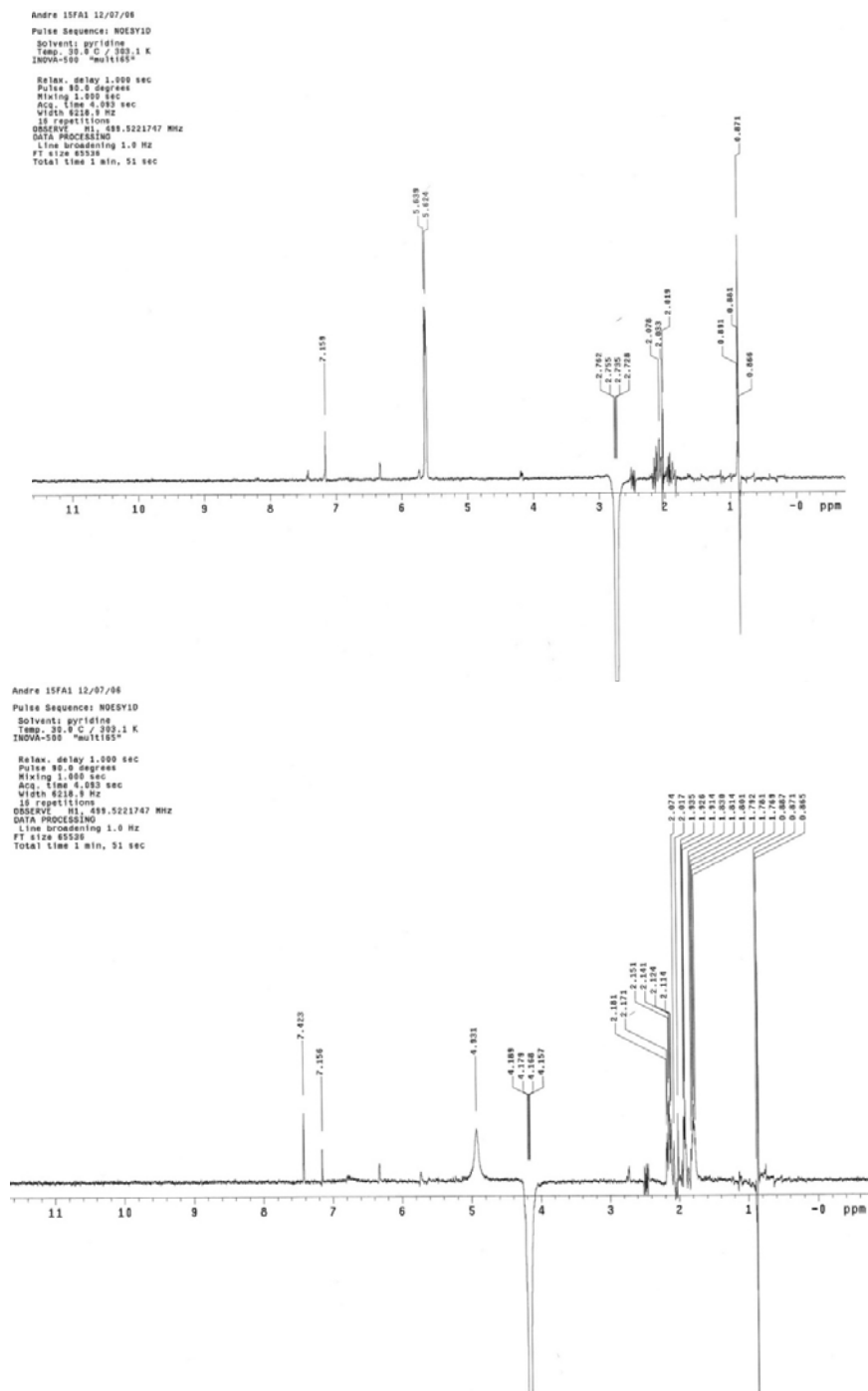
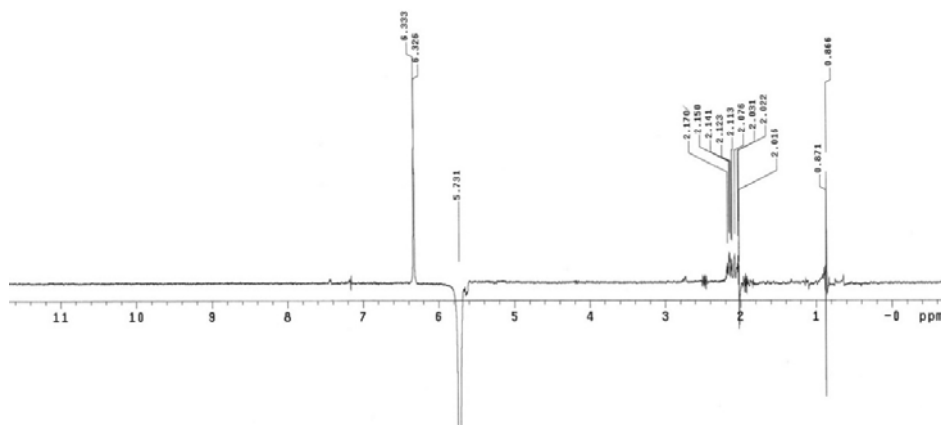


Figura: Espectros de NOESY1D da caseargrewiina F (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 148

Andre 15FA1 12/07/06
 Pulse Sequence: NOESY1D
 Solvent: pyridine
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 INOVA-500 "multis"

 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Mixing 1.000 sec
 Acq. time 4.093 sec
 Width 6218.8 Hz
 IS repetitions
 OBSERVE H1 499.5221747 MHz
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65526
 Total time 1 min, 51 sec



Andre 15FA1 12/07/06
 Pulse Sequence: NOESY1D
 Solvent: pyridine
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 INOVA-500 "multis"

 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Mixing 1.000 sec
 Acq. time 4.093 sec
 Width 6218.8 Hz
 IS repetitions
 OBSERVE H1 499.5221747 MHz
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 1 min, 53 sec

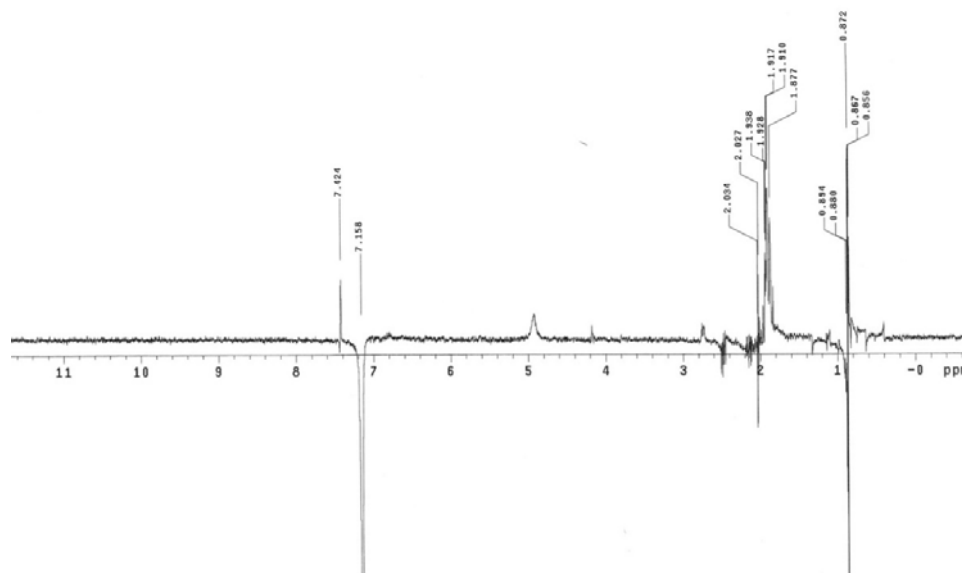


Figura: Espectros de NOESY1D da caseargreina F (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 149

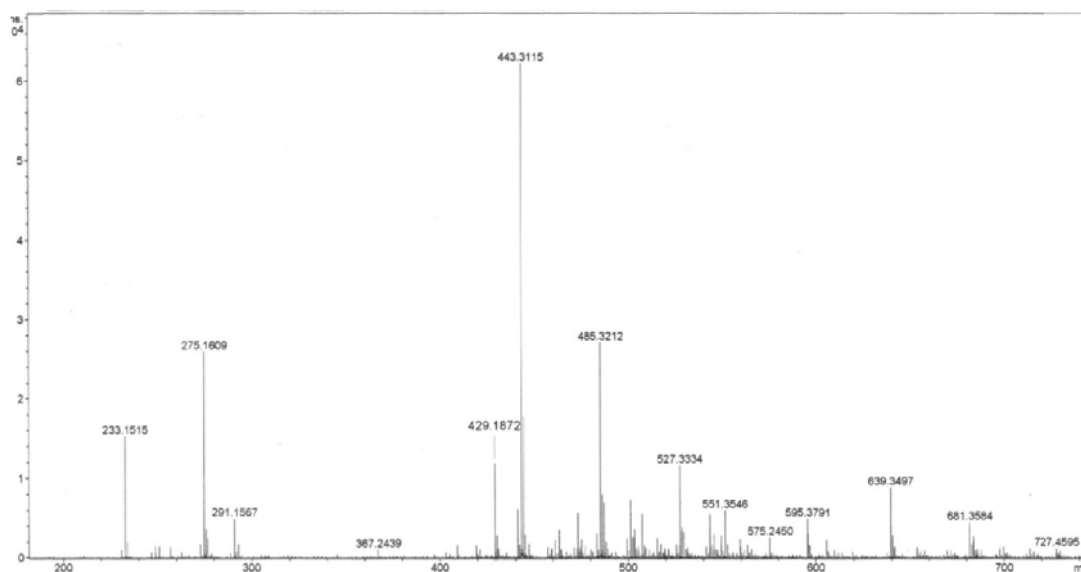


Figura A: Espectro de massas de alta resolução (HRTOF-ESIMS) da 9-hidróxi-4-megastimen-3-ona.

Channel Range: 218.95 to 400.26 nm Absorbance Range: 0.2820 to 526.05 mAu

Max Wavelength(nm): 244.72
Percent of Max Abs.: 100.0%

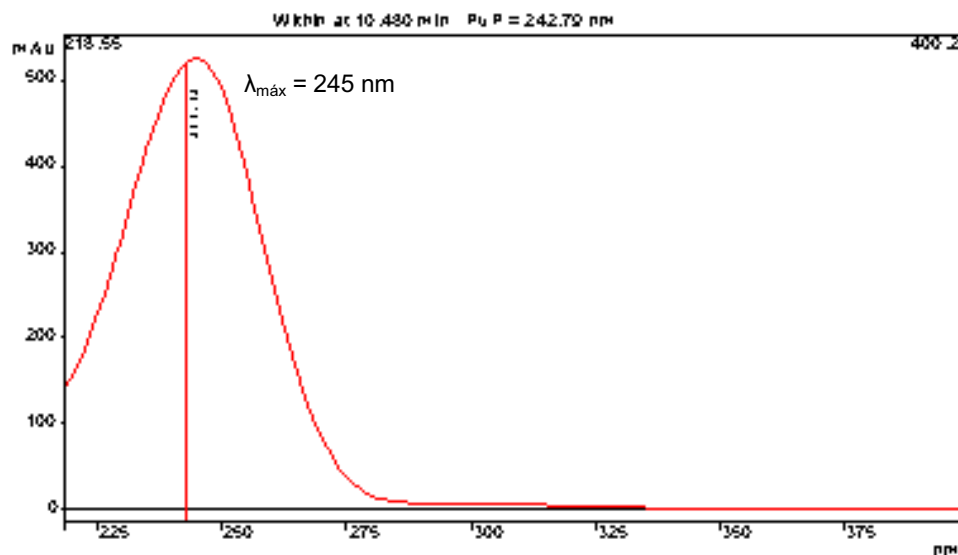


Figura B: Espectro de absorção no UV da 9-hidróxi-4-megastimen-3-ona obtido pela análise em CLAE-DAD. Condições de análise na Tabela 7.

ANEXO 150

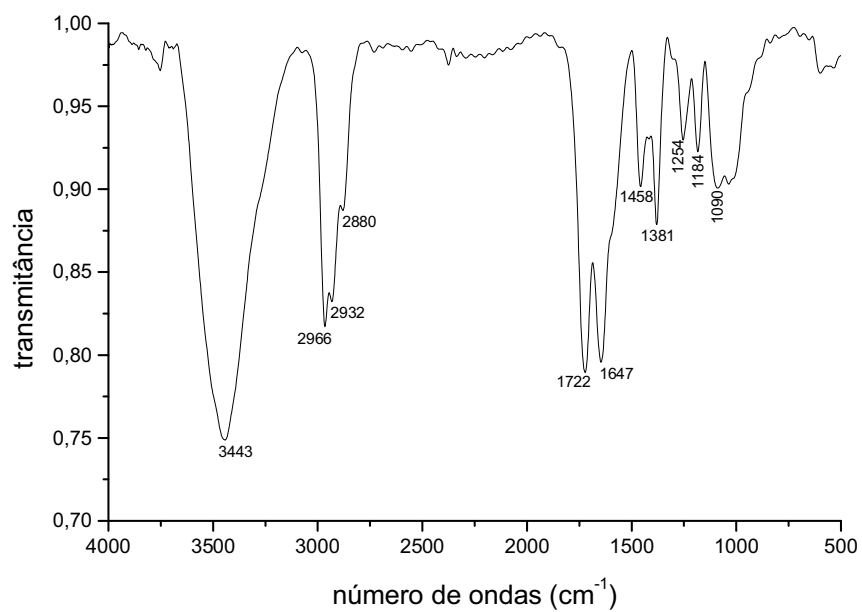


Figura: Espectro de absorção no IV da 9-hidróxi-4-megastimen-3-ona.

ANEXO 151

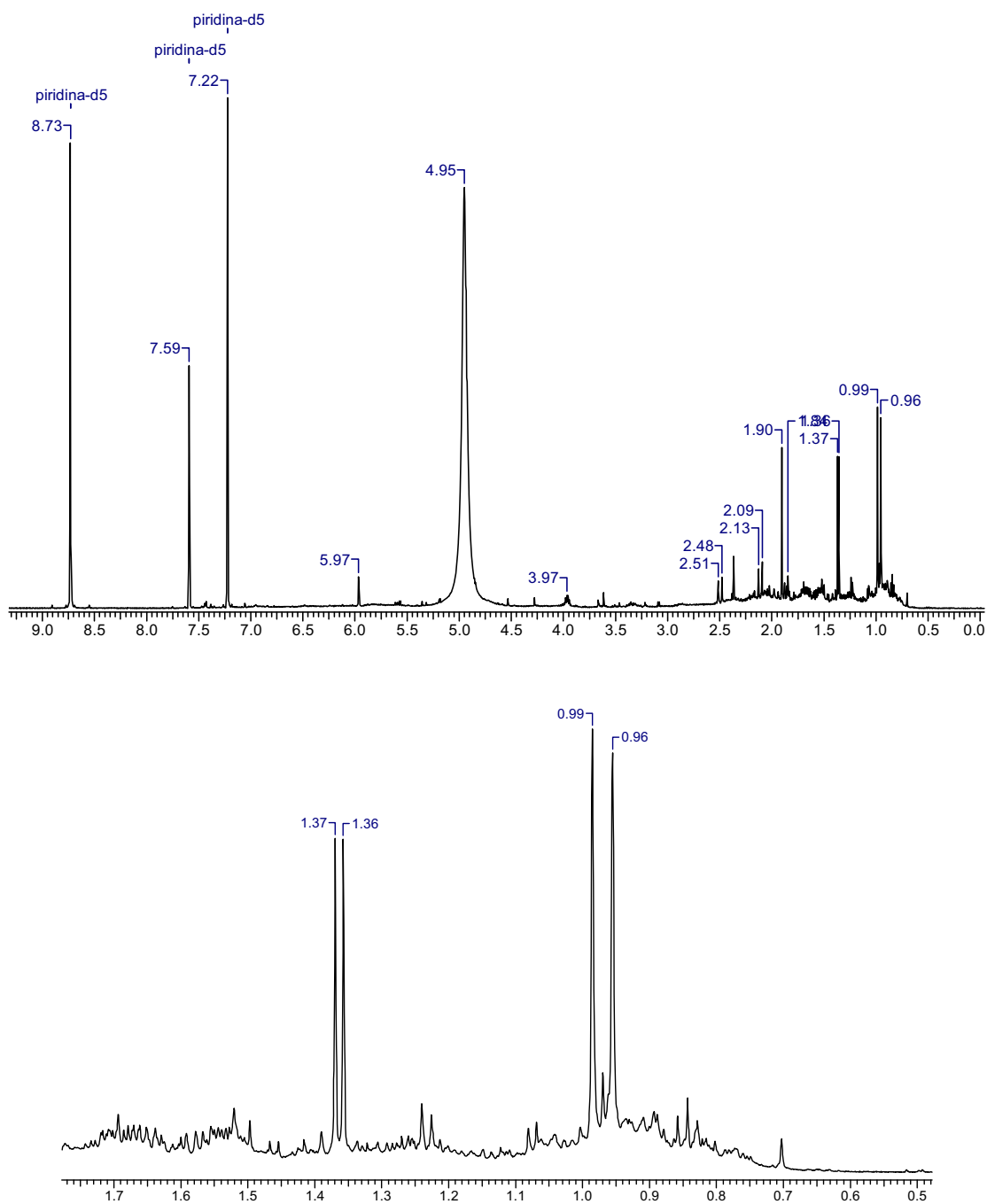


Figura: Espectro de RMN de ^1H da 9-hidróxi-4-megastimen-3-ona (incluindo expansão abaixo) em piridina-d5 obtido a 500 MHz.

ANEXO 152

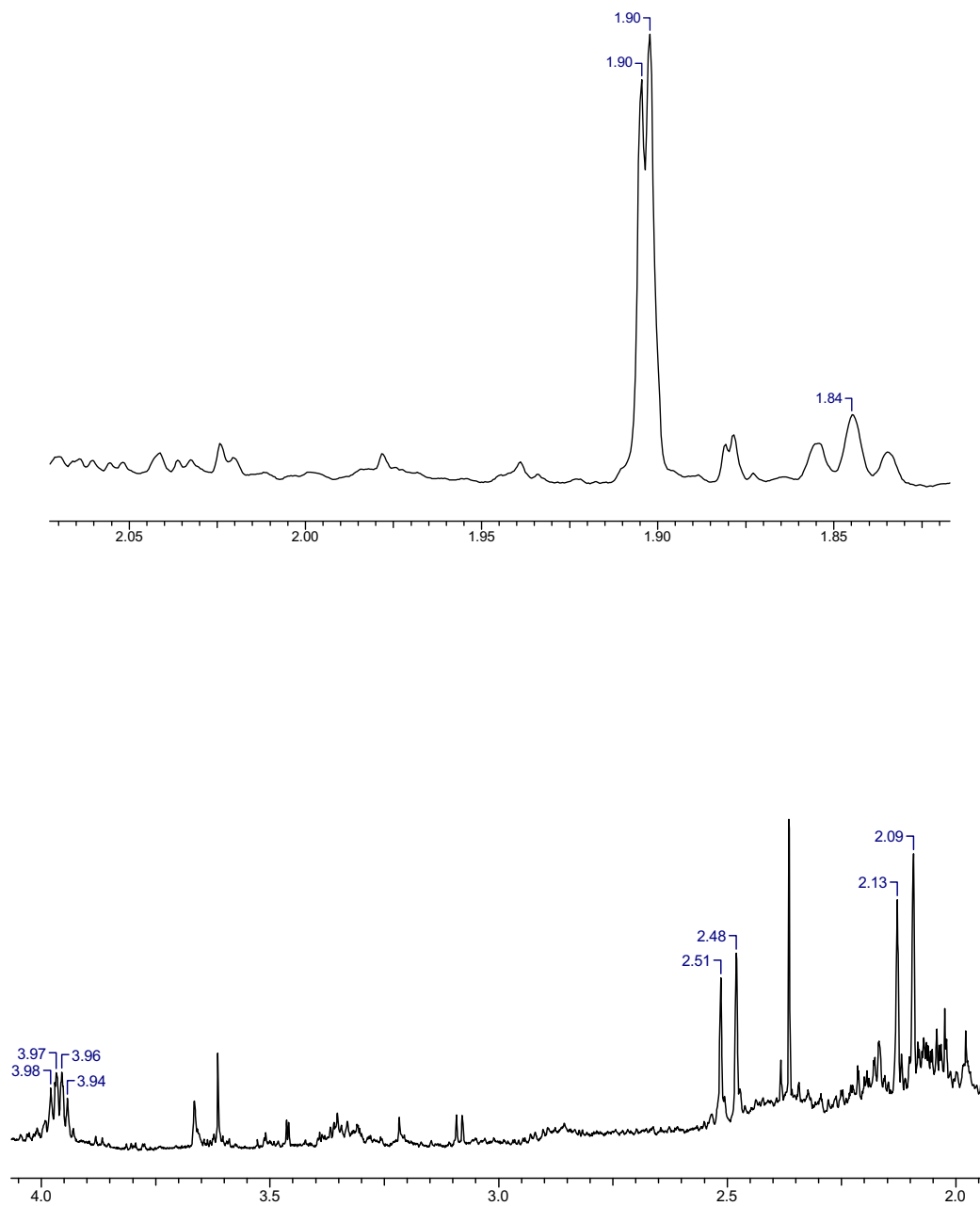


Figura: Expansões do espectro de RMN de ^1H da 9-hidróxi-4-megastimen-3-ona em piridina- d_5 obtido a 500 MHz.

ANEXO 153

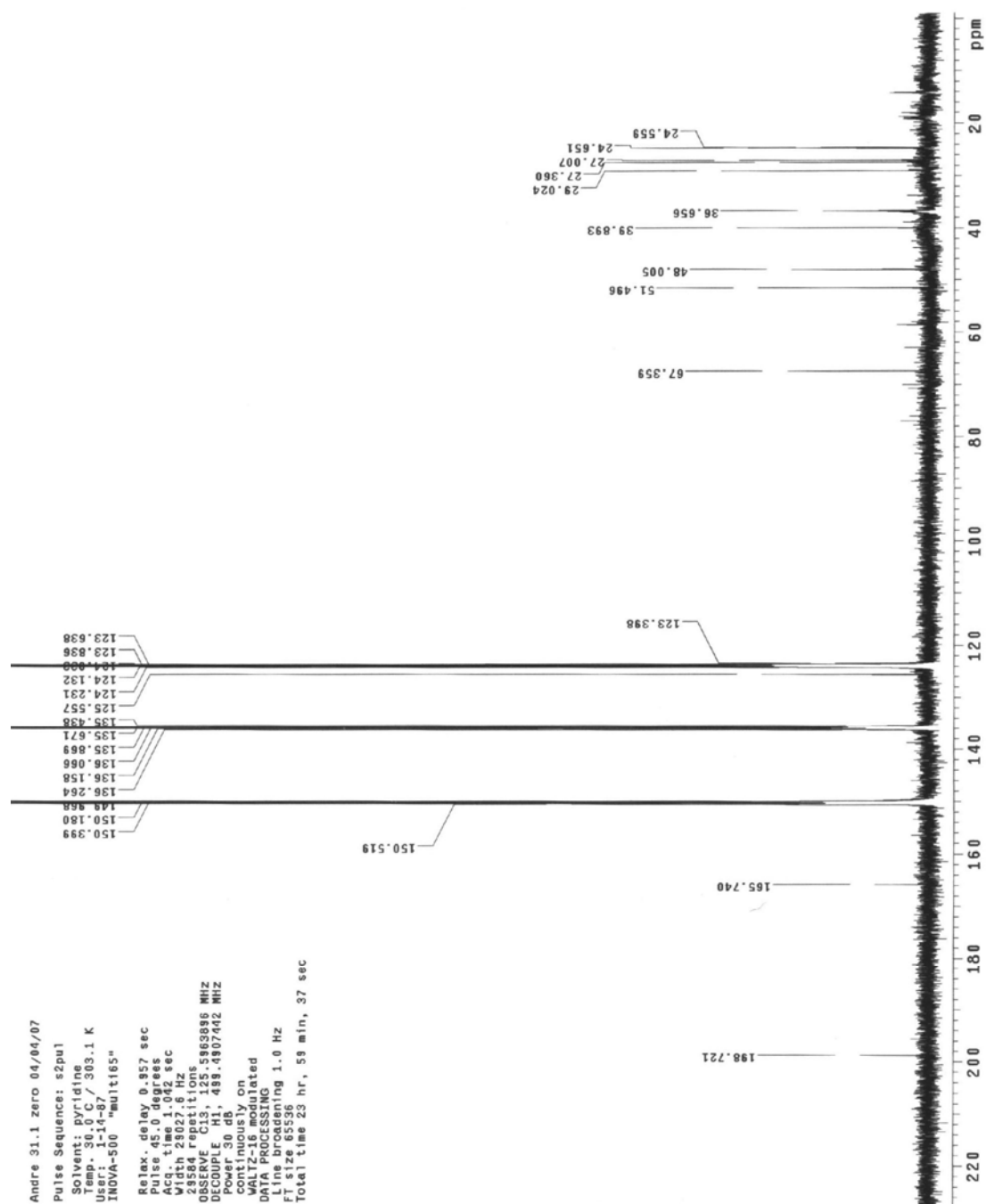


Figura: Espectro de RMN de ^{13}C da 9-hidróxi-4-megastimen-3-ona em piridina-d5 obtido a 125 MHz.

ANEXO 154

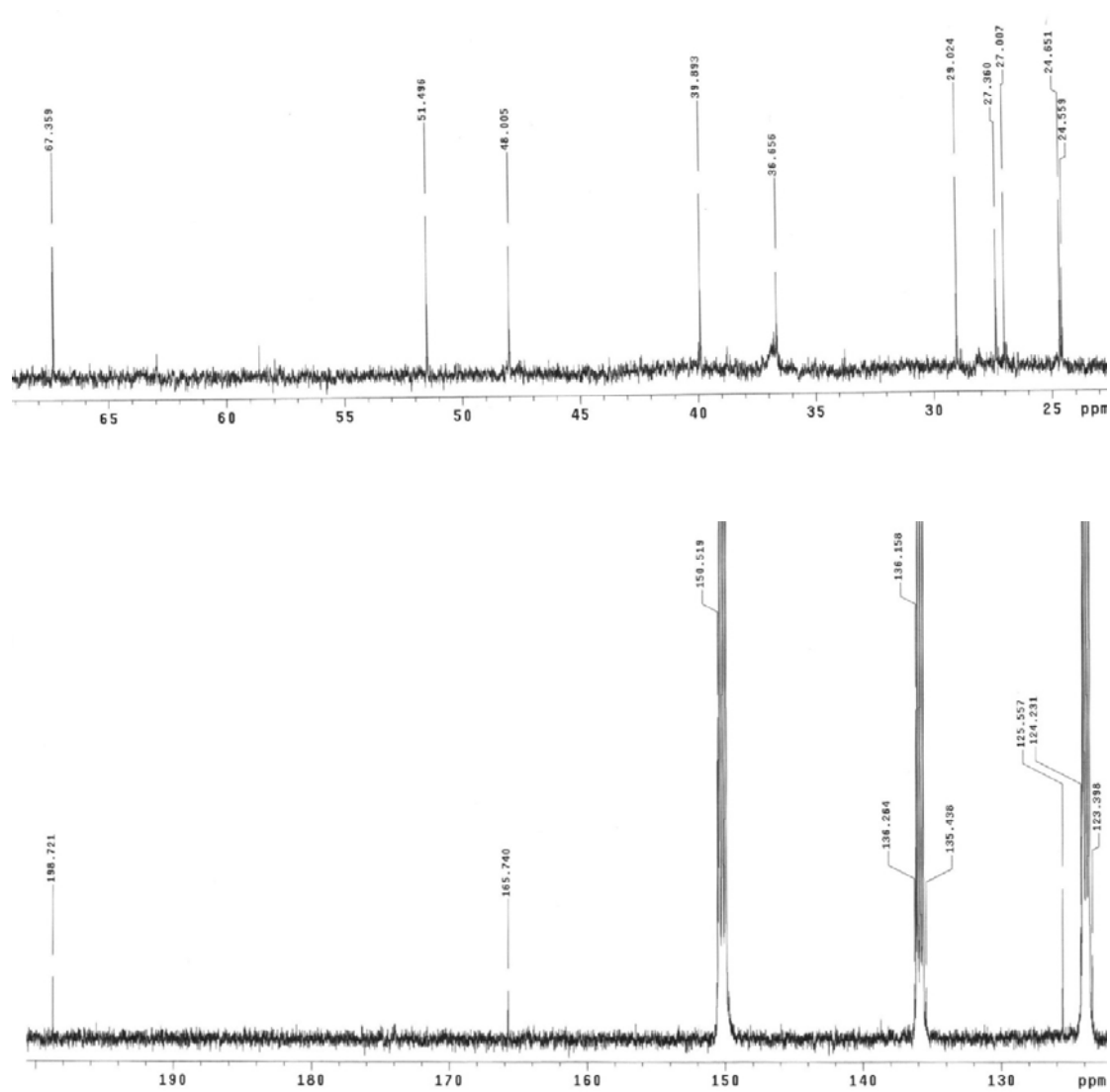


Figura: Expansões do espectro de RMN de ^{13}C da 9-hidróxi-4-megastimen-3-ona em piridina- d_5 obtido a 125 MHz.

ANEXO 155

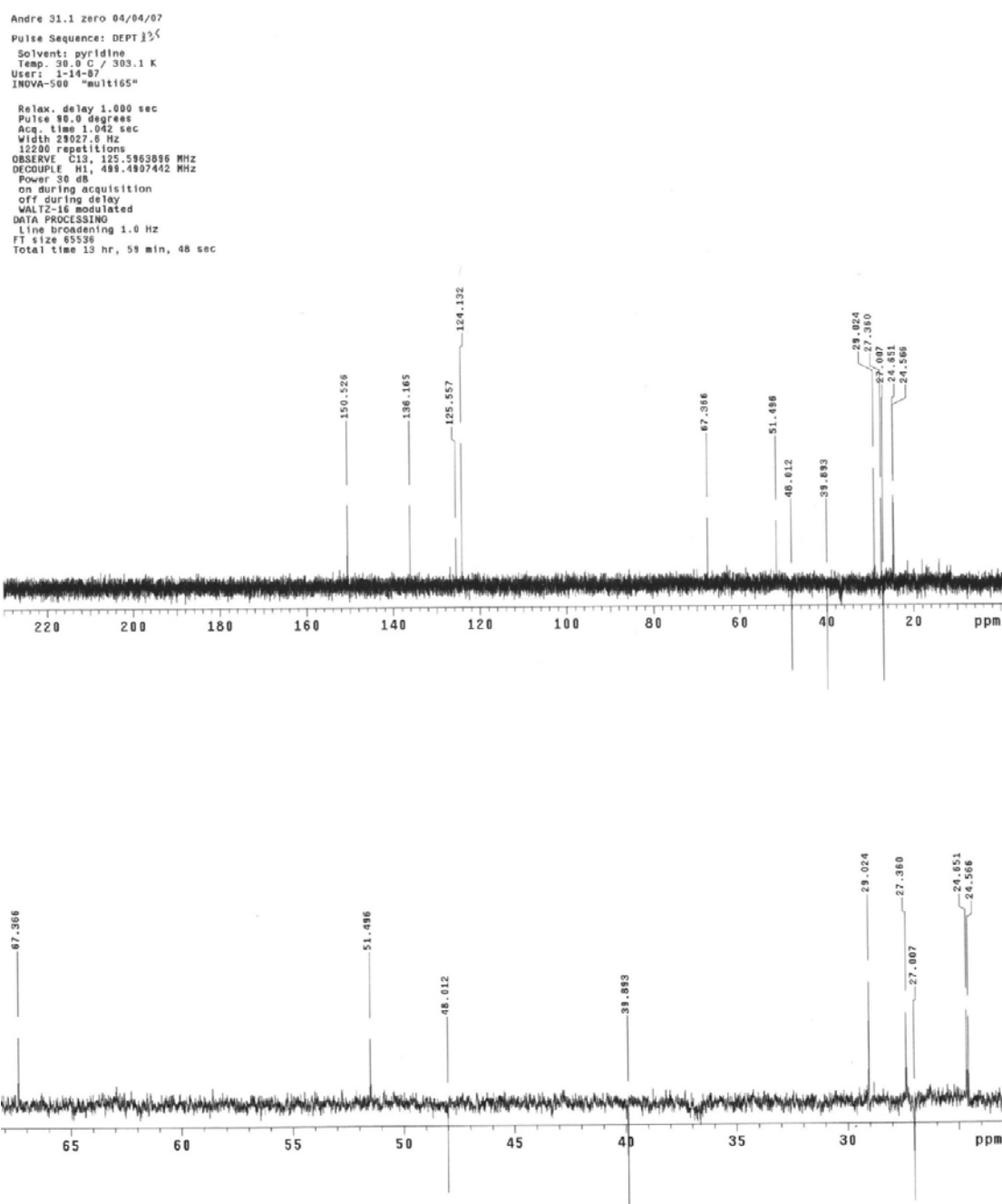


Figura: Espectro de DEPT135^o da 9-hidr3xi-4-megastimen-3-ona (incluindo expans3o abaixo) em piridina-d5 obtido a 125 MHz.

ANEXO 156

```
Andre 31.1 zero 04/04/07
Pulse Sequence: DEPT90
Solvent: pyridine
Temp. 30.0 C / 303.1 K
User: 1-14-07
INOVA-500 "mult165"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 90.0 degrees
Acq. time 1.042 sec
Width 29027.6 Hz
12200 repetitions
OBSERVE C13, 125.5963886 MHz
DECOUPLE H1, 499.4907442 MHz
Power 30 dB
on during acquisition
off during delay
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 65536
Total time 13 hr, 59 min, 48 sec
```

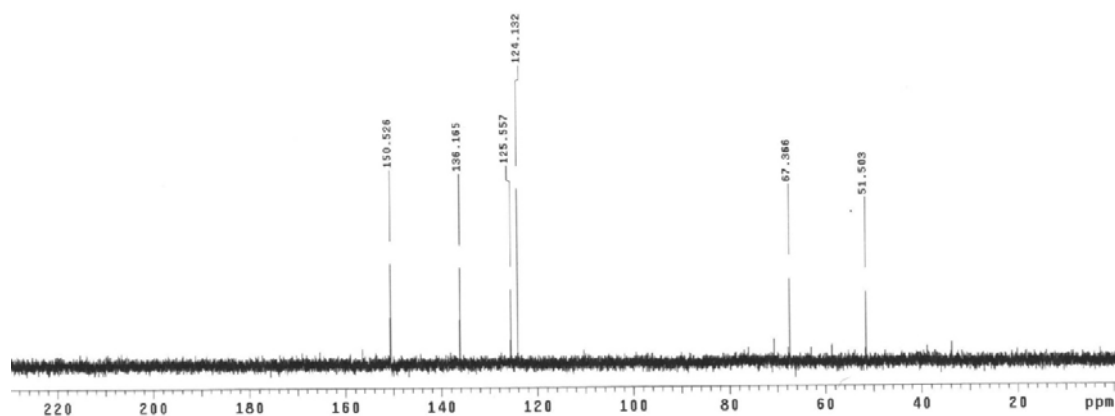


Figura: Espectro de DEPT90^o da 9-hidróxi-4-megastimen-3-ona em piridina-d5 obtido a 125 MHz.

ANEXO 157

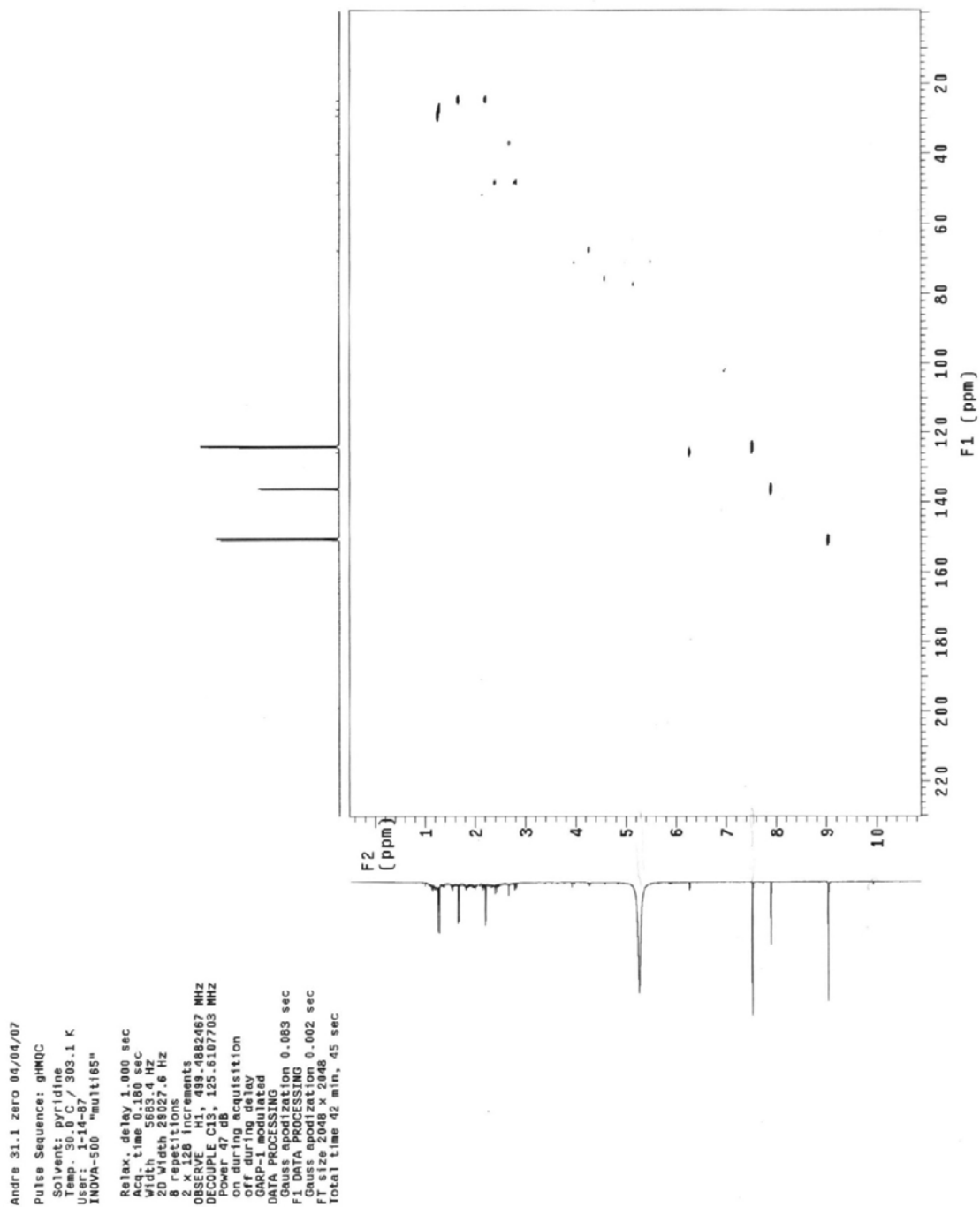


Figura: Mapa de contornos HMQC da 9-hidróxi-4-megastimen-3-ona (piridina-d5, 11,7 T).

ANEXO 158

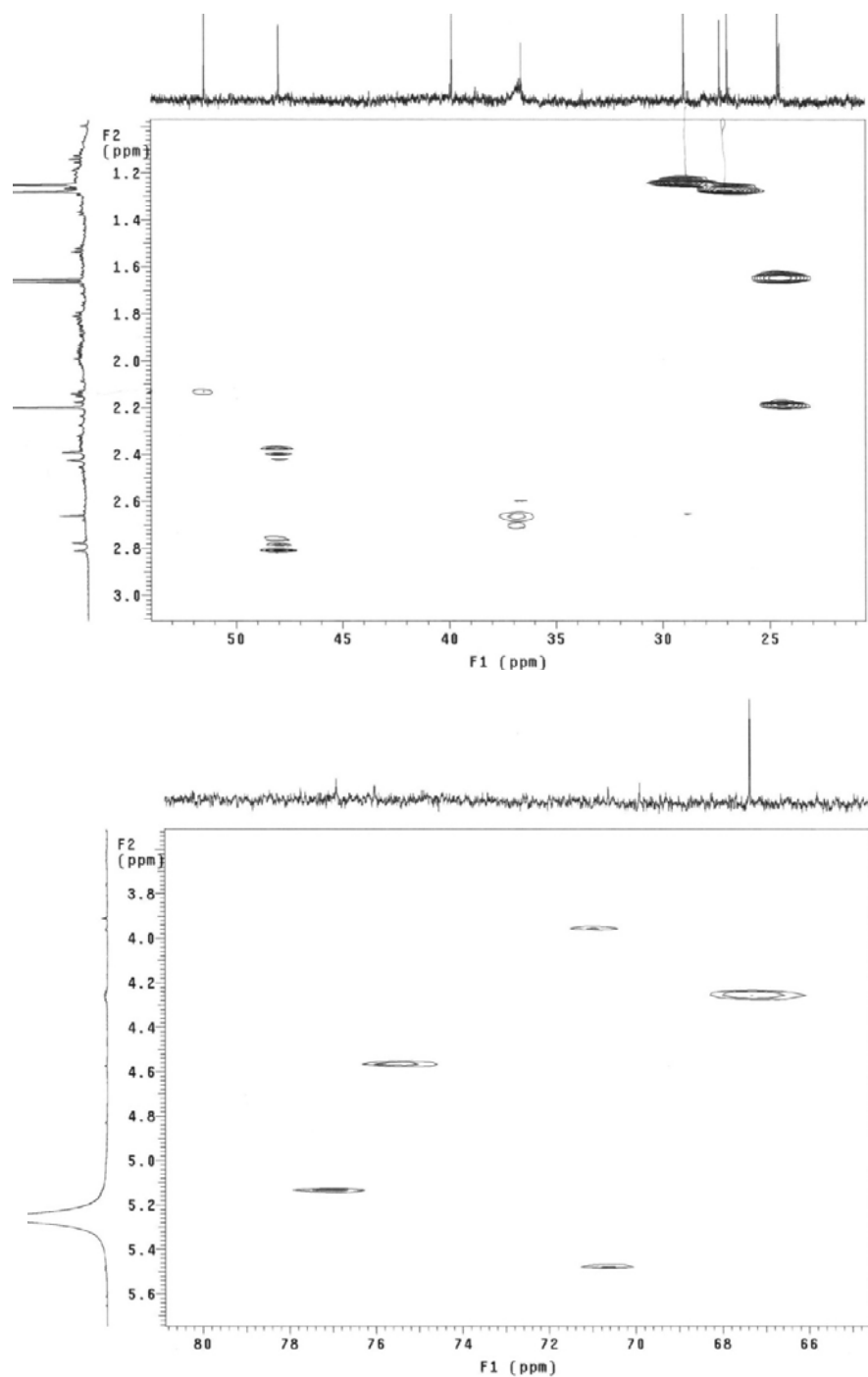


Figura: Expansões do mapa de contornos HMQC da 9-hidróxi-4-megastimen-3-ona (piridina- d_5 , 11,7 T).

ANEXO 159

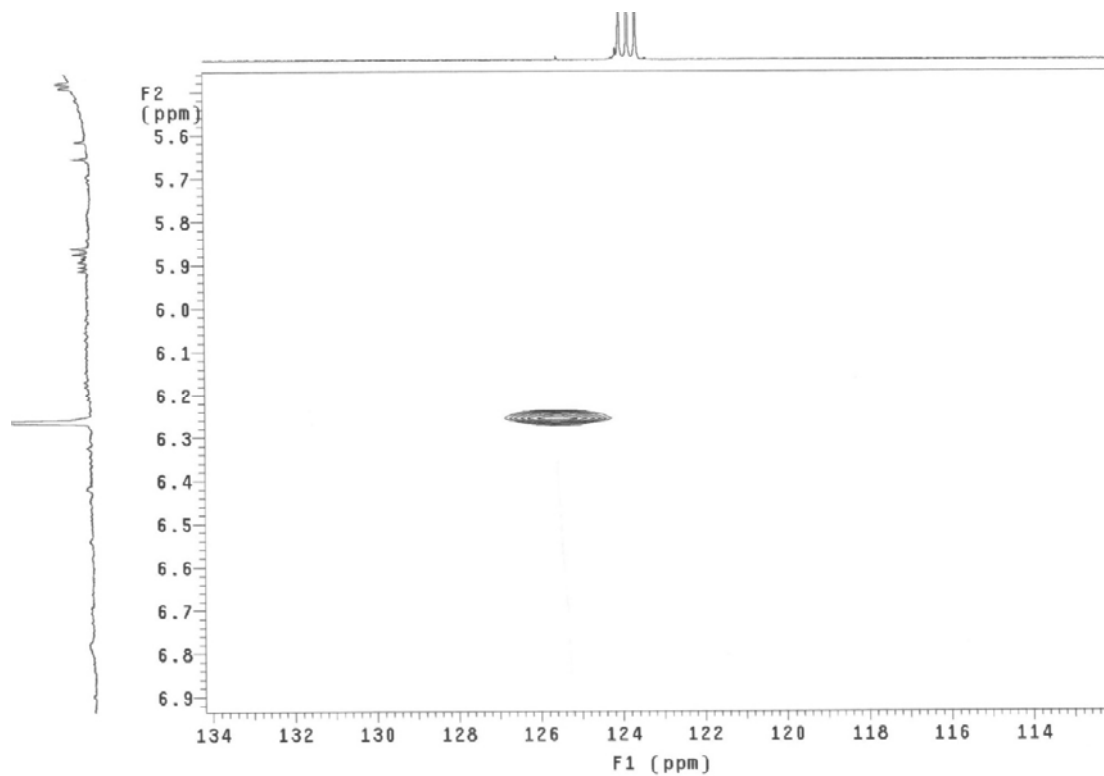


Figura: Expansão do mapa de contornos HMQC da 9-hidróxi-4-megastimen-3-ona (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 160

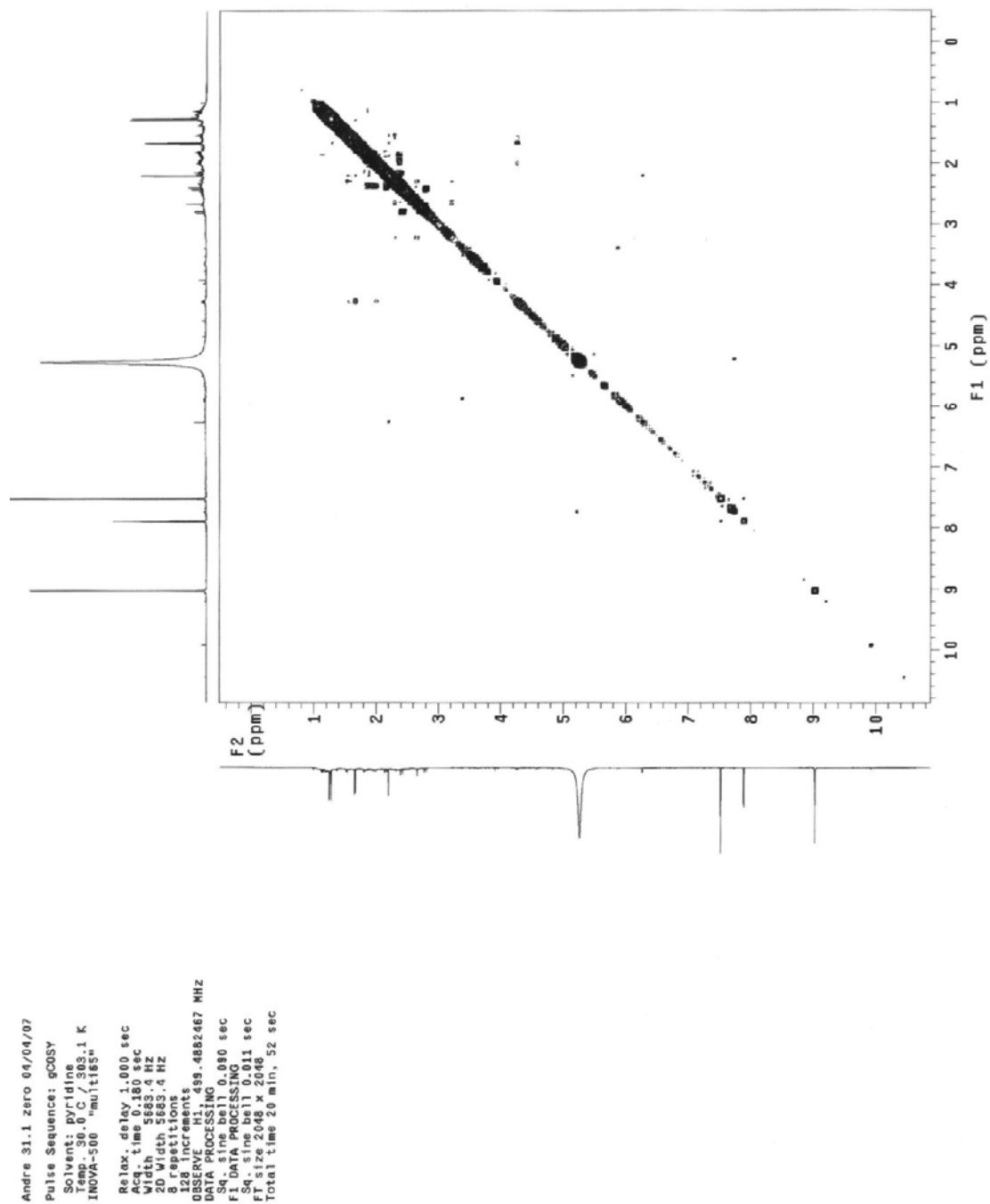


Figura: Mapa de contornos COSY da 9-hidróxi-4-megastimen-3-ona (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 161

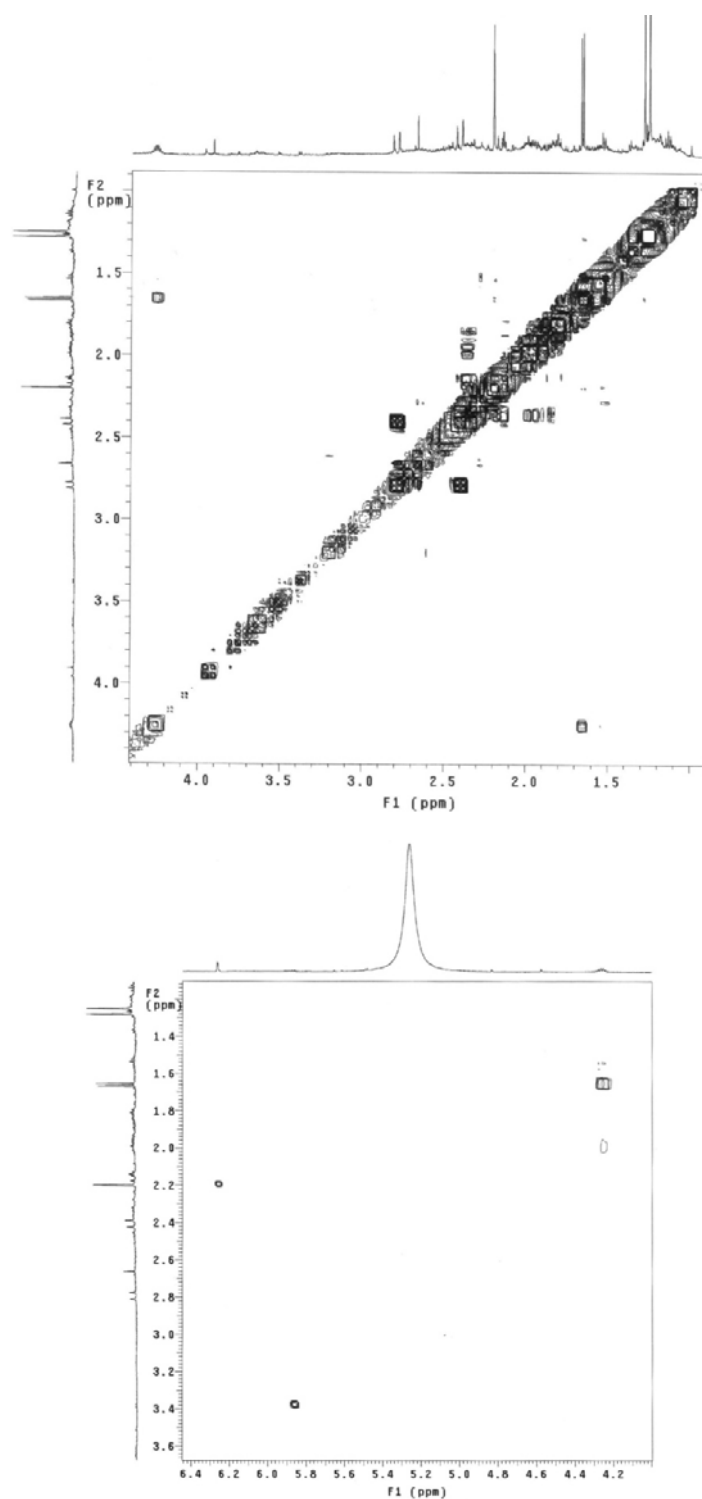


Figura: Expansões do mapa de contornos COSY da 9-hidróxi-4-megastimen-3-ona (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 162

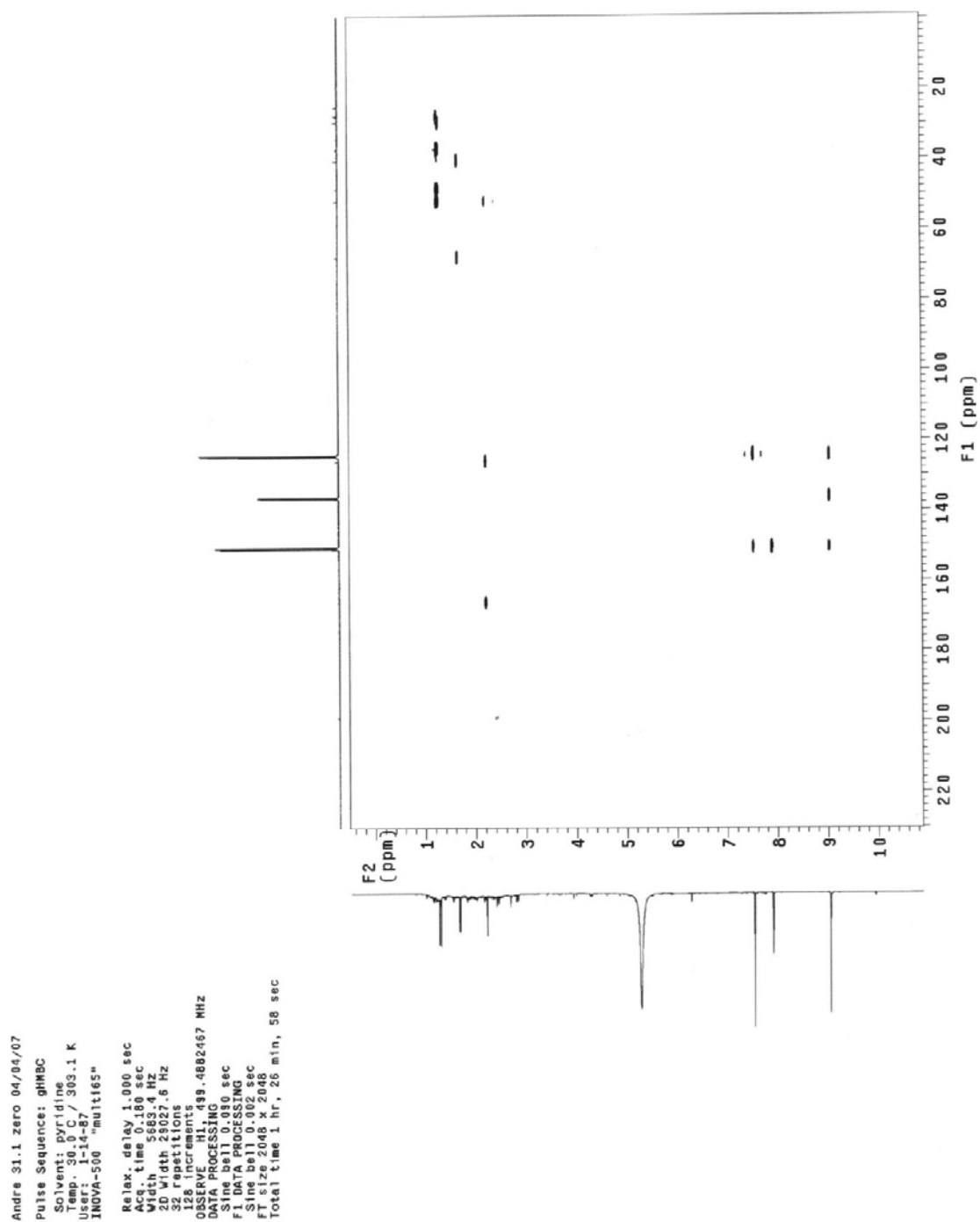


Figura: Mapa de contornos HMBC da 9-hidróxi-4-megastimen-3-ona (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 163

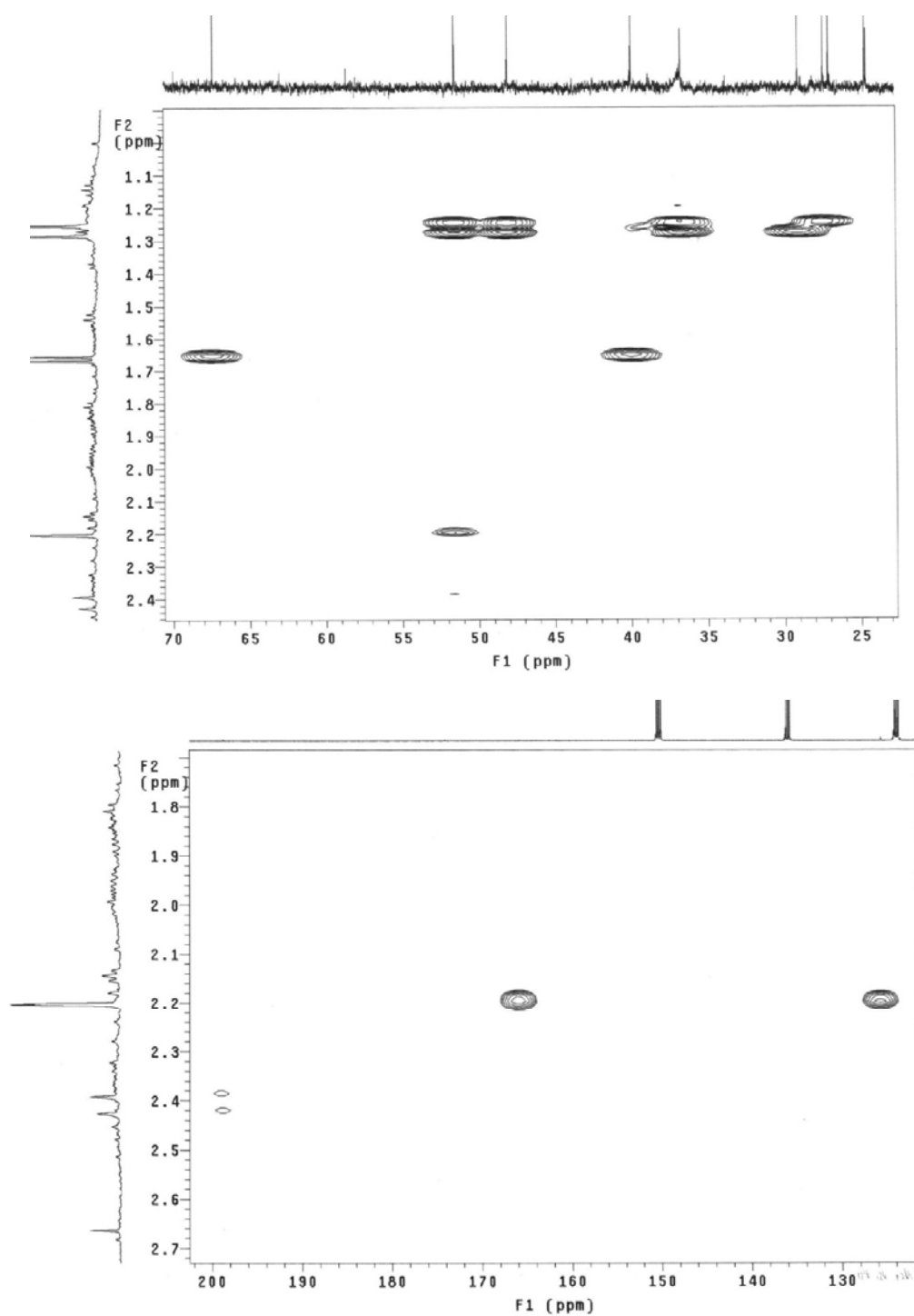


Figura: Expansões do mapa de contornos HMBC da 9-hidróxi-4-megastimen-3-ona (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 164

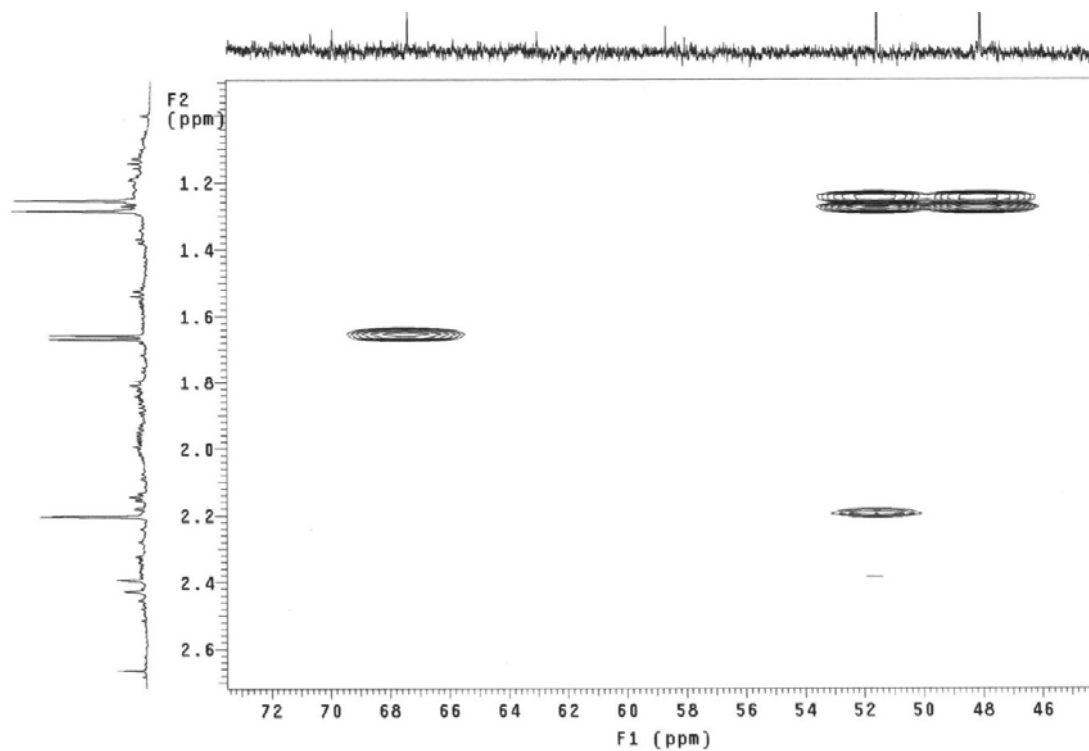


Figura: Expansão do mapa de contornos HMBC da 9-hidróxi-4-megastimen-3-ona (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 165

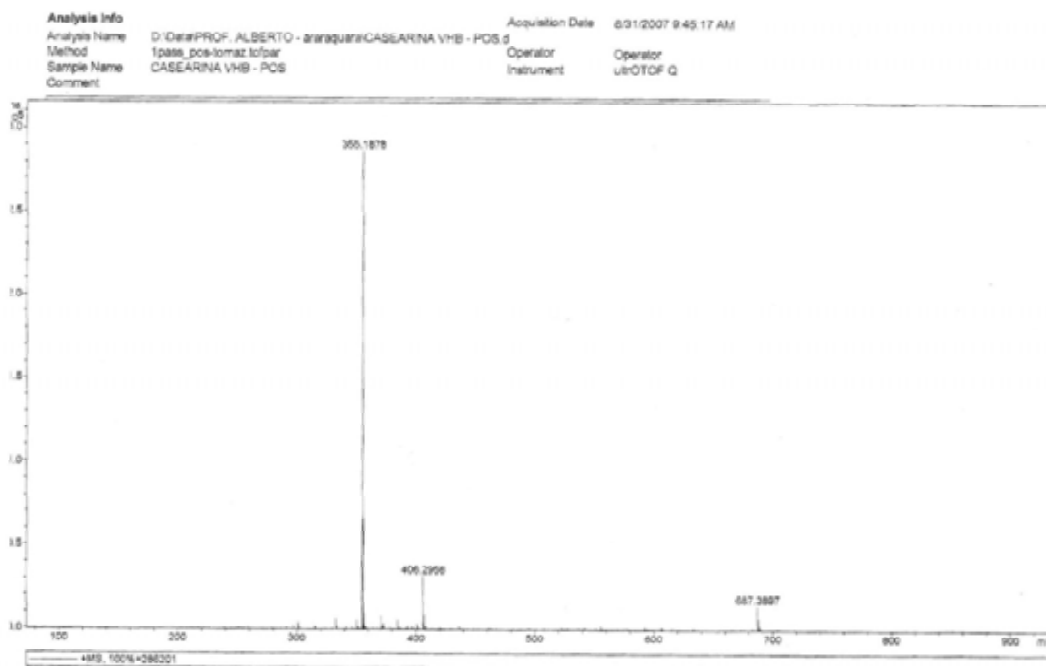


Figura A: Espectro de massas de alta resolução (HRTOF-ESIMS) da caseargrewiina Fhb.

Channel Range: 218.55 to 400.26 nm Absorbance Range: 0.0001 to 1.1531 AU

Max Wavelength(nm): 235.00
Percent of Max Abs.: 100.0%

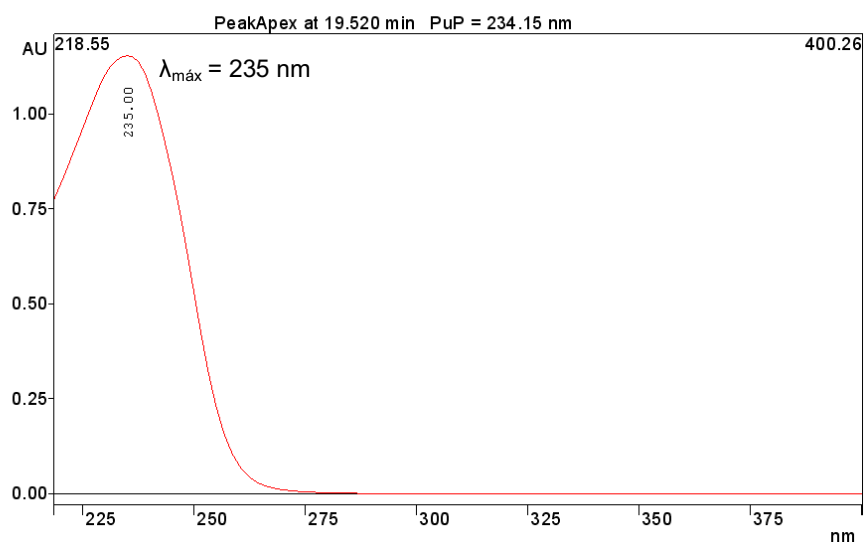


Figura B: Espectro de absorção no UV da caseargrewiina Fhb obtido pela análise em CLAE-DAD. Condições de análise na Tabela 7.

ANEXO 166

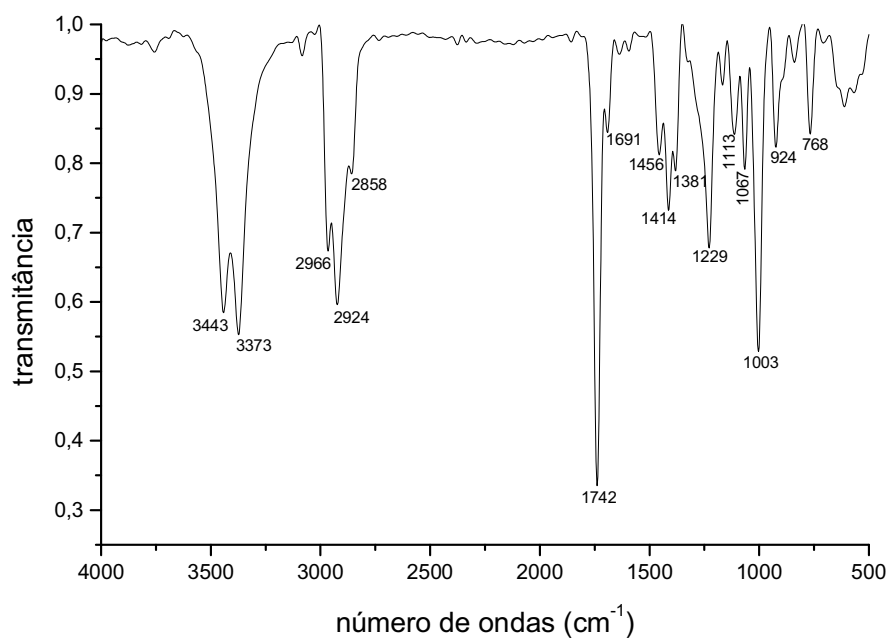


Figura: Espectro de absorção no IV da caseargreina Fhb.

ANEXO 167

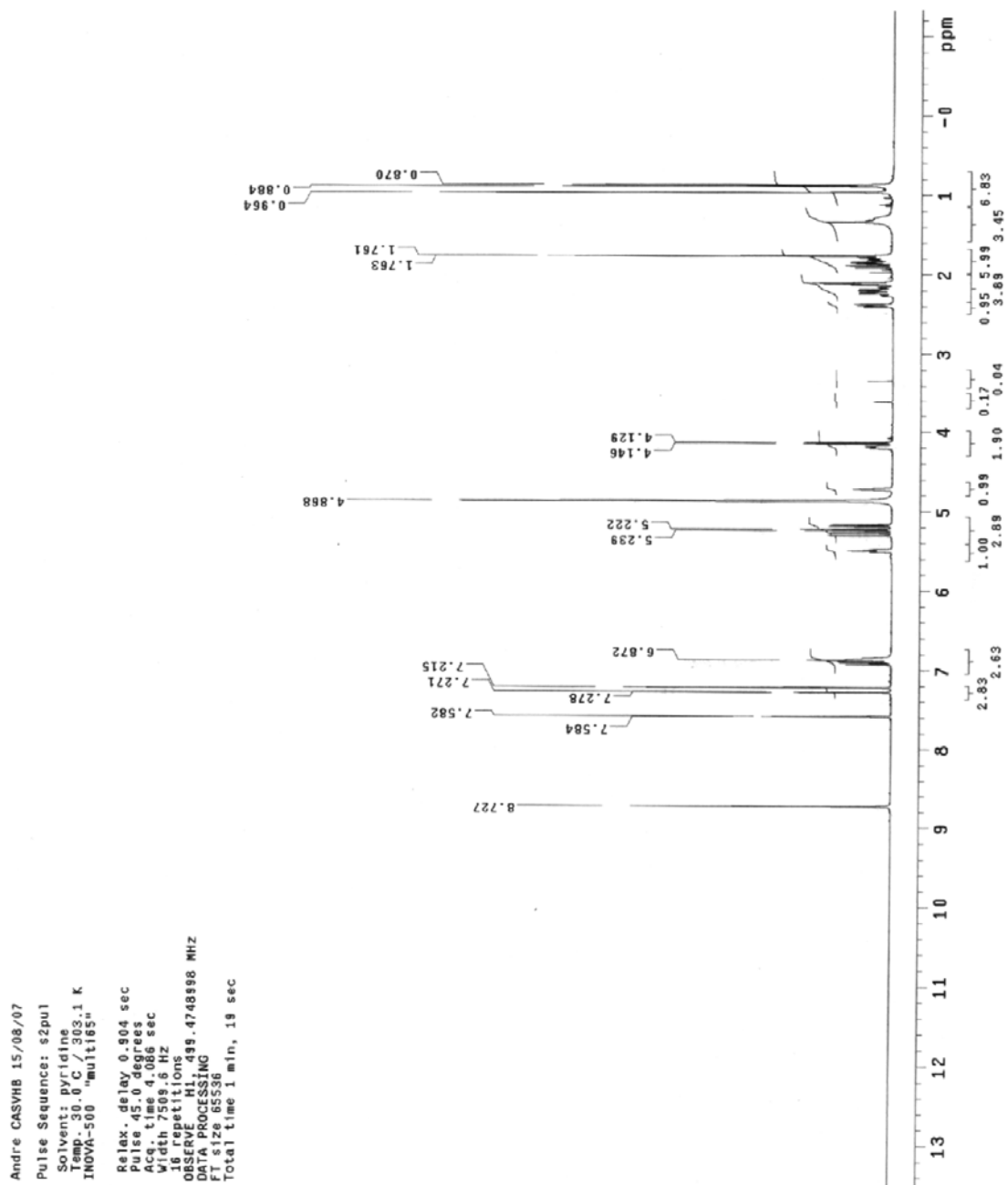


Figura: Espectro de RMN de ^1H da caseargreina Fhb em piridina- d_5 obtido a 500 MHz.

ANEXO 168

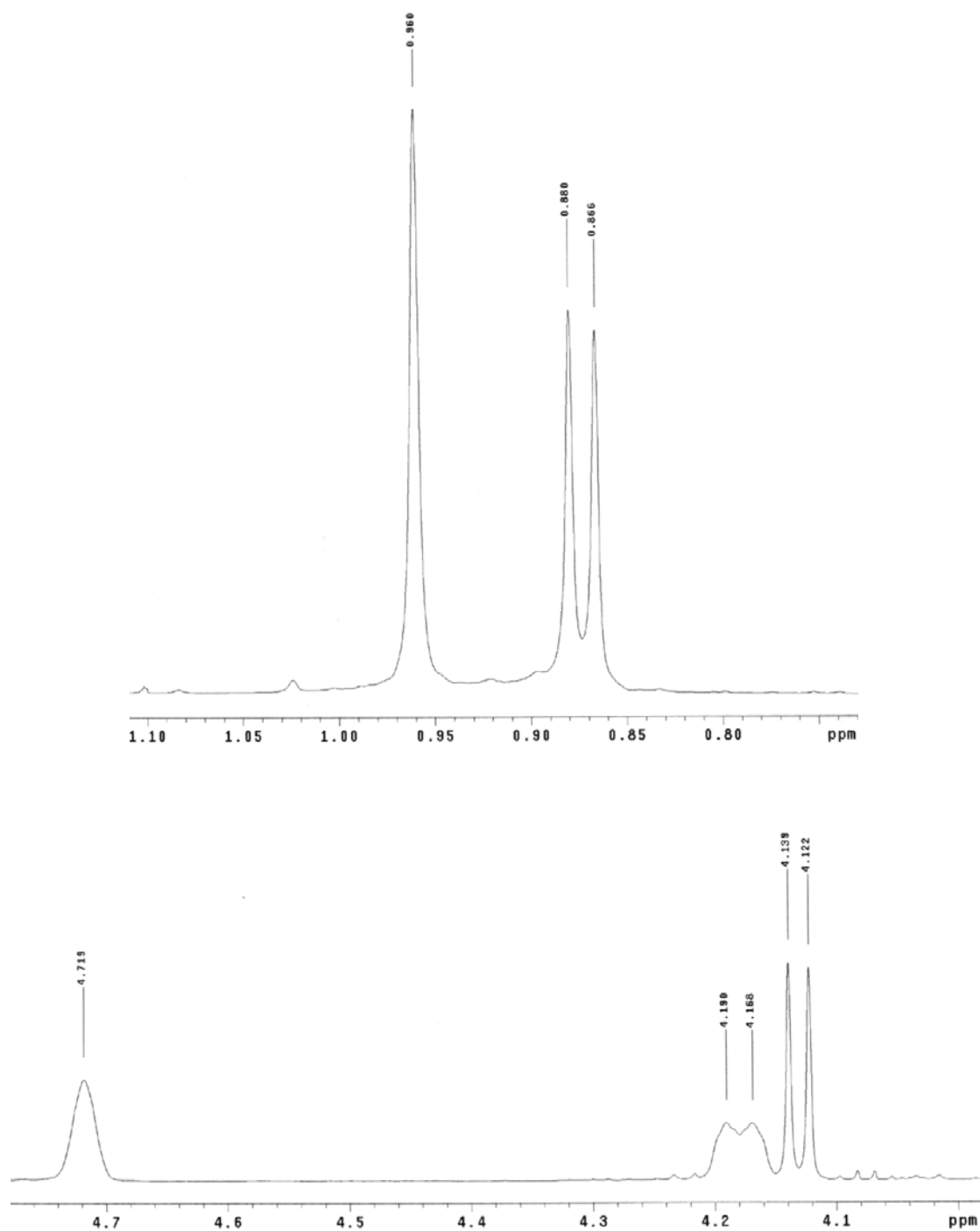


Figura: Expansões do espectro de RMN de ^1H da caseargwiina Fhb em piridina- d_5 obtido a 500 MHz.

ANEXO 169

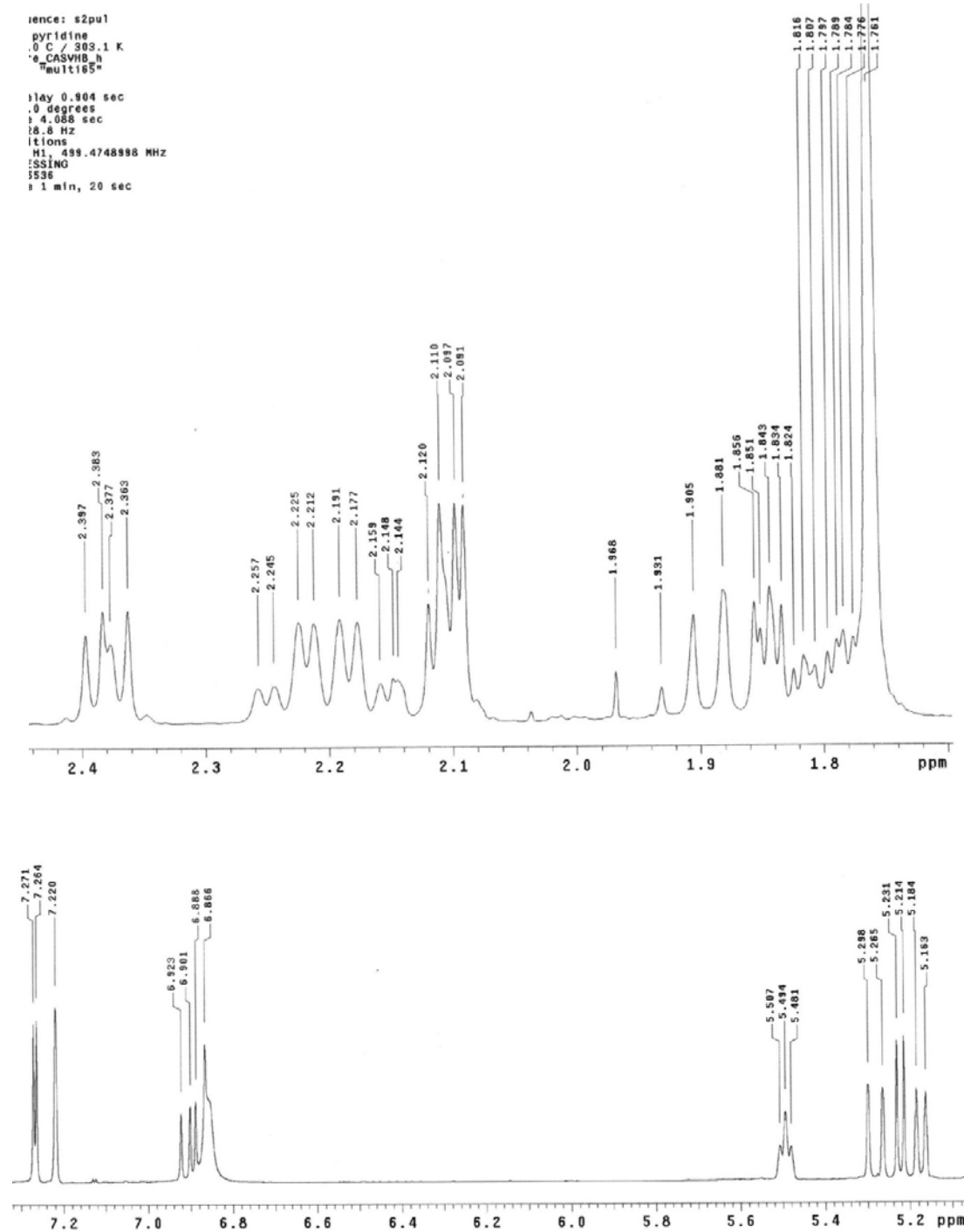


Figura: Expansões do espectro de RMN de ^1H da caseargreina Fhb em piridina- d_5 obtido a 500 MHz.

ANEXO 170

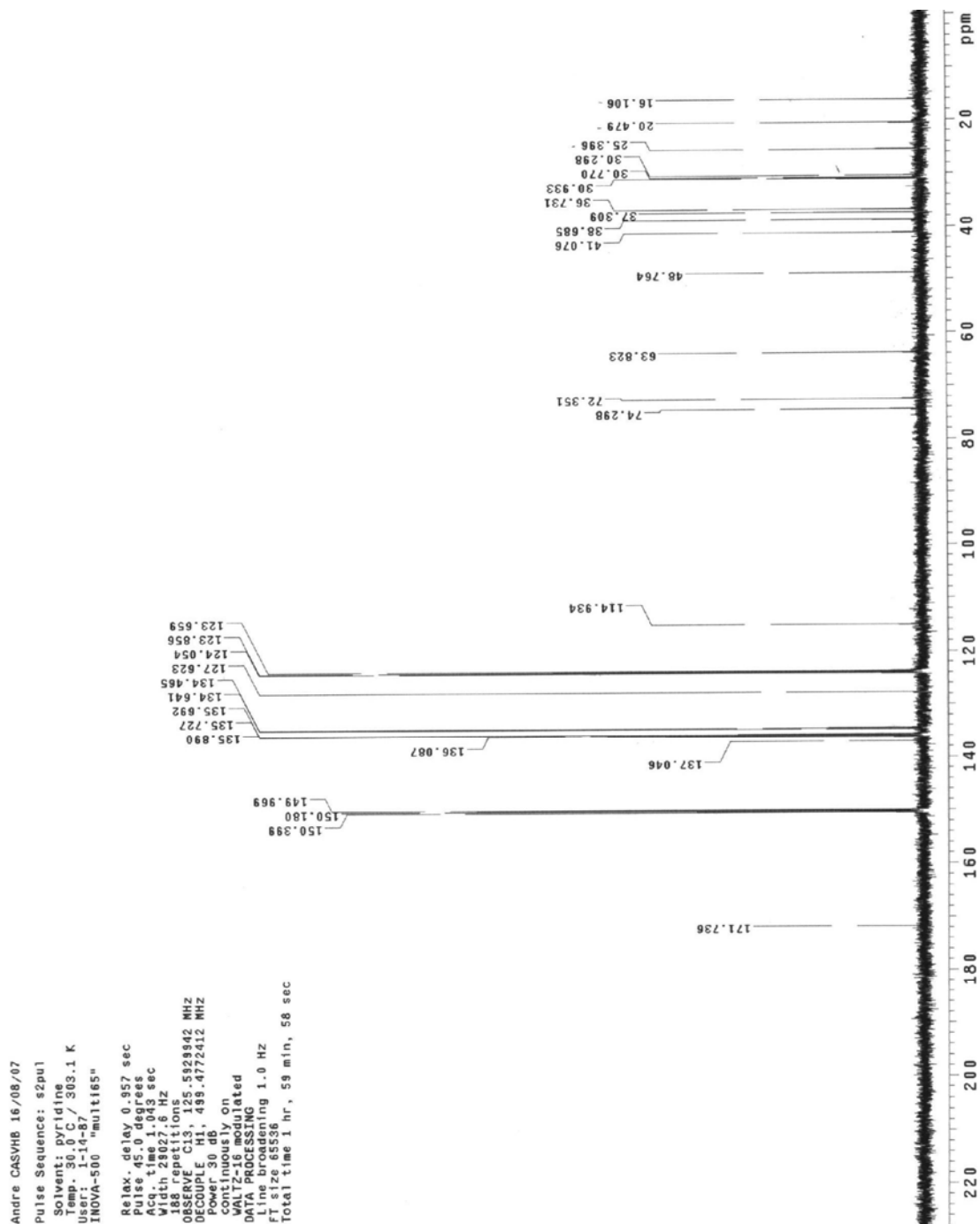


Figura: Espectro de RMN de ^{13}C da caseargreina Fhb em piridina- d_5 obtido a 125 MHz.

ANEXO 171

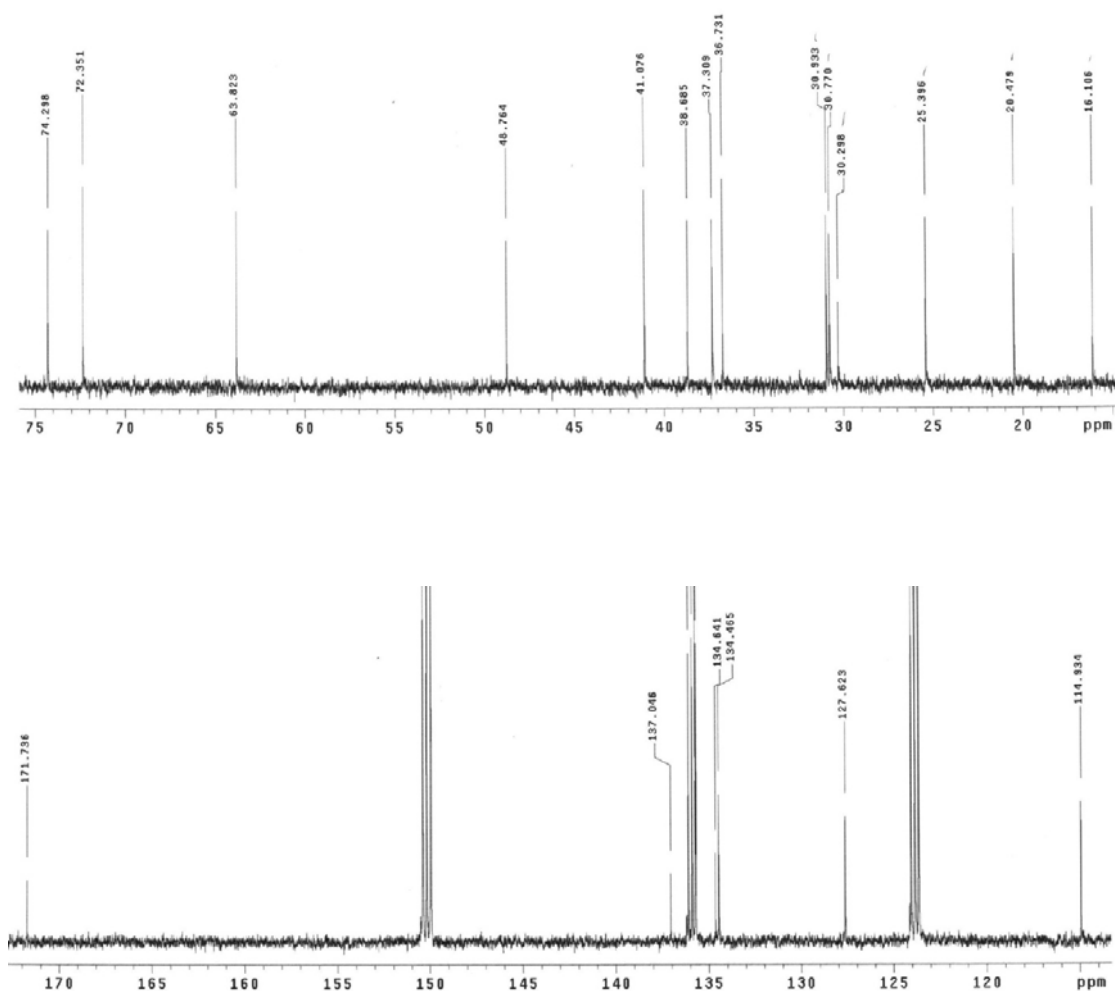


Figura: Expansões do espectro de RMN de ^{13}C da caseargwiina Fhb em piridina- d_5 obtido a 125 MHz.

ANEXO 172

Andre CASVHB 16/08/07
Pulse Sequence: DEPT
Solvent: pyridine
Temp. 30.0 C / 303.1 K
User: 1-14-87
File: andre_CASVHB_dept
INOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 90.0 degrees
Acq. time 1.043 sec
Width 28027.6 Hz
200 repetitions
OBSERVE C13, 125.5928942 MHz
DECOUPLE H1, 499.4772412 MHz
Power 30 dB
On during acquisition
off during delay
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 65536
Total time 28 min, 5 sec

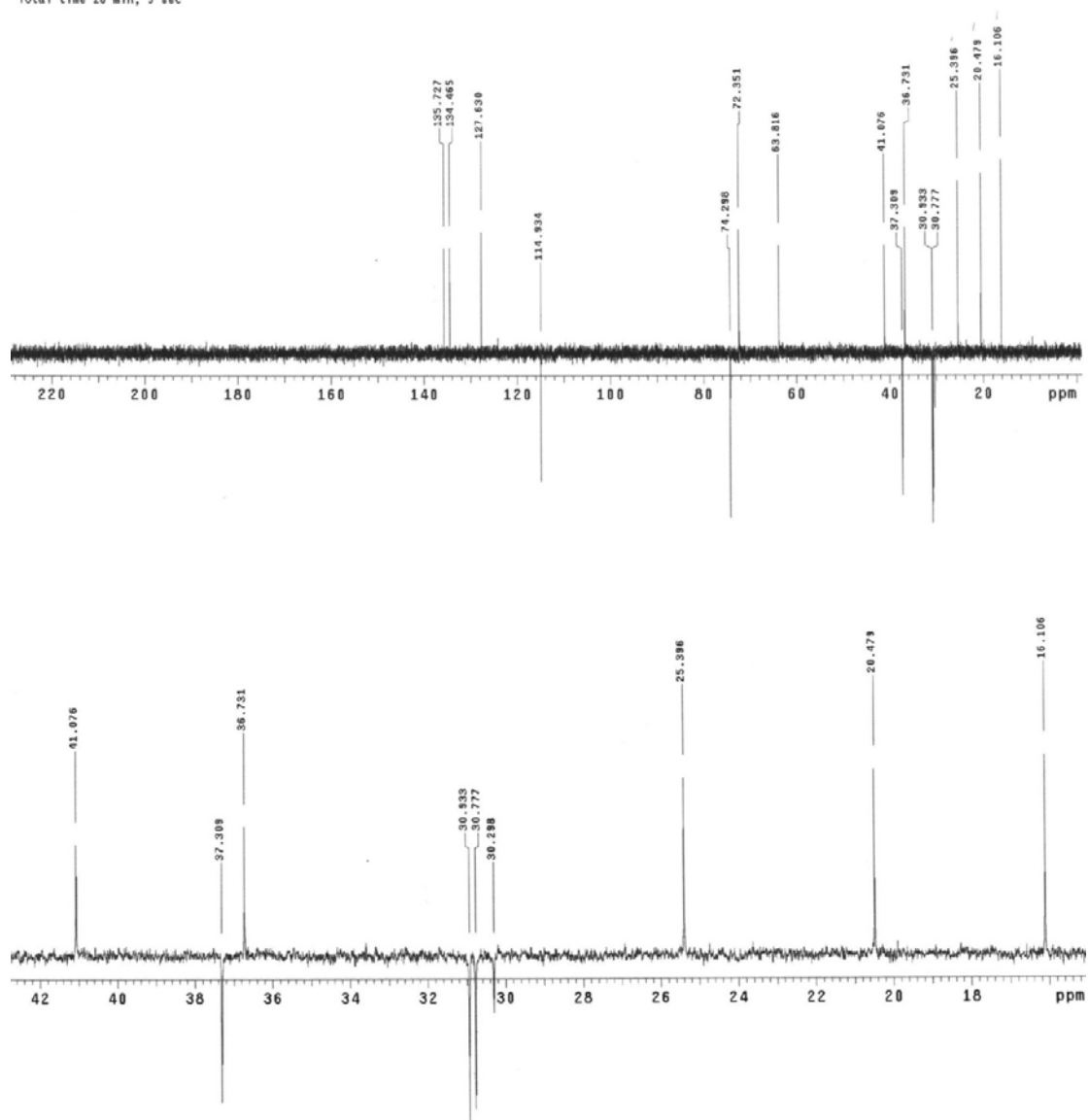


Figura: Espectro de DEPT135^o (incluindo expansão abaixo) da caseargreina Fhb em piridina-d5 obtido a 125 MHz.

ANEXO 173

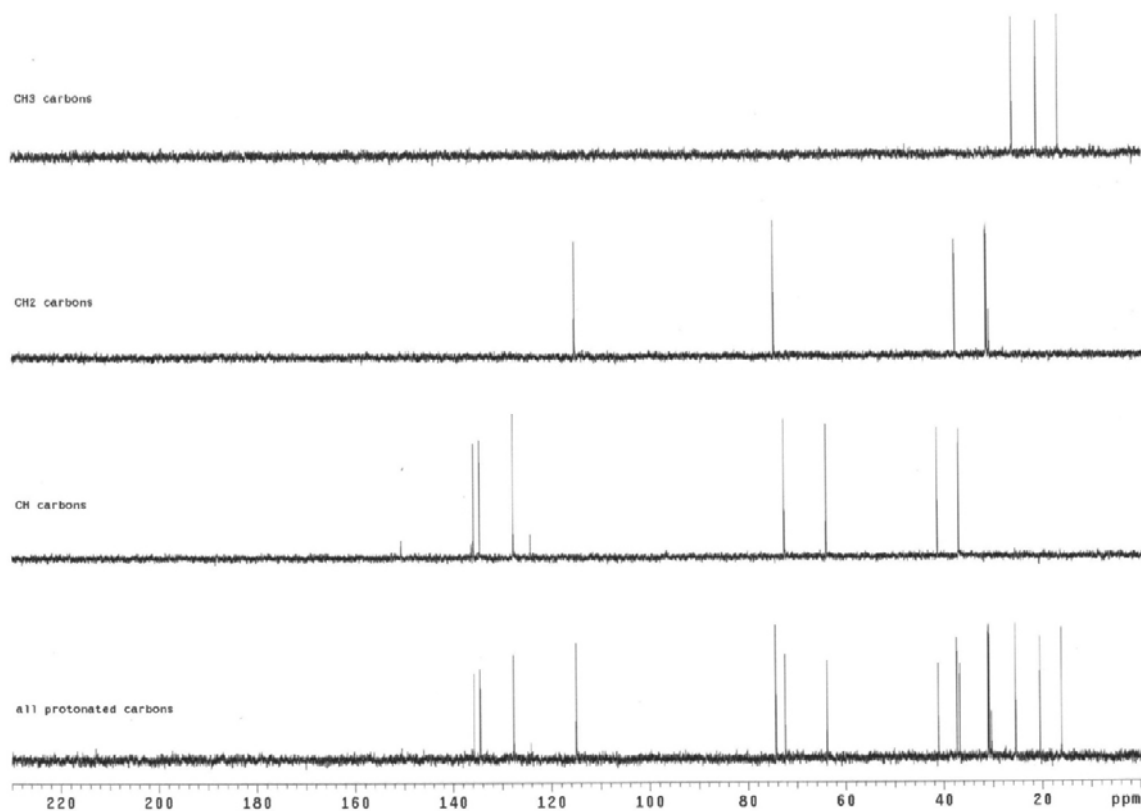


Figura: Espectros simulados a partir dos resultados obtidos nos experimentos de DEPT90 e 135° realizados com a caseargreina Fhb, em piridina- d_5 obtidos a 125 MHz.

ANEXO 174

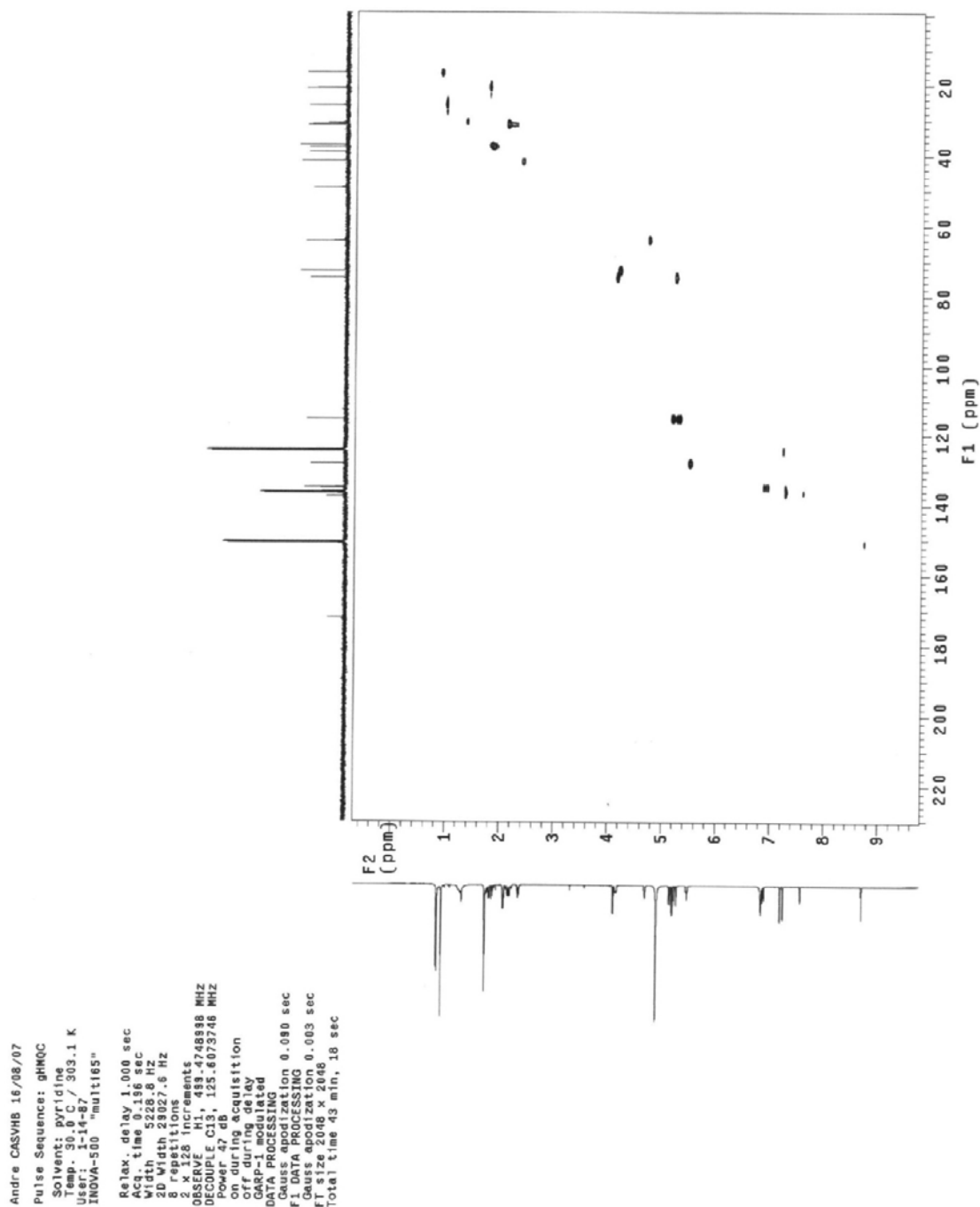


Figura: Mapa de contornos HMQC da caseargrewiina Fhb (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 175

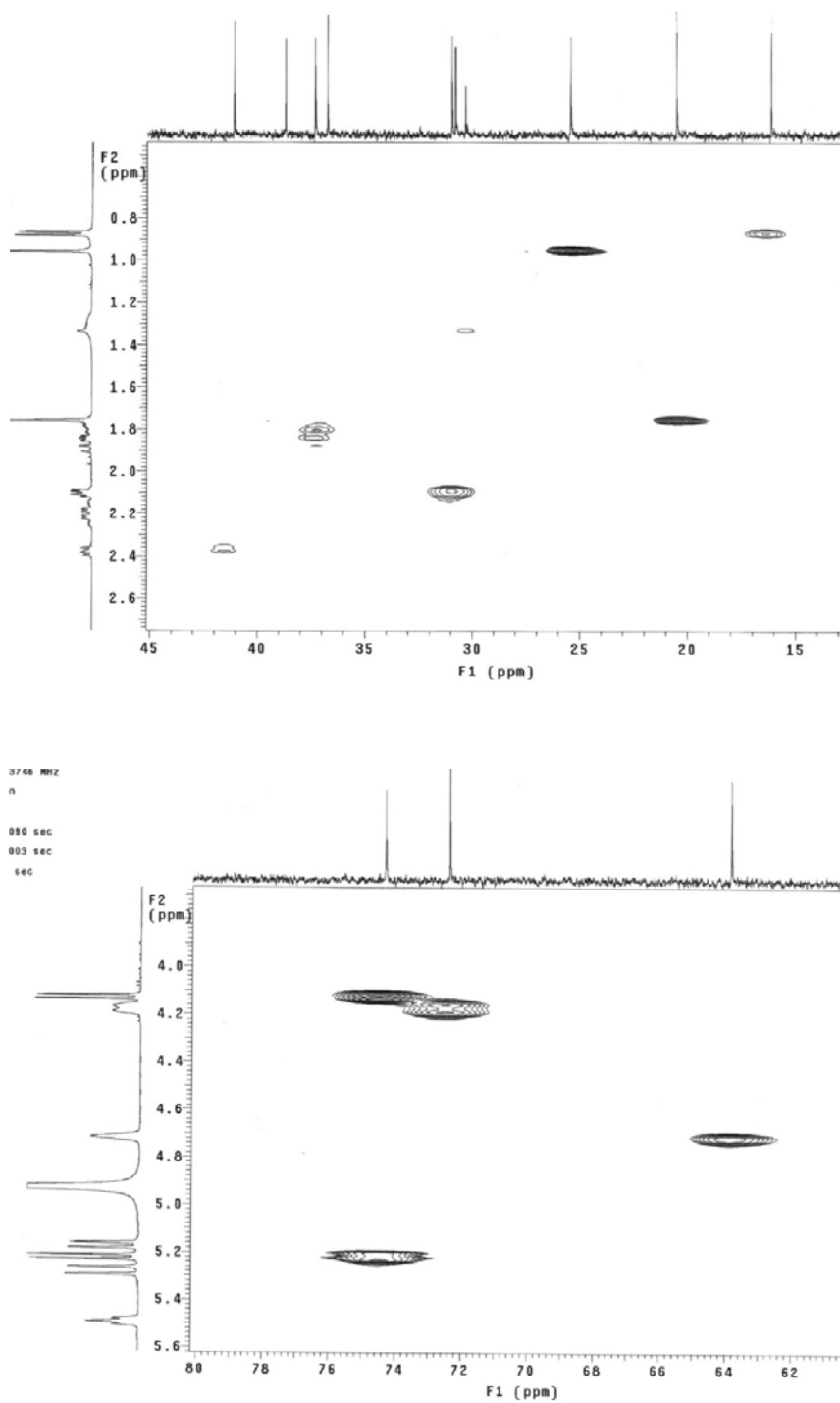


Figura: Expansões do mapa de contornos HMQC da caseargrewiina Fhb (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 176

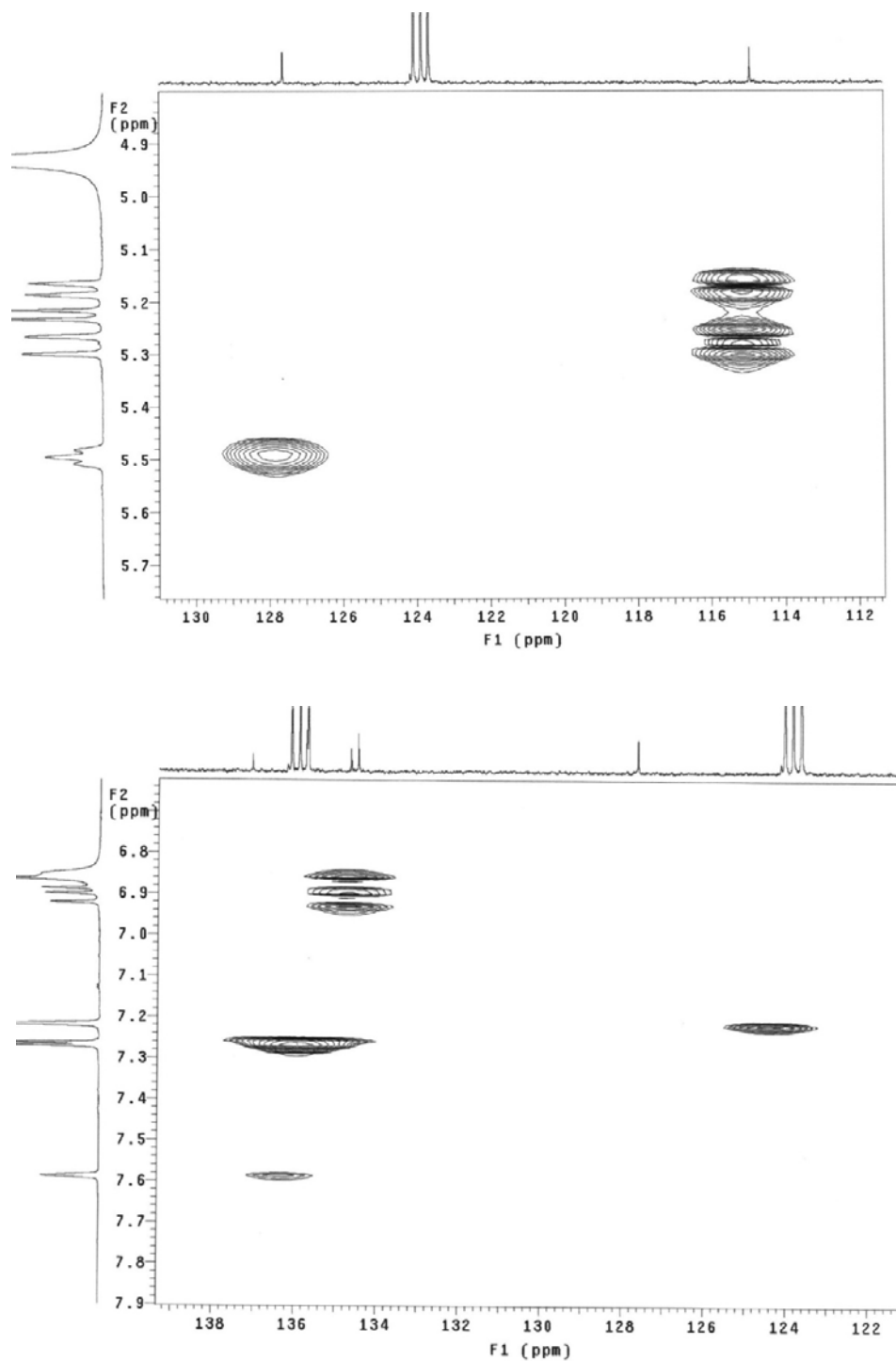


Figura: Expansões do mapa de contornos HMQC da caseargrewiina Fhb (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 177

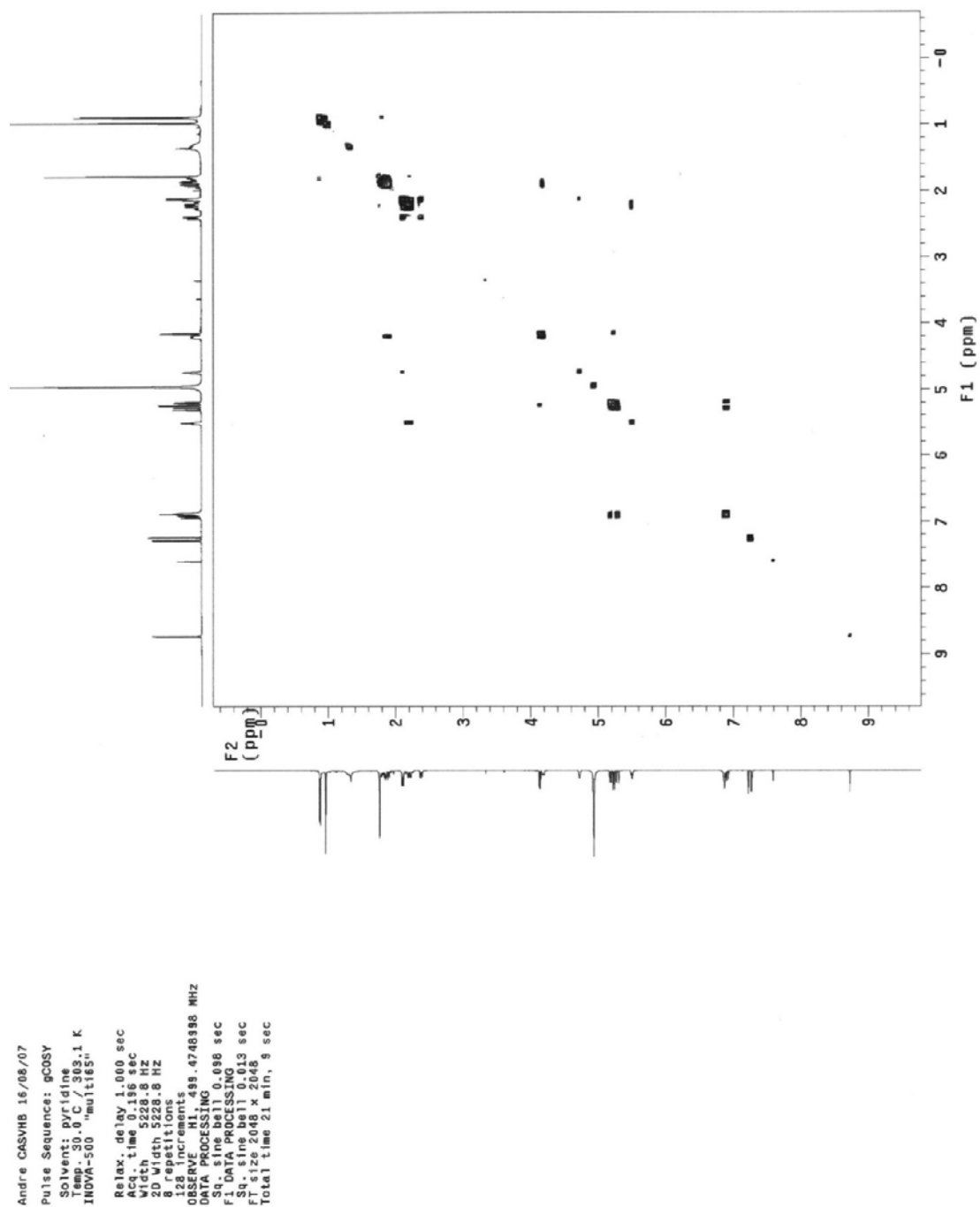


Figura: Mapa de contornos COSY da caseargrewiina Fhb (piridina-d5, 11,7 T).

ANEXO 178

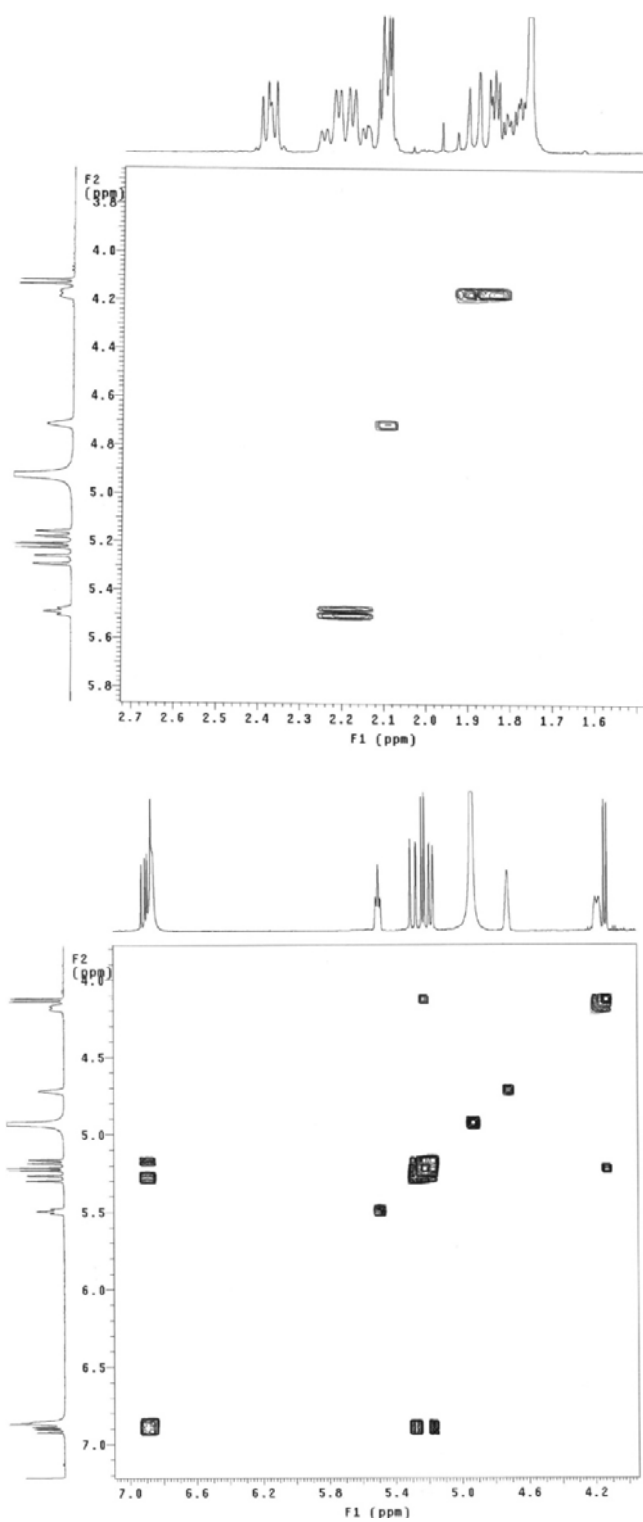


Figura: Expansões do mapa de contornos COSY da caseargreina Fhb (piridina-d5, 11,7 T).

ANEXO 179

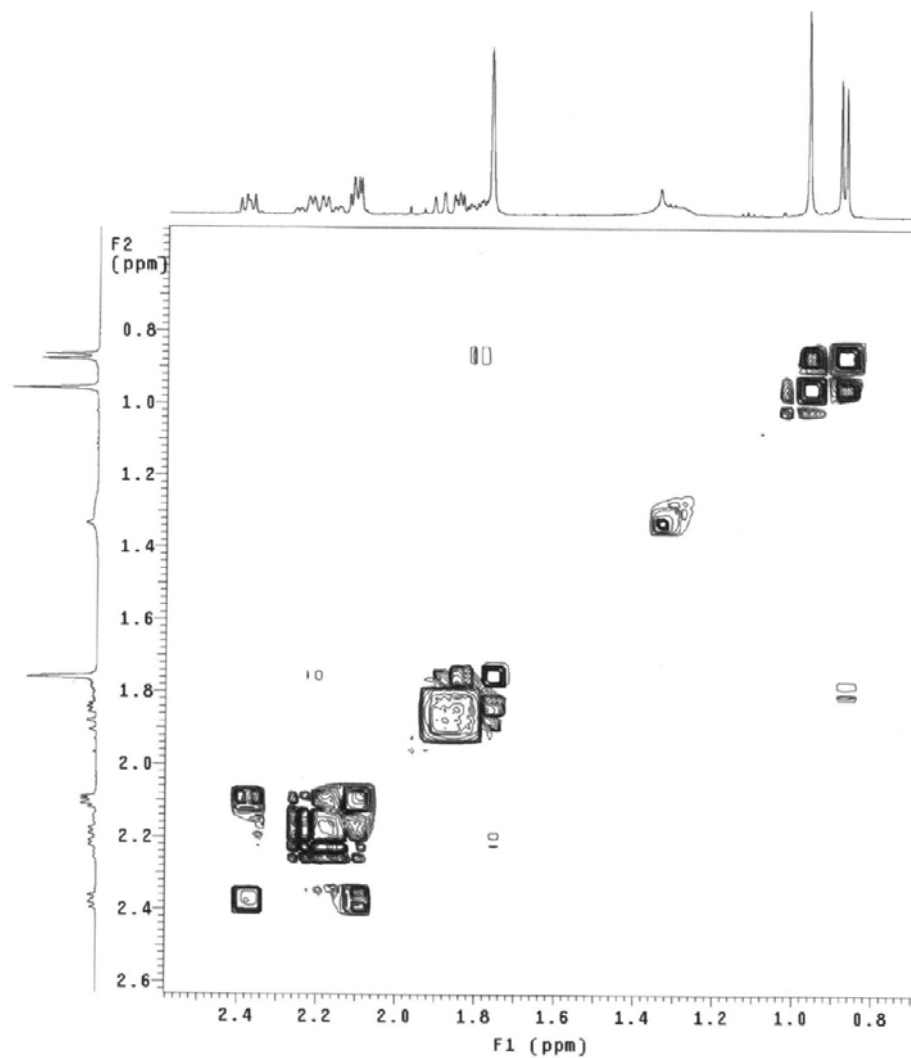


Figura: Expansão do mapa de contornos COSY da caseargrewiina Fhb (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 180

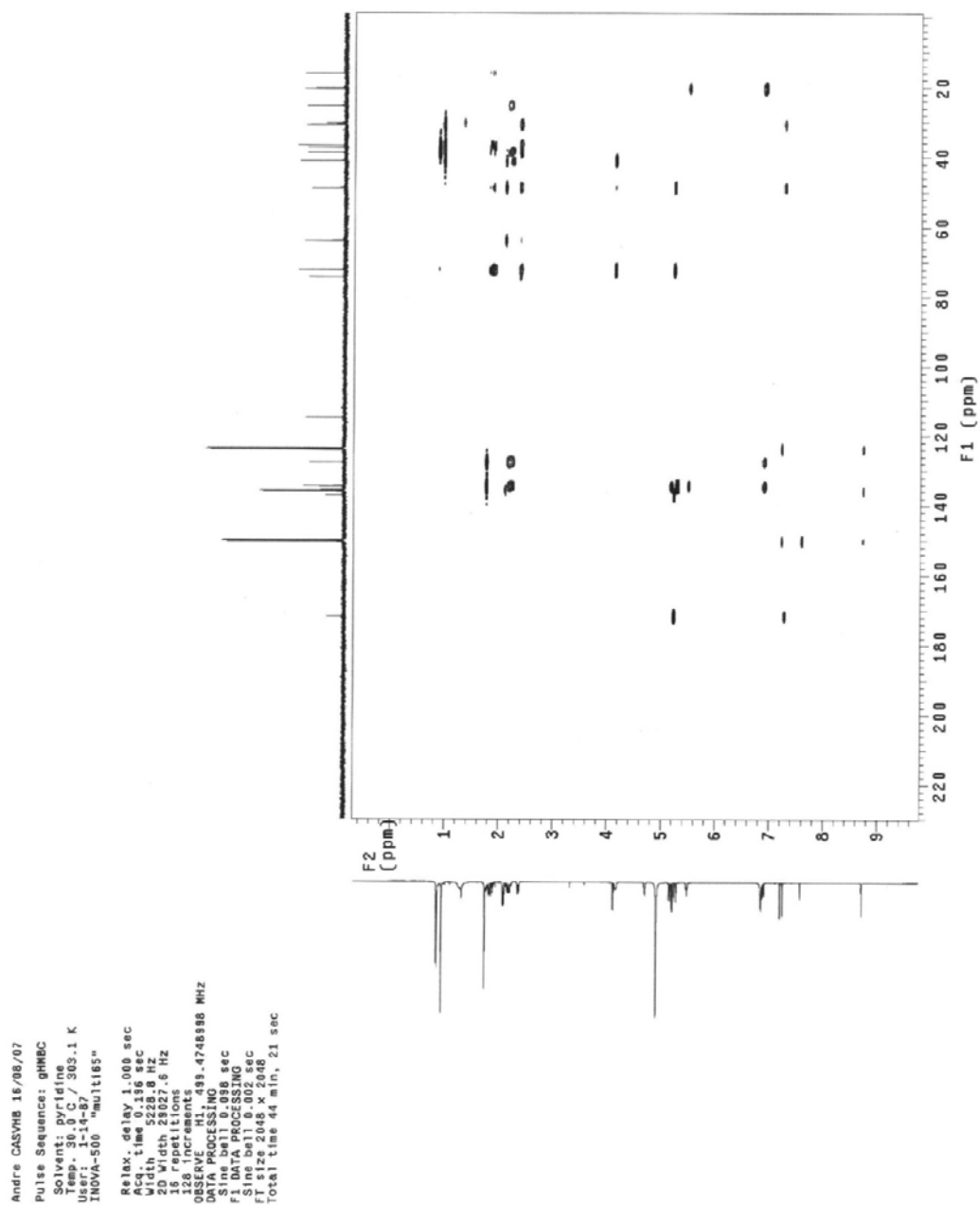


Figura: Mapa de contornos HMBC da caseargrewiina Fhb (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 181

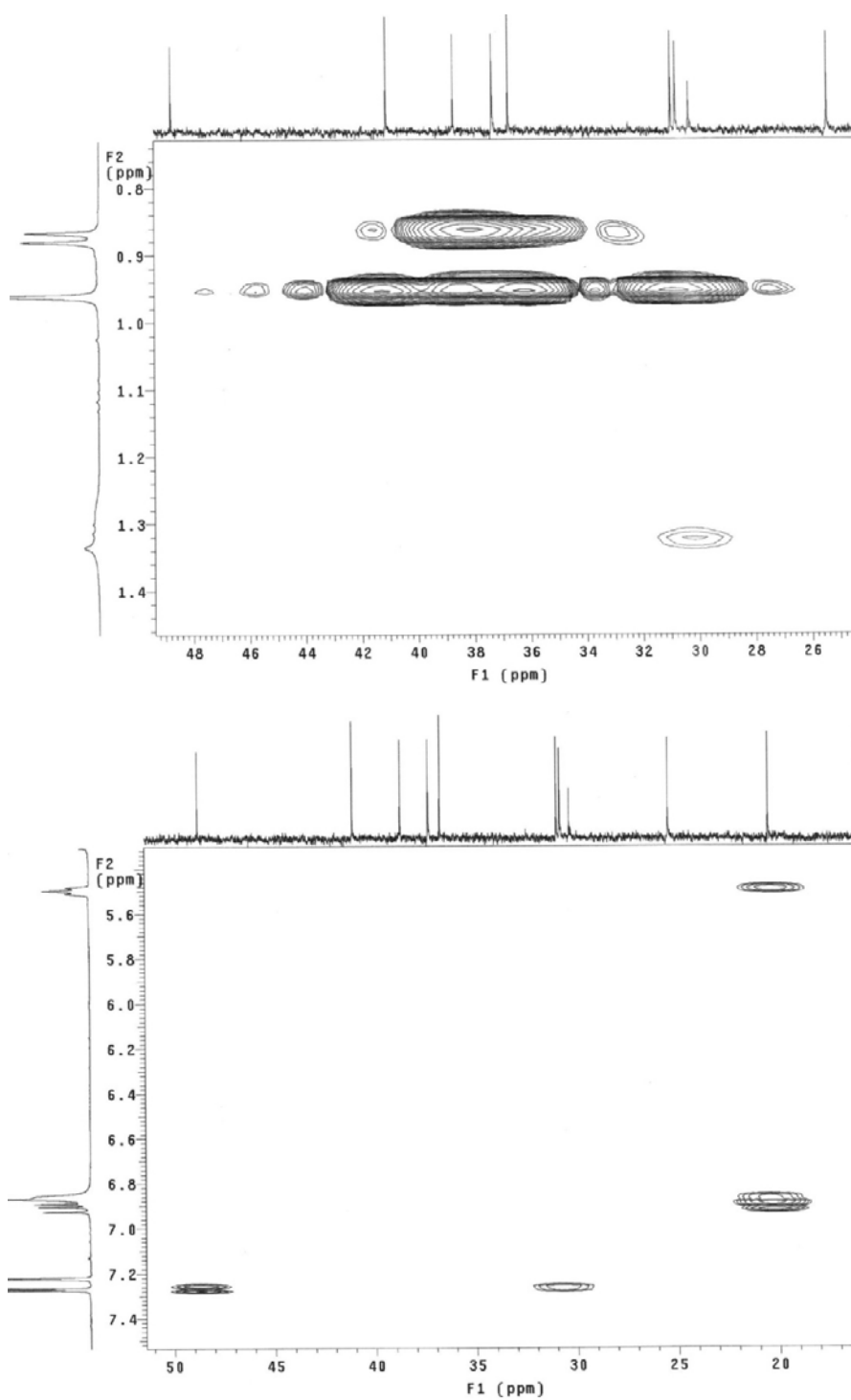


Figura: Expansões do mapa de contornos HMBC da caseargreina Fhb (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 182

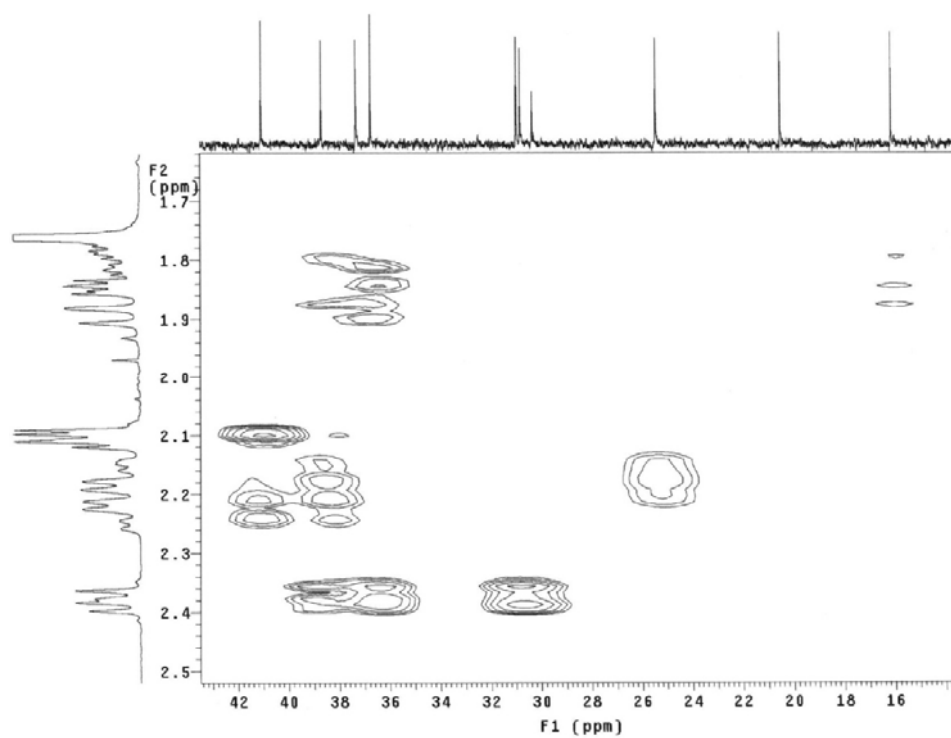


Figura: Expansão do mapa de contornos HMBC da caseargrewiina Fhb (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 183

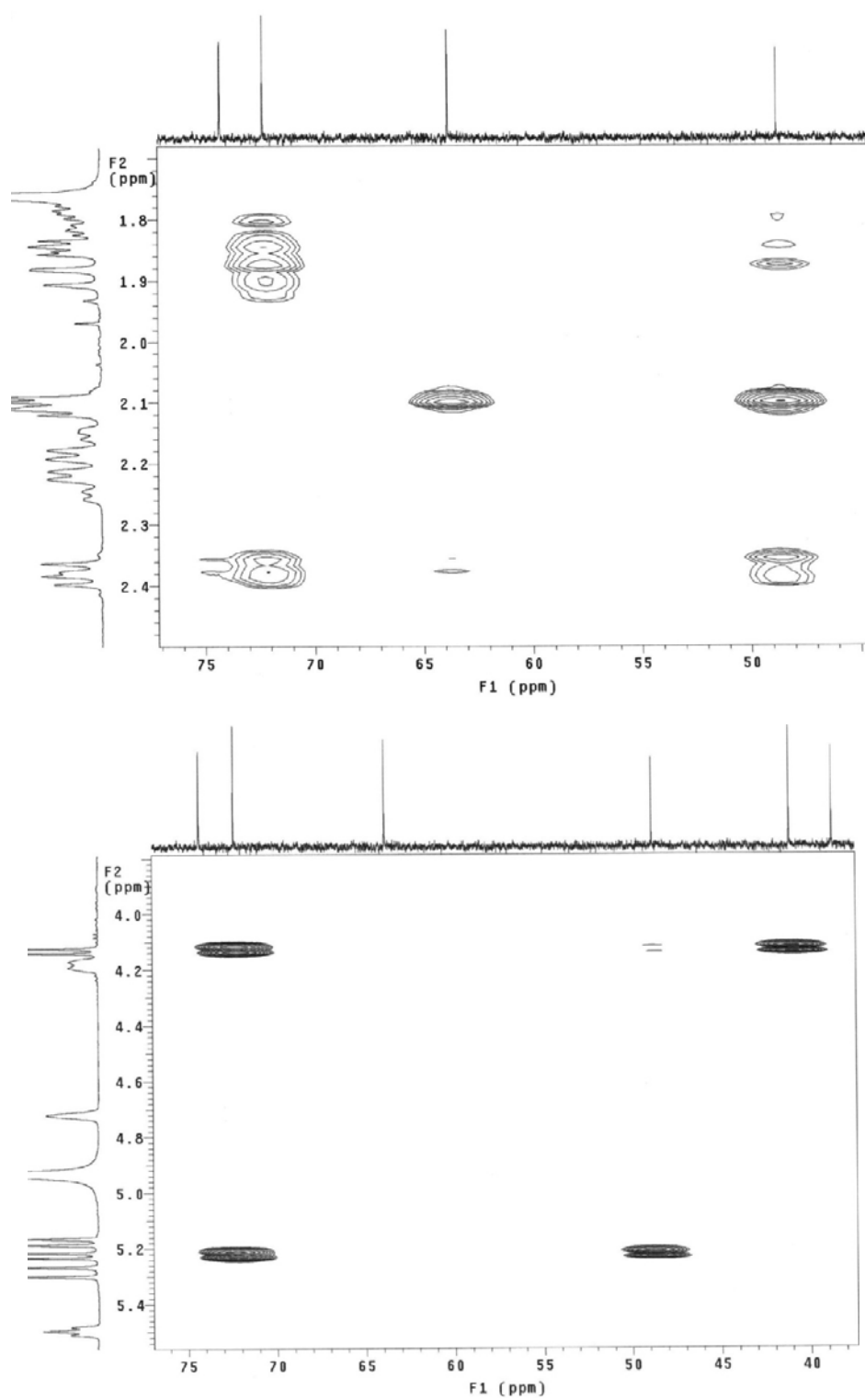


Figura: Expansões do mapa de contornos HMBC da caseargrewiina Fhb (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 184

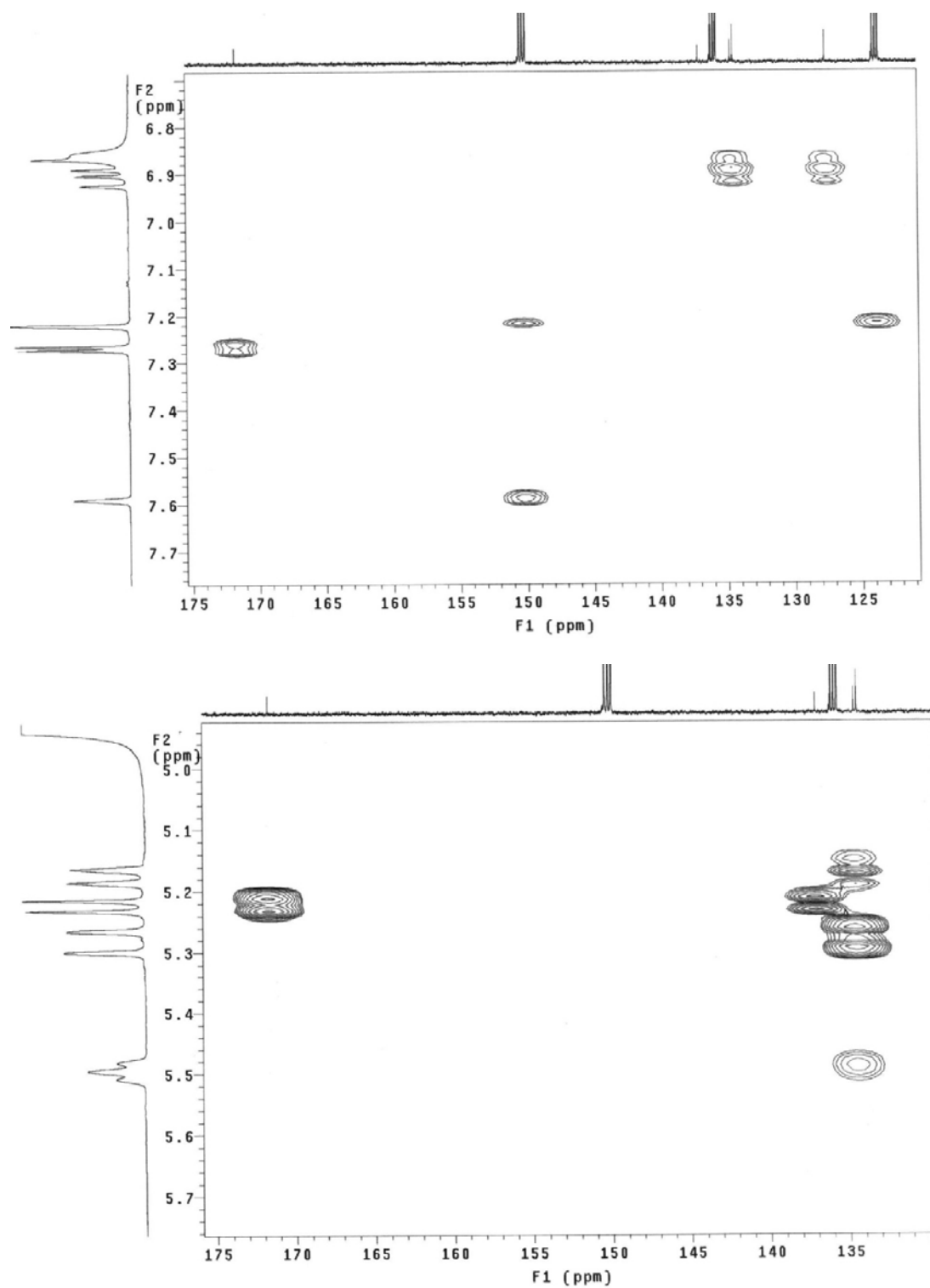


Figura: Expansões do mapa de contornos HMBC da caseargrewiina Fhb (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 185

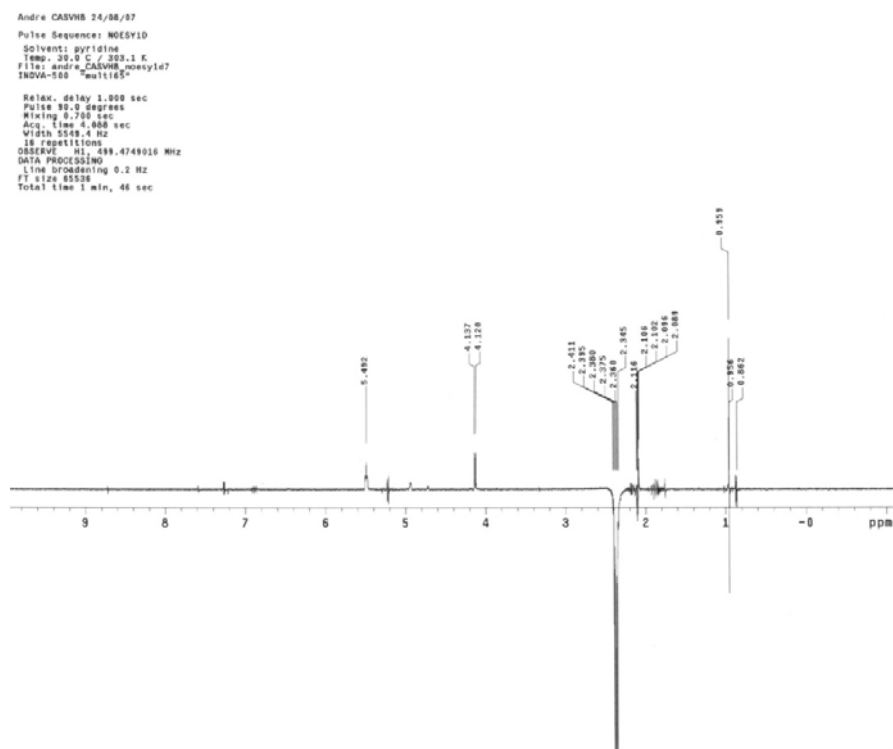
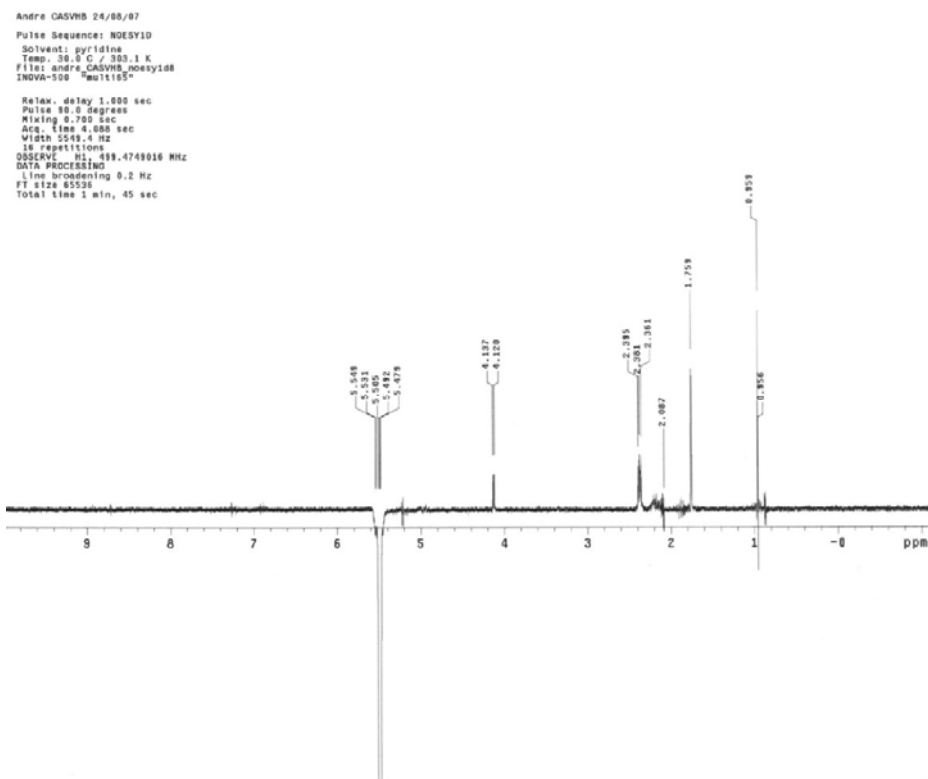
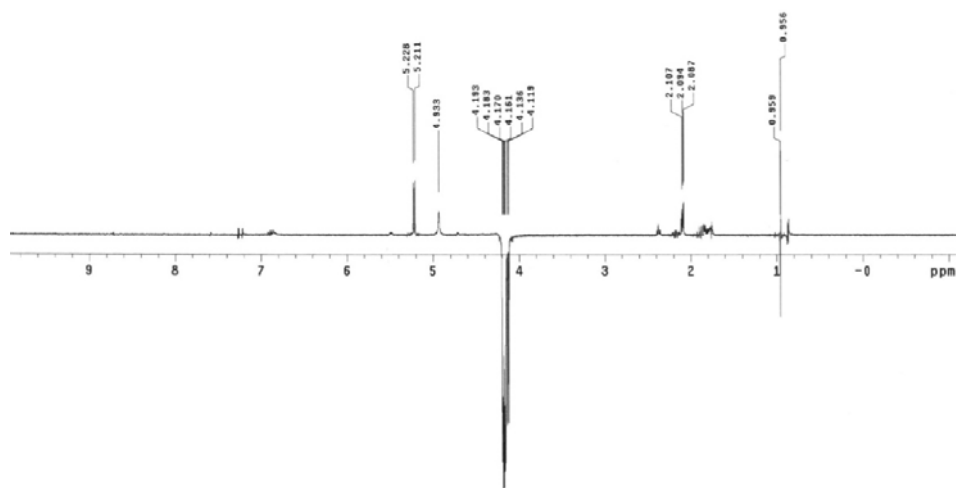


Figura: Espectros de NOESY1D da caseargrewiina Fhb (piridina-d₅, 11,7 T).

ANEXO 186

Andre CASVNS 24/08/07
 Pulse Sequence: NOESY1D
 Solvent: pyridine
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 File: andre_CASVNS_noesy1d4
 INOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Mixing 5.700 sec
 Acq. time 4.000 sec
 Width 5500.4 Hz
 16 repetitions
 OBSERVE F1, 499.4749016 MHz
 DATA PROCESSING
 Line broadening 0.2 Hz
 FT size 65536
 Total time 1 min, 46 sec



Andre CASVNS 24/08/07
 Pulse Sequence: NOESY1D
 Solvent: pyridine
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 File: andre_CASVNS_noesy1d1
 INOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Mixing 6.700 sec
 Acq. time 4.000 sec
 Width 5500.4 Hz
 16 repetitions
 OBSERVE F1, 499.4749016 MHz
 DATA PROCESSING
 Line broadening 0.2 Hz
 FT size 65536
 Total time 3 min, 20 sec

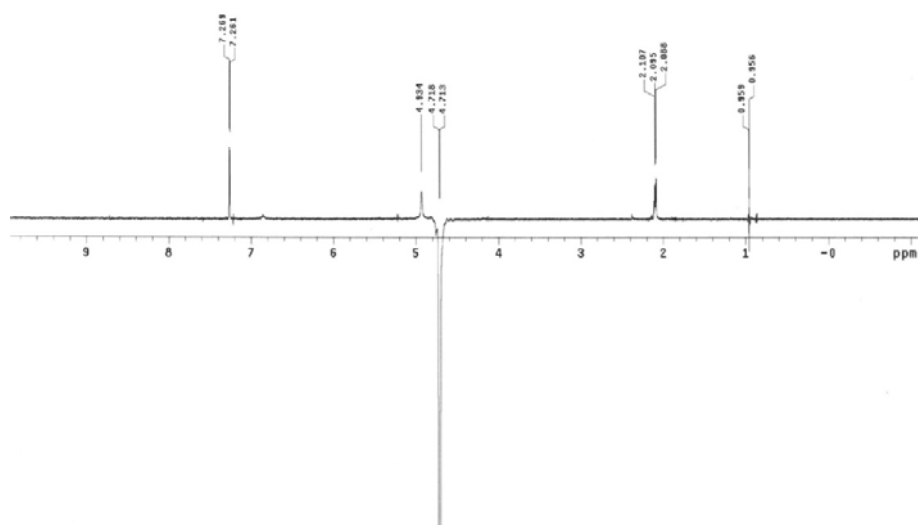


Figura: Espectros de NOESY1D da caseargrewiina Fhb (piridina-d₅, 11,7 T).